

ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКОЕ КЛОНИРОВАНИЕ В ГЕНЕТИКЕ И СЕЛЕКЦИИ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

В.В. КЛИМЕНКО, Н.Г. ЛЫСЕНКО, ХАОЮАНЬ ЛЯН

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

*Институт разведения и генетики животных НААН (Чубинское, Украина)
stemway@gmail.com*

Представлены проблемы и перспективы селекционного процесса у тутового шелкопряда на современном этапе развития репродуктивных технологий в научном шелководстве. Приведены данные о выведенных новых клонах, в которых восстановлена способность продуцировать безлетальных дигамбидных самцов, утраченная старыми рекордными клонами вследствие спонтанного мутагенеза. Рассмотрены источники внутриклональной изменчивости и пути ее использования в селекции. Представлен метод последовательной полиплоидизации для создания обоеполой тетраплоидной расы тутового шелкопряда. Показано, что традиционные методы селекции в сочетании с методами клонирования, получения полиплоидных форм и элиминации летелей подходят для создания открытой партенозиготической популяции тутового шелкопряда, оптимальной для решения задач украинского шелководства.

Ключевые слова: шелководство, партеноклонирование, полиплоидия, летальность, изменчивость

Введение. Благодаря прогрессу в генетических и биотехнологических исследованиях тутового шелкопряда и шелковицы спектр и география прикладных направлений шелководства непрерывно расширяются. В связи с этим формируется новая точка зрения в отношении роли клонирования в селекции тутового шелкопряда. Речь идет о клонировании генотипа путем амейотического термического партеногенеза [1], который, в отличие от трансдерного клонирования, эффективен, прост и надежен. В пользу метода свидетельствует стабильное воспроизведение характерных морфологических и физиологических признаков у клонов тутового шелкопряда, включая саму способность к партеноклонированию. Эта особенность клонирования оптимальна для задач селекции — достаточно получить клоны, обладающие нужными признаками. Наличие исходного клона Р29, который был выведен в лаборатории Б.Л. Астаурова, с высокой, близкой к 100%, способностью к термическому партеногенезу

© В.В. Клименко, Н.Г. Лысенко, Хаюань Лян, 2013

упрощает эту задачу: скрещивая его с самцами, несущими требуемый признак, уже от самок в F1 и F2 можно получать новые клоны с изучаемым признаком. Клон P29 отличается высоким уровнем индивидуальной гетерозиготности, поскольку прямое партеноклонирование самок из инбредного материала на практике не удается [2]. Уникальность этого клона состоит также в том, что при мейотическом партеногенезе от него можно получать абсолютно гомозиготных, не содержащих леталей самцов. Значение безлетальных самцов в селекции клонов сложно переоценить, поскольку их потомство от скрещивания с самками инбредных линий приобретает способность к партеногенезу [3]. Однако в последние годы многократные попытки получения партеногенетических сыновей из клона P29 и клонов, производных от него, [4] были безуспешны, что объясняется возникновением леталей во всех хромосомах диплоидного набора [5]. Это вызвало необходимость выведения новых клонов, сравнимых по эффективности репродукции с клоном P29 и способных через мейотический партеногенез производить безлетальных, полностью гомозиготных партеногенетических сыновей.

Особенность селекции у тутового шелкопряда состоит в возможности закрепления уникальных генотипов в виде клонов. Если в линиях вследствие остаточной гетерозиготности сохраняется индивидуальная генетическая вариация даже после многих поколений инбридинга, то клон с момента его закладки сохраняет неизменной ядерную и цитоплазматическую наследственность самки-основательницы. Партеноклон, как собрание особей с одним генотипом, синхронно развивающихся в одинаковых условиях, является идеальной моделью для анализа разных типов биологической изменчивости и уточнения таких фундаментальных понятий, как генотип, фенотип и самоклонирование. Мы установили и исследовали явление внутриклональной изменчивости у тутового шелкопряда, которая способна осложнить ход селекции, если учитывается только единичный фенотип.

В связи с вышеизложенным целью данного исследования стало создание партенозиготического пула генотипов, вмещающего все известные ценные признаки и генетические модификации тутового шелкопряда, который допускает фиксацию интересных и/или ценных форм на любом уровне селекции.

Материалы и методы исследований. В работе использован материал из лабораторной коллекции тутового шелкопряда, которая насчитывает 22 клона и 10 линий. Разнообразие клонов получено в первом и втором поколениях аутбридинга после скрещивания самок астауровского клона P29 [6] с самцами линий. При работе использованы следующие генетические маркеры: пигментация серозной оболочки развивающегося яйца (w_2 – отсутствие пигмента, re – красная сероза), окраска личинок по вылуплении из яйца (ch – рыжие «мураши»), дорзальный рисунок кожных покровов личинки (L – множественная пятнистость, то есть наличие оранжевых пятен на нескольких сегментах личинки, Kb – бугристость рисунка), пигментация межсегментных участков покровов личинки (Ze – зебровые гусеницы), а также некоторые другие маркерные гены [7].

Для закладки или воспроизводства клонов использовали метод теплового шока – водный прогрев неоплодотворенных яиц при 46°C в течение 18 мин, при котором происходит подавление редукционного деления созревания (с одновременным сохранением функциональности эквационного деления) и выживание начавшего развиваться зародыша в ооплазме, подвергнутой сублетальному прогреву (амейотический вариант партеногенеза) [8]. Для получения полностью гомозиготных партеногенетических сыновей неоплодотворенную грену материнского клона промораживали при –11°C в течение 30 мин (мейотический вариант партеногенеза: мейоз протекает нормально) [9].

Анализ фенотипической изменчивости в зависимости от положения ооцита в овариоле включал анатомирование бабочек, препарирование целых овариол и разрезание их на определенное число примерно равных отрезков. Использование клонов позволяет набрать достаточное количество неоплодотворенных яиц для каждого из выбранных участков овариолы, различия между которыми вдоль овариолы сводятся к разнице во времени их образования в гермариин. В имаго тутового шелкопряда 95% всех яиц могут заведомо считаться зрелыми, поскольку откладываются нередко самкой в течение одного часа первого дня откладки.

Для цитогенетического анализа полиплоидизации в диапаузирующем зародыше тутового шелкопряда использованы методы, представленные в ряде наших публикаций [10, 11]. Метод определения плоидности клетки диапаузирующего зародыша основан на прямом подсчете зерен гетерохроматина в ядрах клеток на этой стадии развития [12].

Проверку распределения количественных дат на соответствие закону нормального распределения в больших группах проводили, рассчитывая показатели асимметрии и эксцесса с последующей проверкой нулевой гипотезы об их равенстве. Разница частот исследуемых признаков оценивалась с помощью χ^2 -преобразования Фишера путем угловой трансформации. Проверку статистических гипотез проводили на уровне значимости $p < 0,05$ [13]. Базы данных были созданы в программе MS Excel 2010 for Windows XP. Расчеты выполняли в программах MS Excel 2010 и Statsoft STATISTICA 7.0.

Результаты исследований, их обсуждение.

Предпосылки для использования ди- и полигаплоидов в селекции. Составной частью высокой гетерозиготности генотипа клона P29 [14] являются локусы с летальными и полуметалетальными, прикрытые нормальными аллелями, а скрытая летальность выявляется при мейотическом типе партеногенеза. В этом случае развитие до вылупления личинки, только если гаплоидный набор хромосом женского пронуклеуса, образующегося в результате прошедшего мейоза, не содержит леталей, W-хромосомы, и удваивается в самом начале дробления. Вследствие этого выжившими оказываются гомозиготные безлетальные особи с удвоенной Z-хромосомой, то есть самцы.

После утраты клонами коллекции способности к производству гомозиготных самцов мы заложили несколько сотен новых дочерних клонов от самок

F1, полученных скрещиванием P29 с различными маркерными линиями. К 2010 г. было отобрано более десятка клонов с высокими показателями, но только один из них – P14 после осенней выкормки того же года, после мейотической криоактивации дал заметное количество черных и рыжих (*ch*) личинок. Способность P14 к партеноклонированию сравнима с таковой клона P29—98% вылупления после термоактивации по Б.Л. Астаурову. Выход мурашей вследствие криоактивации продолжался в течение 5 дней (табл. 1).

1. Выход личинок из неоплодотворенной грены клона P14, стимулированной к развитию помораживанием при -11°C в течение 30 мин

Дата вылупления	Фенотип личинок по вылуплении		
	<i>ch</i> ⁺ черные	<i>ch</i> рыжие	<i>ch</i> ⁺ – <i>ch</i>
15.09.2012	53	61	– 8
16.09.2012	89	116	–27
17.09.2012	70	90	– 20
18.09.2012	7	2	+ 5
19.09.2012	0	2	– 2
Всего	219	271	– 52
По Менделю	245 (–26)	245 (+26)	0

Поскольку клон P14 гетерозиготен по рецессивному маркеру *ch*, выход рыжих мурашей свидетельствует о прохождении мейоза, или, в данном случае, о мейотическом партеногенезе. Однако если ранее во всех подобных случаях, включая клон P29, наблюдалось некоторое постоянное преобладание черного фенотипа мурашей, то теперь – преобладание рецессивного фенотипа, особенно в дни массового выхода (табл. 1). Отклонение от теоретического расщепления в рассматриваемом локусе ($p < 0,05$) свидетельствует о том, что эмбриональное развитие особи с удвоенными хромосомами с диким аллелем проходит хуже, чем у особи с удвоенными хромосомами с рецессивным маркером. Выход мурашей из криоактивированной грены составил 4,4% (490 личинок из 11157 активированных яиц), тогда как в клоне P29 он не превышал 3%.

Выкормка гомозиготных самцов представляет известные трудности в связи с тем, что в генетическом отношении каждый возникший эмбрион уникален, его генотип – это выборка по одной хромосоме из 28 пар хромосом материнского клона. Сложная гетерозиготность родительского клона проявляется сразу с момента вылупления: процесс выхода личинок продолжительнее нормы на 2–3 дня ($p < 0,05$), что свидетельствует о разных темпах эмбриогенеза, а личинки отличаются по скорости развития. Этапы получения уникального на данный момент материала представлены на рис. 1.

На стадии имаго было получено 5 гомозиготных самцов из 13, завивших коконы. Из пяти самцов только два оказались в разной степени плодовитыми при скрещивании с самками материнского клона. От одного самца были по-

лучены кладки после двух первых скрещиваний. Второй самец оказался менее плодовитым, две кладки от «самооплодотворения» имели меньше трети оплодотворенных яиц каждая. Полученного количества яиц достаточно для проведения ряда селекционно-генетических исследований теоретического и прикладного характера. Например, интеграции в спектр гаплоидных безлетальных геномов генов хозяйственно-ценных признаков, трансгенов и создания партенозиготической популяции. Партенозиготическая популяция способна сохранять на разных этапах отбора способность к партеноклонированию любого отдельного генотипа без необходимости переводить определяемое им ценное сочетание признаков в инбредную линию путем длительного отбора. Такая популяция представляет ценность для генетического анализа способности к разным типам партеногенеза, а также анализа других сложных признаков у тутового шелкопряда. При необходимости возможно клонирование генотипа каждого гомозиготного самца посредством андрогенеза [1, 15].



Рис. 1. «Самооплодотворение» у тутового шелкопряда.

В верхнем ряду: слева – выкормка партеногенетических сыновей из неоплодотворенной грены материнского клона P14 после активации ее промораживанием; в середине – пять коконов гомозиготных самцов в сравнении с двумя коконами материнского клона; справа – копуляция гомозиготного самца с самкой материнского клона. В нижнем ряду: кладки, полученные от разных самцов путем «самооплодотворения» – самцы №1 и 5 не смогли спариться и не оставили потомства; из пяти кладок от самца №2 (индекс 142) темная оплодотворенная гrena имеется только в двух; самец №3 (143) имел более низкую плодовитость, чем №2; самец №4 (144) спарился, но оказался стерильным

Партеноклонирование и трансплоидная изменчивость. Партеноклонирование предоставляет возможность эффективной репродукции полиплоидов – успешная продолжительная репродукция тетраплоидного клона P4n17, созданного Б.Л. Астауровым. С момента появления первых клонов тутового шелкопряда установлено, что полиплоидия сопутствует искусственному партеногенезу: в грене, отложенной клональными самками, были обнаружены более крупные яйца, которые оказались тетраплоидными. От осеменения 4n-яиц диплоидными самцами были получены триплоидные партеноклоны, в которых также вскоре было показано генетически наличие яиц удвоенной ploidy (6n), хотя размером они не отличались от диплоидных. Позже был создан тетраплоидный обоеполюый вид тутового шелкопряда [15].

До получения генотипов с предельной способностью к клонированию возникновение ооцитов удвоенной ploidy объясняли аномальностью развития вследствие несовершенства метода клонирования. Позже в грене высокопродуктивных клонов по-прежнему обнаруживали примесь тетраплоидных яиц [4]. Согласно предположению Б.Л. Астаурова клетки удвоенной ploidy являются результатом случайного (аномального) слияния ядер в процессе дробления и последующего их включения в герминативную линию [15]. Однако слияние клеток герминативной линии нельзя исключить и на более поздних стадиях развития вследствие пролонгированного действия теплового шока, используемого в репродукции партеноклонов.

Наши исследования подтверждают гипотезу Б.Л. Астаурова соматической полиплоидизации в двух вариантах развития. При зиготическом развитии в соме диапаузирующего зародыша обнаружены только диплоидные и изредка тетраплоидные клетки, а клетки герминативной линии диплоидны. При клональном развитии в соматической части зародыша в дополнение к ди- и тетраплоидным клеткам найдены также гекса- и октоплоидные клетки, а среди герминативных клеток – клетки тетраплоидные, причем задолго до формирования гонад [12]. Происхождение гексаплоидных соматических клеток можно объяснить только слиянием трех диплоидных клеток либо слиянием диплоидной и тетраплоидной клеток еще до наступления диапаузы. Поскольку в герминативной линии в зиготическом случае никакой полиплоидизации не происходит, присутствие 4n-клеток при партеногенезе объясняется слиянием ядер еще в период дробления. В одном из сотен исследованных диапаузирующих зародышей мы обнаружили гексаплоидную клетку в герминативной линии (рис. 2). Редкость гексаплоидных клеток на этой стадии развития объясняется тем, что всего герминативных клеток около десяти.

Таким образом, в грене диплоидных партеноклонов возможно присутствие не только тетраплоидных, но и гексаплоидных яиц. Можно ожидать, что в грене диплоидного клона, полученной от скрещивания с диплоидным самцом, кроме редких триплоидных яиц ($4n \times 2n$), отличающихся большими размерами (рис. 3), встречаются еще более редкие тетраплоидные ооциты ($6n \times 2n$) диплоидного размера. Если эти оплодотворенные яйца доходят в развитии до стадии имаго, они могут привести осложнения в генетический анализ как в скрещиваниях, так и при партеноклонировании.

Примесь в клональной грене яиц более высокой ploидности является непосредственно обусловленной характеристикой нестабильности партеногенетического развития, приводящей путем слияния ядер дробления к полиплоидизации в герминативной линии (табл. 2).

2. Частота тетраплоидных ооцитов в кладках астауровского клона P29 и его дочерних клонах, оцененная отбором крупной грены с последующим цитогенетическим контролем

Партеноклон	Изученные кладки, шт.	Найденные 4n-яйца, шт.	Доля кладок с 4n-яйцами, %	Количество 4n-яиц в кладке, шт.
P(29×re)n3	337	862	16,0	2,6
P(29×w ₂)n4a	174	1534	47,8	8,8
P(29×w ₂)n7	133	298	21,8	2,2
P29	189	790	19,6	4,2

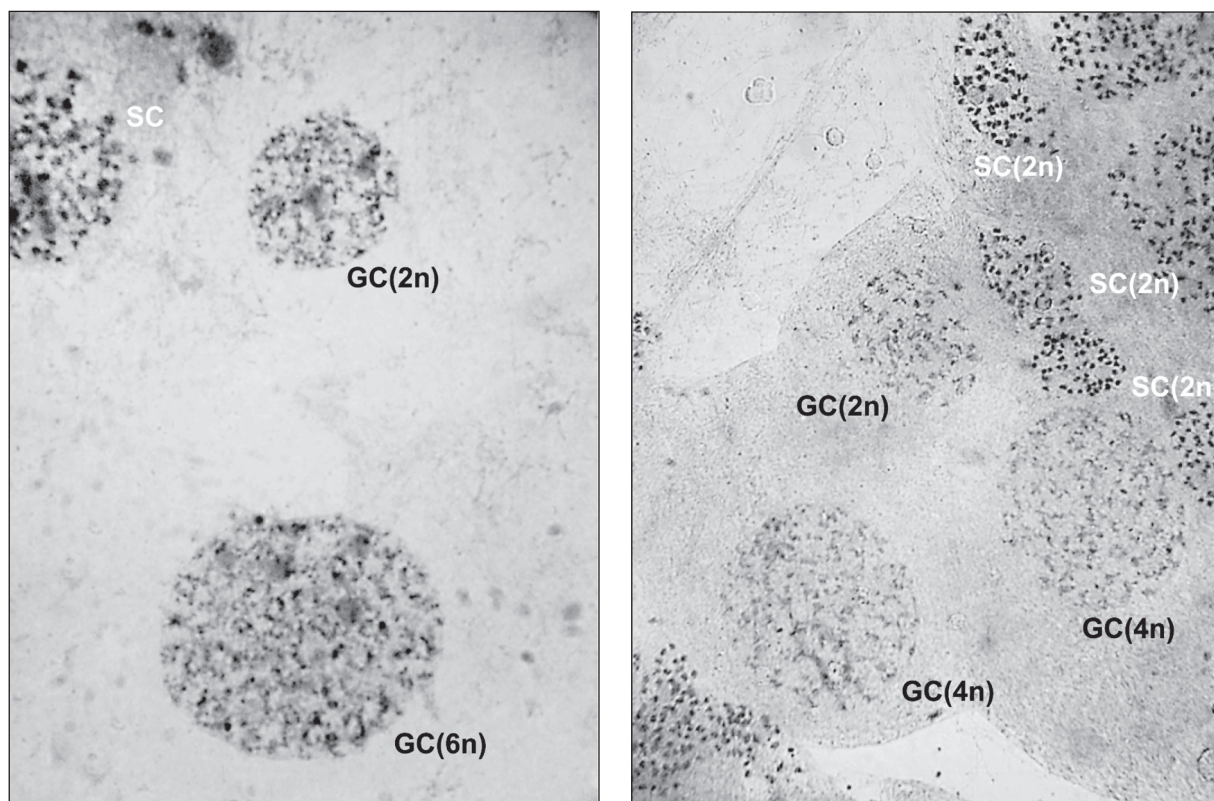


Рис. 2. Полиплоидизация в зародышевой линии партеноклона P29.

Ядра соматических клеток (SC) содержат четкий зернистый хроматин; в ядрах герминативных клеток зерна хроматина разрыхлены, их подсчет для определения ploидности часто затруднен, но возможен (правый препарат); при невозможности подсчетов ploидность легко определяется по размерам ядер (слева)

Частота тетраплоидных ооцитов в кладках самок диплоидных клонов следует распределению редких событий по Пуассону (табл. 2). При репродукции клона из кладок, не содержащих $4n$ -ооцитов, новое распределение кладок по содержанию тетраплоидных яиц будет совпадать с таковым для предыдущего поколения, то есть полиплоидизация в оогенезе является наследуемым признаком клона, но не индивидуума. Частота $4n$ -ооцитов в кладках является типичным примером фенотипической изменчивости в клонах [16].

Вследствие полиплоидизации клон может засоряться удвоенными, с прежним составом генов, и рекомбинантными генотипами. Тетраплоидные ооциты, извлеченные из овариол и оставленные на воздухе на несколько часов, с большей вероятностью, чем диплоидные, приступают к спонтанному развитию, которое всегда проходит по мейотическому типу. В результате мейоза образуется диплоидный женский пронуклеус, развитие которого может проходить нормально, если сублетальный прогрев его не заблокирует.

В мейозе у самок тутового шелкопряда отсутствует кроссинговер, тетраваленты у тетраплоидов практически не образуются, и в женский пронуклеус попадает по одной хромосоме из 56 гомологичных пар. Если из четырех половых хромосом ZZWW в диплоидный пронуклеус попадают две Z-хромосомы, то развивается диплоидный рекомбинантный самец (рис. 3, В) [17]. Этих партеногенетических сыновей также можно использовать для «самооплодотворения» клона. Их отличия от полностью гомозиготных самцов связаны с их заведомо большей гетерозиготностью. Если в каждом из пары гомологов имеется по летали, то гомозиготных сыновей (рис. 3, А), возникающих из $2n$ - и $4n$ -ооцитов, не будет. Попадание в диплоидный пронуклеус той же пары гомологов, которые находятся в материнском генотипе, определенно увеличивает вероятность выживания (рис. 3, верхняя левая часть схемы). При полной гомозиготности самцов и отсутствии в норме кроссинговера у самок [18] возможен отбор в отсутствие внутрихромосомной рекомбинации (рис. 3, А). При необходимости перестройки генов одной хромосомы можно использовать рекомбинантных партеногенетических сыновей и, проводя отбор по нужным признакам, все еще оставаться в рамках генотипа материнского клона (рис. 3, В).

Экспериментальные данные показывают, что возможен возврат партеногенетического потомства диплоидного клона к половому размножению. Такое потомство может быть получено как путем мейотического партеногенеза, так и путем амейотического. Только мейотический партеногенез приводит в диплоидных ооцитах к возникновению полностью гомозиготных сыновей, а в тетраплоидных – к формированию диплоидных рекомбинантов. Следует отметить, что реверсия с тетраплоидного уровня на диплоидный при партеногенезе (апозиготии) и соответственно расщепление контролируемых признаков в диплоидном (дигаплоидном) потомстве показаны у некоторых растений, например у сахарной свеклы [19]. Очевидной предпосылкой возможности возврата к половому размножению в клоне является гетерогаметность (ZW) женского пола у тутового шелкопряда.

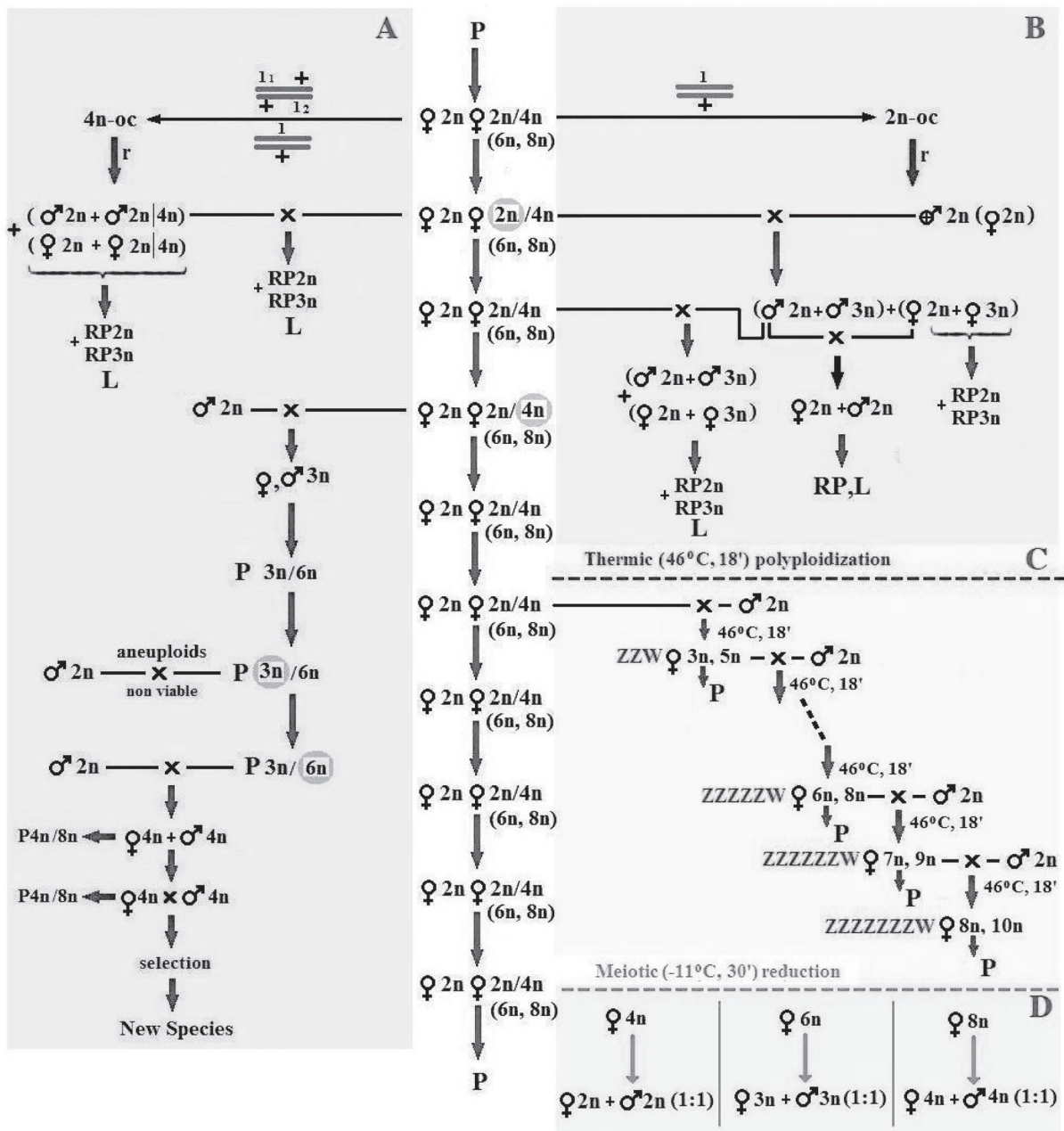


Рис. 3. Возможные направления отбора в партенозиготической популяции тутового шелкопряда. Мейотический партеногенез и хромосомная рекомбинация (r) в тетраплоидных (А, 4n-ос) и диплоидных (В, 2n-ос) ооцитах диплоидного клона (P – клонирование; RP – рекомбинантные клоны; L – обоеполые линии)

На основе клонального генотипа, используя для «самооплодотворения» гомозиготных и рекомбинантных самцов, возможно создание открытой популяции. Особенность такой популяции заключается в возможности селекции и клонирования ценных генотипов в каждом ее поколении, поэтому популяцию с такими свойствами мы назвали партенозиготической (рис. 3). В настоящее время для создания партенозиготической популяции мы проводим отбор клонов, способных производить через мейотический партеногенез полностью го-

мозиготных самцов. Скрещивание таких клонов друг с другом с помощью их партеногенетических сыновей открывает перспективы для создания клонов с группами сцепления без леталей.

Присутствие в паре гомологов леталей (l_1 и l_2) в транспозиции делает невозможной селекцию по схеме В, оставляя возможность получения диплоидов обоего пола только через реверсию тетраплоидных ооцитов ($4n$ -ос), если ревертант сохраняет транспозицию леталей. Возникающие при реверсии миксоплоиды ($2n/4n$) расширяют спектр изменчивости в поколениях, вплоть до возможности получения обоеполюх тетраплоидов.

Селекция по схеме А возможна, даже если в каждой паре гомологов летали имеются только в одной хромосоме и они прикрыты нормальными аллелями гомолога. Она подходит для быстрого создания абсолютно гомозиготных безлетальных андрогенетических клонов, которые в перспективе могут улучшить качество селектуемого материала путем ликвидации леталей. В схеме С предусмотрено последовательное прибавление мужских гаплоидных наборов к хромосомному набору клона с последующей возможной реверсией (D) созданных клонов на вдвое меньший уровень пloidности.

Термическая полиплоидизация и получение полиплоидных форм тутового шелкопряда. Помимо получения полиплоидов на основе партеногенеза, существуют и другие возможности решения этой задачи. Полиплоидные формы у тутового шелкопряда возможно получить при различных обработках осемененных яиц: прогреве при 40°C в течение 60 мин, колхицинировании, центрифугировании, воздействии CO_2 и охлаждении при -10°C [20]. Разнородность вариантов развития, возникающая при использовании перечисленных методов, затрудняет раннюю идентификацию полиплоидов методами цитогенетического анализа и получение их в количествах, достаточных для планомерных исследований. Главной причиной фактического выпадения полиплоидов из селекции следует считать не трудность их получения, а практическую невозможность репродукции полученных полиплоидов [15].

В наших исследованиях для получения полиплоидов [17] используем метод термического клонирования для прогрева свежееосеменной грены. В этом случае (рис. 3, С) в прогретом яйце сохраняется неизменным генотип матери в форме диплоидного женского пронуклеуса, с которым может слиться гаплоидный мужской с образованием триплоидного женского генотипа ($2AZW + 1A_1 Z = 3(AA + A_1)ZZW$). На маркерах пигментации серозной оболочки яйца мы показали, что после теплового шока выход личинок из яиц от скрещивания клона Р50 с самцами ge971 составляет более 40%; из них до IV возраста доживает также около 40% вышедших личинок, то есть около 16% обработанных яиц. Оценка доли триплоидов в IV возрасте по маркерам практически совпала с оценкой, полученной прямым определением пloidности методом подсчета зерен хроматина в ядрах клеток диапаузирующих зародышей. Из выкормленного материала было заложено 15 клонов. Из них по результатам цитогенетического анализа 13 клонов (86,7%) были триплоидными, и 2 клон (13,3%) – диплоидными. В

нескольких ди/триплоидных мозаичных эмбрионах выявлены пентаплоидные клетки, которые образуются путем слияния диплоидного и триплоидного ядер из участков разной ploидности эмбриона. Если такие полиплоидные ядра вовлекаются в зародышевую линию эмбриона, то спектр полиплоидных гамет расширяется, что представляет интерес как для селекционера, так и для биолога-эволюциониста [21].

Изложенный метод позволяет увеличивать ploидность клона на один гаплоидный набор за один цикл. Через семь циклов возможно создание октоплоидного клона с формулой половых хромосом $ZZZZZZZW$. Реверсия такого клона вследствие мейотического партеногенеза на тетраплоидный уровень должна привести к появлению самок и самцов в соотношении 1:1. Таким путем возможно создание обоеполой тетраплоидной расы тутового шелкопряда [15]. Реверсия на вдвое меньший уровень ploидности возможна и на более ранних циклах полиплоидизации (рис. 3, D) [9].

Внутриклональная изменчивость. Применение клонирования в селекции представлено на рис. 3. Эта схема отражает только те изменения генотипа, которые можно получить или ожидать, используя богатство репродуктивных возможностей тутового шелкопряда. Для планирования селекционных исследований следует учитывать и результаты изучения фенотипической изменчивости в клонах [16, 20, 2]. Общность этих положений не зависит ни от видовой специфики тутового шелкопряда, ни от метода клонирования. Трансядерное клонирование по сути является не чем иным, как искусственным партеногенезом с замещенным ядром [22]. Если в случае шелкопряда яйцо стимулируется к развитию тепловым шоком, то в трансядерном клонировании эту роль выполняет электрический стимул. Внутриклональная изменчивость показана на клоне P5D и его характерном признаке – пятна на I–VI сегментах личинки (*L, Kb*). Этот качественный признак, если учитывать содержание пигментов в пятнах, можно рассматривать и как количественный (рис. 4).

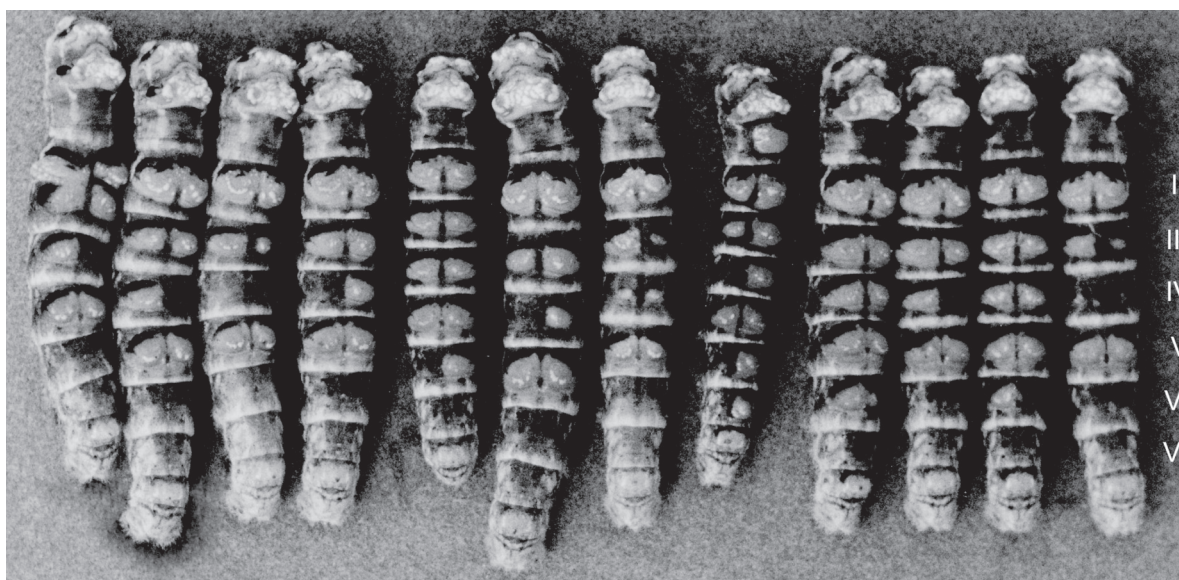


Рис. 4. Фенотипическая изменчивость личинок клона P5D при синхронном развитии до середины V возраста в одних условиях

Проявление любого признака в клоне носит стохастический характер. Это общее положение не препятствует получению всевозможных количественных оценок для самых разных признаков биологических объектов. Именно на таком фоне проявляются закономерности наследования в клонах:

- внутриклональная фенотипическая изменчивость включает в качестве нестохастического компонента овогенетическую изменчивость — зависимость проявления признака в фенотипе от положения ооцита в яичнике [22, 23];
- управление степенью проявления признака возможно через воздействия, например температурные, в фенокритической фазе изучаемого признака [16].

Овогенетическая изменчивость в наших исследованиях была установлена на трансплантационных клонах из яиц, развившихся в яичниках клона Р29, пересаженных в полость тела самцов на личиночной стадии. Мураши, полученные из разных половин овариолы после термоактивации содержащихся в них яиц, значительно отличались между собой по морфофизиологическим признакам, хотя имели один генотип [22]. Параллельные пересадки яичников самкам той же реципиентной линии давали единообразное трансплантационное потомство с фенотипом донора яичников [24]. Следовательно, клонируемые зрелые ооциты яичника имаго тутового шелкопряда не являются эквипотенциальными в отношении развития, и различия между ними выявляются в провокационных критических условиях.

С использованием нескольких вариантов партеногенеза, известных у тутового шелкопряда, была выполнена оценка потенциала развития зрелого ооцита до оплодотворения в зависимости от времени его возникновения и/или положения в яичнике у клональных самок. Полученные результаты показывают отсутствие эквипотенциальности зрелых ооцитов в отношении пенетрантности изучаемого признака, если они расположены в разных частях овариолы. При этом диапазон овогенетической изменчивости зависит от стабильности изучаемого морфологического признака, вследствие чего при нормальной клональной репродукции она была изучена в первую очередь на признаках с неполным проявлением (рис. 4). В этом случае показано, что степень проявления бугристых оранжевых пятен на данном сегменте личинки зависит от положения в овариоле, то есть от времени возникновения ооцита, давшего начало данной особи. На другом сегменте пенетрантность пятен может отличаться, и это отличие определяется генотипом клона, например наличием других генов, влияющих на рассматриваемый признак [25].

Если степень проявления признака у данной особи зависит от времени возникновения давшего ей начало ооцита, то распределение этого признака в большой выборке особей клона должно отличаться от нормального распределения. В качестве наиболее удобного признака для такого исследования был взята полная пигментация неоплодотворенных яиц, развивающихся путем спонтанного партеногенеза после откладки самкой. В опытах использовали синхронизированных по выходу из кокона неосеменных бабочек клона Р29. Порции яиц, отложенные 65 самками в один из 12 последовательных дней, оценивали

по доле пигментированных яиц. Эту оценку принимали за потенциал развития ооцитов в участке овариолы, соответствующем дню откладки (рис. 5).

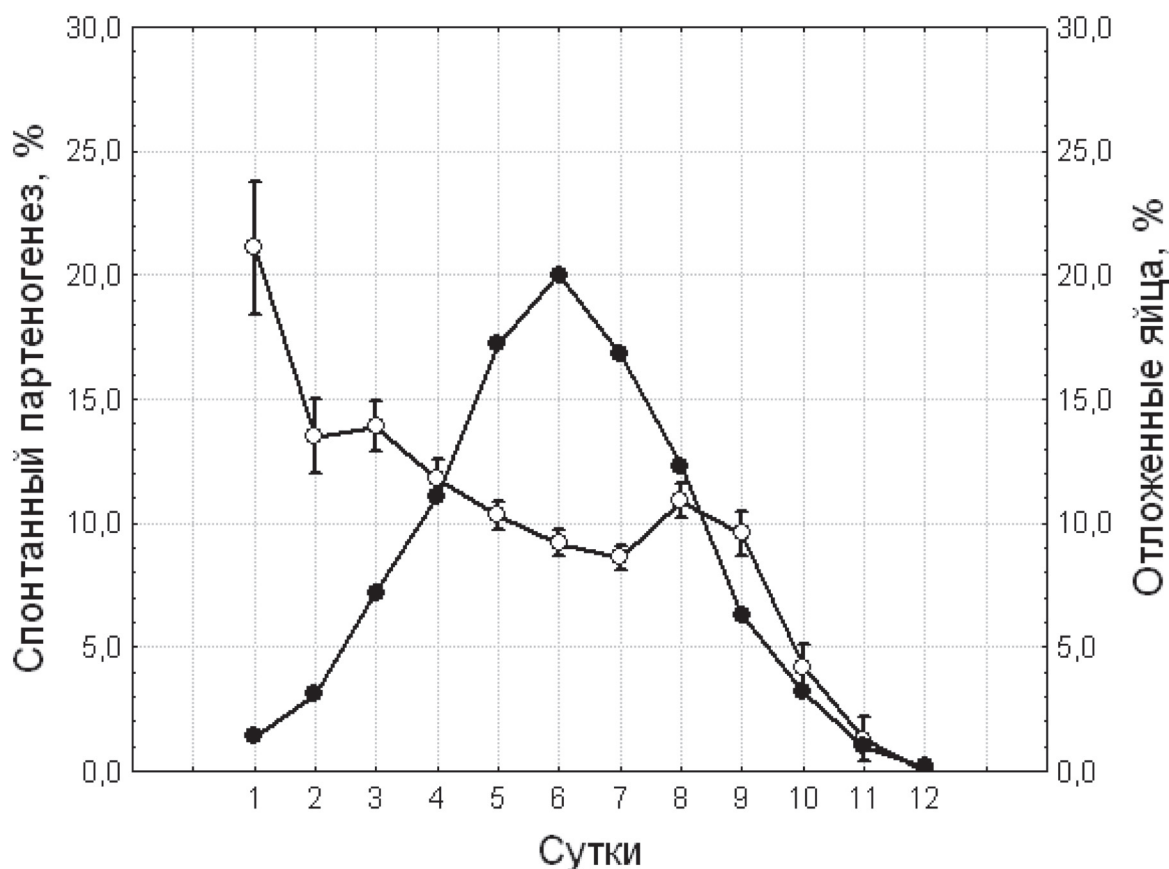


Рис. 5. Спонтанный партеногенез (1) в порциях суточной грены (2), отложенной виргинными самками клона Р29 за 12 суток (65 бабочек, 28688 учетных яиц)

Полученные данные свидетельствуют о том, что яйца тем лучше пигментируются, чем ближе они располагаются к яйцекладу, то есть чем раньше они возникли в апикальной части яичника. При этом их одинаковая степень зрелости подтверждается способностью к термоактивации, единообразием блока мейоза в метафазе I [26]. Кроме того, способность к полному мейотическому и амейотическому партеногенезу не ниже, а часто выше в проксимальной части овариолы, чем в дистальной [27]. Овогенетическая изменчивость затрагивает в первую очередь признаки раннего онтогенеза: пигментацию яиц, окраску покровов мурашей, эмбриональную жизнеспособность и т.д. Управление овогенетической изменчивостью лежит в основе управления процессом оогенеза.

Выводы. Систематизированы возможности использования партеногенетического клонирования, открытого Б.Л. Астауровым, в современном шелководстве.

Получены рекордные клоны с восстановленной способностью к мейотической гомозиготизации.

Проанализированы обнаруженные типы внутриклональной изменчивости и пути их использования в селекции.

Показана полиплоидизация в герминативной линии тутового шелкопряда при разных видах партеногенетического размножения, что позволяет объяснить появление полиплоидии у партеногенетических форм в природе и в эксперименте.

Представлен метод последовательной полиплоидизации, который может быть использован для получения обоеполых четно-плоидных рас тутового шелкопряда.

Благодарности. Авторы выражают благодарность за помощь в проведении исследований и сохранение коллекции Генеральному секретарю Международной комиссии по шелководству, бывшему директору Национального института шелководства Франции Ж. Шаванси, профессорам Лионского университета им. Клода Бернара П. Кублю и Ж.К. Прюдому, ректору Токийского университета профессору М. Кобаяши, профессору Т. Шимада, Директору Центра биологических исследований в Ческе Будеевице профессору Ф. Сегналу, Руководителю Центра ДНК-технологий Индии профессору Дж. Нагараджу, Декану биологического факультета Университета Роуд Айлэнд (США) профессору М. Голдсмит, Директору Института шелководства и пчеловодства Италии профессору С. Каппеллоцци, а также доценту кафедры зоологии и экологии животных Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина А.Ю. Утевскому.

1. *Астауров Б.Л.* Искусственный партеногенез и андрогенез у шелковичного червя / Астауров Б.Л. // Бюл. ВАСХНИЛ. – 1936. – № 12. – С. 47–52.

2. *Klymenko V.V.* Parthenogenesis and cloning in the silkworm *Bombyx mori* L.: problems and prospects / Klymenko V.V. // J. Insect. Biotechnol. Sericology. – 2001. – V. 70. – P. 155–165.

3. *Струнников В.А.* Генетические методы селекции и регуляции пола тутового шелкопряда / Струнников В.А. – М.: Агропромиздат, 1987. – 327 с.

4. *Клименко В.В.* Трансполиплоидная комбинативная изменчивость при искусственном партеногенезе у тутового шелкопряда / В.В. Клименко, Т. Л. Спиридонова // Докл. АН СССР. – 1977. – Т. 236, № 3. – С. 740–743.

5. *Клименко В.В.* Внутриклональная изменчивость тутового шелкопряда / В.В. Клименко, В.Ю. Забелина, Н.Г. Лысенко // Материалы междунар. конф., посвященной 75-летию со дня рождения академика Ю.П. Алтухова, Москва, 17–18 ноября 2011 г. – М.: Цифровичок, 2011. – С. 161–162 (статья по пленарному докладу выйдет в сборнике этой конференции, который застрял в типографии).

6. *Астауров Б.Л.* Отбор по способности к термическому искусственному партеногенезу и получение улучшенных по этому признаку партеноклонов у шелковичного червя / Астауров Б.Л. // Генетика. – 1973. – Т. 9, № 9. – С. 93–106.

7. *Tazima Y.* The silkworm: an important laboratory tool / Tazima Y. – Tokyo: Kodansha, 1978. – 307 p.

8. *Астауров Б.Л.* Искусственный партеногенез у тутового шелкопряда / Астауров Б.Л. – М.–Л. : Изд-во АН СССР, 1940. – 240 с.
9. *Терская Н.Р.* Методы активации яиц тутового шелкопряда к мейотическому партеногенезу / Н. Р. Терская, В. А. Струнников // Докл. АН СССР. – 1974. – Т. 219, № 5. – С. 1238–1241.
10. *Клименко В.В.* Использование пропионо-гематоксилина для подсчета клеток в яйцах насекомых / Клименко В.В. // Онтогенез. – 1972. – Т. 3, № 3. – С. 326–329.
11. *Щегельская Е.А.* Методы цитологического анализа профазы мейоза у тутового шелкопряда / Е.А. Щегельская, Т.Л. Спиридонова, В.В. Клименко // Изв. АН МССР. Сер. биол. и хим. наук. – 1986. – № 1. – С.67–70.
12. *Клименко В.В.* Хроматин диапаузы тутового шелкопряда *Bombyx mori* L.: термический партеногенез и нормальное развитие / В.В. Клименко, Х. Лян // Цитология. – 2012. – Т. 54, № 3. – С. 218–229.
13. *Лакин Г.Ф.* Биометрия / Лакин Г.Ф. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
14. *Алтухов Ю.П.* Положительная корреляция между уровнем индивидуальной гетерозиготности и способностью к полному термическому партеногенезу у тутового шелкопряда / Ю.П. Алтухов, В.В. Клименко // Докл. АН СССР. – 1978. – Т. 239, № 2. – С. 460–462.
15. *Астауров Б.Л.* Цитогенетика развития тутового шелкопряда и ее экспериментальный контроль / Астауров Б.Л. – М.: Наука, 1968. – 102 с.
16. *Клименко В.В.* Температурный контроль степени проявления морфологического признака в партеноклонах тутового шелкопряда / В.В. Клименко, Л.И. Воробьева, В.Г. Шахбазов // Докл. АН СССР. – 1980. – Т. 252, № 3. – С. 732–735.
17. *Клименко В.В.* Полиплоидия и партеногенез у тутового шелкопряда / В.В. Клименко, Т.Л. Спиридонова // Изв. АН МССР. Сер. биол. и хим. наук. – 1982. – № 4. – С. 32–36.
18. *Sturtevant A.H.* No crossing over in the female of the silkworm moth / Sturtevant A.H. // Amer. Natur. – 1915. – Vol. 49. – P. 42–44.
19. *Эпигенетика растений* : сб. науч. тр. / РАН, Сиб. отд-ние, Ин-т цитологии и генетики; сост.: С.И. Малецкий, Е.В. Левитес. – Новосибирск, 2005. – 373 с.
20. *Клименко В.В.* Партеногенетическое развитие тутового шелкопряда: дис. на соискание науч. степени д-ра биол. наук : 03.00.15 / Вячеслав Викторович Клименко. – Кишинев, 1988. – 379 с.
21. *Экспериментальные триплоиды тутового шелкопряда и происхождение естественной полиплоидии у бисексуальных животных* / В. В. Клименко [и др.] // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. праць. – К.: Логос, 2011. – Т. 11. – С. 65–68.
22. *Klimenko V.V.* Parthenocloning in the silkworm vs. transnuclear cloning in mammals / Klimenko V.V. // European embryo transfer association: 14th scientific meeting (Venice, September 11 – 12, 1998). – 1998. – P. 182.
23. *Zabelina V.* Ovary transplantation in the silkworm *Bombyx mori* L.: parthenocloning by eggs produced in male recipient / V. Zabelina, V. Klymenko // Sericologia. – 2008. – Issue 48, № 2. – P. 123–128.

24. *Silkworm* parthenogenesis: phenotypic intraclonal variability / V. Zabelina [et al.] // 5th BACSA international conference «Sericulture for multi products – new prospects for development» (Bucharest, Romania, April 11–15, 2011). Bucharest: Institute for Bioengineering, Biotechnology and Environmental Protection – S.C. BIOING S.A. – 2011. – P. 49.

25. *Technology of silkworm cloning* / V. Zabelina [et al.] / Current opinion in Biotechnology. – 2011. – Vol. 22. – P. 53.

26. *Клименко В.В.* Онтогенетический шум и овогенетическая изменчивость / В.В. Клименко, Н.Г. Лысенко // *Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології*: зб. наук. пр. – 2012. – Т. 4. – С. 89–94.

27. *Клименко В.В.* Элиминационный хроматин и искусственный партеногенез у тутового шелкопряда / В.В. Клименко, Т.Л. Спиридонова // *Цитология*. – 1979. – Т. 21, № 7. – С. 793–799.

ПАРТЕНОГЕНЕТИЧНЕ КЛОНУВАННЯ В ГЕНЕТИЦІ ТА СЕЛЕКЦІЇ ШОВКОВИЧНОГО ШОВКОПРЯДА

В.В. Клименко, Н.Г. Лисенко, Хаоюань Лян

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна (Харків, Україна)

Розглянуто проблеми та перспективи селекційного процесу у шовковичного шовкопряда на сучасному етапі розвитку репродуктивних технологій у науковому шовківництві. Наведено дані про створених авторами нових клонів, у яких відновлено унікальну здатність продукувати безлетальних дигаметоїдних самців, яку було втрачено старими рекордними клонами внаслідок спонтанного мутагенезу. Розглянуто джерела інтраклональної мінливості і шляхи її використання в селекції. Представлено метод послідовної поліплоїдизації для створення тетраплоїдної раси шовковичного шовкопряда. Показано, що традиційні методи селекції у поєднанні з методами клонування, створення поліплоїдних форм та елімінації леталей у селекційному матеріалі є адекватними для створення відкритої партенозиготичної популяції шовковичного шовкопряда, яка відповідає вирішенню завдань українського шовківництва.

Ключові слова: шовківництво, партеноклонування, поліплоїдія, летальність, мінливість

PARTHENOCLONING IN GENETICS AND BREEDING OF THE SILKWORM

V.V. Klymenko, N.G. Lysenko, Haoyuan Liang

V. N. Karazin Kharkiv National University (Kharkiv, Ukraine)

The problems and prospects of the silkworm selection process at the present level in the development of reproductive technologies in scientific sericulture have been considered. The data on obtained new clones, in which there was restored the unique ability to produce lethal free dihaploid males that was lost in the old record clones due to spontaneous mutagenesis, are given. The sources of intraclonal variability and ways of its use in the selection have been

discussed. The method of successive polyploidization is proposed for constructing of bisexual tetraploid race of silkworm. It is shown, that traditional breeding techniques, combined with the methods of cloning, polyploidy form creation and lethal elimination are the means to create the open parthenozygotic population of the silkworm that will be most adequate to solve the problems of Ukrainian sericulture.

Key words: sericulture, parthenocloning, polyploidy, lethality, variability



УДК 636.2.082:575.113.1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ МУТАНТНОГО АЛЛЕЛЯ, ВЫЗЫВАЮЩЕГО КОМПЛЕКС АНОМАЛИЙ ПОЗВОНОЧНИКА (СVM) ЧЕРНО-ПЕСТРОГО СКОТА

**С.Н. МАРЗАНОВА¹, Д.А. ДЕВРИШОВ¹, И.С. ТУРБИНА¹,
В.А. НАГОРНЫЙ¹,**

**Я.И. АЛЕКСЕЕВ², Н.В. КОНОВАЛОВА², Д.Г. СОЧИВКО²,
П.И. ЛЮЦКАНОВ³,**

М.Х. ТОХОВ⁴, Н.С. МАРЗАНОВ⁴

*Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии
имени К.И. Скрябина¹*

*Государственное Научное Учреждение Всероссийский научно-исследовательский
институт сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии, Закрытое
Акционерное Общество «Синтол»²*

*Научно-практический институт биотехнологий в зоотехнии и ветеринарной
медицины Академии наук Молдовы³*

*Государственное Научное Учреждение Всероссийский научно-исследовательский
институт животноводства Россельхозакадемии⁴*

*Приводится краткая характеристика метода определения аллеля, вызывающего
комплекс аномалий позвоночника (СVM) черно-пестрого скота, разводимого в Рос-*

© С.Н. Марзанова, Д.А. Девришов, И.С. Турбина,
В.А. Нагорный, Я.И. Алексеев, Н.В. Коновалова,
Д.Г. Сочивко, П.И. Люцканов, М.Х. Тохов, Н.С. Марзанов, 2013

Розведення і генетика тварин. 2013. № 47