ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՌ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱՅԻ ՏԵՂԵԿԱԳԻՐ
ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

Բիոլոգիական գիտ. XIII, № 1, 1960 Биологические науки

А. А. ЧИЛИНГАРЯН, Е. Ф. ПАВЛОВ

ИЗМЕНЕНИЕ ОКРАСКИ ПЕКИНСКИХ УТОК ПОД ВЛИЯНИЕМ ИНЪЕКЦИИ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЯДЕР ЭРИТРОЦИТОВ УТОК ДРУГОГО ВИДА

Сообщение 1.

Одним из основных препятствий, стоящих на пути использования межвидовой гибридизации в целях получения новых форм животных, являются различные типы биологической несовместимости исходных видов, привлекаемых для формообразовательного процесса. Конкретным выражением несовместимости являются различные формы бесплодия, начиная с отсутствия оплодотворения у исходной родительской генерации и кончая прекращением репродукции у гибридов первого поколения.

Физиологические методы, как пересадка половых желез, парабиоз в эмбриональном и постнатальном периоде, пересадка зигот, переливание крови и яичного белка у птиц, или не разрешают проблемы несовместимости в случае пересадки и сращивания, или имеют ограниченное применение для определенного класса животных в случае переливания крови и белка.

Таким образом, изыскание новых методов преодоления биологической несовместимости при гибридизационных работах имеет определенный интерес. Одним из возможных путей исследования, ведущихся в этом направлении, представляет собой метод дифференциального анализа участия соматических клеток и их органоидов в передаче по наследству потомству различных признаков и свойств. Успешное разрешение этого вопроса в вышеуказанной плоскости, на наш взгляд, способствовало бы в известной мере преодолению биологической несовместимости, так как в этом случае экспериментатор, во первых, имеет дело уже не с живой тканью, а с биологическим препаратом, обладающим меньшей специфичностью и, во вторых, наличие единого плана строения клетки у всех представителей типа позвоночных дает возможность обойти ряд затруднений, обусловленных видовой принадлежностью подопытных животных.

Техническое оснащение биологических лабораторий в настоящее время позволяет перенести этот вопрос из области ранее доступной проверке только методами генетического анализа, который, давая конечный результат, оставляет в тени ряд промежуточных процессов, в иную экспериментальную плоскость. Такая возможность, с нашей точки зрения, заключается в сочетании методов экспериментально вызванной

изменчивости с разделением клетки химическими приемами или путем дифференциального центрифугирования на ее составные отличимые части, с последующим введением изолированных органоидов подопытным животным в целях изменения их наследственных свойств.

В цикле исследований, задуманных в указанном плане, настоящее сообщение является первым.

Приступая к постановке экспериментов, в данной работе мы пытались разрешить следующие задачи:

выяснить возможность трансмиссирования (через изолированные ядра эритроцитов) пигментации уток одного вида потомству птиц другого вида и возможность получения фенотипических изменений у особей, непосредственно подвергавшихся обработке изолированными ядрами эритроцитов;

получить новые данные о характере изменений, наблюдаемых в опытах по трансмиссированию пигментации от одного вида уток к другому внеполовым путем.

В качестве подопытных объектов были избраны чистопородные пекинские утки, разделенные на две группы: в первую входили птицы, получившие изолированные ядра эритроцитов мускусных уток, во-вторую — интактные птицы, служившие контролем.

Изолированные ядра для инъекций мы получили из крови 8 самцов мускусных уток, служивших донорами на протяжении всего опыта. Для выделения ядер были использованы два метода, в свое время описанные Даунасом [8], с некоторой модификацией.

В первом случае кровь у утки-донора бралась из подкрыльцовой вены шприцем емкостью 20 мл, куда перед взятием крови для предотвращения свертывания крови набиралось 2—3 мл насыщенного раствора лимоннокислого натрия. Затем кровь немедленно переносилась в молярный раствор лимонной кислоты, pH которого равнялся 4—4,5. После пребывания в растворе лимонной кислоты в течение 15—20 мин. кровь подвергалась центрифугированию в течение 10 мин. при 4000 об/мин. Эта процедура повторялась до тех пор (4—5 раз), пока надосадочная жидкость не становилась совсем бесцветной и прозрачной. После этого осадок промывался еще раз физиологическим раствором и высушивался в термостате при 40°С. Микроскопический контроль показал, что полученный осадок красновато-коричневого цвета содержал чистые ядра эритроцитов (рис. 1).

Окраска ядерного материала, полученного этим методом, по-видимому, связана с адсорбцией на поверхности ядер некоторого количества субмикроскопических частиц, окрашенных гемоглобином.

Второй метод изоляции ядер отличался от предыдущего тем, что вместо лимонной кислоты для проведения гемолиза был использован 0,1% раствор сапонина. В этом случае 20 мл крови смешивалось с 180 мл раствора сапонина и после 5-минутного стояния последняя подвергалась центрифугированию при 4000 об/мин. Надосадочная жидкость сливалась, а белый осадок в виде геля, как показал микроскопический

контроль, содержал также изолированные ядра эритроцитов. После промывания физиологическим раствором эти ядра также высушивались.

В изолированных ядрах проводилось определение ДНК (дезоксирибонуклеиновой кислоты) по методу Дише с дифениламиновым реактивом с последующим количественным определением путем колориметри-

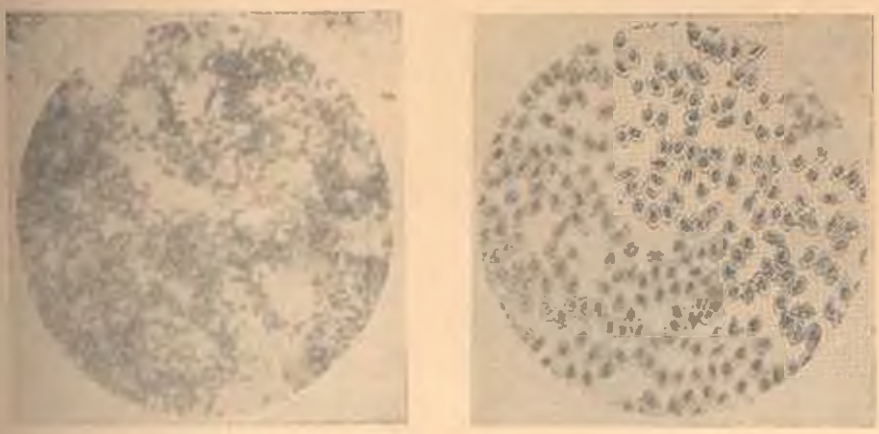

Рис. 1. Слева—микрофото нормального мазка крови мускусной утки. Отчетливо видны эритроциты, содержащие ядра. Справа—микрофото мазка, приготовленного из осадка после обработки крови лимонной кислотой. Отчетливо видны изолированные ядра эритроцитов. Окраска — азур-эозин. Увеличение 10 × 60.

рования. В качестве стандартного раствора был использован препарат ДНК, содержащий 8,9% фосфора (предоставлен профессором А. Н. Белозерским). Полученный вышеописанными способами ядерный материал вводился подкожно и интрамускулярно двум разновозрастным подгруппам пекинских уток в дозе 40 мг на голову 2 раза в неделю. Первая подгруппа в 10 голов состояла из молодняка в возрасте 60 дней с незавершенным формированием дефинитивного оперения. Создавая подгруппу из молодняка, мы имели в виду выяснение вопроса о возможности возникновения под влиянием изолированных ядер фенотипических изменений непосредственно в процессе индивидуального развития подопытных птиц, учитывая, что подопытные утята с незавершенным формированием перьевого покрова имеют наибольшие возможности дать фенотипические изменения в области пигментации, так как вводимые извне чужеродные ядерные материалы легче всего могут оказать влияние на ткани (в частности оперение), находящиеся в процессе становления, что имеет место у растущего молодняка. Экспериментальная проверка этого предположения показала, что оно было не лишено оснований. Так, у двух уток через 49—56 дней после введения в общей сложности 520—600 мг ядерного материала было обнаружено появление отдельных пигментированных перьев (рис. 2).

Таким образом, при введении ядер эритроцитов от темно-пигментированных мускусных уток чисто белым молодым уткам пекинской породы с оперением, не завершившим своего формирования, удается в отдельных случаях вызвать пигментообразовательные процессы у последних. Естественно возникает вопрос, насколько стойкой является

Рис. 2. Утка № 1982. Возраст 109 дней. На фото отчетливо видны билатерально расположенные пигментированные перья, появившиеся после инъекции 520 мг изолированных ядер эритроцитов мускусной утки.

пигментация, появившаяся в результате опыта, представляет ли она собой временную, проходящую реакцию организма, возникшую в ответ на введение чужеродных веществ, или же эти изменения являются стойкими, передающимися по наследству и в какой-то мере отражают собой процессы, наблюдавшиеся в опытах с межпородным переливанием крови у кур.

Для выяснения этого вопроса взамен первой, состоявшей из молодняка подгруппы, была сформирована вторая подгруппа из взрослых чистопородных пекинских уток в составе 7 самок и 3 самцов.

Формирование новой подгруппы было вызвано необходимостью приблизить условия опыта к обстановке, в которой проводилось большинство работ по переливанию крови у птиц [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]. В вышеприведенных исследованиях, за исключением работ Бенуа [1] с введением ДНК, авторы начинали эксперименты если не с вполне взрослыми птицами, то, во всяком случае, с животными, закончившими формирование дефинитивного оперения и обрабатывали их кровью в сроки, близкие к инкубационному сезону и непосредственно в продолжение его. Вероятно поэтому ни в одной из подобного рода работ не было отмечено фенотипических изменений у родительской генерации, подвергавшейся инъекциям, а все многочисленные изменения, возникающие при переливании крови, наблюдались только у потомства первого и последующих поколений.

Инъекция ядер подопытным птицам была начата 30.XII 58 г. и за-

кончена 11.VII 59 г. Дозировка ядерного материала на всем протяжении опыта сохранилась без изменений, то есть утки получали по 40 мг ядер единовременно с частотой инъекций 2 раза в неделю. Всего было произведено по 54 инъекции и каждая птица получила по 2160 мг ядер эритроцитов. Во время опыта вся эта подгруппа как в птичнике, так и на выгуле содержалась изолированно.

В течение инкубационного сезона от этих птиц было получено 55 голов утят, 6 из них имели некоторое количество пигментированных перьев и пуха, то есть обладали признаком, отсутствующим у чистопородных пекинских уток. Это общеизвестное положение было также подтверждено инкубацией яиц от контрольной группы чистопородных пекинских уток, в результате которой было получено 56 утят и среди них не было ни одного, имевшего признаки окрашенного оперения.

Характер появления пигментации у утят подразделяется на две фазы. У трех из шести полученных в этой серии опытов пигментированные перья локализовались в области головы и были отчетливо видны в день вывода (рис. 3).

Рис. 3. Голова утки № 1969. Первое поколение от родителей, получавших ядра эритроцитов. В области надбровья отчетливо видна пигментация перьев (рисунок сделан в возрасте 73 дней).

У трех других утят одиночные пигментированные перья появились только в процессе замены ювенильного покрова на дефинитивный (рис. 4).

Появление пигментации у утят в два различные периода формирования оперения позволяет высказать соображение о том, что наблюдавшаяся меланизация, являясь для пекинской породы новообразованием, как большинство приобретенных признаков, проявляется в заключительной фазе формообразовательных процессов.

Основательность такого соображения, для первого случая, подкрепляется данными, полученными сотрудником нашей лаборатории Ю. А. Магакяном, который установил на эмбрионах мускусной утки, что окраска эмбрионального пухового покрова распространяется в каудо-

краниальном направлении и появляется в области задней части туловища к 15 дню эмбриональной жизни, к концу 17-х суток завершается пигментацией пухового покрова головы. Таким образом, появление окрашенных зон оперения у подопытных утят в области головы можно рассматривать как адекватное изменение, вызванное введением ядер эритроцитов мускусных уток, появившееся в сроки, соответствую-

Рис. 4. Утка № 1912. Первое поколение от родителей, получавших ядра эритроцитов. На белом фоне оперения отчетливо видно пигментированное пятно (рисунок сделан при обнаружении пигментации в возрасте 53 дней).

щие концу меланизации пухового покрова у уток вида донора. Попутно отметим, что в группе гибридного молодняка, полученного от прямого и реципрокного скрещивания пекинских и мускусных уток в количестве 7 голов, а также у 46 эмбрионов того же происхождения в возрасте старше 17 дней, завершивших процесс пигментации пуха, во всех случаях оперение головы было пигментированным, в то время как окраска остальных участков перьевого покрова сильно варьировала от белой до черной.

Что касается второго срока появления пигментации после смены пухового покрова, то этот процесс как бы воспроизводит собой феномен, наблюдавшийся у родительской генерации птиц, вызванной инъекциями ядерного материала. Здесь же следует отметить, что процесс меланизации оперения у птиц, подвергавшихся обработке ядрами эритроцитов, по-видимому, не всегда заканчивается в период смены ювенильного покрова на дефенитивный, а продолжается и в более поздние сроки, проявляясь фенотипически при очередных линьках.

Так, в подгруппе взрослых пекинских уток, обрабатывавшихся ядерным материалом с января по июль, в сентябре при прохождении очередной линьки у птицы № 1942 в оперении головы появились ранее отсутствовавшие пигментированные перья (рис. 5).

Появление и локализация пигментированных перьев у взрослых пекинских уток родительской генерации, подвергавшихся обработке изо-

лированными ядрами эритроцитов мускусных, и передача по наследству этих признаков потомству первого поколения в известной мере свиде-

Рис. 5. Голова утки № 1942. На фоне белого оперения видно пигментированное пятно, появившееся после очередной линьки.

тельствует об объеме изменений в пигментном обмене, прочно фиксированном подопытными птицами.

Выводы

1. Сочетание методов, обеспечивающих получение наследственных изменений с фракционным разделением внутриклеточных структур, открывает новые возможности для анализа участия различных элементов клетки в передаче по наследству отдельных признаков и свойств.

2. Инъекция изолированных ядер эритроцитов уток одного вида уткам другого даст возможность получить ряд изменений в пигментации родительской генерации и ее потомства, сходных с изменениями, наблюдаемыми при переливании крови у птиц.

Зоологический институт
Академии наук АрмССР

Поступило 19.X 1959 г

Ա. Հ. ՍԻՄՈՆԴԱՐՅԱՆ, Ս. Ֆ. ՊԱՎԼՈՎ

ՊԵԿԻՆՅԱՆ ԲԱԴԻ ԳՈՒՆԱՎՈՐՄԱՆ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՅԼ ՏԵՍԱԿԻ ՄԿՆՈՒՄՈՎԱԾ ԱՐՑԱՆ ԿԱՐՄԻՐ ԴՆԴԻԿՆԵՐԻ ԿՈՐԻԶԻ ՆԵՐԱՐԿՄԱՆ (ԻՆՆԵՐՑԻԱՅԻ) ՄԻՋՈՑՈՎ

Ամփոփում

Հիբրիդիզացիոն աշխատանքների բնագավառում հիմնական դժվարությունները հանդիսանում են կենդանիների բիոլոգիական անհամատեղելիու-

թյուն։ Մի շարք ֆիզիոլոգիական մեթոդներ ինչպես են՝ սեռական գեղձերի փոխադրումը, սաղմնային և հետսաղմնային պարաբիոզը, բեղմնավորված բջիջների փոխադրումը, արյան և ձվային սպիտակուցի փոխներարկումը, չեն լուծում անհամատեղելիության պրոբլեմը։ Ուստի նոր մեթոդների որոնումը բիոլոգիական անհամատեղելիության վերացման գործում ունի որոշակի նշանակություն։

Արդյունավետ հնարավոր ուղիներից մեկը այդ ուղղությամբ, մեր կարծիքով, հանդիսանում է մարմնական (սոմատիկ) բջիջների և նրանց օրգանոիդների մասնակցությունը տարբեր հատկանիշների ու հատկությունների փոխանցումը սերունդներին ներարկման միջոցով։

Ներկա հաղորդումը առաջինն է այն հետազոտությունների ցիկլից, որոնք նախատեսված են այդ ուղղությամբ։

Փորձարկումները կազմակերպելիս մենք նպատակ ունեինք պարզաբանել մի տեսակ բադի առանձնացված արյան կարմիր գնդիկների կորիզի ներգործությունը (անսեռ ճանապարհով) մյուս տեսակի բադի հատկանիշների ու հատկությունների վրա ներարկման միջոցով։

Փորձի համար ընտրված էին գտարյուն պեկինյան բադեր, բաժանված երկու խմբի՝ առաջին խմբի թռչունները ներարկվում էին մուսկուսյան բադերից ստացված արյան կարմիր գնդիկների կորիզներով, իսկ մյուսը որպես կոնտրոլ էր ծառայում։

Փորձնական խմբում արյան կարմիր գտարյան կորիզի ներարկման շնորհիվ ինչպես ծնողների, այնպես էլ նրանց սերնդի առանձին ներկայացուցիչների մոտ առաջացան պիգմենտավորված ձևեր։ Ընդհանուր հաշվով, նույնպես և կոնտրոլ խմբի մեջ նման ձևեր ամենևին բացակայում էին։

Էքսպերիմենտում ստացված տվյալները հանգում են այն բանին, որ մուսկուսյան բադերից (մուգ պիգմենտացված) մեկուսացված արյան կարմիր գնդիկների կորիզների ազդեցության տակ, ներարկված պեկինյան բադերին (սպիտակ գույնով) առաջանում են նույնանման փոփոխականություն։

ЛИТЕРАТУРА

1. Бенуа Ж., Леруа П., Вендрели К., Вендрели Р. Опыт получения вегетативных гибридов на утках во Франции. Агробиология, 1, 62, 1958.
2. Братанов К. Вегетативная гибридизация птиц. Известия АН СССР (серия биол.), 1, 1954.
3. Ватти К. В. Повышение жизненности кур при родственном спаривании путем переливания крови. Ученые записки Ленинградского университета (серия биол.), вып. 33, 1953.
4. Громов А. М., Феоктистов П. И. Изменение наследственности у кур переливанием крови, М., 1957.
5. Кушнер Х. Ф. Влияние метаболических факторов на наследственность животных. Агробиология, 1, 1957.
6. Кушнер Х. Ф. Наследование у кур изменений в окраске оперения, возникших под влиянием переливания чужеродной крови. Журнал общей биологии, 5, 357, 1958.
7. Сопиков П. М. Изменение наследственности путем парэнтерального введения крови. Агробиология, 6, 36, 1954.
8. Douncl A. Z. Further studiee on isolatei sells nuclei of normal rat liver, gour. Biol. chem. v, 151, № 1, p. 222, 1943.