

УДК: 577.8

ПОВЫШЕНИЕ СПОСОБНОСТИ К ТЕРМИЧЕСКОМУ ПАРТЕНОГЕНЕЗУ ЯИЦ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА, РАЗВИВШИХСЯ В ЯИЧНИКАХ, ИМПЛАНТИРОВАННЫХ В ЛИЧИНОЧНОМ ВОЗРАСТЕ В СОМУ РЕКОРДНОГО ПО ДАННОМУ ПРИЗНАКУ ПАРТЕНОКЛОНА

К.А.Дорошенко, В.В.Клименко

Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

В работе показана возможность повышения способности к термическому партеногенезу яиц породы тутового шелкопряда Советская-5 при трансплантации в личиночном возрасте яичников этой породы в полость тела гусениц клона-рекордиста по этому признаку. Показателями оцениваемого признака служили способность к термоактивации и способность к полному партеногенезу яиц, развившихся в имплантатах. Показана важность соотношения возрастов донора и реципиента для достижения наилучшего результата. Изучено повышение способности к термипартеногенезу в зависимости от возраста проведения трансплантации. Выявляемый при цитологическом анализе уровень пикноза в дальнейшем может быть использован для оценки степени физиологического соответствия донора и реципиента. Увеличение способности к термипартеногенезу при трансплантации гонад в рекордный клон может открыть возможность клонирования любого женского генотипа у тутового шелкопряда.

Ключевые слова: *тутовый шелкопряд, искусственный партеногенез, клонирование, трансплантация гонад, оогенез.*

Введение

Между способностью к термическому партеногенезу и уровнем индивидуальной гетерозиготности существует высокая положительная корреляция (Астауров, 1940; Алтухов, Клименко, 1978). Напротив, известно, что ряд ценных признаков, в том числе хозяйственно важных, в максимальной степени проявляются именно в инбредных линиях (например, длина и тонина нити). Использование в таких случаях термипартеногенеза по Астаурову для клонирования оказывается невозможным.

Основой данной работы послужили исследования, в которых было показано, что яйца инбредной линии, развивавшиеся в яичниках, имплантированных в гусениц клона-рекордиста, имели повышенную способность к термическому партеногенезу (Клюменко, 2001). Изученная инбредная линия происходила из самого клона Р29 через мейотический партеногенез (Струнников, 1987) и не имела генов, не содержащихся в материнском клоне. Было выдвинуто предположение, что с помощью трансплантации яичников можно получить партеноклон от любой линии, не обладающей способностью к термипартеногенезу. Действительно, при трансплантации яичника происходит обогащение реципиентом белкового набора яиц имплантата. Это происходит в результате того, что белки, синтезируемые в реципиенте и поступающие в ооциты имплантированного яичника, не всегда идентичны белкам донора из-за различия генотипов донора и реципиента. Вследствие этого происходит расширение спектра белков формирующегося яйца, подтверждаемое с помощью электрофореза. Поэтому увеличивается вероятность формирования белково-ферментного комплекса, обеспечивающего повышение способности к термическому партеногенезу в инбредном имплантате (Клюменко, 2001).

Предметом данного исследования стало изучение возможности повышения невысокой способности к термическому партеногенезу яиц породы Советская-5 с помощью трансплантации яичников этой породы в полость тела гусениц клона-рекордиста Р29 (Астауров, 1973) в различных личиночных возрастах.

Материалы и методы

Объектами данного исследования служили породы тутового шелкопряда Советская-5 и партеноклон Р29. В качестве донора гонад использовали гусениц породы Советская-5. Данная порода мечена по полу на стадии грены: тёмная гrena – самки, белая – самцы. Это обусловлено транслокацией на W-хромосому нормального доминантного w_2^+ -аллеля, подавляющего белую окраску яиц у самок, но не у самцов, у которых W-хромосома отсутствует (Струнников, 1987). Реципиентом служил упомянутый выше клон Р29, выведенный Астауровым. Он обладает рекордно высокой способностью к термипартеногенезу, высокой жизнеспособностью и рядом ценных генетических маркеров.

Трансплантации гонад производили по разработанной ранее методике (Спиридонова и др., 1987). Оперированных гусениц выкармливали в одинаковых условиях с контролем в соответствии с принятыми зоотехническими нормами (Tazima, 1978).

Способность к термоактивации оценивали по проценту пигментированных яиц в пробах, активированных по методу Астаурова. За способность к полному термопартеногенезу принимали процент вышедших гусениц в пробах пигментированной грены.

Из части гусениц и куколок извлекали гонады и фиксировали в смеси этанола и уксусной кислоты в соотношении 3:1 с добавлением уксуснокислого железа и оставляли в холодильнике при 5°C, после чего изучали цитологические препараты.

Результаты

В четырех сериях опытов последовательно произвели трансплантации гонад во II, III, IV и V личиночных возрастах. Из выживших имаго-реципиентов извлекали овариолы имплантата; содержащиеся в них яйца активировали одной пробой; оценки термоактивации и полного партеногенеза для каждой такой пробы принимали за координаты точки на партенодиаграмме (рис. 1).

На диаграмме способность к термопартеногенезу исследуемой породы соответствует контрольной точке K2, а клона реципиента P29 – точке K1. Практически все опытные точки расположены правее и выше точки K2, а это означает, что способность к партеногенезу яиц, развившихся в имплантатах, достоверно повышается по сравнению с таковой изучаемого донора гонад (порода Советская-5).

Термоактивация в опыте была не ниже 52%, а полный партеногенез – не ниже 63% (за исключением одного случая). Все точки III возраста лежат выше 80% полного партеногенеза и выше всех прочих точек (за исключением трех точек IV возраста). Это означает, что оптимальным возрастом для трансплантационного метода клонирования, вероятно, является III личиночный возраст. В трех случаях (III и IV возраста) полный партеногенез был близок к 90%, что считается очень высоким уровнем.

Значительный разброс точек партенодиаграммы по активации и по полному партеногенезу свидетельствует о недостаточном совершенстве метода. При этом наиболее трудным моментом, если не принимать пока во внимание необходимость повышенной стерильности при выкармке оперированного материала, является подбор соотношения возрастов донора и реципиента, который может зависеть от генотипов того и другого, а потому должен подбираться опытным путем в каждом отдельном случае. Представляется возможным, на основе предварительных данных, использовать для этой цели в качестве критерия уровень пикноза в имплантате.

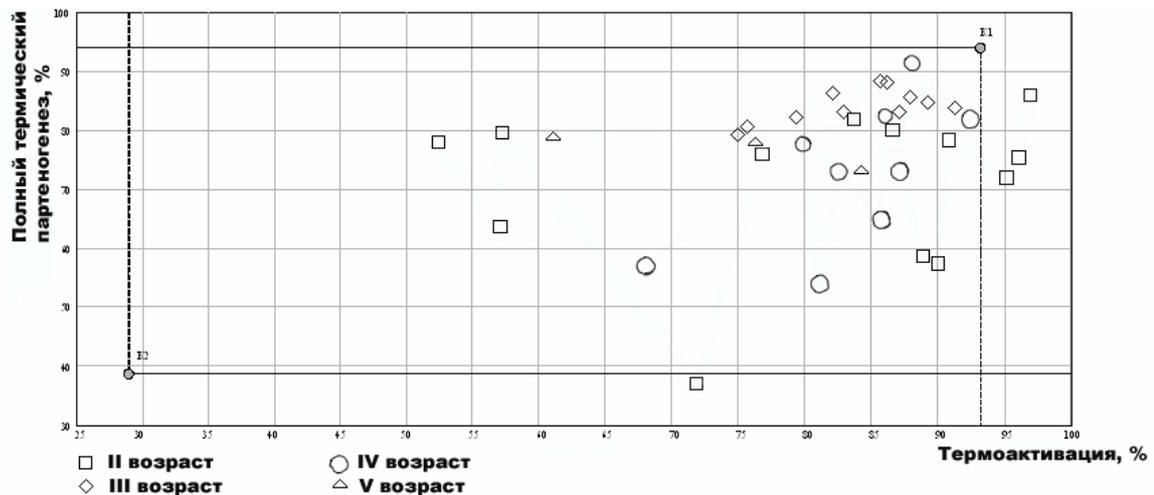


Рис. 1. Партенодиаграмма способности к партеногенезу яиц, развившихся в яичниках, имплантированных в личинок партеноклона-рекордиста P29 в различных возрастах

Обсуждение

Результаты настоящего исследования подтверждают высказанное ранее предположение о возможности повышения способности к термопартеногенезу «слабых» в этом отношении женских генотипов путем имплантации яичников «слабых» самок в полость тела личинок рекордного по партеногенезу клона. В использованном ранее специфическом материале уровень гетерозиготности

реципиента (P29) был гораздо выше, чем у донора (инбредная линия из клона P29, прошедшая 14 поколений тесного инбридинга), т.е. заведомо у реципиента были гены (аллели), которых не было в имплантате (доноре), но все аллели донора имелись в реципиенте. Повышению способности к партеногенезу у имплантата соответствовало расширение белкового спектра в ооците, подтвержденное электрофорезом (Клименко, Спиридонова, 1987; Klymenko, 2001). В настоящей работе донор не имел никакого отношения к выведению партеноклона P29, т.е. заведомо в нем были гены, отсутствовавшие у клона-реципиента, и наоборот. Однако, как и прежде, мы наблюдаем отчетливое повышение способности к термопартеногенезу по обоим его параметрам: активации и способности к полному развитию.

Очевидно, формирование белково-ферментного комплекса, определяющего способность к термопартеногенезу, не является в ооците ни автономным, то есть строго контролируемым генотипом имплантата процессом, ни процессом пассивным, то есть идущим целиком за счет белков гемолимфы реципиента. Это находится в полном соответствии с принятыми представлениями об оогенезе тутового шелкопряда и других насекомых (Telfer et al., 1932; Irie, Yamashita, 1983). Надо полагать, что при различии генотипов донора и реципиента неизбежно расширяется белковый спектр созревающего ооцита, что увеличивает вероятность формирования белково-ферментного комплекса, достаточного для возникновения заметной способности к термопартеногенезу.

При изучении цитологических препаратов имплантатов, зафиксированных на разных стадиях, в них обнаружено наличие различных количеств пикнотических ядер. Мы предполагаем, что их количество и распределение в имплантате зависит от степени физиологического несоответствия между статусами донора (имплантата) и реципиента, а также от неизбежного трансплантационного стресса, и после специального исследования может быть использовано в качестве оценки степени соответствия донора и реципиента в предлагаемом трансплантационном методе клонирования.

Полученные в настоящей работе данные дают основания надеяться, что с помощью метода трансплантации яичников можно будет партеноклонировать любой женский генотип.

Список литературы

- Астауров Б..Л. Искусственный партеногенез у тутового шелкопряда. – М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1940. – 240с.
- Алтухов Ю.П., Клименко В.В. Положительная корреляция между уровнем индивидуальной гетерозиготности и способностью к полному термическому партеногенезу у тутового шелкопряда // Докл. АН СССР. – 1978. – Т.239, №2. – С. 460–462.
- Клименко В.В., Спиридонова Т.Л. Повышение уровня гетерозиготности увеличивает способность к полному термическому партеногенезу через изменение состава ооцитов // Тез. докл 5 съезда МОГИС. – Кишинев, 1987. – С. 26–27.
- Астауров Б..Л. Отбор по способности к искусственному термическому партеногенезу и получение улучшенных по этому признаку партеноклонов у шелкопряда // Генетика. – 1973. – Т.9, №9. – С. 93–106.
- Струнников В.А. Генетические методы селекции и регуляции пола у тутового шелкопряда. – М.: Агропромиздат, 1987. – 328с.
- Tazima Y. The silkworm an important laboratory tool. – Токуо: Kodansha, 1978. – 307с.
- Спиридонова Т.Л., Щегельская Е.А., Клименко В.В. Трансплантация гонад у гусениц чешуекрылых // Известия АН Молдавской ССР. Серия биологических и химических наук. – 1987. – №2. – С. 69–71.
- Klymenko V.V. Parthenogenesis and cloning in the silkworm *Bombyx mori* L.: Problems and prospects // Insect biotechnology and sericology. – 2001. – Vol.70. – P. 155–165.
- Irie K., Yamashita O. Egg-specific protein in the silkworm, *Bombyx mori*: purification, properties, localization and titre changes during oogenesis and embryogenesis // Insect Biochem. – 1983. – Vol.13. – P. 71–80.
- Telfer W.H., Huebner S., Smith D.S. The cell biology of vitellogenic follicles in *Hyalophora* and *Rhodnius* // Insect Ultrastructure. Vol.1. – New York and London: Plenum Press, 1932. – P. 118–149.

ПІДВИЩЕННЯ ЗДАТНОСТІ ДО ТЕРМІЧНОГО ПАРТЕНОГЕНЕЗУ ЯЄЦЬ ШОВКОВИЧНОГО ШОВКОПРЯДА, ЩО РОЗВИЛИСЯ В ЯЄЧНИКАХ, ІМПЛАНТОВАНИХ У ЛИЧИНКОВОМУ ВІЦІ В СОМУ РЕКОРДНОГО ЗА ДАНОЮ ОЗНАКОЮ ПАРТЕНОКЛОНА

К.О.Дорошенко, В.В.Клименко

У роботі показана можливість підвищення здатності до термічного партеногенезу яєць породи шовковичного шовкопряда Радянська-5 при трансплантації в личинковому віці яєчників цієї породи в порожнину тіла гусениць клону-рекордиста за цією ознакою. Показниками оцінюваної ознаки були здатність до термоактивації й здатність до повного партеногенезу яєць, що

розвилися в імплантатах. Показано важливість співвідношення віків донора й реципієнта для досягнення найкращого результату. Вивчено підвищення здатності до термопартеногенезу залежно від віку проведення трансплантації. Рівень пікноза, що виявляється при цитологічному аналізі, надалі може бути використаний для оцінки ступеня фізіологічної відповідності донора й реципієнта. Збільшення здатності до термопартеногенезу при трансплантації гонад у рекордний клон може відкрити можливість клонування будь-якого жіночого генотипу в шовковичного шовкопряда.

Ключові слова: *шовковичний шовкопряд, штучний партеногенез, клонування, трансплантація гонад, оогенез.*

INCREASE OF CAPABILITY FOR THERMOPARTHENOGENESIS OF THE SILKWORM EGGS DEVELOPED IN OVARIES, IMPLANTED INTO HOSTS OF RECORD PARTHENOCLONE BY THIS CHARACTERISTIC IN LARVAL INSTAR

K.A.Doroshenko, V.V.Klimenko

The possibility of capacity rise for thermal parthenogenesis of silkworm stock Soviet-5 eggs with the help of ovaries transplantation of this stock into hosts of record clone by this characteristic in larval instar has been shown in the work. The capabilities for thermoactivation and for complete parthenogenesis of eggs developed in implants served as values of an estimated characteristic. The importance of donor and recipient instars correspondence for obtaining of the best result has been shown. The increase of capability for thermoparthenogenesis depending on stage of transplantation carrying out has been studied. In the sequel the level of pycnosis revealed during the cytologic analysis could be used for an estimation of the donor and the recipient physiological conformity degree. The increase of capability for thermoparthenogenesis with the help of gonad transplantation in record clone can enable cloning of any female genotype of silkworm.

Key words: *silkworm, artificial parthenogenesis, cloning, gonad transplantation, oogenesis.*

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