

УДК: 577.8

**СПОСОБНОСТЬ К ТЕРМОПАРТЕНОГЕНЕЗУ ЯИЦ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА *BOMBYX MORI* L.,
РАЗВИВШИХСЯ В ЯИЧНИКАХ, ИМПЛАНТИРОВАННЫХ В ЛИЧИНОЧНОМ ВОЗРАСТЕ В СОМУ
ПРОТИВОПОЛОЖНОГО ПОЛА
В.Ю.Забелина, В.В.Клименко**

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

В работе изучено развитие яичников клона Р29, трансплантированных в различных личиночных возрастах в полость тела самцов для оценки хода оогенеза в чужеродном окружении и способности к термопартеногенезу яиц, созревающих в соме противоположного пола. Используются микрохирургические методы трансплантации гонад и метод термической активации яиц по Астаурову. Показано, что для получения яиц, способных к термопартеногенезу, трансплантация яичников должна производиться не ранее пятого возраста; в противном случае яичники не завершают своего развития и, по-видимому, дегенерируют. Ооциты, достигшие созревания в соме самцов, способны к термопартеногенезу, однако уровень его ниже, чем у клона-донора Р29, что объяснимо установленным ранее дефицитом вителлогенина в ооцитах имплантата.

Ключевые слова: *тутовый шелкопряд, термический партеногенез, клонирование, партеноклон, трансплантация гонад, имплантат, дегенерация, оогенез.*

Введение

Известно, что способность тутового шелкопряда к термическому партеногенезу зависит от генотипа: не каждый женский генотип тутового шелкопряда может быть клонирован путем термического партеногенеза (Алтухов, Клименко, 1978; Астауров, 1940, 1973; Клименко, 1982). В этом усматривается существенный недостаток данного метода. Поэтому поиск путей, позволяющих клонировать любой женский генотип, в том числе инбредный, остается весьма актуальным.

Основой данной работы послужили исследования Ямашиты (Yamashita, Irie, 1980) по пересадке яичников в полость тела самцов в третий день последнего (пятого) личиночного возраста. Было установлено, что яйца, созревающие в соме противоположного пола, несмотря на отсутствие вителлогенина, способны завершать эмбриональное и постэмбриональное развитие, если их активировать методом искусственного термопартеногенеза по Астаурову (Астауров, 1940).

Целью настоящей работы было определение момента, начиная с которого оогенез в пересаженном в чужеродную сому яичнике будет завершаться развитием яиц, в той или иной степени способных к термопартеногенезу. Эту степень принято оценивать по двум параметрам: способности к активации (процент пигментированных яиц) и способности к полному партеногенезу (процент вылупившихся из активированных яиц личинок) (Астауров, 1940).

В качестве донора яичников в нашей работе использован партеноклон Р29 с заведомо высокой, больше 90%, способностью к термопартеногенезу, чего не могло быть в работе японского исследователя. В таком случае изучение изменения способности к искусственному партеногенезу в условиях протекания процессов оогенеза в чужеродной соме позволит приблизиться к пониманию природы факторов, ответственных за детерминацию способности к активации и полному термопартеногенезу. В свою очередь, выяснение механизмов термопартеногенеза необходимо для решения проблемы клонирования любого женского генотипа у тутового шелкопряда.

Материалы и методы

Объектом исследования служил тутовый шелкопряд *Bombyx mori* L. В качестве материала использовали партеногенетический диплоидный клон Р29 (Астауров, 1973) и породу, меченную по полу на стадии грены, Советская-5 (Струнников, 1987). Партеногенетический клон Р29 обладает высокой способностью к партеногенезу – водный прогрев при 46°C в течение 18 мин. дает около 100% активированных (пигментированных) яиц. При этом процент вылупления личинок (полный партеногенез) составляет 95%. Порода Советская-5 позволяет уже на стадии грены отличать самцов от самок, выращивать последних отдельно для использования в опытах по трансплантации гонад. Экспериментальный материал выращивали в соответствии с общепринятыми зоотехническими требованиями (Tazima, 1978).

Трансплантация гонад. Метод заключается в экстирпации семенников реципиента и имплантации на их место яичников донора. Трансплантацию гонад проводили во II, III, IV и V личиночных возрастах по разработанной ранее методике (Спиридонова и др., 1987). В качестве доноров использовали самок клона

P29, в качестве реципиентов – самцов породы Советская-5. Контролем являлся клон P29. Дошедших до стадии имаго самцов вскрывали для извлечения имплантата и изучения развившихся в нем яиц.

Термоактивация. Ооциты, развившиеся в соме самцов, извлекали и подвергали термоактивации по методу Астаурова (водный прогрев при 46°C в течение 18 минут). Способность гены к термоактивации оценивали по проценту пигментированных яиц в пробах; пигментация клеток серозной оболочки свидетельствует о вхождении развивающихся яиц в диапаузу. Для устранения диапаузы проводили преждевременную "зимовку": грену хранили в холодильнике при температуре +5°C в течение 100 дней, затем помещали ее в надлежащие условия инкубации (20–25°C). Вышедших в течение трех недель гусениц подсчитывали для оценки способности к полному термопартеногенезу.

Результаты исследования и обсуждение

Из 158 реципиентов, получивших имплантаты во втором, третьем и четвертом возрастах, до седьмого дня пятого возраста дошли 103 гусеницы (65,2%). Жизнеспособность реципиентов после операции в различных возрастах представлена в табл. 1. До стадии имаго дошли 15 бабочек (15,7%); при вскрытии ни в одной из них имплантата не обнаружили.

Таблица 1.

Жизнеспособность оперированных гусениц породы Советская-5

Возраст операции	Оперированные личинки, шт.	Количество жизнеспособных в конце V возраста, шт. (%)	Количество жизнеспособных на стадии имаго, шт. (%)
II	57	44 (77,2)	6 (13,6)
III	55	37 (67,3)	4 (10,8)
IV	46	22 (47,8)	5 (22,8)
V-1, V-2, V-3, V-4	51	19 (37,3)	3 (15,8)

В другой серии опытов (табл. 1), где операции производили в первые четыре дня пятого возраста, к седьмому дню того же возраста из 51 реципиента в живых осталось 19 гусениц (37,3%). До стадии имаго дошли 3 самца (15,8%). При вскрытии этих реципиентов были обнаружены овариолы с развившимися ооцитами. Яйца извлекали и активировали по методу Астаурова.

Способность к термопартеногенезу в контрольном клоне P29 представлена в табл. 2. Сниженные показатели активации объяснимы погодными условиями сезона, а показатели полного партеногенеза достаточно высоки, если их относить к начавшим развиваться активированным яйцам.

Таблица 2.

Способность к термопартеногенезу в контрольном клоне P29

Имаго, №	Выборка яиц, шт., (а)	Количество пигментированных яиц, шт. (термоактивация, %), (б)	Количество вышедших гусениц, шт., (полный партеногенез к (б), %)	Полный партеногенез к (а), %
1	320	273 (85,3)	258 (94,5)	80,6
2	470	424 (90,2)	396 (93,3)	84,3
3	293	246 (83,9)	198 (80,5)	68,0
4	261	206 (78,9)	193 (93,6)	74,0

Результаты оценки развития яиц в яичниках, имплантированных в личинок-самцов, представлены в табл. 3 и на рис. 1. В среднем, судя по пигментации, прогрев вызвал развитие 23% яиц, полный партеногенез наблюдался у 43%, если его рассматривать по отношению к числу пигментированных яиц, а по отношению к общему количеству яиц он составил лишь 9%. По сравнению с интактным контролем в опыте значительно снизились все показатели: количество яиц на яичник, способность к активации и способность к полному партеногенезу. Отчасти это вызвано имевшим место ухудшением условий выкормки в V возрасте (см. табл. 1), что могло привести к полной дегенерации яичников,

трансплантованих раніше V віку. Тем не менше, розвиток яєчників клон-донора в сомі протилежного статю можливо іменно в останньому личиночному віку і влечет за собою падіння здатності до термopартенoгенезу.

Таблиця 3.

Розвиток яєць в яєчниках клон-донора P29, імплантованих самцям породи Советская-5 в п'ятому віку личиночного розвитку

Имаго, №	Выборка яєць, шт., (а)	Кількість пігментованих яєць, шт. (термоактивація, %), (б)	Кількість вийшлих гусениць, шт., (повний партеногенез к (б), %)	Повний партеногенез к (а), %
1	103	26 (25,2)	11 (42,3)	10,7
2	45	9 (20,0)	4 (44,4)	8,9
3	57	12 (21,1)	5 (41,7)	8,8

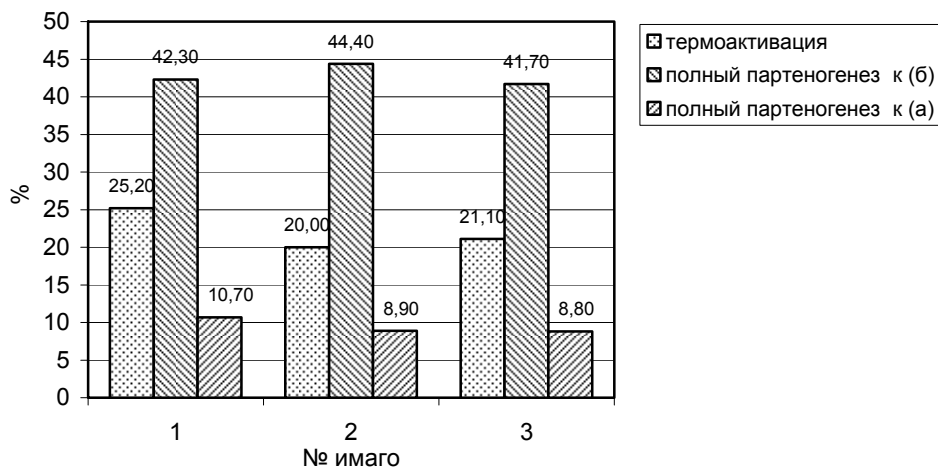


Рис. 1. Термopартенoгенез яєць, розвинувшись в мужській сомі реципієнта породи Советская-5 в імплаті з клон-донора P29

Японські дослідники, щоб довести необов'язковість наявності вітеллогеніну в яйці нашкоди для його розвитку, імпантовали яєчники в порожнину тіла самців в третій день V личиночного віку; сформовані в таких умовах яйця (з слідовими кількостями вітеллогеніну) були здатні розвиватися після їх активації по методу Астаурова (Yamashita, Irie, 1980). Дивовижна здатність яєць до термopартенoгенезу в цьому експерименті, на наш погляд, не більш дивовижна, ніж їх здатність до розвитку взагалі, яка, як і фізіологічний гетерозис при трансплантатії гонад, реалізований в розглянутому випадку дуже вдалим вибором донора і реципієнта, пояснюється надходженням в імпантовані ооцити ряду важливих для оогенезу речовин з гемолимфи донора (Умея, 1926; Клименко, Спиридонова, 1987). Наоборот, ми передположили, що використану в експерименті японських учених модель можна застосувати для вивчення механізму термоактивації по Астаурову, оскільки дефектність оогенезу в чужеродній сомі дозволить виявити фактори, необхідні для успішного партеногенезу при розвитку яєчників в нормі у самок. Поетому ми провели серію експериментів по пересадці гонад во II, III, IV і V личиночних віках. Яєчники, імпантовані в порожнину тіла самців в початку V віку, проходять модифікований оогенез і формують яйця, здатні до термopартенoгенезу, тоді як яєчники, пересажені в більш ранніх личиночних віках, по-видимому, дегенерують до стадії имаго. Особливо слід відзначити небезпечність пошкодження оболонки раннього яєчника при трансплантатії для його наступного розвитку (Щегельська, 1987). Вероятно, тут приховані причини того, що при відкритті 15 бабочек-реципієнтів імпантовані в них виявлені не були. Для підтвердження цього передположення необхідно провести спеціальне додаткове дослідження, оскільки блокування оогенезу в мужській сомі представляє значительний інтерес.

Отримані нами результати свідчать про те, що в початку V віку оогенез в яєчниках уже може проходити в певній мірі незалежно від сомі реципієнта. К цьому часу ооцити, вероятно, уже містять той необхідний для завершення оогенезу мінімум, який одночасно

обеспечивает определенный уровень способности к термопартеногенезу. В ранних личиночных возрастах яичник, по-видимому, еще не имеет каких-то факторов, необходимых для завершения развития в чужеродной соме. Исходя из общеизвестного факта транспорта белков из гемолимфы в ооциты (Irie, Yamashita, 1983), мы предполагаем, что трансплантированные на ранних стадиях яичники не могут, вероятно, нормально развиваться из-за отсутствия белков, поступающих в яичник из женской гемолимфы, но отсутствующих в мужской.

В работе японских исследователей не наблюдалось значительных различий в способности к партеногенетическому ответу яиц, полученных от донора и реципиента, хотя во втором случае эта способность была несколько выше, что противоположно нашим результатам. В таком случае упомянутый выше физиологический гетерозис дает лишь частичное объяснение результатов Ямашита и Ирие, оставляя довольно высокую способность к термопартеногенезу донора яичников в их эксперименте загадочной.

При оценке способности к термопартеногенезу яиц, развившихся в имплантированных яичниках, мы установили падение этой способности более чем в два раза по сравнению с донорским клоном P29. Мы предполагаем, что данный факт может быть связан с отсутствием вителлогенина или его уменьшенным количеством в ооцитах имплантата. Роль вителлогенина в детерминации способности к полному термопартеногенезу еще предстоит установить и, очевидно, решения вопроса можно достичь, разрабатывая использованную в настоящей работе модель. Полученные данные показывают, что имплантация яичников в самцов приводит к снижению способности к термическому партеногенезу и, по-видимому, не может быть использована для партеноклонирования инбредного материала методом трансплантаций (Klymenko, 2001).

Список литературы

- 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.
- Астауров Б.Л. Искусственный партеногенез у тутового шелкопряда. – М.–Л.: Изд-во АН СССР, 1940. – 240с.
- 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.
- Клименко В.В. Механизм искусственного партеногенеза у тутового шелкопряда // Генетика. – 1982. – Т.18, №1. – С. 64–72.
- 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.
- 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.
- Струнников В.А. Генетические методы селекции и регуляции пола у тутового шелкопряда. – М.: Агропромиздат, 1987. – 328с.
- Щегельская Е.А. Фенотипическое переопределение пола в мужской зародышевой линии тутового шелкопряда. Автореф. дис ... канд. биол. наук. – Минск, 1987. – 22с.
- Klymenko V.V. Parthenogenesis and cloning in the silkworm *Bombyx mori* L.: Problems and prospects // Insect biotechnology and sericulture. – 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.
- Tazima Y. The silkworm an important laboratory tool. – Tokyo: Kodansha, 1978. – 307с.
- Umeya Y. Experiments of ovarian transplantation and blood transfusion in silkworm with special reference to the alternation of voltinism // Bull. Govern. Serical. Exper. Station. – 1926. – Vol.1. – P. 1–26.
- Yamashita O., Irie K. Larval hatching from vitellogenin – deficient eggs developed in male hosts of the silkworm // Nature. – 1980. – Vol.203. – P. 385–386.

ЗДАТНІСТЬ ДО ПАРТЕНОГЕНЕЗУ ЯЄЦЬ ШОВКОВИЧНОГО ШОВКОПРЯДА *BOMBYX MORI* L., ЩО РОЗВИЛИСЯ В ЯЄЧНИКАХ, ІМПЛАНТОВАНИХ У ЛИЧИНКОВОМУ ВІЦІ В СОМУ ПРОТИЛЕЖНОЇ СТАТІ В.Ю.Забеліна, В.В.Клименко

У роботі вивчений розвиток яєчників клону P29 шовковичного шовкопряда, трансплантованих у різних личинкових віках у порожнину тіла самців породи Радянська-5 для оцінки ходу оогенезу в чужорідному оточенні й здатності до термопартеногенезу яєць, що дозрівають у сомі протилежної

статі. Використано мікрохірургічні методи трансплантації гонад і метод термічної активації яєць за Астауровим. Показано, що для отримання яєць, здатних до термопартеногенезу, трансплантація яєчників повинна провадитися не раніше п'ятого віку; в протилежному випадку яєчники не завершують свого розвитку й, очевидно, дегенерують. Ооцити, що досягли дозрівання в сомі самців, здатні до термопартеногенезу, однак рівень його нижче, ніж у клона-донора P29, що пояснюється встановленим раніше дефіцитом вітеллогеніну в ооцитах імплантату.

Ключові слова: *шовковичний шовкопряд, термічний партеногенез, клонування, партеноклон, трансплантація гонад, імплантат, дегенерація, оогенез.*

CAPABILITY FOR THE THERMOPARTHENOGENESIS OF THE SILKWORM *BOMBYX MORI* L. EGGS, DEVELOPED IN OVARIES, IMPLANTED IN HOSTS OF AN OPPOSITE SEX ON LARVAL STAGE
V.Y.Zabelina, V.V.Klymenko

The development of the silkworm clone P29 ovaries, transplanted into male hosts of stock Soviet-5 in different larval instars for an evaluating of oogenesis process in foreign environment and capability for thermal parthenogenesis of the eggs maturing in hosts of an opposite sex has been studied in the work. Microsurgical methods of gonad transplantation and method of thermal activation of eggs by Astaurov were used. It was shown that transplantation should be carried out not earlier than the fifth instar to obtain the eggs from implanted ovaries capable for parthenogenetic response; otherwise ovaries do not complete their development and seem to degenerate. Oocytes matured in male hosts are capable of thermoparthenogenesis, however its level being lower, than in the donor – clone P29 that could be explained by known facts of vitellogenin deficiency in implant oocytes.

Key words: *silkworm, thermal parthenogenesis, cloning, parthenoclone, gonad transplantation, implant, degeneration, oogenesis.*

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