

## ROLA BODŹCÓW WĘCHOWYCH W ROZRODZIE

Anna Marchlewska-Koj

Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytut Zoologii,  
Uniwersytet Jagielloński

Istnienie komunikacji węchowej między zwierzętami jest zjawiskiem ogólnie uznanym, jakkolwiek stosunkowo słabo poznanym. Wymiana informacji oparta na rozpoznawaniu odpowiednich zapachów występuje tak między osobnikami należącymi do różnych gatunków, jak też między osobnikami tego samego gatunku.

Związki chemiczne - feromony - wydzielane przez jednego osobnika poprzez stymulację układu węchowego innego osobnika tego samego gatunku mogą spowodować zmiany behawioralne lub też pobudzenie układu hormonalnego. Najlepiej poznanym efektem działania feromonów jest ich rola w procesach związanych z rozrodem ssaków. Bodźce węchowe działają i modyfikują aktywność hormonalną podczas całego życia osobnika, a ich istotne efekty stwierdzono prawie u wszystkich gatunków ssaków, tak małych jak mysz i tak dużych jak słoń indyjski [18].

Myszy stanowią klasyczny obiekt badań nad rolą feromonów w fizjologii rozrodu ssaków. Najwięcej informacji uzyskano dotychczas na temat wpływu bodźców węchowych produkowanych przez samce, a stymulujących układ hormonalny samic. Obecność dorosłego

samca lub jego moczu w klatce, w której znajdują się samice, przyspiesza ich dojrzewanie płciowe, skraca cykl estralny lub może spowodować przerwanie ciąży we wczesnych jej stadiach oraz ponowną owulację [16]. Synteza i wydzielanie tych biologicznie czynnych substancji uwarunkowane jest obecnością testosteronu w organizmie. Kastracja powoduje zahamowanie wydzielania feromonów, a podanie testosteronu wznawia ich produkcję. Istnieje wiele dowodów, że trzy wyżej opisane efekty wywoływane są przez jeden i ten sam bodziec produkowany przez samca, a reakcja samic zależy od różnego stanu hormonalnego samicy.

Przerwanie ciąży u samicy, czyli tzw. blok ciążowy, który powoduje zahamowanie implantacji zarodków i pojawienie się nowej rui, w czasie której samica może być ponownie zapłodniona, stanowi doskonały model do badań nad identyfikacją feromonu produkowanego przez samce myszy [17].

W toku prowadzonych ostatnio badań wykazano, że kastracja samców powoduje u nich powolny zanik wydzielania feromonu blokującego ciążę. Jeszcze po upływie 10 dni po usunięciu jąder u 3 z 10 testowanych samic nastąpiło zahamowanie implantacji i pojawienie się nowej rui. Jednorazowy zastrzyk testosteronu wznawia zdolność wydzielania feromonu już po 24 godzinach, a szczyt aktywności stwierdzono między 2 a 4 dniem po zastrzyku. Zdolność wywoływania bloków przez wydzielany feromon utrzymuje się jeszcze w 10 dniu [20]. Wyniki te potwierdzają hipotezę, że feromon blokujący ciążę jest to związek chemiczny lub też mieszanina kilku substancji, która jest syntetyzowana pod wpływem testosteronu, nie zaś produkt degradacji tego androgeny [17].

Pobudzenie hormonalne samic może być także modulowane przez bodźce węchowe, produkowane przez inne samice tego samego gatunku. U myszy feromon wydzielany przez dorosłe samice hamuje dojrzewanie płciowe młodych samic [25], natomiast u dorosłych samic, hodowanych w dużym zagęszczeniu, następuje wydłużenie cyklu estralnego, a owulacja pojawia się rzadziej niż u samic hodowanych w izolacji.

Przeprowadzone ostatnio badania wskazują, że u samic myszy hodowanych przez 20 dni w obecności innych dojrzałych płciowo samic lub też samic dorosłych, owariektomizowanych, ruja następuje rzadziej niż u samic hodowanych po dwie w klatce (tab 1). Towarzyszy temu wydłużenie fazy diestralnej. Zahamowanie owulacji następuje także pod wpływem moczu samic aktywnych hormonalnie lub z usuniętymi jajnikami (tab. 2). Pozwala to stwierdzić, że samice myszy produkują i wydzielają z moczem feromon, który powoduje zahamowanie rui u innych osobników. Wydzielanie tego feromonu nie jest kontrolowane przez hormony jajnikowe [19].

Badając wrażliwość samic na bodźce węchowe, produkowane przez inne dorosłe samice, stwierdzono, że zahamowanie rui następuje, jeśli samice poddane są działaniu moczu przynajmniej przez 2 godziny w ciągu doby. Efekt feromonu hamującego ruję zależy także od cyklu dobowego. Myszy hodowano w pomieszczeniu oświetlonym przez 14 godz w ciągu doby. Stwierdzono, że wydłużenie fazy diestralnej, a co za tym idzie zahamowanie owulacji, występuje, jeśli samice poddane były działaniu feromonów przez 2 godz na początku fazy świetlnej i na początku fazy ciemnej (tab. 3). Sugeruje to, że cykl świetlny jest kolejnym czynnikiem modyfikującym działanie feromonów [21].

Wpływ różnego zagęszczenia samic myszy na liczbę rui w ciągu 20 dni

2 samice hodowane	Liczba samice	Liczba rui					Liczba rui na samice
		1	2	3	4	5	
Kontrolne 2 ♀	20	1	2	4	7	6	3,8 ± 0,25
+ 8 owk. ♀	20	1	4	11	4	0	2,7 ± 0,16
+ 8 ♀	20	1	9	7	2	1	2,7 ± 0,20
+ 8 kastr. ♂	20	4	7	6	3	0	2,4 ± 0,24

$\bar{x} \pm S.E.$  Średnie nie połączone liniami pionowymi są różne. ANOVA  $p \leq 0,01$ .  
 (jednoczynnikowa analiza wariancji).



Wpływ ściółki różnego pochodzenia na liczbę rui u samic myszy w ciągu 20 dni

22 samice hodowane na ściółce	Liczba samice	Liczba rui w 20 dniach					Liczba rui na samice
		1	2	3	4	5	
Czystej	18	0	2	5	9	2	$3,6 \pm 0,18$
Po 8 kastr. ♂	18	0	2	8	5	3	$3,5 \pm 0,21$
Po 8 owk. ♀	18	4	3	7	3	1	$2,7 \pm 0,26$
Po 8 ♀	18	4	3	7	4	0	$2,6 \pm 0,25$

$\bar{x} \pm S.E.$  Średnie nie połączone liniami pionowymi są różne, ANOVA  $p < 0,01$ .

Liczba rui u samic myszy poddanych działaniu moczu innych samio przez 2 godziny,  
w różnych fazach świetlnych

2 samice hodowane na ściółce po 8 samicach	Liczba samio	Liczba rui w 20 dniach					Liczba rui na samice	
		0	1	2	3	4		5
Kontrolne	20	0	0	3	11	6	0	$3,15 \pm 0,15$
Koniec fazy świetlnej	20	0	3	2	10	4	1	$2,9 \pm 0,24$
Koniec fazy ciemnej	20	0	0	7	9	3	1	$2,9 \pm 0,19$
Początek fazy świetlnej	20	1	3	10	5	1	0	$2,1 \pm 0,20$
Początek fazy ciemnej	20	1	6	5	6	2	0	$2,1 \pm 0,19$

$\bar{x} \pm S.E.$  Średnie nie połączone liniami pionowymi są różne, ANOVA  $p < 0,01$ .

Modelowe badania przeprowadzone w laboratorium na myszach wskazują, że układ hormonalny samicy może być stymulowany przez feromony produkowane przez samce lub też hamowany przez feromony wydzielane przez inne samice. Nasunęło to przypuszczenie, że podobne czynniki mogą wpływać istotnie na rozród innych gryzoni. Jak dotychczas niewiele jest danych na ten temat.

Powszechnie występujące w Polsce takie gatunki norników, jak nornica ruda (*Clethrionomys glareolus*) i darniówka zwyczajna (*Pitymys subterraneus*) pojawiają się masowo na naszych polach, czyniąc poważne szkody w zbiorach. Przebadanie i wyizolowanie odpowiednich feromonów mogłoby dostarczyć doskonałych środków do walki z tymi szkodnikami, podobnie jak w przypadku owadów, gdzie syntetyczne feromony znalazły zastosowanie przy odławianiu korników (*Ips typographus*) i pasożytów bawełny (*Pectinophora gossypiella*).

Norniki (*Microtinae*) stosunkowo niedawno zostały wprowadzone do laboratorium i niewiele jeszcze wiadomo na temat ich biologii rozrodu.

Wstępne badania nad mechanizmami hormonalnymi samicy darniówki zwyczajnej (*Pitymys subterraneus*) pozwalają stwierdzić, że samice hodowane w laboratorium nie wykazały regularnego cyklu płciowego ani owulacji spontanicznej. Owulacja następowała po upływie 10 godz po kopulacji. Średnia liczba jaj wynosiła  $2,17 \pm 0,2$  [8]. Owulację można było także wywołać przez podanie preparatów gonadotropowych. Liczba owulowanych jaj pod wpływem egzogennych hormonów była podobna do liczby jaj owulowanych po kopulacji (10 j PMS + 10 j HCG - średnio  $3,05 \pm 0,5$  jaj). Podwój-

na stymulacja samiec przez podanie preparatów gonadotropowych oraz kopulacji nie zwiększyła liczby owulowanych normalnych jaj, spowodowała natomiast uwolnienie degenerujących oocytów [8]. Jemioło [8] prześledziła także zdolność rozrodczą samic w warunkach laboratoryjnych. Pierwsze płodne kojarzenia stwierdziła w wieku 37 dni. Ciąża u pierworódek trwała średnio 22,9 dnia (zakres 21 do 25 dni). Wielkość miotów średnio 2,47 osobników wahała się od 1 do 5 młodych. Zarówno pierworódki, jak i wieloródki rodziły podobną liczbę młodych. Liczba kolejnych miotów od jednej samicy dochodziła do 18, ale pełna rozrodczość samic utrzymywała się do 9 wykotu. U większości wieloródek następowało krycie poporodowe. Odstępy między wykotami trwały od 18 do 25 dni. U samic darniówki zwyczajnej nie stwierdzono opóźnienia implantacji spowodowanego laktacją.

Niezależnie od utrzymania stałych warunków hodowlanych stwierdzono wpływ pór roku na rozród samic [9]. W sezonie zimowym (od połowy października do połowy stycznia) rodziło się mniej (2,44), a ich śmiertelność w okresie odchowowania była większa niż w pozostałych miesiącach. Od połowy stycznia do połowy kwietnia rodziło się średnio 2,74 osobniki, a od połowy kwietnia do połowy października 2,78. Przyrost masy ciała odchowanych młodych zależał od wielkości miotów oraz od pory roku [9].

Dojrzewanie płciowe samic norników może być w dużym stopniu modulowane przez czynniki socjalne. Efekt przyspieszania dojrzewania płciowego przez dorosłe samice opisano u *Microtus ochrogaster* [7], i *M. pennsylvanicus* [1] oraz u *M. agrestis* [2].

Interakcja między samicami jest u tych gatunków gorzej poznany zjawiskiem. Istnieją pewne dowody, że u *M. pinetorum* pod wpływem dużego zagęszczenia następuje zahamowanie aktywności jajników u dorosłych samic [23].

W naszych badaniach nad darniówką zwyczajną (*P. subterraneus*) podjęto próbę prześledzenia wpływu obecności dorosłej samicy lub jej moczu na stopień rozwoju jajników u dojrzewających płciowo samic [5]. 21-dniowe samice o ciężarze ciała  $9,9 \pm 0,3$  g rozdzielono na 5 grup doświadczalnych i hodowano po 1 do 2 osobników w klatce. Cztery grupy hodowane były przez 3 tygodnie w obecności moczu samic dorosłych, a piątą grupę stanowiły samice kontrolne.

Klatki z młodymi samicami były połączone z klatką metaboliczną, w której umieszczano jedną samicę dorosłą lub samicę dorosłą, owariektomizowaną. Zwierzęta były utrzymywane w klatce metabolicznej przez 24 godziny. Samice - dawcy moczu - były hodowane pojedynczo lub po 6 osobników w klatce (samice zgrupowane). Do klatek metabolicznych były przenoszone raz w tygodniu. Owariektomię wykonano na 4 tygodnie przed użyciem samic do doświadczeń.

Wszystkie młode samice zabijano w 42 dniu życia. Jako test biologiczny użyto ciężary macic i jajników oraz liczbę dużych pęcherzyków jajnikowych. Celem określenia liczby pęcherzyków jajnikowych wykonano preparaty histologiczne, które barwiono hematoksyliną i eozyną. Duże pęcherzyki jajnikowe (typy: 6, 7, 8 i atretyczne) klasyfikowano według kryteriów przyjętych dla myszy [22].

Stwierdzono, że aktywność hormonalna młodych samic może być hamowana przez mocz samic dorosłych normalnych i samic z usuniętymi jajnikami (tab. 4). Występuje tu duże podobieństwo między reakcją młodych samic myszy [4], a reakcją samic darniówki zwyczajnej, jakkolwiek u myszy feromon opóźniający dojrzewanie płciowe był wydzielany przez dorosłe samice tylko w wypadku, gdy były one hodowane w dużym zagęszczeniu. Wzrost zagęszczenia populacji myszy koreluje z pojawieniem się feromonu hamującego dojrzewanie samic tak w warunkach laboratoryjnych jak i w dzikich populacjach [3, 4]. Dziko żyjące darniówki nigdy nie występują w dużym zagęszczeniu i to może tłumaczyć fakt, że mocz nawet pojedynczo hodowanej dorosłej samicy może zawierać czynniki powodujące zahamowanie dojrzewania płciowego młodych osobników.

Większość gatunków gryzoni, występujących w wolno żyjących populacjach, charakteryzuje 3- lub 4-letni cykl populacyjny. Zazwyczaj w pierwszych dwóch latach liczba osobników wzrasta, osiągając swój szczyt w trzecim roku, po czym następuje gwałtowny spadek rozrodczości, a co za tym idzie zmniejszenie liczby osobników w następnym roku. Przyczyny gwałtownego spadku rozrodczości w momencie osiągnięcia szczytu populacyjnego są zapewne wynikiem działania szeregu czynników i nie są dotychczas wyjaśnione.

W toku przeprowadzonych przez nas badań na nornicy rudej (*C1. glareolus*) prześlędzono wpływ obecności dorosłych samic na tempo dojrzewania płciowego młodych samic hodowanych w seminaturalnych warunkach w zagrodzie [12].

Masa macioy i liczba pęcherzyków jajnikowych u samio darniówki zwyczajnej  
poddanych działaniu moczii dorosłych i owariektomizowanych (owk.) samio

Wyszczególnienie	Liczba samio	Masa macioy mg	Liczba pęcherzyków jajnikowych					suma
			typ 6	typ 7	typ 8	atretyczne		
Kontrolne	16	6,8 <sup>±</sup> 0,38 <sup>ab</sup>	8,7 <sup>±</sup> 0,93	4,4 <sup>±</sup> 0,45	3,3 <sup>±</sup> 0,42 <sup>a-d</sup>	3,7 <sup>±</sup> 0,58	20,1 <sup>±</sup> 1,54 <sup>ab</sup>	
Izolowane nieowk. samice	9	5,6 <sup>±</sup> 0,58	5,9 <sup>±</sup> 1,34	5,0 <sup>±</sup> 0,93	1,4 <sup>±</sup> 0,29 <sup>a</sup>	3,6 <sup>±</sup> 0,74	15,9 <sup>±</sup> 2,64	
Zgrupowane nieowk. samice	9	7,2 <sup>±</sup> 0,55	7,0 <sup>±</sup> 0,92	4,1 <sup>±</sup> 0,64	0,9 <sup>±</sup> 0,43 <sup>b</sup>	3,7 <sup>±</sup> 0,61	15,6 <sup>±</sup> 1,94	
Izolowane owk. samice	9	4,9 <sup>±</sup> 0,33 <sup>a</sup>	7,1 <sup>±</sup> 1,14	3,2 <sup>±</sup> 0,43	1,6 <sup>±</sup> 0,24 <sup>c</sup>	3,0 <sup>±</sup> 0,44	14,0 <sup>±</sup> 1,23 <sup>a</sup>	
Zgrupowane owk. samice	9	4,6 <sup>±</sup> 0,57 <sup>b</sup>	6,3 <sup>±</sup> 1,05	3,6 <sup>±</sup> 0,44	1,1 <sup>±</sup> 0,20 <sup>d</sup>	3,1 <sup>±</sup> 0,56	14,1 <sup>±</sup> 1,80 <sup>b</sup>	
ANOVA		p < 0,01	NS	NS	p < 0,01	NS	p < 0,01	
Test Dunnetta		a, b p < 0,01			a-d p < 0,01		a, b p < 0,01	

$\bar{x}$   
 $\bar{X} \pm S.E.$

Doświadczenia przeprowadzono od początku kwietnia do końca września w 1982 r. i powtórzono w podobnych warunkach w 1983 roku. Na początku kwietnia do zagrody o powierzchni  $36 \text{ m}^2$  wpuszczono 30 dorosłych samic i 10 dorosłych samców. Zwierzęta były oznakowane. Powierzchnia podłogi zagrody była pokryta trawą, ale zwierzęta były karmione taką samą dietą jak w laboratorium. Pod koniec każdego miesiąca nornice odławiano przy użyciu żywołówek. Sprawdzano liczbę i płeć. Zwierzęta nie oznakowane uznawano za urodzone w miesiącu odłowu. Samce urodzone w zagrodzie usuwano z doświadczenia, a samice znakowano i losowo dzielono na dwie grupy doświadczalne. Część wpuszczano ponownie do zagrody, a drugą grupę umieszczano w klatkach po 1 lub 2 osobniki. Klatki pozostawiano w tej samej zagrodzie, ale na półkach (klatki na powietrzu). Jeśli w czasie doświadczenia dorosła samica (matka) lub dorosły samiec (ojciec) padł, brakujące zwierzęta uzupełniano z hodowli, tak by ilość osobników pokolenia rodzicielskiego była stała.

Równolegle prowadzono hodowlę w laboratorium. 5 samic i 5 samców użyto w każdym roku. Na początku kwietnia jedną samicę i jednego samca łączono w klatce. Młode obydwu płci trzymano z rodzicami do momentu oddzielenia (21 dzień życia). Następnie młode samice hodowano po 1-2 w klatce do końca doświadczenia. Wszystkie młode samice hodowane w zagrodzie, w klatkach na powietrzu i w laboratorium zabijano 30 września.

Liczbę nornic, które przeżyły do końca doświadczenia, przedstawiono w tabeli 5. Wyniki uzyskane w ciągu dwóch kolejnych lat połączono. Z 44 samic urodzonych w zagrodzie, tylko 27 wybrano losowo do dalszej analizy.



T a b e l a 5

Pokolenie rodzicielskie i młode samice nornicy rudej  
hodowane w zagrodzie, na zewnątrz i w laboratorium,  
zabijane 30 września

Rok	Zagroda			Młode w klatkach		
	pokolenie rodz.	młode	suma	na zewnątrz	w laboratorium	
1982	10	28	25	53	25	13
1983	9	24	19	33	13	13
Suma		44		38		26

Jako test na tempo dojrzewania płciowego samic przyjęto masę macicy, masę jajników oraz liczbę dojrzałych pęcherzyków jajnikowych, czyli test analogiczny, jak dla określenia tempa dojrzewania płciowego samic darniówki zwyczajnej.

Wyniki przedstawione w tabeli 6 wskazują wyraźnie, że masa macicy i jajników oraz liczba pęcherzyków jajnikowych (suma pęcherzyków typu: 6, 7, 8 i atretyczne) u samic dojrzewających w obecności innych samic w zagrodzie była niższa niż u samic należących do pozostałych dwóch grup doświadczalnych. Samice hodowane w zagrodzie oraz w klatkach na powietrzu były żywione tą samą dietą i w tych samych warunkach klimatycznych. Sugeruje to, że na ak-

Masa ciała, masy i jajników oraz ilość pęcherzyków jajnikowych u samio nornioy rudej urodzonych od czerwca do sierpnia i hodowanych w zagrodzie, na zewnątrz i w laboratorium a zabiłanych 30 września

	Młode w klatkach	
	Zagroda	w laboratorium
	na zewnątrz	
Liczba samio	27	26
Masa ciała (g)	19,20 ±0,25 <sup>Aa</sup>	17,79 ±0,59 <sup>A</sup>
Masa masy (mg)	5,64 ±0,25	8,92 ±1,66 <sup>b</sup>
Masa jajników (mg)	1,48 ±0,11	3,10 ±0,28 <sup>C</sup>
Liczba pęcherzyków jajnikowych	2,92 ±0,59	10,00 ±0,93 <sup>D</sup>
		14,52 ±0,42
		9,87 ±0,89 <sup>b</sup>
		3,45 ±0,28 <sup>C</sup>
		12,69 ±1,42 <sup>D</sup>

$\bar{x}$

$\bar{x} \pm$  S.E. Średnie w rzędach nie oznaczone tą samą literą są różne.

ANOVA  $p < 0,05$  dla a, b,  $p < 0,01$  dla A, C, D.

tywność gonad mogły wpłynąć czynniki socjalne, a w tym przypadku obecność innych samiec.

Wyniki przedstawione powyżej wskazują, że dojrzewanie płciowe samiec dwóch gatunków z rodziny Microtinae jest hamowane przez dorosłe samice. W przypadku samiec darniówki zwyczajnej hamowanie to następuje pod wpływem czynników zawartych w moczu dorosłych samiec. Nasuwa się więc przypuszczenie, że u samiec nornicy rudej opóźnienie dojrzewania płciowego może być także wywołane przez czynniki natury chemicznej, zwane feromonami.

Skąpe są informacje na temat dojrzewania płciowego samców nornicy rudej. Jako wskaźnik aktywności hormonalnej samców przyjęto masę jąder i gruczołów dodatkowych (gruczoły koagulujące i gruczoły pęcherzykowe) oraz stopień zaawansowania spermatogenezy. Stwierdzono, że w wieku 3, 4, 6 i 12 tygodni przyrost masy tych narządów następuje stopniowo (tab. 7). Pomimo utrzymania stałych warunków hodowlanych zauważono wyraźny wpływ pory roku. Przyjmując podział roku analogiczny jak przy badaniu aktywności hormonalnej samiec darniówki zwyczajnej stwierdzono, że najcięższe jądra oraz najcięższe gruczoły dodatkowe miały osobniki urodzone i odchowywane w okresie od połowy kwietnia do połowy października (odpowiada to sezonowi rozrodczemu w naturze).

Celem prześledzenia stanu funkcyjnego jąder wykonano preparaty histologiczne, barwione hematoksyliną i eozyną. Przy użyciu indeksu spermatogenicznego (wartość od 5 do 0) określono aktywność nabłonka spermatogenicznego. Wartości 5 odpowiada

Masa ciała, jąder i gruczołów dodatkowych u 3-, 4-, 6- i 12-tygodniowych samic nornicy rudej hodowanych w warunkach laboratoryjnych w trzech sezonach roku

Sezon	Liczba samic	Masa ciała samic (g)	Masa jąder (mg)	Masa gruczołów pęch. + koag. (mg)
<b>3-tygodniowe samce</b>				
15 I - 15 IV	10	9,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	42,3 ± 6,6 <sup>d</sup>	2,4 ± 0,0 <sup>ab</sup>
15 IV - 15 X	9	9,8 ± 0,2 <sup>b</sup>	49,6 ± 3,8 <sup>a</sup>	2,8 ± 0,1 <sup>bo</sup>
15 X - 15 I	10	7,6 ± 0,4 <sup>ab</sup>	26,8 ± 1,9 <sup>ad</sup>	1,9 ± 0,1 <sup>ao</sup>
<b>4-tygodniowe samce</b>				
15 I - 15 IV	9	10,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	64,6 ± 17,0 <sup>d</sup>	3,1 ± 0,5
15 IV - 15 X	10	12,5 ± 0,5 <sup>ab</sup>	112,1 ± 16,2 <sup>ad</sup>	3,9 ± 0,5 <sup>a</sup>
15 X - 15 I	10	10,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	51,3 ± 7,3 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,1 <sup>a</sup>
<b>6-tygodniowe samce</b>				
15 I - 15 IV	9	14,4 ± 0,5	224,4 ± 28,5 <sup>ad</sup>	21,8 ± 8,5
15 IV - 15 X	10	14,3 ± 0,5	315,6 ± 26,8 <sup>bd</sup>	42,4 ± 9,8 <sup>a</sup>
15 XX - 15 I	10	13,7 ± 0,4	108,3 ± 14,3 <sup>ab</sup>	3,7 ± 0,6 <sup>a</sup>
<b>12-tygodniowe samce</b>				
15 I - 15 IV	10	20,3 ± 0,9 <sup>a</sup>	680,0 ± 46,0 <sup>a</sup>	261,8 ± 19,0 <sup>a</sup>
15 IV - 15 X	10	18,5 ± 0,5	630,7 ± 28,1 <sup>b</sup>	268,2 ± 3,1 <sup>b</sup>
15 X - 15 I	10	17,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	426,8 ± 38,9 <sup>ab</sup>	133,8 ± 25,4 <sup>ab</sup>

<sup>x</sup>  
 $\bar{x} \pm S.E.$  ANOVA  $p < 0,01$  dla a, b, o.  $p < 0,05$  dla d.

kompletna spermatogeneza z dużą ilością wykształconych plemników, a wartość 0 określa obecność tylko komórek podporowych i spermatogonii [6].

U 3-tygodniowych samców spermatogeneza osiągała jedynie stadium spermatocytów I rzędu (IS=1). W kanalikach nasiennych samców 6-tygodniowych obserwowano po raz pierwszy dojrzałe plemniki (IS=4), ale tylko w sezonie rozrodczym. Kompletną spermatogenezę (IS=5) stwierdzono dopiero u 12-tygodniowych osobników, pochodzących ze wszystkich trzech sezonów, ale najbardziej zaawansowana była w sezonie rozrodczym. Różnice aktywności nabłonka spermatogenicznego między osobnikami urodzonymi w różnych porach roku potwierdzają fakt utrzymania wyraźnej sezonowości w aktywności hormonalnej samców *C1. glareolus* hodowanych w laboratorium [10].

Procesowi dojrzewania płciowego samców nornicy rudej towarzyszy pojawienie się białek w ich moczu. U 12-tygodniowych samców stwierdzono wyższy poziom białka niż u dorosłych samic i niedojrzałych płciowo samców. Spadek poziomu białek obserwuje się u dorosłych samców po kastracji (tab. 8). Podanie egzogenego testosteronu kastrowanym osobnikom wznawia wydzielanie białka [11]. Wskazuje to, że wydzielanie białka przez samce nornicy rudej jest kontrolowane przez testosteron.

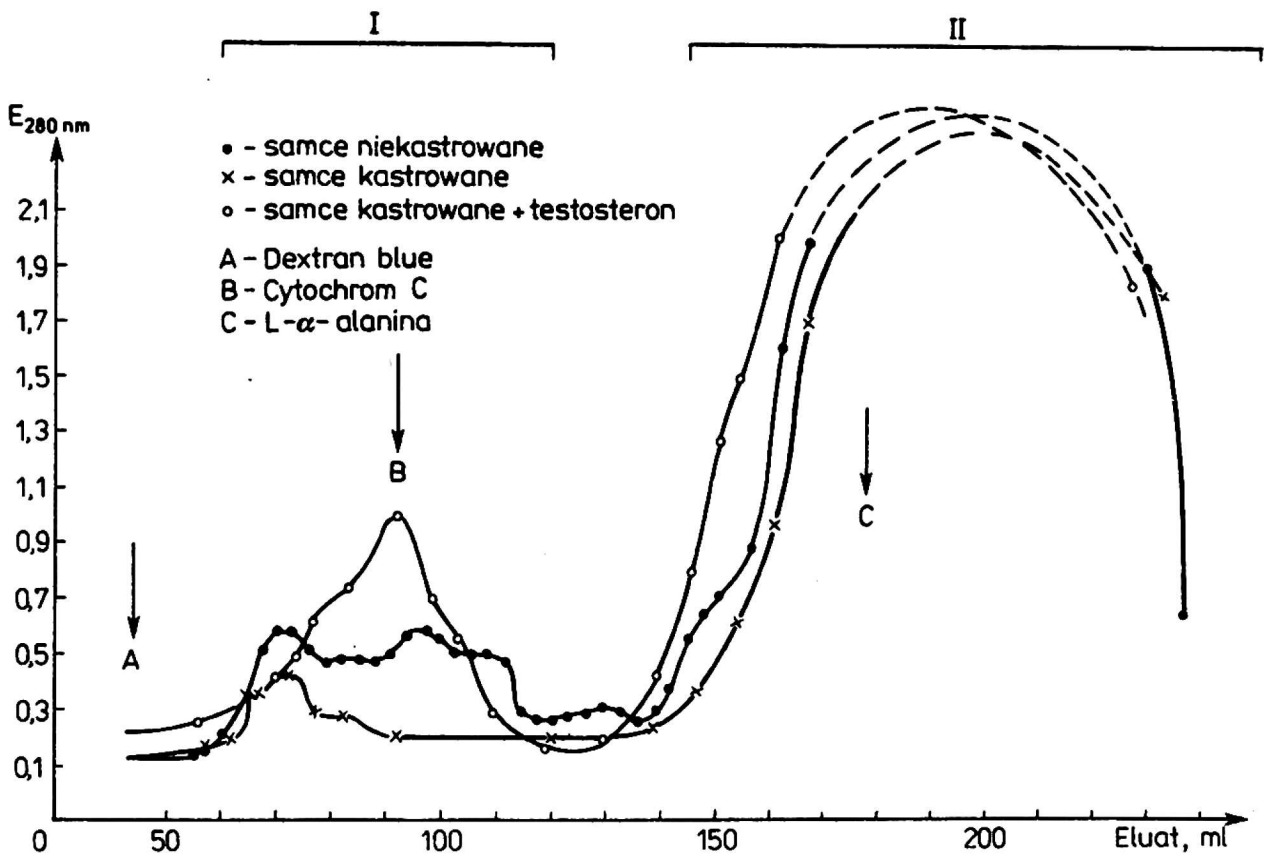
Podobnie u samców myszy i szczurów procesowi dojrzewania płciowego towarzyszy pojawienie się w moczu dużej ilości białek. Synteza ich kontrolowana jest przez androgeny. Ta frakcja białkowa moczu została nazwana białkami zależnymi od płci (sex-dependent proteins).

## Zawartość białek w moczach samców i samic nornioy rudej oznaczana metodą Lowry'ego [13]

	Liczba zwierząt	Poziom białek mg/ml	ANOVA
Samice	12	0,28 ± 0,02 <sup>a</sup>	a-d vs e p < 0,01
Samce			
3-tygodniowe	10	0,31 ± 0,02 <sup>b</sup>	
4-tygodniowe	12	0,38 ± 0,05 <sup>c</sup>	
6-tygodniowe	10	0,35 ± 0,03 <sup>d</sup>	
12-tygodniowe			
Niekastrowane	12	0,83 ± 0,04 <sup>e</sup>	e vs f, g, h, p < 0,01
Kastrowane	10	0,32 ± 0,03 <sup>f</sup>	f vs g, h p < 0,01
Kastr. + testosteron	10	1,06 ± 0,04 <sup>g</sup>	g vs h p < 0,01
Niekastr. + testosteron	11	1,39 ± 0,12 <sup>h</sup>	

 $\bar{x} \pm S.E.$

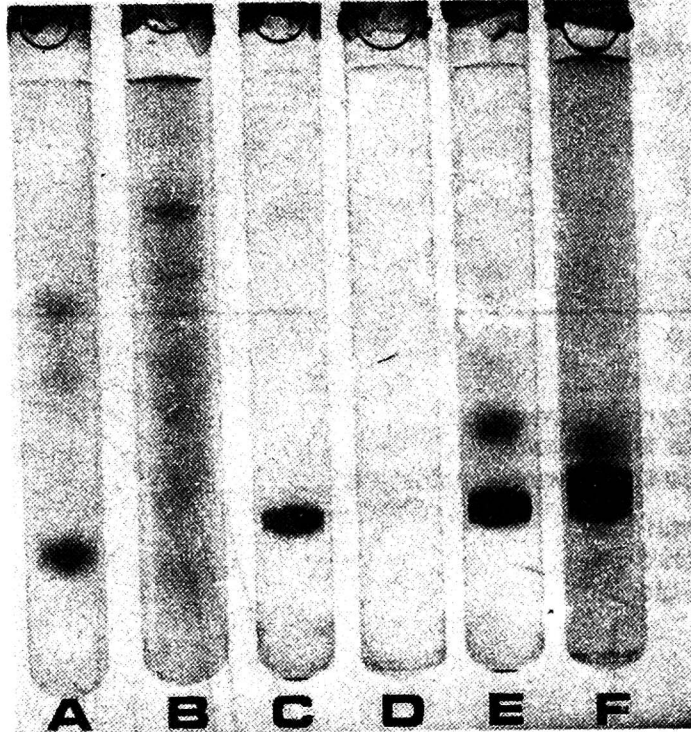
Po rozdziale moczu samców nornicy rudej na kolumnie chromatograficznej Sefadexs G-75 uzyskano dwie frakcje: białkową i niskocząsteczkową, zawierającą m.in. barwki (rys. 1). Kastracja powoduje zmniejszenie szczytu białkowego, a podanie testosteronu wznowia obecność tej frakcji.



Rys. 1. Rozdział moczu samców nornicy rudej na kolumnie chromatograficznej Sefadexs G-75

Dodatkowe informacje uzyskano po rozdziale dializowanego moczu na żelu polykrylamidowym (rys. 2). Stwierdzono, że mocz dojrzałych płciowo samców zawiera białka wykazujące ruchliwość zbliżoną do cytochromu C (żel C). Natomiast mocz samiec lub kastrowanych samców zawiera tylko śladowe ilości tych białek (zele

B i D). Iniekcja testesteronu u kastrowanych samoów powoduje wzrost zawartości białek (żel E) oraz pojawienie się dodatkowych składników o mniejszej ruchliwości.



Rys. 2. Elektroforogram białek moczu w żelu polyakrylamidowym w obecności SDS anoda na dole : A - białka standardowe (5  $\mu$ g), kolejność od góry: albumina z surowicy wołowej (m.cz. 68000), owoalbumina kurza (m.cz. 43000), cytochrom C (m.cz. 13 400); B - 60  $\mu$ l zagęszczonego moczu samicy nornicy rudej; C - 15  $\mu$ l zagęszczonego moczu samców niekastrowanych nornicy rudej; D - 15  $\mu$ l zagęszczonego moczu samców kastrowanych nornicy rudej; E - 15  $\mu$ l zagęszczonego moczu samców kastrowanych nornicy rudej, którym podawano testosteron; F - 15  $\mu$ l zagęszczonego moczu samców myszy ze szczepu niekrewniaczego Outbred

Biologiczna rola białek wydzielanych z moczem nie jest znana, ale istnieją pośrednie dowody, że są one związane z transportem i wydzielaniem feromonów. U myszy frakcja białkowa moczu samców wykazuje biologiczną aktywność. Kontakt młodych samic z tą frak-



cją powoduje przyspieszanie dojrzewania płciowego [24], zaś u dorosłych - synchronizację cyklu estralnego lub blok ciążyowy [15].

Wyniki przedstawionych badań pozwalają przypuszczać, że u norników, podobnie jak u myszy, istnieje komunikacja chemiczna między samicami [5, 12]. Dorosłe samice darniówki zwyczajnej i nornicy rudej wydzielają feromon, który zahamowuje tempo dojrzewania płciowego młodych samic własnego gatunku. Czy i w jakim stopniu feromony produkowane przez samce stymulują układ hormonalny samic norników, trudno obecnie powiedzieć. Występowanie w moczu białek, które u samców myszy są związane z obecnością feromonu, pozwala przypuszczać, że samce nornicy rudej produkują podobne biologicznie czynne substancje [11].

#### LITERATURA

1. Baddaloo E. G. J., Clulov F. V.,: Effects of the male on growth, sexual maturation and ovulation of young female meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*. *Can. J. Zool.* 1981, 59, 415-421.
2. Clarke J. R., Clulov F. V.: The effect of successive matings upon bank vole (*Clethrionomys glareolus*) and vole (*Microtus agrestis*) ovaries. W: *The Development and Maturation of the Ovary and its Functions*. 1973, str. 160-170. Red. H. Peters. *Experta Medica*, Amsterdam.
3. Drickamer L. C.: Social cues and reproduction of rodents and primates. W: *Biosocial Mechanisms of Population Regulation*. 1980, str. 37-53. Red. M. N. Cohen, R. S. Malpass, H. G. Klein. *Yale Univ. Press*, N. Haven and London.
4. Drickamer L. C., McIntosh T. K., Rose E. A.: Effects of ovariectomy on the presence of a maturation-delaying phero-

- none in the urine of female mice. *Horm. Behav.* 1978, 11, 131-137.
5. Frankiewicz J., Marchlewska-Koj A.: Effect of conspecifics on sexual maturation in female European pine vole (*Pitymys subterraneus*). *J. Reprod. Fert.* 1985, 74, 153-156.
  6. Grocock C. A., Clarke J. R.: Photoperiod control of testis activity in the vole, *Microtus agrestis*. *J. Reprod. Fert.* 1974, 39, 337-347.
  7. Hasler H. J., Nalbandov A. V.: The effect of weaning and adult males on sexual maturation in female voles (*Microtus ochrogaster*). *Gen. Comp. Endocr.* 1974, 23, 237-238.
  8. Jemioło B.: Ovulation and fertilization in the vole, *Pitymys subterraneus*. *Biol. Reprod.* 1983a, 28, 523-527.
  9. Jemioło B.: Reproduction in a laboratory colony of the female pine voles, *Pitymys subterraneus*. *Acta Theriol.* 1983b, 28, 197-207.
  10. Kruczek M.: Seasonal effects on sexual maturation of male bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *J. Reprod. Fert.* 1986, 76, (w druku).
  11. Kruczek M., Marchlewska-Koj A.: Androgen-dependent proteins in the urine of bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *J. Reprod. Fert.* 1985, 75, 189-192.
  12. Kruczek M., Marchlewska-Koj A.: Puberty delay of bank vole females in a high density population. *Biol. Reprod.* 1986, w druku.
  13. Lowry L. O., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265-272.
  14. Massey A., Vandenberg J. G.: Puberty delay by a urinary cue from female house mice in feral populations. *Science* 1980, 209, 821-822.
  15. Marchlewska-Koj A.: Pregnancy block elicited by urinary proteins of male mice. *Biol. Reprod.* 1977, 17, 729-732.
  16. Marchlewska-Koj A.: Priming pheromones in mice. W: *Chemical Signals in Vertebrates*. 1983a, str. 135-151. Red. D. Muller-Schwartz, R. H. Silverstein. Plenum Press, New York and London.

17. Marchlewska-Koj A.: Pregnancy Blocking by Pheromones. W: Pheromones and Reproduction in Mammals. 1983b, str. 151-174. Red. J. G. Vandenberg. Academic Press, New York and London.
18. Marchlewska-Koj A.: Pheromones and Mammalian Reproduction. W: Oxford Reviews of Reproductive Biology. 1984, str. 266-302. Red. J. R. Clarke. Clarendon Press, Oxford.
19. Marchlewska-Koj A., Kruczek M., Toch E.: Suppression of estrous cycle of female mice by ovariectomized females. *Hor. Behav.* 1983, 17, 233-236.
20. Marchlewska-Koj A., Drozdowska J.: Testosterone control of the pregnancy block pheromone in mice. *Folia Biol.* 1984, 32, 301-306.
21. Marchlewska-Koj A., Kruczek M.: Acceleration and suppression of oestrus cycle in female mice by pheromones: light effect. *Folia Biol.* 1986, w druku.
22. Pedersen T., Peters H.: Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J. Reprod. Fert.* 1968, 17, 555-557.
23. Schadler M. H.: The effect of crowding on the maturation of gonads in pine voles, *Microtus pinetorum*. *J. Mammal.* 1980, 61, 769-774.
24. Vandenberg J. G., Whitsett J. M., Lombardi J. R.: Partial isolation of pheromone accelerating puberty in female mice. *J. Reprod. Fert.* 1975, 43, 515-523.
25. Vandenberg J. G.: Pheromonal Regulation of Puberty. W: Pheromones and Reproduction in Mammals. 1983, str. 95-112. Red. J. G. Vandenberg. Academic Press, New York and London.

Anna Marchlewska-Koj

## THE ROLE OF THE OLFACTORY SIGNALS IN REPRODUCTION

### S u m m a r y

Pheromone is the chemical compound that released by one animal stimulates the olfactory system of conspecific and evokes

behavioural or hormonal reaction of a recipient. *Mus musculus* is the best investigated species, often used as a model for experiments on the pheromonal effect in reproductive physiology. Our results indicate that female urine contains a pheromone which inhibits ovulation of other females. Since this pheromone is equally released by sexually active and ovariectomized females, one can conclude that its synthesis is not controlled by ovarian hormones. This prompted us to investigate the pheromonal effects in other species of rodents. Preliminary experiments on *Pitymys subterraneus* females indicate that they have no regular oestrous cycle and ovulation is provoked by copulation or by injection of gonadotrophin. Even in the laboratory conditions the hormonal activity of these females is affected by the season of the year. The onset of puberty of juvenile females of *P. subterraneus* could be delayed by pheromones released by adult females. The synthesis of puberty-delaying pheromone is not controlled by ovarian hormones. Also in *Clethrionomys glareolus* females the presence of adult females inhibited maturation in juvenile females.

The time of maturation of juvenile males of *Cl. glareolus* was investigated in laboratory conditions. The influence of the season of the year on the onset of puberty was found. Males born and reared in winter reached puberty later than those reared in spring or in summer.

The urine of *Cl. glareolus* males contains a high level of proteins. The synthesis of these proteins is controlled by

androgens. However biological function of this fraction is unknown. Because in mouse male pheromone is bound with the sex-dependent proteins we suggest that in *Cl. glareolus* male urine the protein fraction is also connected with a similar biological activity.

Анна Мархлевска-Кой

### РОЛЬ ОБАНЫТЕЛЬНЫХ РАЗДРАЖИТЕЛЕЙ В ПРОЦЕССЕ РАЗМНОЖЕНИЯ

#### Р е з ю м е

Химические соединения - феромоны - выделяемые одной особью в результате стимуляции обонятельной системы другой особи одного и того же вида могут вызывать бегавиоральные изменения активности гормональной системы. Мыши являются классическим объектом для исследования роли феромонов млекопитающих. В процессе исследований обнаружили, что в моче взрослых самок мышей находится феромон, который вызывает торможение овуляции у других особей. Этот феромон выделяют гормонально активные самки, а также самки с ампутированными яичниками. Это значит, что синтез данной биологически активной субстанции не контролируется яичниковыми гормонами.

Таким образом можно предполагать, что такой же эффект действия феромонов можно наблюдать и у других видов грызунов. Вступительные опыты, проведенные на самках *Pitymys subterraneus* показывают, что они отличаются нерегулярным циклом, а овуляция провоцируется благодаря копуляции либо путём инъекции гонадотропинов. Даже в лабораторных условиях констатировали ярко выраженное влияние времени года на гормональную активность самок.

Достижение половозрелости молодыми самками *P. subterraneus* задерживается благодаря феромонам, продуцированным взрослыми самками. Синтез этого феромона не контролируется яичниковыми гормонами. У самок *Clethrionomys glareolus* констатировали опаздывание процесса полового созревания молодых особей под влиянием присутствия взрослых самок.

Исследования, касающиеся темпа полового созревания самцов *Cl. glareolus* выращиваемых в лаборатории, указывают на то, что не смотря на одинаковые условия среды, особи рождённые зимой, достигают половозрелости в более медленном темпе по сравнению с самцами, рождёнными весной либо летом.

В моче самцов *Cl. glareolus* обнаружили белок, синтез которого контролируется андрогенами. Биологическая функция этого белка неизвестна. Поскольку у мышей с аналогичным белком связан феромон, продуцированный самцами, весьма вероятно, что у *Cl. glareolus* он имеет сходное значение.