

УДК: 577.8

ВЛИЯНИЕ ПРЕДВАРЯЮЩЕГО ТЕПЛОВОГО ШОКА НА СПОСОБНОСТЬ К ПОЛНОМУ ТЕРМОПАРТЕНОГЕНЕЗУ У ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА *BOMBYX MORI* L.**А.М.Нестеренко, В.В.Клименко***Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)*

Цель работы – изучение влияния предваряющего теплового шока (водный прогрев при 46°C в течение 1 мин) в личиночном и куколочном периодах развития тутового шелкопряда на способность к термическому партеногенезу (СТП) яиц, развивающихся в прогретых особях женского пола. Эффект воздействия оценивали на партеноклоне Р29 (в норме его СТП близка к 100%) по трем показателям: выживаемости личинок и куколок после теплового шока (теплоустойчивость), способности неоплодотворенных яиц имаго, развившихся из выживших особей, к термоактивации и полному партеногенезу при тепловой стимуляции развития по Астаурову (водный прогрев при 46°C в течение 18 мин). Показано, что теплоустойчивость в куколочном периоде многократно возрастает по сравнению с личиночным периодом, что предваряющий тепловой шок на некоторых этапах личиночного периода вызывает резкое снижение СТП клона Р29. Высказано предположение, что в этих участках в ооцитах формируются факторы, необходимые для механизма успешного термопартеногенеза, проявление которых зависит от генов теплового шока. Цитологический анализ гонад прогретых личинок показал наличие в клетках пикнотических ядер, отсутствующих в контроле.

Ключевые слова: *искусственный термический партеногенез, тутовый шелкопряд, тепловой шок (хит-шок), активация яйца, партеноклоны, теплоустойчивость.*

Введение

Метод термического партеногенеза, разработанный Б.Л.Астауровым (1940), представляет собой пример экспериментального управления цитогенетическими механизмами развития у животных. Автор метода показал генетическую обусловленность СТП, возможность ее увеличения через гибридизацию (Астауров, 1940, 1968). Им же был предложен цитогенетический механизм открытого термопартеногенеза, подтвержденный значительно позже (Клименко, Спиридонова, 1979). Была установлена высокая положительная корреляция между СТП и индивидуальной гетерозиготностью женской особи (Алтухов, Клименко, 1978), показана обратимость активационных изменений в яйце (Клименко, 1982), но вопрос о молекулярных основах способности неоплодотворенного яйца к термическому партеногенезу до сих пор остается открытым.

В поиске новых подходов к названной проблеме мы изучили влияние применяемого в методе Астаурова теплового шока (в меньшей экспозиции) на способность к термопартеногенезу клона Р29 (в норме его СТП близка к 100%) в том случае, когда действие сходного «укороченного» шока выпадает на период оогенеза, заведомо предшествующий полной зрелости яйца у имаго. Если в этот период в ооците формируются или уже сформированы факторы (компоненты), которые существенны для СТП и функциональность которых нарушается тепловым шоком, то это будет обнаружено по снижению СТП у имаго, развившихся из личинок, прогретых в этот «чувствительный» период.

Материал и методы

В работе в качестве объекта исследования использовали партеноклон Р29 тутового шелкопряда. В этом клоне способность к искусственному термическому партеногенезу (СТП) доведена почти до 100% (Астауров, 1973). По ходу развития брали случайную выборку (10–20 шт.) личинок или куколок из одного и того же синхронизированного материала клона Р29 (контрольная партия) и прогревали в водном термостате УТ-10 при 46°C в течение 1 мин, охлаждали в воде комнатной температуры (около 22°C) в течение 5 мин, обсушивали на фильтровальной бумаге и выкармливали в одних с контролем условиях. Контрольных личинок и куколок выдерживали 6 мин в воде комнатной температуры, хотя известно, что помещение их в воду даже на несколько часов никак не влияет на жизнеспособность (данные не опубликованы). Следует учитывать также, что генотип всех особей в данной работе одинаков, поскольку они принадлежат одному клону.

Извлеченные из части материала (гусениц и куколок) гонады фиксировали в смеси 96% этанола и ледяной уксусной кислоты (3:1) с добавлением уксуснокислого железа и оставляли в холодильнике при 5°C для последующего изучения. Цитологический анализ проводили по методике, описанной ранее (Щегельская и др., 1986).

Способность к термоактивации оценивалась по проценту пигментированной грены в пробах неоплодотворенных яиц (500 шт.), активированных по методу Астаурова. За способность к полному партеногенезу принимали процент вылупившихся личинок (мурашей) в предварительно отобранных пробах пигментированной грены (100–200 шт.).

Результаты

В табл. 1 представлены результаты оценки теплоустойчивости в клоне Р29 по ходу развития в двух независимых опытах. За контроль в обоих опытах был принят общий процент не подвергавшихся воздействию гусениц, дошедших до стадии имаго. В опыте В инфекционный фон был выше, что выразилось в снижении теплоустойчивости в контроле. Однако и в лучшей ситуации опыта А теплоустойчивость в IV и V возрастах (после 15 суток) не превышает 20%, тогда как в младших личиночных возрастах она достоверно выше этого уровня ($p > 0,95$). В обоих случаях теплоустойчивость в кукольном периоде (старше 27 дней) многократно выше личиночной и, что особенно интересно, оказалась выше контрольной. Это означает, что тепловой шок в кукольном периоде увеличил жизнеспособность на инфекционном фоне, главными компонентами которого были вирусные заболевания, в частности, желтуха.

Таблица 1.

Теплоустойчивость в ходе развития клона Р29 тутового шелкопряда (процент выживших особей)*

Возраст, сутки	Стадия развития	Теплоустойчивость, % Эксперимент А	Теплоустойчивость, % Эксперимент В
0	Контроль	83±6,9	50±9,1
9	Начало III возраста	-	28±4,5
11	Конец III возраста	-	28±4,5
13	Начало IV возраста	-	32±5,1
15	Середина IV возраста	18±5,1	-
17	Начало V возраста	0	-
22	Конец V возраста	17±3,1	-
26	Предкуколки 3 дня	75±5,4	100
27	Предкуколки 4 дня	100	100
30	Куколки 7 дня	100	100
31	Куколки 8 дня	100	100
34	Куколки 11 дня	100	100

* отличия от контроля достоверны в каждом случае ($p > 0,95$)

Результаты оценки СТП представлены в табл. 2, где значения термоактивации и полного партеногенеза соотнесены с соответствующими периодами прогрева по ходу развития. Значения термоактивации в опыте достоверно ниже контрольных значений. В одном случае выявлена точка, в которой термоактивация и полный партеногенез равны 0% (рис. 2, А). Снижение термоактивации не превышает 20%.

Что касается полного партеногенеза, то влияние упреждающего теплового шока на СТП можно было бы считать несущественным во всем исследованном периоде, если бы не выявившееся достоверное падение до нуля способности к полному партеногенезу в конце III возраста. При этом наблюдается лишь небольшое (5%) снижение способности к термоактивации.

При цитологическом анализе яичников прогретых личинок в клетках были обнаружены пикнотические ядра, которые отсутствовали в контроле. Связь пикноза с прогревом представляется очевидной, но его отношение к некоторому снижению СТП требует исследований молекулярного уровня.

Таблица 2.

Термоактивация и полный партеногенез (критерии оценки СТП) в случае предваряющего теплового шока по ходу личиночного и кукольного развития партеноклона P29*

Возраст, сутки	Стадии развития	Термоактивация, % эксперимент А	Полный партеногенез, % эксперимент В	Термоактивация, % эксперимент А	Полный партеногенез, % эксперимент В
0	Контроль	96±3,5	90,6±5,3	90,39±5,3	97,8±2,6
9	Начало III возраста	-	-	87,19±0,79	91,51±0,73
11	Конец III возраста	-	-	87,71±0,81	0
13	Начало IV возраста	-	-	96,64±0,48	87,06±0,91
15	Середина IV возраста	92,7±0,6	89,3±0,8	-	-
17	Начало V возраста	0	0	-	-
22	Конец V возраста	96,2±0,4	76,2±0,9	-	-
26	Предкуколки 3 дня	95±0,48	73±1,4	89,7±0,94	86,13±1,53
27	Предкуколки 4 дня	90±1,1	80,1±1,6	90,69±0,94	90,31±0,79
30	Куколки 7 дня	91±0,6	80±0,9	82,26±0,62	87,5±0,59
31	Куколки 8 дня	91±0,6	77,5±0,9	88,97±0,87	71,03±1,29
34	Куколки 11 дня	96±0,6	86±1,1	88,4±1,18	87,44±1,31
35	Куколки 12 дня	0	0	90,26±1,06	85,51±1,33

* отличия от контроля достоверны в каждом случае ($p > 0,95$)

Обсуждение и выводы

Полученные попутно в настоящей работе данные по изменению теплоустойчивости в ходе развития тутового шелкопряда необходимы как общий фон для более глубокого изучения влияния теплового шока в ходе онтогенеза на способность к искусственному термопартеногенезу. Повышенная теплоустойчивость в младших возрастах объяснима близостью к известной высокой теплоустойчивости развивающегося яйца, а высокая теплоустойчивость в кукольном периоде соответствует приближению к высокой теплоустойчивости зрелого яйца и, видимо, целого организма. Между этими двумя периодами находится IV и V личиночный возраст, в которых теплоустойчивость невысока. Что касается ее самых низких значений в начале пятого возраста, то у шелководов хорошо известно, что тепловой шок в этом периоде легко провоцирует ядерный полиэдроз, или желтуху, а значит, и снижение жизнеспособности (Кириченко, 1995). С другой стороны, известен также термический метод обеззараживания в кукольном периоде, когда прогрев повышает жизнеспособность (Астауров, 1956). Показанная нами повышенная теплоустойчивость в опыте по сравнению с контролем хорошо с этим согласуется. Обнаружение нами пикноза в яичниках прогретых особей поднимает вопрос о соответствии степени пикноза уровню теплоустойчивости и СТП.

Наибольший интерес для изучения природы СТП, механизма термопартеногенеза представляют такие периоды оогенеза, когда формируются компоненты и факторы, определяющие СТП. С этой точки зрения значительный интерес представляет выявившийся в нашей работе период в конце III личиночного возраста, когда тепловой шок сводит к нулю способность к полному партеногенезу, оставляя почти нетронутой способность к термоактивации. Это соответствует тому нередкому случаю, когда активированная по Астаурову грена бабочки пигментируется, но мураши из яиц не выходят. Объяснение этому явлению следует, возможно, искать не только и не столько в

несрабатывании цитогенетического механизма термопартеногенеза, сколько в невозможности выживания нормально образующегося партеногенетического зародыша и гибели его на определенной стадии из-за отсутствия в модифицированной тепловым шоком цитоплазме яйца необходимых или полноценных факторов развития, например, белков, синтез которых зависит от генотипа материнского организма (Клюменко, 2001). Для дальнейшего анализа необходимо более детальное изучение связи СТП с тепловым шоком в III личиночном возрасте.

В результате проведенного исследования показано, что:

- в III личиночном возрасте тутового шелкопряда тепловой шок (46°C–1 мин) может резко снизить способность к полному термопартеногенезу и почти не изменить способности к термоактивации;
- предвещающий тепловой шок на всем изученном отрезке онтогенеза снижает способность к термоактивации, но не более чем на 20%;
- за исключением III личиночного возраста, упреждающий тепловой шок в исследованных участках онтогенеза практически не снижает способность к полному партеногенезу;
- тепловой шок в куколичном периоде повышает жизнеспособность, что проявляется в повышении теплоустойчивости, особенно на инфекционном фоне.

Список литературы

- Алтухов Ю.П., Клименко В.В. Положительная корреляция между уровнем индивидуальной гетерозиготности и способностью к полному термическому партеногенезу у тутового шелкопряда // Доклады Академии Наук СССР. – 1978. – Т.239, №4. – С.460–462.
- Астауров Б.Л. Искусственный партеногенез у тутового шелкопряда. – М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1940. – 240с.
- Астауров Б.Л. Цитогенетика развития тутового шелкопряда и ее экспериментальный контроль. – М.: Наука, 1968. – 103с.
- Астауров Б.Л. Отбор по способности к искусственному термическому партеногенезу и получение улучшенных по этому признаку партеноклонов у шелковичного червя // Генетика. – 1973. – Т.9, №9. – С. 93–106.
- Астауров Б.Л. О биологических основах прижизненного обеззараживания растений и пойкилотермных животных с помощью сильных прогревов // Усп. совр. биол. – 1956. – Т.42, №1(4). – С. 62–86.
- Кириченко И.А. Основные инфекционные болезни тутового шелкопряда в Украине и меры борьбы с ними. – Харьков: РИП Оригинал, 1995. – 208с.
- Клименко В.В., Спиридонова Т.Л. Элиминационный хроматин и искусственный партеногенез у тутового шелкопряда // Цитология. – 1979. – Т.19, №7. – С. 793–796.
- Клименко В.В. Механизм искусственного партеногенеза у тутового шелкопряда. Сообщение 3. Обратимость вторичных активационных изменений при термо- и криоактивации // Генетика. – 1982. – Т.18, №1. – С. 64–72.
- Щегельская Е.А., Спиридонова Т.Л., Клименко В.В. Методы цитологического анализа профазы мейоза у тутового шелкопряда // Известия АН Молдавской ССР. Серия биологических и химических наук. – 1986. – №1. – С.67–70.
- Klymenko V.V. Parthenogenesis and Cloning in the Silkworm *Bombyx mori* L.: Problems and prospects // Journal of Insect Biotechnology and sericology. – 2001. – Vol.70 – P. 155–165.

ВПЛИВ ПОПЕРЕДНЬОГО ТЕПЛОВОГО ШОКУ НА ЗДАТНІСТЬ ДО ПОВНОГО ПАРТЕНОГЕНЕЗУ У ШОВКОВИЧНОГО ШОВКОПРЯДА *BOMBYX MORI* L.

А.М.Нестеренко, В.В.Клименко

Метою даної роботи було вивчення впливу попереднього теплового шоку (вода при 46°C протягом 1 хв.) на личинкових та лялечкових стадіях розвитку шовковичного шовкопряда на здатність до термічного партеногенезу (ЗТП) яєць, що розвиваються в прогрітих особинах жіночої статі. Вплив оцінювали у клоні Р29 (близько 100% ЗТП) у трьох аспектах: кількість личинок та лялечок, що вижили (термостійкість), здатність незапліднених яєць імаго, що розвилися з особин, що вижили, до термоактивації та повного партеногенезу після термічної стимуляції їх розвитку за Астауровим (вода при 46°C протягом 18 хв.). Було показано, що термостійкість лялечок є значно вищою порівняно із личинковим періодом та що попередній тепловий шок у деяких районах личинкового періоду може викликати різке зниження ЗТП клону Р29. Припускається, що під час цих часових інтервалів в ооцитах утворюються фактори, що необхідні для механізму успішного термопартеногенезу, функціональність яких залежить від

генів теплового шоку. Цитологічний аналіз прогрітих гонад показав пікнотичні ядра, що відсутні у контролі.

Ключові слова: *штучний термічний партеногенез, тепловий шок, активація яйця, партенокони, теплостійкість.*

INFLUENCE OF ANTICIPATING HEAT SHOCK ON CAPABILITY FOR COMPLETE THERMOPARTHENOGENESIS IN MULBERRY SILKWORM *BOMBYX MORI L.*

A.M.Nesterenko, V.V.Klimenko

The purpose of this work is to study effects of anticipating heat shock (water at 46°C during 1 min) in larval and pupal developmental periods of the mulberry silkworm on the capability for thermal parthenogenesis (CTP) of the eggs that develop in the shocked females. The effect was estimated in parthenoclone P29 (ca 100% CTP) in three aspects: survivability of the larvae and pupae shocked (thermoresistance), capability of the unfertilized eggs of the imagoes developed from surviving individuals for thermoactivation and complete parthenogenesis after thermal stimulation of their development by Astaurov technique (water at 46°C during 18 min). It has been shown that pupal thermoresistance is much higher as compared to larval period and that anticipating heat shock in some areas of larval period can cause a sharp decline of CTP of clone P29. It is supposed that during these time intervals factors necessary for the mechanism of successful thermoparthenogenesis are formed in oocytes, their functionality depending on the heat shock genes. The cytological analysis of the heat shocked gonads shows picnotic nuclei in their cells, which are absent in the control.

Key words: *artificial thermal parthenogenesis, mulberry silkworm, heat shock, egg activation, parthenoclones, thermoresistance.*

**Представлено О.А.Щегельською
Рекомендовано до друку Л.І.Воробйовою**