

УДК: 577.8

**Термический партеногенез яиц тутового шелкопряда *Bombyx mori* L., формирующихся в яичниках, имплантированных в чужеродную сому**  
**К.А.Дорошенко, В.Ю.Забеліна, В.В.Клименко**

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

Используя партеноклоны и линии тутового шелкопряда, изучали развитие яичников, имплантированных в полость тела самок и самцов. Оценивали способность к термипартеногенезу сформировавшихся таким путем яиц. Показано, что с помощью трансплантации яичников и подбора реципиента можно существенно повысить способность донора к термоактивации и тем самым в перспективе клонировать по Астаурову любой женский генотип. Обнаружено, что при имплантации яичников клона в мужскую сомую яйца, формирующиеся в подсаженных яичниках, сохраняют способность к полному термипартеногенезу; при этом вызванное термоактивацией развитие протекает без диапаузы.

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

**Введение**

Способность яйца к искусственному партеногенезу давно привлекает внимание исследователей, но факторы, детерминирующие эту способность, остаются малоизученными. Одним из подходов к решению данной проблемы может служить метод трансплантации женских гонад, предложенный В.В.Клименко (Klymenko, 2001), с последующей термоактивацией формирующихся в реципиенте яиц по Астаурову. Было выдвинуто предположение, что с помощью подбора реципиента и трансплантации яичников можно получить партеноклон от любой линии, обладающей низкой способностью к термипартеногенезу. Действительно, при трансплантации яичника происходит обогащение реципиентом белкового набора формирующихся яиц имплантата. Это происходит в результате того известного факта, что белки, синтезируемые в реципиенте и поступающие в ооциты имплантированного яичника (Yamashita, Irie, 1980), не всегда идентичны белкам донора из-за различия генотипов донора и реципиента. Вследствие этого происходит расширение спектра белков формирующегося яйца, подтвержденное с помощью электрофореза (Klymenko, 2001). Очевидно, что при этом увеличивается вероятность формирования белково-ферментного комплекса, необходимого для возникновения способности к термическому партеногенезу в имплантате. Полученные ранее нами результаты показывают, что при имплантации яичников породы Советская-5<sup>1</sup> в клон P29 показатели полного термипартеногенеза поднимаются с низкого до такого уровня, который достаточен для партеноклонирования этой известной породы (Дорошенко, Клименко, 2006). При трансплантации яичников клона P29 в мужскую сомую нами было обнаружено, что яйца, развившиеся в имплантате, несмотря на моновольтинность и донора, и реципиента, не входят в диапаузу. Для проверки выявленных особенностей партеногенеза в эксперимент были включены другие партеноклоны. Целью данной работы был сравнительный анализ способности к термоактивации и полному термическому партеногенезу яиц, развившихся в имплантате при использовании различного исходного материала.

Изучение изменения способности к искусственному партеногенезу в условиях протекания оогенеза в чужеродной соме позволит приблизиться к пониманию природы факторов, ответственных за детерминацию способности к активации и полному термипартеногенезу. Выяснение механизмов термипартеногенеза необходимо для решения проблемы клонирования любого женского генотипа у тутового шелкопряда и, возможно, других видов Lepidoptera.

**Материалы и методы**

Объектом исследования служил тутовый шелкопряд *Bombyx mori* L. В качестве материала использовали партеногенетический диплоидный клон P29 (Астауров, 1973), обладающий 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%. Для оценки способности к термоактивации и полному термическому партеногенезу, в сравнении с рекордистом по названным признакам клоном P29, в эксперимент были

<sup>1</sup> Взята из института шелководства УААН (г. Мерефа, Харьковская область). С 1993 г. репродуцировалась в Лионском институте шелководства (Франция).

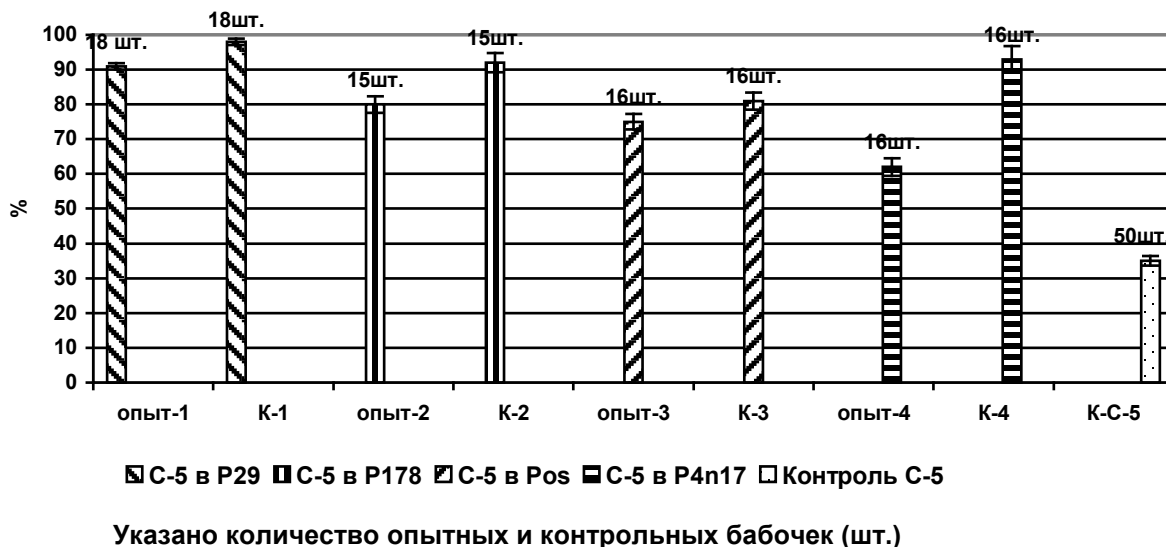
включены и другие клоны: P178 (Клименко, Спиридонова, 1977) – диплоидный клон, уникален по своей способности к спонтанному партеногенезу, P4n17 (Астауров, 1973) – тетраплоидный клон, Pos (Клименко, Спиридонова, 1977) – диплоидный клон. Для раннего определения пола личинок в опытах использовали породу, меченную по полу на стадии яйца, Советская-5 (Струнников, Гуламова, 1969). Порода Советская-5 обладает низкой способностью к полному термopартеногенезу (Дорошенко, Клименко, 2006; Забелина, Клименко, 2006). И использованные клоны и порода моновольтинны. Экспериментальный материал выращивали в соответствии с общепринятыми зоотехническими требованиями (Михайлов, 1950).

**Трансплантация гонад.** Метод заключается в имплантации яичников донора в сому реципиента. Трансплантацию гонад проводили в III и IV личиночных возрастах по разработанной ранее методике (Спиридонова и др., 1987). Дошедших до стадии имаго бабочек вскрывали и извлекали имплантат для изучения развившихся в нем яиц. Учитывали только тех бабочек, в которых обнаружили развившуюся грену.

**Термоактивация.** Ооциты, развившиеся в имплантированных яичниках, извлекали и подвергали термоактивации по методу Астаурова (водный прогрев при 46°C в течение 18 минут) (Астауров, 1940). Способность грены к термоактивации оценивали по проценту пигментированных яиц в пробах; за способность к полному термopартеногенезу принимали процент вылупившихся личинок.

### Результаты

В первой серии опытов в качестве доноров использовали личинок-самок породы Советская-5, в качестве реципиентов – личинок клонов P29, P178, P4n17, Pos, которые одновременно служили контролем. Максимальной способностью к термоактивации оказалась у яиц, развившихся в яичниках, трансплантированных в сому клона P29, – 91%. При имплантации яичников той же породы в личинок клона P178 степень термоактивации яиц составила 80%. Способность к термоактивации яиц, развившихся в яичниках, имплантированных в сому личинок партеноклона Pos, оказалась на уровне 75%. Самым низким данный показатель был у яиц из яичников, развившихся в клоне P4n17, – 62%. Контролем служили яйца, развившиеся в собственных яичниках реципиентов (К-1 – К-4), а также в качестве дополнительного интактного контроля служил процент пигментации яиц породы Советская-5. Яйца, развившиеся в имплантате, во всех случаях вошли в диапаузу, что соответствует нормальному ходу оогенеза. Результаты по пигментации яиц представлены на рис. 1.



**Рис. 1.** Процент пигментированных яиц породы Советская-5 (способность к термоактивации), развившихся в клонах P29, P178, P4n17, Pos.

Вторая серия опытов проведена в обратном направлении: донор – клоны P29, P178, P4n17, POS, реципиенты – личинки мужского пола породы Советская-5. При всех комбинациях трансплантаций в мужскую сому наблюдался бездиапаузный выход личинок из яиц, развившихся в имплантате, несмотря на то, что весь использованный материал моновольтинный. Степень активации яиц клона P29 составила 95%, полного термopартеногенеза – 55%. При имплантациях яичников клона P178 в личинок мужского пола уровень активации оказался ниже – 85%,

бездиапаузный выход личинок – 50%. Способность к термоактивации яиц клона P4n17 – 65%, полный термопартеногенез – 35%. Самые низкие показатели активации и полного термопартеногенеза отмечены у яиц клона Pos: 40% и 30% соответственно. Результаты оценки активации представлены на рис. 2, бездиапаузного выхода личинок – на рис. 3. В качестве контроля использовали данные по активации яиц K-1 – K-4, развившихся в соответствующих неоперированных клонах. В качестве дополнительного интактного контроля также служил процент пигментации яиц породы Советская-5.



Рис. 2. Процент пигментированных яиц (способность к термоактивации) яиц клонов P29, P178, P4n17, Pos, развившихся в личинках мужского пола породы Советская-5

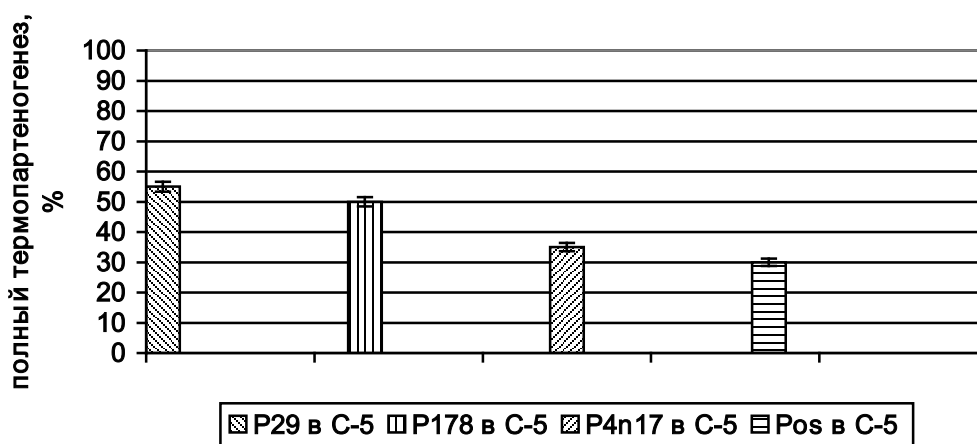


Рис. 3. Полный термопартеногенез (выход личинок, %) яиц клонов P29, P178, P4n17, Pos, развившихся в личинках мужского пола породы Советская-5

Таким образом, при трансплантациях яичников породы Советская-5 в личинок вышеупомянутых клонов нами было отмечено повышение способности к активации. При трансплантациях яичников исследуемых клонов в личинок мужского пола породы Советская-5 из яиц, развившихся в имплантате, личинки выходят без диапаузы.

Активация яиц, развившихся в имплантате, в первой серии опытов намного выше, чем в контроле Советская-5, но данные по полному термопартеногенезу (выход личинок) в настоящей работе не представлены, поскольку грена проходит зимовку. Однако, ссылаясь на полученные нами ранее результаты по полному термопартеногенезу яиц породы Советская-5, развившихся в имплантате в клоне P29 (Клименко и др., 2007), и на полный бездиапаузный выход личинок, развившихся в имплантате в мужской соме, мы можем предположить, что ожидаемый выход будет на уровне бездиапаузного или выше.

### Обсуждение

Способность к термопартеногенезу у тутового шелкопряда может быть существенно повышена путем трансплантации яичника личинки исследуемого генотипа в личинок партеноклов с высокой способностью к термопартеногенезу. Тем самым значительно расширяются возможности партеноклонирования у этого вида, и, возможно, других видов *Lepidoptera*. Повышение данной способности у яиц породы Советская-5, развивавшихся в соме партенклона P29, было отмечено нами в ряде работ (Дорошенко, Клименко, 2006; Забелина, Клименко, 2006). Для подтверждения выявленной закономерности в эксперимент были включены некоторые партеноклоны, уровень термоактивации у которых хотя и не достигает уровня клон-рекордиста P29, однако достаточно высок. Мы предполагаем, что этот факт связан с индивидуальным белково-ферментным составом комплекса, ответственного за способность к термоактивации и полному термическому партеногенезу (Клименко, 2001). По-видимому, формирование данного 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. Возможно, у использованных клонов, отличных от P29, необходимые для нормального партеногенетического развития вещества содержатся в недостаточном количестве, или их спектр более узкий по сравнению с комплексом клон P29. По этой причине способность к термоактивации яиц, развившихся в яичниках породы Советская-5 в соме исследуемых партеноклов, по сравнению с имплантатом, развившемся в клоне P29, снижается.

Нами показано, что, начиная со второго возраста, в яичниках, имплантированных как в женскую, так и в мужскую сому, могут формироваться ооциты, способные к полному термическому партеногенезу. Возраст, в котором производятся пересадки, не влияет существенно на изученные показатели термоактивации и термопартеногенеза (Дорошенко, Клименко, 2006; Забелина, Клименко, 2006). Во всех сериях опытов, представленных на диаграммах, следует учитывать фактор трансплантационного стресса, который может приводить к некоторому снижению показателей.

При трансплантациях яичников всех изученных в этой работе клонов в сому самцов яйца, развившиеся в имплантате, не входят в диапаузу, что свидетельствует о непоступлении в ооциты имплантата гормона диапаузы. Гормональный фон в теле матери имеет важное значение в интервале между индукцией и экспрессией диапаузы. Мозг контролирует выход гормона из подглоточного ганглия матери, что определяет наличие или отсутствие диапаузы у отложенной грены (Lees, 1955, Hasagawa, 1957). Следовательно, этот гормон у мужского пола либо не производится нейросекреторными клетками подглоточного ганглия, либо находится в неактивной форме. Таким образом, за вольтинизм у тутового шелкопряда отвечает женский пол. Также следует отметить, что способность к активации и полному термопартеногенезу яиц клонов, отличных от P29, развившихся в имплантате в мужской соме, снижена по сравнению с яйцами клон P29 в тех же условиях. По-видимому, это также связано с указанными выше различиями в составе белково-ферментного комплекса, ответственного за способность к термопартеногенезу.

Таким образом, метод трансплантации яичников позволяет повысить способность к термопартеногенезу, а также, при пересадках в мужскую сому, снять диапаузу у первого партеногенетического поколения, что существенно увеличивает выживаемость новых клонов и увеличивает ценность партеногенеза для генно-инженерных исследований, например, для микроинъекций ДНК в термоактивированные яйца. Полученные в настоящей работе данные дают основания надеяться, что с помощью метода трансплантации яичников можно будет клонировать по Астаурову любой женский генотип.

### Список литературы

- 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 партеноклов у шовковичного червя // Генетика. – 1973. – Т.9, №9. – С. 93–106.
- Дорошенко К.А., Клименко В.В. Повышение способности к термическому партеногенезу яиц тутового шелкопряда, развившихся в яичниках, имплантированных в личиночном возрасте в сому рекордного по данному признаку партенклона // Вестник ХНУ им. В.Н.Каразина. Серия биология. – 2006. – Вып.3, №729. – С. 72–75.
- Забелина В.Ю., Клименко В.В. Способность к термопартеногенезу яиц тутового шелкопряда *Bombyx mori* L., развившихся в яичниках, имплантированных в личиночном возрасте в сому противоположного пола // Вестник ХНУ им. В.Н.Каразина. Серия биология. – 2006. – Вып.3, №729. – С. 76–80.
- Клименко В.В., Дорошенко К.А., Забелина В.Ю. Термический партеногенез у тутового шелкопряда: возможности клонирования и бездиапаузного развития методом трансплантации яичников //

Матеріали VIII з'їзду Українського товариства генетиків і селекціонерів. – Алушта, 2007. – Т.1. – С. 236–240.

Клименко В.В., Спиридонова Т.Л. Трансплоиплоидная комбинативная изменчивость при искусственном партеногенезе у тутового шелкопряда // Доклады Академии наук СССР. – 1977. – Т.236, №3. – С. 740–743.

Михайлов Е.Н. Шелководство. – М.: Сельхозгиз, 1950. – 496с.

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., Гуламова Л.М. Искусственная регуляция пола у тутового шелкопряда. Сообщение I. Выведение меченных по полу пород тутового шелкопряда // Генетика. – 1969. – Т.5, №6. – С. 52–71.

Hasagawa K. Diapause hormone of the silkworm *Bombyx mori* // Nature. – 1957. – Vol.179. – P. 1300–1301.

Klymenko V.V. Parthenogenesis and cloning in the silkworm *Bombyx mori* L.: Problems and prospects // Insect biotechnology and sericulture. – 2001. – Vol.70. – P. 156–164.

Lees A.D. The physiology of diapause in arthropods. – London: Cambridge University Press, 1955. – 151p.

Yamashita O., Irie K. Larval hatching from vitellogenin-deficient eggs developed in male hosts of the silkworm // Nature. – 1980. – Vol.203. – P. 385–386.

**Термічний партеногенез яєць шовковичного шелкопряда *Bombyx mori* L., що формуються в яєчниках, імплантованих в чужорідну сомю  
К.О.Дорошенко, В.Ю.Забеліна, В.В.Клименко**

У роботі вивчений розвиток яєчників, імплантованих у порожнину тіла самиць та самців при використанні партеноклонів та ліній шовковичного шелкопряда. Оцінювали здатність до активації та термopартеногенезу яєць, що формувались в такий спосіб. Показано, що за допомогою трансплантації яєчників і підбору реципієнта можна суттєво підвищити здатність донора до термоактивації й таким чином в перспективі клонувати за Астауровим будь-який жіночий генотип. Виявлено, що при імплантації яєчників клону в порожнину тіла самців, яйця, що формуються у підсаджених яєчниках, зберігають здатність до повного термopартеногенезу, при цьому розвиток, викликаний термоактивацією, протікає без діпаузи.

Ключові слова: шовковичний шелкопряда, овогенез, активація яйця, термічний партеногенез, клонування, партеноклон, трансплантація гонад, імплантат, діпауза.

**Thermal parthenogenesis of the silkworm *Bombyx mori* L. eggs, forming in the ovaries implanted into foreign environment  
K.O.Doroshenko, V.Y.Zabelina, V.V.Klymenko**

The development of silkworm ovaries, implanted into female and male hosts using silkworm parthenoclones and stocks has been studied in the work. Oogenesis process in foreign environment and capability for activation and thermal parthenogenesis of the eggs have been estimated. It was shown, that donor capability for thermoactivation could be considerably increased by using egg transplantation and having chosen the recipient that may be a way of any female genotype cloning by Astaurov in perspective. It was discovered that implanting clone ovaries into male hosts, the eggs formed in implant keep the capability for full thermoparthenogenesis and develop without diapause.

Key words: silkworm, oogenesis, egg activation, thermal parthenogenesis, cloning, parthenoclone, gonad transplantation, implant, diapause.

---

Представлено Г.Ф.Жегуновим  
Рекомендовано до друку Л.І.Воробйовою