

	Название статьи	Страницы	Цит.
<b>ОБЗОРЫ</b>			
<input type="checkbox"/>	<b>АСИММЕТРИЧНОЕ ДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК В МОРФОГЕНЕЗЕ МАКРОХЕТ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i></b> Бухарина Т.А., Фурман Д.П.	83-93	0
<b>ФИЗИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ</b>			
<input type="checkbox"/>	<b>ДИНАМИКА ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА В ОНТОГЕНЕЗЕ НАСЕКОМЫХ ЩИТНИКА ЛИНЕЙЧАТОГО (<i>GRAPHOSOMA LINEATUM L.</i>) И СОВКИ КАПУСТНОЙ (<i>MAMESTRA BRASSICAE L.</i>)</b> Алексеева Т.А., Озернюк Н.Д.	94-100	0
<b>БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ</b>			
<input type="checkbox"/>	<b>РАЗВИТИЕ АНТИПОДАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЗАРОДЫШЕВОГО МЕШКА ПШЕНИЦЫ</b> Чабан И.А., Лазарева Е.М., Кононенко Н.В., Поляков В.Ю.	101-115	0
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭМБРИОЛОГИЯ</b>			
<input type="checkbox"/>	<b>ИНДУКЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ЗАДНЕГО КОНЦА ПЛАНУЛЫ МОРСКОГО ГИДРОИДА <i>DYNAMENA PUMILA</i></b> Краус Ю.А.	116-125	0
<b>МОРФОГЕНЕЗ</b>			
<input type="checkbox"/>	<b>ПАССИВНЫЕ И АКТИВНЫЕ РЕАКЦИИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ НА ДЕЙСТВИЕ ДОЗИРОВАННЫХ МЕХАНИЧЕСКИХ СИЛ</b> Мансуров А.Н., Белоусов Л.В.	126-132	1
<b>ГЕНЕТИКА РАЗВИТИЯ</b>			
<input type="checkbox"/>	<b>ДИСПЕРМНЫЙ АНДРОГЕНЕЗ У ОСЕТРОВЫХ РЫБ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ: ПОЛУЧЕНИЕ АНДРОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОТОМСТВА СИБИРСКОГО ОСЕТРА И АНДРОГЕНЕТИЧЕСКИХ ГИБРИДОВ МЕЖДУ СИБИРСКИМ И РУССКИМ ОСЕТРАМИ</b> Грунина А.С., Рекубрятский А.В., Цветкова Л.И., Барминцева А.Е., Васильева Е.Д., Ковалев К.В., Полуэктова О.Г.	133-145	0
<input type="checkbox"/>	<b>ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕНА <i>PINOID/ABRUPTUS</i> С ГЕНОМ <i>AGAMOUS</i> □ НЕГАТИВНЫМ РЕГУЛЯТОРОМ ПРОЛИФЕРАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В МЕРИСТЕМЕ ЦВЕТКА <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i></b> Кавай-оол У.Н., Карпенко О.Ю., Ежова Т.А.	146-150	0
<input type="checkbox"/>	<b><i>FIMBRIATA RETIOLES</i> □ ГЕН <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>, КОНТРОЛИРУЮЩИЙ ПРОЦЕССЫ ДЕЛЕНИЯ И РОСТА КЛЕТОК ОРГАНОВ ЦВЕТКА</b> Кавай-оол У.Н., Ежова Т.А.	151-158	0
<b>ПИСЬМО В РЕДАКЦИЮ</b>			
<input type="checkbox"/>	<b>ПИСЬМО В РЕДАКЦИЮ ЖУРНАЛА "ОНТОГЕНЕЗ"</b> Асланян М.М., Солдатова О.П.	159-160	0

УДК 575.16:951.3595.773.4

## АСИММЕТРИЧНОЕ ДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК В МОРФОГЕНЕЗЕ МАКРОХЕТ *Drosophila melanogaster*<sup>1</sup>

© 2011 г. Т. А. Бухарина<sup>1</sup>, Д. П. Фурман<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, 630090 Новосибирск, пр. Лаврентьева, д. 10

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2

E-mail: bukharina@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 28.12.09 г.

Окончательный вариант получен 15.04.10 г.

Асимметричное деление клеток (АДК) является основным процессом, создающим разнообразие клеток у многоклеточных организмов. В результате асимметричного деления дочерние клетки приобретают отличия от родительской клетки и друг от друга по своим способностям к дифференцировке и специализации в определенном направлении. Этот тип деления встречается у широкого круга живых организмов от бактерий до позвоночных. Показано, что молекулярно-генетические механизмы контроля АДК эволюционно консервативны. Белки, участвующие в процессе АДК у разных видов животных, имеют высокую степень гомологии.

В качестве модельной системы для изучения механизмов генетического контроля асимметричного деления широко используются сенсорные органы – щетинки (макрохеты) дрозофилы. Щетинки, упорядоченным образом расположенные на голове и теле мухи, играют роль механорецепторов. Каждый из них состоит из 4-х специализированных клеток – потомков единственной родительской клетки сенсорного органа (РКСО), которая обособляется из эктодермальных клеток крылового имагинального диска на стадии личинки позднего третьего возраста. Основой дифференцировки и последующей специализации дочерних клеток РКСО является процесс асимметричного деления.

В обзоре систематизированы экспериментальные данные о генах и их продуктах, контролирующих асимметричные деления РКСО и дочерних клеток, а также специализацию последних. Рассмотрены основные механизмы, детерминирующие время вступления клетки в асимметричный митоз и обеспечивающие структурные характеристики процесса асимметричного деления – полярное распределение белковых детерминант Numb и Neuralized, ориентацию веретена деления относительно этих детерминант и неравную сегрегацию детерминант по дочерним клеткам, определяющую направление их развития.

**Ключевые слова:** асимметричное деление, родительская клетка сенсорного органа, гены-селекторы, сигнальные пути, макрохеты, дрозофила.

### ВВЕДЕНИЕ

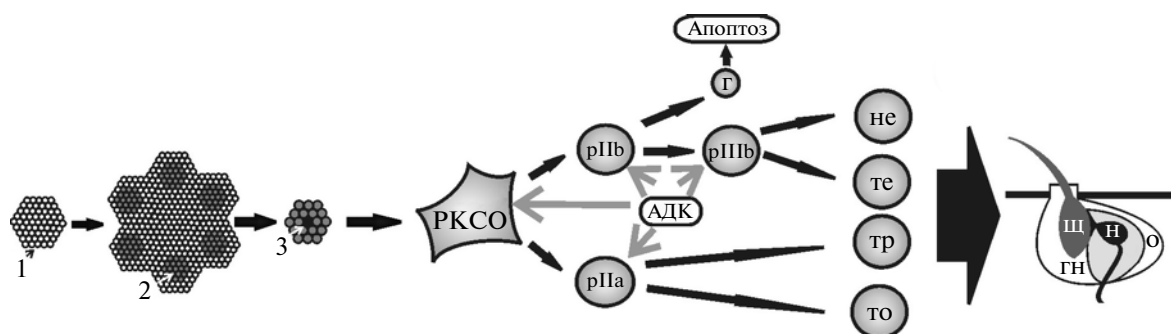
Проблема асимметричного деления клеток (АДК) занимает в биологии одно из центральных мест, поскольку этот процесс, с одной стороны, создает возможность самоподдержания и самообновления клеточных популяций и, с другой стороны, определяет возможность структурно-функциональной дифференцировки и специализации клеток.

Стратегически дифференцировка клеток может достигаться двумя путями: либо различным направлением развития изначально тождественных дочер-

них клеток, возникших при делении исходной клетки, либо через появление дочерних клеток, уже наделенных изначально различными потенциями к дифференцировке в определенном направлении. Первый путь реализуется при дальнейшем воздействии на дочерние клетки внешних стимулов различного происхождения, тогда как второй связан с процессом асимметричного деления родительской клетки.

Необходимыми и достаточными условиями асимметричного деления являются поляризация родительской клетки по распределению определенных белковых детерминант и строгое позиционирование веретена деления вдоль оси поляризации клетки, что ведет к неравной сегрегации по дочерним клеткам компонентов, детерминирующих их дальнейшую судьбу.

<sup>1</sup> Работа выполнена при поддержке Программ РАН 15 и 22.8, программы СО РАН “Геномика, протеомика, биоинформатика: высокотехнологичные исследования молекулярно-биологических и молекулярно-генетических систем и процессов”, Междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН № 119, Госконтракта с ФАНИ № 02.512.11.2332 и гранта НШ-2447.2008.4.



**Рис. 1.** Схема морфогенеза щетиночного органа. 1 — эктодермальные клетки крылового имагинального диска; 2 — пронеиральный кластер (темно-серые); 3 — пронеиральный кластер с клеткой РКСО в центре; pIIa, pIIb, pIIIb — дочерние клетки, г — клетка глии, которая впоследствии подвергается апоптозу, не — нейрон, те — текоген, тр — трихоген, то — тормоген, щ — щетинковая клетка, гн — гнездовая клетка (цоколь), о — клетка оболочки нерва, н — биполярный нейрон.

Асимметричное деление — процесс эволюционно консервативный и наблюдается у представителей широкого круга таксономических групп как растительного, так и животного царств, отличаясь лишь в деталях (Wodarz, Huttner, 2003; Knoblich, 2008, Abrash, Bergmann, 2009). У многоклеточных организмов оно является базовым при формировании органов и тканей, у одноклеточных позволяет разнообразить типы клеток, обеспечивая оптимизацию существования популяции в целом (Horvitz, Herskowitz, 1992; Betschinger, Knoblich, 2004; Lawler, Brun, 2006; Терских и др., 2007; Abrash, Bergmann, 2009, Thorpe et al., 2009).

С проблемой асимметричного деления тесно смыкается проблема неопластического роста: показано, что неоплазия у многоклеточных связана с нарушениями регуляции АДК (Morrison, Kimble, 2006; Wodarz, Gonzalez, 2006; Caussinus, Hirth, 2007; Терских и др., 2009; Furthauer, Gonzalez-Gaitan, 2009; Yamashita, 2009).

Для исследования механизмов асимметричного деления используют нейробласты и клетки зародышевого пути дрозофилы, эмбриональные клетки *C. elegans*, стволовые клетки человека и других млекопитающих (Horvitz et al., 1983; Seery, Watt, 2000; Jan, Jan, 2001; Shen et al., 2002; Zhang et al., 2003; Rogiers, Jan, 2004; Lechler, Fuchs, 2005; Gaziova, Bhat, 2007). Наряду с этими объектами, адекватной моделью для изучения асимметричного деления служат и компоненты периферической нервной системы дрозофилы — сенсорные органы — щетинки (макрохеты), каждый из которых состоит из четырех специализированных клеток, происходящих из т.н. родительской клетки сенсорного органа (РКСО) путем последовательных асимметричных делений.

В обзоре систематизированы экспериментальные данные об основных генах и их продуктах, участвующих в процессах асимметричного деления РКСО и специализации клеток, формирующих де-

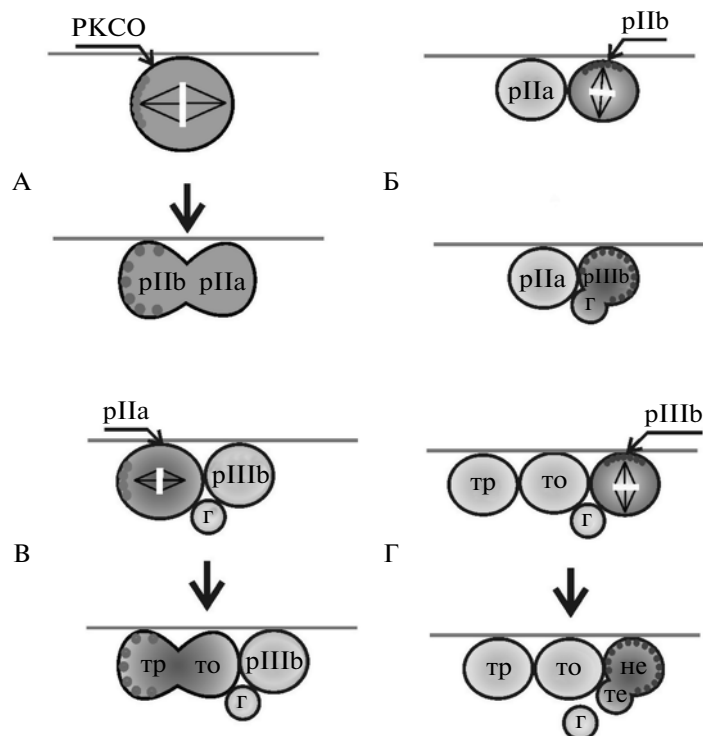
финитивный механорецептор. Рассмотрены условия и механизмы, обеспечивающие правильное протекание последовательных асимметричных митозов и специализацию дочерних клеток: время вступления родительской клетки в деление, поляризация РКСО по локализации белков Numb и Neuralized, позиционирование веретена деления относительно этих детерминант и их сегрегация по дочерним клеткам, участие генов-селекторов.

#### МОРФОГЕНЕЗ МАКРОХЕТ: ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Макрохеты как органы периферической нервной системы дрозофилы выполняют функцию механорецепторов. В составе дефинитивного органа различают кутикулярную внешнюю часть, видимую на поверхности тела имаго — это щетинка и цоколь, окружающий ее основание, и скрытые в полости тела собственно нейральные элементы — биполярный нейрон и его оболочку.

Морфогенез макрохет занимает около 55 часов и приходится на стадию позднего личиночного и раннего куколичного возраста дрозофилы (Hartenstein, Posakony, 1989; Huang et al., 1991; Campuzano, Modolell, 1992). Это трехэтапный процесс, в котором участвует несколько десятков генов.

На первом этапе в массе однородных эктодермальных клеток крыловых имагинальных дисков формируются т.н. пронеиральные кластеры — группы из 20–30 клеток. На втором этапе в границах каждого пронеирального кластера определяется единственная клетка, преддетерминированная к развитию механорецептора — РКСО. Заключительный этап составляют три последовательных асимметричных митотических деления РКСО, создающих основу для последующей специализации клеток-потомков (рис. 1).



**Рис. 2.** Два типа АДК в морфогенезе механорецепторов. А, Б — а-р тип; В, Г — а-б тип. Темно-серые и светло-серые точки внутри клеток — белковые детерминанты. Расшифровка сокращений соответствует рис. 1. Горизонтальной линией обозначена плоскость крылового имагинального диска.

В результате последовательных асимметричных митозов из каждой родительской клетки образуются четыре дочерние: трихоген, тормоген, нейрон и текоген. Двумя из них (трихо- и тормогеном) впоследствии формируются кутикулярные части механорецептора. Две другие дают, соответственно, биполярный нейрон и клетку его оболочки — нейральные составляющие механорецептора.

Уже первый асимметричный митоз РКСО предопределяет различные судьбы ее дочерних клеток pIIa и pIIb. В дальнейшем клетка pIIa даст начало трихо- и тормогену, тогда как клетка pIIb предетерминируется к специализации по нейральному пути. В результате ее деления возникает маленькая клетка глии и клетка pIIIb. Глиальная клетка подвергается апоптозу вскоре после образования, а pIIIb, в свою очередь, проходит асимметричный митоз с образованием нейрона и текогена.

Таким образом, ключевыми событиями морфогенеза макрохет являются детерминация РКСО и последовательные асимметричные митозы, которые проходит эта клетка и ее потомки. Детерминация РКСО детально рассмотрена нами ранее (Фурман, Бухарина, 2008; Furman, Bukharina, 2008, 2009). Ниже остановимся подробнее на молекулярно-генетических механизмах АДК.

## АСИММЕТРИЧНОЕ ДЕЛЕНИЕ КАК БАЗОВЫЙ ПРОЦЕСС СПЕЦИАЛИЗАЦИИ КЛЕТОК, СОСТАВЛЯЮЩИХ МЕХАНОРЕЦЕПТОР

### Типы АДК в нейрогенезе дрозофилы

Двумя сопряженными характеристическими признаками асимметричного деления клетки (АДК) являются поляризация клетки по расположению определенных белков, называемых белковыми детерминантами, и ориентация веретена деления относительно этих детерминант. Согласно этим признакам, АДК, происходящие при формировании нервной системы дрозофилы, подразделяются на два типа, соответствующие типам поляризации делящейся клетки (рис. 2).

Первый тип свойственен клеткам РКСО и pIIa. Это т.н. а-р (anterior-posterior), или РКСО-тип: ось распределения белковых детерминант и ориентация веретена совпадают с передне-задней осью делящейся клетки. Веретено симметрично, centrosомы сохраняют свои размеры и форму в течение всего митоза, а образовавшиеся дочерние клетки имеют практически одинаковые размеры. Плоскость деления перпендикулярна плоскости имагинального диска. Дочерние клетки при расхождении остаются в той же плоскости, что имагинальный диск и родительская клетка (рис. 2А, В).

Второй тип – т.н. а-б (apical-basal), или нейробластный, тип. При развитии механорецепторов ему следуют клетки рIb и рIIb. В этом случае относительно плоскости диска оси распределения белковых детерминант и веретена деления располагаются перпендикулярно, а плоскость деления – параллельно. Апикальная centrosома увеличивается в размере, а агрегирующиеся около нее микротрубочки удлиняются и образуют хорошо заметную “шапочку” в апикальной части клетки. Базальная centrosома имеет меньшие размеры и более короткие микротрубочки, что приводит к асимметрии веретена в анафазе и, как следствие, к смещению борозды деления и к различию в размерах дочерних клеток (рис. 2Б, Г). Дочерние клетки занимают позицию в плоскости, перпендикулярной плоскости диска (Jan, Jan, 2001; Roegiers et al., 2001).

#### *Гены, контролирующие АДК и специализацию дочерних клеток*

Генетический контроль прохождения АДК и специализации дочерних клеток осуществляется несколькими десятками генов, основных представителей которых условно можно разделить на следующие группы:

- гены регуляции собственно процесса асимметричного деления:

- гены, экспрессия которых определяет момент вступления клетки в митоз (*cdc2*, *String*, *phyllopod*, *seven-in-absentia*);

- гены белковых детерминант (*neuralized*, *numb*);

- гены, обеспечивающие поляризацию делящейся клетки:

- гены первой фазы поляризации (*frizzled*, *prickle*, *dishevelled*, *Van Gogh*, *flamingo*);

- гены второй фазы поляризации (*inscuteable*, *bazooka*, *par-6*, *atypical protein kinase C*, *partner of inscuteable*, *partner of numb*);

- гены, ответственные за ориентацию веретена деления (гены субъединиц G белка, *pins*);

- гены-селекторы (*tramtrack*, *musashi*, *miranda*, *staufer*, *prospero*), определяющие направление дальнейшей специализации дочерних клеток.

Рассмотрим роль названных генов и их продуктов в процессе АДК и специализации клеток-потомков более подробно.

#### *Время вступления клетки РКСО в асимметричный митоз*

Основной характеристикой РКСО, отличающей ее от окружающих клеток имагинального диска, является повышенное содержание пронеуральных белков комплекса *achaete-scute* (AS-C), которые удлиняют фазу G2 и задерживают начало митоза

(Kimura et al., 1997; Bertrand et al., 2002; Negre et al., 2003; Kiefer et al., 2005). Для перехода клетки к делению необходимо снижение их концентрации, определяющее самую возможность инициации процесса формирования механорецептора (Chang et al., 2008).

Деградация пронеуральных белков осуществляется убиквитинизирующим комплексом, в состав которого входит адапторный белок Phyllopod (PHYL) и E3 убиквитин лигаза Seven-in-absentia (SINA). PHYL, связываясь с пронеуральными белками, дает возможность SINA присоединить к ним убиквитин, служащий идентификатором готовности белков к стандартному процессу утилизации в протеасомах.

В свою очередь, экспрессия гена *phyllopod* иницируется пронеуральными белками AS-C через взаимодействие с E-боксами в его регуляторном районе (Pi et al., 2004). Скорость накопления PHYL определяет время жизни пронеуральных белков и, тем самым, продолжительность предмитотической фазы (Chang et al., 2008).

Детали регуляции вступления родительской клетки в АДК далеко не ясны. Очевидно, что, кроме перечисленных факторов, оно в том числе зависит и от белков клеточного цикла. Так, показано, что при повышении активности циклинзависимой киназы Cdc2, клетка идет по пути развития, типичному для рIb, и в результате формируется аномальный механорецептор, состоящий только из нейрона и его оболочки (Fichelson, Gho, 2004). Если же начало митоза форсируется избыточной экспрессией индуктора митотического деления *String* (*Stg*), то сенсорный орган не формируется вовсе (Negre et al., 2003).

#### *Белковые детерминанты АДК*

Неравновесное распределение специфических белковых детерминант является непременным атрибутом клетки, претерпевающей асимметричное деление. Основными детерминантами считаются Numb и Neuralized (NEUR) – мембранные белки, которые на стадии поздней профазы сосредотачиваются только на одном из полюсов клетки. После асимметричного деления дочерние клетки различаются по содержанию Numb и NEUR из-за неравновесной сегрегации этих белков в одну из них (Rhyu et al., 1994; Knoblich et al., 1995, 1997; Le Borgne, Schweisguth, 2003; Le Borgne et al., 2005).

Роль Numb и NEUR в определении дифференцировочных потенциалов клеток определяется участием этих белков в Notch-сигнальном пути – основном внеклеточном механизме детерминации судьбы клеток. Клетка, в которой наличествуют оба этих белка, функционирует как источник, а клетка, лишенная их, – как приемник Notch-сигнала. В результате, в этих клетках экспрессируются разные наборы генов, что, в свою очередь, ведет к различным

направлениям дифференцировки (Lai, 2004; Ehebauer et al., 2006; Cau, Blader, 2009).

При морфогенезе механорецептора после деления РКСО дочерняя клетка p1b, в которую попали Numb и NEUR, пойдет по пути нейральной специализации и при делении даст начало нейрону и текогену. Отсутствие этих детерминант во второй дочерней клетке p1a предопределяет возможность приема Notch-сигнала, что закрывает для нее возможность дифференцировки в собственно нейральные части механорецептора, и при делении эта клетка даст начало трихо- и тормогену (Frise et al., 1996; Vieira et al., 1996; Seugnet et al., 1997; Seto et al., 2002; Conner, Schmidt, 2003; Le Borgne, Schweisguth, 2003; Li, Baker, 2004; Le Borgne et al., 2005; Hurlbut et al., 2007).

#### *Механизмы, обеспечивающие установление полярности родительской клетки*

Поляризация клетки по расположению белковых детерминант Numb и NEUR и ориентация веретена деления относительно этих детерминант являются двумя сопряженными характеристиками асимметричного деления. Правильное протекание этих процессов в РКСО имеет принципиальное значение, поскольку определяет судьбу дочерних клеток и, тем самым, развитие полноценного механорецептора.

Согласно последним данным, полярность РКСО по детерминантам устанавливается последовательно и проходит две фазы. Первая фаза связана с установлением антерио-постериорной поляризации клетки и зависит от внешних стимулов. Вторая фаза целиком определяется ходом внутриклеточных событий, под влиянием которых первично установленная полярность либо сохраняется, либо переопределяется.

Исходная локализация Numb и NEUR в РКСО совпадает с их расположением в окружающих ее эктодермальных клетках имагинального диска и не имеет четкого тяготения ни к одному из полюсов (Gho, Schweisguth, 1998; Bellaïche et al., 2001a, 2004). В первой фазе становления полярности определяющую роль играет взаимодействие РКСО с окружающими клетками, на мембранах которых происходит сборка и полярное позиционирование белковых комплексов двух типов. В состав комплексов первого типа входят трансмембранные белки Frizzled (FZ), Flamingo (FMI) и мембранный белок Dishevelled (DSH). Второй тип формируется трансмембранными белками Van Gogh (VANG или Strabismus/STBM), Flamingo (FMI) и мембранным белком Prickle (PK) (Bellaïche et al., 2001a). Комплекс первого типа из эктодермальной клетки опознается комплексом второго типа из РКСО и наоборот, так что происходит перекрестное взаимодействие между комплексами РКСО и эктодермальной клетки. Первая фаза завершается поляризованным расположением FZ и VANG (Chen et al., 2008; Gomes et al., 2009; Wu, Mlodzik, 2009).

Во второй фазе происходит строгое позиционирование детерминантов, в частности, Numb, ранее равномерно распределенного по мембране, на одном из полюсов, что окончательно определяет тип поляризации клетки.

Известно, что на этом этапе в процесс вовлечены адаптерный белок Partner of Numb (PON), а также Lethal(2) giant larvae (LGL), Partner of Inscuteable (PINS), белки Par- и G-комплексов. В позиционировании Numb основная роль отводится LGL и Par-комплексу (Bazooka/Par-6/aPKC). Комплекс формируется атипичной протеинкиназой C (aPKC) из семейства Ser/Thr-киназ и белками Bazooka (Par-3) и Par-6, несущими PDZ-домены, через которые осуществляется белок-белковое взаимодействие (Rogiers et al., 2001).

Par-комплекс выявляется только на одном из полюсов клетки, и его позиция исключает для Numb возможность локализации в том же районе (Petronczki, Knoblich, 2001; Betschinger et al., 2003; Gönczy, 2008). Выбор полюса для Par-комплекса происходит на основе первичной поляризации, заданной на первой фазе распределением FZ и VANG, и зависит от наличия белка Inscuteable. В случае его присутствия, как это наблюдается в клетке p1b, место сборки Par-комплекса меняется, переопределяя поляризацию клетки с a-p типа на a-b тип (Bellaïche et al., 2001b).

При любом из типов поляризации на одном полюсе совместно с Numb оказываются белки PON и нефосфорилированная форма LGL, а на другом — Par-комплекс (Knust, 2001; Schaefer et al., 2001; Betschinger et al., 2003; Katanaev, Tomlinson, 2006; Wirtz-Peitz et al., 2008).

Рассматриваются две гипотезы о механизмах, обеспечивающих вторую фазу поляризации. В обеих основная роль отводится процессу каскадного фосфорилирования с участием комплекса белков, расположенного на одном из полюсов клетки и ассоциированному с мембраной. Обязательными его компонентами являются Par-6 и aPKC.

Гипотезы различаются представлениями о составе комплекса на момент инициации каскада — дополнен ли он белком LGL или Bazooka (Betschinger et al., 2003; Wirtz-Peitz et al., 2008), а также о форме участия Numb в этом процессе.

Согласно одной гипотезе, комплекс формируется субъединицами Par-6, LGL и aPKC, и каскад начинается с фосфорилирования Par-6 в составе комплекса киназой Auroga-A (AURA). Фосфорилирование Par-6 ведет к активации киназы aPKC, которая, в свою очередь, фосфорилирует одну из своих мишеней — LGL. Далее LGL выходит из состава комплекса, и его место занимает Bazooka. Благодаря такой замене, Par-комплекс приобретает способность распознавать белок Numb, локализованный с ним на мембране клетки. Затем субъединица aPKC фосфорилирует Numb, и модифицированный белок, те-

ря связь с мембраной, отходит в цитоплазму (Smith et al., 2007; Wirtz-Peitz et al., 2008).

Согласно другой, более ранней гипотезе, каскадное фосфорилирование происходит по описанной схеме, но с той разницей, что в процессе участвует комплекс неизменного состава – Vazooka/Par-6/aPKC, а каскад короче на один шаг и завершается фосфорилированием LGL. Numb при этом структурным изменениям не подвергается.

В рамках этой гипотезы рассматриваются варианты расположения Numb в клетке в зависимости от формы LGL – фосфорилированной или нативной.

LGL, находясь в нативной форме, может связываться как с мембраной, так и, гипотетически, с Numb и/или комплексом PON/Numb, определяя положение Numb на мембране. Фосфорилированный LGL утрачивает способность связываться как с мембраной, так и с этими белками, в результате чего Numb оказывается в свободном состоянии (Strand et al., 1994a; Betschinger et al., 2003).

Полярность расположения LGL и связанных с ним белков задается локализацией Par-комплекса. Появление Par-комплекса на одном из полюсов клетки обеспечивает последующее фосфорилирование и изменение конформации LGL, что влечет отделение от мембраны как его самого, так и связанного с ним Numb и/или комплекса PON/Numb. В результате, этот полюс оказывается свободным от Numb. На другом полюсе, где отсутствует Par-комплекс и не происходит фосфорилирования LGL, Numb остается связанным на мембране (Betschinger et al., 2003).

Известно, что в позиционировании Numb, наряду с LGL, в качестве посредника участвует и немышечный миозин II, с тяжелой цепью которого связывается LGL. Показано, что миозин II влияет на распределение Numb в клетке, хотя точные механизмы этого влияния неясны (Strand et al., 1994b; Kalmes et al., 1996; Barros et al., 2003; Betschinger et al., 2005).

Таким образом, независимо от конкретного механизма, позиционирование Numb и Par-комплекса отказывается взаимоисключающим.

В закреплении полярной локализации Numb в РКСО и клетке рПа участвует G-белок. G-белок имеет гетеротримерную структуру и состоит из большой  $\alpha$ -субъединицы и двух меньших  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц, причем связь между  $\alpha$ -субъединицей и димером G $\beta\gamma$  слабее, чем между субъединицами димера (Hamm, 1998). Через G $\beta\gamma$  весь комплекс присоединяется к трансмембранному белку Frizzled, что и обеспечивает его расположение на одном из полюсов клетки.

При взаимодействии  $\alpha$ -субъединицы в составе G-белка с PINS происходит ее отщепление от гетеротримера с образованием димера Gai/PINS (Sidarovski et al., 1999; Schaefer et al., 2000; Yu et al., 2000;

Schaefer et al., 2001). Формируя комплекс с Numb и нефосфорилированной формой LGL, димер фиксирует Numb на полюсе (Knust, 2001).

Во второй фазе поляризации устанавливается другая обязательная характеристика АДК – ориентация веретена деления относительно полярно распределенных белковых детерминант, в первую очередь, Numb. Главная роль в этом процессе принадлежит находящемуся лишь на одном из полюсов комплексу Gai/PINS, который задает точку формирования веретена (Roegiers et al., 2001; Bowman et al., 2006). Показано, что на формирование веретена влияет и Par-комплекс, определяя степень его смещенности к одному из полюсов. В результате, дочерняя клетка, унаследовавшая при делении Par-комплекс, оказывается большей по размеру, чем сестринская. Различие может быть либо незначительным в случае а-р-типа АДК, либо существенным в случае а-б-типа (Roegiers et al., 2001; Betschinger et al., 2004).

Таким образом, вторая фаза поляризации делящейся клетки завершается формированием белковых комплексов, позволяющих сосредоточить Numb на одном из полюсов, и веретена деления, ориентированного относительно Numb (Bellaiche et al., 2001a; Roegiers et al., 2001).

Правильное протекание обеих фаз обеспечивает асимметричность деления родительской клетки, предeterminируя судьбу дочерних клеток.

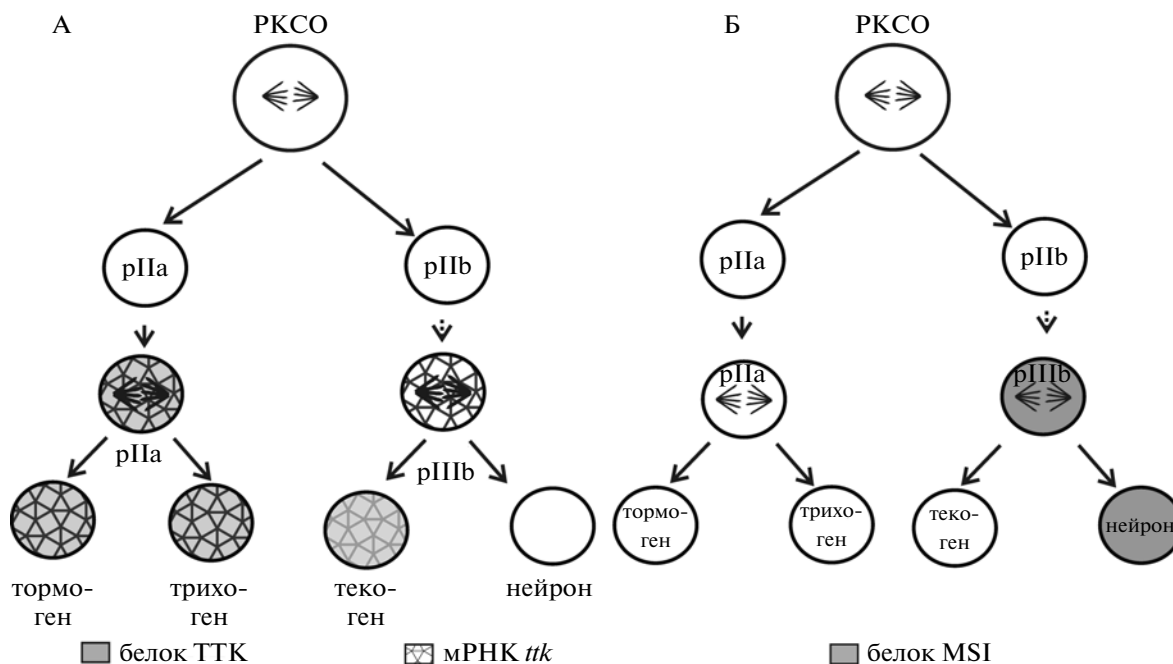
#### *Гены-селекторы и направления дифференцировки дочерних клеток*

Дальнейшее направление дифференцировки дочерних клеток зависит от комбинации экспрессирующихся в них известных генов-селекторов *tramtrack*, *musashi*, *prospero*, *miranda*, *staufen*. “Селекторные” функции этих генов могут реализовываться как на уровне белков, так и на уровне мРНК. Продукты генов-селекторов маркируют клетки нейтральной и кутикулярной специализации.

Ген *ttk* кодирует транскрипционный фактор, установленными мишенями которого являются *achaete*, *asense*, *deadpan* (Badenhorst, 2001; Badenhorst et al., 2002).

После первого деления РКСО мРНК *ttk* выявляется в обеих дочерних клетках примерно в равных количествах, однако белок ТТК обнаруживается в рПа и не выявляется в рПб (рис. 3А). Показано, что различия по содержанию ТТК обусловлены действием другого гена-селектора – *musashi*, сопряженном с одновременной активацией Notch-пути (Okabe et al., 2001; Badenhorst et al., 2002).

*msi* кодирует ядерный белок, способный специфически связываться с 3'UTR мРНК *ttk*, запрещая ее трансляцию (Okabe et al., 2001; Okano et al., 2002). После первого деления РКСО белок MSI обнаруживается в обеих дочерних клетках, но при этом мРНК



**Рис. 3.** Схема распределения белков ТТК, MSI и мРНК *tkk* при асимметричных делениях клетки РКСО и ее дочерних клеток. А – распределение мРНК *tkk* и белка ТТК; В – распределение белка MSI в клетках развивающегося щетиночного органа.

*tkk* транслируется только в одной из них – pIIa. В этой клетке не блокируется прохождение Notch-сигнала, и белок MSI деградирует, освобождая транскрипт для трансляции (Okabe et al., 2001). Во второй дочерней клетке – pIIb, где в результате асимметричного деления оказался Numb и произошла блокировка сигнала, запрет на трансляцию сохраняется (рис. 3Б).

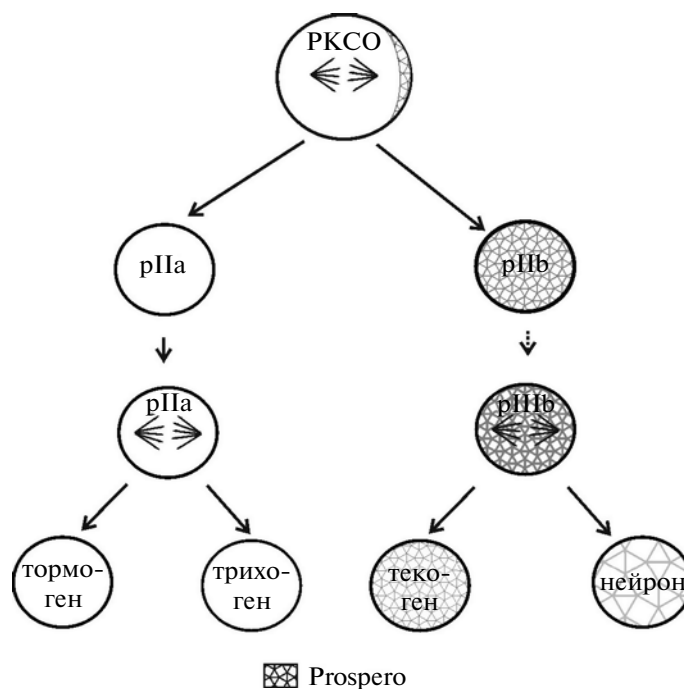
Ген *prospero* кодирует транскрипционный фактор, активирующий экспрессию генов *achaete*, *scute*, *asense*, *miranda*, *aPKC*, *Cyclin E* и др. (Choksi et al., 2006). В делящейся РКСО количество белка PROS незначительно, и он совместно с Numb сосредоточен на одном из полюсов. PROS маркирует клетки, следующие по нейтральному пути дифференцировки. Этот белок никогда не обнаруживается ни в клетке pIIa, ни в тормо- и трихогене, но выявляется в pIIb и ее производных (Manning, Doe, 1999; Rogiers et al., 2001) (рис. 4). При этом, динамика изменения содержания PROS в нейроне и в текогене диаметрально противоположна: в нейроне он постепенно исчезает, тогда как в текогене накапливается.

За распределение PROS в клетке pIIb и ее производных ответственны продукты селекторных генов *staufen* и *miranda*.

Белок Staufen содержит т.н. double-stranded RNA binding domain (dsRBD), с помощью которого он может связываться с двухцепочечными РНК, в том числе и с мРНК *prospero* (Ramos et al., 2000).

Участие белка Miranda в распределении PROS осуществляется через формирование комплексов как с ним самим, так и с комплексом

Staufen/мРНК*pros*, с которым он взаимодействует через т.н. “cargo-binding”-домен, представляющий собой двойную спираль (Yousef et al., 2008). Поскольку MIRA одновременно связывается и с



**Рис. 4.** Локализация белка Prospero при асимметричных делениях в клетках развивающегося щетиночного органа.



Numb, полярно локализованным в делящейся РКСО, комплексы MIRA/PROS и MIRA/Staufen/мРНК*pros* распределяются в ней асимметрично, а в pIIb и ее дочерних клетках неравновесно (Shen et al., 1998; Ramos et al., 2000; Bardin et al., 2004; Yousef et al., 2008).

Таким образом, активность генов-селекторов окончательно определяет дальнейшую специализацию дочерних клеток РКСО как различных компонентов сенсорного органа.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В онтогенезе многоклеточных организмов тесно соседствуют два процесса: создание разнообразных типов клеток, обеспечивающее принципиальную возможность формирования тканей и органов, и пролиферация однородных специализированных клеток с наращиванием их массы при морфогенезе. Реализуются эти процессы посредством механизмов асимметричного и симметричного клеточного деления, соответственно.

Обширный круг исследований, выполненных на разных модельных объектах, позволил обозначить некоторые общие закономерности протекания асимметричного деления, которые состоят в создании оси поляризации делящейся клетки через локализацию специфических белковых комплексов и белковых детерминант на ее полюсах и строгую ориентацию веретена деления относительно этих детерминант.

В серии асимметричных делений при формировании механорецептора дрозофилы их непременным атрибутом является наличие определенного набора белков, в частности, Frizzled, Van Gogh, Inscuteable, Numb, Lethal giant larvae, Neuralized, Miranda, Prospero, а также Par- и G-белковых комплексов. Поляризованное позиционирование Par- и G-комплексов задает архитектуру делящейся клетки через распределение детерминант Numb и Neuralized и сопряженную с этим распределением ориентацию веретена деления.

Следует отметить, что механорецептор представляет собой наиболее простую модель для изучения АДК. В его морфогенезе участвует всего несколько клеток (рис. 1), причем асимметричный тип деления для каждой материнской клетки в каждом поколении является безальтернативным вариантом. Однако при исследовании даже такой сравнительно простой модели целый ряд аспектов все еще остается непроясненным.

В деталях неизвестно, например, как осуществляется зависящий от наличия Inscuteable выбор между апикально-базальным и антериорно-постериорными вариантами АДК для РКСО и клеток, следующих по кутикулярному или нейральному направлению дифференцировки.

Непонятны до конца механизмы установления начальной поляризации родительской клетки, связанные с позиционированием белковых комплексов и белкового детерминанта Neuralized. Далеко не полностью выявлен весь набор участвующих в процессе АДК генов и белков, и не для всех идентифицированных описана их точная роль.

Более сложной представляется ситуация с другим модельным объектом для изучения АДК — стволовыми клетками. Как известно, в зависимости от конкретных условий они выбирают симметричное деление, при возникновении дефицита численности популяции, или асимметричное, которое необходимо для выполнения их основной функции как поставщика клеток определенной специализации.

Здесь, наряду с уже перечисленными вопросами, имеющими общий характер, возникает еще один, пожалуй, самый главный — каким образом осуществляется выбор и переключение типов деления в популяциях стволовых клеток.

Очевидно, что решение этой проблемы, имеющей не только фундаментальный, но и прикладной интерес, позволит подойти к пониманию механизмов неопластического роста и разработке принципиально новых методов лечения онкологических заболеваний.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Терских В.В., Васильев А.В., Воротеяк Е.А. Поляризация и асимметричное деление стволовых клеток // Цитология. 2007. Т. 49. С. 933–938.
- Терских В.В., Васильев А.В., Воротеяк Е.А. Асимметричное деление клеток и неопластический рост // Изв. РАН. 2009. Т. 4. С. 389–394.
- Фурман Д.П., Бухарина Т.А. Генетический контроль развития макрохет у *Drosophila melanogaster* // Онтогенез. 2008. Т. 39. С. 245–258.
- Abrash E.B., Bergmann D.C. Asymmetric cell divisions: a view from plant development // Dev. Cell. 2009. V. 16. P. 783–796.
- Badenhorst P. Tramtrack controls glial number and identity in the *Drosophila* embryonic CNS // Development. 2001. V. 128. P. 4093–4101.
- Badenhorst P., Finch J.T., Travers A.A. Tramtrack co-operates to prevent inappropriate neural development in *Drosophila* // Mech. Dev. 2002. V. 117. P. 87–101.
- Bardin A.J., Le Borgne R., Schweisguth F. Asymmetric localization and function of cell-fate determinants: a fly's view // Curr. Opin. Neurobiol. 2004. V. 14. P. 6–14.
- Barros C.S., Phelps C.B., Brand A.H. *Drosophila* nonmuscle myosin II promotes the asymmetric segregation of cell fate determinants by cortical exclusion rather than active transport // Dev. Cell. 2003. V. 5. P. 829–840.
- Bellaïche Y., Beaudoin-Massiani O., Stuttem I. et al. The planar cell polarity protein Strabismus promotes Pins anterior localization during asymmetric division of sensory organ precursor cells in *Drosophila* // Development. 2004. V. 131. P. 469–478.

- Bellaïche Y., Gho M., Kaltschmidt J.A. et al.* Frizzled regulates localization of cell-fate determinants and mitotic spindle rotation during asymmetric cell division // *Nat. Cell Biol.* 2001a. V. 3. P. 50–57.
- Bellaïche Y., Radovic A., Woods D.F. et al.* The partner of inscuteable/discs-large complex is required to establish planar polarity during asymmetric cell division in *Drosophila* // *Cell.* 2001b. V. 106. P. 355–366.
- Bertrand N., Castro D.S., Guillemot F.* Proneural genes and the specification of neural cell types // *Nat. Rev. Neurosci.* 2002. V. 3. P. 517–530.
- Betschinger J., Eisenhaber F., Knoblich J.A.* Phosphorylation-induced autoinhibition regulates the cytoskeletal protein Lethal (2) giant larvae // *Curr Biol.* 2005. V. 15. P. 276–282.
- Betschinger J., Knoblich J.A.* Dare to be different: asymmetric cell division in *Drosophila*, *C. elegans* and vertebrates // *Curr. Biol.* 2004. V. 14. P. R674–R685.
- Betschinger J., Mechtler K., Knoblich J.A.* The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl // *Nature.* 2003. V. 422. P. 326–330.
- Bowman S.K., Neumüller R.A., Novatchkova M. et al.* The *Drosophila* NuMA Homolog Mud regulates spindle orientation in asymmetric cell division // *Dev. Cell.* 2006. V. 10. P. 731–742.
- Campuzano S., Modolell J.* Patterning of the *Drosophila* nervous system: the *achaete-scute* gene complex // *Trends Genet.* 1992. V. 8. P. 202–206.
- Cau E., Blader P.* Notch activity in the nervous system: to switch or not switch? // *Neural Development.* 2009. V. 4. P. 36.
- Caussinus E., Hirth F.* Asymmetric stem cell division in development and cancer // *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 2007. V. 45. P. 205–225.
- Chang P.J., Hsiao Y.L., Tien A.C. et al.* Negative-feedback regulation of proneural proteins controls the timing of neural precursor division // *Development.* 2008. V. 135. P. 3021–3030.
- Chen W.S., Antic D., Matis M. et al.* Asymmetric homotypic interactions of the atypical cadherin flamingo mediate intercellular polarity signaling // *Cell.* 2008. V. 133. P. 1093–1105.
- Choksi S.P., Southall T.D., Bossing T. et al.* Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in *Drosophila* neural stem cells // *Dev. Cell.* 2006. V. 11. P. 775–789.
- Conner S.D., Schmid S.L.* Regulated portals of entry into the cell // *Nature.* 2003. V. 422. P. 37–44.
- Ehebauer M., Hayward P., Arias A.M.* Notch, a universal arbiter of cell fate decisions // *Science.* 2006. V. 314. P. 1414–1415.
- Fichelson P., Gho M.* Mother-daughter precursor cell fate transformation after Cdc2 down-regulation in the *Drosophila* bristle lineage // *Dev. Biol.* 2004. V. 276. P. 367–377.
- Frise E., Knoblich J.A., Younger-Shepherd S. et al.* The *Drosophila* Numb protein inhibits signaling of the Notch receptor during cell-cell interaction in sensory organ lineage // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 11925–11932.
- Furman D.P., Bukharina T.A.* How *Drosophila melanogaster* forms its mechanoreceptors // *Current Genomics.* 2008. V. 8. P. 312–323.
- Furman D.P., Bukharina T.A.* The gene network determining development of *Drosophila melanogaster* mechanoreceptors // *Comp. Biol. Chem.* 2009. V. 33. P. 231–234.
- Fürthauer M., González-Gaitán M.* Endocytic regulation of Notch signalling during development // *Traffic.* 2009. V. 10. P. 792–802.
- Gazivova I., Bhat K.M.* Generating asymmetry: with and without self-renewal // *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 2007. V. 45. P. 143–178.
- Gho M., Schweisguth F.* Frizzled signalling controls orientation of asymmetric sense organ precursor cell divisions in *Drosophila* // *Nature* 1998. V. 393. P. 178–181.
- Gomes J.E., Corado M., Schweisguth F.* Van Gogh and Frizzled act redundantly in the *Drosophila* sensory organ precursor cell to orient its asymmetric division // *PLoS ONE.* 2009. V. 4. P. e4485.
- Gönczy P.* Mechanisms of asymmetric cell division: flies and worms pave the way // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008. V. 9. P. 355–366.
- Hamm H.E.* The many faces of G protein signaling // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 669–672.
- Hartenstein V., Posakony J.W.* Development of adult sensilla on the wing and notum of *Drosophila melanogaster* // *Development.* 1989. V. 107. P. 389–405.
- Horvitz H.R., Herskowitz I.* Mechanisms of asymmetric cell division: two Bs or not two Bs, that is the Question // *Cell.* 1992. V. 68. P. 237–255.
- Horvitz H.R., Sternberg P.W., Greenwald I.S. et al.* Mutations that affect neural cell lineages and cell fates during the development of the nematode *Caenorhabditis elegans* // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1983. V. 48. P. 453–463.
- Huang F., Dambly-Chaudière C., Ghysen A.* The emergence of sense organs in the wing disc of *Drosophila* // *Development.* 1991. V. 111. P. 1087–1095.
- Hurlbut G.D., Kankel M.W., Lake R.J. et al.* Crossing paths with Notch in the hyper-network // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007. V. 19. P. 166–175.
- Jan Y.N., Jan L.Y.* Asymmetric cell division in the *Drosophila* nervous system // *Nat. Rev. Neurosci.* 2001. V. 2. P. 772–779.
- Kalmes A., Merdes G., Neumann B. et al.* A serine-kinase associated with the p127-l(2)gl tumour suppressor of *Drosophila* may regulate the binding of p127 to nonmuscle myosin II heavy chain and the attachment of p127 to the plasma membrane // *J. Cell Sci.* 1996. V. 109. P. 1359–1368.
- Katanaev V.L., Tomlinson A.* Dual roles for the trimeric G protein Go in asymmetric cell division in *Drosophila* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 6524–6529.
- Kieffer J.C., Jarman A., Johnson J.* Pro-neural factors and neurogenesis // *Dev. Dyn.* 2005. V. 234. P. 808–813.
- Kimura K.I., Usui-Ishihara A., Usui K.* G2 arrest of cell cycle ensures a determination process of sensory mother cell formation in *Drosophila* // *Dev. Genes. Evol.* 1997. V. 207. P. 199–201.
- Knoblich J.A.* Mechanisms of asymmetric stem cell division // *Cell.* 2008. V. 132. P. 583–597.
- Knoblich J.A., Jan L.Y., Jan Y.N.* Asymmetric segregation of Numb and Prospero during cell division // *Nature.* 1995. V. 377. P. 624–627.
- Knoblich J.A., Jan L.Y., Jan Y.N.* The N terminus of the *Drosophila* Numb protein directs membrane association and ac-

- tin-dependent asymmetric localization // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 1305–1310.
- Knust E.* G protein signaling and asymmetric cell division // *Cell*. 2001. V. 107. P. 125–128.
- Lai E.C.* Notch signaling: control of cell communication and cell fate // *Development*. 2004. V. 131. P. 965–973.
- Lawler M.L., Brun Y.V.* A molecular beacon defines bacterial cell asymmetry // *Cell*. 2006. V. 124. P. 891–893.
- Le Borgne R., Bardin A., Schweisguth F.* The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling // *Development*. 2005. V. 132. P. 1751–1762.
- Le Borgne R., Schweisguth F.* Unequal segregation of Neuralized biases Notch activation during asymmetric cell division // *Dev. Cell*. 2003. V. 5. P. 139–148.
- Lechler T., Fuchs E.* Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin // *Nature*. 2005. V. 437. P. 275–280.
- Li Y., Baker N.E.* The roles of cis-inactivation by Notch ligands and of neuralized during eye and bristle patterning in *Drosophila* // *BMC Dev. Biol.* 2004. V. 4. P. 5.
- Manning L., Doe C.Q.* Prospero distinguishes sibling cell fate without asymmetric localization in the *Drosophila* adult external sense organ lineage // *Development*. 1999. V. 126. P. 2063–2071.
- Morrison S.J., Kimble J.* Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer // *Nature*. 2006. V. 441. P. 1068–1074.
- Nègre N., Ghysen A., Martinez A.M.* Mitotic G2-arrest is required for neural cell fate determination in *Drosophila* // *Mech. Dev.* 2003. V. 120. P. 253–265.
- Okabe M., Imai T., Kurusu M. et al.* Translational repression determines a neuronal potential in *Drosophila* asymmetric cell division // *Nature*. 2001. V. 411. P. 94–98.
- Okano H., Imai T., Okabe M.* Musashi: a translational regulator of cell fate // *J. Cell Sci.* 2002. V. 115. P. 1355–1359.
- Petronczki M., Knoblich J.A.* DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila* // *Nat. Cell Biol.* 2001. V. 3. P. 43–49.
- Pi H., Huang S.K., Tang C.Y. et al.* phyllopod is a target gene of proneural proteins in *Drosophila* external sensory organ development // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. P. 8378–8383.
- Ramos A., Grünert S., Adams J. et al.* RNA recognition by a Staufien double-stranded RNA-binding domain // *EMBO J.* 2000. V. 19. P. 997–1009.
- Rhyu M.S., Jan L.Y., Jan Y.N.* Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells // *Cell*. 1994. V. 76. P. 477–491.
- Roegiers F., Jan Y.N.* Asymmetric cell division // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004. V. 16. P. 195–205.
- Roegiers F., Younger-Shepherd S., Jan L.Y. et al.* Bazooka is required for localization of determinants and controlling proliferation in the sensory organ precursor cell lineage in *Drosophila* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. P. 14469–14474.
- Schaefer M., Petronczki M., Dorner D. et al.* Heterotrimeric G proteins direct two modes of asymmetric cell division in the *Drosophila* nervous system // *Cell*. 2001. V. 107. P. 183–194.
- Schaefer M., Shevchenko A., Shevchenko A. et al.* A protein complex containing Inscuteable and the Galpha-binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in *Drosophila* // *Curr. Biol.* 2000. V. 10. P. 353–362.
- Seery J.P., Watt F.M.* Asymmetric stem-cell divisions define the architecture of human oesophageal epithelium // *Curr. Biol.* 2000. V. 10. P. 1447–1450.
- Seto E.S., Bellen H.J., Lloyd T.E.* When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways // *Genes Dev.* 2002. V. 16. P. 1314–1336.
- Seugnet L., Simpson P., Haenlin M.* Requirement for dynamin during Notch signaling in *Drosophila* neurogenesis // *Dev. Biol.* 1997. V. 192. P. 585–598.
- Shen C.P., Knoblich J.A., Chan Y.M. et al.* Miranda as a multi-domain adapter linking apically localized Inscuteable and basally localized Staufien and Prospero during asymmetric cell division in *Drosophila* // *Genes Dev.* 1998. V. 12. P. 1837–1846.
- Shen Q., Zhong W., Jan Y.N. et al.* Asymmetric Numb distribution is critical for asymmetric cell division of mouse cerebral cortical stem cells and neuroblasts // *Development*. 2002. V. 129. P. 4843–4853.
- Siderovski D.P., Diverse-Pierluissi M., De Vries L.* The GoLoco motif: a Galphai/o binding motif and potential guanine nucleotide exchange factor // *Trends Biochem. Sci.* 1999. V. 24. P. 340–341.
- Smith C.A., Lau K.M. et al.* aPKC-mediated phosphorylation regulates asymmetric membrane localization of the cell fate determinant Numb // *EMBO J.* 2007. V. 26. P. 468–480.
- Strand D., Jakobs R., Merdes G. et al.* The *Drosophila* lethal(2)giant larvae tumor suppressor protein forms homooligomers and is associated with nonmuscle myosin II heavy chain // *J. Cell Biol.* 1994a. V. 127. P. 1361–1373.
- Strand D., Raska I., Mechler B.M.* The *Drosophila* lethal(2)giant larvae tumor suppressor protein is a component of the cytoskeleton // *J. Cell Biol.* 1994b. V. 127. P. 1345–1360.
- Thorpe P.H., Bruno J., Rothstein R.* Kinetochore asymmetry defines a single yeast lineage // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. P. 6673–6678.
- Vieira A.V., Lamaze C., Schmid S.L.* Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis // *Science*. 1996. V. 274. P. 2086–2089.
- Wirtz-Peitz F., Nishimura T., Knoblich J.A.* Linking cell cycle to asymmetric division: Aurora-A phosphorylates the Par complex to regulate Numb localization // *Cell*. 2008. V. 135. P. 161–173.
- Wodarz A., Huttner W.B.* Asymmetric cell division during neurogenesis in *Drosophila* and vertebrates // *Mech. Dev.* 2003. V. 120. P. 1297–1309.
- Wodarz A., Gonzalez C.* Connecting cancer to the asymmetric division of stem cells // *Cell*. 2006. V. 124. P. 1121–1123.
- Wu J., Mlodzik M.* A quest for the mechanism regulating global planar cell polarity of tissues // *Trends Cell Biol.* 2009. V. 19. P. 295–305.
- Yamashita Y.* Asymmetric stem cell division and pathology: insights from *Drosophila* stem cell systems // *J. Pathol.* 2009. V. 217. P. 181–185.
- Yousef M.S., Kamikubo H., Kataoka M. et al.* Miranda cargo-binding domain forms an elongated coiled-coil homodimer in solution: implications for asymmetric cell di-

vision in *Drosophila* // *Protein Sci.* 2008. V. 17. P. 908–917.

*Yu F., Morin X., Cai Y. et al.* Analysis of partner of inscuteable, a novel player of *Drosophila* asymmetric divisions, reveals

two distinct steps in inscuteable apical localization // *Cell.* 2000. V. 100. P. 399–409.

*Zhang J., Niu C., Ye L. et al.* Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size // *Nature.* 2003. V. 425. P. 836–841.

## Asymmetric Cell Division in the Morphogenesis of *Drosophila melanogaster* Macrochaetae

T. A. Bukharina<sup>a</sup> and D. P. Furman<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, pr. Lavrent'eva 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

<sup>b</sup> *Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia*  
*e-mail: bukharina@bionet.nsc.ru*

**Abstract**—Asymmetric cell division (ACD) is the basic process which creates diversity in the cells of multicellular organisms. As a result of asymmetric cell division, daughter cells acquire the ability to differentiate and specialize in a given direction, which is different from that of their parent cells and from each other. This type of division is observed in a wide range of living organisms from bacteria to vertebrates. It has been shown that the molecular-genetic control mechanism of ACD is evolutionally conservative. The proteins involved in the process of ACD in different kinds of animals have a high degree of homology. Sensory organs—setae (macrochaetae)—of *Drosophila* are widely used as a model system for studying the genetic control mechanisms of asymmetric division. Setae located in an orderly manner on the head and body of the fly play the role of mechanoreceptors. Each of them consists of four specialized cells—offspring of the only sensory organ precursor cell (SOPC), which differentiates from the imaginal wing disc at the larval stage of the late third age. The basic differentiation and further specialization of the daughter cells of SOPC is an asymmetric division process.

In this summary, experimental data on genes and their products controlling asymmetric division of SOPC and daughter cells, and also the specialization of the latter, have been systemized. The basic mechanisms which determine the time cells enter into asymmetric mitosis and which provides the structural characteristics of the asymmetric division process—the polar distribution of protein determinants Numb and Neuralized—the orientation of the mitotic spindle in relation to these determinants, and the uneven segregation of the determinants into the daughter cells that determines the direction of their development have been discussed.

**Keywords:** asymmetric division, sensory organ precursor cell, selector-genes, signaling pathways, macrochaetae, *Drosophila*

УДК 591.1:595.7

## ДИНАМИКА ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА В ОНТОГЕНЕЗЕ НАСЕКОМЫХ ЩИТНИКА ЛИНЕЙЧАТОГО (*Graphosoma lineatum* L.) И СОВКИ КАПУСТНОЙ (*Mamestra brassicae* L.)

© 2011 г. Т. А. Алексеева, Н. Д. Озернюк

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,

119991 Москва, ул. Вавилова 26

E-mail: taalexeeva@mail.ru

Поступила в редакцию 10.06.10 г.

Окончательный вариант получен 05.10.10 г.

Проведено сравнение динамики роста и потребления кислорода в ходе онтогенеза насекомых с прямым (щитник линейчатый *Graphosoma lineatum* L.) и непрямом (совка капустная *Mamestra brassicae* L.) развитием. Показано, что характер изменения энергетического обмена коррелирует с особенностями развития насекомых данных видов. Так, у насекомых с непрямом развитием наблюдается циклическое снижение потребления кислорода в период линек и резкое падение во время метаморфоза. У насекомых с прямым развитием снижение потребления кислорода наблюдается только в периоды линек. Коэффициент *a* аллометрической зависимости потребления кислорода от массы тела имаго у совки капустной более чем в два раза выше, по сравнению со щитником линейчатым.

*Ключевые слова:* насекомые, онтогенез, прямое и непрямое развитие, рост, потребление кислорода.

Динамика энергетического обмена в онтогенезе различных видов животных существенно различается (Зотин, 1974; Озернюк, 1992, 2000; Зотин, Зотина, 1993; Радзинская и др., 2003). Особенно значительная вариабельность изменения энергетического обмена характерна для беспозвоночных и, в частности, для насекомых, что связано со спецификой их индивидуального развития. Два основных типа онтогенеза насекомых – прямой и непрямой, включающий стадию метаморфоза, затрагивают не только морфологические особенности развития, но и динамику физиологических параметров, в частности, энергетического обмена. Очевидно, что тот или иной характер изменения энергетического обмена в ходе индивидуального развития животных связан с особенностями их роста, формированием органов дыхания, развитием кровеносной и сердечно-сосудистой систем.

Энергетический обмен насекомых как показатель физиологического состояния зависит от образа жизни вида, от уровня двигательной активности и температуры обитания. Важным фактором, определяющим уровень энергетического обмена насеко-

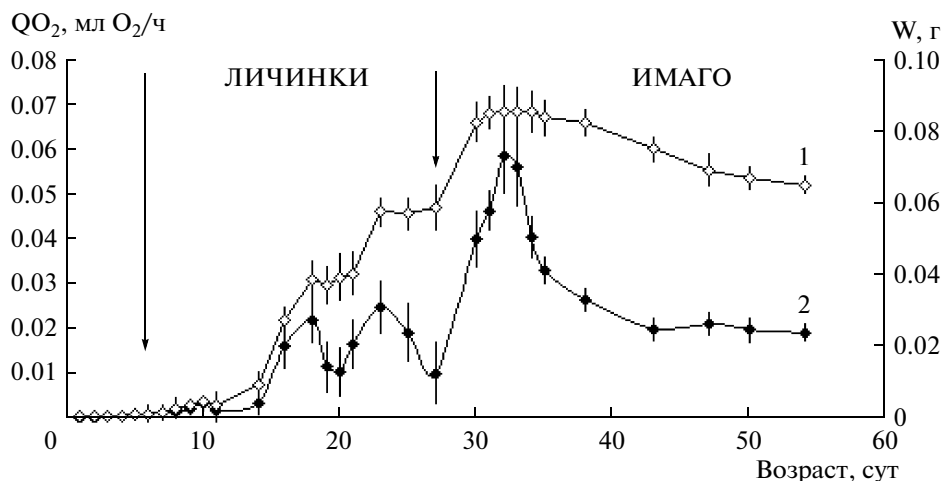
мых, является трахейная дыхательная система, позволяющая доставлять кислород к каждой клетке организма, что обеспечивает необычайно высокую эффективность процесса дыхания (Тыщенко, 1976; Росс и др. 1985; Бызова, 2007). При всем разнообразии динамики энергетического обмена на разных этапах онтогенеза насекомых, общим является возрастание интенсивности потребления кислорода на ранних стадиях и снижение на поздних (Gromadzka, 1968; Радзинская, Никольская, 1972, 1982; Алексеева, 1985; Никольская, Радзинская, 1986; Gromysz-Kałkowska, Hubicka, 1988; Алексеева и др., 1991; Yaginuma, Yamashita, 1999; Радзинская и др., 2003). Однако работы по изучению энергетического обмена в течение всего периода онтогенеза насекомых с прямым и непрямом типом развития носят, как правило, фрагментарный характер.

Целью настоящей работы было изучение особенностей роста и параметров энергетического обмена (скорости и интенсивности потребления кислорода) в ходе индивидуального развития представителей насекомых с прямым и непрямом типом развития.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для сравнения динамики роста и уровня энергетического обмена были использованы: щитник ли-

<sup>1</sup> Работа выполнена при частичной поддержке федерального бюджета по Программе фундаментальных исследований ОБН РАН “Биоразнообразие, подпрограмма “Биоразнообразие: инвентаризация, функции, сохранение”.



**Рис. 1.** Изменение массы тела (1) и скорости потребления кислорода (2) в онтогенезе клопа щитника линейчатого *Graphosoma lineatum* L. По оси абсцисс — время развития; по левой оси ординат — скорость потребления кислорода; по правой оси ординат — масса тела. Стрелки указывают: начало вылупления личинок и имаго.

нейчатый *Graphosoma lineatum* L. (Heteroptera, Pentatomidae) и совка капустная *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera, Noctuidae).

Работу проводили на Кропотовской биостанции Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН в летние сезоны 2006–2008 гг. Собранных насекомых размещали в лабораторных термостатах при температуре  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Каждый из исследуемых видов насекомых содержали на привычном для вида пищевом субстрате. В термостатах поддерживали влажность в пределах 60–70% и соблюдали световой диапазон (14/10 ч) суток (Веck, 1980). При откладке яиц регистрировали время появления кладок, количество яиц в каждой кладке, взвешивали и размещали яйца каждой кладки на отдельном влажном фильтре, который помещали в сосудик для опыта. Для измерения потребления кислорода использовали манометрический метод Варбурга с сосудиками различных объемов (от 5 до 20 мл), в зависимости от размеров объекта. Личинок первого и второго возрастов помещали в сосудики по несколько штук. Измерения потребления кислорода проводили при температуре  $20 \pm 0.2^\circ\text{C}$ , регистрировать первые замеры начинали через 1–1.5 ч после начала опыта, чтобы насекомые могли прийти в состояние покоя. Замеры делали через каждые 30 мин в течение 3 ч. Всего проведено примерно 1200 опытов. Скорость потребления кислорода ( $Q_{O_2}$ ) рассчитывали в мл  $O_2$ /ч, а интенсивность потребления кислорода ( $q_{O_2}$ ) — в мл  $O_2$ /ч/г. Данные на рисунках представлены в виде средних значений скорости потребления кислорода ( $Q_{O_2}$ ), интенсивности потребления кислорода ( $q_{O_2}$ ), массы (M), а также указаны стандартные ошибки измерений.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Почт

Масса развивающегося яйца в период эмбриогенеза щитника линейчатого (*Graphosoma lineatum*) при активном росте собственно зародыша почти не меняется и составляет, в среднем,  $0.64 \pm 0.03$  мг. В период личиночного развития наблюдается значительный рост массы тела, но поскольку личиночное развитие сопровождается линьками, то увеличение массы тела носит ступенчатый характер (рис. 1). При переходе к стадии имаго масса увеличивается примерно на 30–35%, достигая максимума ( $85.0 \pm 8.0$  мг) на этой стадии. Впоследствии масса тела имаго несколько снижается.

В ходе эмбриогенеза совки капустной (*Mamestra brassicae*) масса собственно зародыша растет, а масса яйца фактически не меняется и, в среднем, составляет  $0.12 \pm 0.02$  мг. Интенсивный рост массы тела происходит в личиночный период (рис. 2). В отличие от щитника, у капустной совки максимальное значение массы тела отмечено в конце личиночного периода, когда масса достигает максимального значения  $0.86 \pm 0.09$  г. При переходе к стадии предкуколки рост массы прекращается. Период окукливания сопровождается интенсивной, почти двукратной потерей массы тела, что связано с выделением жидкости из личинок при окукливании. Куколки зимуют в состоянии диапаузы в грунте. За время зимовки наблюдается снижение массы тела ещё на 20–30%. В период вылета бабочки из кокона потеря массы происходит за счет сбрасывания покровов куколки и выделения жидкости. У имаго масса тела меняется незначительно.

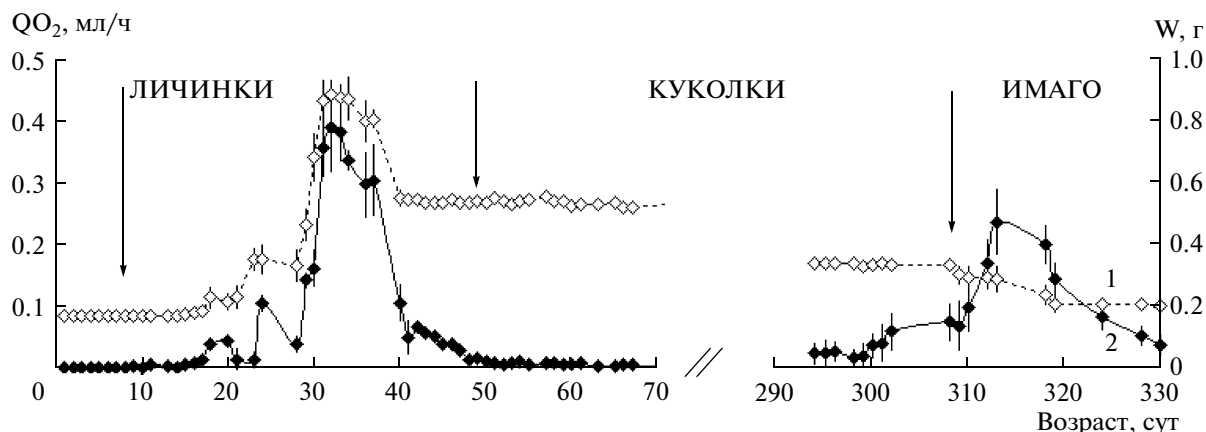


Рис. 2. Изменение массы тела (1) и скорости потребления кислорода (2) в онтогенезе совки капустной *Mamestra brassicae* L. По оси абсцисс — время развития; по левой оси ординат — скорость потребления кислорода; по правой оси ординат — масса тела. Стрелки указывают: начало вылупления личинок, начало метаморфоза и появление имаго.

### Скорость потребления кислорода

Данный параметр энергетического обмена в период зародышевого развития щитника линейчатого мало изменяется, однако, по мере роста личинок, он возрастает от 0.00027 до 0.0203 мл  $O_2$ /ч (рис. 1). Этот подъем носит колебательный характер, что связано с линьками. Максимум потребления кислорода отмечен на 33 сут онтогенеза и составляет  $0.0586 \pm 0.0012$  мл  $O_2$ /ч, т.е. увеличивается более чем в 200 раз, по сравнению с зародышевым развитием. По мере увеличения возраста имаго скорость потребления кислорода уменьшается. Так, на 47 сут онтогенеза этот показатель падает более чем в два раза и примерно на этом уровне остается до поздних стадий онтогенеза.

На основании полученных экспериментальных данных и в соответствии с формулой:

$$QO_2 = aM^k \quad (1)$$

(где  $QO_2$  — скорость потребления кислорода,  $M$  — масса тела,  $a$  и  $k$  коэффициенты), был рассчитан коэффициент  $a$  аллометрической зависимости потребления кислорода от массы тела взрослого насекомого этого вида (при  $k$  равном 0.75). Коэффициент  $a$  равен  $1.21 \pm 0.08$ .

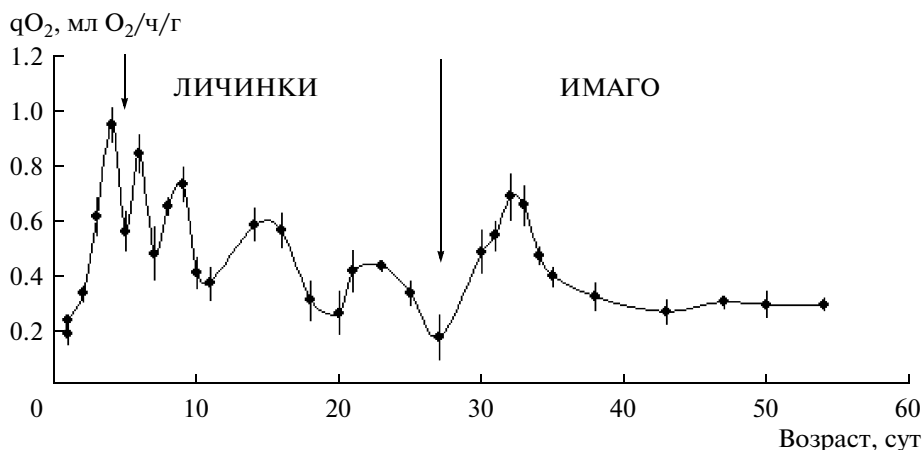
В ходе эмбрионального развития совки капустной скорость потребления кислорода меняется незначительно. Однако во время роста личинок она возрастает более чем в 300 раз на 32 сут (рис. 2). В период окукливания скорость потребления кислорода падает и остается на низком уровне до конца метаморфоза. Далее у имаго этот показатель возрастает до  $0.237 \pm 0.022$  мл  $O_2$ /ч на 313 сут развития и затем снижается. На основании полученных результатов и в соответствии с формулой (1) был рассчитан коэффициент  $a$  аллометрической зависимости скоро-

сти потребления кислорода от массы тела имаго (при  $k$  равном 0.75), который равен  $2.64 \pm 0.2$ .

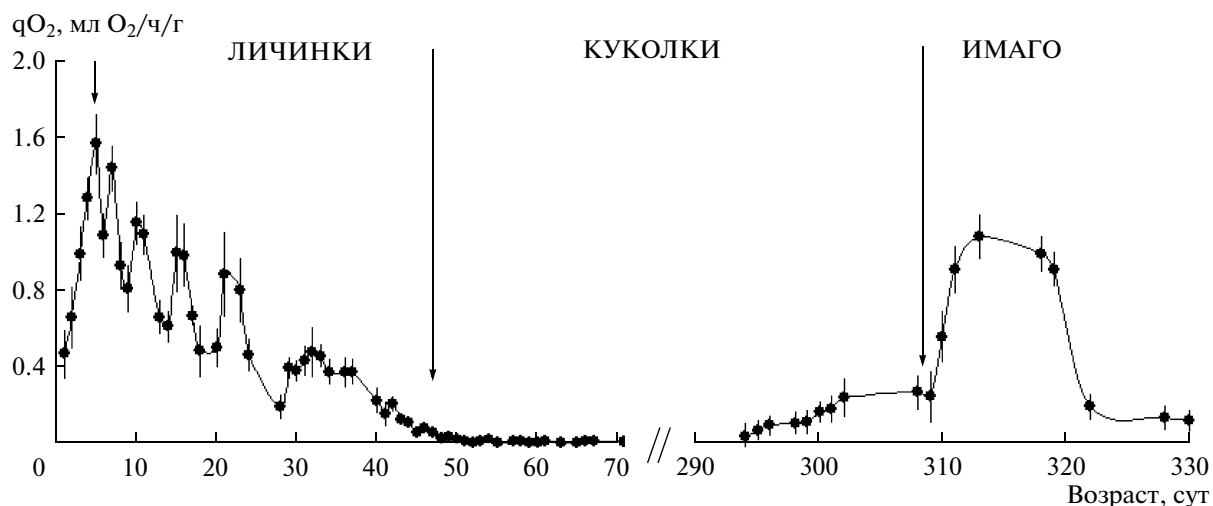
### Интенсивность потребления кислорода

Данный показатель энергетического обмена значительно увеличивается в ходе эмбрионального развития щитника линейчатого, достигая максимального значения ( $0.94 \pm 0.06$  мл  $O_2$ /ч/г) на стадии вылупления личинки из яйца (рис. 3). В течение развития личинок наблюдаются существенные колебания интенсивности потребления кислорода: снижение во время линек и подъем между ними. Средний уровень интенсивности потребления кислорода несколько снижается в ходе линек. Во время последней линьки отмечено минимальное значение этого показателя обмена ( $0.17 \pm 0.06$  мл  $O_2$ /ч/г). При завершении последней линьки и появлении имаго происходит четырехкратное увеличение интенсивности потребления кислорода. На последующих этапах развития имаго интенсивность потребления кислорода снижается и затем меняется мало.

Интенсивность потребления кислорода существенно возрастает в период эмбрионального развития совки капустной и достигает максимума при вылуплении личинки из яйца (рис. 4). В процессе роста личинок, сопровождающегося линьками, происходят заметно выраженные циклические изменения интенсивности потребления кислорода. К стадии предкуколки этот показатель существенно снижается, достигая наименьшего значения у куколок ( $0.0049 \pm 0.0002$  мл  $O_2$ /ч/г). Во время диапаузы куколок опыты не проводились. После завершения зимовки интенсивность потребления кислорода постепенно возрастает и достигает максимума после вылета бабочек. У имаго с возрастом этот показатель обмена постепенно снижается. Таким обра-



**Рис. 3.** Изменение интенсивности потребления кислорода в онтогенезе клопа щитника линейчатого *Graphosoma lineatum* L. По оси абсцисс — время развития; по левой оси ординат — интенсивность потребления кислорода. Стрелки указывают: начало вылупления личинок и имаго.



**Рис. 4.** Изменение интенсивности потребления кислорода в онтогенезе совки капустной *Mamestra brassicae* L. По оси абсцисс — время развития; по левой оси ординат — интенсивность потребления кислорода. Стрелки указывают: начало вылупления личинок, начало метаморфоза и появление имаго.

зом, в онтогенезе капустной совки отмечено два максимума интенсивности потребления кислорода: после завершения периода эмбрионального развития и у взрослых особей.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Представленные данные об особенностях роста и энергетического обмена (скорости и интенсивности потребления кислорода) свидетельствуют о заметных различиях между двумя видами насекомых, отличающимися типом развития. Прежде всего, отличается рост массы тела у насекомых с прямым и непрямым типом развитием.

У щитника линейчатого в ходе эмбриогенеза при увеличении массы собственно зародыша масса яйца не меняется. Основной прирост массы тела у данного вида, как и у других насекомых с прямым типом развития (Klingenberg, 1996), происходит во время личиночного периода, достигая максимума после перехода к стадии имаго, и плавно снижается в последующий период (рис. 1). Сходная динамика показана также для других видов насекомых с прямым типом развития: сверчка *Acheta domestica* L. (Никольская и др., 1986) и красноклопа обыкновенного *Pyrrhocoris apterus* L. (Радзинская, Никольская, 1982).



Характер изменения массы тела у совки капустной — вида с непрямым типом развития, иной. Как и у щитника, при росте собственно зародыша масса яйца в период эмбрионального развития не меняется. Масса тела у совки начинает увеличиваться во время личиночного развития и достигает максимума в конце личиночного периода (рис. 2), что существенно отличается от динамики изменения массы тела у щитника, для которого максимум приходится на период взрослого насекомого. Следует отметить, что у насекомых с непрямым развитием в период метаморфоза изменения массы тела незначительны и возможны за счет потери влаги. Сложный характер роста насекомых зависит, как известно, от последовательной смены секреции гормонов, контролирующей разные этапы их онтогенеза: рост, линьки, превращение в куколку, формирование имаго (Nova'k, 1975; Тыщенко, 1976; Росс и др., 1985; Takaki, Sakurai, 2003).

Динамика интенсивности потребления кислорода на разных этапах онтогенеза у насекомых с прямым и непрямым развитием также отличается. При этом, для изменения данного показателя в ходе индивидуального развития характерны и общие черты для всех насекомых. Изменение интенсивности потребления кислорода в онтогенезе этих животных имеет двухвершинный характер. Этот показатель энергетического метаболизма в онтогенезе насекомых с прямым типом развития (щитник линейчатый) существенно возрастает во время эмбриогенеза, достигает максимума при вылуплении зародышей и затем снижается в ходе личиночного развития. Второй по высоте подъем этого показателя энергетического обмена отмечен при переходе к имагинальной стадии. Колебательный характер снижения интенсивности потребления кислорода в ходе личиночного развития показан также для еще одного вида с прямым типом развития — красноклопа *Pyrrhocoris apterus* (Радзинская, Никольская, 1982).

Для насекомых с непрямым типом развития (совка капустная) максимум интенсивности потребления кислорода отмечен при вылуплении личинок. Далее следует циклическое снижение данного показателя в ходе личиночного развития, которое переходит в значительное падение на стадии куколки (рис. 3). Данное снижение — специфичное для насекомых с непрямым типом развития, связано с зимней диапаузой на этой стадии (Саулич, Соколова, 2002). Сходное понижение уровня интенсивности потребления кислорода на стадии куколки получено и для других видов, в частности, для колорадского жука (Таланов, 1968, Радзинская и др., 2003). Падение уровня метаболических процессов в этот период обусловлено не только тем, что куколки неподвижны, но и глубокими внутренними преобразованиями, связанными с лизисом внут-

ренних органов насекомого и последующим постепенным формированием новых структур из имагинальных дисков. Таким образом, если у клопа щитника интенсивность потребления кислорода между двумя максимальными значениями частично снижается, сохраняя колебательный характер, то у капустной совки, в промежутке между двумя максимальными значениями, данный показатель на фоне метаморфоза падает до минимальных величин. Следует отметить, что в период метаморфоза нервная и частично трахейная система насекомого сохраняются, однако лизис остальных тканей не может не затрагивать структуры, связанные с энергетическим обменом (Иванова-Казас, Иванова, 1964; Sehna, et al., 1996; Бызова, 2007). При переходе к стадии имаго интенсивность потребления кислорода капустной совки существенно возрастает и затем снижается на более поздних этапах. Данная динамика с небольшими вариациями характерна и для других насекомых с непрямым типом развития, в частности, для тутового шелкопряда *Bombyx mori* (Радзинская, Никольская, 1972), дрозофилы *Drosophila melanogaster* (Алексеева, 1985), комара *Culex pipiens molestus* (Алексеева и др., 1991). Сходные результаты были получены и для жука *Callosobruchus subinnotatus* (Mbata et al., 2000).

Поскольку метаморфоз у животных, в том числе у насекомых, рассматривается как эволюционное усложнение онтогенеза (Шмальгаузен, 1938; Захваткин, 1949; Иванова-Казас, 1995), сравнение насекомых с прямым и непрямым развитием можно анализировать с этой точки зрения. Одним из подходов к изучению эволюционных процессов с позиций сравнительной и эволюционной физиологии является анализ сопоставимого стандартного обмена, численно равного величине коэффициента  $a$  аллометрической зависимости скорости дыхания от массы тела (Зотин, Зотин, 1999). Показано, что в ходе процесса эволюции насекомых, так же как и других животных, величина коэффициента  $a$  возрастает (Зотин, Зотин, 1999, Алексеева, 2009). Результаты настоящей работы показывают, что значение коэффициента  $a$ , рассчитанное для взрослых особей с непрямым типом развития (совки капустной), существенно выше, чем у щитника линейчатого с прямым типом развития. Полученные данные подтверждают заключение, сделанное ранее (Зотин, Алексеева, 1997), что коэффициент  $a$  для отрядов насекомых с прямым типом развития ниже (диапазон значений для разных видов составляет 1.02–2.91), чем для отрядов насекомых с непрямым типом развития (1.24–4.08).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что насекомые с различными типами онтогенеза различаются не только по динамике потребления кислорода, но также по величине коэффициента  $a$ , характеризующего стандартный

обмен видов. Исходя из этого, можно предположить, что насекомые, онтогенез которых протекает по непрямому типу развития, включающему период метаморфоза, приобретают преимущество перед насекомыми с прямым типом развития, поскольку повышение энергетического обмена дает им возможность занять более обширный ареал. В связи с этим, следует отметить, что бабочки совки, представители сем. Noctuidae, в мировой фауне представлены 35000 видов, в то время как клопы щитники, представители сем. Pentatomidae – примерно 4000 видов. Количество видов рассматривается как показатель направления эволюционного развития (Матвеев, 1968; Расницын, 2005), и принято считать, что процветающие группы представлены большим числом видов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алексеева Т.А. Изменение интенсивности дыхания в онтогенезе *Drosophila melanogaster* // Онтогенез. 1985. Т. 16. № 2. С. 177–180.
- Алексеева Т.А. Изменение энергетического обмена в ходе эволюции насекомых // Экология, эволюция и систематика животных. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Рязань: НП “Голос губернии”. 2009. С. 300–302.
- Алексеева Т.А., Расницын С.П., Званцов А.В. Изменение интенсивности потребления кислорода в онтогенезе *Culex pipiens molestus* F. (Diptera, Nematocera, Culicidae) // Онтогенез. 1991. Т. 22. № 3. С. 266–268.
- Бызова Ю.Б. Дыхание почвенных беспозвоночных. М.: Т-во научных изданий КМК, 2007. 328 с.
- Захваткин А.А. Сравнительная эмбриология низших беспозвоночных (Источники и пути формирования индивидуального развития многоклеточных). М.: Сов. наука, 1949. 395 с.
- Зотин А.И. Термодинамический подход к проблемам развития, роста, старения. М.: Наука, 1974. 183 с.
- Зотин А.И., Алексеева Т.А. Прогрессивная эволюция и макросистематика в классе насекомых // Изв. РАН. Сер. биол. 1997. № 2. С. 186–195.
- Зотин А.И., Зотин А.А. Направление скорость и механизмы прогрессивной эволюции. М.: Наука, 1999. 320 с.
- Зотин А.И., Зотина Р.С. Феноменологическая теория развития, роста, старения организма. М.: Наука, 1993. 364 с.
- Иванова-Казас О.М. Эволюционная эмбриология животных. СПб.: Наука, 1995. 565 с.
- Иванова-Казас О.М., Иванова Н.А. Метаморфоз ивового пилильщика *Pontania capreae* L. (Hymenoptera, Tenthredinidae). I. Гиподерма // Энтомологическое обозрение. 1964. V. 43. № 2. P. 309–326.
- Никольская И.С., Радзинская Л.И., Прокофьев Е.А. Изменение дыхания и веса сверчка *Acheta domestica* L. при росте и старении // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1986. № 4. С. 628–633.
- Матвеев Б.С. Современное состояние учения А.Н. Северцова о прогрессе и регрессе эволюции // Зоологический журнал. 1968. Т. 47. № 1. С. 5–19.
- Озернюк Н.Д. Механизмы адаптаций. М.: Наука, 1992. 272 с.
- Озернюк Н.Д. Биоэнергетика онтогенеза. М.: Изд-во МГУ, 2000. 264 с.
- Радзинская Л.И., Никольская И.С. Энергетика развития тутового шелкопряда. 1. Дыхание и уровень АТФ в зародышевом развитии // Онтогенез. 1972. Т. 3. № 6. С. 602–608.
- Радзинская Л.И., Никольская И.С. Изменение энергетического обмена в онтогенезе животных // Математическая биология развития. М.: Наука, 1982. С. 160–168.
- Радзинская Л.И., Никольская И.С., Алексеева Т.А. и др. Изменение интенсивности дыхания в онтогенезе некоторых беспозвоночных // Онтогенез. 2003. Т. 34. № 5. С. 377–381.
- Расницын А.П. Избранные труды по эволюционной биологии. М.: Т-во научных изданий КМК, 2005. 347 с.
- Росс Г., Росс Ч., Росс Д. Энтомология. М.: Мир, 1985. 576 с.
- Саулич А.Х., Соколова И.В. Сезонные адаптации совков (Lepidoptera, Noctuidae) // Энтомологическое обозрение. 2002. Т. 81. № 3. С. 529–546.
- Тилавов Т.Т. О периодичности газообмена в онтогенезе колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say) // Зоологический журнал. 1968. Т. 48. № 12. С. 118–125.
- Тыщенко В.П. Основы физиологии насекомых. Л.: Изд-во ЛГУ, 1976. Т. 1. 363 с.
- Шмальгаузен И.И. Пути и закономерности эволюционного процесса. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1938. 144 с.
- Beck S.D. Insect Photoperiodism. New York: Academic Press. 1980. 387 p.
- Gromadzka J. Respiratory metabolism of the Colorado beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) // Ekol. Polska. 1968. V. 16. № 17. P. 375–383.
- Gromysz K., Hubicka J. Changes in oxygen consumption of the fly *Lipara similis* Schin. (Diptera) during various stages of its life // Comp. Biochem. Physiol. 1988. V. A91. P. 91–95.
- Klingenberg C.P. Individual variation of ontogenesis: a longitudinal study of growth and timing // Evolution. 1996. V. 50. № 6. P. 2412–2428.
- Mbata G.N., Hetz S.K., Reichmuth C., Adler C. Tolerance of pupae and adults of *Callosobruchus subinnotatus* Pic (Coleoptera: Bruchidae) to modified atmospheres: a function of metabolic rate // J. Insect Physiol. 2000. V. 46. P. 145–151.
- Nova'k V.J.A. Insect hormones. London: Chapman and Hall, 1975. 600 p.
- Sehnal F., Svacha P., Zrzavy J. Evolution of insect metamorphosis // Metamorphosis. Postembryonic reprogramming of gene expression in amphibian and insect cells. San Diego: Academic Press, 1996. P. 3–58.
- Takaki K., Sakurai S. Regulation of prothoracic gland ecdysteroidogenic activity leading to pupal metamorphosis // Insect Biochem. Molec. Biol. 2003. V. 33. P. 1189–1199.
- Yaginuma T., Yamashita O. Oxygen consumption in relation to sorbitol utilization at the termination of diapause in eggs of the silkworm, *Bombyx mori* // J. Insect Physiol. 1999. V. 45. P. 621–627.

## Dynamics of Energy Metabolism in Ontogenesis of Striped Shield Bug (*Graphosoma lineatum* L.) and Cabbage Moth (*Mamestra brassicae* L.)

T. A. Alekseeva and N. D. Ozernyuk

*Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119991 Russia*

**Abstract**—Dynamics of growth and oxygen consumption during ontogenesis of insects with direct (striped shield bug *Graphosoma lineatum* L.) and indirect (cabbage moth *Mamestra brassicae* L.) development have been compared. The correlation between a character of energy metabolism alteration and peculiarities of development of the insects has been shown. Cyclic decrease of oxygen consumption during molt and sharp dropping during metamorphosis have been observed in insects with indirect development. The decrease of oxygen consumption has been observed in insects with direct development only during molts. The coefficient *a* of allometric dependence of oxygen consumption on body weight of imago for cabbage moth was two times higher than that for striped shield bug.

*Keywords:* insects, ontogenesis, direct and indirect development, growth, oxygen consumption

УДК 591:577

## РАЗВИТИЕ АНТИПОДАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЗАРОДЫШЕВОГО МЕШКА ПШЕНИЦЫ

© 2011 г. И. А. Чабан, Е. М. Лазарева\*, Н. В. Кононенко, В. Ю. Поляков\*

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, 127550 Москва,  
ул. Тимирязевская, 42; факс(495)977-0947

\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет 119992 Москва,  
ГСП-2, Ленинские горы

E-mail: lazareva-e@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.12.09 г.

Окончательный вариант получен 11.04.10 г.

В работе с помощью реконструкции серийных “полутонких” срезов детально прослежена динамика формирования антиподального комплекса пшеницы *Triticum aestivum* L. Полученные данные позволяют выделить три ключевых и строго последовательных этапа в развитии антиподального комплекса: этап пролиферации инициальных клеток, этап роста и функциональной дифференцировки антипод и этап их апоптотической гибели.

Впервые охарактеризованы особенности митотического деления антипод. Показано, что по структуре интерфазных ядер и митотических хромосом пролиферирующие антиподы не отличаются от клеток нуцеллуса, окружающих зародышевый мешок. Реконструкция строго ориентированных серийных срезов позволила установить, что антиподы делятся не синхронно. Методом цитофотометрического анализа определено содержание ДНК в дифференцированных клетках антиподального комплекса: в зрелом зародышевом мешке плоидность антипод варьирует от 8 до 32С. Установлено, что в антиподальном комплексе процессы пролиферации и эндоредупликации ДНК “разобщены” во времени: эндоредупликация ДНК в антиподах начинается только после окончания их пролиферации. Процесс эндоредупликации ДНК сопровождается тотальным ремоделированием хроматина, в результате в ядрах антипод формируются гигантские хромосомы. Конечным этапом развития антиподального комплекса является гибель клеток, связанная с включением программы апоптоза. Предложена модель структурной организации антиподального комплекса, основанная на принципе “ярусного” расположения клеток. Впервые обнаружена секреторная активность антипод, направленная в синцитий эндосперма. Анализ “усеченных” семяпочек с неразвившимся эндоспермом показал, что возможным индуктором, стимулирующим функциональную активность антипод и вызывающим включение их терминальной дифференцировки, является развивающийся эндосперм. Полученные данные обсуждаются в связи с гипотезой о функциональной роли антипод в развитии эндосперма и зародыша.

**Ключевые слова:** ранний эмбриогенез зародышевого мешка, антиподальный комплекс, растительные клетки.

### ВВЕДЕНИЕ

Одним из структурно-функциональных элементов сформированного женского гаметофита представителей семейства *Poaceae* является хорошо развитый и активно функционирующий антиподальный комплекс, располагающийся в халазальной части зародышевого мешка (Поддубная-Арнольди, 1976). Несмотря на длительную историю изучения, сведения о динамике формирования антиподального комплекса носят случайный и не систематический характер.

На основании ранних наблюдений сложилось мнение о том, что увеличение количества антипод происходит как до, так и после оплодотворения яйцеклетки и центральной клетки (Brink, Соорет,

1944; Батыгина, 1974; Поддубная-Арнольди, 1976; Engell, 1994). В то же время показано, что характерной особенностью клеток антипод является особый тип дифференцировки, сопровождающийся эндоредупликацией генома и формированием в интерфазных ядрах гигантских (политенных) хромосом (Tscharmak-Woess, 1971; Ивановская, 1973; Zhimuev, 1996; Петрова и др., 1985; Лазарева, Ченцов, 2004; Чабан, 2008). Вместе эти данные указывают на возможную “сопряженность” в клетках высших растений процессов пролиферации, дифференцировки и эндоредупликации ДНК. Вопрос о том, когда заканчивается пролиферация антипод и начинается эндоредупликация их ядерной ДНК, и связаны ли эти процессы с оплодотворением яйцеклетки, до настоящего времени не решен. Отчасти, это объяс-

няется тем, что в литературе отсутствуют данные об особенностях митотического деления антиподальных клеток. Очевидно, что от количества делений инициальных клеток, от пространственной ориентации полюсов делений и от направленного роста клеток во многом зависит общая структура антиподального комплекса в развивающемся зародышевом мешке.

Другая мало изученная проблема – функциональная роль антиподального комплекса в раннем эмбриогенезе растений. Известно, что антиподы представляют собой транзиторную ткань, которая сохраняет жизнеспособность до тех пор, пока в цитоплазме эндосперма не начинается формирование клеток (Bhatnagar, Chandra, 1975; Engell, 1994; Diboll, 1966). На основании ряда косвенных данных высказываются предположения о том, что антиподальный комплекс является метаболическим центром абсорбции и преобразования питательных веществ, поступающих из тканей семяпочки, для последующего направленного транспорта в зародышевый мешок (Поддубная-Арнольди, 1976; Engell, 1994). Возможно, так же, что в антиподах синтезируются ферменты, необходимые для лизиса примыкающих к антиподам клеток нуцеллуса (Engell, 1994).

Вместе, перечисленные данные показывают, что антиподальный комплекс злаков остается загадочной и мало изученной структурой зародышевого мешка.

Цель настоящей работы – подробное изучение этапов дифференцировки клеток антиподального комплекса пшеницы от начала их пролиферации до включения программы апоптотической гибели и получение данных о функциональном значении антиподального комплекса для эмбрионального развития.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования использовалась гексаплоидная пшеница *Triticum aestivum* L. ( $2n = 42$ ) озимого сорта Московская 39.

Нормальные семязачатки на разных фазах развития и семязачатки, имеющие “усеченную” форму (рис. 12, а), извлекали из колоса и фиксировали в 2.5% растворе глутарового альдегида на 0.1 М ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) буфере Зоренсена, pH 7.3 с добавлением сахарозы (15 мг/мл). После фиксации из семязачатков изолировали семяпочки и выделяли зародышевые мешки, содержащие эндосперм, зародыш и антиподы (Петрова, 1970). Полученные образцы заключали в эпоксидную смолу (Эпон 812, Merck, Германия) по стандартной методике. Ультратонкие срезы получали с помощью ультрамикротомы LKB–III (Швеция).

Для анализа структуры и пространственной ориентации клеток антиподального комплекса исполь-

зовали тотальные препараты зародышевых мешков и “полутонкие” (около 1–2 мкм) срезы семяпочек, ориентированные дорсовентрально и билатерально по отношению к бороздке семязачатка. Срезы монтировали на предметные стекла, окрашивали 0.1% водным раствором метиленового синего (Merck, Германия) и заключали в Эпон 812 (Merck, Германия). Полученные препараты изучали в микроскопе Axiovert 200M (Zeiss, Германия) с эпифлуоресцентным освещением, стандартным набором фильтров и объективом Neofluar  $\times 100$ . Изображения записывали с помощью камеры AxioCam HRm и обрабатывали в программе Adobe Photoshop 7.0.

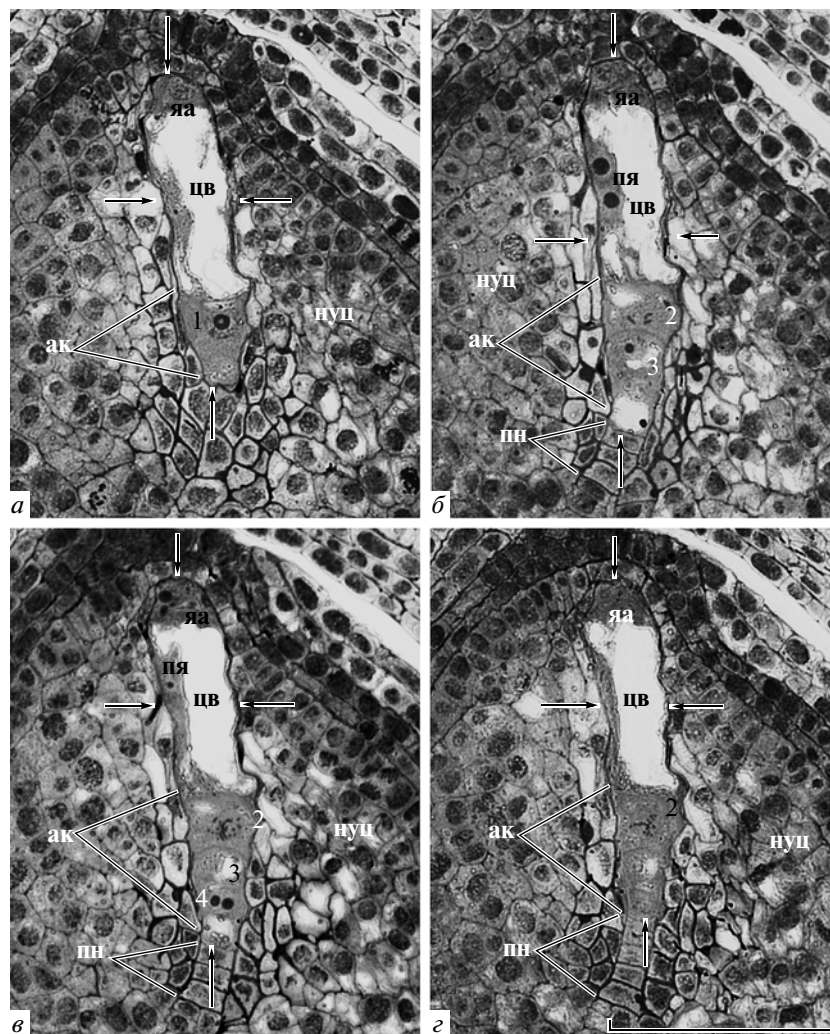
Для цитофотометрического анализа семяпочки фиксировали в смеси этанола и уксусной кислоты (в соотношении 3 : 1) в течение 3 часов. Целые семяпочки обрабатывали 5 N HCL в течение 40 минут при 22°C и окрашивали реактивом Шиффа (Merck, Германия). Затем на предметном стекле в капле 45% уксусной кислоты из семяпочек извлекали антиподальные клетки и готовили постоянные препараты. Содержание ДНК определяли в относительных единицах на цитофотометре SMP-20 (Opton, Германия) с объективом  $\times 10$ , окуляром  $\times 10$  и зондом 0.63 мм. В качестве стандарта использовали ядра клеток нуцеллуса и эндосперма на стадии телофазы (2с и 3С соответственно) или метафазные пластинки делящихся клеток эндосперма (6С).

Для выявления антиподальных клеток, включивших программу апоптоза, тотальные препараты изолированных зародышевых мешков окрашивали по методу TUNEL (G3250; Promega, Madison, WI, США) (Otsuki et al., 2003). Фиксированные в 4% параформальдегиде (ISN, США) (при 4°C) зародышевые мешки, инкубировали с реагентом в течение 40 минут в темноте при комнатной температуре (22°C). Затем препараты отмывали от реагента и заключали в среду Vectashield (Vector laboratories, США), содержащую флуорохром DAPI и изучали в микроскопе Axiovert 200M (Zeiss, Германия) с эпифлуоресцентным освещением, стандартным набором фильтров и объективом Neofluar  $\times 100$ . Изображения записывали камерой AxioCam HRm и обрабатывали с помощью программы Adobe Photoshop 7.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### 1. Формирование антиподального комплекса в зародышевом мешке до оплодотворения семяпочки

**1.1. Пролиферация антипод.** Известно, что в ювенильной семяпочке пшеницы семиклеточный зародышевый мешок содержит три инициальные гаплоидные антиподальные клетки, которые располагаются полярно: одна клетка (базальная) примыкает к халазальной зоне нуцеллуса, а две другие занимают апикальное положение по отношению к базальной клетке (Батыгина, 1974). Анализ серий-



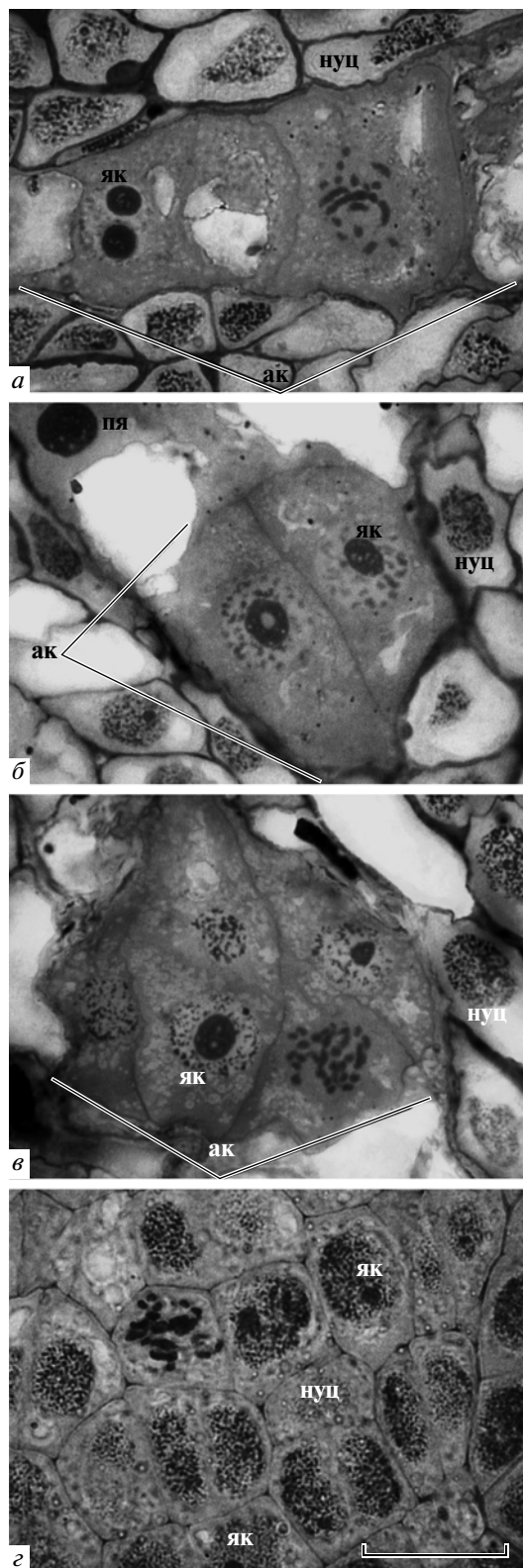
**Рис. 1.** Начальные этапы формирования антиподального комплекса зародышевого мешка (начало пролиферации до оплодотворения). Дорсовентральные сечения семязачатка.

*a–г* – серия срезов зародышевого мешка (стрелки) с антиподальными клетками, находящимися на различных стадиях клеточного цикла (антиподы обозначены цифрами 1, 2, 3, 4). Апикальная антипода 1 на стадии интерфазы (*a*); апикальная антипода 2 на стадии метафазы (*б, в, г*); антиподы 3 и 4 образовались в результате деления базальной инициальной клетки (*б, в*). Центральная вакуоль зародышевого мешка (цв), недифференцированный яйцевой аппарат (яа), полярные ядра зародышевого мешка (пя) и постамент, образованный клетками нуцеллуса (пн). Объектив Plan CN  $\times 20/0.40$ . Масштаб 100 мкм.

ных дорсовентральных срезов нескольких зародышевых мешков показал, что первой вступает в деление базальная клетка: на рис. 1 (*б, в*) видно, что базальная клетка антиподального комплекса завершила деление (стадия поздней телофазы, G1), в то время как одна из апикальных клеток находится на стадии метафазы, другая – в интерфазе. При этом ось деления базальной клетки ориентируется параллельно дорсовентральной плоскости зародышевого мешка. На всех последующих этапах развития антиподального комплекса делений базальной клетки не зарегистрировано, а митотические фигуры обнаруживаются только в апикальных клетках. При этом некоторые апикальные клетки могут делиться синхронно (рис. 2, *б*), однако, в целом, в ан-

типодальном комплексе преобладают асинхронные деления (рис. 2, *a, в*).

Общая структурная организация интерфазных ядер и митотических хромосом в клетках пролиферирующих антипод сходна с клетками нуцеллуса, окружающими зародышевый мешок. В обоих типах ткани интерфазные ядра содержат 1–2 ядрышка, хроматин представлен фибриллярными структурами – хрономемами (рис. 2, *г*). По характерной фибриллярной организации хроматина, интерфазные ядра антипод и нуцеллуса можно отнести к ядрам хрономемного типа (Kaufmann et al., 1960). Сравнительный анализ показал, что митотические хромосомы антипод по своей общей морфологии, размерам и плотности упаковки хроматина также не отличаются от хромосом клеток



нукеллуса (рис. 2, а, в, г). Существенным отличием антипод являются большие размеры ядрышек, которые по объему в несколько раз превышают ядрышки клеток нукеллуса (рис. 2, б, в).

**Рис. 2.** Асинхронность делений антиподальных клеток в начале пролиферации (до оплодотворения).

*а* — асинхронные деления антипод. Одна клетка на стадии метафазы, другая на стадии G1.

*б* — синхронные деления некоторых антипод (профаза) апикальной зоны комплекса.

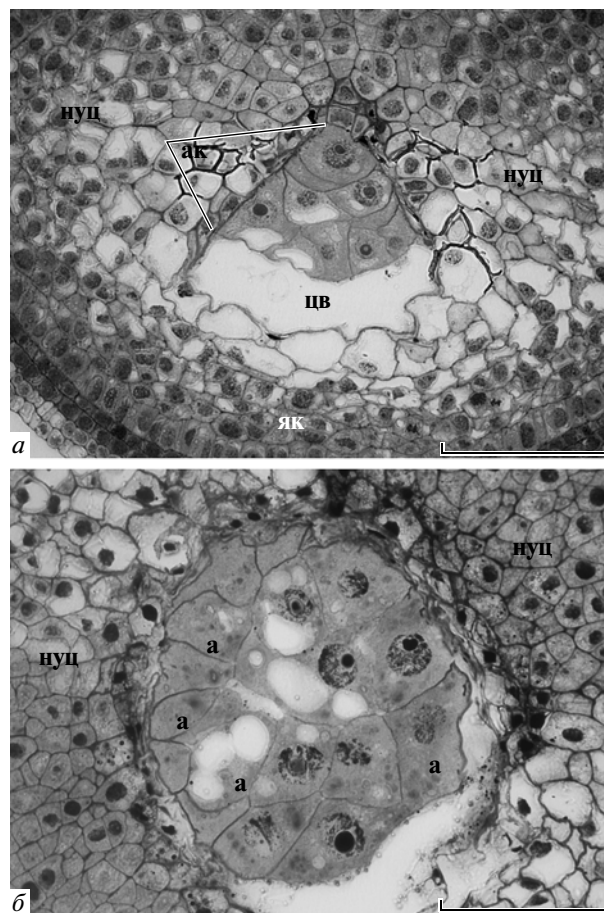
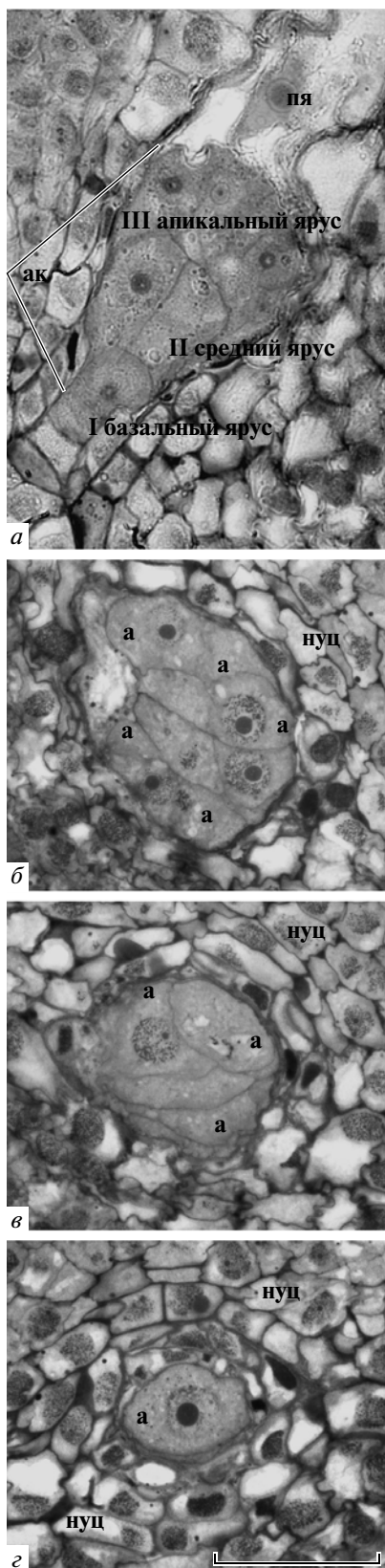
*в* — асинхронные деления антипод в апикальной зоне комплекса на более поздней стадии пролиферации: 1 — интерфаза, 2, 3 — профаза, 4 — прометафаза.

*г* — интерфазные и делящиеся клетки нукеллуса (**нуц**), окружающие зародышевый мешок. В ядрах клеток нукеллуса ядрышки (**як**) существенно меньше (*з*), чем в ядрах антиподальных клеток (*б*). Митотические хромосомы нукеллуса (*з*) по своей общей морфологии, размерам и плотности упаковки хроматина не отличаются от хромосом клеток антипод (*а*). Обьектив UPlan FLN  $\times 100/1.30$ . Масштаб 20 мкм.

По мере пролиферации антипод антиподальный комплекс приобретает четко выраженную ярусную структуру (рис. 3). Реконструкция серийных срезов антиподального комплекса, ориентированных в поперечной и дорсовентральной плоскости семяпочки, позволила установить, что на заключительном этапе пролиферации базальный ярус, примыкающий к халазальной зоне нукеллуса, содержит 1–2 клетки, средний около 8-ми. Ярус, граничащий непосредственно с центральной клеткой, содержит не менее 16 клеток (рис. 4, б). Таким образом, окончательное количество клеток в сформированном антиподальном комплексе зародышевого мешка пшеницы составляет 25–27. На этом этапе развития в клетках антиподального комплекса митозы не обнаруживаются, что свидетельствует о завершении пролиферативной активности антипод.

**1.2. Дифференцировка антипод.** Все последующие этапы развития антиподального комплекса в не оплодотворенной семяпочке связаны с дифференцировкой антипод, характерными признаками которой является прогрессивный рост клеток, сопровождающийся значительным увеличением размеров ядер.

В качестве отправной точки для анализа изменений, характеризующих этот процесс, была взята стадия зрелого зародышевого мешка, на которой происходит смещение его продольной оси, связанное с поворотом семяпочки на 90 градусов по направлению к микропиле (Батыгина, 1974; Поддубная-Арнольди, 1976; Engell, 1994). В результате, антиподальный комплекс располагается латерально по отношению к микропиллярной зоне (рис. 5, а). В таком зародышевом мешке антиподальный комплекс занимает примерно третью часть всего объема. На этом этапе крупные ядра антипод более чем в 2 раза превышают по диаметру диплоидные ядра клеток нукеллуса (рис. 5, а). В их цитоплазме содержится несколько мелких вакуолей и одна большая вакуоль, как правило, обращенная в сторону центральной клетки (рис. 5, а).



**Рис. 4.** Антиподальный комплекс зрелого, готового к оплодотворению зародышевого мешка (конец пролиферации, начало дифференцировки).

*а* – ярусное расположение клеток на продольном сечении антиподального комплекса.

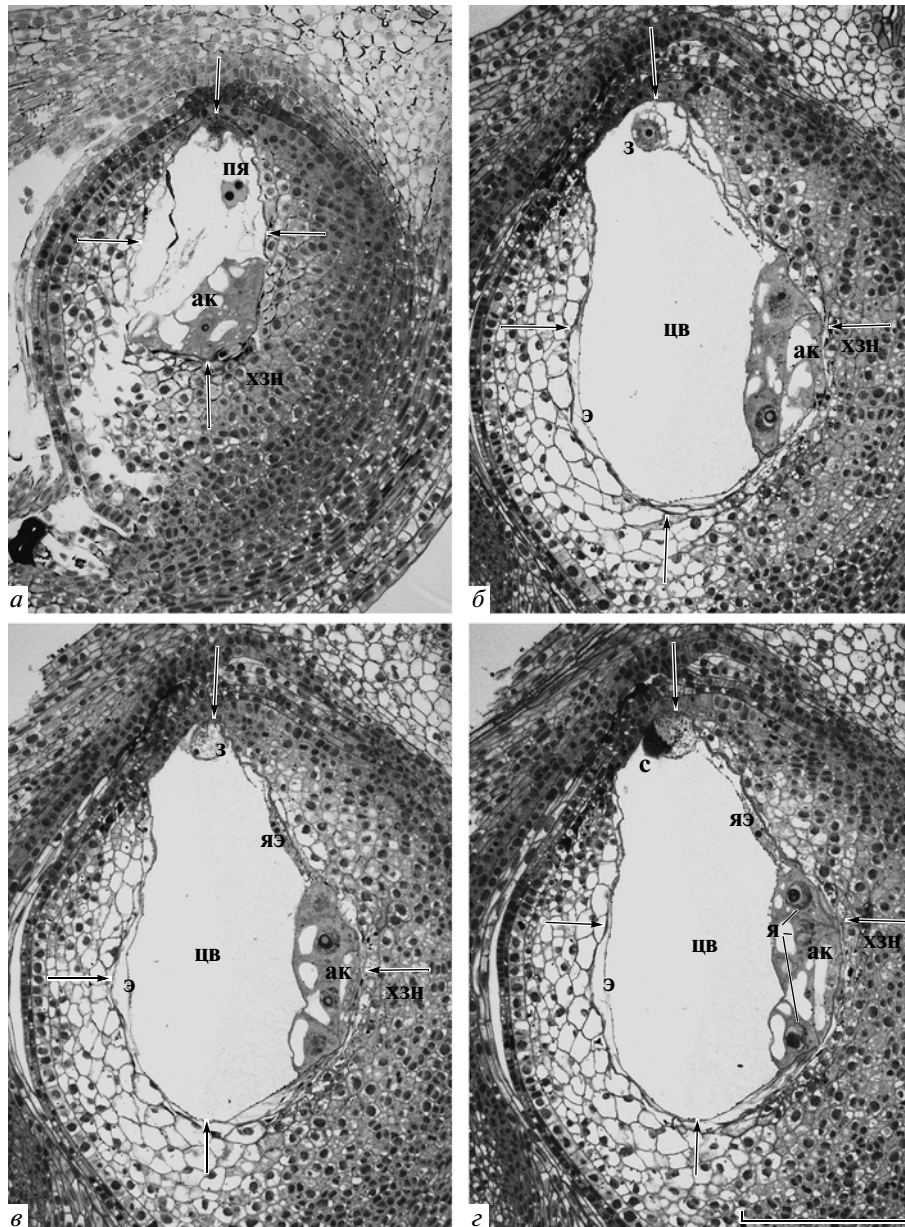
*б* – поперечное сечение антиподального комплекса на уровне апикального яруса. На этом этапе апикальный ярус содержит не менее 16 клеток. Объектив Plan CN  $\times 20/0.40$ . Масштаб 100 мкм. Клетки нуцеллуса – нуц; антиподальный комплекс – ак; антипода – а; центральная вакуоль – цв.

**Рис. 3.** Ярусное расположение клеток в пролиферирующем антиподальном комплексе (до оплодотворения).

*а* – на дорсовентральном сечении зародышевого мешка в составе антиподального комплекса четко видны три яруса клеток: апикальный I, средний II и базальный III. Поперечные сечения антиподальных клеток апикального (*б*), среднего (*в*) и базального (*г*) ярусов комплекса. Антипода – а, клетки нуцеллуса – нуц, полярное ядро – пя. Объектив Plan CN  $\times 40/0.65$ . Масштаб 50 мкм.

Трехмерная реконструкция серий дорсовентральных и трансвентральных срезов семязпочки, позволила установить, что ярус, граничащий с центральной клеткой, содержит не менее 8 клеток, средний не менее 4-х, базальный ярус комплекса антипод, примыкающий к халазе, содержит 1 клетку.

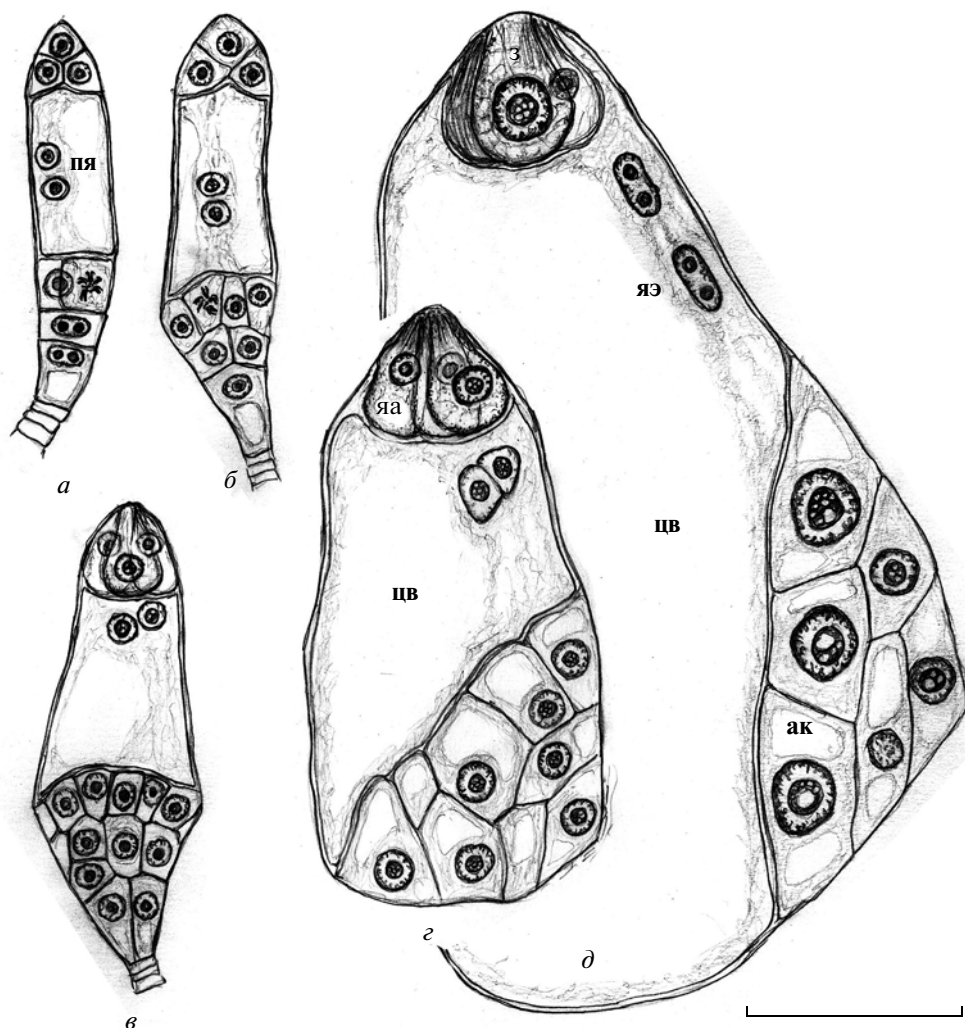




**Рис. 5.** Структура зародышевого мешка до и после оплодотворения. Дорсовентральные сечения семязпочек.  
*а* – Положение антиподального комплекса в зрелом зародышевом мешке перед оплодотворением.  
*б–г* – Положение антиподального комплекса в зародышевом мешке после оплодотворения. Антиподальный комплекс (**ак**) располагается латерально по отношению к продольной оси зародышевого мешка (стрелки) после завершения поворота семязпочки. Зигота – **з** (*а, в*); синергида – **с** (*б*); ядра эндосперма – **яэ** (*б, в, г*); эндосперм – **э**; халаза – **х**; ядра с гигантскими хромосомами – **я**; полярные ядра – **пя**; халазальная зона нуцеллуса – **хзн** (*а*). Объектив Plan CN  $\times 20/0.40$ . Масштаб 100 мкм.

Одной из возможных причин увеличения размеров цитоплазматического и ядерного компартов дифференцирующихся клеток антиподального комплекса, может быть возрастание их плоидности (Melaragno et al., 1993). Для проверки этого предположения с помощью метода цитофотометрии проведено измерение количества ДНК в ядрах индивидуальных антипод. Полученные данные показали, что в растущих антиподах количество ДНК примерно в 4 раза превышает гаплоидные значения

(табл. 1). Этот факт свидетельствует о том, что после окончания этапа пролиферации в ядрах антипод индуцируется процесс эндоредупликации ДНК. Этот процесс сопровождается ремоделированием структуры хроматина в клетках всех ярусов антиподального комплекса, что в конечном итоге приводит к формированию гигантских хромосом. Первые структуры, соответствующие обособленным хромосомам, появляются в интерфазных ядрах, когда количество ДНК возрастает до 4С.



**Рис. 6.** Динамика развития антиподального комплекса (ак) от начала пролиферации антипод до оплодотворения зародышевого мешка и формирования зиготы. Схема основана на пространственной реконструкции серийных срезов семязачатков пшеницы.

*a, б, в, г* — зародышевые мешки до оплодотворения.

*a* — начало пролиферации инициальных антиподальных клеток;

*б, в* — этапы пролиферации антиподальных клеток, приводящие к формированию трехъярусного комплекса;

*в* — завершение процесса пролиферации, начало эндоредупликации ядер антиподальных клеток;

*г* — сформированный зародышевый мешок с полиплоидными антиподальными клетками, готовый к оплодотворению;

*д* — зародышевый мешок, с высокополиплоидными антиподальными клетками, после оплодотворения и образования зиготы (з) и первых ядер эндосперма (яэ).

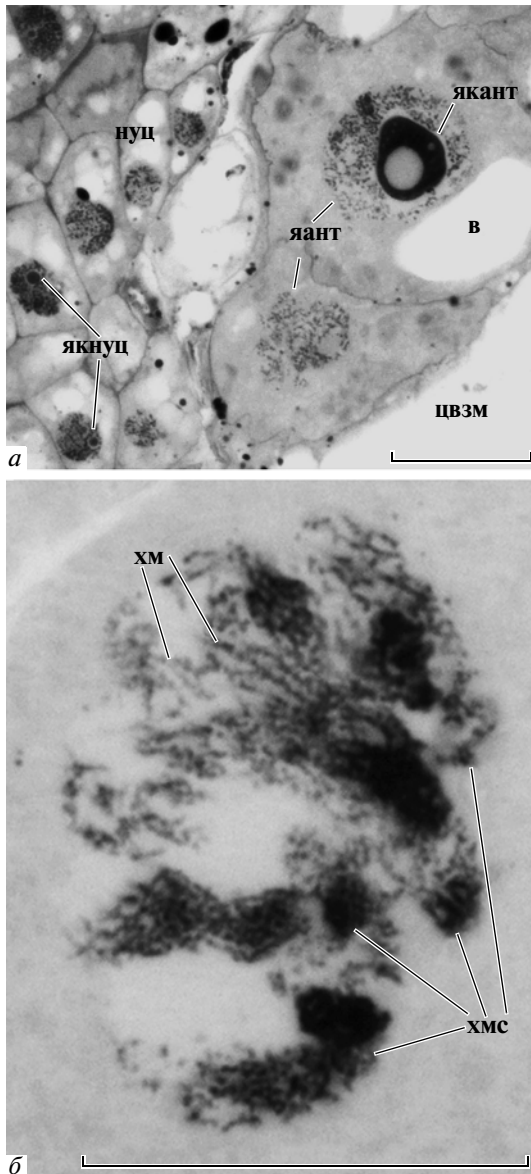
На схеме: полярные ядра — **пя**; центральная вакуоль — **цв**; яйцевой аппарат — **яа**. Масштаб 100 мкм.

Обобщенная схема процесса формирования антиподального комплекса представлена на рисунке 6.

## 2. Развитие антиподального комплекса в зародышевом мешке после оплодотворения семязачатка

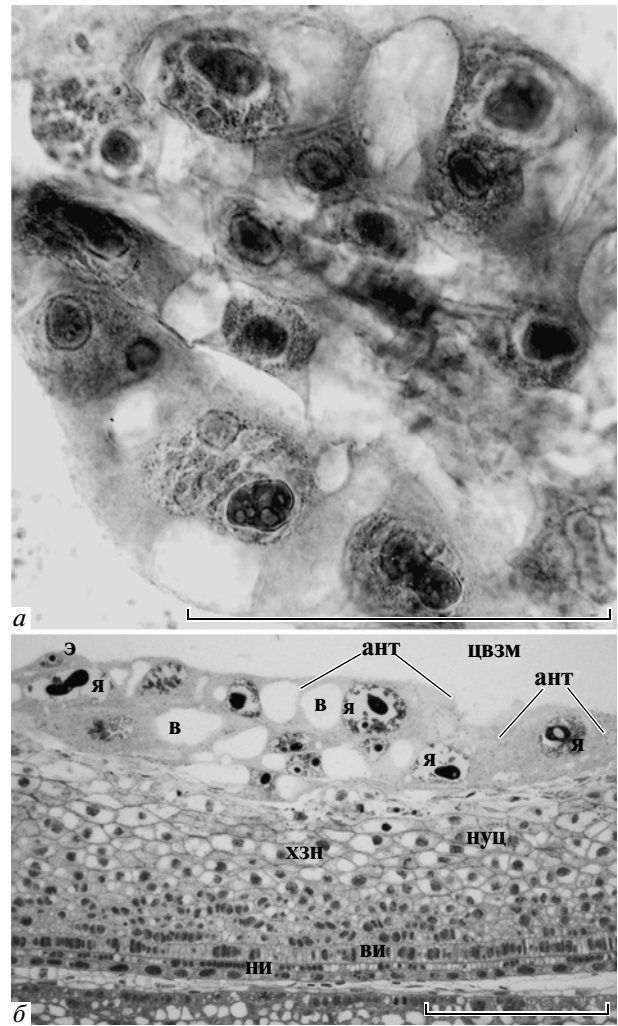
После оплодотворения яйцеклетки и центральной клетки зародышевого мешка антиподальный комплекс занимает свое окончательное положение,

латеральное по отношению к микропиллярной зоне и параллельно удлиняющейся халазе растущей семязачатка (рис. 5, б–г). В дальнейшем размеры антиподального комплекса увеличиваются за счет пропорционального роста объемов цитоплазмы и ядер антипод (рис. 7). Когда количество ДНК в ядрах антипод возрастает до 8С–16С, структуры, соответствующие обособленным гигантским хромосомам, значительно увеличиваются в размерах. В отличие от компактных метафазных хромосом, в которых на светооптическом уровне не удастся идентифициро-



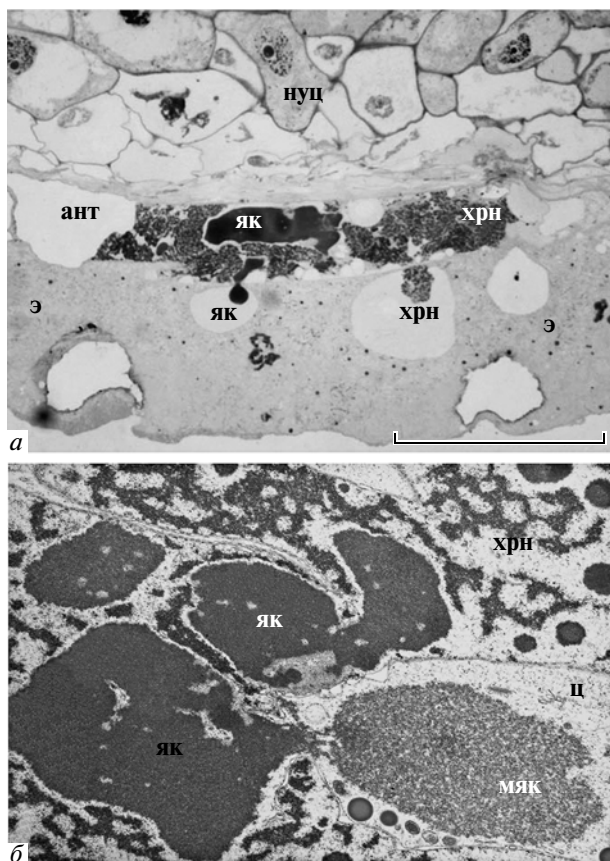
**Рис. 7.** Ядра антипод с гигантскими хромосомами.  
*а* – на полутонком срезе семяпочки (окрашивание 0.1% раствором метиленового синего) – фрагмент антиподального комплекса зародышевого мешка. Клетки нуцеллуса – нуц, ядрышки нуцеллуса – якнуц. Ядра (яант), ядрышко (якант) и вакуоли (в) антиподальных клеток. Центральная вакуоль зародышевого мешка – цвзм. Объектив Plan CN  $\times 40/0.65$ . Масштаб 50 мкм;  
*б* – на срезе тотального препарата антиподального комплекса (окрашивание 0.1% раствором метиленового синего). В составе гигантских хромосом выявляются “элементарные” фибриллярные структуры хроматина – хромонемы (хм, стрелки). Гигантские хромосомы – хмс (стрелки), як – ядрышко и вакуоли (в) антиподальных клеток. Объектив UPlan FLN  $\times 100/1.30$ . Масштаб 20 мкм.

вать составляющие их структурные элементы, гигантские хромосомы упакованы менее компактно. На срезах антиподального комплекса (рис. 7) в составе гигантских хромосом четко выявляются протяженные фибриллярные структуры, соответству-



**Рис. 8.** Гетерогенность клеток в активно функционирующем антиподальном комплексе.  
*а* – антиподальный комплекс на тотальном препарате зародышевого мешка (вид со стороны базального яруса). Объектив Plan CN  $\times 40/0.65$ . Масштаб 50 мкм.  
*б* – антиподальный комплекс на дорсовентральном срединном срезе семяпочки. В апикальном ярусе, примыкающем к эндосперму, видны крупные клетки с гигантскими ядрами (я), клетки базального яруса, примыкающие к халазальной зоне нуцеллуса (хзн), содержат мелкие ядра. Клетки нуцеллуса – нуц, клетки наружного (ни) и внутреннего (ви) интегументов, антиподы – ант, вакуоли в цитоплазме антипод – в. Объектив Plan CN  $\times 40/0.65$ . Масштаб 50 мкм.

ющие хромонемам интерфазных ядер. На этой стадии развития сильно увеличиваются размеры ядрышек. В тоже время скорость роста индивидуальных клеток антиподального комплекса не одинакова, о чем свидетельствует сильно выраженная гетерогенность клеток и ядер по их размерам. Особенно четко эти различия выявляются на тотальных препаратах зародышевого мешка (рис. 8). Реконструкция серийных дорсовентральных и поперечных сечений семяпочки показывает, что наибольш-



**Рис. 9.** Секреторная активность антипод.

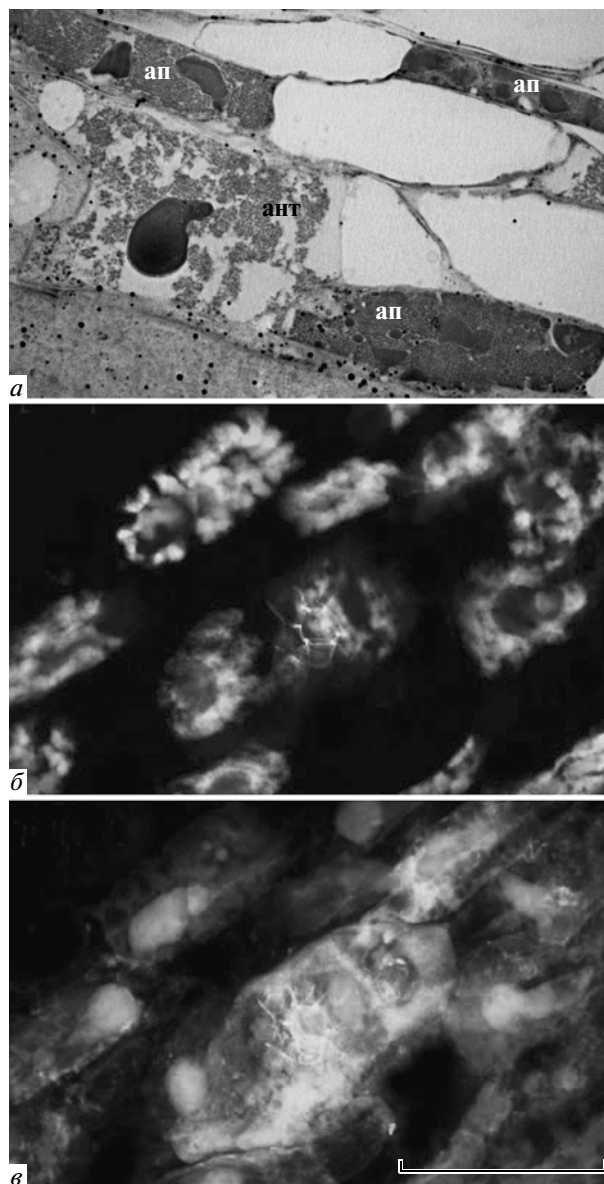
*а* – экструзия участков хроматина (хрн) и материала ядрышка (як) из ядра антиподы (ант) в вакуоли нуклеарного эндосперма на дорсовентральном срезе семязачатка (окрашивание 0.1% раствором метиленового синего). Клетки нуцеллуса – нуц. Объектив UPlan FLN ×100/1.30. Масштаб 20 мкм.

*б* – выход части материала ядрышка (мяк) в цитоплазму (ц) антиподы, (электронная микрофотография фрагмента антиподальной клетки, ×5000).

ших размеров достигают антиподы в апикальном ярусе, который контактируют с эндоспермом. Клетки базального и среднего ярусов отличаются более мелкими ядрами (рис. 8, *а, б*). Такое соотношение размеров ядер и клеток сохраняется на всем протяжении дальнейшего развития антиподального комплекса.

В зародышевых мешках с хорошо развитым эндоспермом наблюдается удлинение антипод параллельно бороздке. В таких вытянутых антиподах большую долю объема клетки занимают одна или две крупные вакуоли.

На этом этапе развития зародышевого мешка на ультраструктурном уровне выявляются случаи выхода части гранулярного компонента ядрышка в цитоплазму антиподы (рис. 9, *б*). В то же время можно наблюдать картины, свидетельствующие о секреторной функции антипод: крупные вакуоли



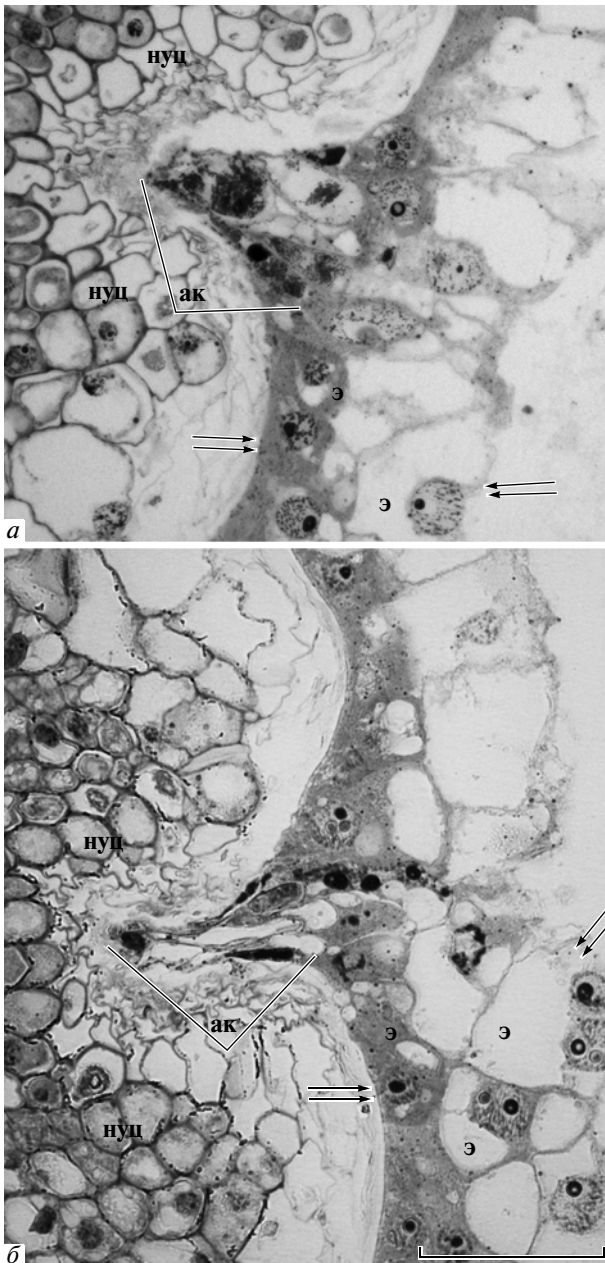
**Рис. 10.** Клетки антиподального комплекса на этапе апоптотической гибели.

*а* – клетки антиподального комплекса (срез тотального препарата): ап – антиподы с конденсированным хроматином и фрагментированными ядрышками и антипода с диффузным хроматином (*а*).

*б* – ядра антипод на тотальном препарате изолированного зародышевого мешка, окрашенные флуорохромом Dapi.

*в* – те же ядра после окрашивания по методу TUNEL. Окрашивание гигантских хромосом и зон ядрышек некоторых клеток свидетельствует о наличии в этих структурах фрагментированной ДНК. Объектив UPlan FLN ×100/1.30. Масштаб 20 мкм.

синцития эндосперма содержат фрагменты ядрышка и хроматина, экструированные из прилежащих к нему антиподальных клеток (рис. 9, *а*).



**Рис. 11.** Завершающие стадии онтогенеза антиподального комплекса (ак) на поперечных срезах семязачатков с многослойным эндоспермом.

*а* – фаза зародышевого мешка с двухслойным эндоспермом (э, двойные стрелки).

*б* – фаза зародышевого мешка с трехслойным эндоспермом (э, двойные стрелки). Функционирующие и апоптотические антиподы располагаются внутри углубления, сформированного халазальной зоной нуцеллуса (нуц). Объектив Plan CN  $\times 20/0.40$ . Масштаб 100 мкм.

На последующей стадии развития зародышевого мешка, которая характеризуется переходом эндосперма в клеточную фазу, наблюдается сильная гетерогенность клеток антипод по содержанию ДНК. По данным цитофотометрии ploidy большинства

клеток антиподального комплекса в этот период составляет от 10 до 16С, некоторые наиболее крупные клетки, которые располагаются в апикальном ярусе, достигают ploidy в 32С (рис. 13, *а–г*). Результаты цитофотометрического анализа антипод, изолированных из зародышевого мешка, показали, что наблюдается положительная корреляция между площадью ядер и их ploidy (рис. 14). Это может означать, что, не все клетки комплекса прошли одинаковое количество раундов эндоредупликации ДНК. Альтернативное предположение – в части клеток реплицируется не вся геномная ДНК, а только некоторые локусы хромосом.

Завершающий этап дифференцировки антиподальных клеток характеризуется конденсацией хроматина, распадом ядрышек, нарушением целостности ядерной оболочки и выходом части хроматина и материала ядрышек в цитоплазму (рис. 9, *а, б*; рис. 10, *а*). По общей морфологии ядер можно заключить, что в таких клетках включается программа апоптоза. Это предположение подтверждается окрашиванием сегментированной ДНК по методу TUNEL (рис. 10, *б, в*).

По мере вытягивания и роста семени клетки халазальной зоны нуцеллуса, примыкающие к проводящему пучку, образуют углубление, в которое постепенно втягиваются апоптотические антиподы. На поперечном срезе это углубление имеет вид подковы, в котором расположены клетки антиподального комплекса (рис. 11).

Таким образом, процесс деструкции антипод обычно растянут во времени до тех пор, пока вся полость зародышевого мешка не заполнится клетками. На поперечных срезах в период двухъярусного клеточного эндосперма можно видеть как интактные, так и отмирающие клетки антиподального комплекса (рис. 11, *б*).

### 3. Строение АК в семяпочках с не развившимся эндоспермом

Наряду с нормально развивающимися семяпочками были проанализированы встречающиеся в колосе пшеницы “усеченные” семяпочки (рис. 12, *а*). Оказалось, что в этих не развившихся семяпочках содержится округлый расширенный зародышевый мешок, лишенный эндосперма, но с развитым антиподальным комплексом, содержащий около 25 клеток. Как и в нормальных семяпочках, антиподальный комплекс “усеченных” семяпочек имеет ярусное строение (рис. 12, *б*). Антиподальные клетки апикального яруса этих семяпочек крупнее апикальных клеток нормально развивающегося зародышевого мешка (периода до оплодотворения), имеют округлую форму и содержат крупные ядра с массивными ядрышками и гигантскими хромосомами (рис. 12, *а*). Другой отличительной особен-

Содержание ДНК в ядрах антипод в онтогенезе

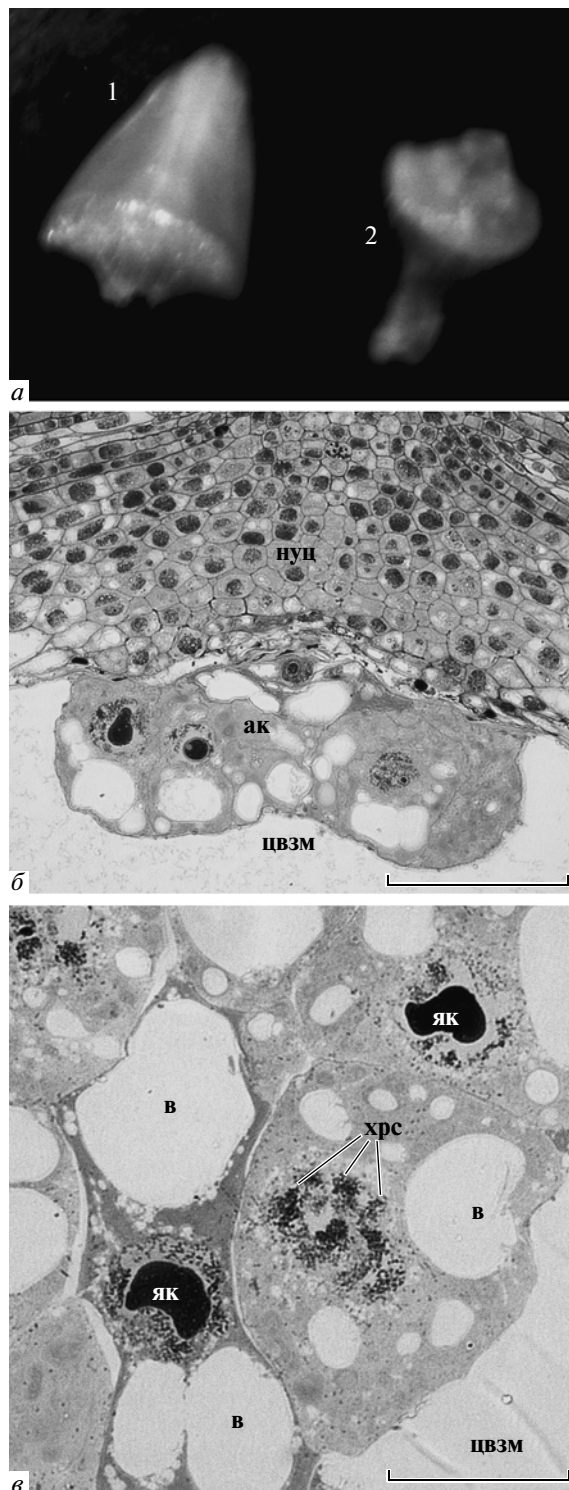
Содержание ДНК в ядрах антипод	% ядер к моменту оплодотворения	% ядер после оплодотворения	% ядер активной фазы	% ядер с первыми признаками апоптоза
до 4С	100%			
до 10С		84%	43%	19%
более 10С		16%	57%	81%

ностью этих клеток является наличие в их цитоплазме значительного количества вакуолей, самые мелкие из которых располагаются вокруг ядра, вблизи ядерной оболочки и у мембран больших вакуолей (рис. 12, в). Два базальных яруса состоят из меньших по размеру и сильно уплощенных клеток (рис. 12, б).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В работе детально прослежена динамика формирования антиподального комплекса пшеницы *Triticum aestivum* L. Полученные данные позволяют выделить три ключевых и строго последовательных этапа в развитии антиподального комплекса: этап пролиферации инициальных клеток, этап роста и функциональной дифференцировки антипод и этап их апоптотической гибели.

В этом процессе наименее изученным остается этап пролиферации антипод. По данным ранних работ, у многих растений число антипод, первоначально равное трем, увеличивается путем митотических делений (Поддубная-Арнольди, 1976), однако до настоящего времени особенности делений антипод остаются не документированными. Результаты полученные в нашей работе убедительно показывают, что антиподы зародышевого мешка пшеницы делятся путем типичного митоза, их деления асинхронны, а вектор пролиферации направлен от базальных к апикальным клеткам антиподального

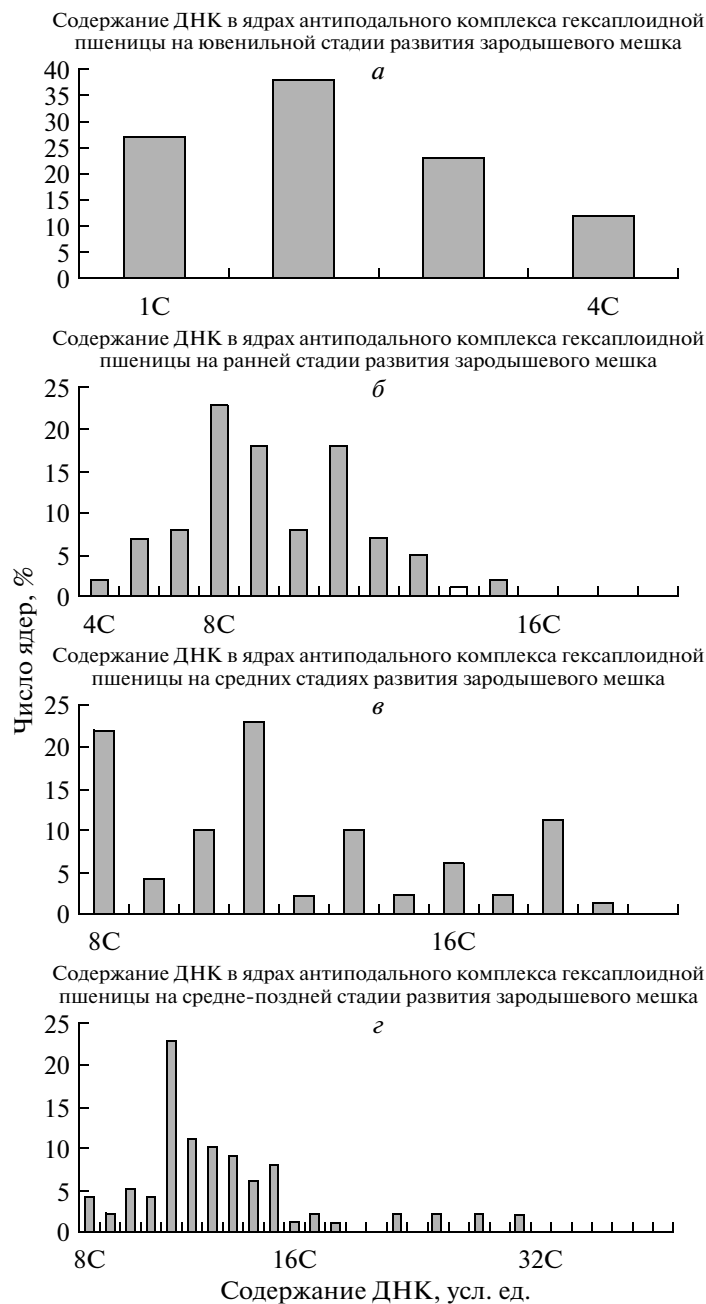


**Рис. 12.** Структурная организация антиподального комплекса в "усеченных" семяпочках (с неразвившимся эндоспермом).

а – Нормальные (1) и "усеченные" семяпочки (2), изолированные из одного колоса пшеницы.

б – Поперечное сечение развитого антиподального комплекса в "усеченных" семяпочках. Апикальный ярус представлен крупными клетками, средний и базальный ярусы состоят из мелких уплощенных клеток. Антиподальный комплекс – ак; клетки нуцеллуса – нуц; центральная вакуоль зародышевого мешка – цвзм. Эндосперма нет. Объектив Plan CN  $\times 20/0.40$ . Масштаб 100 мкм.

в – Срез тотального препарата антиподального комплекса. В ядрах клеток апикального яруса гигантские хромосомы декомпактизованы (хрс, стрелки), в цитоплазме многочисленные мелкие вакуоли локализованы вокруг ядер и крупных вакуолей, что отражает высокую функциональную активность антиподальных клеток. Объектив Plan CN  $\times 40/0.65$ . Масштаб 50 мкм.



**Рис. 13.** Гистограммы распределения содержания ДНК (в отн. ед.) в ядрах антиподальных клеток на разных этапах развития зародышевого мешка.

*а* – содержание ДНК в ядрах антипод до оплодотворения (ювенильная стадия); *б* – после оплодотворения; *в* – в самой активной фазе; *г* – к моменту апоптотической гибели.

комплекса. По общей организации хроматина, по размерам и структуре митотических хромосом, на этом этапе развития антиподы не отличаются от клеток нуцеллуса, окружающих зародышевый мешок. В то же время, наличие в пролиферирующих антиподах anomalно крупных ядрышек может свидетельствовать о высоком уровне экспрессии генов, кодирующих синтез рибосомной РНК (Traas et al., 1998).

В конечном итоге, именно пролиферация антипод приводит к формированию дефинитивной структуры антиподального комплекса. Обобщенная схема, суммирующая данные по ранним этапам развития антиподального комплекса от начала стадии пролиферации антипод до формирования зиготы и первых ядер эндосперма, представлена на рис. 6. Анализ дорсовентральных и поперечных сечений зародышевого мешка показал, что структура

антиподального комплекса закладывается уже на начальных этапах пролиферации инициальных клеток (рис. 6, а, б). В связи с тем, что ось первого деления базальной клетки ориентируется параллельно дорсовентральной плоскости зародышевого мешка, в антиподальном комплексе формируются 3 яруса клеток, — одна дочерняя клетка остается базальной, другая занимает срединное положение, а две не разделившиеся инициальные клетки располагаются в апикальном ярусе (рис. 6, а). Наиболее четко три яруса клеток выявляются на стадии, предшествующей оплодотворению: нижний (базальный) ярус комплекса, примыкающий к халазальной зоне нуцеллуса, содержит одну или две клетки, средний около восьми, а ярус, граничащий непосредственно с центральной клеткой, содержит не менее 16 клеток (рис. 6, в). Таким образом, суммарное количество клеток в комплексе может достигать 25–27, что хорошо соответствует ранним наблюдениям (Батыгина, 1974). Окончательное количество антиподальных клеток в индивидуальных семязпочках обычно немного варьирует, что может быть обусловлено асинхронностью делений при формировании антиподального комплекса. Перечисленные данные позволяют сделать два важных вывода. Во-первых, в отличие от базальной клетки, ось деления которой располагается в дорсовентральной плоскости, оси делений клеток среднего и апикального ярусов должны быть ориентированы только латерально. При любой другой ориентации делений упорядоченность архитектуры антиподального комплекса не может сохраняться на всех этапах его развития. Во-вторых (в случае, если одинаковым пролиферативным потенциалом обладают все инициальные антиподы), каждая клетка среднего и апикального ярусов проходит три цикла митотических делений.

К моменту окончания делений количество ДНК в клетках антиподального комплекса не превышает гаплоидных значений, что свидетельствует об отсутствии в пролиферирующих антиподах процесса эндоредупликации ДНК. Увеличение количества ДНК в ядрах антипод начинается только после полного окончания пролиферации и по времени предшествует оплодотворению. Известно, что эндоредупликация ДНК, приводящая к формированию полиплоидных соматических клеток — явление, широко распространенное в мире растений (Mela-ragno et al., 1993; Tominaga R. et al., 2008). Однако только в некоторых специализированных клетках, к которым можно отнести антиподы, этот процесс характеризуется особым типом дифференцировки, связанным с формированием обособленных гигантских хромосом (Поддубная-Арнольди, 1976). В антиподальном комплексе пшеницы процесс формирования гигантских хромосом, сопровождающийся прогрессивным увеличением размеров клеток и ядер, становится заметным только после оплодотворения зародышевого мешка. На этом эта-

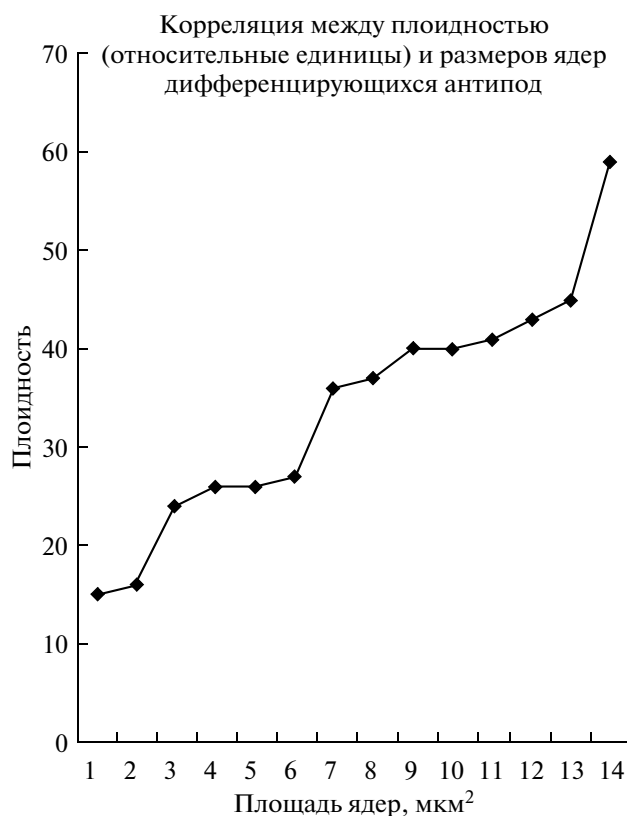


Рис. 14. Корреляция между плоидностью ядер антиподальных клеток и их площадью.

пе развития ярусы комплекса содержат клетки, близкие по размеру, в то время как размеры клеток в составе индивидуальных ярусов различаются: клетки апикального яруса значительно крупнее, чем клетки базального и среднего ярусов. При этом гигантские хромосомы выявляются в ядрах всех без исключения клеток антиподального комплекса. Основываясь на данных цитофотометрии можно утверждать, что крупные клетки апикальных ярусов обладают более высокой плоидностью и, следовательно, повышенным уровнем метаболической активности по сравнению с клетками базальных ярусов.

Эндоредупликация ДНК и формирование гигантских хромосом свидетельствуют о включении в антиподах генетически детерминированного процесса, направленного на повышение уровня экспрессии генов на определенной стадии развития зародышевого мешка. Наличие в “усеченных” семязпочках с не развившимся эндоспермом полностью сформированного антиподального комплекса, показывает, что реализация этого процесса не зависит от программы, контролирующей развитие зародышевого мешка после оплодотворения. С другой стороны, завершающий этап этой программы, а именно, апоптотическая гибель клеток и утилизация синтезированных в антиподах продуктов, возможен



только после оплодотворения. На это указывают данные, по которым в семяпочках с не развившимся эндоспермом частично или полностью блокируется терминальная дифференцировка антипод. По нашим наблюдениям и по некоторым данным литературы (Engel, 1994; Li-Hua, Rui-Lin You, 2004) антиподы начинают гибнуть апоптогически в тот период, когда происходит формирование клеточного эндосперма. Заканчивается этот процесс, когда эндосперм полностью сформирован. В клетках антиподального комплекса “усеченных” семяпочек программа апоптогической гибели не включается или сильно задерживается: “усеченные” семяпочки были собраны для микроскопического анализа в то время, когда в нормальных семяпочках того же колоса антиподальный комплекс полностью дегенерировал. Таким образом, из полученных данных по сравнительному анализу антиподального комплекса в нормальных и “усеченных” семяпочках следует, что эндополиплоидизация генома и формирование гигантских хромосом является необходимым, но не достаточным условием для нормального функционирования антипод.

Важно подчеркнуть, что существенным отличием “усеченных” семяпочек от нормальных является отсутствие клеток эндосперма, вероятнее всего, по причине не состоявшегося оплодотворения центральной клетки. На этом основании можно предположить, что возможным индуктором терминальной фазы дифференцировки антипод является именно развивающийся эндосперм. В рамках этой гипотезы, основным назначением антиподального комплекса зародышевых мешков пшеницы и других злаков, является обеспечение нормального функционирования эндосперма на нуклеарной стадии его развития. Не случайно многие исследователи считают этот этап в развитии семени злаков наиболее критическим, поскольку неоднократно отмечалось, что при аномалиях в развитии антипод или их ранней деградации у гибридов наблюдаются нарушения в формировании эндосперма, что обычно приводит к шуплости семян (Ригин и Орлова, 1974).

Вопрос о том, в чем конкретно состоит функциональная роль клеток антиподального комплекса остается открытым. Возможно, клетки базальных ярусов комплекса с хорошо развитой вакуолярной системой, находящиеся в контакте с халазальной зоной нуцеллуса и в непосредственной близости к проводящей системе семязачатка, выполняют осморегулирующую и своего рода “буферную” функцию, контролируя поступление воды, минеральных веществ и метаболитов из материнских тканей в эндосперм. Именно в этой пограничной зоне у разных злаков наблюдаются инвагинации клеточных стенок антипод, что значительно увеличивает поверхность контакта и облегчает абсорбцию транспортируемых продуктов (Engell, 1994). Другое (но не альтернативное) предположение — клетки антиподального комплекса выполняют сек-

реторную функцию. Известно, что в клетках, ядра которых содержат гигантские политенные хромосомы (как, например, клетки слюнных желез некоторых *Diptera*), синтезируется большое количество белков, необходимых для ключевых стадий развития личинки (Zhimulev, 1996; Коряков, Жимулев, 2009). Рассуждая по аналогии, можно предположить, что в клетках антиподального комплекса пшеницы экспрессируются гены, кодирующие необходимые для развития эндосперма факторы (белки), которые утилизируются эндоспермом. В качестве аргумента можно привести полученные в работе данные, показывающие транспорт фрагментов ядерного материала из клеток антипод в эндосперм (рис. 9, а).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Батыгина Т.Б. Эмбриология пшеницы. Л.: Колос, 1974. 206с.
- Ивановская Е.В. Функциональная морфология политенных хромосом антипод пшеницы // Цитология. 1973. Т. 15. № 12. С. 1445–1452.
- Жимулев И.Ф. Хромосомы. Структура и функции. Новосибирск. Изд-во СО РАН, 2009. 258 с.
- Лазарева Е.М., Ченцов Ю.С. Особенности локализации фибрилларина, белка с мол. массой 53 кДа и AgNOR-белков в гигантских ядрах клеток антипод пшеницы // Цитология. 2004. Т. 46. № 2. С. 125–135.
- Петрова Т.Ф. Метод приготовления тотальных эмбриологических препаратов эндосперма // Ботан. журн. 1970. Т. 55. №. 11. С. 1662 – 1665.
- Петрова Т.Ф., Соловьянова О.Б., Ченцов Ю.С. Ультраструктура гигантских хромосом в антиподах ячменя // Цитология. 1985. Т. 27. № 5. С. 499–502.
- Поддубная-Арнольди В.А. Цитозембриология покрытосеменных растений. Основы и перспективы. М.: Наука, 1976. 507с.
- Ригин Б.В., Орлова И.Н. Пшенично-ржаные амфидиплоиды. Л.: Колос, 1974. 206с.
- Чабан И.А. Генезис антиподального комплекса зародышевого мешка пшеницы // XII съезд РБО. Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века. Материалы всероссийской конференции. 2008. Петрозаводск. С. 302–306.
- Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Ред. Т.Б. Батыгина. С. Петербург: Мир и семья. 1994. Т. 1. 508 с.
- Cionini P.G., Cavallini A., Baroncelli S., Lercari B., D'Amato F. Diploidy and chromosome endoreduplication in the development of epidermal cell lines in the first foliage leaf durum wheat (*Triticum durum* Desf.) // Protoplasma. 1983. V. 118. P. 156–162.
- Bhatnagar S.P., Chandra S. Reproductive biology of *Triticum*. 111 // Phytomorphology. V. 25. № 4. P. 471–477.
- Brink R.A., Cooper D.C. The antipodal in relation to abnormal endosperm behavior in *Hordeum jubatum* × *Secale cereale* hybrid seeds // Genetics. 1944. V. 29. № 4. P. 291–340.
- Diboll A.G., Larson D.A. Fine structural development of the megagametophyte of *Zea mays* following fertilization // Am. J. Bot. 1966. V. 55. № 7. P. 787–806.

- Engell K.* Embryology of barley. IV. Ultrastructure of the antipodal cells of *Hordeum vulgare* L. cv. Bomi before and after fertilization of the egg cell // *Sex Plant Reprod.* 1994. V. 7. P. 333–348.
- Kaufmann B.P., Gay H., McDonald M.R.* Organizational patterns within chromosomes // *Int. Rev. Cytol.* 1960. V. 9. P. 77–127.
- Li-Hua An and Rui-Lin You.* Studies on nuclear degeneration during programmed cell death of synergid and antipodal cells in *Triticum aestivum* // *Sex Plant Reprod.* 2004. V. 17. P. 195–201.
- Melaragno J.E., Mehrotra B., Coleman A.W.* Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 1993. V. 5. P. 1661–1668.
- Otsuki Y., Li Z.L., Shibata V.F.* Apoptotic detection methods: from morphology to gene // *J. Prog. Histochem. Cytol.* 2003. V. 38. P. 275–339.
- Tominaga R., Iwata M., Sano R., Inoue K., Okada K., Wada T.* *Arabidopsis* CAPRICE-LIKE MYB 3 (CPL3) controls endoreduplication and flowering development in addition to trichome and root hair formation // *Development.* 2008. V.135. P. 1335–1345.
- Traas J., Hülskamp M., Gendreau E., Höfte H.* Endoreduplication and development: rule without dividing? // *Curr. Opin. Plant Biol.* 1998. V. 1. P. 498–503.
- You R., Jensen W.A.* Ultrastructural observation of the mature megagametophyte and fertilisation in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Can. J. Bot.* 1985. V. 63. № 2. P. 163–178.
- Zhimulev I.F.* Morphology and structure of polytene chromosomes // *Advances in Genetics.* 1996. V. 34. P. 1–359.

## Antipodal Complex Development in the Embryo Sac of Wheat

I. A. Chaban<sup>a</sup>, E. M. Lazareva<sup>b</sup>, N. V. Kononenko<sup>a</sup>, and V. Yu. Polyakov<sup>b</sup>

<sup>a</sup> All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Russian Academy of Agricultural Sciences, Moscow, 127550 Russia

<sup>b</sup> Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

e-mail: lazareva-e@yandex.ru

**Abstract**—Dynamics of an antipodal complex formation in wheat (*Triticum aestivum* L.) has been observed in detail using a reconstruction of serial semifine sections. Three consecutive crucial stages have been identified in the development of the antipodal complex: (1) proliferation of initial cells, (2) growth and functional differentiation of antipodal cells, and (3) cell apoptosis. Specific features of the mitotic division of antipodal cells have been characterized. It has been shown that the structure of interphase nuclei and mitotic chromosomes of proliferating antipodal cells is similar to that of nucellar cells surrounding the embryo sac. According to the reconstruction of appropriately oriented serial sections, the division of antipodal cells is asynchronous. DNA content in differentiated antipodal cells has been determined by a cytophotometric analysis; in the case of a mature embryo sac, the ploidy of antipodal cells varied from 8 to 32C. Proliferation and DNA endoreduplication processes in the antipodal complex proceed at different time; the second process starts only after the termination of the first one. DNA endoreduplication is accompanied by total chromatin remodeling; as a result, giant chromosomes are formed in the nuclei of antipodal cells. The final stage of the antipodal complex development is programmed cell death or apoptosis. A model for the structural organization of an antipodal complex has been proposed based on the layer arrangement of cells. The secretory activity of antipodal cells directed towards the endosperm syncytium has been detected for the first time. The analysis of “truncated” ovules with an undeveloped endosperm has shown that developing endosperm can be a possible inductor, which stimulates the functional activity of antipodal cells and triggers their terminal differentiation. The obtained results evidence the functional role of antipodal cells in the development of the endosperm and embryo.

**Keywords:** early embryogenesis of the embryo sac, antipodal complex, plant cells

УДК 591.39:591.34:593:71

## ИНДУКЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ЗАДНЕГО КОНЦА ПЛАНУЛЫ МОРСКОГО ГИДРОИДА *Dynamena pumila*

© 2011 г. Ю. А. Краус

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет,  
Кафедра биологической эволюции 119992, Москва, Ленинские горы, д. 1/12

E-mail: yulia\_kraus@hydrozoa.org

Поступила в редакцию 27.01.2010

Окончательный вариант получен 13.09.2010

Активность регионов-организаторов необходима для формирования плана строения развивающегося организма. Трансплантация фрагмента такого региона организму-реципиенту приводит к формированию вторичной оси тела, состоящей из тканей как донора, так и реципиента (Gerhart, 2001). Объект данной работы, представитель Cnidaria, беломорский гидроидный полип *Dynamena pumila* L. (Thecaphora, Sertulariidae), обладает высокоорганизованной колонией, которая формируется в ходе сложного метаморфоза личинки-планулы. Для выявления у личинки *Dynamena* региона-организатора, были выполнены эксперименты по трансплантации фрагментов тканей планулы-донора эмбрионам, находящимся на стадиях ранней и поздней гастрюлы, а также планулам. Только пересадка фрагмента заднего конца планулы-донора плануле-реципиенту того же возраста приводила к развитию в ходе метаморфоза вторичного побега, использующего для своего формирования до 50% тканей реципиента. При трансплантации фрагментов переднего конца и середины тела планулы, у реципиентов никогда не наблюдалось формирования каких-либо эктопических структур. Был сделан вывод о том, что задний конец планулы *Dynamena* обладает свойствами организатора.

**Ключевые слова:** Cnidaria, Hydrozoa, индукция, организатор, трансплантация, эмбриональное развитие, личинка, метаморфоз.

Формирование плана строения в онтогенезе любого организма – результат межклеточных и межтканевых взаимодействий. Эмбриональная индукция – наиболее важный класс таких взаимодействий – была описана Шпеманом и Мангольд в 1924 году (Sander, Faessler, 2001). В 1921–1923 гг. они обнаружили, что фрагмент дорзальной губы бластопора эмбриона амфибии, трансплантированный на вентральную сторону эмбриона-реципиента, индуцирует формирование вторичной оси тела, состоящей, в основном, из тканей реципиента (Spemann, Mangold, 1924). Этими авторами было введено в эмбриологию понятие “эмбриональный организатор”. В последующих экспериментах гомологи организатора амфибий были обнаружены и детально изучены у представителей всех классов позвоночных животных (DeRobertis et al., 2000; Gerhart, 2001; Stern, 2006). В современной биологии развития эмбриональный организатор определяется как “регион, фрагмент которого способен к индукции вторичной оси тела при эктопической трансплантации” (Stewart, Gerhart, 1990). Активность регионов-организаторов характерна для эмбрионального развития не только позвоночных, но и беспозвоночных животных. Например, в эмбриогенезе иглокожих (некоторых видов морских ежей) вегетативные микромеры дифференцируются в клетки скелето-

генной мезенхимы, но, кроме того, действуют как организационный центр, индуцирующий формирование архентерона и вторично-мезенхимных структур (Ransick, Davidson, 1993; McClay et al., 2000). У представителя низших хордовых, ланцетника *Branchiostoma belcheri*, дорзальная губа бластопора в экспериментах индуцирует формирование вторичной оси тела (Tung et al., 1962).

В последние годы было обнаружено, что индукционная активность регионов-организаторов основана на сходных молекулах и сигнальных путях даже у таких далеких друг от друга таксонов, как позвоночные, головохордовые, иглокожие, полухордовые, и, возможно, моллюски (Lowe et al., 2006; Yu et al., 2007; Garcia-Fernandez et al., 2007; Lambert, 2008). С биохимической точки зрения, организатор представляет собой сложный сигнальный центр, отвечающий за поддержание градиентов молекул, являющихся компонентами сигнальных каскадов, главным образом BMP- и Wnt-сигнальных путей (Garcia-Fernandez et al., 2007). Распространенность эмбриональных организаторов среди разных таксонов животных, а также их функциональная и биохимическая консервативность, заставляют задуматься о том, насколько рано в эволюции появились регионы-организаторы.

Cnidaria, низшие многоклеточные животные, обладают примитивным планом строения: их двухслойное тело не имеет дорзо-вентральной оси. В онтогенезе многих представителей этого типа наблюдается четкая преэмптвенность полюсов и осей: анимальный полюс яйцеклетки соответствует полюсу эмбриона, где происходит интернализация презумптивной эндодермы, заднему концу личинки-планулы и оральному полюсу полипа (Freeman, 1981, 1983; Momose, Schmid, 2006; Momose, Houlliston, 2007; Fritzenwanker et al., 2007). Данные молекулярно-биологических исследований показывают, что в регионе полюса, где происходит гастрюляция, экспрессируются гены, специфичные для эмбриональных организмов высших Metazoa (Hayward et al., 2002; Lee et al., 2006; Rentzsch et al., 2006; Matus et al., 2006; Momose, Schmid, 2006; Momose, Houlliston, 2007; Momose et al., 2008; Saina et al., 2009). Можно предположить, что именно в этом регионе локализован эмбриональный организатор. К сожалению, проверка этой гипотезы была выполнена только для *Nematostella vectensis* (класс Anthozoa). Было показано, что способностью индуцировать формирование эктопической вторичной оси обладает фрагмент губы бластопора инвагинационной гастрюлы *Nematostella* (Kraus et al., 2007).

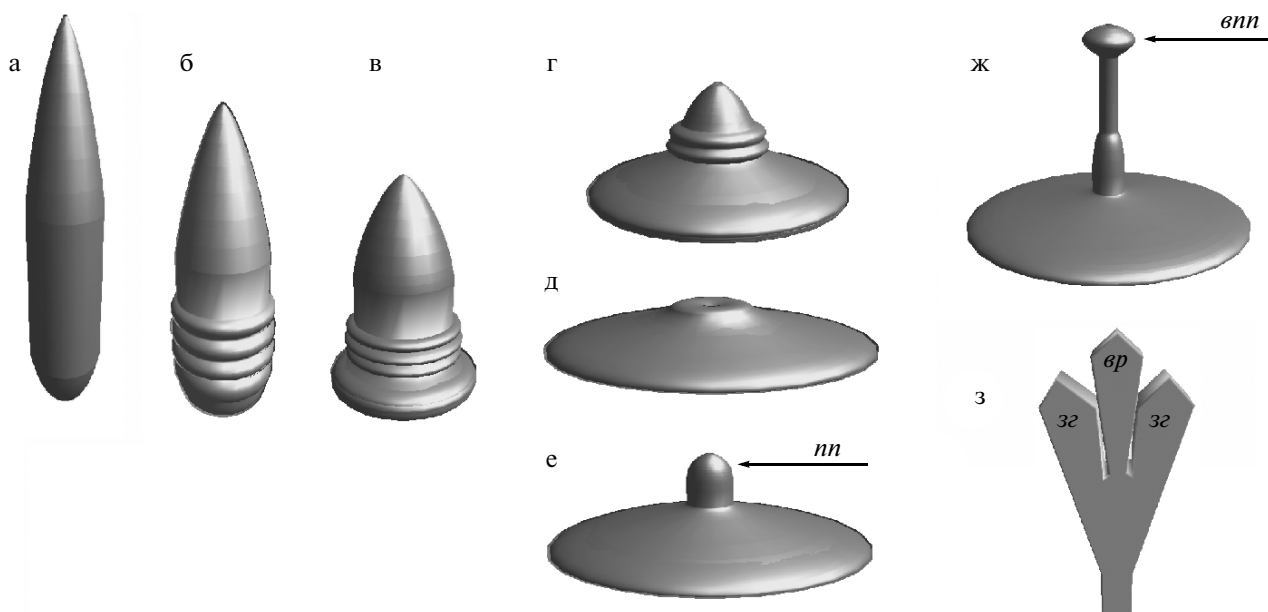
Для пресноводного полипа *Hydra* (класс Hydrozoa) показано, что трансплантация фрагмента гипостомы (околоротовой области) полипу-реципиенту приводит к формированию вторичного тела, состоящего, в основном, из тканей реципиента (Browne, 1909; Broun et al., 2005). Таким образом, гипостом гидры является настоящим организатором, хотя его активность проявляется в постэмбриональном периоде. Поскольку вегетативное размножение (почкование) играет огромную роль в жизненном цикле гидры, формирование плана строения для нее – непрекращающийся процесс, а для его регуляции необходима постоянная активность региона-организатора (MacWilliams, 1983). Показано, что индукционная активность гипостомы гидры основана на взаимодействии тех же самых молекул и сигнальных путей, что и активность эмбриональных организаторов позвоночных животных (Broun et al., 2005; Rentzsch et al., 2007). Гипостомальный организатор интересен также и тем, что у многих кишечнополостных оральная часть первичного полипа формируется непосредственно из заднего конца личинки-планулы, а он, в свою очередь, соответствует области презумптивной эндодермы у видов с поляризованной гастрюляцией.

В наиболее яркой форме непрерывное формирование присутствует в жизненном цикле колониальных Hydrozoa, у которых постоянно формируются новые элементы (модули) колонии (Marfenin, 1993; Marfenin, Kossevitch, 2004). Обладают ли колониальные гидроиды регионами-организаторами?

Существуют данные об индукционной активности заднего конца тела личинки – планулы морского колониального гидроида *Hydractinia echinata*. При пересадках небольшого витально окрашенного фрагмента заднего конца планулы в тело первичного полипа или в среднюю область тела планулы-реципиента было обнаружено, что задний конец тела планулы *Hydractinia* обладает свойствами организатора: индуцирует развитие вторичной оси тела у планулы-реципиента и эктопических структур (щупалец) у полипа (Stumpf et al., 2010). Несмотря на то, что гастрюляция этого вида морфологически аполлярна, наблюдается строгая преэмптвенность между анимальным полюсом яйцеклетки и задним концом планулы (Plickert et al., 2006). Было показано, что в регионе, который впоследствии становится задним концом личинки, на протяжении всего эмбрионального развития экспрессируются гены, продукты которых вовлечены в канонический сигнальный каскад Wnt/beta – catenin/Tcf (Plickert et al., 2006; Stumpf et al., 2010). Эти же гены экспрессируются и у зооидов *Hydractinia* в области гипостомы, причем гиперактивация Wnt-пути ведет к усилению почкования, подавлению роста столонов, формированию эктопических щупалец и гипостомов у зооидов колонии (Muller et al., 2007). Можно предположить, что для нормального формирования колонии *Hydractinia* необходима постоянная активность гипостомальных организаторов, которыми обладают взрослые зооиды и развивающиеся почки. Однако архитектура колонии у многих видов Hydrozoa значительно сложнее, чем у *Hydractinia* (Марфенин, 1993; Marfenin, Kossevitch, 2004). У них из осевшей личинки в ходе метаморфоза формируется не первичный полип, а первый модуль колонии, состоящий из нескольких зачатков, то есть не наблюдается непосредственной преэмптвенности между задним концом планулы и гипостомами гидрантов первого модуля колонии. Новые модули колонии формируются за счет активности постоянно действующей верхушки роста, а ветви и побеги – за счет активности почек, образующихся на теле колонии и/или на столонах, обеспечивающих распространение колонии по субстрату. Обладают ли сложно устроенные колониальные гидроиды регионами-организаторами? И если обладают, то на какой стадии жизненного цикла они активны и где локализованы? Данная работа – первая попытка ответить на эти вопросы, используя в качестве объекта беломорского колониального гидроида *Dynamena pumila* (Thecaphora, Sertulariidae).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Dynamena pumila* – массовый вид в районе Беломорской Биологической Станции МГУ им. Н.А. Перцова, где и выполнялась работа. Колонии *Dynamena* являются обычными компонентами обрастающих водорослей рода *Fucus* и легко до-



**Рис. 1.** Оседание и метаморфоз планулы *Dynamena pumila*: а–д – последовательные стадии оседания планулы, передний конец планулы обращен вниз; е–ж – прорастание первичного побега (*nn* – первичный побег, *vnn* – верхушка первичного побега); з – верхушка первичного побега, разделившаяся на 3 зачатка (*вр* – верхушка роста, *зг* – зачаток гидранта). Схема.

ступны во время отлива. Развитие эмбрионов *Dynamena pumila* происходит внутри слизистого мешка, т.н. акроцисты, формирующейся на гонозооиде (половом гидранте). В каждой акроцисте находится в среднем 14 эмбрионов. Эмбриональное развитие продолжается примерно 72 часа при температуре 16°C и завершается выходом из акроцисты личинок-планул. Акроцисты, содержавшие эмбрионов, отделяли от собранных колоний и помещали в чашки Петри с профильтрованной морской водой. Воду заменяли один-два раза в сутки. Планул, вышедших из акроцист, немедленно переносили в чистые чашки Петри.

Для трансплантаций использовали планул в возрасте 8–10 часов после выхода из акроцисты. Эмбрионов-реципиентов извлекали из акроцист непосредственно перед экспериментом с помощью препаровальных игл. Оперированных эмбрионов содержали в чашках Петри, дно которых было покрыто пленкой Parafilm, в профильтрованной морской воде.

Фрагменты ткани планулы-донора размером 30 мкм вырезались с помощью микрохирургического скальпеля (MICRO FEATHER, P-715), пересадку фрагментов эмбриону или плануле-реципиенту осуществляли с помощью акупунктурных игл. Метаморфоз планул-реципиентов индуцировался 15–30-минутной инкубацией в 0.5 мМ растворе CsCl по стандартной методике (Seipp et al., 2006) и (или) с помощью осушения планул в течение 15–30 минут.

Результаты экспериментов регистрировали прижизненно с помощью моторизованного стереомикроскопа Leica M205 A, оснащенного цифровой 10 Мп камерой и программным обеспечением той же фирмы (модуль Leica LAS Multifocus).

*Эмбриональное развитие и метаморфоз D. pumila.* Эмбриогенез, формирование планулы и метаморфоз у этого вида подробно изучены (Teissier, 1923, 1931; Краус, Черданцев, 1999, 2003; Kraus, 2006; Пятаева, 2007). Яйцеклетки *D. pumila* очень богаты желтком, что, по-видимому, обуславливает высокую изменчивость дробления. В результате дробления образуется морула, представляющая собой рыхлую массу клеток. В начале гастрюляции клетки морулы формируют небольшие фрагменты эпителиального пласта, число и расположение которых на этой стадии очень изменчиво. Позже эти фрагменты объединяются друг с другом, формируя замкнутый эктобласт. Дальнейшее развитие приводит к формированию базальной мембраны, разделяющей экто- и эндобласт, эпителизации эндобласта, удлинению передне-задней оси планулы и дифференцировке ее полюсов, а также к процессам клеточной дифференцировки.

Свободноживущая планула имеет длину примерно 600 мкм, отношение ее длины к ширине равно примерно 4 : 1. Передний конец планулы округлый, задний – заостренный (рис. 1а). От выхода планулы из акроцисты до начала оседания проходит 24–36 часов. Оседание планулы начинается с прикрепления переднего конца к субстрату и формирования многочисленных складок (рис. 1б). Следующие

ший этап метаморфоза – постепенное расширение и распластывание по субстрату переднего конца планулы (рис. 1б–г), вплоть до уплощения планулы (рис. 1д), превратившейся в прикрепительный диск будущего первичного побега колонии. На этой стадии эктодерма планулы уже покрыта перисарком (наружным хитиновым скелетом). В центре прикрепительного диска начинает прорастать первичный побег (рис. 1е, 2а). У него формируется верхушка (рис. 1ж), которая впоследствии разделяется на три зачатка: боковые зачатки гидрантов и центральная верхушка роста (рис. 1з). Таким образом формируется первый модуль колонии (рис. 2б), а следующие модули колонии формируются за счет активности верхушки роста (рис. 2в). Таким образом, в результате метаморфоза *Dynatena* сразу формируется первичный модуль колонии, а не первичный полип, как у одиночных кишечнополостных, или у кишечнополостных, имеющих просто устроенную колонию. Задний конец планулы, как показали результаты опытов с меткой, состоящей из частиц кармина, соответствует верхушке роста первичного побега в начале его прорастания (Краус, неопубликованные данные). При разделении верхушки на три зачатка материал заднего конца планулы оказывается, в основном, в верхушке роста первого модуля колонии.

Для того, чтобы проверить, обладает ли задний конец планулы *Dynatena*, соответствующий верхушке первичного побега колонии, индукционной активностью, было выполнено несколько серий трансплантационных экспериментов (рис. 3). Длительное развитие (от начала эмбриогенеза до конца метаморфоза проходит до 10 дней) не позволяло использовать мечение пересаживаемых тканей витальными красителями. Однако поскольку окраска яйцеклеток, формирующихся у разных колоний, варьирует от белой до темно-желтой, для экспериментов подбирали пары, в которых ткани донора и реципиента отличались друг от друга по цвету. Для пересадки использовался фрагмент заднего конца планулы размером 30 мкм, состоящий преимущественно из клеток эктодермы (рис. 3а). Фрагмент вставлялся в разрез, сделанный на поверхности донора (эмбрион на стадии средней гастролы или поздней гастролы, планула) и на 1–2 минуты прижимался к раневой поверхности концом иглы. В контрольных экспериментах пересаживали фрагмент ткани размером 30 мкм, вырезанный из середины тела или из переднего конца планулы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*Пересадка фрагмента заднего конца планулы эмбрионам, находящимся на стадии средней гастролы* (рис. 3а, е–з, л). Всего было выполнено 20 пересадок. Во всех случаях эмбрионы дожили до стадии планулы, но пересаживаемый фрагмент либо отторгался во время развития (8 случаев), либо на стадии поздней гастролы – препланулы оказывался под

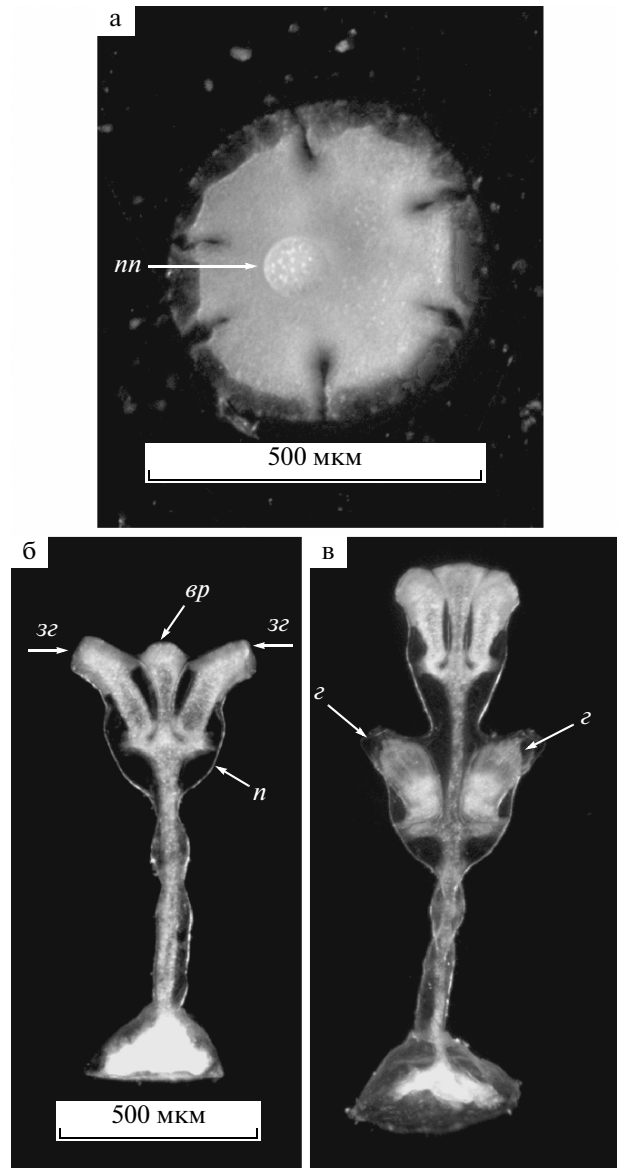
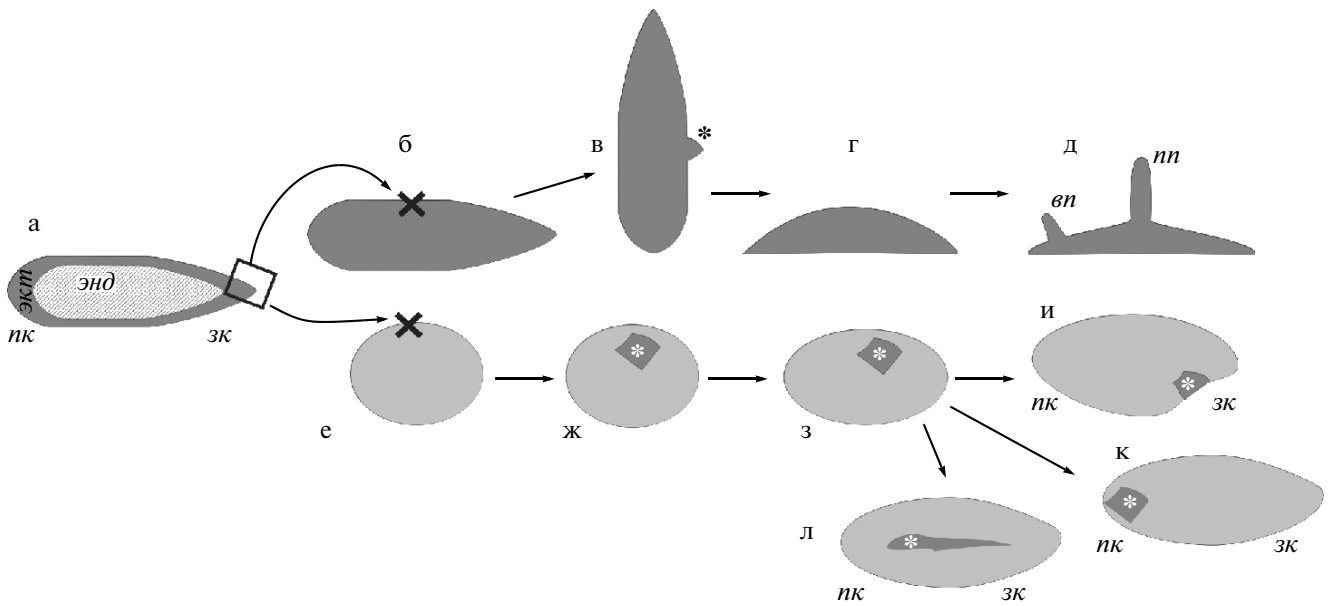


Рис. 2. Прорастающий первичный побег (а), первый модуль молодой колонии (б) и колония, состоящая из двух модулей (в) (n – перисарк, г – гидрант).

поверхностью эктобласта. Все 12 планул, сохранивших в теле пересаживаемую ткань, имели нормальную морфологию. Пересаживаемый фрагмент располагался в средней части тела планулы (9 случаев) или вблизи одного из ее концов (3 случая). У этих 12 планул был индуцирован метаморфоз, но только 7 из них начали метаморфоз и успешно его закончили, сформировав нормальный первичный побег.

*Пересадка фрагмента заднего конца планулы эмбрионам, находящимся на стадии поздней гастролы* (рис. 3а, е–л, 4). Пересадки выполнялись точно так же, как и в предыдущем эксперименте. Пересаживаемая ткань хорошо приживалась, но между пересаживаемым фрагментом и тканью реципиента сохра-



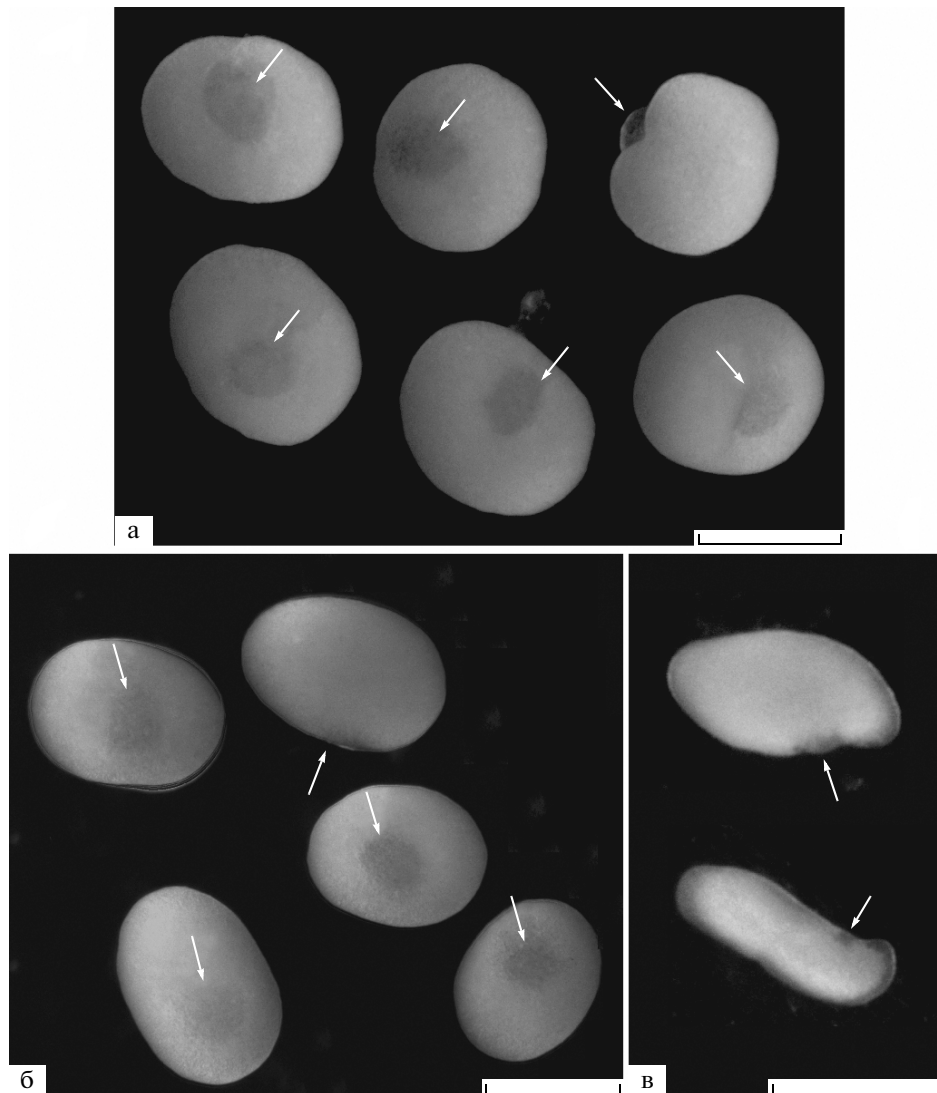
**Рис. 3.** Пересадка фрагмента заднего конца планулы *Dytiscus pumila* (а–д – другой плануле того же возраста; а, е–л – эмбриону на стадии поздней гастролы): а – планула-донор, показан ее оптический срез (*нк* – передний, *зк* – задний конец планулы, *экт* – эктодерма, *энд* – энтодерма, □ – фрагмент заднего конца, вырезавшийся для пересадки); б – планула-реципиент (*x* – надрез в месте пересадки); в–д – оседание и метаморфоз планулы-реципиента (\* – пересаженный фрагмент ткани, *nn* – первичный побег, *вп* – вторичный побег); е, ж – эмбрион-реципиент на стадии поздней гастролы; з – реципиент на стадии препланулы; и–л – реципиент на стадии планулы, показаны варианты положения и формы пересаженного фрагмента. Схема.

нялась морфологическая граница (рис. 4а, б). Всего было выполнено 25 трансплантации, до стадии планулы дожили 19 эмбрионов из 25. Через 24 часа после пересадки эмбрионы-реципиенты находились на стадии препланулы. К этому времени они приобретали овальную форму, а их длинная ось соответствовала будущей передне-задней оси планулы. Пересаженные фрагменты на этой стадии располагались либо в середине тела эмбриона, либо были смещены к одному из его полюсов (рис. 4б). В 12 из 19 случаев из эмбрионов-реципиентов формировались планулы с измененной морфологией: у всех этих планул пересаженный фрагмент располагался вблизи искривленного заднего конца тела (рис. 3и, 4в). У 4 из 19 планул пересаженная ткань была вытянута вдоль передне-задней оси тела (рис. 3л), а у 3 из 19 располагалась на переднем конце (рис. 3к). Морфология всех 7 планул была нормальной. У всех 19 планул был индуцирован метаморфоз, 11 из них осели, в том числе 3 планулы с искривленным задним концом. Во всех 11 случаях в ходе метаморфоза формировался нормальный первичный побег.

В качестве контроля было выполнено 7 пересадок фрагмента, вырезанного из середины тела планулы и 7 пересадок фрагмента переднего конца планулы. Во всех 14 случаях получившиеся из эмбрионов-реципиентов планулы имели нормальную морфологию, ткань пересаженного фрагмента была вытянута вдоль длинной оси планулы, располагаясь либо в ее передней половине (5 случаев из 14), либо

в задней половине (6 случаев из 14), либо примерно в середине тела (3 случая из 14).

*Пересадка фрагмента заднего конца планулы в середину тела планулы того же возраста* (рис. 3а–д, 5). Пересадки выполняли точно так же, как и в предыдущих экспериментах. Всего было выполнено 25 пересадок. В 18 случаях пересаженная ткань осталась на поверхности тела планулы-реципиента. В 7 случаях фрагмент погрузился внутрь тела планулы при заживлении раны. Если пересаженный в тело реципиента фрагмент заднего конца оставался на поверхности, то через 4–6 часов он приобретал конусовидную форму, характерную для нормального заднего конца планулы (рис. 3в, 5а–в). Через 12–14 часов после трансплантации у планул-реципиентов индуцировали метаморфоз. Осели на субстрат в общей сложности 15 планул, причем у 3-х из них пересаженный фрагмент был погружен внутрь тела. При распластывании планул по субстрату (рис. 3г), пересаженный фрагмент терял конусовидную форму и сливался с тканями реципиента. Прорастание первичного побега, как и в нормальном развитии, начиналось в центре прикрепительного диска, образованного осевшей планулой (рис. 2а). Через 3–10 часов на краю диска начиналось прорастание еще одного, “вторичного” побега (рис. 3д, 5г, д). Он сформировался в 8 случаях из 15. Интересно, что его образование происходило только в тех случаях, когда пересаженный фрагмент оставался на поверхности тела планулы-реципиента (8 случаев из 12).



**Рис. 4.** Пересадка фрагмента заднего конца планулы эмбрионам на стадии поздней гастрюлы: а – 2 часа после трансплантации (стрелки указывают на пересаженный фрагмент, масштабная линейка – 200 мкм); б – 24 часа после трансплантации, стадия препланулы; в – планулы-реципиенты, у которых пересаженный фрагмент оказался в области заднего конца.

Поскольку вторичный побег формировался позже первичного, он на протяжении всего развития находился на более ранней стадии, чем первичный, и имел меньшие размеры (рис. 5е, ж). По приблизительной оценке, он составлял до  $2/3$  от объема тканей планулы-реципиента. Однако в 2-х случаях из 8-ми прорастание первичного и вторичного побега началось практически одновременно (разница во времени прорастания составила около 3-х часов). В этих случаях вторичный побег формировался за счет примерно 50% тканей планулы-реципиента. Развитие вторичных побегов проходило нормально, на их верхушках дифференцировались два боковых гидранта и центральная зона роста.

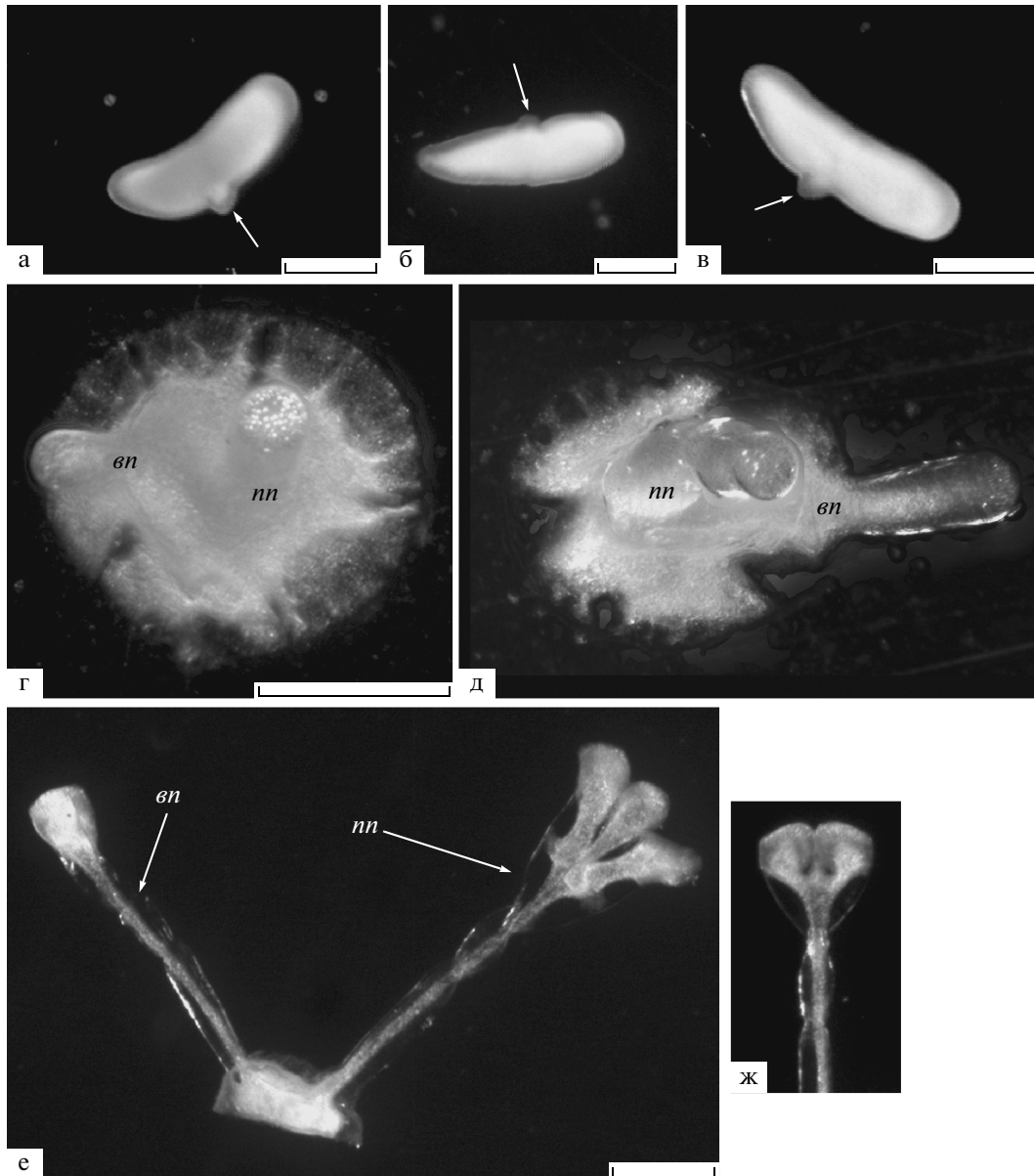
В качестве контроля было выполнено 10 пересадок фрагмента переднего конца планулы-донора в среднюю часть тела планулы-реципиента. Переса-

женный фрагмент оставался плоским, т.е. не приобретал форму конца планулы. Планулы-реципиенты были индуцированы, и 6 из них осели и прошли метаморфоз. Вторичный побег или какие-то другие этопические структуры не были сформированы ни в одном из случаев.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Формирование вторичной оси тела (вторичного этопического побега) наблюдалось только в одной серии экспериментов: при трансплантации в среднюю часть тела планулы-реципиента небольшого фрагмента заднего конца тела планулы-донора того же возраста. Причем вторичная ось тела формировалась не у подвижной планулы, а после ее оседания, в ходе метаморфоза. Единственным транс-





**Рис. 5.** Пересадка фрагмента заднего конца планулы планулам того же возраста: а–в – 6 часов после трансплантации, короткие стрелки указывают на пересаженный фрагмент; г, д – прорастание побегов в ходе метаморфоза планулы-реципиента (*nn* – первичный (нормальный) и *вп* – вторичный, включающий в себя пересаженный фрагмент, побеги); е – более поздняя стадия формирования первичного и вторичного побегов; ж – верхушка вторичного побега, изображенного на е.

плантационным экспериментом, выполненным на личинках гидрарий, является тот, объектом которого был морской колониальный гидроид *Hydractinia echinata* (Stumpf et al., 2010). Авторы этой работы пересаживали неиндуцированным к метаморфозу планулам-реципиентам фрагменты заднего конца тела индуцированных к метаморфозу личинок-доноров. При пересадках тканей неиндуцированных личинок-доноров формирование вторичной оси тела не происходило. Это свидетельствует о том, что задний конец тела личинки *Hydractinia* приобретает свойства организатора только с началом метамор-

фоза. Авторы этого исследования отмечают, что регион-организатор, локализованный в заднем конце тела начавшей метаморфоз личинки, скорее всего близок по свойствам к хорошо изученному гипостомальному организатору одиночного полипа *Hydra* (гипостом первичного полипа *Hydractinia* формируется непосредственно из заднего конца планулы). Из экспериментов, проведенных на личинках *Dynamena*, можно сделать вывод о том, что у данного вида задний конец тела приобретает свойства организатора еще в ходе эмбрионального развития, до начала метаморфоза.

Несмотря на это, в экспериментах, где в качестве реципиентов использовали эмбрионов на стадии ранней и поздней гастролы, ни разу не наблюдалось формирование вторичной оси тела или каких-то эктопических структур. Одно из возможных объяснений такого результата – отсутствие у эмбрионов данного вида региона, обладающего свойствами эмбрионального организатора, что обуславливает неспособность тканей эмбриона воспринимать индукционные сигналы, получаемые от пересаженного организатора. В этом случае можно предположить, что задний конец эмбриона *Dynamena* приобретает свойства организатора только на стадии препланулы – ранней планулы. Однако нельзя исключить и другую возможность. Фрагмент заднего конца планулы-донора мог приобрести свойства организатора после пересадки. Дело в том, что планула-реципиент после пересадки была индуцирована к метаморфозу, а вместе с ней мог быть индуцирован и пересаженный фрагмент. В этом случае время появления региона-организатора в онтогенезе *Dynamena* и *Hydractinia* совпадает.

Интересно, что в экспериментах, выполненных на планулах *Hydractinia*, вторичная ось тела у реципиента формировалась не в ходе метаморфоза (как у *Dynamena*), а еще на стадии планулы (Stumpf et al., 2010). Эта вторичная ось была представлена длинным отростком, напоминающим по форме задний конец планулы и состоящим, в основном, из тканей реципиента. Такой результат не был получен ни в одном из экспериментов, выполненных на планулах *Dynamena*. Таким образом, уже первые трансплантационные эксперименты показали, что свойства регионов-организаторов, локализованных в заднем конце тела, в значительной степени различаются у двух изученных видов гидроидов.

В интерпретации нуждаются также результаты экспериментов с эмбрионами-реципиентами, находившимися на стадии поздней гастролы. Несмотря на то, что никакие эктопические структуры у реципиентов не формировались, в 12 из 19 случаев развивались планулы с нарушенной морфологией (рис. 3и, 4в). Пересаженный фрагмент у таких планул всегда располагался вблизи искривленного заднего конца тела. Этот результат нельзя интерпретировать как проявление специфической индукционной активности пересаженного фрагмента, так как подобные результаты мы наблюдали и в других экспериментах с эмбрионами *Dynamena*, находившимися на стадии поздней гастролы (Краус, Черданцев, 2003). На этой стадии в эмбриогенезе данного вида происходит завершение эпителизации эктобласта и начало морфологической дифференцировки передне-задней оси тела. Если формирование замкнутого эктобласта нарушить, например нанести эмбриону широкую рану или подсадить в эктобласт кусочек ткани от эмбриона, находящегося на более ранней стадии развития, то будет нарушен и морфогенез планулы. Оставшийся после заживле-

ния раны шрам будет препятствовать нормальному ходу планарной интеркаляции клеток эктобласта. В результате получаются планулы с укороченным телом и искривленным задним концом. Шрам от раны у таких планул располагается вблизи заднего конца. Такое положение шрама можно интерпретировать как результат изменение ориентации передне-задней оси эмбриона (Краус, Черданцев, 2003) или как побочный результат нарушения процесса интеркаляции клеток эктобласта при удлинении тела планулы. В любом случае морфогенез эмбрионов, участвовавших в трансплантационных экспериментах, был нарушен пересаженным фрагментом, который не интегрировался в эктобласт реципиента. Надо отметить, что именно фрагмент заднего конца планулы хуже всего встраивается в ткань реципиента. При пересадках фрагментов переднего конца и середины тела планулы-донора никаких нарушений морфологии реципиента не наблюдалось, пересаженный фрагмент встраивался в эктобласт реципиента и менял форму вместе с телом хозяина.

Данная работа – только начало исследования индукционной активности в развитии гидроида, обладающего высокоорганизованной колонией и сложным метаморфозом, связанным с полной реорганизацией плана строения личинки. В дальнейшем необходимо более детально исследовать временные рамки активности региона-организатора и выявить биохимические основы этой активности.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Я очень благодарна администрации ББС МГУ и сотрудникам кафедры Зоологии беспозвоночных Биологического факультета МГУ проф. Н.Н. Марфенину и снс И.А. Косевичу за поддержку и помощь во время работы. Исследование поддержано грантом РФФИ №09-04-01487, грантом “Ведущие научные школы” НШ-4813.2010.4.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Иванова-Казас О.М. Эволюционная эмбриология животных. СПб.: Наука, 1995. 565 с.
- Краус Ю.А., Черданцев В.Г. Изменчивость и эквивалентность в раннем морфогенезе морского гидроида *Dynamena pumila* // Онтогенез. 1999. Т. 30. № 2. С. 118–129.
- Краус Ю.А., Черданцев В.Г. Экспериментальное изучение формирования передне-задней полярности в раннем развитии морского гидроида *Dynamena pumila* // Там же. 2003. Т. 34. № 6. С. 438–452.
- Марфенин Н.Н. Функциональная морфология колониальных гидроидов. СПб.: РАН, Зоол. ин-т, 1993, 150 с.
- Пятаева С.В. Перестройки анатомо-морфологической организации в онтогенезе колониальных гидроидных (Hydrozoa): Автореферат дисс. ... канд. биол. наук. М.: 2007, 24 стр.

- Broun M., Gee L., Reinhardt B., Bode H.R. Formation of the head organizer in hydra involves the canonical Wnt pathway // *Development*. 2005. V. 132. P. 2907–2916.
- Browne E.N. The production of new hydranths in hydra by the insertion of small grafts // *J. Exp. Zool.* 1909. V. 8. P. 1–33.
- DeRobertis E.M., Larrain J., Oelgeschlager M., Wessely O. The establishment of Spemann's organizer and patterning of the embryo // *Nat. Rev.* 2000. V. 1. P. 171–181.
- Freeman G. The role of polarity in the development of the hydrozoan planula larva // *Wilhelm Roux's Archives*. 1981. V. 190. P. 168–184.
- Freeman G. Experimental studies on embryogenesis in hydrozoans (Trachylina and Syphonophora) with direct development // *Biol. Bull.* 1983. V. 165. P. 591–618.
- Fritzenwanker J.H., Genikhovich G., Kraus Yu., Technau U. Early development and axis specification in the sea anemone *Nematostella vectensis* // *Dev. Biol.* 2007. V. 310. P. 264–279.
- Garcia-Fernandez J., D'Aniello S., Escriva H. Organizing chordates with an organizer // *BioEssays*. 2007. V. 29. P. 619–624.
- Gerhart J. Evolution of the organizer and the chordate body plan // *Int. J. Dev. Biol.* 2001. V. 45. P. 133–153.
- Hayward D.C., Samuel G., Pontynen P.C., Catmull J., Saint R., Miller D.J., Ball E.E. Localized expression of a dpp/BMP2/4 ortholog in a coral embryo // *PNAS*. 2002. V. 99. P. 8106–8111.
- Kraus Y., Fritzenwanker J.H., Genikhovich G., Technau U. The blastoporal organiser of a sea anemone // *Curr. Biol.* 2007. V. 17. № 20. P. R874–R876.
- Kraus Yu.A. Morphomechanical programming of morphogenesis in cnidarian embryos // *Int. J. Dev. Biol.* 2006. V. 50. P. 267–275.
- Lambert J.D. Mesoderm in spiralian: the organizer and the 4d cell // *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)*. 2008. V. 310B. P. 15–23.
- Lee P.N., Pang K., Matus D.Q., Martindale M.Q. A WNT of things to come: evolution of Wnt signaling and polarity in cnidarians // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2006. V. 17. P. 157–167.
- Lowe C.J., Terasaki M., Wu M., Freeman R.M., Runft L. Dorsal-ventral patterning in hemichordates: insights into early chordate evolution // *PLoS Biol.* 2006. № 4. e291.
- MacWilliams H.K. Hydra transplantation phenomena and the mechanism of hydra head regeneration. Properties of the head activation // *Dev. Biol.* 1983. V. 96. P. 239–257.
- Matus D.Q., Pang K., Marlow H., Dunn C.W., Thomsen G.H., Martindale M.Q. Molecular evidence for deep evolutionary roots of bilaterality in animal development // *PNAS*. 2006. V. 103. P. 11195–11200.
- Marfenin N.N., Kossevitch I.A. Morphogenetic evolution of hydroid colony pattern // *Coelenterate Biology 2003: Trends in research on Cnidaria and Ctenophora*. Eds. Fautin D.G., Westfall J.A., Cartwright P., Daly M., Wyttenbach C.R. // *Hydrobiologia*. 2004. P. 319–327.
- McClay D.R., Peterson R.E., Range R.C., Winter-Vann A.M., Ferkowicz M.J. A micromere induction signal is activated by b-catenin and acts through Notch to initiate specification of secondary mesenchyme cells in the sea urchin embryo // *Development*. 2000. V. 127. P. 5113–5122.
- Momose T., Derelle R., Houliston E. A maternally localised Wnt ligand required for axial patterning in the cnidarian *Clytia hemisphaerica* // *Development*. 2008. V. 135. P. 2105–2113.
- Momose T., Schmid V. Animal pole determinants define oral-aboral axis polarity and endodermal cell-fate in hydrozoan jellyfish *Podocoryne carnea* // *Dev. Biol.* 2006. V. 292. P. 371–380.
- Momose T., Houliston E. Two oppositely localised Frizzled RNAs as axis determinants in a cnidarian embryo // *PLoS Biol.* 2007. V. 5. № 4. e70.
- Muller W.A., Frank U., Teo R., Mokady O., Guette C., Plickert G. Wnt signaling in hydroid development: ectopic heads and giant buds induced by GSK-3b inhibitors // *Int. J. Dev. Biol.* 2007. V. 51. P. 211–220.
- Plickert G., Jacoby V., Frank U., Muller W.A., Mokady O. Wnt signaling in hydroid development: Formation of the primary body axis in embryogenesis and its subsequent patterning // *Dev. Biol.* 2006. V. 298. P. 368–378.
- Ransick A., Davidson E.H. A complete second gut induced by transplanted micromeres in the sea urchin embryo // *Science*. 1993. V. 259. P. 1134–1138.
- Rentzsch F., Anton R., Saina M., Hammerschmidt M., Holstein T.W., Technau U. Asymmetric expression of the BMP antagonists chordin and gremlin in the sea anemone *Nematostella vectensis*: implications for the evolution of axial patterning // *Dev. Biol.* 2006. V. 29. P. 375–387.
- Rentzsch F., Guder C., Vocke D., Hobmayer B., Holstein Th.W. An ancient chordin-like gene in organizer formation of *Hydra* // *PNAS*. 2007. V. 104. № 9. P. 3249–3254.
- Saina M., Genikhovich G., Renfer E., Technau U. BMPs and Chordin regulate patterning of the directive axis in a sea anemone // *PNAS*. 2009. V. 106. № 44. P. 18592–18597.
- Sander K., Faessler P.E. Introducing the Spemann-Mangold organizer: experiments and insights that generated a key concept in developmental biology // *Int. J. Dev. Biol.* 2001. V. 45. P. 1–11.
- Seipp S., Wittig K., Stiening B., Bottger A., Leitz T. Metamorphosis of *Hydractinia echinata* (Cnidaria) is caspase-dependent // *Int. J. Dev. Biol.* 2006. V. 50. P. 63–70.
- Spemann H., Mangold H. Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren // *W. Roux's Arch. Entwicklungsmech. Organ.* 1924. V. 100. P. 599–638.
- Stern, C.D. Evolution of the mechanisms that establish the embryonic axes // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2006. V. 4. P. 413–418.
- Stewart R.M., Gerhart J.C. The anterior extent of dorsal development of the *Xenopus* embryonic axis depends on the quantity of organizer in the late blastula. *Development*. 1990. V. 109. P. 363–372.
- Stumpf M., Will B., Wittig K., Kasper J., Fischer B., Schmich J., Seipp S., Leitz T. An organizing region in metamorphosing hydrozoan planula larvae – stimulation of axis formation in both larval and in adult tissue // *Int. J. Dev. Biol.* 2010. V. 54. P. 795–802.
- Teissier G. Recherches sur *Dynamena pumila* (L.) // *Trav. Stat. Biol. Roskoff*. 1923. V. 1. P. 2–52.
- Teissier G. Etude expérimentale du développement de quelques Hydraries // *Ann. Sci. Natur. Zool. Ser. 10*. 1931. T. 14. P. 5–60.
- Tung T.C., Wu S.C., Tung Y.Y.F. Experimental studies on the neural induction in amphioxus // *Sci. Sin.* 1962. V. 11. P. 805–820.

Yu Jr.-K., Satou Y., Holland N.D., Shin-I T., Kohara Y.,  
Sato N., Bronner-Fraser M., Holland L.Z. Axial patterning

in cephalochordates and the evolution of the organizer //  
Nature. 2007. V. 447. P. 613–617.

## Inductive Activity of the Posterior Tip of Planula in the Marine Hydroid *Dynamena pumila*

Yu. A. Kraus

Department of Evolutionary Biology, Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia  
e-mail: yulia\_kraus@hydrozoa.org

**Abstract**—Activity of organizer regions is required for body plan formation in the developing organism. Transplanting a fragment of such a region to a host organism leads to the formation of a secondary body axis that consists of both the donor's and the host's tissues (Gerhart, 2001). The subject of this study, the White Sea hydroid cnidarian *Dynamena pumila* L. (Thecaphora, Sertulariidae), forms morphologically advanced colonies in the course of complex metamorphosis of the planula larva. To reveal an organizer region, a series of experiments has been performed in which small fragments of donor planula tissues were transplanted to embryos at the early and late gastrula stage, as well as to planulae. Only transplantations of a posterior tip fragment of a donor planula to a host planula of the same age led, in the course of metamorphosis, to the formation of a secondary shoot, which involved up to 50% of the host's tissues. After transplantations of tissue fragments of the anterior tip and the middle of the planula body, the formation of any ectopic structures was never observed. It was concluded that the posterior tip of the planula has organizer properties in *Dynamena*.

**Keywords:** Cnidaria, Hydrozoa, induction, organizer, transplantation, embryonic development, larva, metamorphosis

УДК 611.013.9

## ПАССИВНЫЕ И АКТИВНЫЕ РЕАКЦИИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ НА ДЕЙСТВИЕ ДОЗИРОВАННЫХ МЕХАНИЧЕСКИХ СИЛ<sup>1</sup>

© 2011 г. А. Н. Мансуров, Л. В. Белоусов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва, ГСП-2, Ленинские горы

E-mail: morphogenesis@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.06.10 г.

Окончательный вариант получен 23.06.10 г.

С помощью присасывающего манометрического устройства изучали зависимость между деформациями зародышей шпорцевой лягушки на стадиях гастролы и нейрулы и величинами приложенных сил. Модуль жесткости эмбриональных тканей имел порядок нескольких десятков паскалей и при деформациях от 40 до 120% был им обратно пропорционален. На стадии гастролы в течение 30 мин после прекращения действия присасывающей силы наблюдали равномерное или нарастающее по скорости втягивание тела зародыша во всасывающий капилляр диаметр которого составлял около половины поперечника зародыша. Длина втянутой части зародыша коррелировала с величиной его деформации за первую минуту. В результате втягивания общая поверхность тела деформированного зародыша возрастала более чем в два раза по сравнению с интактным зародышем. После выталкивания зародыша из капилляра в течение 5 мин его поверхность сокращалась и деформация сглаживалась, что указывает на присутствие в растянутых зародышах упругих сил. Эти данные показывают, что у зародышей стадии гастролы внешние механические силы не только пассивно деформируют зародыш, но и запускают его активное растяжение, происходящее при нулевой внешней силе и преодолевающее упругое сопротивление тканей. Обсуждаются механизмы активного растяжения и его связь с процессами нормального морфогенеза.

*Ключевые слова:* морфогенез, механические напряжения, гастролы, модуль Юнга, *Xenopus laevis*.

### ВВЕДЕНИЕ

Одним из важных направлений современной биологии развития становится морфомеханика, изучающая распределение и морфогенетическую роль механических напряжений в клетках и тканях зародыша, а также реакции эмбриональных тканей на механические воздействия. Многочисленные данные, полученные за последние 10–15 лет, указывают на важную, а иногда и решающую роль механических сил и вызываемых ими деформаций для блокирования апоптоза (Huang, Ingber, 2000), нормального протекания морфогенеза (Belousov et al., 2006), установления паттернов экспрессии генов (Farge, 2003; Kornikova et al., 2010) и определения путей дифференцировки стволовых клеток (Engler et al., 2006). Принципиально важно, что во всех этих случаях наблюдаются активные ответы клеток на внешние механические силы. Одна из моделей связей между внешними механическими силами и активными ответами эмбриональных клеток и тканей предложена в терминах гипотезы гипервосстановления механических напряжений (Belousov, 2008; Taber, 2009).

Дальнейшее развитие морфомеханики требует получения точных количественных данных как о пассивных механических параметрах клеток и тканей (характеризующих их вязко-упругие свойства), так и об их активных ответах. Хотя первые измерения механических сил в ходе развития зародышей были получены около 70 лет тому назад (Waddington, 1939; Moore, 1941; Selman, 1958), планомерные исследования в этом направлении были начаты лишь недавно. Так, на зародышах шпорцевой лягушки (стадии гастролы–нейрулы) измеряли жесткость эмбриональных тканей (модули Юнга) при сжатии тканей (Zhou et al., 2009) и их растяжении методом присасывания (von Dassow, Davidson, 2009). В обеих работах были получены сходные данные. При сжатии модуль Юнга для гастрол составлял около 20 Па, а к стадии нейрулы возрастал до 80 Па. При растяжении тот же показатель для гастрол варьировал в области 10–20 Па, а к стадии нейрулы возрастал до 20–140 Па. Авторы подчеркивают широкую вариабельность этого показателя даже для зародышей одной и той же стадии развития, полученных из одной кладки. Они полагают, что нормальное развитие зародышей при сильно различающихся значениях модуля Юнга свидетельствует о тонкой подстройке активных механохимических реакций с участием цитоскелета к жесткости тканей. Вместе с тем, они не ис-

<sup>1</sup> Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 05-04-48681).

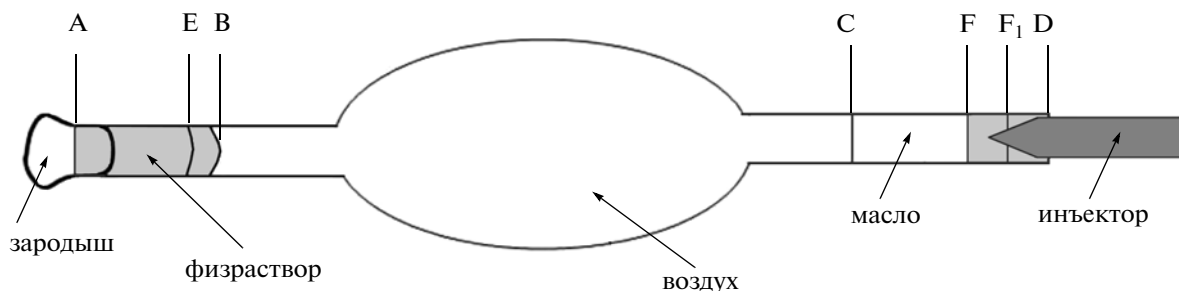


Рис. 1. Принципиальная схема установки и положение менисков в ходе измерений. Подробные объяснения в тексте.

следовали зависимости модуля Юнга от величины приложенной силы и/или вызванной ею деформации. В цитированных работах отсутствуют также какие-либо указания об активных реакциях деформированных тканей. Наше исследование было посвящено решению именно двух последних вопросов.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Материал.** Работу проводили на зародышах шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* Daudin, полученных методом гормональной стимуляции. Измерения проводили на зародышах стадий 12 (средняя гастрюла) и 14 (нейрула) по Nieuwkoop, Faber (1956). Зародыши помещали в чашку Петри с агаровым дном, заполненную модифицированным раствором Рингера (MMR). Перед началом измерений с зародышей снимали желточную оболочку.

**Описание установки.** Был сконструирован прибор, имеющий резервуар с воздухом, связанный на противоположных концах с двумя капиллярами (рис. 1). Один из капилляров (CD) заполнялся маслом. В него вводили иглу иньектора, снабженного винтовой подачей. Противоположный капилляр (AB) был погружен в раствор MMR. Пространство BC заполнено воздухом. Диаметр капилляра равнялся 0.6 мм, что составляло примерно половину диаметра зародыша.

**Схема измерений механических сил, вызывающих деформацию зародыша.** Зародыш плотно прижимали к концу А капилляра, фиксируя его стеклянными иглами, закрепленными в агаровом дне. Это полностью исключало сдвиги или повороты зародыша в ходе опыта. Для каждого опыта устанавливали такие объемы воздуха в отсеке ВС, при которых мениск В начнет двигаться либо в сторону иньектора, либо в противоположную сторону. Назовем первый объем полностью разреженным, а второй объем — полностью сжатым воздухом. Для этого с помощью движений иньектора достигали такое давление в резервуаре с воздухом, когда столбик АВ начнет удлиняться или укорачиваться соответственно (засасывание раствора в установку или его выпуск). Это необходимо для расчета эффективного давления, действующего на эмбрион, так как эмбрион втягивается

только при полностью разреженном воздухе. Затем, во избежание последующих резких рывков мениск С сдвигали влево относительно полностью разреженного воздуха (воздух немного сжимался) на такое малое расстояние, чтобы мениск В не двигался. Затем вращением винта иньектора давление воздуха в отсеке ВС понижали, и когда эмбрион начинал втягиваться в капилляр, понижение прекращали. Зародыш фотографировали с помощью цифровой камеры непосредственно перед началом понижения давления, сразу после остановки иньектора, а также через 1, 5, 10, 20 и 30 мин. В некоторых опытах после этого повышали с помощью иньектора давление в системе, благодаря чему зародыш выталкивался из капилляра. Его фотографировали сразу, через 1 и 6 мин после выхода. В ходе измерений поддерживали внутри установки постоянную температуру с точностью 0.2°C.

**Принципы расчетов механических сил.** Расчеты проводили на основе уравнения для идеальных газов:  $P_1V_1 = P_2V_2$ . Для его применения надо знать давление в отсеке с воздухом при *полностью разреженном воздухе*. Чтобы его рассчитать, измеряли объемы полностью разреженного и полностью сжатого воздуха по фотографиям соответствующих положений менисков на границе вода-воздух и воздух-масло. (На рис. 1 полностью разреженный воздух располагается между менисками В и F, а полностью сжатый — между менисками Е и С). После стабилизации капиллярных сил давление в системе составило примерно 103 кПа, что соответствует воздуху средней сжатости. Это на 2 кПа выше атмосферного давления. Данная разница возникла за счет капиллярных сил, сжимающих воздух внутри системы. Принимая, что давление воздуха средней сжатости  $P_{cp} = (P_{сж} + P_p)/2$ , где  $P_{сж}$  и  $P_p$  — давление соответственно сжатого и полностью разреженного воздуха, и используя уравнение для идеального газа, получаем, что  $P_p = (2P_{cp}V_p)/(V_p + V_c) \approx 102$  кПа, что и является стартовым давлением в дальнейших расчетах.

Для расчета действующего на эмбрион отрицательного давления измеряли объем воздуха  $V_n$  до начала деформации зародыша (рис. 1, объем между менисками В и F) и объем воздуха  $V_k$  после заданной деформации (объем между менисками В и F<sub>1</sub>). В со-

Результаты измерений.  $(\Delta L/L)$  – относительные деформации,  $P$  – начальное давление,  $E$  – модули Юнга. Подстрочные индексы: 1 – результаты за первую минуту после начала измерений; 10 – за последующие 10 мин; 30 – за все 30 мин измерений; 30–10 – то же за вычетом первых 10 мин; 6 мин out – за 6 мин после выталкивания зародыша из капилляра

№ опытов	$(\Delta L/L)_1$	$P_1$	$E$	$(\Delta L/L)_{10}$	$(\Delta L/L)_{30}$	$(\Delta L/L)_{6 \text{ мин out}}$
1	0.4	86	215	0.21	0.58	
2	0.46	76	165	0.24	0.58	
3	0.49	76	155	0.07	0.69	
4	0.6	66	110	0.55	1.11	0.45
5	0.88	54	61.5	1.42		
6	1.18	16	13.5	2.41	2.58	
7	1.5	36	24	3.87	1.99	0.8
8	1.85	74	40	4.57	1.99	0.8
9	2.0	138	69	4.0	2.7	
10	0.65	115	75	2.78	0.70	
11	0.26	44	171	2.07	1.70	
12	0.17	27	154	2.26	1.15	
13	0.60	62	103	2.09		

ответствии с уравнением для идеального газа, отрицательное давление на зародыш  $P_k = P_n V_n / V_k$ , где  $P_n = P_p \approx 102$  кПа.

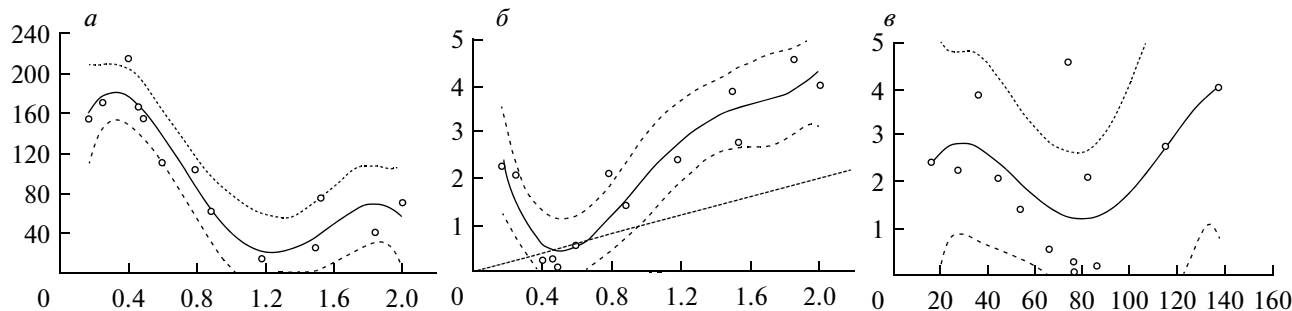
*Механические показатели, измерившиеся в данной работе.* В течение всего периода измерений (в большинстве опытов в течение 30 мин) регистрировали величину действующего на зародыш всасывающего давления в паскалях (Pa) и растяжение введенной в капилляр части зародыша. В ряде опытов по истечении данного времени зародыш выталкивали из капилляра и измеряли изменение его длины в течение 6 мин. За модуль Юнга (модуль жесткости эмбриональных тканей) принимали отношение  $\varepsilon = P : (\Delta L/L)$ , где  $P$  – всасывающее давление, регистрируемое сразу после приложения силы,  $\Delta L/L$  – относительное растяжение введенной в капилляр части зародыша за первую минуту втягивания. Использование для измерения модуля Юнга именно первой минуты действия силы связано с тем, что деформации зародышей за столь краткий период можно было в достаточном приближении считать пассивными (хотя, как мы увидим, и в этот период активной компоненты полностью исключить нельзя), тогда как в дальнейшем активные реакции явно преобладают.

*Определение корреляций между различными показателями.* С помощью пакета программа Statistica 7.0 определяли коэффициенты корреляции ( $r$ ) между значениями модуля Юнга и одноминутными деформациями зародышей, а также между деформациями зародышей за первую и за последующие 10 мин. Измерения проводили на 13 зародышах стадии 12, составляющих 5 разновременных серий опытов.

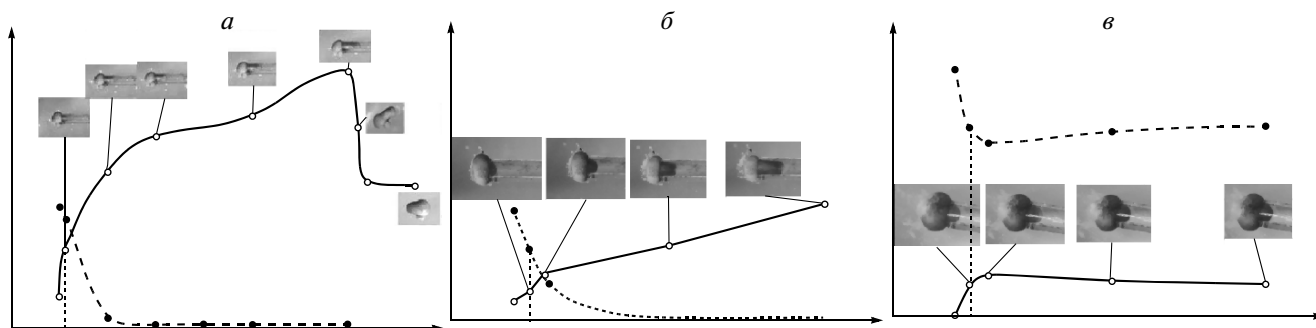
## РЕЗУЛЬТАТЫ

*Зависимость модуля Юнга от пассивных (одноминутных) деформаций.* Как видно из табл. 1, величины модуля Юнга для разных образцов различаются почти на порядок (от 24 до 215 Pa). Наряду с этим обнаруживается достоверная, в основном обратная корреляция ( $r = -0.80$ ) между значениями модуля Юнга и деформациями (рис. 2, а): в диапазонах деформаций от 25 до 140% значения модуля падают, а затем начинают слабо возрастать. Это означает, что при средних величинах деформаций ткань зародыша уже в течение первой минуты воздействия “размягчается”, а при более сильных деформациях испытывает небольшое затвердевание.

*Активное втягивание зародыша в капилляр.* Наиболее важным и неожиданным результатом данной работы оказалось то, что большинство зародышей, деформированных на стадии гастрюлы (но не на стадии нейрулы) продолжали втягиваться в капилляр даже при прекращении действия втягивающей силы (рис. 3, а, б). Поэтому втягивание зародыша в капилляр следует считать активным процессом (вызванным действием внутренних сил), тем более, что в ряде случаев оно шло с нарастающей скоростью (рис. 3, а). При этом активное удлинение зародышей за первые 10 мин имело достоверную положительную корреляцию с деформациями тех же зародышей за первую минуту ( $r = 0.80$ ); эта корреляция проявлялась начиная с 40% растяжения (рис. 2, б). Размеры активных деформаций за 10 мин почти во всех случаях существенно превышали размеры предшествующих пассивных деформаций (пунктирная прямая на рис. 2, б). Достоверная положительная корреляция сохранялась и между одноминутными и 30-минутными деформациями ( $r = 0.77$ ), а также



**Рис. 2.** Корреляции между значениями модуля Юнга и деформациями за первую минуту опыта (*а*), между деформациями за первую и последующие 10 мин (*б*) и отсутствие корреляций между приложенной силой и деформациями за 10 мин после прекращения ее действия (*в*). На *а* абсцисса – деформации ( $\Delta L/L$ ) за первую минуту, ордината – модули Юнга (Па). На *б* абсцисса та же, ордината – деформации ( $\Delta L/L$ ) за последующие 10 мин. Пунктирная прямая соединяет равновеликие деформации. На *в* абсцисса – присасывающая сила (Па), ордината – деформации за 10 мин после прекращения ее действия. Использовано полиномиальное сглаживание. Пунктирные кривые – доверительные интервалы корреляций.



**Рис. 3.** Типичные графики деформаций нормальных зародышей на стадии гастрюлы (*а, б*) и зародыша, предварительно обработанного колхицином (*в*). На рис. 3 и 5 горизонтальные оси – время от начала опытов, мин. Вертикальная пунктирная линия указывает момент снятия деформирующей силы. Левые вертикальные оси и сплошные кривые – деформации зародышей (длины втянутых в капилляры частей, мм). Два правых кадра на *а* относятся к зародышам, выпущенным из капилляра. Правые вертикальные оси и пунктирные кривые – внешние силы, приложенные к зародышам (паскали, Па). Видно, что втягивание зародышей в капилляры продолжается при нулевых внешних силах.

между 10- и 30-минутными ( $r = 0.84$ ). На этом фоне показательным является полное отсутствие корреляций между десятиминутными деформациями и величинами всасывающих сил (рис. 2, *в*).

Через 30 мин после начала опыта некоторые зародыши полностью втягивались в капилляр, после чего оставались неподвижными. Последнее еще раз подтверждает, что внешняя всасывающая сила в период их втягивания отсутствовала.

Мы исследовали также динамику деформации зародышей стадии гастрюлы, предварительно инкубированных в 1% растворе колхицина. При этом наблюдали вытяжение зародыша за первую минуту, находящееся в типичном отношении к величине приложенной силы (вычисленный на основе данного опыта модуль Юнга составлял около 40 Па, что по порядку величин соответствует данным по нормальным зародышам). Однако даже при сохранении ненулевой внешней силы последующее вытяжение отсутствовало и наблюдалось даже небольшое сокращение втянутой части (рис. 3, *в*). Это можно связать

с тем, что разрушение микротрубочек колхицином приводит к утрате передне-задней полярности мигрирующих клеток (Li, Gundersen, 2008). Такая реакция подтверждает, что последующее вытяжение связано с активными клеточными движениями.

*Изменение рисунка поверхностного пигмента при действии внешней силы*

На фотографиях, сделанных до приложения внешней силы, в момент ее приложения и через 1 мин мы прослеживали пигментный рисунок на той части зародыша, которая осталась вне капилляра. Как видно из сравнения рис. 4, *а–в*, уже через 1 мин после начала действия силы края относительно свободной от пигмента зоны поверхности зародыша образуют несколько впадин, примерно параллельных отверстию капилляра. Это свидетельствует о том, что втягивание сопровождается кольцевым (окружным) сжатием поверхности, примыкающей к отверстию капилляра.



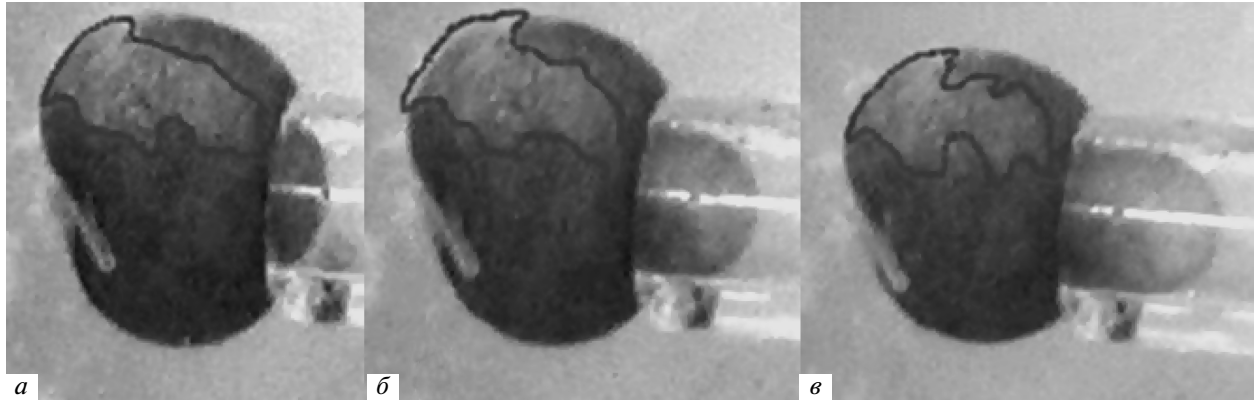


Рис. 4. Фотографии поверхности зародыша до начала действия силы (а), в момент приложения силы (б) и через 1 мин (в). Обведен край зоны, относительно свободной от пигмента.

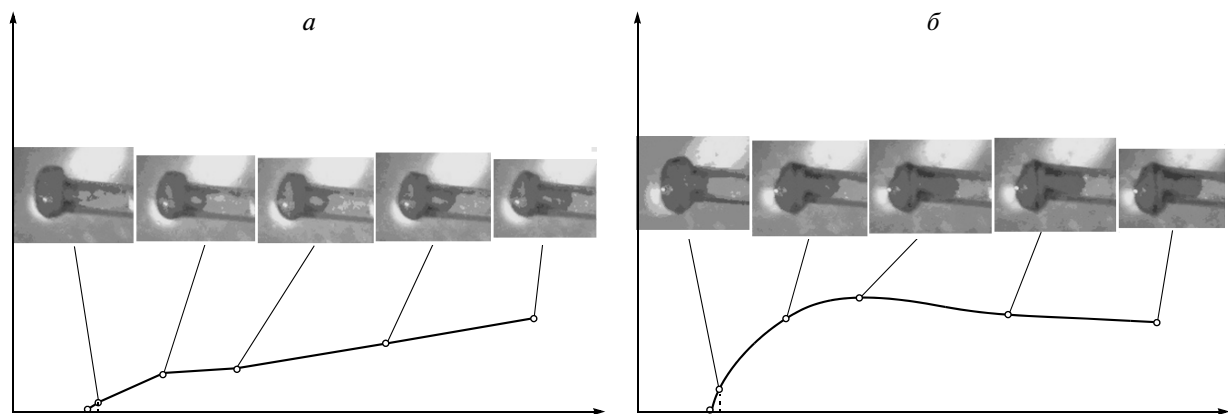


Рис. 5 а, б – Типичные графики деформаций зародышей стадии нейрулы. Обозначения по осям как на рис. 3.

В нескольких опытах мы выпускали из капилляра наружу частично втянутые в него зародыши. Будучи освобожденными, они немедленно начинали сокращаться (рис. 3, а), возвращаясь к своей исходной форме. Через 6 мин сокращение в большинстве случаев превышало 50% (Таблица, правая графа). Это указывает на присутствие в активно деформированных зародышах существенных упругих напряжений.

Результаты воздействий на зародыши стадии нейрулы были менее определенными. После воздействия силой 80–90 Па в некоторых случаях наблюдали последующее вытяжение зародыша, а в других – его слабое сокращение (рис. 5, а, б).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты данной работы можно разделить на две категории. К первой относятся измерения модулей Юнга эмбриональной ткани на основе измерений деформаций (растяжения) участка зародыша в течение первой минуты действия присасывающего давления заданной величины (“быстрый ответ”). Мы считали, что за столь малое время активная ре-

акция зародыша на действие внешней силы не успевает развиваться, так что быстрый ответ можно в хорошем приближении рассматривать как пассивную линейную реакцию вязко-упругого тела. Однако оказалось, что уже в пределах 1-минутных воздействий модули сильно зависят как от деформаций, так и от приложенных сил.

Как уже говорилось, в диапазоне деформаций от 25 до 140% модули были обратно пропорциональны деформациям. Это значит, что при возрастании деформаций в данном диапазоне ткань зародыша уже за 1 минуту существенно “размягчается”, что согласуется с данными о способности цитоскелета уже в течение нескольких секунд изменять жесткость под влиянием внешних сил (Deng et al., 2006). Следовательно, реакции тканей зародыша на механические силы на всех испытанных временах являются сильно нелинейными, отчего само понятие модуля жесткости может быть применено к ним в значительной мере условно. Однако с этой оговоркой мы будем продолжать его использовать ввиду привычности данного термина и отсутствием адекватной замены.

Полученные нами значения модулей Юнга на 1.5–2 порядка меньше типичных значений модулей для отдельных клеток, измеренных по большей части методом присасывания (Kolodney, Wysolmerski, 1992; Hochmuth, 2000). С другой стороны, наши данные по порядку величин совпадают с таковыми Dassow, Davidson (2009), которые были также получены методом присасывания, хотя и с использованием значительно более тонкими пипетками (поперечник 120–125 мкм). Это подтверждает корректность наших данных. Расхождения с величинами модулей для отдельных клеток допускают следующие толкования:

1. Можно допустить, что при определении величин давления показания манометра следует делить не на полную площадь сечения отростка зародыша, втянутого в капилляр ( $S_1$ ), а на суммарную площадь клеточных контактов типа *zonulae adherence*, приходящихся на данное сечение. ( $S_2$ ). Поскольку для каждого сечения толщиной в одну клетку  $S_2 \approx 0.01S_1$ , при таком пересчете значения модулей должны возрасти примерно на 2 порядка. Однако такое рассуждение, по-видимому, несостоятельно, поскольку действующие в наших опытах силы растягивают не один поперечный слой клеток, а по меньшей мере несколько десятков таких слоев, отчего суммарная площадь растягиваемых клеточных контактов (расположенных в разных плоскостях) приближается по порядку величин к  $S_1$ .

2. Действующие в наших опытах кратковременные силы деформируют не отдельные клетки, а межклеточные связи и внеклеточный матрикс. Иными словами, клетки не деформируются каждая по отдельности, а перераспределяются. Это предположение кажется нам правдоподобнее, хотя и оно должно быть проверено подробными цитологическими наблюдениями.

Вторая категория данных относится к активным деформациям, протекающим при нулевой внешней силе (втягивание зародышей в капилляр). Мы считаем, что эти деформации являются реакциями целого зародыша на изменение его механогеометрии при начале втягивания. Предлагается следующая интерпретация (рис. 6). В результате приложения внешней силы в течение первой минуты растягивается не только втянутая в капилляр часть зародыша, но и примыкающие к устью капилляра участки еще не втянутой поверхности. Согласно модели гипертонического восстановления механических напряжений (Velousov, 2008) и соответствующих ей наблюдений клеточной динамики в тороидальных структурах (Kraus, 2006; Cherdantzeva, Cherdantzev, 2006), меридиональные натяжения вызывают интеркаляционные движения клеток в окружных направлениях (рис. 6, конвергирующие стрелки 4). Эти движения и вызывают активное кольцевое сужение еще не втянувшейся части зародыша, что способствует ее вталкиванию в капилляр. Согласно

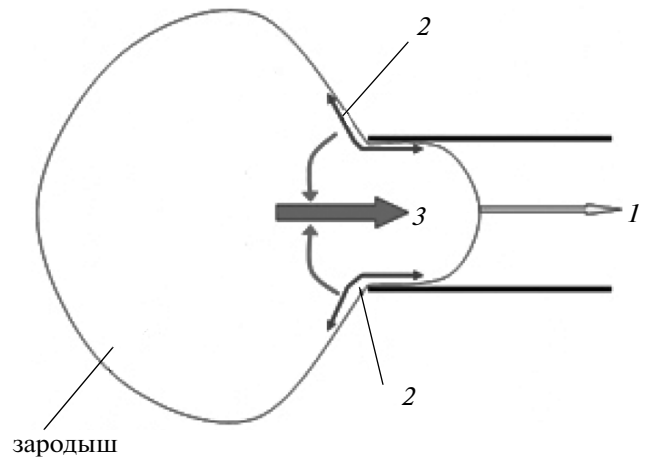


Рис. 6. Схема механических напряжений в тканях зародыша, вызывающих его активное втягивание в капилляр. 1 – всасывающая сила, 2 – пассивное растяжение поверхности зародыша под действием этой силы, 3 – активное давление, втягивающее зародыш в капилляр и возникающее на основе конвергенции клеток (4), вызванной растяжением.

Cherdantzeva, Cherdantzev (2006), совершенно аналогичные силы должны действовать при гаструляции по окружности бластопора. В этом смысле активное втягивание тканей зародыша в капилляр можно рассматривать как экзогастрюляцию, или же как модель роста побега.

Обратим внимание на то, что величина активного втягивания за 10 и даже за 30 мин сильно коррелирует с длиной втягивания за первую минуту, но не с величиной приложенной силы (рис. 2, б, в). Это важно потому, что именно длина одномоментного втягивания является непосредственной мерой пассивного растяжения тканей зародыша под влиянием внешней силы. В таком случае высокий коэффициент корреляции между прямыми показателями пассивного и активного вытяжения говорит о пропорциональности активной реакции пассивному растяжению. При этом активное вытяжение в подавляющем большинстве случаев существенно превышает пассивное (см. положение пунктирной прямой на рис. 2, б). Это как раз и соответствует реакции гипертонического восстановления, то есть генерации в тканях зародыша силы давления, превышающего внешнюю растягивающую силу. При оценке сил внутреннего давления следует учитывать, что они при втягивании зародыша в капилляр преодолевают еще и упругое растяжение тканей, проявляющееся при выталкивании зародыша из трубки. Наряду с этим, дополнительным фактором, способствующим втягиванию зародыша в трубку, может быть понижение значений модуля Юнга при деформации (рис. 2, а, б), т.е. уменьшение жесткости растянутой ткани по сравнению с нерастянутой. Мы полагаем, что предложенная нами простая экспериментальная модель может быть удобной для дальнейшего исследования коли-

чественных соотношений между пассивными и активными механозависимыми реакциями эмбриональных тканей.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Belousov L.V.* Mechanically based generative laws of morphogenesis // *Physical Biology*. 2008. V. 5. № 1. 015009.
- Belousov L.V., Luchinskaia N.N., Ermakov A.S., Glagoleva N.S.* Gastrulation in amphibian embryos, regarded as a succession of biomechanical feedback events // *Int. J. Dev. Biol.* 2006. V. 50. P. 113–122.
- Cherdantzeva E.V., Cherdantzev V.G.* Geometry and mechanics of Teleost gastrulation and the formation of primary embryonic axes // *Int. J. Dev. Biol.* 2006. V. 50. P. 157–168.
- Deng L., Trepast X., Butler J.P. et al.* Fast and slow dynamics of the cytoskeleton // *Nature Materials*. 2006. V. 5. P. 636–640.
- Engler A.J., Sen S., Sweeney H.L. et al.* Matrix elasticity directs stem cells lineage specification // *Cell*. 2006. V. 126. P. 677–689.
- Farge E.* Mechanical induction of Twist in the Drosophila foregut/stomodaeal primordium // *Curr. Biol.* 2003. V. 13. P. 1365–1377.
- Hochmuth R.M.* Micropipette aspiration of living cells // *J. Biomechanics*. 2000. V. 33 P. 15–22.
- Huang S., Ingber D.E.* Shape-dependent control of cell growth, differentiation, and apoptosis: switching between attractors in cell regulatory networks // *Exptl. Cell Res.* 2000. V. 261. P. 91–103.
- Kolodney M.S., Wysolmerski R.B.* Isometric contraction by fibroblasts and endothelial cells in tissue culture: a quantitative study // *J. Cell Biol.* 1992. V. 117. P. 73–82.
- Kornikova E.S., Troshina T.G., Kremnyov S.V. et al.* Neuro-mesodermal patterns in artificially deformed embryonic explants: a role for mechanogeometry in tissue differentiation // *Dev. Dynamics*. 2010. V. 239. P. 885–896.
- Kraus Ju.A.* Morphomechanical programming of morphogenesis in Cnidarian embryos // *Int. J. Dev. Biol.* 2006. V. 50. P. 267–276.
- Li R., Gundersen G.G.* Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell // *Nature*. 2008. V. 9. P. 860–873.
- Moore A.R.* On the mechanisms of gastrulation in *Dendroaster excentricus* // *J. Exp. Zool.* 1941. V. 87. P. 101–111.
- Nieuwkoop P.D., Faber J.* Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). Amsterdam: North-Holland Publ. Co. 1956. 243 p.
- Selman J.* The forces producing neural closure in Amphibia // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1958. V. 6. P. 448–465.
- Taber L.A.* Towards a unified theory for morphomechanics // *Phil. Trans. R. Soc. A*. 2009. V. 367. P. 3555–3583.
- von Dassow M., Davidson L.A.* Natural variation in embryo mechanics: gastrulation in *Xenopus laevis* is highly robust to variation in tissue stiffness // *Dev Dynamics*. 2009. V. 238. P. 2–18.
- Waddington C.H.* Order of magnitude of morphogenetic forces // *Nature*. 1939. V. 144. P. 637–637.
- Zhou Jan, Hye Young Kim, Davidson L.A.* Actomyosin stiffens the vertebrate embryo during crucial stages of elongation and neural tube closure // *Development*. 2009. V. 136. P. 677–688.

## Passive and Active Reactions of Embryonic Tissue to the Action of Dosed Mechanical Forces

A. N. Mansurov and L. V. Belousov

Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

e-mail: morphogenesis@yandex.ru

**Abstract**—With the help of a suction manometric device, the relation between the deformation of *Xenopus laevis* embryo at the gastrula and neurula stages and the value of the applied force has been studied. Stiffness modules of embryonic tissues were in the order of several dozens of Pascal and they were inversely proportional during deformation from 40 to 20%. At the gastrula stage, a uniform or an increasing rate of expansion of the embryo body in the suction capillary with the diameter of approximately half that of the embryo was observed for 30 min after the action of the suction forces. The length of the stretched portion of the embryo correlates with the value of its deformation at the first minute. As a result of the expansion, the total body surface area of the deformed embryo increases more than twice compared to intact embryos. After expelling the embryo from the capillary, its surface reduced and the deformation became smoothed within 5 min, which indicates the existence of tensional force in the expanded embryo. These data confirm that, at the embryo gastrula stage, external mechanical forces do not only passively deform the embryo but also initiate the active expansion of the embryo which takes place at zero external force and overcomes the tensional resistance of tissues. The mechanism of active expansion and its link with the processes of normal morphogenesis are discussed.

**Keywords:** morphogenesis, mechanical tensions, gastrula, Young module, *Xenopus laevis*

УДК 591.392

## ДИСПЕРМНЫЙ АНДРОГЕНЕЗ У ОСЕТРОВЫХ РЫБ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ: ПОЛУЧЕНИЕ АНДРОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОТОМСТВА СИБИРСКОГО ОСЕТРА И АНДРОГЕНЕТИЧЕСКИХ ГИБРИДОВ МЕЖДУ СИБИРСКИМ И РУССКИМ ОСЕТРАМИ<sup>1</sup>

© 2011 г. А. С. Грунина, А. В. Рекубратский\*, Л. И. Цветкова\*, А. Е. Барминцева\*\*,  
Е. Д. Васильева\*\*\*, К. В. Ковалев\*, О. Г. Полуэктова\*\*

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26  
E-mail: asgrunina@gmail.com

\* Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства,  
141821 п. Рыбное, Московская область

\*\* Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии,  
107140 Москва, ул. Верхняя Красносельская, д. 17

\*\*\* Зоологический музей МГУ, 125009 Москва, ул. Большая Никитская, д. 6

Поступила в редакцию 28.06.2010 г.  
Окончательный вариант получен 07.10.2010

Впервые благодаря применению метода диспермного андрогенеза получены андрогенетическое потомство сибирского осетра (*Acipenser baerii*) и андрогенетические ядерно-цитоплазматические гибриды (сибирский осетр, *Acipenser baerii* × русский осетр, *A. gueldenstaedtii*) у осетровых рыб с использованием криоконсервированной спермы. С помощью анализа микросателлитной ДНК подтверждена чисто отцовская наследственность у андрогенетического потомства сибирского осетра. Среди андрогенетических гибридов выявлены гетерозиготы по некоторым микросателлитным локусам, что подтверждает диспермную природу андрогенеза. По данным сравнительного морфологического анализа полученный андрогенетический гибрид к 15-месячному возрасту полностью идентичен отцовскому виду. В полученных андрогенетических потомствах осетровых рыб выявлены как самка, так и самец, что представляет интерес с точки зрения возможности получения с помощью андрогенеза бисексуальных потомств. Данные настоящего исследования подтверждают возможность применения метода диспермного андрогенеза в сочетании с использованием криоконсервированной спермы для сохранения и воссоздания генофондов исчезающих видов осетровых рыб.

**Ключевые слова:** диспермный андрогенез, осетровые рыбы, криоконсервированная сперма, микросателлитный анализ, гетерозиготность, андрогенетические ядерно-цитоплазматические гибриды, сравнительный морфологический анализ, определение пола, гистологический анализ.

Индукцированный андрогенез является методом получения организмов с исключительно отцовской ядерной наследственностью и традиционно применяется в генетике и биологии развития для получения высокоинбредных линий и клонов, изучения взаимоотношений ядра и цитоплазмы, регуляции пола и др. В последнее время метод привлекает особое внимание в связи с возможностью использования его для восстановления редких и исчезающих видов из генетического материала их спермиев (Véprintsev, Rott, 1979; Grunina et al., 1990; Corley-Smith,

Brandhorst, 1999). Значение этого подхода к проблеме сохранения ценных генофондов в существенной мере определяется тем, что технология длительного хранения спермы рыб посредством криоконсервации уже в основном разработана (Suquet et al., 2000).

Для получения диплоидного андрогенеза необходимо вызвать инактивацию ядер яйцеклеток и диплоидизацию (удвоение) мужского хромосомного комплекса. К настоящему времени диплоидный андрогенез успешно осуществлен у ряда видов костистых рыб с помощью радиационной инактивации ядер яйцеклеток и диплоидизации мужских хромосом за счет блокирования первого деления дробления у андрогенетических гаплоидных зародышей (см. обзоры: Penman et al., 1996; Grunina, Neyfakh,

<sup>1</sup> Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты 09-04-01695, 06-04-49637 и 07-04-00219) и подпрограммой “Биоразнообразие” Президиума РАН (проект № 6.1.8).

1997). Однако полученные нами тем же способом андрогенетические диплоиды осетровых рыб оказались нежизнеспособны вследствие повышенной чувствительности этих рыб к высокому уровню гомозиготности, возникающей в результате блокирования первого деления дробления (Грунина, Нейфах, 1991). Между тем работы в данном направлении на осетровых рыбах имеют первостепенное значение, поскольку многие виды и популяции этих рыб близки к исчезновению (Birstein et al., 1997).

Для преодоления гомозиготности андрогенетических особей нами применительно к осетровым рыбам разработан метод диспермного андрогенеза. Данный метод предполагает диплоидизацию за счет слияния хромосомных наборов двух спермиев, что приводит к получению гетерозиготного потомства с обычным уровнем генетической изменчивости. Разработанный метод диспермного андрогенеза основывается на биологических особенностях осетровых рыб — наличии в яйцеклетках нескольких микропиле и физиологической моноспермии (отсутствии в яйцеклетках механизмов, блокирующих сверхчисленные спермии) (Гинзбург, 1968) — и включает радиационную инактивацию ядер яйцеклеток, полиспермное оплодотворение и тепловой шок, способствующий слиянию мужских пронуклеусов. С помощью этого метода нами были впервые получены жизнеспособные андрогенетические потомства у нескольких видов осетровых рыб (Grunina et al., 1995; Recoubratsky et al., 1996; Грунина, Рекубратский, 2005), а также жизнеспособные андрогенетические ядерно-цитоплазматические гибриды (Грунина, Рекубратский, 2005; Grunina et al., 2009). Получение подобных гибридов является необходимым условием, определяющим возможность использования андрогенеза для восстановления редких и исчезающих видов. При этом предполагается, что, оплодотворяя нативной или криоконсервированной спермой такого вида генетически инактивированные яйцеклетки доступного близкого вида и используя метод диплоидного андрогенеза, можно воссоздать исчезающий вид (Grunina, Neyfakh, 1997).

В данном сообщении отражены последние результаты наших исследований по диспермному андрогенезу у осетровых рыб с использованием криоконсервированной спермы. Впервые приводятся данные о получении таким путем андрогенетического потомства сибирского осетра (*Acipenser baerii*) и андрогенетических ядерно-цитоплазматических гибридов. В качестве экспериментальных объектов для получения этих гибридов использованы сибирский (*A. baerii*) и русский (*A. gueldenstaedtii*) осетры (соответственно, материнский и отцовский виды). Для подтверждения чисто отцовской наследственности у андрогенетических особей сибирского осетра, а также андрогенетической природы полученных ядерно-цитоплазматических гибридов использован микросателлитный анализ. Для иденти-

фикации андрогенетических гибридов использован сравнительный морфологический анализ. Также впервые приводятся данные по изучению пола у андрогенетических осетров, в том числе с использованием гистологического анализа.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

*Материал.* Эксперименты по индуцированному андрогенезу проводились в 2006–2008 гг. в Институте биологии развития РАН. В качестве материала использовали половые продукты, полученные от производителей сибирского осетра, содержащихся на Конаковском заводе товарного осетроводства (Тверская область), а также криоконсервированную сперму русского осетра, заготовленную на рыболовных заводах Краснодарского края. До использования в опытах эта сперма хранилась в криобанке в течение 2-х лет.

В опытах использовали яйцеклетки сибирского осетра, криоконсервированную или нативную сперму сибирского осетра и криоконсервированную сперму русского осетра. В каждом опыте использовали яйцеклетки, полученные от одной-трех самок, и смесь спермы от трех самцов для каждого вида.

### *Замораживание и размораживание спермы*

Сперму замораживали в 1.5 мл центрифужных пробирках по стандартной методике (Tsvetkova et al., 1996). Криозащитная среда содержала метанол (10%), сахарозу (7%) и антифризные белки. Для размораживания пробирки помещали на 1 мин в водяную баню (40°C), затем полуразмороженную сперму извлекали из пробирок, разбавляли водой и приливали к икре. Через 3 мин после осеменения яйцеклетки отмывали от криопротектора путем трехкратной смены воды.

### *Получение андрогенетического потомства*

Для инактивации ядер яйцеклетки подвергали рентгеновскому облучению в дозе 220 Гр. Затем, спустя 1.4–1.6  $\tau_0$  ( $\tau_0$  см. Dettlaff et al., 1993) после осеменения нативной (разбавление водой 1 : 10) или размороженной (разбавление 1.5 : 10) спермой, их подвергали тепловому шоку при 37°C в течение 2 мин. Ранее установлено, что шок в период развития от 1.4 до 1.6  $\tau_0$  является оптимальным для индукции диплоидного андрогенеза за счет слияния ядер спермиев (диспермный андрогенез) у осетровых рыб (Recoubratsky et al., 1996). Меньшее разбавление криоконсервированной спермы было взято исходя из того, что часть спермиев после процедур замораживания и оттаивания теряет подвижность. При получении обычного (интактного) потомства сперму разбавляли в соотношении 1 : 100, что позволяло избежать полиспермного оплодотворения.

В параллельных вариантах опытов для сравнения результатов использовали криоконсервированную и нативную сперму.

В каждом опыте по диспермному андрогенезу, помимо экспериментальных андрогенетических диплоидных потомств (АД – диплоидный андрогенез), были получены следующие контрольные варианты: КД (контроль диплоидный) – обычное скрещивание без применения экспериментальных воздействий; КГ (контроль гаплоидный) – андрогенетическое потомство (облучение икры), полученное без применения теплового шока. В контрольных вариантах были использованы те же гаметы, что и в опытных. Все варианты опытов проводились в трех-четыре повторностях.

#### *Инкубация эмбрионов и выращивание личинок*

Эмбрионов инкубировали в чашках Петри диаметром 90 мм (100–150 шт. на чашку) при комнатной температуре. Регулярно отбирали погибших эмбрионов. Полученных личинок после перехода на экзогенное питание переводили на выращивание в аквариальную ИБР РАН, где они содержались при температуре около 20°C и получали живые и искусственные корма.

#### *Молекулярно-генетический анализ*

Для анализа ДНК образцы тканей рыб фиксировали в 96%-ном этаноле. Из полученных образцов выделяли ДНК методом фенольно-хлороформовой экстракции (Blin, Stafford, 1976) с небольшими модификациями. Фрагмент плавника (2–5 мг), хвостовую часть личинки или эмбрион помещали в 400 мкл лизирующего раствора (100 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 100 мМ EDTA pH 8.0, 1% додецил сульфат натрия и 2 мкл раствора протеиназы К с концентрацией 20 мг/мл) и интенсивно перемешивали. Образцы инкубировали при 55°C в течение ночи, после чего к каждому образцу добавляли 400 мкл фенола. Образцы тщательно перемешивали и центрифугировали 15 мин при 15000 g. Супернатант переносили в чистые пробирки, добавляли равный объем хлороформ-изоамила (24 : 1) перемешивали и опять центрифугировали 15 мин при 15000 g. Супернатант переносили в чистые пробирки, добавляли равный объем изопропанола, перемешивали и инкубировали пробирки 30 мин при –20°C, после чего образцы центрифугировали 12 мин при 12000 g (4°C). Осадки промывали 80% этанолом, высушивали и растворяли ДНК в 200 мкл воды (MilliQ). ДНК хранили при –20°C до использования.

Исследование генетического материала родительских особей и их потомков проводилось методом микросателлитного анализа. Было использовано четыре микросателлитных несцепленных между собой локуса – An20, AfuG41, AoxD161, AoxD165

**Таблица 1.** Локусы и праймеры для микросателлитного анализа

Локус	Праймеры 5'-3'
An20	F: AATAACAATCATTCATGAGGCT R: TGGTCAGTTGTTTTTTTATTGAT
AfuG41	F: TGACGCACAGTAGTATTATTTATG R: TGATGTTTGCTGAGGCTTTTC
AoxD161	F: GTTTGAAATGATTGAGAAAATGC R: TGAGACAGACACTCTAGTTAAACAGC
AoxD165	F: TTTGACAGCTCCTAAGTGATACC R: AAAGCCCTACAACAAATGTCAC

(Zane et al., 2002; Welsh et al., 2003; Henderson-Arzapalo, King, 2002) (табл. 1).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в объеме 15 мкл в реакционной смеси, содержащей 1.5 мкл 10-кратного буфера для ПЦР, 0.6 мкл 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, по 0.6 мкл 2.5 мМ каждого из дезокси-нуклеозидтрифосфатов (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), по 0.6 мкл каждого праймера в стоковой концентрации 10 пм/мкл, 50 нг ДНК-матрицы и 1 ед. Taq-полимеразы.

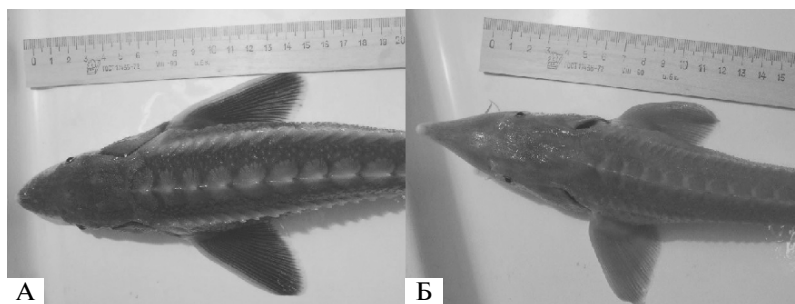
ПЦР осуществляли в приборе PTC-225 “MJ Research” при следующих параметрах: предварительная денатурация ДНК – 5 мин при 95°C; синтез ПЦР-продуктов (35 циклов): плавление – 95°C – 20 сек, отжиг праймеров (52–56°C) – 15 сек, синтез ДНК – 72°C – 15 сек, окончательная достройка цепей – 72°C – 10 мин.

После ПЦР к смеси добавляли 5 мкл 6-кратного буфера для нанесения (0.25% бромфенолового синего, 0.25% ксиленианола и 30% глицерина), 8 мкл полученной смеси наносили на 6% ПААГ. После окончания электрофореза гель окрашивали в растворе бромистого этидия (0.5 мкг/мл) в течение 30 мин, а затем промывали в дистиллированной воде 30 мин. Гели сканировали на геле-сканере “Turphoon 8600” (“Molecular Dynamics”).

На основании анализа электрофореграмм по каждому из локусов были выявлены аллели, характерные для исследуемых особей.

#### *Морфологический анализ*

Из полученного андрогенетического потомства удалось вырастить до 15 мес возраста двух особей (рис. 1) – сибирского осетра (A1, получен с использованием нативной спермы) и андрогенетического гибрида сибирский осетр × русский осетр (A2, криоконсервированная сперма); в контрольном потомстве истинных гибридов сохранилось 4 особи, в потомстве материнского вида (сибирского осетра) – 3. Для оценки степени морфологического сходства андрогенетических гибридов с родительскими видами и их истинными гибридами использовали 7 краниологических индексов (табл. 2), для которых ранее



**Рис. 1.** Андрогенетический гибрид сибирский осетр *Acipenser baerii* × русский осетр *A. gueldenstaedtii*, полученный с использованием криоконсервированной спермы (А) и андрогенетический сибирский осетр (нативная сперма) (Б). Возраст рыб – 15 мес.

был выявлен высокий уровень дивергенции между сибирским и русским осетрами (Vasil'eva, 2004, 2009). Схема промеров, использовавшихся для получения этих индексов, была опубликована ранее (Васильева и др., 2001; Vasil'eva, 2004). Среди стандартных морфологических признаков, применяемых в систематике и популяционных исследованиях осетровых рыб (Берг, 1948; Holčik, 1989; Gröger, De-

bus, 2000; Elvira, Almodo'var, 2000), были отобраны следующие: 1) форма жаберных тычинок, как основной диагностический признак сибирского осетра (Берг, 1948; Holčik, 1989; Vasil'eva, 1999); 2) число жучек в боковом и спинном рядах и число жаберных тычинок на первой жаберной дуге (табл. 3), по которым были выявлены различия в средних значениях между сибирским и русским осетрами по данным

**Таблица 2.** Краниологические характеристики 15-месячной молоди сибирского осетра (В), андрогенетического сибирского осетра (А1), андрогенетического ядерно-цитоплазматического (А2) и истинных гибридов (В × G) сибирского и русского осетров и 12-месячной молоди отцовского вида (G)

Формы Признаки	В (n = 3)	А1 (n = 1)	А2 (n = 1)	В × G (n = 4)	G (n = 4)
<i>TL</i> , мм	$\frac{186-322}{250.7}$	~336	~395	$\frac{230-268.0}{246.0}$	$\frac{193-334}{283.3}$
<i>Ri/D</i>	$\frac{69.7-73.3}{71.4}$	69.8	61.4	$\frac{65.2-71.9}{68.2}$	$\frac{56.4-63.1}{60.6}$
<i>Mr/D</i>	$\frac{57.8-61.2}{59.2}$	61.4	48.8	$\frac{56.6-59.9}{58.5}$	$\frac{48.8-57.1}{52.7}$
<i>Fds/Ri</i>	$\frac{86.4-89.1}{87.8}$	82.3	117.7	$\frac{81.9-103.6}{93.8}$	$\frac{114.4-123.0}{117.6}$
<i>Pds/Ri</i>	$\frac{57.6-67.9}{61.4}$	61.7	89.2	$\frac{61.5-71.5}{67.9}$	$\frac{79.1-97.8}{87.5}$
<i>W/Ri</i>	$\frac{56.2-62.4}{59.5}$	62.2	77.0	$\frac{52.9-70.2}{62.1}$	$\frac{67.6-80.8}{76.3}$
<i>B/B<sub>1</sub></i>	$\frac{105.2-141.7}{121.2}$	144.6	86.3	$\frac{98.1-106.2}{102.2}$	$\frac{46.9-58.3}{52.7}$
<i>B/Ri</i>	$\frac{42.8-49.3}{46.7}$	53.0	37.1	$\frac{42.4-49.7}{44.9}$	$\frac{26.6-32.0}{28.2}$

Обозначения промеров, использованных для получения индексов (в %): *Fds* – расстояние от переднего конца frontale до заднего края dermosupraoccipitale; *Ri* – расстояние от вершины роострума до заднего угла infraorbitale accessorium; *Pds* – расстояние от переднего конца parietale до заднего края dermosupraoccipitale; *D* – длина dermoscranium от конца роострума до заднего края dermosupraoccipitale; *Mr* – длина участка дермокрания, занимаемого комплексом костей rostralia-medialia; *W* – ширина дермокрания на уровне заднего угла infraorbitale accessorium; *B* – расстояние от переднего конца роострума до основания внутренней пары усиков; *B<sub>1</sub>* – расстояние от основания усиков до ротового хряща; *TL* – общая длина тела рыбы; *n* – число особей.

Над чертой – пределы варьирования, под чертой – *M*.

**Таблица 3.** Морфометрические характеристики 15-месячной молоди сибирского осетра, андрогенетического сибирского осетра, андрогенетического ядерно-цитоплазматического и истинных гибридов сибирского и русского осетров и молоди отцовского вида

Формы Признаки	B ( <i>n</i> = 3)	A1 ( <i>n</i> = 1)	A2 ( <i>n</i> = 1)	B × G ( <i>n</i> = 4)	G ( <i>n</i> = 4)	G-1 ( <i>n</i> = 3)
<i>TL</i> , мм	$\frac{186-322}{250.7}$	~336	~395	$\frac{230-268.0}{246.0}$	$\frac{193-334}{283.3}$	$\frac{377-440}{418.0}$
<i>Lsc</i>	$\frac{40-50}{44.0}$	46	38	$\frac{34-43}{37.5}$	$\frac{32-35}{33.8}$	$\frac{31-36}{34.3}$
<i>Dsc</i>	$\frac{13-15}{13.7}$	15	12	$\frac{12-13}{12.8}$	$\frac{10-16}{12.8}$	$\frac{11-14}{12.3}$
<i>spbr</i>	$\frac{28-31}{30.0}$	30	26	$\frac{23-26}{24.3}$	$\frac{20-24}{22.3}$	$\frac{18-19}{18.7}$
B % длины головы						
<i>a</i>	$\frac{49.5-51.0}{45.5}$	49.1	40.9	$\frac{46.2-51.5}{48.7}$	$\frac{38.7-43.2}{40.5}$	$\frac{33.9-35.7}{34.7}$
<i>aB</i>	$\frac{28.5-33.0}{30.9}$	33.1	20.7	$\frac{26.9-32.5}{28.6}$	$\frac{14.4-18.7}{16.1}$	$\frac{13.3-14.2}{13.8}$
<i>wM</i>	$\frac{28.1-30.2}{29.3}$	28.2	28.0	$\frac{26.9-28.8}{27.8}$	$\frac{28.4-40.4}{32.7}$	$\frac{27.7-32.8}{29.8}$
<i>lB</i>	$\frac{18.4-27.6}{22.5}$	22.5	24.0	$\frac{15.4-21.6}{18.8}$	$\frac{15.3-19.7}{17.4}$	$\frac{14.0-20.8}{18.1}$
<i>o</i>	$\frac{8.6-12.1}{10.0}$	7.9	8.8	$\frac{10.9-12.5}{11.8}$	$\frac{10.9-16.3}{13.1}$	$\frac{11.6-12.6}{12.1}$
<i>io</i>	$\frac{27.5-30.4}{28.9}$	29.2	33.9	$\frac{28.9-30.2}{29.5}$	$\frac{29.3-34.7}{29.5}$	$\frac{29.8-33.7}{31.6}$
<i>hc</i>	$\frac{35.6-38.2}{37.2}$	40.1	52.2	$\frac{36.6-40.7}{38.4}$	$\frac{44.4-54.9}{48.8}$	$\frac{50.0-57.6}{52.7}$

Примечание. G-1 – крупные экземпляры русского осетра, обозначения остальных форм как в табл. 2. Обозначения признаков: *TL* – общая длина тела, *Lsl* – число жучек бокового ряда слева; *Dsc* – число жучек спинного ряда; *spbr* – число жаберных тычинок; *a* – длина рыла, *aB* – расстояние от конца рыла до усиков, *wM* – ширина рта, *lB* – длина наружного (самого длинного) усика, *o* – горизонтальный диаметр глаза, *io* – межглазничное расстояние, *hc* – высота головы у затылка (перед первой спинной жучкой); *n* – число экземпляров.

литературы (Берг, 1948; Holčík, 1989); 3) семь морфометрических признаков (табл. 3), ранее обнаруживших наибольшую разрешающую способность для разделения выборок этих видов (Vasil'eva, 2004; Birstein et al., 2005).

Поскольку из-за отсутствия яйцеклеток сибирского осетра обычное потомство этого вида в данном исследовании получено не было, для сравнительного анализа использовали данные по 12-месячной молоди из экспериментальных исследований 1999 г. (Васильева и др., 2001); несколько экземпляров рыб старшего возраста и больших размеров (табл. 3) из коллекции Зоологического музея МГУ использовали для выяснения характера размерной изменчивости характеристик, применявшихся в сравнительном морфологическом анализе.

Количество изученного материала представлено в табл. 2, 3. По всем признакам рассчитывали среднее значение в выборках родительских видов и истинных гибридов. Для сравнительной оценки степени сходства гибридных форм с родительскими видами определяли гибридный индекс по формуле, предложенной Веригиным и Макеевой (Веригин, Макеева, 1972):  $HI = [100(M_h - M_f)/(M_m - M_f) - 50] \times 2$ , где  $M_h$  – среднее значение признака у гибридной формы (в случае андрогенетических особей – индивидуальное значение признака),  $M_f$  – среднее его значение у материнского вида,  $M_m$  – у отцовского. При отрицательных значениях индекса гибридные особи уклоняются в сторону материнского вида, при положительных – в сторону отцовского.



**Таблица 4.** Результаты опыта (число и % выживших экземпляров на разных стадиях развития) по получению диспермного андрогенеза у сибирского осетра с использованием криоконсервированной спермы

Вариант	Гастрюла		Нейрула		Нормальные личинки			Мальки (2 мес)	
	Шт.	%	Шт.	%	Шт.	% нейр	% гастр	Шт.	%
Криоконсервированная сперма:									
КГ	69	23.3	24	34.8	0	0.0	0.0	0	0.0
АД	153	23.5	18	11.8	6	33.3	3.9	4	66.7
КД	127	38.5	120	94.5	113	94.2	89.0	71	62.8
Нативная сперма:									
КГ	146	45.6	63	43.2	0	0.0	0.0	0	0.0
АД	175	44.9	46	26.3	15	32.6	8.6	9	60.0
КД	181	81.2	167	92.3	156	93.4	86.2	103	66.0

Примечания. АД – диплоидный андрогенез (зародышей подвергали тепловому шоку 37°C, 2.0 мин). КГ – контроль гаплоидный (андрогенетических зародышей тепловому шоку не подвергали). КД – контроль диплоидный (использовали необлученные яйцеклетки).

#### *Определение половой принадлежности андрогенетических особей*

Из выращенных до 15 мес возраста рыб (см. раздел *Морфологический анализ*) в исследовании по определению пола были использованы две андрогенетические особи (А1 и А2) и по две особи из контрольных потомств сибирского осетра и истинных гибридов сибирского и русского осетров. После вскрытия рыб (применяли анестетик MS-222), гонады были извлечены и исследованы вначале макроскопически, а затем с помощью гистологического анализа. Яичники идентифицировали по наличию характерной борозды, разделяющей гонаду на две лопасти, и уплощенной форме, семенники – по однолопастной структуре (борозда отсутствует) и треугольной или округлой в сечении форме.

Далее для гистологического анализа гонады фиксировали в жидкости Буэна. Препараты готовили по традиционной методике (Ромейс, 1953). Использовали проводку по спиртам повышающейся крепости и смесям этилового спирта с бутанолом. Поперечные срезы гонад толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином по Эрлиху с докраской эозином. Анализ и фотографирование препаратов проводили с помощью системы BIOSONIC (микроскоп Leica DMLS с насадкой – автоматической видеокамерой Leica DC100, персональный компьютер Intel, специальное программное обеспечение для обработки видеоизображений DC Viewer, ImageJ).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

##### *Результаты экспериментов по получению андрогенетических потомств с использованием криоконсервированной спермы*

##### *1. Получение андрогенетического потомства сибирского осетра*

В параллельных вариантах опыта использовали свежемороженную и нативную сперму, полученную от одних и тех же самцов сибирского осетра. Нативной и размороженной спермой осеменяли облученную икру от трех самок сибирского осетра. Опыт был проведен в 2006 г. в самом конце нерестовой кампании, что, по-видимому, обусловило низкое качество спермы. После оттаивания замороженных спермиев их подвижность составила только 25%.

Результаты опыта представлены в таблице 4. Процент живых эмбрионов на стадии гастрюлы отражает успешность осеменения и выживаемость эмбрионов после шока. Из таблицы видно, что в данном опыте гибели эмбрионов после шока практически не наблюдалось (доли живых эмбрионов на стадии гастрюлы в вариантах КГ и АД одинаковы). Такая картина, типичная при использовании яйцеклеток диких рыб, при использовании самок, содержащихся в условиях искусственного выращивания, наблюдалась нами впервые.

Применение теплового шока приводило к получению нормальных жизнеспособных личинок как в вариантах с использованием нативной, так и криоконсервированной спермы сибирского осетра (см. табл. 4). В вариантах же без тепловой обработки бы-

**Таблица 5.** Результаты опыта (число и % выживших экземпляров на разных стадиях развития) по получению андрогенетических гибридов между сибирским и русским осетрами с использованием криоконсервированной спермы

Вариант	Гастроула		Обособл. хвоста		Нормальные личинки		Мальки 2 мес	
	Шт.	%	Шт.	%	Шт.	%	Шт.	%
Криоконсервированная сперма:								
КГ	108	77.7	78	72.2	0	0.0	0	0.0
АД	230	13.1	180	78.3	34	14.8	10	29.4
КД	36	13.9	36	100.0	36	100.0	36	100
Нативная сперма:								
КГ	57	45.6	41	71.9	0	0.0	0	0.0
АД	99	12.2	86	86.9	11	11.1	4	36.4
КД	40	10.7	36	90.0	33	82.5	33	100

Сокращения как в табл. 4.

ли получены нежизнеспособные гаплоидные зародыши и предличинки. Таким образом, нами был получен диспермный андрогенез у сибирского осетра, в том числе, впервые с использованием криоконсервированной спермы.

В данном опыте криоконсервация спермы приводила к снижению выживаемости гаплоидных и диплоидных андрогенетических эмбрионов на ранних стадиях (до нейрулы). Однако в дальнейшем выживаемость андрогенетических эмбрионов и личинок, полученных с использованием криоконсервированной и нативной спермы, была сходной. Выживаемость же контрольных зародышей (КД), развивавшихся из замороженной и нативной спермы, в данном опыте была одинаковой. В 2007 г. был проведен аналогичный опыт на сибирском осетре, в котором были получены сходные результаты.

## 2. Получение андрогенетических гибридов между сибирским и русским осетрами

При проведении опыта мы располагали яйцеклетками сибирского осетра и замороженной спермой русского осетра и нативной спермой сибирского осетра. Таким образом, сопоставление выживаемости эмбрионов в вариантах с замороженной и нативной спермой в данном опыте можно проводить с определенной степенью условности. Результаты опыта представлены в таблице 5.

Как видно из таблицы, выживаемость гаплоидных и диплоидных андрогенетических эмбрионов, а также личинок и мальков в вариантах с замороженной и нативной спермой была приблизительно одинаковой. Таким образом, отрицательного влияния криоконсервации спермы на выживаемость андрогенетического потомства в данном случае не наблюдалось.

### Микросателлитный анализ

Микросателлитный анализ, выполненный на материале опыта 2007 г. на сибирском осетре, вы-

явил неожиданный результат. Хотя для получения андрогенетического потомства в этом опыте была использована смесь спермы трех самцов (рабочие номера 2, 4 и 6), анализ микросателлитных локусов Afug 41 и An20 показал, что оплодотворяли яйцеклетки только спермией самца № 6 (табл. 6). Тем не менее, полученные в этом опыте андрогенетические потомства оказались вполне жизнеспособны как при использовании нативной, так и криоконсервированной спермы (см. результаты выше).

Сходный аллельный состав по локусам Afug 41 и An20 у самки и самца № 6 не позволил сделать заключение о полноте генетической инактивации яйцеклеток в данном опыте. Однако анализ по другому локусу, AoxD161, подтвердил отсутствие материнских аллелей у андрогенетических потомков (рис. 2). Как видно из рисунка, в геноме у опытных особей присутствуют только аллели, характерные для самца, в то время как у контрольного потомства присутствуют как отцовские, так и материнские аллели.

Также был проведен анализ микросателлитной ДНК андрогенетических гибридов между сибирским и русским осетрами, полученных с использованием криоконсервированной спермы (возраст рыб – 3 мес). В соответствии с результатами этого анализа 3 из 8 андрогенетических гибридов оказались гетерозиготными хотя бы по одному из исследованных микросателлитных локусов AfuG41 и AoxD165 (рис. 3). В контрольном потомстве гетерозиготными по тем же локусам оказались 7 из 11 изученных особей (данные анализа не приводятся).

### Морфологический анализ

По всем использовавшимся в анализе краниологическим индексам выборки одноразмерных особей родительских видов различались с хиатусом. Значения этих признаков у андрогенетического ядерно-цитоплазматического гибрида (A2) в большинстве случаев укладывались в диапазон изменчивости потомства отцовского вида, и только по двум индексам

**Таблица 6.** Аллельный состав (выражен в числовых эквивалентах) локусов Afug 41 и An20 у родителей, в контрольном и андрогенетическом потомстве сибирского осетра

Название образца	Afug 41						An20			
	193	209	213	245	249	147	155	159	163	167
самка	193	209	213				155	159		167
самец 2	193		213	245	249	147	155	159		
самец 4	193			245				159		
самец 6	193	209		225				159	163	167
контр.н.1		209	213	225			155	159		167
контр.н.2	193	209		225				159		167
контр.н.3	193	209		225				159		167
контр.н.4	193	209	213	225				159		167
контр.н.5	193	209		225				159		167
контр.н.6		209	213	225			155	159		167
контр.к.1	193	209	213				155	159		167
контр.к.2	193	209						159		167
контр.к.3	193	209	213					159		167
контр.к.4		209	213	225				159		167
контр.к.5	193	209		225			155	159		167
андрог.н.1	193	209						159		167
андрог.н.2		209		225				159		167
андрог.н.3	193	209						159		167
андрог.н.4		209		225				159		167
андрог.к.1	193	209						159		167
андрог.к.2		209		225				159		167

Сокращения: н. — нативная сперма; к. — криоконсервированная сперма.

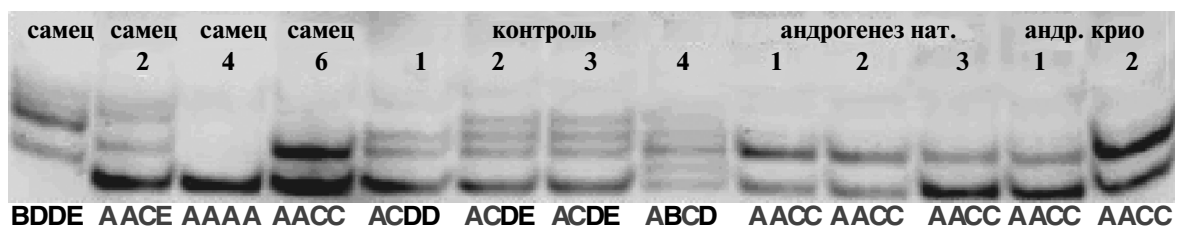
сам, определяющим положение усиков ( $B/B_1$ ,  $B/Ri$ ), наблюдалось небольшое смещение значений в сторону материнского вида (табл. 2). Рассчитанные гибридные индексы во всех случаях демонстрировали сходство с отцовским видом — русским осетром (табл. 7). В то же время андрогенетический сибирский осетр (A1) обнаруживал наибольшее сходство с контрольной молодеью сибирского осетра, а у истинных гибридов сибирского осетра с русским наблю-

далась матроклиния или промежуточное наследование краниологических индексов (табл. 2, 7).

По форме жаберных тычинок андрогенетический гибрид A2 (рис. 4б) был неотличим от русского осетра (рис. 4в), имея простые утолщенные жаберные тычинки, а не так называемые “веерообразные”, как у материнского вида (рис. 3а) или андрогенетического сибирского осетра A1. Простые, не “веерообразные” жаберные тычинки имели также и истинные гибриды, по-видимому, эта форма соответствует доминантному состоянию признака.

Среди 10 изученных морфометрических признаков хиатус между значениями в потомствах родительских видов наблюдался лишь в пяти случаях (*Lsc*, *spbr*, *a*, *aB*, *hc*), а остальные признаки обнаруживали ту или иную степень перекрытия (табл. 3). Андрогенетический ядерно-цитоплазматический гибрид (A2) по всем упомянутым пяти признакам был сходен с отцовским видом, а андрогенетический сибирский осетр (A1) — с сибирским осетром; истинные гибриды характеризовались промежуточным наследованием со сдвигом либо в сторону отцовского (*Lsc*, *spbr*), либо материнского (*a*, *aB*, *hc*) видов (табл. 3, 8). Аналогичная ситуация наблюдалась и по двум признакам (*Dsc*, *io*), обнаруживающим перекрытие в потомствах сибирского и русского осетров (табл. 3, 8). Среди остальных морфометрических характеристик по относительной ширине рта ( $wM$ ) андрогенетический гибрид A2 и истинные гибриды были сходны с материнским видом и, соответственно, андрогенетическим сибирским осетром, а по длине наружных (самых длинных) усиков (*IB*) и величине горизонтального диаметра глаза (*o*) андрогенетический гибрид A2 был сходен с материнским видом и андрогенетическим сибирским осетром, тогда как истинные гибриды уклонялись в сторону отцовского вида (табл. 3, 8).

Сравнительный анализ крупных и мелких особей из потомства русского осетра показал, что большинство анализируемых морфометрических признаков обнаруживают значительную размерную изменчивость; к числу признаков, не подверженных размерной изменчивости, можно отнести лишь три характеристики: *Lsc*, *Dsc*, *io*. Выявленное на основе рассчитанного гибридного индекса большее сходство



**Рис. 2.** Наследование материнских и отцовских аллелей локуса AoxD161 в контрольном и андрогенетическом потомстве сибирского осетра *Acipenser baerii*.

Примечание. Латинские буквы А, В, С, D, Е соответствуют аллелям различного размера.

андрогенетического гибрида А2 с сибирским осетром по относительной ширине рта ( $wM$ ) следует считать следствием размерной изменчивости данного признака у русского осетра (уменьшается по мере роста) и более крупными размерами особи А2 в сравнении с 12-месячным потомством русского осетра (табл. 3). Этот вывод соответствует данным Бириштейна с соавторами (Birstein et al., 2005), получившими “высокое дифференцирующее значение” относительной ширины рта на выборках сибирского и русского осетров, отличающихся по средней длине тела. В то же время, в противоположность ситуации с относительной шириной рта, большее сходство андрогенетического гибрида А2 с потомством сибирского осетра по относительной длине усиков и диаметру глаза, несмотря на размерную изменчивость этих характеристик, не могут быть объяснены лишь различиями в размерах особей разного происхождения. Совершенно очевидно, что в этих случаях у андрогенетического гибрида А2 наблюдается матроклиния, не выраженная у истинных 15-месячных гибридов сибирского и русского осетров.

#### Определение половой принадлежности андрогенетических особей

Уже макроскопический анализ при вскрытии позволил определить пол у всех рыб. Обе контрольные особи сибирского осетра оказались самками. Среди контрольных истинных гибридов сибирский осетр × русский осетр одна особь оказалась самкой, а другая — самцом. Из андрогенетических рыб особь А1 была идентифицирована как самка, а А2 — как самец. Последующий гистологический анализ подтвердил эти данные (рис. 5).

Изучение гистологических препаратов показало, что гонада андрогенетической самки А1 развивалась неравномерно. В некоторых участках гонады присутствовали группы (“гнезда”) оогоний в процессе перехода к ооцитам (стадии прелептонемы и лептонемы). В этих участках гонады практически отсутствовала жировая ткань. Однако достаточно большая часть гонады четко подразделялась на жировую и генеративно-соматическую ткань. В центре генеративно-соматической части наблюдались обособленные группы клеток вытянутой формы с овальными ядрами, окруженные соединительнотканн-

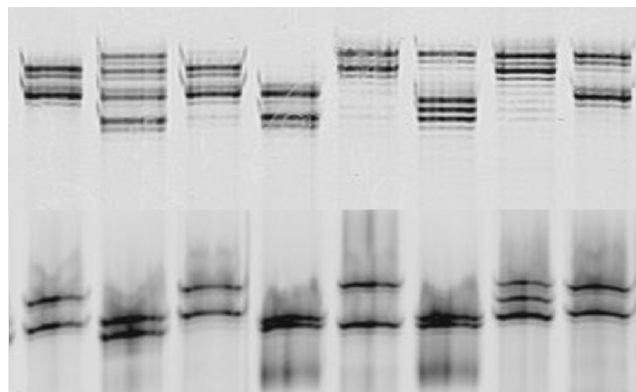


Рис. 3. Электрофореграммы продуктов амплификации по локусам AfuG41 (вверху) и AoxD165 (внизу) у андрогенетических гибридов между сибирским *Acipenser baerii* и русским *A. gueldenstaedtii* осетрами.

Гетерозиготы имеют три или четыре полосы.

ми септами. Среди этих клеток встречались недифференцированные гонии и единично первичные половые клетки.

В яичниках у двух контрольных самок (одна самка из потомства сибирского осетра и одна — гибридная самка) были полностью сформированы яйцеклеточные пластинки и присутствовали ооциты периода протоплазматического роста. В гонадах третьей контрольной самки (сибирский осетр), значительно отстававшей в развитии, гаметогенез только начался, гонии находились в процессе активного митотического деления и еще не были дифференцированы в оогонии.

Андрогенетический гибрид сибирского и русского осетров (А2) имел гонаду, развивающуюся по типу семенника. В гонаде присутствовало много жировой ткани, были хорошо развиты кровеносные сосуды, гонии интенсивно митотически размножались. Наблюдалось распространение гоний с периферической (герминативный эпителий) в центральную часть гонады, также были видны обособленные скопления гоний, свидетельствующие о формировании семенных ампул. Гонада самца из контрольного варианта опыта (обычный гибрид сибирского и русского осетров) характеризовалась теми же особенностями развития.

Таким образом, проведенный гистологический анализ позволяет сделать заключение о том, что раз-

Таблица 7. Гибридные индексы (НИ) краниологических характеристик у экспериментальной молодежи осетровых

Признаки Формы	$Ri/D$	$Mr/D$	$Fds/Ri$	$Pds/Ri$	$W/Ri$	$B/B_1$	$B/Ri$
A2	85.2	220.0	100.7	240.0	108.3	1.90	3.78
A1	-70.4	-167.7	-136.9	-97.7	-67.9	-168.3	-168.1
B × G	-40.7	-78.5	-59.7	-50.2	-69.1	-94.5	-80.5

Примечание. Обозначения форм и признаков как в табл. 2.

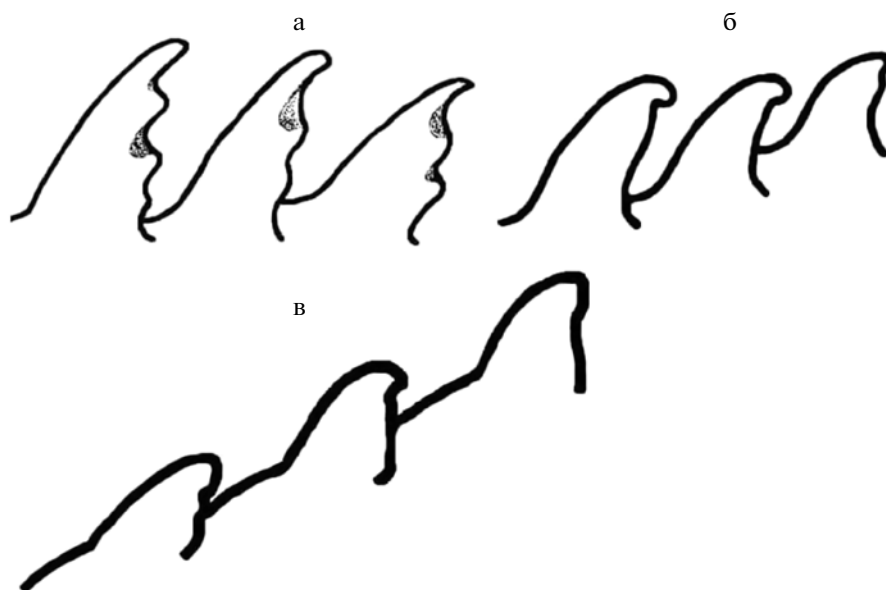


Рис. 4. Строение жаберных тычинок у сибирского осетра (а), андрогенетического гибрида сибирского и русского осетров (б) и русского осетра (в).

витие гонад у андрогенетических осетров протекало нормально.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Итак, в настоящем исследовании впервые с использованием криоконсервированной спермы получены андрогенетическое потомство сибирского осетра и андрогенетические ядерно-цитоплазматические гибриды у осетровых рыб. Ранее успех в этом направлении исследований был достигнут нами на североюге (*A. stellatus*) (Grunina et. al., 2006).

Полученные в настоящем исследовании с использованием яйцеклеток сибирского осетра и глубоководной замороженной спермы русского осетра (срок хранения спермы – 2 года) андрогенетические гибриды оказались полностью жизнеспособны. Результаты этого исследования указывают на возможность восстановления исчезающих видов осетровых рыб с помощью андрогенеза, в случае, если сохранилась исключительно их криоконсервированная сперма. Ранее, с использованием нативной спермы, нами были получены андрогенетические гибриды между русским и сибирским осетрами, которые так-

же были жизнеспособны. Однако не всегда андрогенетические гибриды от реципрокных скрещиваний жизнеспособны в равной степени (Грунина, Рекуратский, 2005).

Жизнеспособность полученных в данном исследовании андрогенетических потомств обусловлена использованием для их получения метода диспермного андрогенеза, обеспечивающего гетерозиготность андрогенетических особей. Следует отметить, что полученные с помощью диспермного андрогенеза с использованием спермы от одного самца сибирского осетра (см. результаты) и возникшие в результате слияния ядер его спермиев андрогенетические потомства (коэффициент инбридинга – 0,5, как при самооплодотворении) также демонстрировали нормальную выживаемость. При альтернативном способе индукции диплоидного андрогенеза – за счет блокирования первого деления дробления (митотический андрогенез), андрогенетические особи у осетровых рыб нежизнеспособны из-за их повышенной чувствительности к возникающей при этом полной гомозиготности (коэффициент инбридинга равен 1).

Таблица 8. Гибридные индексы (HI) морфометрических характеристик у экспериментальной молодежи осетровых

Признаки Формы	<i>Lsc</i>	<i>Dsc</i>	<i>spbr</i>	<i>a</i>	<i>aB</i>	<i>wM</i>	<i>lB</i>	<i>o</i>	<i>io</i>	<i>hc</i>
A2	17.7	277.7	3.9	84.4	37.8	-176.5	-158.8	-177.4	222.6	158.6
A1	-139.2	-388.9	-100.0	-244.0	-129.7	-164.7	-100.0	-235.5	-80.7	-50.0
B × G	27.5	-100.0	48.1	-228.0	-68.9	-188.2	45.1	16.1	-61.3	-79.3

Примечание. Обозначения форм и признаков как в табл. 3.

Наблюдаемая нами в опыте на сибирском осетре пониженная выживаемость андрогенетических потомств на ранних стадиях при использовании криоконсервированной спермы, по всей видимости, связана с возникновением в спермиях доминантных и/или рецессивных леталей вследствие заморозки. Однако эти мутации реализовались до стадии нейрулы и в дальнейшем выживаемость андрогенетических эмбрионов и личинок, полученных с использованием криоконсервированной и нативной спермы была сходной. Таким образом, использование метода андрогенеза в данном опыте позволило выявить повреждения, возникающие в спермиях при замораживании и оттаивании. На уровне обычного скрещивания эти повреждения не проявлялись (см. результаты в КД), поскольку компенсировались работой второго (материнского) генома. В опыте же по получению андрогенетических гибридов процессы замораживания и оттаивания не привнесли существенных повреждений в наследственный аппарат спермиев, на что указывает сходная выживаемость андрогенетических эмбрионов, полученных из нативной и криоконсервированной спермы (см. результаты).

В данном исследовании нам впервые удалось с помощью анализа микросателлитной ДНК подтвердить чисто отцовскую наследственность андрогенетического потомства осетровых рыб. У особей в потомстве сибирского осетра, полученного с помощью диспермного андрогенеза, отсутствовали материнские аллели по одному из исследованных локусов (AoxD161), что указывает на инактивацию женского ядра. Кроме того, среди полученных андрогенетических гибридов были выявлены гетерозиготы по некоторым локусам (AfuG41 и AoxD165), что подтверждает диспермную природу андрогенеза. Ранее диспермный характер андрогенеза у осетровых рыб был доказан нами с помощью RAPD-PCR анализа андрогенетических особей, при получении которых использовали смесь спермы разных видов (Грунина, Рекубратский, 2005).

Для идентификации андрогенетических ядерно-цитоплазматических гибридов между сибирским и русским осетрами в данном исследовании успешно использовался сравнительный морфологический анализ. По всем краниологическим индексам и большинству морфометрических характеристик 15-месячный андрогенетический ядерно-цитоплазматический гибрид А2 обнаруживал полное морфологическое сходство с отцовским видом, отличаясь даже визуально от одновозрастной молодежи материнского вида, истинных гибридов и андрогенетической особи сибирского осетра А1 (см. рис. 1). На основании этих данных можно сделать вывод о полной инактивации материнского генома у данной особи и подтверждении правильности ее определения как андрогенетического ядерно-цитоплазматического гибрида. Этому выводу не противоречат данные по выявленной матроклинии в случае двух

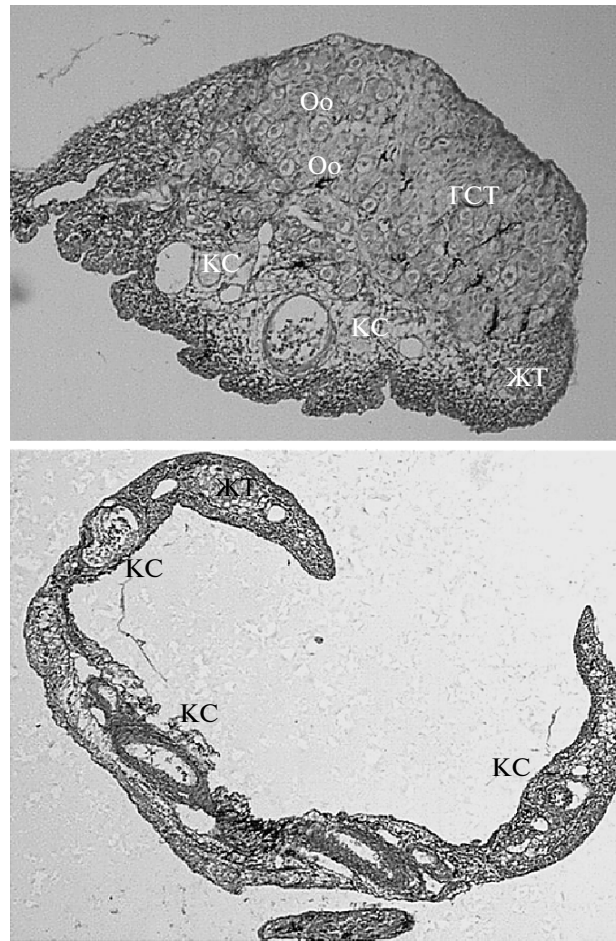


Рис. 5. Гонада особей А1 (вверху) и А2 (внизу).

Оо — оогонии, ЖТ — жировая ткань, ГСТ — генеративно-соматическая ткань, КС — кровеносные сосуды. Увеличение  $\times 10$ .

морфометрических характеристик: длина усиков и диаметр глаза.

Ранее у разных вариантов андрогенетических ядерно-цитоплазматических гибридов было выявлено проявление матроклинии по отдельным признакам, формирующимся в постларвальном онтогенезе, вплоть до возраста 1 года или даже трех лет (Васильева и др., 2001, 2005). При этом в случае андрогенетических ядерно-цитоплазматических гибридов персидского *Acipenser persicus* и русского осетров, как и в данном случае с андрогенетическим гибридом сибирского и русского осетров, была выявлена задержка в становлении отцовских признаков у андрогенетических гибридов по сравнению с гибридами истинными, что объяснялось как следствие проявления несовместимости между чужеродным ядром и цитоплазмой (Васильева и др., 2001). Этот феномен не был выявлен в случае андрогенетических гибридов севрюги *A. stellatus* и белуги *A. huso* (Васильева и др., 2005), которые, согласно современным генетическим данным, являются достаточно близкими видами, но, очевидно, не более

близкородственными, чем сибирский и русский осетры (Ludwig et al., 2001; Robles et al., 2004; Krieger et al., 2008). Вполне возможно, что феномен задержки становления отцовского состояния некоторых морфологических признаков у андрогенетических гибридов, полученных с использованием спермы русского осетра, связан с особенностями постларвального онтогенеза этого вида.

В данном исследовании впервые определена половая принадлежность у выращенных андрогенетических осетров. Две исследованных особи — андрогенетический сибирский осетр и андрогенетический гибрид между сибирским и русским осетрами были идентифицированы соответственно как самка и самец. Полученное нами гиногенетическое потомство сибирского осетра также включало как самок, так и самцов (неопубликованные данные). Это свидетельствует о том, что для этих видов характерен одновременно и мужской и женский тип гетерогаметности. Полученные данные не противоречат современным представлениям о механизмах определения пола у тетраплоидных видов осетровых рыб (Vasil'eva et al., 2009), к которым принадлежат и исследованные нами рыбы (Васильев, 1985). Несмотря на малое количество исследованных особей, обнаружение самки в андрогенетическом потомстве заслуживает особого внимания в связи с проблемой регуляции пола у осетровых рыб и возможностью получения с помощью андрогенеза бисексуального потомства.

В целом, результаты настоящей работы подтверждают возможность применения метода диспермного андрогенеза в сочетании с использованием криоконсервированной спермы для воссоздания генофондов исчезающих популяций и видов осетровых рыб.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Васильев В.П. Эволюционная кариология рыб. М.: Наука, 1985. 301 с.
- Берг Л.С. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран. Ч. 1. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1948. 466 с.
- Васильева Е.Д., Грунина А.С., Рекубратский А.В. Характер проявления некоторых морфологических признаков у андрогенетических ядерно-цитоплазматических гибридов персидского *Acipenser persicus* и русского *A. gueldenstaedtii* осетров в постларвальном онтогенезе // Вопросы ихтиологии. 2001. Т. 41. № 4. С. 530–537.
- Васильева Е.Д., Грунина А.С., Рекубратский А.В., Павлинов И.Я. Характер проявления некоторых морфологических признаков у андрогенетических ядерно-цитоплазматических гибридов севрюги (*Acipenser stellatus*) и белуги (*Huso huso*) (Acipenseridae) в постларвальном онтогенезе // Вопросы ихтиологии. 2005. Т. 45. № 4. С. 525–538.
- Веригин Б.В., Макеева А.П. Гибридизация карпа с пестрым толстолобиком // Генетика. 1972. Т. 8. № 7. С. 55–64.
- Гинзбург А.С. Оплодотворение у рыб и проблема полиспермии. М.: Наука, 1968. 357 с.
- Грунина А.С., Гомельский Б.И., Нейфах А.А. Диплоидный андрогенез у карпа // Генетика. 1990. Т. 26. № 11. С. 2037–2043.
- Грунина А.С., Нейфах А.А. Индукция диплоидного андрогенеза у сибирского осетра *Acipenser baeri* Brandt // Онтогенез. 1991. Т. 22. № 1. С. 53–56.
- Грунина А.С., Рекубратский А.В. Индуцированный андрогенез у рыб: получение жизнеспособных ядерно-цитоплазматических гибридов // Там же. 2005. Т. 36. № 4. С. 254–264.
- Ромейс Б. Микроскопическая техника. М.: Иностранная литература, 1953. 719 с.
- Birstein, V.J., Bemis, W.E., Waldman, J.R. The threatened status of acipenseriform fishes: a summary. In: Sturgeon Biodiversity and Conservation. Eds: Birstein, V.J., Waldman, J.R., Bemis, W.E., Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1997. pp. 427–444.
- Birstein V.J., Ruban G.I., Ludwig A., Doukakis P., DeSalle R. The enigmatic Caspian Sea Russian sturgeon: how many cryptic forms does it contain? // Systematics and Biodiversity 2005. V. 3. № 2. P. 203–218.
- Blin N., Stafford D.W. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes // Nucleic Acids Res. 1976, September; V. 3. № 9. P. 2303–2308.
- Corley-Smith G.E., Brandhorst B.P. Preservation of endangered species and populations: a role for genome banking, somatic cell cloning, and androgenesis? // Mol. Reprod. Develop. 1999. V. 53. P. 363–367.
- Detlaff T.A., Ginsburg A.S., Schmalhausen O.I. Sturgeon Fishes. Developmental Biology and Aquaculture. Berlin: Springer-Verlag, 1993. 300 p.
- Elvira B., Almodovar A. Morphology and taxonomy of the Atlantic sturgeon, *Acipenser sturio* from Spain // Folia Zoologica. 2000. V. 49. P. 221–230.
- Gröger J., Debus L. Morphometric comparison of *Acipenser sturio* L. populations based on mixed estimation and morphometric measurements // Arch. Fish Mar. Res. 2000. V. 48. № 2. P. 175–193.
- Grunina A.S., Neyfakh A.A. Induced diploid androgenesis // Physiol. Gen. Biol. Rev. 1997. V. 12. P. 73–103.
- Grunina A.S., Recoubratsky A.V., Neyfakh A.A. Induced diploid androgenesis in sturgeons // The Sturgeon Quart. 1995. V. 3. № 3. P. 6–7.
- Grunina A.S., Recoubratsky A.V., Tsvetkova L.I., Barmintsev V.A. Investigation on dispermic androgenesis in sturgeon fish. The first successful production of androgenetic sturgeons with cryopreserved sperm // Int. J. Refrigeration. 2006. V. 29. № 3. P. 379–386.
- Grunina A.S., Recoubratsky A.V., Barmintsev V.A., Vasil'eva E.D., Chebanov M.S. Dispermic androgenesis as a method for recovery of endangered sturgeon species // Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons. Fish and Fisheries Series. V. 29. Carmona R., Domezain A., Garcia-Gallego M., Hernando J.A., Rodriguez F., Ruiz-Rejo'n M. (eds.). Netherlands: Springer. 2009. P. 191–208.
- Henderson-Arzapalo A., King T.L. Novel microsatellite markers for Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) population delineation and broodstock management // Mol. Ecol. Notes. 2002. № 2. pp. 437–439.

- Holčik J.* (editor) 1989. The Freshwater Fishes of Europe. 1. Pt. 2. Wiesbaden: AULA-Verlag. 469 p.
- Krieger J., Hett A.K., Fuerst P.A., Artyukhin E., Ludwig A.* The molecular phylogeny of the order Acipenseriformes revisited // *J. Appl. Ichthyol.* 2008. V. 24 (Supplement 1). P. 36–45.
- Ludwig A., Belfiore N., Pitra C. et al.* Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*) // *Genetics.* 2001. V. 158. P. 1203–1215.
- Penman D.J., Myers J.M., McAndrew B.J.* Restoration of diploid genotypes by androgenesis // *Proc. Conf. "Refrigeration and Aquaculture"*. Bordeaux, 20–22 March. 1996. P. 469–474.
- Recoubratsky A.V., Grunina A.S., Minin A.A. et al.* Dispermic androgenesis in *Acipenser stellatus* // *Sturgeon Quart.* 1996. V. 4. N.4. P. 12–14.
- Suquet M., Dreanno C., Fauvel C. et al.* Cryopreservation of sperm in marine fish // *Aquaculture Res.* 2000. V. 31. P. 231–243.
- Tsvetkova L.I., Cosson J., Linhart O., Billard R.* Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeon, *Acipenser baeri* and *Acipenser ruthenus* // *Journal Applied Ichthyology.* 1996. V. 12. P. 407–412.
- Robles F., de la Herrán R., Ludwig A., Rejón G.R., Rejón M.R., Garrido-Ramos M.A.* Evolution of ancient satellite DNAs in sturgeon genomes // *Gene.* 2004. 338. P. 133–142.
- Vasil'eva E.D.* Some morphological characteristics of Acipenserid fishes: considerations of their variability and utility in taxonomy // *J. Appl. Ichthyol.* 1999. V. 15 (4–5). Proceedings of the 3rd Internat. Symposium on Sturgeon. Piacenza, Italy, July 8–11/1997. P. 32–34.
- Vasil'eva E.D.* Morphological data corroborating the assumption of independent origins within octoploid sturgeon species // *J. Ichthyology.* 2004. V. 44. Suppl. 1. P. 63–72.
- Vasil'eva E.D.* Morphological and morphometric characters in sturgeon taxonomy and phylogeny // *Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons. Fish and Fisheries Series.* V. 29. Carmona R., Domezain A., Garcia-Gallego M., Hernando J.A., Rodriguez F., Ruiz-Rejo'n M. (eds.). Netherlands: Springer. 2009. P. 51–61.
- Vasileva E.D., Grunina A.S., Recoubratsky A.V., Barmintsev V.A., Barmintseva A.E., Volkov A.A., Badrtidinov O.A., Kovalev K.V., Chebanov M.S., Vasilev V.P.* Genetic mechanisms of sex determination in sturgeons. Problems and perspectives // 6th International Symposium on Sturgeon, October 25–31, 2009 Wuhan, Hubei Province, China. Harmonizing the relationships between Human Activities and Nature: the Case of Sturgeons. Book of Abstracts. Oral Presentation. Wuhan. P. 86–88.
- Veprintsev B.N., Rott N.N.* Conserving genetic resources of animal species // *Nature.* 1979. V. 280. P. 633–634.
- Welsh A.B., Blumberg M., May B.* Identification of microsatellite loci in lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, and their variability in green sturgeon, *A. medirostris* // *Mol. Ecol. Notes.* 2003. № 3. pp. 47–55.
- Zane L., Patarnello T., Ludwig A., Fontana F., Congiu L.* Isolation and characterization of microsatellites in the Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) // *Mol. Ecol. Notes.* 2002. № 2. pp. 586–588.

## Dispermic Androgenesis in Sturgeons with the Help of Cryopreserved Sperm: Production of Androgenetic Hybrids between Siberian and Russian Sturgeons

A. S. Grunina<sup>a</sup>, A. V. Rekubratsky<sup>b</sup>, L. I. Tsvetkova<sup>b</sup>, A. E. Barmintseva<sup>c</sup>, E. D. Vasil'eva<sup>d</sup>, K. V. Kovalev<sup>b</sup>, and O. G. Polyektova<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia  
e-mail: asgrunina@gmail.com

<sup>b</sup> All-Russia Institute of Freshwater Fisheries, Rybnoe, Moscow oblast, 141821 Russia

<sup>c</sup> All-Russia Institute of Fisheries and Oceanography, ul. Verkhnyaya Krasnosel'skaya 17, Moscow, 107140 Russia

<sup>d</sup> Zoological Museum, Moscow State University, ul. Bol'shaya Nikitskaya 6, Moscow, 125009 Russia

**Abstract**—Dispermic androgenesis was used to produce, for the first time, an androgenetic progeny of the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and the androgenetic nuclear cytoplasmic hybrids (Siberian sturgeon, *A. baerii* × Russian sturgeon, *A. gueldenstaedtii*) using cryopreserved sperm. Microsatellite DNA analysis confirmed exclusively paternal inheritance in the androgenetic progeny of Siberian sturgeon. Heterozygotes for certain microsatellite loci were detected among the androgenetic hybrids, thereby confirming a dispermic nature of androgenesis. According to the data of comparative morphological analysis, the obtained androgenetic hybrid, by the age of 15 months old, was completely identical to the paternal species. Both a female and a male were detected in the androgenetic sturgeon progenies, which is of interest for producing bisexual progenies via androgenesis. The data of this study confirm the feasibility of dispermic androgenesis using cryopreserved sperm to preserve and recover the gene pools of endangered sturgeon species.

**Keywords:** dispermic androgenesis, sturgeons, cryopreserved sperm, microsatellite analysis, heterozygosity, androgenetic nuclear cytoplasmic hybrids, comparative morphological analysis, sex determination, histological analysis



УДК 575.164

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕНА *PINOID/ABRUPTUS* С ГЕНОМ *AGAMOUS* – НЕГАТИВНЫМ РЕГУЛЯТОРОМ ПРОЛИФЕРАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В МЕРИСТЕМЕ ЦВЕТКА *Arabidopsis thaliana*<sup>1</sup>

© 2011 г. У. Н. Кавай-оол<sup>1</sup>, О. Ю. Карпенко<sup>2</sup>, Т. А. Ежова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Тувинский государственный университет,  
Кафедра общей биологии, 667000 Кызыл  
e-mail: dr.urana@mail.ru

<sup>1</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Учреждение Российской Академии наук, 119991 Москва

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
Кафедра генетики, 119992 Москва  
e-mail: ezhova2001@mail.ru

Поступила в редакцию 07.05.10 г.  
Окончательный вариант получен 28.06.10 г.

Выявлено комплементарное взаимодействие гена *AGAMOUS* с геном *PINOID/ABRUPTUS*. У двойного мутанта *abr ag-1* наблюдается существенное усиление пролиферации клеток флоральной меристемы и образование ветвящихся побегоподобных цветков. Эти данные указывают на участие гена *PID/ABR* в ограничении пролиферации ствольных клеток флоральной меристемы. Выявленное в цветках мутанта *abr* повышение уровня транскрипции гена *WUS*, а также нарушение распределения ауксина, позволяют предполагать, что ген *PID/ABR*, контролируя транспорт ауксина, участвует в определении доменов экспрессии гена *WUS*.

**Ключевые слова:** развитие цветка, взаимодействие генов, ствольные клетки, транспорт ауксина, мутанты, *Arabidopsis thaliana*.

### ВВЕДЕНИЕ

Полярный транспорт ауксина является важнейшим фактором морфогенеза растений. Локальные изменения концентрации ауксина (повышенные или, наоборот, минимальные) определяют судьбу клеток на всем протяжении онтогенеза, начиная с самых ранних этапов эмбриогенеза. В исследованиях на модельном растении *Arabidopsis thaliana* (L.) Neuh. установлено, что в изменении концентрации ауксина в клетках важнейшую роль играют белки-транспортёры PIN, выносящие ауксин из клетки, и протеинкиназа PID (продукт гена *PID/ABR*), которая фосфорилирует белки PIN и обеспечивает возможность их полярной (ассиметричной) локализации на мембране клетки (Zhang et al., 2010). Градиент ауксина определяет апикально-базальную ось зародыша; высокие локальные концентрации ауксина маркируют положение развивающихся семядолей и гипофизиса, а на постэмбриональной стадии они определяют места положения латеральных органов и маркируют инициалы будущих

органов и сосудистых тканей (обзор Petrášek and Friml, 2009). Минимальные концентрации ауксина по краю плодolistиков маркируют участки разделительного слоя, по которым происходит вскрытие стручков *A. thaliana* (Sorefan et al., 2009). Недавно установлено, что в процессе соматического эмбриогенеза градиенты ауксина определяют место экспрессии гена *WUS* (Su et al., 2009), активность которого необходима для инициации и поддержания пула ствольных клеток (СК) в апикальной меристеме побега и флоральной меристеме *A. thaliana* (Laux et al., 1996).

В отличие от функционирующего на протяжении всего жизненного цикла пула СК в апикальной меристеме побега, пул СК во флоральной меристеме существует в растениях дикого типа лишь до появления зачатков репродуктивных органов цветка. Это связано с активностью гена *AG*, который не только обеспечивает развитие тычинок и плодolistиков, но и терминирует флоральную меристему, путем подавления в ней транскрипции гена *WUS* (Lenhard et al., 2001; Lohmann et al., 2001). Мутации в гене *AG* приводят к эктопической пролиферации СК во флоральной меристеме: у мутантов *ag* цветок образует многочисленные органы, причем вместо тычинок и пести-

<sup>1</sup> Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 10-04-00859-а) и федеральной целевой программой “Ведущие научные школы” (проект № НШ-3293.2010.4)

ков развиваются лепестки и чашелистики (Соен, Меуергоуитц, 1991). Задачей данной работы было изучение влияния мутации *abr*, нарушающей функцию гена *PID/ABR* (Ежова и др., 2000), на проявление мутации *ag-1*. Для решения этой задачи провели анализ фенотипа двойного мутанта *abr ag-1*, исследовали уровень транскрипции гена *WUS* в цветках мутанта *abr*, а также распределение ауксина в растениях *abr* с использованием химерной конструкции *DR5::GUS*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали растения, гомозиготные по температурочувствительной мутации *abr* (линия К-150 из коллекции кафедры генетики МГУ, полученная на основе расы Dijon-M), а также линию, содержащую мутацию *ag-1*, которая получена от трехкратного скрещивания мутации *ag-1* из линии CS25 (коллекция ABRC) с растениями расы Dijon-M. Для получения двойного мутанта *abr ag-1* скрещивали растения мутанта *abr*, выращенные при 23–25°C, с растениями, гетерозиготными по мутации *ag-1*.

Для выявления участков локализации свободного ауксина использовали линию трансгенных растений *A. thaliana DR5::GUS*, в геном которых включен репортерный ген  $\beta$ -глюкуронидазы *GUS* под контролем чувствительному к ауксину синтетического промотора *DR5* (Ulmasov et al., 1997). Путем скрещивания с растениями расы Dijon-M (линия К-1) и мутанта *abr* получены гомозиготы по нормальной и мутантной аллелям гена *ABR/PID* и трансгену *DR5::GUS*. Растения выращивали в асептических условиях при 16 ч фотопериоде и температуре 23–25°C. После достижения стадии цветения (4 недели от посадки), часть растений переносили в условия 27–29°C, где они росли еще одну неделю. Анализ активности репортерного гена проводили на растениях в возрасте 5 недель как описано ранее (Ву и др., 2008).

Уровень транскрипции *WUS* оценивали с помощью метода ПЦР продуктов обратной транскрипции РНК в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ). Для выделения РНК использовался RNA Easy KIT фирмы QIAGEN с дополнительной обработкой ДНКазой. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора cDNA Synthesis Kit (first strand) с 15T праймером (Silex, Russia). ПЦР-РВ проводили на приборе АНК-32 (Syntol, Russia). Для амплификации кДНК использовали следующие праймеры: для *WUS* CAGTCTTGTCCATAGATCCATAG и CTCATCTTTCCGAAGTGTCTCA; для референсного гена *EFL* TTGCTGTTGTAACAAGTGGATGC и AAGATTGGTGGTATTGGAACGG. Анализ проводили в 3-х повторностях.

Таблица. Особенности строения цветка у двойного мутанта *abr ag-1* и родительских линий *A. thaliana*

Генотип	Число ярусов на главной оси цветка	Число латеральных цветков
<i>abr</i>	1 ± 0	0
<i>ag-1</i>	4.6 ± 0.3	0.7 ± 0.1
<i>abr ag-1</i>	8.5 ± 1.8	4.1 ± 0.6

Примечание: анализировали базальные цветки растений 8-ми недельного возраста; для всех генотипов просмотрено по 25 цветков.

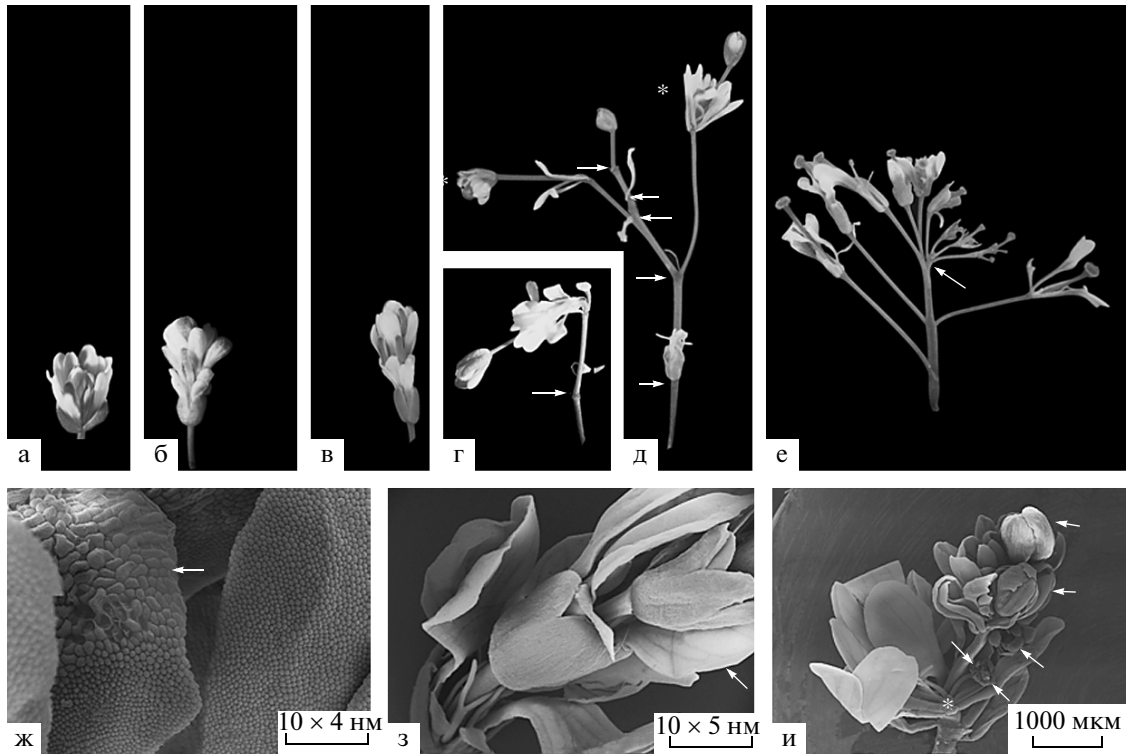
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как и у мутанта *ag-1*, цветки двойного мутанта не имели тычинок и пестиков и состояли только из органов околоцветника, число которых существенно превышало обычное число органов цветка из-за более продолжительной пролиферации флоральной меристемы (рис. 1а–д). На генетическом фоне расы Dijon-M мутация *ag-1* вызывает образование многоярусных цветков, что связано с тем, что после образования нескольких мутовок ось цветка удлиняется перед образованием новой мутовки чашелистиков и вновь начинает формировать органы цветка (рис. 1б). Число таких ярусов повышается с возрастом растения и достигает в базальных цветках мутанта *ag-1* в конце вегетации в среднем 3.6 (таблица). Цветки двойного мутанта *abr ag-1* пролиферируют еще дольше (рис. 1г, д), чего не наблюдается у мутанта *abr* (рис. 1е). Среднее число ярусов в цветке *abr ag-1* составляет 7.5 у растений 8-ми недельного возраста (таблица).

У мутанта *ag-1* и двойного мутанта часто встречались химерные органы, состоящие из тканей чашелистиков и лепестков (рис. 1ж). Лепестки у двойного мутанта были крупными и часто двухлопастными (рис. 1з), как и у мутанта *abr*.

В отличие от мутанта *ag-1*, цветки двойного мутанта ветвятся (рис. 1д). Среднее число латеральных цветков на один многоярусный цветок составляет 4.1 (таблица), в то время как у мутанта *ag-1* латеральные ветвления встречаются очень редко (0.7). Такой фенотип, свидетельствующий о комплементарном взаимодействии генов *ABR* и *AG*, можно объяснить выявленным в распустившихся цветках мутанта *abr* повышенным уровнем транскрипции гена *WUS* (рис. 2).

По-видимому, ген *ABR* в растениях дикого типа вместе с геном *AG* участвует в ограничении уровня экспрессии гена *WUS* и терминации флоральной меристемы. Отметим, что у одиночного мутанта *abr* также наблюдаются некоторые при-



**Рис. 1.** Морфология цветка мутантов *ag-1* (а, б), *abr* (е) и двойного мутанта *abr ag-1* (в–д, ж–и) *A. thaliana*:

а и б — цветки *ag-1*, состоящие из чашелистиков и лепестков (на рис. б видно появление нового яруса за счет растяжения оси цветка);

в–д — последовательные стадии развития цветка двойного мутанта; на рис. г стрелками отмечено положение частично или полностью опавших органов цветка нижних ярусов; на рис. д главная ось цветка имеет 6 ярусов, латеральные двухъярусные цветки отмечены звездочками;

е — верхушка соцветия мутанта *abr*, стрелкой отмечен фасциированный участок цветоноса;

ж–и — сканирующая электронная микроскопия;

ж — эпидермальные клетки органов цветка двойного мутанта; справа и слева — лепестки, в центре — химерный орган, нижняя часть которого состоит из типичных для лепестка клеток, а верхняя (стрелка) из крупных клеток, характерных для чашелистиков;

з — трехъярусный цветок двойного мутанта; видно удлинение оси цветка перед каждой новой мутовкой чашелистиков; стрелкой обозначен крупный лепесток;

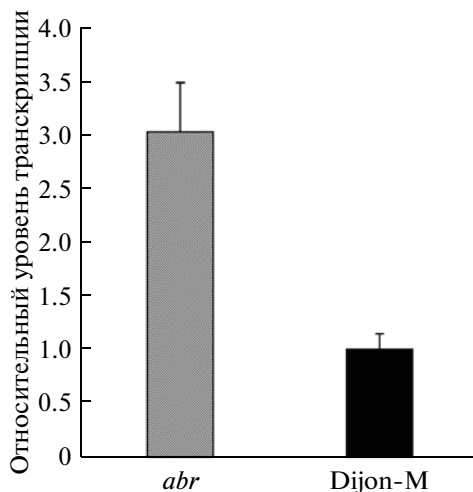
и — цветок двойного мутанта с пятью латеральными цветками (стрелки); верхняя часть главной оси удалена (отмечено звездочкой).

знаки, указывающие на эктопическую пролиферацию клеток как апикальной, так и флоральной меристем: фасциация цветоноса (у 12–40% растений мутанта *abr*, см. рис. 1е), длительный рост оси цветка и формирование гинофора (разрастание цветоложа между тычинками и пестиком), а также аномальное разрастание рыльцевых тканей. Влияние гена *PID/ABR* на экспрессию *WUS* может быть связано с установленной недавно (Su et al., 2009) важной ролью градиентов ауксина в определении пространственных особенностей экспрессии гена *WUS*.

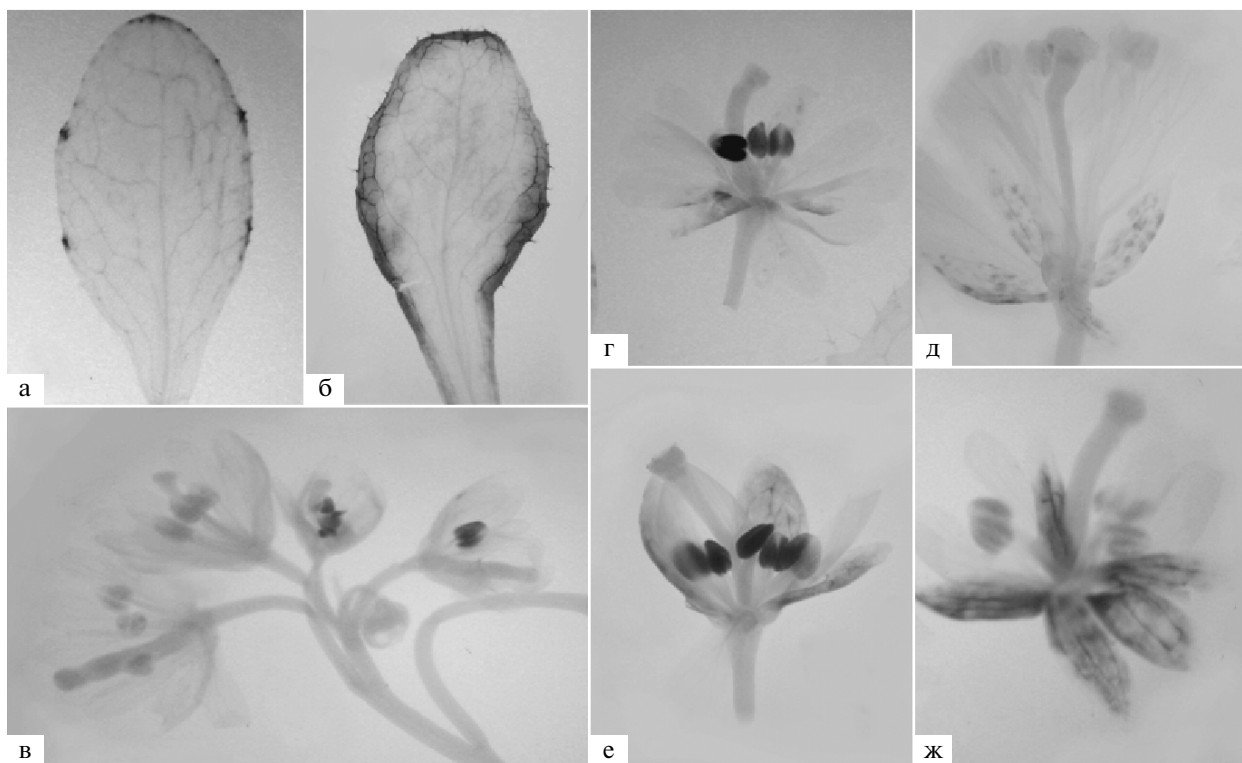
С использованием химерного гена *DR5::GUS* (Ulmasov et al., 1997) нами выявлены существенные аномалии в распределении ауксина по тканям растений мутанта *abr*. В отличие от растений дикого типа у мутанта ауксин накапливается по

всему краю листа (рис. 3а, б). В цветках ауксин накапливается не только в молодых пыльниках (как у исходной линии *DR5::GUS*, рис. 3в, г), но и в чашелистиках (рис. 3д).

При переносе растений на стадии начала цветения, выращенных при 23–25°C, в условия повышенной температуры (7 дней при 27–29°C), содержание ауксина в растениях исходной линии снижалось (данные не приводятся), а в растениях температурочувствительного мутанта *abr* существенно увеличивалось (рис. 3е, ж). Полученные данные подтверждают важную роль гена *PID/ABR* в регуляции полярного транспорта ауксина и позволяют предположить, что аномалии в распределении ауксина в растениях мутанта могут приводить к появлению новых участков экспрессии



**Рис. 2.** Сравнение уровня транскрипции гена *WUS* в цветках мутанта *abr* и растений дикого типа (раса Dijon-M). Уровень транскрипции гена *WUS* в растениях расы Dijon-M принят за единицу.



**Рис. 3.** Экспрессия трансгена *DR5::GUS* в листьях и цветках дикого типа (гомозиготы по нормальному аллелю гена *PID/ABR* – а, в) и мутанта *abr* (б, г–ж) *A. thaliana*:

а, б – листья розетки растений, выращенных при 23–25°C;

в – верхушка цветоноса растения дикого типа, выращенного при 23–25°C (видна экспрессия репортерного гена в пыльниках молодых цветков);

г, д – соответственно, молодой и зрелый цветки растений мутанта *abr*, выращенных при 23–25°C (в молодом цветке видна экспрессия репортерного гена в пыльниках; в зрелом цветке *DR5::GUS* экспрессируется в чашелистиках);

е, ж – соответственно, молодой и зрелый цветки растений мутанта *abr*, перенесенных в условия 27–29°C (в молодом цветке видна экспрессия трансгена в пыльниках и чашелистиках; в зрелом цветке экспрессия в чашелистиках усиливается, а в пыльниках сохраняется остаточная экспрессия).

*WUS* и эктопической пролиферации рядом расположенных клеток.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ву Х.Ч., Ондар У.Н., Солдатова О.П. Особенности проявления новых аллелей генов *AS1* и *AS2*, контролирующих морфогенез листа *Arabidopsis thaliana* // Онтогенез. 2008. Т. 39. № 1. С. 8–14.
- Ежова Т.А., Солдатова О.П., Калинина А.Ю., Медведев С.С. Взаимодействие генов *ABRUPTUS/PINOID* и *LEAFY* в процессе флорального морфогенеза у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Генетика. 2000. Т. 36. № 12. С. 1682–1687.
- Coen E.S., Meyerowitz E.M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development // Nature. 1991. V. 353. № 6339. P. 31–37.
- Laux T., Mayer K.F.X., Berger J., Jrgens G. The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis* // Development. 1996. V. 122. P. 87–96.
- Lenhard M., Bohnert A., Jurgens G., Laux T. Termination of stem cell maintenance in *Arabidopsis* floral meristems by interactions between *WUSCHEL* and *AGAMOUS* // Cell. 2001. V. 105. P. 805–814.
- Lohmann J.U., Hong R.L., Hobe M. et al. A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis* // Cell. 2001. V. 105. Issue 6. P. 793–803.
- Petrášek J. and Friml J. Auxin transport routes in plant development // Development. 2009. V. 136. P. 2675–2688.
- Sorefan K., Girin T., Liljegren S.J. et al. A regulated auxin minimum is required for seed dispersal in *Arabidopsis* // Nature. 2009. V. 459. P. 583–586.
- Su Y.H., Zhao X.Y., Liu Yu B. et al. Auxin-induced *WUS* expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis* // Plant Journal. 2009. V. 59. P. 448–460.
- Ulmasov T., Murfett J., Hagen G., Guilfoyle T.J. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements // Plant Cell. 1997. V. 9. P. 1963–1971.
- Zhang J., Nodzyn'ski T., Pěnc'ík A. et al. PIN phosphorylation is sufficient to mediate PIN polarity and direct auxin transport // PNAS. 2010. V. 107. № 2. P. 918–922.

### Interaction between the *PINOID/ABRUPTUS* Gene with the *AGAMOUS* Gene: the Negative Regulator of Stem Cells in the Meristem of *Arabidopsis thaliana* Flower

U. N. Kawai-ool<sup>a</sup>, O. Yu. Karpenko<sup>b</sup>, and T. A. Ezhova<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Tyva State University, Department of General Biology, ul. Lenina 36, Kyzyl, 667000 Russia

e-mail: dr.urana@mail.ru

<sup>a</sup> Vavilov Institute of General Genetics, ul. Gubkina 3, Moscow, 119991 Russia

<sup>b</sup> Moscow State University, Department of Genetics, Moscow, 119992 Russia

e-mail: ezhova2001@mail.ru

**Abstract**—Complementary interaction between the *AGAMOUS* and *PINOID/ABRUPTUS* genes was revealed. In double mutant *abr ag-1*, there is a significant increasing proliferation of cells of the floral meristem and formation of branching bine-like flowers. This data indicate the participation of the *PID/ABR* gene in limitation of proliferating stem cells of the floral meristem. The revealed increase of transcription level of *WUS* gene in flowers of the *abr* mutant, as well as distortion of auxin distribution, allows us to suggest that the *PID/ABR* gene controls auxin transport and participates in detection of expression domains for the *WUS* gene.

**Keywords:** flower development, gene interaction, stem cells, auxin transport, mutants, *Arabidopsis thaliana*

УДК 575.164

## **FIMBRIATA PETIOLES – ГЕН *Arabidopsis thaliana*, КОНТРОЛИРУЮЩИЙ ПРОЦЕССЫ ДЕЛЕНИЯ И РОСТА КЛЕТОК ОРГАНОВ ЦВЕТКА<sup>1</sup>**

© 2011 г. У. Н. Кавай-оол\*, Т. А. Ежова

\*Тувинский государственный университет,

Кафедра общей биологии, 667000 Кызыл, ул. Ленина, д. 36

\*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской Академии наук,

119991 Москва, ул. Губкина, д. 3

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

Кафедра генетики, 119992 Москва, Воробьевы горы, д. 1, стр. 12

e-mail: dr.urana@mail.ru

Поступила в редакцию 13.06.10 г.

Окончательный вариант получен 21.10.10 г.

У *Arabidopsis thaliana* с помощью химического мутагенеза получен новый мутант *fimbriata petioles* (*fip*), характеризующийся необычными аномалиями развития органов цветка. В дистальной области чашелистиков и лепестков наблюдается появление групп очень крупных клеток, создающих бахромчатость краев этих органов. На основании анализа морфологии органов цветка и листьев у двойного мутанта *fip as1* выявлено комплементарное взаимодействие генов *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*) и *FIMBRIATA PETIOLES* (*FIP*). Предполагается, что ген *FIP* вместе с геном *AS1* контролирует пролиферацию клеток, предотвращая преждевременную эндоредупликацию.

**Ключевые слова:** морфогенез растений, *Arabidopsis thaliana*, деления и рост клеток, развитие органов цветка.

Изучение генетического контроля развития цветка у *Arabidopsis thaliana* в последние годы позволило получить новые данные о генетических и молекулярных механизмах данного процесса. На основе анализа гомеозисных мутантов *apetala2*, *apetala3*, *pistillata*, *agamous*, была сформулирована классическая ABC-модель детерминации типа органов цветка (Coen, Meyerowitz, 1991), которая позже была дополнена новым классом E, представленным генами семейства *SEPALLATA* (*SEPI*, *SEP2*, *SEP3*, *SEP4*; обзор Krizek, Fletcher, 2005). Высококонсервативные гены ABCE-классов определяют тип органов цветка у большинства исследованных цветковых растений, но не существующее разнообразие их формы.

Сегодня внимание исследователей направлено на выявление генов, которые определяют особенности строения органов цветка (размер, форму). Эти особенности у растений не связаны с процессами миграции и апоптоза клеток, которые у живот-

ных играют ключевую роль в определении формы развивающегося органа, но являются результатом генетически запрограммированных изменений процессов пролиферации, растяжения и дифференцировки клеток как в самих примордиях органов, так и в участках флоральной меристемы, расположенных между органами. Показано, что у *Arabidopsis thaliana* гены *CUP-SHAPED COTYLEDONS1, 2* (*CUC1* и *CUC2*) и *PETAL LOSS* (*PTL*) нужны для формирования границ между органами и развития отдельных (не слитых) органов цветка путем подавления пролиферации клеток, расположенных между органами. При нарушении их функции у двойных мутантов *ptl cuc1* и *ptl cuc2* органы околоцветника сливаются (Brewer et al., 2004). Гены *AS1*, *AS2* и *JAGGED* (*JAG*) ограничивают действие “пограничников” в примордиях органов, прямо или опосредованно подавляя их транскрипцию в тех участках, где они сами экспрессируются. В околоцветнике двойных мутантов *as1 jag* и *as2 jag* из-за расширения областей непролиферирующих клеток формируются узкие филаменто-подобные органы (Xu et al., 2008). Одиночные мутанты *as1* и *as2* также имеют некоторые аномалии развития цветка (уко-

<sup>1</sup> Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 10-04-00859-а) и федеральной целевой программой “Ведущие научные школы” (проект № НШ-3293.2010.4)

Число органов цветка у одиночных мутантов *fip*, *as1* и двойного мутанта *fip as1*

Мутовка, органы	Дикий тип	<i>fip</i>	<i>as1</i>	<i>fip as1</i>
I – чашелистики ( $k_{\text{var}}$ )	4.0 ± 0 (0)	4.1 ± 0.1(5)	4.1 ± 0.2 (23)	4.6 ± 0.8 (70)
II – лепестки ( $k_{\text{var}}$ )	4.0 ± 0 (0)	3.4 ± 0.5 (26)	4.0 ± 0 (0)	4.8 ± 0.8 (57)
III – тычинки ( $k_{\text{var}}$ )	5.4 ± 0.2 (12.6)	4.4 ± 0.5 (17)	5.9 ± 0.4 (22)	7.2 ± 0.9 (53)
IV – плодолистики ( $k_{\text{var}}$ )	2.0 ± 0 (0)	2.6 ± 0.9 (9.6)	2.0 ± 0 (0)	2.5 ± 0.5 (63)

Примечание.  $k_{\text{var}}$  – коэффициент вариации значений выборки в процентах.

рочение и сужение чашелистиков, а у *as1* – и лепестков), а также листа (асимметричные бугристые листья; Ori et al., 2000; Byrne et al., 2002). В нашей работе приведены результаты изучения нового рецессивного моногенного мутанта *A. thaliana fimbriata petioles (fip)* из коллекции кафедры генетики, который характеризуется необычными аномалиями развития органов цветка, а также двойного мутанта *fip as1*.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали линии из коллекции кафедры генетики МГУ: К-1 (дикий тип, раса Dijon-M) и М-40 (мутант *fip*). Мутант выделен с помощью химического мутагенеза (этилметансульфонат). Из-за женской стерильности мутант поддерживали путем размножения гетерозиготных фенотипически нормальных растений. Для изучения взаимодействия генов использовали мутант *as1* из коллекции кафедры генетики (линия К-102). Растения выращивали в теплице в смеси почвы и песка (2 : 1) в условиях теплицы на длинном дне.

Исследовали по 20 цветущих растений 8–9-недельного возраста дикого типа и мутантов *fip* и *as1*, а также 10 растений двойного мутанта *fip as1*. У каждого растения исследовали число и тип органов в 10-ти базально-расположенных цветках главного цветоноса. Съёмки растений проводили цифровым фотоаппаратом “Canon” (Япония) под бинокуля-

ром Stemi 2000-C (Германия). Детальный анализ структуры органов проводили с помощью аналитического и сканирующего электронного микроскопов JSM-6380LA и СЭМ S-405A (фирм Jeol и Hitachi, Япония, соответственно). Материал готовили, как описано ранее (Ондар и др., 2008).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

Растения *A. thaliana* расы Dijon-M, на основе которой получен мутант *fip*, имеют типичный для семейства крестоцветных цветок: 4 чашелистика, 4 лепестка, от 4 до 6 тычинок (5.4 тычинки в среднем) и пестик из двух плодолистиков. У мутанта *fip* среднее число органов I-ой и II-ой мутовки цветка незначительно отличается от дикого типа, однако варьирует очень широко (от 3-х до 5-ти чашелистиков и от 2-х до 5-ти лепестков соответственно), что видно по величине коэффициента вариации (таблица). Число генеративных органов III-ей и IV-ой мутовок у мутанта варьируют в пределах от 2-х до 5-ти тычинок и от 2-х до 4-х плодолистиков. У мутанта *fip* также иногда встречаются единичные филаменты в III-ей мутовке. В цветках расы Dijon-M число органов I-ой, II-ой и VI-ей мутовок цветка стабильно – все 200 исследованных цветков имели по 4 чашелистика, 4 лепестка и 2 плодолистика, а коэффициент вариации числа тычинок составляет 12.6%, что также значительно ниже, чем у мутанта (таблица).

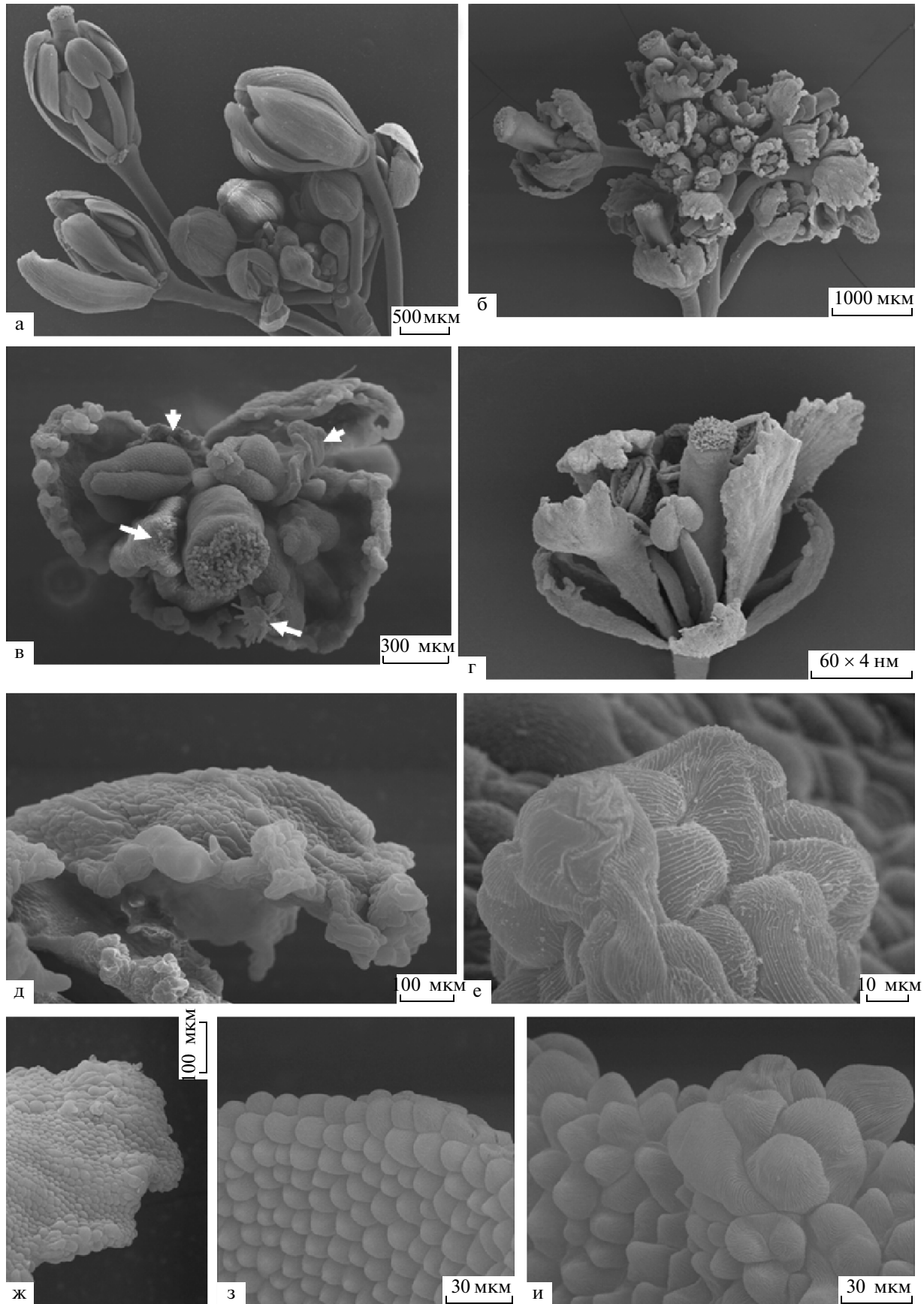
**Рис. 1.** Особенности морфологии цветка мутанта *fip* (сканирующая электронная микроскопия):

а и б – верхушки соцветий дикого типа и мутанта, соответственно; у мутанта молодые бутоны открыты; видны укороченные чашелистики с волнистыми краями;

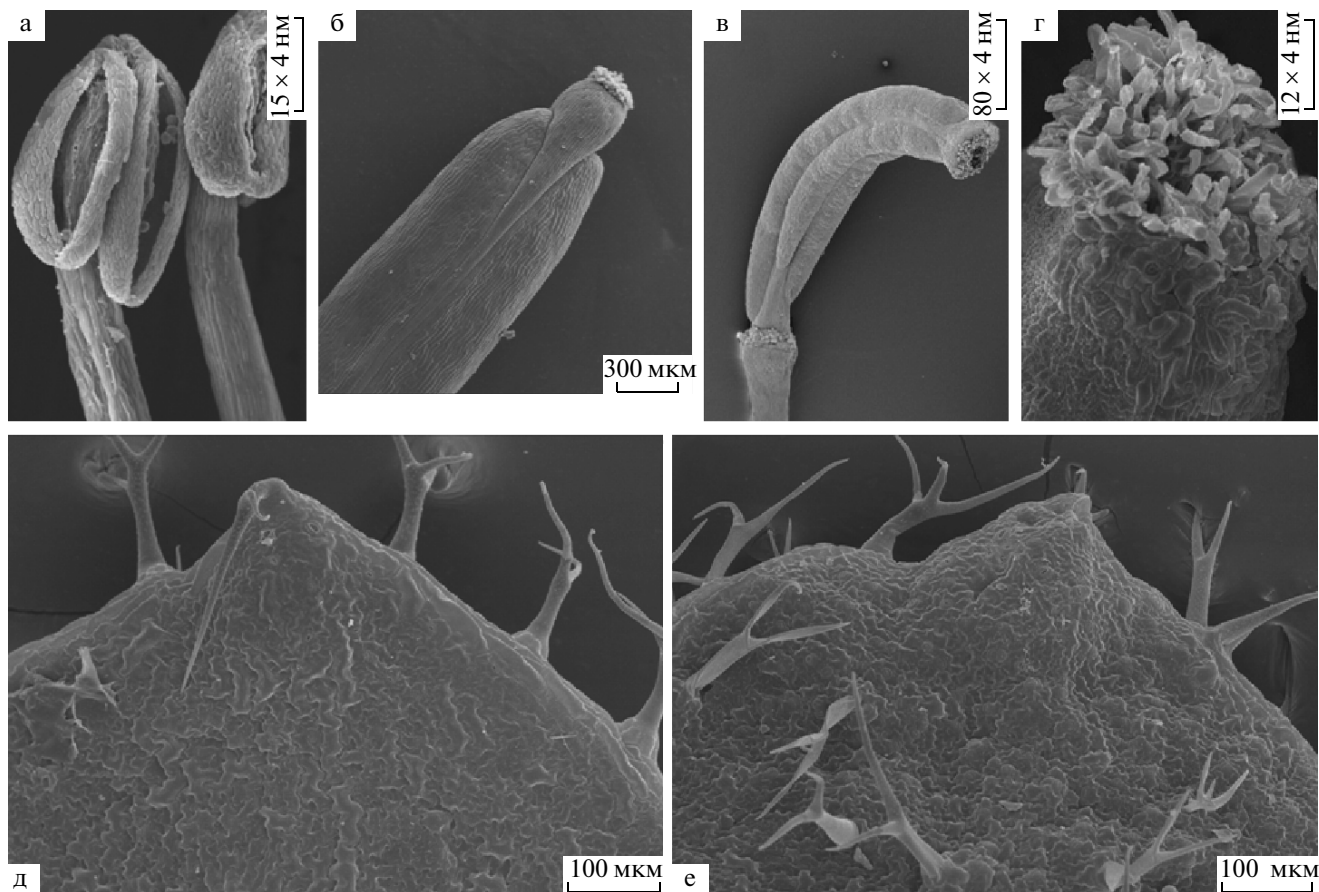
в и г – цветки мутанта с бахромчатыми краями органов околоцветника (чашелистиков и лепестков); в более молодом цветке (в) лепестки короче чашелистиков (отмечены короткими стрелками), а на верхушках некоторых тычинок видна рыльцевая ткань (длинные стрелки);

д–и – дистальные края чашелистиков (д, е) и лепестков (ж, з, и) мутанта (д, е, ж, и) и дикого типа (з); у мутанта видны отдельные группы крупных клеток.

Бары соответствуют (а) – 500, (б) – 1000, (в) – 300, (г) – 600, (д) – 100, (е и ж) – 10, (з и и) – 30 мкм.







**Рис. 2.** Морфология генеративных органов цветка и листа мутанта *fip* (сканирующая электронная микроскопия):

а – тычинки мутанта;

б–г – пестики дикого типа (б) и мутанта (в, г), состоящие из 2-х и 4-х плодолистиков соответственно; на рисунке г видны аномалии столбика и рыльца;

д и е – верхушки листьев розетки растения дикого типа и мутанта, соответственно; на листе мутанта видны расположенные группами трихомы, бугристость поверхности и асимметрия края листа.

Бары соответствуют (а) – 150, (б) – 300, (в) – 800, (г) – 120, (д и е) – 100 мкм.

Чашелистики мутанта существенно короче, чем у цветков дикого типа, и не закрывают внутренние органы цветка на стадии бутонизации (рис. 1а, б). Размер и форма чашелистиков сильно варьирует, но, как правило, чашелистики мутанта *fip* имеют более широкую, чем у дикого типа, дистальную область и асимметричную форму (рис. 1а, б, в). Встречаются слитые у основания чашелистики. Некоторое расширение дистальной области характерно и для лепестков (рис. 1г). Лепестки также короче, чем у дикого типа, причем их размеры сильно варьируют: лишь единичные по размеру приближаются к дикому типу, большинство (около 60%) не превышают длины чашелистиков, а остальные короче, чем у дикого типа примерно на треть. Отмечены случаи слияния тканей лепестков и чашелистиков.

Наиболее ярким признаком мутанта *fip* является изменение структуры органов околоцветника – бахромчатый край чашелистиков и особенно лепестков (рис. 1б, в, г), что отражено в названии мутанта (*fimbriata petioles*). По краю чашелистиков и лепестков хорошо заметны отдельные группы крупных клеток (рис. 1д, е, ж, и), которых не наблюдается у дикого типа (рис. 1а, з). Неравномерное распределение этих групп создает “бахрому” по краю органов околоцветника у мутанта. По мере роста органов происходит некоторое сглаживание их края, однако зубчатость края лепестка остается хорошо заметной и после завершения его роста (рис. 1г).

Часть тычинок развивается нормально и имеет фертильную пыльцу (рис. 2а); встречаются и стерильные тычинки. Изредка встречаются тычинки с

рыльцевой тканью на верхушках (рис. 1в). Развитие пестика нарушено — наблюдается недоразвитие столбика, аномалии рыльца (рис. 2б, в, г). Семязпочки по краям плодолистиков не развиваются, что приводит к женской стерильности.

Некоторым изменениям подвергаются и листья. У мутанта *fip* листья имеют неровную бугристую поверхность с неравномерно разбросанными и часто образующими группы трихомами (рис. 2д, е). Отметим, что у мутанта листья толще и поэтому имеют более темную окраску по сравнению с листьями дикого типа. Таким образом, у мутанта *fip* в органах околоцветника и листьях наблюдаются сходные нарушения деления и роста клеток.

Мутант *as1* напоминает мутант *fip*. Наши исследования показали, что для мутанта *as1* характерна не только асимметричность листа и бугристость его поверхности, что описано ранее, но и аномалии развития органов околоцветника. Чашелистики и лепестки не только мельче, чем у дикого типа (Ori et al., 2000; Byrne et al., 2002), но и имеют неровный зубчатый край, как у мутанта *fip* (рис. 3а, б). На поверхности молодых чашелистиков и лепестков (рис. 3б) как и у *fip* встречаются клетки разного размера, хотя этот признак у *as1* выражен не так ярко, как у *fip*. У *as1* выявляются и некоторые аномалии развития пестика (столбика и рыльца, рис. 3в, д), которые несколько напоминают структуру гинецея мутанта *fip*. Плодолистики мутанта *as1* могут быть неправильной формы вследствие незавершенности процесса закладки новых плодолистиков (рис. 3г).

Цветки двойного мутанта *fip as1* характеризуются некоторым увеличением числа всех типов органов (таблица). Более того, в органах околоцветника еще сильнее заметны различия размеров клеток (рис. 3е, ж).

Не только чашелистики и лепестки, но и листья двойного мутанта *fip as1* характеризуются более выраженной асимметрией и неровностью поверхности по сравнению с обоими родителями (рис. 2е, 3з, 3и).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что клетки растений могут увеличиваться в размере более чем в 1000 раз за счет амплификации хромосомной ДНК, не сопровождающейся делением клетки (Sugimoto-Shirasu et al., 2005). Переход от делений к процессу эндоредупликации — нормальное явление, которое сопровождает процессы окончательной дифференцировки клеток. В исследованиях на *A. thaliana* показано, что различия в размере дифференцированных клеток на поверхности листа и органов цветка (в первую очередь, чашелистиков) являются результатом раз-

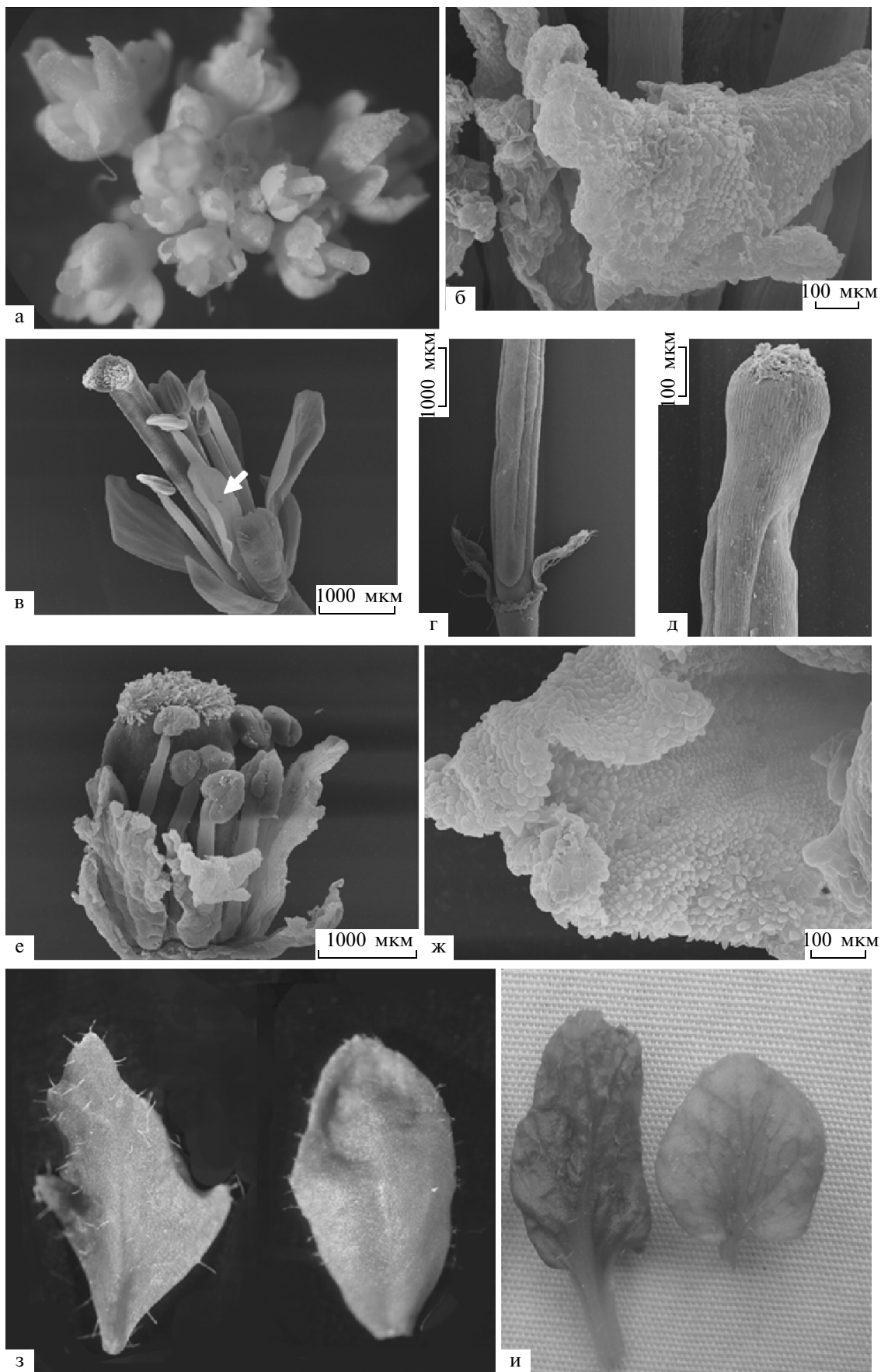
ного уровня их ploидности. Чем раньше клетка приступает к эндоредупликации, тем более крупной она может стать (Roeder et al., 2010).

В настоящее время благодаря изучению мутантов и трансгенных растений идентифицированы гены, контролирующие переход между митотическим циклом и циклом эндоредупликаций, например, ингибиторы циклин-зависимых протеинкиназ (Verkest et al., 2005), начали приоткрываться молекулярные механизмы, останавливающие деления клеток и направляющие их в цикл эндоредупликаций, который предложено называть эндоциклом (Vignardell et al., 2003; Lammens et al., 2008; Vanstraelen et al., 2009). Тем не менее, информация о регуляторных системах, которые включают в нужное время и в нужном месте (определенном органе и ткани) эти клеточные механизмы митоза/эндоредупликаций, пока ограничена.

Хотя для изучения мутанта *fip* требуются дальнейшие исследования с использованием ДНК-цитометрии, его фенотипические особенности позволяют предполагать, что ген *FIP* может быть одним из репрессоров перехода клеток к эндоредупликациям. Нарушение его функции у мутанта приводит к преждевременному прекращению клеточных делений и включению процесса эндоредупликации, приводящему к появлению аномально крупных клеток в органах околоцветника.

Похожие аномалии выявлены и в цветке мутанта *as1* из коллекции кафедры генетики, а у двойного мутанта *fip as1* обнаружена еще более выраженная неравномерность размера клеток и асимметрия формы листа. Полученные данные свидетельствуют о комплементарном взаимодействии генов *FIP* и *AS1* в контроле пролиферации клеток листа и органов цветка и, по-видимому, в подавлении процессов эндоредупликации. Хотя обе мутации вызывают нарушения, как в листе, так и в цветке, тем не менее, наиболее яркое проявление они имеют в разных органах (мутация *as1* нарушает главным образом развитие листа, а мутация *fip* — органов цветка). Это указывает на специфичность действия генов *AS1* и *FIP*.

Ген *FIP* пока не идентифицирован. По нашим данным он локализован в верхнем плече I-ой хромосомы на расстоянии 18.7 сМ от маркерного гена *AN*. Ген *AS1* кодирует белок с доменом MYB и имеет несколько разных функций — он ограничивает пролиферацию листовой меристемы, подавляя экспрессию генов *KNAT* в примордиях листьев (Guo et al., 2008), и участвует в поляризации примордия листа *A. thaliana* (Xu et al., 2003). Укорочение органов цветка у мутанта можно объяснить повышением уровня экспрессии *KNAT*-генов, которые подав-



**Рис. 3.** Особенности морфологии органов цветка и листа одиночного мутанта *as1* и двойного мутанта *fip as1* (б–ж – сканирующая электронная микроскопия):

а и б – соответственно, верхушка соцветия и лепесток мутанта *as1*; на поверхности лепестков видны клетки разного размер (сравните с рис. 1з);

в – цветок мутанта *as1*; виден аномальный пестик и лепестко-тычинка (стрелка);

г, д – основание и верхушка аномального пестика мутанта *as1*;

е, ж – крупный цветок и лепесток двойного мутанта *fip as1*, соответственно; видна ярко выраженная бахромчатость края и разный размер клеток на поверхности лепестка;

з – стеблевые листья мутанта *as1* (слева) и мутанта *fip* (справа); виден зубчатый край листа мутанта *as1* и неровный край листа мутанта *fip*;

и – листья розетки мутанта *as1* (справа) и двойного мутанта *fip as1* (слева); видно более выраженное проявление неровности (бугристости) поверхности листа у двойного мутанта.

Бары соответствуют (б и ж) – 100, (в, г и е) – 1000, (д) – 300 мкм.

ляют синтез гиббереллина (Hay et al., 2002). В то же время причины наиболее яркого проявления фенотипа мутанта *as1* (бугристый лист) не связаны с эктопической экспрессией *KNAT*, поскольку у двойных, тройных и даже четверных мутантов с одновременным нарушением активности гена *as1* и *KNAT*-генов (*KNAT1*, 2, 6), восстановления этой аномалии не наблюдалось (Ikezaki et al., 2010). Повидимому, ген *AS1* может контролировать пролиферацию клеток по дополнительному пути (не зависящему от генов *KNAT*), комплементарно взаимодействуя с геном *FIP*.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ондар У.Н., Ву Х.Ч., Ежова Т.А. Новый делеционный мутант *apetala1-20 Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Онтогенез. Том 39. № 6. 2008. С. 430–436.
- Brewer P.B., Howles P.A., Dorian K. et al. *PETAL LOSS*, a trihelix transcription factor gene, regulates perianth architecture in the *Arabidopsis* flower // *Development*. 2004. V. 131. P. 4035–4045.
- Byrne M.E., Simorowski J., Martienssen R.A. *ASYMMETRIC LEAVES1* reveals *knox* gene redundancy in *Arabidopsis* // *Development*. 2002. V. 129. P. 1957–1965.
- Coen E.S., Meyerowitz E.M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development // *Nature*. 1991. V. 353. № 6339. P. 31–37.
- Guo M., Thomas J., Collins G. et al. Direct repression of *KNOX* loci by the *ASYMMETRIC LEAVES1* complex of *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2008. V. 20. P. 48–58.
- Hay A., Kaur H., Phillips A. et al. The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans // *Current Biology*. 2002. V. 12. № 18. P. 1557–1565.
- Ikezaki M., Kojima M., Sakakibara H. et al. Genetic networks regulated by *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*) and *AS2* in leaf development in *Arabidopsis thaliana*: *KNOX* genes control five morphological events // *The Plant J*. 2010. V. 61. P. 70–82.
- Krizek B.A., Fletcher J.C. Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide // *Nat. Rev. Genet*. 2005. V. 6. P. 688–698.
- Lammens T., Boudolf V., Kheibarshekan L. et al. Atypical E2F activity restrains APC/C<sup>CC52A2</sup> function obligatory for endocycle onset // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2008.
- Ori N., Eshed Y., Chuck G. et al. Mechanisms that control *knox* gene expression in the *Arabidopsis* shoot // *Development*. 2000. V. 127. P. 5523–5532.
- Roeder A.H.K., Chickarmanel V., Cunha A. et al. Variability in the control of cell division underlies sepal epidermal patterning in *Arabidopsis thaliana* // *PLoS Biology*. 2010. V. 8. Issue 5. doi: 10.1371/journal.pbio.1000367.
- Sugimoto-Shirasu K., Roberts G.R., Stacey N.J. et al. RHL1 is an essential component of the plant DNA topoisomerase VI complex and is required for ploidy-dependent cell growth // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. P. 18736–18741. V. 105. № 38. P. 14721–14726.
- Vanstraelena M., Balobana M., Inesa O.D. et al. APC/CCCS52A complexes control meristem maintenance in the *Arabidopsis* root // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 28. P. 11806–11811.
- Verkest A., Manes C.L., Vercruyse S. et al. The cyclin-dependent kinase inhibitor KRP2 controls the onset of the endoreduplication cycle during *Arabidopsis* leaf development through inhibition of mitotic CDKA;1 kinase complexes // *Plant Cell*. 2005. V. 17. № 6. P. 1723–1736.
- Vinardell J.M., Fedorova E., Cebolla A. et al. Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* Nodules // *Plant Cell*. 2003. V. 15. P. 2093–2105.
- Xu B., Li Z., Zhu Y. et al. *Arabidopsis* genes *AS1*, *AS2*, and *JAG* negatively regulate boundary-specifying genes to promote sepal and petal development // *Plant Physiology*. 2008. V. 146. P. 566–575.
- Xu L., Xu Y., Dong A. et al. Novel *as1* and *as2* defects in leaf adaxial-abaxial polarity reveal the requirement for *ASYMMETRIC LEAVES1* and 2 and *ERECTA* functions in specifying leaf adaxial identity // *Development*. 2003. V. 130. № 17. P. 4097–5007.

***Arabidopsis thaliana* FIMBRIATA PETIOLES Gene, Controlling Cell Division and Growth in Floral Organs**

**U. N. Kawai-ool\* and T. A. Ezhova**

\* *Department of General Biology, Tuva State University, Kyzyl, Russia*

\* *Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

*Department of Genetics, Moscow State University, Moscow, Russia*

*e-mail: dr.urana@mail.ru*

**Abstract**—A new mutant, *fimbriata petioles* (*fip*), of *Arabidopsis thaliana* was obtained by chemical mutagenesis. The mutant is characterized by unusual anomalies of floral organs. Clusters of very large cells formed in the distal region of sepals and petals, which created fringed edges of these organs. An analysis of the morphology of the floral organs and leaves of the *fip as1* double mutant revealed a complementary interaction of the *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*) and *FIMBRIATA PETIOLES* (*FIP*) genes. It was assumed that the *FIP* gene, together with the *AS1* gene, controls cell proliferation, preventing their premature entry into endocycle.

**Keywords:** plant morphogenesis, *Arabidopsis thaliana*, cell division and growth, floral organ development

## ПИСЬМО В РЕДАКЦИЮ

УДК 575.18

**Письмо в редакцию журнала “ОНТОГЕНЕЗ”**  
**В декабрьском номере журнала “Cell” опубликована статья группы**  
**исследователей под руководством Матиаса Трайера**  
**“Somatic Sex Reprogramming of Adult Ovaries to Testes by FOXL2 Ablation” Cell,**  
**Volume 139, Issue 6, 1130–1142, 11 December 2009.**

История и открытие ключевого гена, определяющего направление развития семенников у млекопитающих, была связана почти с двадцатилетним поиском тестис – детерминирующего фактора (TDF), которая завершилась открытием гена *SRY*, полоопределяющая функция которого была подтверждена в эксперименте с трансгенными мышами XX, несущими 14kb фрагмент этого гена (Sinclair et al., 1990, Koopman et al., 1991). Ген *SRY* относится к семейству SOX транскрипционных факторов и является регулятором других генов в каскадной цепи превращения бипотенциальной гонады в семенники. Первым таким геном является *SOX9*, который определяет дифференцировку гранулезных и стероидогенных клеток в клетки Сертоли и клетки Лейдига соответственно. В случае отсутствия функции ключевых генов *SRY* и *SOX9* бипотенциальная гонада дифференцировалась в яичники (Dinapoli, Capel, 2008). Ключевые гены развития яичников также были идентифицированы, это *Dax1*, *Wnt4*, *Rspo1* и *Foxl2*, мутации которых приводили к реверсии пола.

Использование метода сайт направленной рекомбинации и возможность получения индуцируемой делеции по гену *FOXL2* у взрослых мышей привели к неожиданным результатам. Ранее было установлено, что аутосомный ген *FOXL2* содержит ДНК связывающий домен (fork head domain), известный также под названием летящая спираль (“winged helix”) и принадлежит к семейству FOX транскрипционных факторов (Schmidt et al., 2004, Uda et al., 2004). Функция белка FOXL2 связана с регуляцией направления развития клеток в течение эмбриогенеза. Мутации этого гена связаны с нарушением развития глазного века (BPESI, и BPESII – blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome), BPESI сопровождается еще и недоразвитием яичников и бесплодием (Crisponi et al., 2001).

Этот ген экспрессируется в течение всей жизни у особей женского пола, поэтому сотрудники Европейской лаборатории молекулярной биологии в Германии, под руководством Матиаса Трайера, решили проверить, что произойдет, если этот ген удалить у взрослых мышей с нор-

мально сформированными яичниками с помощью сайт-специфической рекомбинации. Для этого были созданы линии мышей с Cre-LoxP сайтами: одна линия самок (*Foxl2<sup>fl/fl</sup>*) имела ген *Foxl2*, фланкированный LoxP сайтами, и другая *R26CreERT2;Foxl2<sup>fl/fl</sup>* с геном рекомбиназы (*Cre*), слитым с геном рецептора эстрогена (*ERT2*), чувствительного к тамоксифену, который является нестероидным антинеопластическим эстрогеном. Активность рекомбиназы можно было регулировать введением тамоксифена. У 8-недельных мышей XX *R26CreERT2;Foxl2<sup>fl/fl</sup>* после действия тамоксифена происходило удаление гена *Foxl2* и уже через три недели наблюдалась гистологическая картина, свидетельствующая о трансдифференцировке гранулезных клеток и клеток Теки в Сертоли-подобные и Лейдига-подобные клетки. Линия (*Foxl2<sup>fl/fl</sup>*) использовалась как контроль. Трансдифференцировка была подтверждена и на молекулярном уровне. Перепрограммированные клетки секретировали тестостерон на таком же уровне, как и у самцов XY. Планируя этот эксперимент Трайер с сотрудниками ожидали, что удаление гена *Foxl2* приведет к дегенерации ооцитов, но в целом организм сохранит все физиологические признаки женского пола. Вместо этого у животных произошла полная трансдифференцировка яичников в семенники. Экспрессия гена *Foxl2* в течение всей жизни свидетельствует о его необходимости для предотвращения трансдифференцировки яичников в семенники у взрослых мышей. Как было ранее установлено, основную роль в дифференцировке гранулезных и стероидогенных клеток в клетки Сертоли и Лейдига принадлежит гену *SOX9*. Результаты, полученные по установлению функции гена *FOXL2* и его взаимодействия с другими генами, дают основание для расширения представлений о функциях и роли гена *SOX9* в процессе дифференцировки пола у млекопитающих

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Koopman P., Gubbay J., Vivian N., Goodfellow P., Lovell-Badge R. Male development of chromosomally fe-

- male mice transgenic for *SRY* // Nature. 1991. Vol. 351. P. 117–121.
2. *Dinapoli L., Capel B.* *SRY* and the standoff in sex determination // Mol. Endocrinol. 2008. Vol. 22. P. 1–9.
  3. *Crisponi L., Deiana M., Loi A., Chiappe F., Uda M., Amati P., Bisceglia L., Zelante L., Nagaraja R., Porcu S. et al.* The putative forkhead transcriptional FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome // Nat. Genet. 2001. Vol. 27. P. 159–166.
  4. *Uhlenhaut N.H., Jakob S., Anlag K., Eisenberger T., Sekido R., Kress J., Treier A.-C., Klugmann C., Klagen M., Holter N.I., Riethmacher D., Schütz G., Cooney A.J., Lovell-Badge R., Treier M.* Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation // Cell. 2009. Vol. 139. Issue 6. P. 1130–1142.

*Сотрудники кафедры генетики  
Биологического факультета  
МГУ им. М.В. Ломоносова  
Профессор М.М. Асланян  
и доцент О.П. Солдатова*

---

Сдано в набор 12.01.2011 г.	Подписано к печати 01.02.2011 г.	Формат бумаги 60 × 88 <sup>1</sup> / <sub>8</sub>	
Цифровая печать	Усл. печ. л. 10.0	Усл. кр.-отт. 1.1 тыс.	Уч.-изд. л. 10.1
	Тираж 102 экз.	Зак. 1123	Бум. л. 5.0

---

Учредитель: Российская академия наук,  
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

---

Издатель: Российская академия наук. Издательство “Наука”, 117997 Москва, Профсоюзная ул., 90  
Оригинал-макет подготовлен МАИК “Наука/Интерпериодика”  
Отпечатано в ППП “Типография “Наука”, 121099 Москва, Шубинский пер., 6