

УДК: 595.412:576.316

Цитогенетика созревания ооцитов тихоходки *Macrobiotus glebkai* Biserov, 1990 (Tardigrada: Eutardigrada: Macrobiotidae)

Е.А.Киося

Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
yevgenkiosya@gmail.com

Ооциты тихоходок были впервые исследованы при помощи методики давленных препаратов хромосом с окрашиванием ацетогематоксилином и последующим просветлением в ацетохлоралгидрате. Установлено, что тихоходки раздельнополого вида *Macrobiotus glebkai* Biserov, 1990 имеют 12 хромосом ($2n=12$). Созревание большинства ооцитов в яичнике приостанавливается на стадии поздней метафазы 1-го деления мейоза, когда биваленты выстраиваются вдоль оси веретена деления, однако изредка можно наблюдать и более поздние стадии (анафазу и телофазу I). В яичнике каждой самки ооциты находятся на одинаковой стадии созревания, что указывает на циклический тип созревания ооцитов у данного вида.

Ключевые слова: тихоходки, *Macrobiotus glebkai*, хромосомы, мейоз, ацетогематоксилин.

Цитогенетика дозрівання ооцитів тихохода *Macrobiotus glebkai* Biserov, 1990 (Tardigrada: Eutardigrada: Macrobiotidae)

Є.О.Киося

Ооцити тихоходів були вперше досліджені за допомогою методики давлених препаратів хромосом з фарбуванням ацетогематоксиліном і наступним освітленням у ацетохлоралгідраті. Встановлено, що тихоходи роздільностатевого виду *Macrobiotus glebkai* Biserov, 1990 мають 12 хромосом ($2n=12$). Дозрівання більшості ооцитів в яєчнику призупиняється на стадії пізньої метафазі 1-го поділу мейозу, коли биваленти вишиковуються вздовж вісі веретена поділу, однак зрідка можна спостерігати й пізніші стадії (анафазу I та телофазу I). В яєчнику кожної самиці ооцити знаходяться на однаковій стадії дозрівання, що вказує на циклічний тип дозрівання ооцитів в цього виду.

Ключові слова: тихоходи, *Macrobiotus glebkai*, хромосомы, мейоз, ацетогематоксилін.

Cytogenetics of oocyte maturation in a tardigrade *Macrobiotus glebkai* Biserov, 1990 (Tardigrada: Eutardigrada: Macrobiotidae)

Ye.O.Kiosya

The method of staining chromosomes with acetic hematoxylin followed by clarifying and squashing in chloralhydrate was adapted to studying tardigrade oocytes. It has been shown that bisexual tardigrades *Macrobiotus glebkai* Biserov, 1990 have 12 chromosomes ($2n=12$). Maturation of most oocytes pauses in the ovary at the late metaphase of the 1st meiotic division when the bivalents are arranged along the axis of the spindle, however occasional finds of later phases (anaphase I and telophase I) were recorded. All oocytes from the same female always presented the same phase, which is an evidence of cyclic pattern of oocyte maturation in this species.

Key words: Tardigrada, *Macrobiotus glebkai*, chromosomes, meiosis, acetic hematoxylin.

Введение

Первые сведения о хромосомах тихоходок были получены ещё в 1962 г. Д.Аммерманном, изучавшим серии гистологических срезов *Hypsibius dujardini*, окрашенных гематоксилином (Ammermann, 1962; 1967). Однако применённая им методика широкого распространения не получила, и на протяжении длительного времени были исследованы хромосомы всего нескольких видов тихоходок.

Р.Бертолани была разработана методика цитогенетического анализа тихоходок на давленных тотальных микропрепаратах в лакто-ацето-орсеине. С помощью этой методики им были определены хромосомные числа многих видов наземных и пресноводных тихоходок, описаны случаи амеиотического и мейотического партеногенеза, а также гермафродитизма у тихоходок, показано сосуществование цитотипов различной пloidности в пределах некоторых морфотипов (Bertolani, 1982; 1994; 2001).

Также на тихоходках были успешно опробованы различные техники высушивания хромосом на воздухе с последующим окрашиванием красителем Гимза, нитратом серебра, или же С-бэндингом (Rebecchi, 1991; Rebecchi et al., 2002; Altiero, Rebecchi, 2003). Эти новые подходы позволили получить новые сведения о морфологии хромосом тихоходок, однако малопригодны для определения хромосомного числа из-за сильного разброса хромосом и частых потерь отдельных гомологов на препаратах.

Хотя тихоходки не являются истинно эутеличными животными, как, например, коловратки, митозы в их соматических клетках встречаются крайне редко. К тому же, митотические хромосомы тихоходок чрезвычайно мелкие (около 1 мкм). Поэтому исследования хромосом тихоходок, как правило, проводятся на клетках зародышевой линии (Bertolani, 1994).

В данной работе для изучения мейоза тихоходок впервые применена несложная методика окрашивания давленных препаратов ацетогематоксилином, которая была предложена Ю.А.Смирновым для исследования хромосом плодовых деревьев (Смирнов, 1968) и впоследствии успешно применялась в цитогенетике животных, в том числе тутового шелкопряда (Щегельская и др., 1986) и различных видов млекопитающих (Щегельская, Клименко, 1997).

Материалы и методы

Основным объектом исследования была локальная популяция тихоходок из пробы мха, собранного в свежей дубраве в окрестностях села Студенок Изюмского района Харьковской области (49°05' с.ш., 37°29' в.д.) в июле 2007 г. Примерный объем пробы составлял 5 см³. Данная проба мха была высушена на воздухе и около двух с половиной лет сохранялась в бумажном конверте при комнатной температуре. В течение этого времени тихоходки находились в состоянии ангидробิโอ́за и большинство из них сохраняли жизнеспособность. Впоследствии проба была разделена на 10 равных частей, которые были последовательно использованы для изучения.

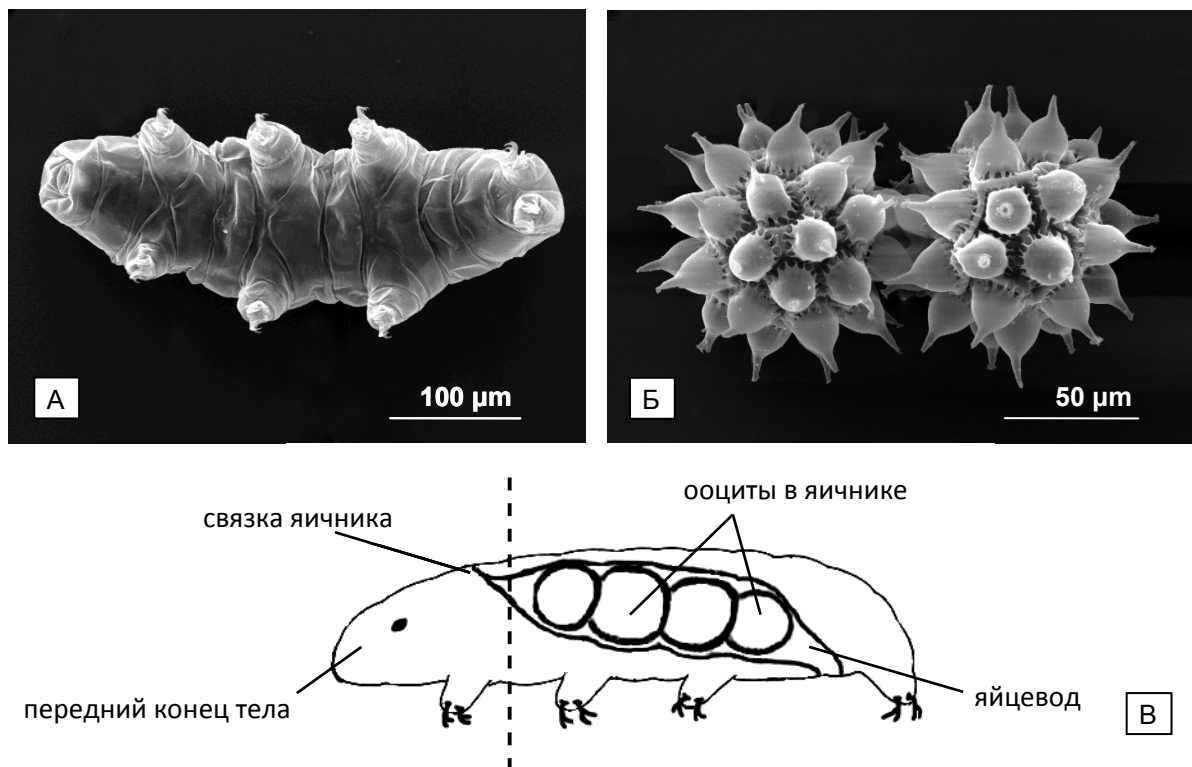


Рис. 1: а – габитус *M. glebkai*, вид снизу, растровая электронная микроскопия; б – отложенные яйца *M. glebkai*, растровая электронная микроскопия; в – схема вскрытия тихоходки для извлечения ооцитов из яичника (пунктиром обозначена линия разреза).

Беспозвоночных извлекали из пробы по методике Моргана и Кинга (Morgan, King, 1976), с небольшими изменениями. Мох замачивали в небольшом объеме отстоянной водопроводной воды на срок от 3 до 6 ч. Затем тихоходок наркотизировали, прибавляя равный объем 20% раствора

этилового спирта, и через 15 мин тщательно встряхивали и отжимали мох. Эту процедуру повторяли трижды, после чего просматривали отжатую суспензию на тёмном поле при 25-кратном увеличении стереоскопического микроскопа.

Для исследования хромосом отбирали самок тихоходок с крупными ооцитами в яичнике. Их фиксировали в свежеприготовленном фиксаторе Кларка (3 ч. 96% этилового спирта на 1 ч. ледяной уксусной кислоты) на протяжении 45 мин, предварительно добавив в него несколько капель насыщенного раствора уксуснокислого железа (таким образом, фиксация совмещалась с протравой). Затем тихоходок помещали в пластиковую пробирку с крышкой, заливали 1% гематоксилином на 50% уксусной кислоте и окрашивали на протяжении 2 ч, подогревая в термостате до 60°C. После этого тихоходок вскрывали при помощи тонких стальных или вольфрамовых булавок и извлекали ооциты (рис. 1 в). Их переносили на обезжиренное предметное стекло и раздавливали частью покровного стекла (5×5 мм) в капле 40% раствора хлоралгидрата в уксусной кислоте. Для предотвращения высыхания края покровного стекла обводили лаком и сохраняли полученные временные микропрепараты в герметичной коробке при температуре 5°C.

Прочие обнаруженные тихоходки и их яйца либо а) использовались для приготовления тотальных давленных микропрепаратов на основе 1% лакто-ацето-орсеина по методике Бертолани (Bertolani, 1982), либо б) окрашивались 1% ацетокармином и заключались в жидкость Фора-Берлезе по методике Бисерова (Бисеров, 1989), либо в) были приготовлены для растровой (сканирующей) электронной микроскопии по методике Шустера и др. (Schuster et al., 1980) в модификации Бертолани и Ребекки.

Микропрепараты исследовали при увеличении ×1000 светового микроскопа, с использованием масляной иммерсии. Измерения осуществляли при помощи окуляр-микрометра. Фотографии получали при помощи цифровой фотокамеры. Пол тихоходок определяли на тотальных давленных (временных) и постоянных микропрепаратах по характерным особенностям ультраструктуры гонад.

Электронно-микроскопические исследования проводились в межфакультетском центре крупных инструментов университета Модены и Реджо-Эмилии (Италия).

Результаты

В исследованной пробе мха были обнаружены нематоды, бделлоидные коловратки и инфузории, подсчёт и определение которых не производились, а также 764 экземпляра тихоходок, принадлежащих к одному виду – *Macrobiotus glebkai* Biserov, 1990 (рис. 1 а, б). Этот вид впервые зарегистрирован на территории Харьковской области.

Из общего числа тихоходок 155 составляли яйца, 184 – самки (в т.ч. 32 – самки с крупными ооцитами на стадии созревания), 270 – самцы, 74 – ювенильные особи и 81 – взрослые особи, пол которых не удалось установить.

Случаи спаривания тихоходок отмечены не были, однако в половых путях 15 самок были обнаружены сперматозоиды. Принимая во внимание это, а также то, что самцы составляли значительную долю в исследованной локальной популяции, можно заключить, что вид *M. glebkai* является раздельнополым (т.е. бисексуальным и, вероятно, амфимиктическим).

Количество созревающих ооцитов в яичнике самок варьировало от 1 до 5 шт., но большинство самок имели по 3 ооцита. Всего было исследовано 85 ооцитов от 28 самок. Из них подавляющее большинство (76) находились на стадии метафазы I мейоза, однако также встречались профазы I (5 ооцитов), анафазы I (2 ооцита) и телофазы I (2 ооцита). Все ооциты, извлечённые из одной самки, находились на одинаковой стадии созревания. Ооциты со сформированной скорлупой в яичниках самок обнаружены не были.

Хромосомы тихоходок *M. glebkai* исследованы впервые. По результатам подсчёта хромосом на метафазных пластинках ооцитов установлено, что *M. glebkai* имеет диплоидный хромосомный набор $2n=12$.

Ацетогематоксилином хорошо окрашиваются не только хромосомы, но и нити веретена деления. Поэтому, несмотря на малый размер ооцитов тихоходок (менее 0,1 мм), уже при 25-кратном увеличении стереоскопического микроскопа во всех ооцитах на стадии метафазы веретено деления можно различить в виде темного овального пятнышка, смещённого к периферии цитоплазмы.

В поздней метафазе I видны 6 бивалентов, располагающихся вдоль оси веретена деления, таким образом, что гомологи уже не лежат параллельно экватору веретена, но ориентированы к его полюсам (рис. 2 а). В пределах одной метафазной пластинки все гомологи имеют сходное строение и размеры (от 2,5 до 3,5 мкм), что сильно затрудняет кариотипирование. Впрочем, отмечено различное расстояние между проксимальными частями гомологов: в одних бивалентах они плотно примыкают друг к другу, а в других – отстоят сравнительно далеко.

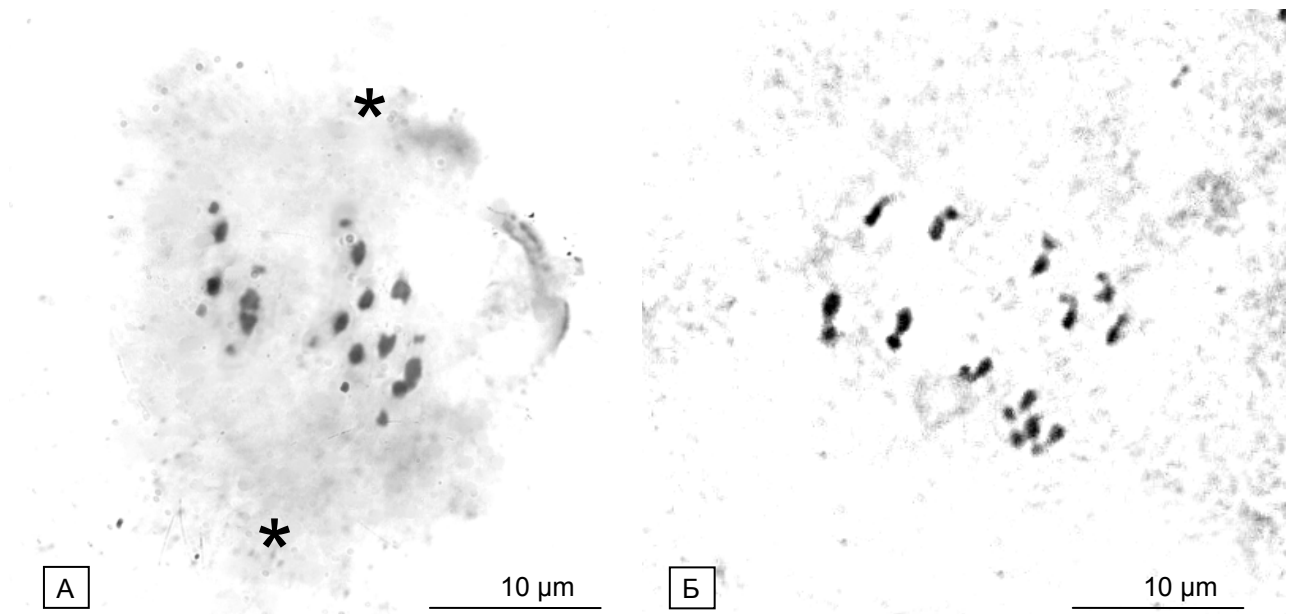


Рис. 2: а – хромосомы *M. glebkai* в поздней метафазе I, латерально (звёздочками отмечены полюса раздавленного веретена деления; дистальные части некоторых гомологов не видны); б – хромосомы *M. glebkai*, в анафазе I, латерально

Каждый гомолог состоит из двух сестринских хроматид, плотно прилежащих друг к другу. В составе каждой хроматиды, в свою очередь, можно различить 3 части. Проксимально располагается наиболее крупная и интенсивно окрашиваемая часть (единственная, которую видно на тотальных препаратах тихоходок). Дистально располагается мелкая интенсивно окрашиваемая часть («точка»). Между ними находится слабо окрашиваемая часть, имеющая вид гибкой полупрозрачной ленты.

В поздней профазе I хромосомы сильнее деспирализованы и окрашиваются значительно менее интенсивно. Биваленты имеют вид крестов и содержат хиазмы. В анафазе I можно наблюдать расхождение хромосом к полюсам веретена (рис. 2 б), а в телофазе I – разрушение веретена деления и формирование дочерних ядер.

Обсуждение

Методика окрашивания препаратов хромосом ацетогематоксилином с последующим просветлением и раздавливанием в хлоралгидрате показала свою эффективность для изучения хромосом тихоходок. Она позволяет видеть детали строения хромосом, невидимые при использовании стандартной методики тотальных давленных препаратов в лакто-ацето-орсеине. В то же время, данная методика позволяет сохранить для обозрения полный хромосомный набор, в отличие от различных методик высушивания на воздухе.

Хромосомный набор тихоходок *M. glebkai* сходен с хромосомными наборами диплоидных бисексуальных цитотипов других представителей семейства Macrobiotidae, например, *Paramacrotus richtersi* (Murray, 1911) и *Xerobiotus pseudohufelandi* (Iharos, 1966). Однако в литературе указывается, что эти виды имеют только акроцентрические хромосомы (Altiero, Rebecchi, 2003), тогда как по положению перетяжки хромосом *M. glebkai* в анафазе можно скорее предположить, что хромосомы являются субметацентрическими. С другой стороны, ещё не выяснено, какие именно части метафазных хромосом данного вида тихоходок соответствуют центромерному региону.

Неодинаковое удаление проксимальных частей гомологов в поздней метафазе I указывает на асинхронное вхождение хромосом в анафазу. Эта особенность уже регистрировалась другими исследователями при изучении хромосом тихоходок альтернативными методами (Rebecchi et al., 2002).

Нахождение большинства созревающих ооцитов на стадии метафазы I не является особенностью исследованной локальной популяции *M. glebkai*, но характерно для большого количества популяций разных видов тихоходок (Bertolani, 1982). Таким образом, мейоз в

созревающих ооцитах не доходит до конца и приостанавливается – вероятно, до момента осеменения ооцита. Если это так, редко встречающиеся анафаза I и телофаза I соответствуют короткому периоду после осеменения яйца, но до его откладки. Тот факт, что все ооциты в яичнике каждой самки находятся на одинаковой стадии созревания, свидетельствует о циклическом типе созревания ооцитов, являющемся характерным для большинства наземных тихоходок.

Благодарности

Я искренне благодарю Н.В.Коваленко и проф. В.В.Клименко за помощь в освоении методики и ценные замечания, позволившие значительно улучшить мою работу, а также коллектив лаборатории адаптационных процессов и эволюционных механизмов университета Модены и Реджо-Эмилии, в особенности проф. Роберто Бертолани, проф. Лорену Ребекки и докт. Тициану Альтиеро – за всестороннее содействие. Также я очень признателен Глебу Щеплыкину, который помог мне при сборе проб для исследования.

Список литературы

- Бисеров В.И. Новые виды тихоходок фауны СССР // Зоологический журнал. – 1990. – Т.69, вып.5. – С. 17–25. /Biserov V.I. Novyye vidy tikhokhodok fauny SSSR // Zoologicheskij zhurnal. – 1990. – Т.69, вып.5. – С. 17–25/
- Бисеров В.И. Фауна тихоходок Европейской части СССР. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.08 / ЗИН АН СССР. – Л., 1989. – 23с. /Biserov V.I. Fauna tikhokhodok Yevropeyskoy chasti SSSR. Avtoref. diss. ... kand. biol. nauk: 03.00.08 / ZIN AN SSSR. – L., 1989. – 23s./
- Смирнов Ю.А. Ускоренный метод исследования соматических хромосом плодовых // Цитология. – 1968. – Т.10, №12. – С. 1601–1602. /Smirnov Yu.A. Uskorennyy metod issledovaniya somaticheskikh khromosom plodovykh // Tsitologiya. – 1968. – Т.10, №12. – С. 1601–1602/
- Щегельская Е.А., Клименко В.В. «Элиминационный хроматин» в мейозе ооцитов мышей, свиней и коров при созревании in vitro // Цитология и генетика. – 1997. – Т.31, №3. – С. 30–35. /Shchegel'skaya Ye.A., Klimenko V.V. «Eliminatsionnyy khromatin» v meyoze ootsitov myshey, sviney i korov pri dozrevanii in vitro // Tsitologiya i genetika. – 1997. – Т.31, №3. – С. 30–35/
- Щегельская Е.А., Спиридонова Т.Л., Клименко В.В. Методы цитологического анализа профазы мейоза у тутового шелкопряда // Изв. АН МССР. Биол. и хим. науки. – 1986. – №1. – С. 67–70. /Shchegel'skaya Ye.A., Spiridonova T.L., Klimenko V.V. Metody tsitologicheskogo analiza profazy meyoza u tutovogo shelkopyrada // Izv. AN MSSR. Biol. i khim. nauki. – 1986. – №1. – С. 67–70/
- Altiero T., Rebecchi L. First evidence of achiasmatic male meiosis in the water bears *Richtersius coronifer* and *Macrobiotus richtersi* (Eutardigrada, Macrobiotidae) // Hereditas. – 2003. – Vol.139. – P. 116–120.
- Ammermann D. Parthenogenese bei dem Tardigraden *Hypsibius dujardini* // Naturwissenschaften. – 1962. – Bd.49. – S.115.
- Ammermann D. Die Cytologie der Parthenogenese bei dem Tardigraden *Hypsibius dujardini* // Chromosoma (Berl.). – 1967. – Bd.23., Nr.203. – S. 203–213.
- Bertolani R. Cytology and reproductive mechanisms in tardigrades // Proc. of the 3-rd International Symposium on Tardigrada (Johnson City, 1980). – Johnson City: East Tennessee University Press. – 1982. – P. 93–114.
- Bertolani R. Tardigrada // In: Reproductive biology of invertebrates, ed. K.G.Adiyodi. – New Delhi: Oxford & IBH Publishing Co, 1994. – Vol.VI, Part B. – P. 25–37.
- Bertolani R. Evolution of the reproductive mechanisms in tardigrades – a review // Zool. Anzeiger. – 2001. – Vol.240. – P. 247–252.
- Morgan C.I., King P.E. British tardigrades. – London-NY: Academic Press, 1976. – 133p.
- Rebecchi L. Karyological analysis of *Macrobiotus pseudohufelandi* (Tardigrada: Macrobiotidae), and a new finding of a tetraploid population // Caryologia. – 1991. – Vol.44, №3–4. – P. 301–307.
- Rebecchi L., Altiero T., Bertolani R. Banding techniques on tardigrade chromosomes: the karyotype of *Macrobiotus richtersi* (Eutardigrada: Macrobiotidae) // Chromosome research. – 2002. – Vol.10. – P. 437–443.
- Schuster R.O., Nelson D.R., Grigarick A.A., Christenberry D. Systematic criteria of the Eutardigrada // Trans. Amer. Microsc. Soc. – 1980. – Vol.99, №3. – P. 284–303.

Представлено: О.В.Лукашем / Presented by: O.V.Lukash

Рекомендовано до друку: Д.А.Шабановим / Recommended for publishing by: D.A.Shabanov

Подано до редакції / Received: 01.10.2010.