

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ  
И МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ  
РАЦИОНАЛЬНОГО  
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ  
И ОХРАНЫ БИОРАЗНООБРАЗИЯ**

Материалы Молодежной Всероссийской  
школы-семинара с международным участием

Томск  
2013

УДК 576.316.2

**КАРИОТИП И С-ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ОКРАСКА  
ХРОМОСОМ ЭМБРИОНОВ ПАЛОЧНИКА *SUNGAYA  
INEXPECTATA* (ZOMPRO, 1996) (PHASMIDA,  
HETEROPTERYGIDAE)**

**О.Г. БУЛЭУ, А.Г. БУГРОВ, С.В. ЛУКЪЯНЦЕВ**

Приведены сведения о хромосомном наборе и локализации С-гетерохроматина палочника *Sungaya inexpectata* (Phasmida, Heteropterygidae). Показано, что применение эмбриональной ткани для приготовления препаратов митотических хромосом дает хорошие результаты при изучении партеногенетических видов насекомых.

**Ключевые слова:** *Sungaya inexpectata*; хромосомы; кариотип; С-дифференциальная окраска; эмбрионы; гетерохроматин.

**KARYOTYPE AND C-BANDING OF CHROMOSOMES FROM  
EMBRYOS OF STICK INSECT *SUNGAYA INEXPECTATA*  
(ZOMPRO, 1996) (PHASMIDA, HETEROPTERYGIDAE)**

**O.G. BULEY, A.G. BUGROV, S.V. LUKYANTSEV**

**Введение**

Данные о кариотипах палочников немногочисленны, и включают в себя в основном сведения о числе и морфологии хромосом примерно у 45 видов из шести семейств: Phasmatidae, Bacillidae, Diapheromeridae, Phylliidae, Prisopodidae, Pseudophasmatidae (Makino, 1951; Hughes-Schrader, 1959; Craddock, 1975; Pijnacker, Ferwerda, 1980; Bianchi, Melado, 1998; Passamonti et al., 1999; Milani et al., 2010). Разнообразие числа хромосом в кариотипе от  $2n^{\text{♂}} = 20 + X0$ ;  $2n^{\text{♀}} = 20 + XX$  у вида *Carausius rotundatolobatus* (Makino, 1951; Bianchi, Melado, 1998), до  $2n^{\text{♀}} = 66 + XX$ ;  $2n^{\text{♀}} = 70 + XX$ ;  $2n^{\text{♀}} = 74 + XX$  у вида *Ramulus artemis* (Makino, 1951). Преобладающий механизм определения пола – XO самец/XX самка.

Линейная дифференциация хромосом на С-позитивные и С-негативные районы описана лишь для четырех видов партеногенетических палочников, и одного обоеполого вида рода *Bacillus* (Bacillidae) (Marescalchi, Scali, 1990; Manaresi, Marescalchi, Scali, 1992; Tintia; Scalia, 2010), и так же для одного обоеполого вида *Acrophylla wuelfingi* (Phasmatidae) (Marescalchi, Masetti, Scali, 1986).

Слабая изученность кариотипов Phasmida, по сравнению с другими ортоптероидными насекомыми обусловлена тем, что для многих видов известны только

партеногенетические самки, а для приготовления хромосомных препаратов используют чаще всего семенные фолликулы самцов. Используется также методика приготовления хромосомных препаратов из гермариев овариол самок (Tinti, Scali, 2010), но ее недостатком является, то что, в яичниках значительно меньше делящихся клеток, чем в семенниках.

В настоящей работе предложен метод приготовления препаратов митотических хромосом из клеток эмбрионов партеногенетической культуры палочников *Sungaya inexpectata*.

Палочник *Sungaya inexpectata* обитает на Филиппинах. Партеногенетическая популяция этого вида была обнаружена на острове Luzon (Luzon Island) и описана как самостоятельный вид (Zompro, 1996). Эта популяция была введена в культуру и в настоящее время широко распространена. В 2008 г. на том же острове была обнаружена обополая популяция этого вида (Zompro, 2008). В России с 1999 г. культивируют только партеногенетическую популяцию этого вида (Огнев, Огнева, Огнев, 2004).

### Методика

Самки *Sungaya inexpectata* содержались в садках с кормовым растением (малина, гибискус) при комнатных условиях. Отложенные яйца выбирались через каждые 5–10 дней. Яйца хранили при комнатной температуре в чашках Петри. Через 1,5–2 месяца яйца переносили в чашку Петри в 0,5%-ный раствор колхицина на физиологическом растворе для насекомых. На противоположном микропиллярному концу яиц нарушали целостность оболочек, и яйца помещали в термостат при 25–30°C на 1,5–2,0 часа для стимуляции клеточных делений. Затем эмбрионы извлекались с помощью препаровальных игл и после 20-минутной гипотонии в 0,9%-ом растворе цитрата натрия фиксировали в смеси ледяной уксусной кислоты и 96%-ого этанола (1:3). Фиксированный материал мацерировали на предметном стекле в капле 60% ледяной уксусной кислоты и высушивали на воздухе. Для приготовления препаратов пригодны эмбрионы начала формирования зародышевой полоски и до пигментации глаз. Высушенные препараты окрашивали методом С-дифференциальной сегментации хромосом (Sumner, 1972) с некоторыми модификациями (Бугров, 2001).

Хромосомные препараты анализировались при помощи светового микроскопа Zeiss Primo Star. Микрофотографии получены с применением Axio Zeiss Lab.A1.

### Результаты и обсуждение

Хромосомный набор *Sungaya inexpectata* состоит из 22 пар хромосом ( $2n = 44$ ). Две первые пары хромосом метацентрические, остальные – акроцентрические, мало различимые по величине друг от друга (рис. 1).

С-метод дифференциального окрашивания выявил С-позитивные районы в прицентромерных районах всех хромосом набора. В первой паре хромосом одно из плечей полностью гетерохроматиновое (рис. 2).

Анализ полученных пластинок не дает возможности однозначно идентифицировать половые хромосомы и механизм определения пола.

Сведения о кариотипах палочников из семейства Heteropterygidae, к которому относится *Sungaya inexpectata*, ранее не приводились. Наиболее изучены в цито-

генетическом плане представители родов *Bacillus* и *Clonopsis* из надсемейства *Vacilloidea*. Из рода *Bacillus* изучено 8 видов, из которых три *Bacillus atticus*, *Bacillus whitet* и *B. lynceorum* являются партеногенетическими (Manaresi, Marescalchi, Scali, 1992). Хромосомные наборы и С-дифференциальная окраска этих видов были получены из гермариев овариол насекомых (Tinti, Scali, 2010).

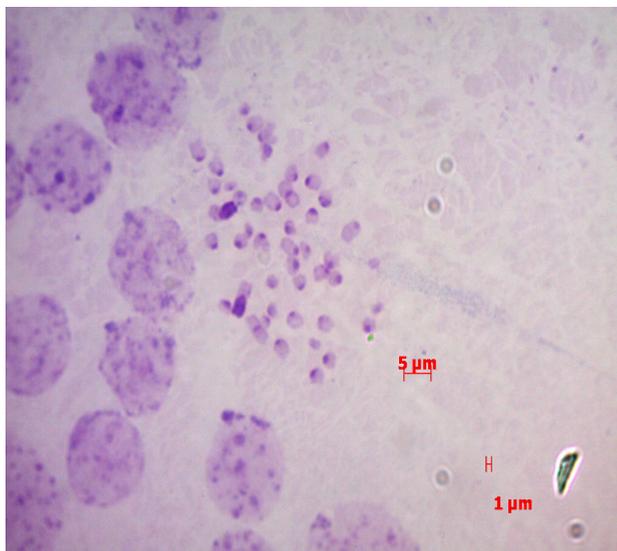


Рис. 1. С-дифференциальная окраска митотических хромосом из эмбриональной клетки *Sungaya inexpectata*: L1 – первая пара хромосом, L2 – вторая пара хромосом.



Рис. 2. Первая пара хромосом *Sungaya inexpectata*

Число хромосом у *Bacillus atticus*  $2n = 34 XX$ , *Bacillus whitet*  $2n = 35 XX$ , *B. lynceorum*  $3n = 52 XXX$  (Manaresi, Marescalchi, Scali, 1992). Авторы статьи выделили стандартный кариотип у *Bacillus whitet*, состоящий из двух больших метацентриков, первая и вторая пара, третья и четвертая – субметацентрики, пятая и шестая пары – среднего размера метацентрики, остальные – акроцентрические хромосомы (Manaresi, Marescalchi, Scali, 1992). У *Bacillus atticus* первая пара метацентрическая, 2, 3, 5, 13, 15 являются субметацентрическими, 4, 6, 7, 10, 12, 14, 16 субacroцентрические, 8 и 17 акроцентрические хромосомы (Manaresi, Marescalchi, Scali, 1992).

*Sungaya inexpectata*, отличается от видов рода *Bacillus* отсутствием субметацентрических и субacroцентрических хромосом, а так же первая метацентрическая пара меньшего размера. Различия С-дифференциальной окраски видов *Bacillus* и *Sungaya inexpectata* в полностью гетерохроматиновом плече первой пары метацентриков у *Sungaya inexpectata*, для остальных хромосом этих видов характерны прицентромерные блоки гетерохроматина.

### Заключение

Использование эмбрионов для кариологического анализа дает возможность проводить исследование более широкого круга объектов, в том числе и партеногенетических видов насекомых. Применение эмбриональной ткани позволяет изучить морфологию хромосом и локализацию С-маркеров. Для более подробного анализа хромосом *Sungaya inexpectata*, необходимо дальнейшее исследование представителей семейства Heteropterygidae.

За предоставление лабораторной культуры для проведения исследований авторы выражают благодарность И.Б. Камскову.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Bianchi A.P., Melado P. Analysis of the karyotypes of four species of the *Leptynia attenuata* complex (Insecta Phasmatodea) // Caryologia. 1998. 51 (3–4). P. 207–219.
2. Craddock E.M. Intraspecific karyotypic differentiation in the Australian phasmatid *Didymuria violescens* (Leach) // Chromosoma. 1975. 53. P. 1–24.
3. Hughes-Schrader S. On the cytotaxonomy of Phasmids (Phasmatodea) // Chromosoma, 1959. 10. P. 268–277.
4. Makino S. An atlas of the chromosome number in animals. Ames : Iowa State Collq. Press, 1951. Vol. 1. P. 113–219.
6. Manaresi S., Marescalchi O., Scali V. The Chromosome Complement of the Hybrid *Bacillus whitei* Complex (Insecta Phasmatodea) I. The paleo- and neo-standard karyotypes // Cytologia. 1992. 57. P. 101–109.
7. Manaresi S., Marescalchi O., Scali V. The Chromosome Complement of the Hybrid *Bacillus whitei* Complex (Insecta Phasmatodea) II. The repatterned cytotypes // Cytologia. 1992. 57. P. 111–119.
8. Marescalchi O., Masetti M., Scali V. C-banding karyotype and male meiosis of *Acrophylla wuelfingi* (Redtenbacher) (Phasmatodea: Phasmatidae) // J. Aust. Ent. Soc. 1986. 25. P. 223–227.
9. Marescalchi O., Scali V. Cytogenetic studies on *Bacillus grandii grandii* and *B. grandii benazzii* (Insecta, Phasmatodea): karyotype description, constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions // Genetica. 1990. 82. P. 117–124.
10. Marescalchi O., Scali V. Karyotypes and Ag-NORs of five Heteronemiidae (Insecta Phasmatodea) from Somalia // Boll. Zool. 1993. 60. P. 53–61.
11. Milani L., Ghiselli F., Pellecchia M., Scali V., Passamonti M. Reticulate evolution in stick insects: the case of *Clonopsis* (Insecta Phasmida) // Evolutionary Biology 2010. 10. P. 1–15.
12. Passamonti M., Mantovani B., Scali V. Karyotype and Allozyme Characterization of the Iberian *Leptynia attenuata* Species Complex (Insecta Phasmatodea) // Zoological Science. 1999. 16. P. 675–684.
13. Pijnacker L.P., Ferwerda M.A. Sex Chromosomes and Origin of Males and Sex Mosaics of the Parthenogenetic Stick Insect *Carausius morosus* Br. // Chromosoma (Berl.) 1980. 79. P. 105–114.
14. Tinti F., Scali V. C-banding, Ag-NOR localization and chromosomal repatterning in Sardinian *Bacillus atticus* (Insecta, Phasmatodea) // Italian Journal of Zoology. 2010. 58. P. 235–243.
15. Zompro O. Zur Entdeckung von *Sungaya inexpectata* Zompro, 1996 // Arthropoda. 2008. 16(2). P. 41.