

... ГЕНЕТИКА ...

УДК: 577.22.78: 577.37:595.787

Влияние степени инбридинга родительских компонентов межлинейных гибридов тутового шелкопряда на проявление эффекта гетерозиса и реакцию на лазерное облучение**Е.А.Бойко¹, Л.М.Чепель², С.В.Суханов¹**¹*Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины» (Харьков, Украина)*²*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
eaboiko@yandex.ru, slavasukhanov@yandex.ru*

Исследовали ряд количественных признаков (масса кокона, масса шёлковой оболочки, масса куколки) линий с различной степенью инбридинга и межлинейных гибридов тутового шелкопряда в контроле и после лазерного облучения грены. Показано, что реакция на облучение у линий зависит от степени их инбридинга: у линии с меньшей степенью инбридинга выявлено снижение показателей, у линии с большей степенью – повышение, по сравнению с контролем. Достоверных изменений признаков у межлинейных гибридов не отмечено, что свидетельствует об их большей устойчивости к данному фактору. При этом эффект гетерозиса по изученным показателям, выявленный в контроле у межлинейного гибрида, полученного на основе линий с большим различием в степени инбридинга, сохранился и после облучения.

Ключевые слова: *гетерозис, инбридинг, тутовый шелкопряд, линии, гибриды, количественные признаки, лазерное облучение.*

Вступлення

Эффект гетерозиса – генетическое явление, которое широко используется для повышения продуктивности и неспецифической устойчивости растений и животных. В то же время природа данного явления до конца не выяснена. Одним из направлений в изучении гетерозиса является исследование реакции инбредных и гибридных форм на действие физических факторов (Шахбазов, 1992). Лазерное излучение низкой интенсивности – один из наименее изученных факторов при исследовании гетерозиса. При этом в ряде работ показано влияние лазерного облучения на генетический аппарат растений и животных; обсуждаются причины мутагенного эффекта (Бельшева и др., 1984; Мусаев и др., 1973), выявлено модифицирующее влияние лазера на активность отдельных генов (Брилль и др., 1998; Зубкова и др., 1981), отмечено изменение ряда показателей растений и животных в онтогенезе и в последующих генерациях (Лысиков и др., 1975; Суханов, Бойко, 2007). Следует также отметить, что стимулирующий эффект данного физического фактора на организмы сейчас широко применяется для лечения и профилактики различных заболеваний человека.

Изучение природы гетерозиса на таком объекте, как тутовый шелкопряд, может дать результаты, которые, кроме теоретической ценности, будут иметь и практическое значение. Это связано с тем, что гетерозисные гибриды шелкопряда издавна используются в практике шелководства.

Ранее в нашей лаборатории проводились исследования, направленные на изучение реакции пород и межпородных гибридов тутового шелкопряда на низкоинтенсивное электромагнитное облучение. При этом было показано, что у межпородных гибридов шелкопряда по ряду признаков наблюдалась большая устойчивость к облучению, в сравнении с родительскими формами. Это выражалось в отсутствии достоверных изменений показателей после облучения грены у гибридов, в то время как у родительских форм при тех же условиях воздействия были установлены существенные изменения изученных параметров (Бойко и др., 2004а, б). Если принять, что большая устойчивость организма к лазерному воздействию связана с его гетерозиготностью, то можно предположить, что межлинейные гибриды тутового шелкопряда, полученные на основе линий с разной степенью инбридинга внутри одной породы, также будут характеризоваться повышенной устойчивостью к облучению, в сравнении с исходными родительскими линиями. Кроме этого, гомозиготность линий шелкопряда будет возрастать с увеличением степени их инбридинга, что также может привести к различиям в формировании количественных признаков у линий с разной степенью

инбридинга в контроле и после облучения. Однако подобные исследования на шелкопряде ранее не проводили. Поэтому целью данной работы было изучение изменений ряда количественных признаков у линий тутового шелкопряда с различной степенью инбридинга и их межлинейных гибридов при лазерном облучении грены.

Материал и методика

Объектом исследования являлась порода Бухарская тутового шелкопряда *Bombyx mori* L. Предварительно были получены линии с 4, 6 и 9 степенью инбридинга. В 2006 году на основе линий с 4 и 6 степенью инбридинга, а также с 4 и 9 степенью соответственно, были получены межлинейные гибриды 4×6 и 4×9. В то же время линии разводили далее путем инбридинга, поэтому в экспериментах 2007 года были использованы линии с 5, 7 и 10 степенью инбридинга (далее в тексте – линии 5, 7 и 10 соответственно) и вышеуказанные межлинейные гибриды.

Грену линий и гибридов шелкопряда на вторые сутки инкубации облучали He-Ne лазером (типа ЛНГ-111 с длиной волны 0,633 мкм и плотностью мощности 2,5 мВт/см²) при экспозиции 10 мин. Облучение проводилось на кафедре генетики и цитологии Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина. В качестве контроля использовали необлученную грену тех же генотипов.

Гусениц, вышедших из контрольной и облученной грены, выкармливали по общепринятой методике (Головкин та ін., 1998) и учитывали следующие количественные признаки: средняя масса кокона, средняя масса шёлковой оболочки, средняя масса куколки. При этом в каждом варианте исследования выкармливали по 100 гусениц и проводили индивидуальный провес 30 коконов.

Достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента; для обработки результатов также использовали однофакторный дисперсионный анализ (Лакин, 1990).

Результаты

При изучении контрольных значений массы кокона, массы шёлковой оболочки и массы куколки у линий с разной степенью инбридинга показано, что линия 10 (с наибольшей степенью инбридинга) характеризовалась наименьшими значениями массы шёлковой оболочки самок, массы кокона и массы оболочки самцов по сравнению с линиями 5 и 7 (табл. 1). По показателям массы кокона самок, а также массы куколки самок и самцов данная линия находилась на уровне линии 5. Таким образом, увеличение степени инбридинга до 10 приводило к снижению некоторых количественных показателей.

Таблица 1

Масса кокона, шёлковой оболочки и куколки линий породы Бухарская тутового шелкопряда с различной степенью инбридинга

Генотип	Самки			Самцы		
	Масса кокона, г	Масса оболочки, г	Масса куколки, г	Масса кокона, г	Масса оболочки, г	Масса куколки, г
Линия 5	1,16±0,03	0,174±0,006	0,98±0,03	1,01±0,02	0,192±0,005	0,82±0,01
Линия 7	1,36±0,03	0,199±0,006	1,16±0,03	1,15±0,03	0,206±0,009	0,94±0,03
Линия 10	1,19±0,03	0,157±0,005	1,03±0,02	0,95±0,02	0,153±0,003	0,79±0,01

При сравнении контрольных значений показателей коконов между линиями и межлинейными гибридами показано, что показатели гибрида 4×6 находились на уровне лучшей материнской линии 7 (рис. 1, а). В то же время гибрид 4×9 характеризовался гетерозисным эффектом по всем изученным признакам. При этом масса кокона, масса шёлковой оболочки, масса куколки самок и самцов гибрида была выше, чем у обеих родительских линий на 27,6–60,1 % (P<0,001) (рис. 1, б).

Таким образом, гетерозисный эффект по показателям коконов проявился у межлинейного гибрида, полученного на основе линий с большим различием в степени инбридинга (4 и 9 степень).

В связи с тем, что изученные межлинейные гибриды имели одинаковую материнскую компоненту, а отличались степенью инбридинга отцовской компоненты, был проведен однофакторный дисперсионный анализ для выяснения достоверности влияния степени инбридинга отцовской компоненты гибрида на проявление показателей коконов. При этом показано достоверное влияние (P<0,001) степени инбридинга отцовского генотипа на показатели массы кокона, массы шёлковой оболочки и массы куколки самок и самцов межлинейного гибрида. Сила влияния данного фактора составляла от 25,4% для массы шёлковой оболочки самцов до 67,0% для массы куколки самок.

Лазерное облучение грены (экспозиция 10 мин.) приводило к достоверным изменениям показателей самцов исследуемых линий, в то время как существенных модификаций признаков самок

не виявлено. При цьому наблюдались различия в реакции линий с разной степенью инбридинга на лазерное воздействие (рис. 2). Так, показано существенное снижение массы шёлковой оболочки самцов линии 5 (на 11,6%, $P < 0,001$), в сравнении с контролем. У линии 7 достоверных изменений изученных признаков не отмечалось, в то время как у линии 10 выявлено, напротив, повышение массы кокона самцов на 10,5% ($P < 0,05$) и массы шёлковой оболочки самцов на 9,2% ($P < 0,05$). То есть повышение значений признаков коконов по отношению к контролю наблюдалось у линии с большей степенью инбридинга.

У обоих межлинейных гибридов (4×6 и 4×9) не было выявлено достоверных изменений ни одного из изученных признаков после облучения. При этом гетерозисный эффект, выявленный в контроле у гибрида 4×9 по всем изученным признакам, после облучения сохранился.

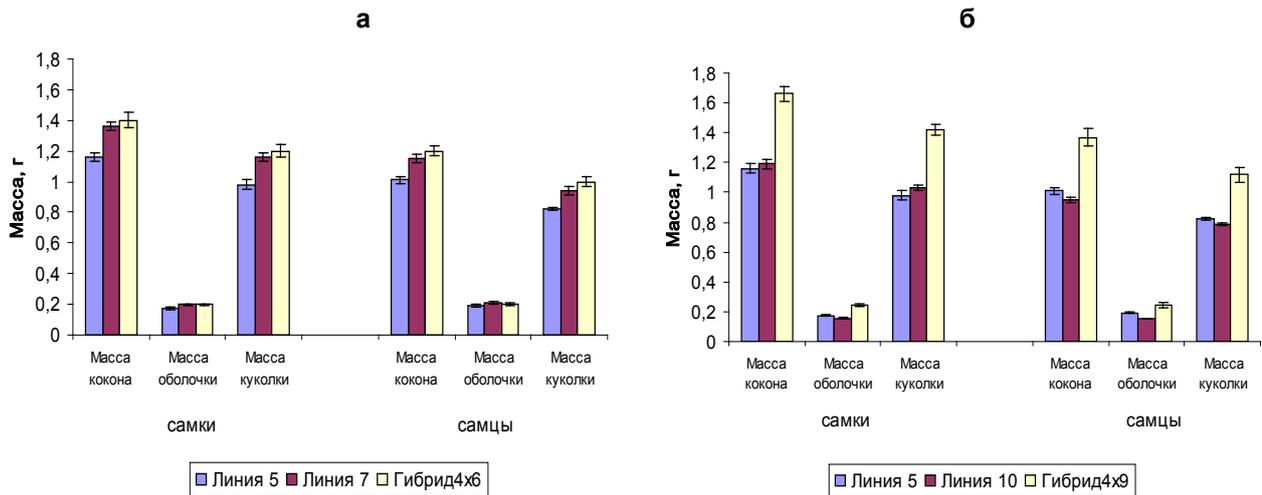


Рис. 1. Масса кокона, шёлковой оболочки и куколки линий 5, 7 и межлинейного гибрида 4×6 (а), и линий 5, 10 и межлинейного гибрида 4×9 (б) тутового шелкопряда в контроле

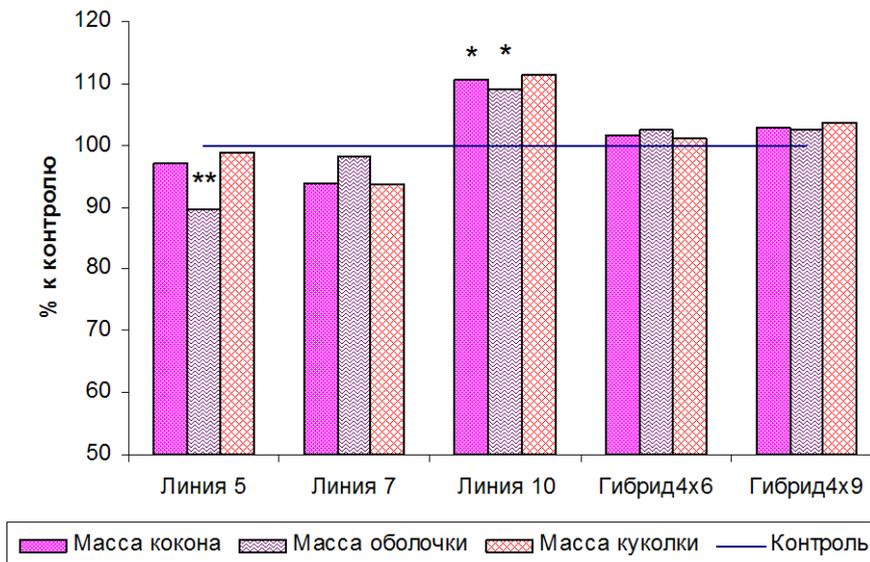


Рис. 2. Масса кокона, шёлковой оболочки и куколки у линий тутового шелкопряда с разной степенью инбридинга и межлинейных гибридов после лазерного облучения грены

Примечание: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$.

Так, контрольные значения массы шёлковой оболочки гибрида 4×9 были выше, чем у линий 5 и 7, на 39,1% и 54,1% ($P < 0,001$) соответственно, т.е. отмечался гетерозисный эффект. После облучения у родительских линий наблюдались достоверные изменения массы шёлковой оболочки, в то время как у межлинейного гибрида значение показателя облучённого варианта находилось на уровне контроля. При этом гетерозисный эффект после облучения сохранился: превосходство гибрида над линиями 5 и 7 составило соответственно 44,8% и 58,7% ($P < 0,001$).

Однофакторный дисперсионный анализ (фактор – лазерное облучение) подтвердил недостоверное влияние облучения на показатели коконов самок и достоверное – на показатели самцов изученных линий. При этом сила влияния фактора на массу кокона самцов для линии 10 составляла 9,3% ($P < 0,05$), на массу оболочки самцов для линии 5 составляла 12,7% ($P < 0,01$), для линии 10 – 8,5% ($P < 0,05$), на массу куколки линий 7 и 10 – была близкой и составляла 8,3% ($P < 0,05$) и 8,1% ($P < 0,05$) соответственно. Проведенный однофакторный дисперсионный анализ также показал недостоверное влияние облучения на показатели коконов межлинейных гибридов (табл. 2).

Таблица 2

Сила влияния лазерного облучения на количественные признаки линий и межлинейных гибридов тутового шелкопряда (%)

Генотип	Масса кокона	Масса шёлковой оболочки	Масса куколки
Бухарская (5)	2,39	12,65**	0,63
Бухарская (7)	5,83	0,34	8,26
Бухарская (10)	9,33*	8,54*	8,14
Бухарская (4)×Бухарская (6)	0,56	0,71	0,44
Бухарская (4)×Бухарская (9)	1,61	0,58	1,76

Примечание: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$.

Обсуждение

Проявление эффекта гетерозиса по показателям массы кокона, массы шёлковой оболочки и массы куколки у межлинейного гибрида тутового шелкопряда, полученного на основе линий породы Бухарская с большим различием в степени инбридинга (4 и 9 степень), очевидно, связано с большей гетерозиготностью гибрида 4×9, в сравнении с гибридом, полученным на основе линий с меньшим различием в степени инбридинга (4 и 6 степень).

Изменение количественных признаков на стадии куколки тутового шелкопряда после облучения лазером на его эмбриональной стадии, вероятно, связано с некоторыми эпигенетическими изменениями генома шелкопряда, возникшими после воздействия лазером. Это предположение основано на данных ряда работ, которые свидетельствуют о конформационных перестройках хроматина, вызванных ослаблением связи ДНК с белком после низкоинтенсивного, в том числе лазерного, облучения организмов (Брилль и др., 1998; Зубкова и др., 1981; Гапеев и др., 2003). Наследование эпигенетических изменений, по современным представлениям, объясняется с помощью механизмов клеточной памяти, в основе которых лежат белки. «Белки памяти», связываясь с регуляторными элементами, поддерживают открытую или закрытую структуру хроматина в прилегающих районах, закрепляют активированное (или молчащее) состояние транскрипции генов и передают его при митотическом, а иногда и при мейотическом делении клеток (Cavalli, Paro, 1999; Muller et al., 2002). При этом показано, что способность «белков памяти» поддерживать перепрограммированное состояние хроматина возможно только в том случае, если это перепрограммирование было осуществлено в эмбриональный период (Rank et al., 2002).

В связи с этим можно предположить, что воздействие лазером на эмбриональной стадии шелкопряда приводило к конформационному изменению хроматина. Это состояние, посредством вышеуказанных механизмов, сохранялось в ряду митотических делений клеток и на уровне организма выражалось в изменении проявлений количественных признаков, которые, как известно, имеют полигенную природу.

Выявленные различия в реакции на облучение у линий шелкопряда с разной степенью инбридинга, по-видимому, связаны с влиянием уровня гетерозиготности на проявление количественных признаков. В наших экспериментах увеличение степени инбридинга до 10 в контрольных условиях приводило к снижению некоторых количественных показателей, в сравнении с линиями с 5 и 7 степенью инбридинга. Лазерное облучение гены в данном случае выступало фактором, компенсирующим последствия инбредной депрессии и приводящим к повышению значений признаков у линии с пониженными показателями. Снижение значений количественных признаков у организмов с их исходно высокими значениями и, наоборот, их повышение у организмов с низкими значениями после лазерного облучения было ранее показано на ряде других объектах исследования, например, на линиях дрозофилы (Аленіна, 2000). Данные, полученные в наших экспериментах на линиях шелкопряда, свидетельствуют об универсальных механизмах реакции организмов на лазерное облучение.

Полученные различия в реакции самок и самцов на лазерное воздействие были отмечены нами ранее в исследованиях, проведенных на породе с различной пигментацией гены самок и самцов, в

которых также было показано влияние лазерного облучения гены на показатели коконов самцов и отсутствие подобного влияния на самок (Бойко и др., 2000). Однако данный вопрос пока остаётся открытым и требует дальнейшего изучения.

В представленной работе была также выявлена большая устойчивость межлинейных гибридов тутового шелкопряда (в том числе гетерозисного) к лазерному воздействию, что выражалось в отсутствии достоверных изменений изученных параметров у гибридов, в отличие от родительских линий, у которых были показаны существенные изменения показателей, по отношению к контролю. Полученные результаты согласуются с рядом наших работ, проведенных на породах и межпородных гибридах шелкопряда, в которых была показана большая устойчивость межпородных гибридов шелкопряда к низкоинтенсивному электромагнитному облучению, в сравнении с родительскими породами (Бойко и др., 2004а, б). Для объяснения полученных данных можно привлечь представления о связи большей устойчивости гибридных организмов с биофизическими особенностями их клеточных ядер, обусловленными особенностями электростатического и резонансного взаимодействия компонентов гибридного организма (Шахбазов, 1974, 2003).

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о роли гетерозиготности организмов в реакции на низкоинтенсивное лазерное облучение и расширяют наши представления о природе гетерозиса, а также могут быть полезными в шелководстве при поиске путей управления этим явлением.

Выводы

При исследовании некоторых количественных признаков линий породы Бухарская тутового шелкопряда показано, что повышение степени инбридинга до 10 приводит к снижению массы кокона, массы шёлковой оболочки и массы куколки данной линии в сравнении с показателями у линий с 5 и 7 степенью инбридинга. После лазерного облучения гены выявлено повышение изученных показателей по отношению к контролю у линии с 10 степенью инбридинга и снижение – у линии с 5 степенью инбридинга. Показано проявление эффекта гетерозиса по массе кокона, шёлковой оболочки и куколки у межлинейного гибрида, полученного на основе линий с большим различием в степени инбридинга, в контрольных условиях и его сохранение после облучения. У межлинейных гибридов достоверных изменений признаков после лазерного облучения не отмечено, что свидетельствует об их большей устойчивости к данному фактору, в сравнении с родительскими линиями, и роли гетерозиготности организмов в реакции на лазерное облучение.

Список литературы

- Аленіна С.Б. Вплив He-Ne лазера на прояв адаптивних кількісних ознак і біоелектричні властивості клітинних ядер у інбредних ліній і гібридів *Drosophila melanogaster*. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Х., 2000. – 19с.
- Белышева Н.К., Мавринская Л.Ф., Свечникова Л.И. Цитогенетический эффект лазерного облучения личинок *Dr. melanogaster* // Биол. действие лазерного излучения. – Куйбышев: КГУ, 1984. – С.3.
- Бойко Е.А., Суханов С.В., Шахбазов В.Г. Эффект гетерозиса и наследование количественных признаков у тутового шелкопряда в условиях электромагнитного облучения // Генетика. – 2004а. – Т.40, №9. – С. 1209–1214.
- Бойко Е.А., Суханов С.В., Шахбазов В.Г. Генетические различия в устойчивости тутового шелкопряда (*Bombyx mori* L.) к электромагнитному излучению // Материалы VIII Международной научной экологической конференции «Актуальные проблемы сохранения устойчивости живых систем». – Белгород, 2004б. – С. 23–24.
- Бойко Е.А., Шахбазов В.Г., Шаламова О.А. и др. Изменение некоторых биологических показателей *Bombyx mori* L. под влиянием лазерного облучения гены // Фотобиология и экспериментальная фотомедицина. – 2000. – Т.3, № 3–4. – С. 56–59.
- Брилль Г.Е., Панина Н.П., Белик Н.М. Временная динамика образования пухов de novo в политенных хромосомах хирономид под влиянием излучения гелий-неонового лазера // Материалы 11 Междунар. науч.-практ. конф. «Применение лазеров в медицине и биологии». – Ялта, 1998. – С. 4–5.
- Гапеев А.Б., Лушников К.В., Шумилина Ю.В. и др. Влияние низкоинтенсивного крайневисокочастотного электромагнитного излучения на структуру хроматина лимфоидных клеток in vivo и in vitro // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2003. – Т.43, №1. – С. 87–92.
- Головко В.О., Злотин А.З., Браславський М.Ю. та ін. Шовківництво. – Харьков: Оригинал, 1998. – 416с.
- Зубкова С.М., Лапрун И.Б., Соколова З.А., Попов В.И. Окислительные и синтетические процессы в тканях печени и мозга при действии излучения гелий-неонового лазера // Науч. докл. высш. шк. Биол. науки. – 1981. – №4. – С. 24–31.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352с.

- Лысыков В.Н., Плешанов П.Г., Бляндур О.В., Щеглов В.А. Лазерный мутагенез растений и резонансный механизм его действия // Проблемы фотоэнергетики растений. – Кишинёв: Штиинца, 1975. – Вып.3. – С. 160–171.
- Мусаев М.А., Абдулаева Т.Ю., Егизаров В.В. Мутагенный эффект действия лазерного излучения на томаты // Цитология и генетика. – 1973. – Т.5, №3. – С. 207–208.
- Суханов С.В., Бойко Е.А. Модифицирующий эффект лазерного облучения и наследование приобретённых модификаций у тутового шелкопряда (*Bombyx mori* L.) // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: Збірник наукових праць. – К.: Логос, 2007. – С. 322–325.
- Шахбазов В.Г. Механизмы формирования и проявления гетерозиса // Природа, проявления и прогнозирование гетерозиса. – К.: Наукова думка, 1992. – С. 5–15.
- Шахбазов В.Г. Новое в понимании биофизической природы эффекта гетерозиса // Труды по фундаментальной и прикладной генетике. – 2003. – Вып.2. – С. 58–70.
- Шахбазов В.Г. О физико-химических механизмах инбредной депрессии и гетерозиса // Генетика. – 1974. – №4. – С. 153–164.
- Cavalli G., Paro R. Epigenetic inheritance of active chromatin after removal of the main transactivator // Science. – 1999. – Vol.286. – P. 955–958.
- Muller J., Hart C., Francis N. et al. Histone methyltransferase activity of a Drosophila polycomb group repressor complex // Cell. – 2002. – Vol.111. – P. 197–208.
- Rank G., Prestel M., Paro R. Transcription through intergenic chromosomal memory elements of the Drosophila bithorax complex correlates with an epigenetic switch // Mol. Cell. Biol. – 2002. – Vol.22. – P. 8026–8034.

Вплив ступеня інбридингу батьківських компонентів міжлінійних гібридів шовковичного шовкопряда на прояв ефекту гетерозису і реакцію на лазерне опромінення
О.А.Бойко, Л.М.Чепель, С.В.Суханов

Вивчали ряд кількісних ознак (маса кокона, маса шовкової оболонки, маса лялечки) ліній з різним ступенем інбридингу та міжлінійних гібридів шовковичного шовкопряда в контролі та після лазерного опромінення грени. Показано, що реакція на опромінення у ліній залежить від ступеня їх інбридингу: у ліній з меншим ступенем інбридингу виявлено зниження показників, у ліній з більшим ступенем – підвищення, порівняно з контролем. Достовірних змін ознак у міжлінійних гібридів не відмічено, що свідчить про їх більшу стійкість до даного чинника. При цьому ефект гетерозису за вивченими ознаками, виявлений в контролі у міжлінійного гібрида, який був отриманий на основі ліній, більш контрастних за ступенем інбридингу, зберігся і після опромінення.

Ключові слова: гетерозис, інбридинг, шовковичний шовкопряд, лінії, гібриди, кількісні ознаки, лазерне опромінення.

Influence of the degree of inbreeding of parental components of silkworm interline hybrids on heterosis effect manifestation and on reaction to laser radiation
Ye.A.Boyko, L.M.Chepel, S.V.Sukhanov

A number of quantitative traits (cocoon weight, silk shell weight, and pupa weight) of lines with various degrees of inbreeding and of interline hybrids of silkworm – control ones and those following the exposure of eggs to laser radiation – have been studied. The reaction of lines to radiation was shown to be dependent on their degree of inbreeding: the line with a lower degree of inbreeding demonstrated a decrease in the indices while, for the line with a higher degree, an increase as compared with the control was observed. No significant change in the traits of the interline hybrids was observed; this evidences their higher resistance to this factor. The effect of heterosis in respect of the indices studied that was revealed in the control in the interline hybrid which was obtained on the base of lines with a large difference in their degrees of inbreeding remained also after irradiation.

Key words: heterosis, inbreeding, silkworm, lines, hybrids, quantitative traits, laser radiation.

Представлено: В.І.Россохою
Рекомендовано до друку: Л.І.Воробйовою