

- transformation with distinct *Agrobacterium tumefaciens* strains // Plant Sci. – 2005. – V. 168, N 6 – P. 1515-1523.
13. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. - Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, NY. - 1989.
14. Steinke F.H. Nutritional value of soybean protein foods / New protein foods in human health: nutrition, prevention and therapy. Eds.: Steinke F.H., Waggle D.H., Volgarev M.N. – 1991.- P. 59-67.
15. Yemets A.I., Klimkina L.A., Tarassenko L.V., Blume Ya.B. Efficient callus formation and plant regeneration from dinitroaniline-resistant and susceptible biotypes of *Eleusine indica* (L.) // Plant Cell Rep. – 2003. – V. 21. – P. 503-510.

Резюме

Осуществлена биолистическая трансформация сои конструкцией с мутантным геном α -тубулина, обеспечивающим устойчивость к динитроанилиновым гербицидам. В результате селекции отобраны трифлуралин-устойчивые растения сои, трансгенная природа которых подтверждена с помощью блоттинг-гибридизации по Саузерну с использованием специфического зонда к мутантному гену тубулина.

Здійснено біолистичну трансформацію сої конструкцією з мутантним геном α -тубуліну, що забезпечує стійкість до динітроанілінових гербицидів. В результаті селекції відібрано трифлуралін-стійкі рослини сої, трансгенна природа яких підтверджена за допомогою блотинг-гібридизації за Саузерном з використанням специфічного зонду до мутантного гена тубуліну.

Biolistic transformation of soybean by construct with mutant α -tubulin gene has been realized. During the selection a trifluralin-resistant soybean plantlets were picked up. Their transgenic nature was confirmed by Southern blotting hybridization using specific probe to mutant tubulin gene.

ЗАБЕЛИНА В.Ю., ДОРОШЕНКО К.А., КЛИМЕНКО В.В.

Харьковский национальный университет им. В.Н.Каразина

Украина, 61077, Харьков, пл. Свободы, 4, E-mail: belkina1983@mail.ru

РАЗВИТИЕ В ЧУЖЕРОДНОЙ СОМЕ ТРАНСПЛАНТИРОВАННЫХ ЯИЧНИКОВ И СПОСОБНОСТЬ К ТЕРМИЧЕСКОМУ ПАРТЕНОГЕНЕЗУ СФОРМИРОВАВШИХСЯ В НИХ ЯИЦ У ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА ВОМВУХ MORI L.

Полученные нами ранее результаты показывают, что при имплантации яичников породы Советская-5 в клон Р29 показатели полного термопартеногенеза повышаются с низкого до такого уровня, который достаточен для партеноклонирования этой известной породы. При трансплантации яичников клона Р29 в мужскую сому породы Советская-5 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 приживаемости имплантата в чужеродной соме в зависимости от пола реципиента, способности к термоактивации и полному термическому партеногенезу яиц, развившихся в имплантате при использовании различного исходного материала.

Изучение изменений способности яйца к партеногенезу вследствие прохождения оогенеза в чужеродной соме позволит приблизиться к пониманию природы факторов,

ответственных за онтогенетическую детерминацию процессов партеногенетического развития. Выяснение механизмов термопартеногенеза на данной модели необходимо не только для решения проблемы клонирования любого женского генотипа у тутового шелкопряда, но и партеноклонирования у животных вообще.

Материалы и методы

Объектом исследования служил *тутовый шелкопряд Bombyx mori L.* В качестве материала использовали партеногенетический диплоидный клон P29, обладающий высокой способностью к партеногенезу: водный прогрев при 46°C в течение 18 мин. дает здесь около 100% активированных (пигментированных) яиц; при этом процент вылупления личинок (полный партеногенез) составляет 95%. По отношению к этому клону-рекордисту оценивали ход оогенеза в имплантатах и способность к термоактивации и полному термическому партеногенезу в нескольких других клонах: диплоидном клоне P178, уникальном по своей способности к спонтанному партеногенезу, тетраплоидном клоне P4n17 и диплоидном клоне Pos. Для раннего определения пола личинок в опытах использовали породу Советская-5(C-5), меченную по полу на стадии яйца. Порода C-5 обладает низкой способностью к полному термопартеногенезу, около 0,1%. Использованные клоны и порода моновольтинны, то есть отложенные бабочками яйца обязательно уходят в диапаузу. Экспериментальный материал выращивали в соответствии с общепринятыми зоотехническими требованиями.

Трансплантация гонад. Метод заключается в имплантации яичников донора в сому реципиента. Трансплантацию гонад проводили в III и IV личиночных возрастах по разработанной ранее методике. Дошедших до стадии имаго бабочек вскрывали и извлекали имплантат для изучения развившихся в нем яиц.

Термоактивация. Ооциты, развившиеся в имплантированных яичниках, 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; за способность к полному термопартеногенезу принимали процент вылупившихся личинок в выборках пигментированной гены.

Результаты и обсуждение

Результаты выживаемости оперированных гусениц и приживаемости в них имплантированных гонад приведены в таблице 1. Они свидетельствуют о том, что при используемых условиях выкормки до стадии имаго доходит в среднем 70% реципиентов, в которых приживается около 60 % имплантированных гонад. Существенных различий по изучаемым показателям между самцами- и самками-реципиентами не обнаружено.

Таблица 1

Выживаемость оперированных гусениц и приживаемость имплантированных гонад

№ опыта	Трансплантации	Кол-во реципиентов	Кол-во реципиентов в V возрасте	Кол-во имаго	Имаго с имплантатом
1	♀C-5 → P29	28	22 (79%)	21 (75%)	18 (64%)
2	♀C-5→P178	28	21 (75%)	20 (71%)	15 (54%)
3	♀C-5→Pos	30	23 (77 %)	19 (63%)	16 (57%)
4	♀C-5→P4n17	28	24 (86%)	22 (79%)	16 (57%)
5	P29→♂C-5	30	25 (83%)	23 (77%)	21 (70%)
6	P178→♂C-5	28	21 (75%)	18 (64%)	15 (54%)
7	P4n17→♂C-5	27	20 (74%)	17 (63%)	16 (59%)
8	Pos→♂C-5	26	22 (85%)	15 (58%)	13 (50%)

Таблица 2 показывает, что яйца породы C-5, развившиеся в клонах-реципиентах, активируются в достаточно высокой степени по сравнению с интактным контролем C-

5, более того их способность к полному термопартеногенезу возрастает с 0,1 – 0,5% (таблица 4) до 30 – 42%.

Таблица 2

Способность к партеногенезу яиц породы С-5, развившихся в яичниках, имплантированных в личинок различных партеноклонов и яиц, развившихся в собственных гонадах реципиентов

Вариант трансплантации	Кол-во бабочек	Общ. кол-во яиц	Активация яиц		Выход личинок		
			шт.	%	шт.	% от активации	% от общ. кол-ва яиц
С-5 → Р29	18	2351	2139	91	917	43	39
С-5→Р178	15	2020	1615	80	763	47	38
С-5→Pos	16	2143	1492	75	689	46	32
С-5→Р4n17	16	2101	1302	62	429	33	20
Контроль							
Р29	18	5201	5096	98	4229	83	81
Р178	15	4952	4556	92	3463	76	70
Pos	16	4790	3879	81	2017	52	42
Р4n17	16	4983	4634	93	2734	59	55

При пересадке яичников исследуемых клонов в мужскую сомую яйца, формирующиеся в имплантатах, сохраняют способность к полному термопартеногенезу, хотя уровень его ниже в сравнении с контрольными значениями (таблицы 3, 4). Во всех вариантах трансплантаций яичников клонов в личинок мужского пола вызванное термоактивацией развитие яиц, сформированных в имплантате, протекает без диапаузы, несмотря на то, что весь использованный материал моновольтинный. В случае имплантации яичников клона Р29 в самцов породы С-5 в 6 кладках мы наблюдали одновременный выход типичных черных и отличавшихся от них по фенотипу рыжих личинок. На данном этапе природа этого явления нами не изучена. Возможно, это связано с проявлением рецессивного аллеля гетерозигот +/ch (Р29), которое свидетельствует о различии процессов экспрессивности генов в указанном локусе для разных яиц имплантата.

Таблица 3

Способность к партеногенезу яиц различных партеноклонов, развившихся в яичниках, имплантированных в личинок мужского пола породы С-5

Вариант трансплантации	Кол-во бабочек	Общ. кол-во яиц	Активация яиц		Выход личинок		
			шт.	%	шт.	% от активации	% от общ. кол-ва яиц
Р29→С-5	21	2417	2248	93	1236	55	51
Р178→С-5	15	1378	1172	85	586	50	43
Р4n17→С-5	16	874	568	65	199	35	23
Pos→С-5	13	793	317	40	95	30	12

Таблица 4

Способность к партеногенезу яиц различных партеноклонов и яиц породы С-5, развившихся в собственных яичниках гусениц (интактный контроль)

Название	Кол-во бабочек	Общ. кол-во	Активация яиц		Выход личинок		
			шт.	%	шт.	% от	% от

		яиц				активации	общ. кол-ва яиц
P29	21	6192	6068	98	5522	91	89
P178	15	5020	4668	93	3734	80	74
P4n17	16	5124	4765	93	3097	65	60
Pos	13	3817	3244	85	1816	56	48
C-5	20	5305	1856	35	9	0,5	0,2

Выводы

Выживаемость оперированных личинок и приживаемость в них имплантата достаточно высоки и практически не зависят от пола реципиента.

Для повышения способности к термопартеногенезу линейного и породного материала возможно использование не только клона-рекордиста P29, но и других партеноклонов.

Метод трансплантации яичников - в сочетании с методом термоактивации по Астаурову и, в перспективе, с методами молекулярной биологии - представляется целесообразным и достаточно эффективным в экспериментальном анализе процессов, приводящих к формированию в оогенезе механизмов, которые определяют способность зрелого яйца к активации и дальнейшему развитию.

Литература

1. Астауров Б.Л. Искусственный партеногенез у тутового шелкопряда. – М. – Л.: Изд-во АН СССР, 1940. - 240с.

2. 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.

3. 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 партеноклона // Вестник ХНУ им. В.Н.Каразина. Серия биология. – 2006. – В.3, №729. – С. 72–75.

4. 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. – В.3, №729. – С. 76–80.

5. Клименко В.В., Дорошенко К.А., Забелина В.Ю. Термический партеногенез у тутового шелкопряда: возможности клонирования и бездиапаузного развития методом трансплантации яичников // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології – 2007 – Т.1. – С. 236–240.

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

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

8. 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.

9. 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.

10. 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.

11. Klymenko V.V., Spiridonova T.L., Frolova N.M. Ooplasmic determinants of silkworm egg capability for complete thermal parthenogenesis. // Biologicheskii vestnik. –

2006. – vol.10. – P.103-108.

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

Резюме

Используя партеноклоны и линии тутового шелкопряда, изучали развитие яичников, имплантированных в полость тела самок и самцов. Оценивали их развитие в чужеродной соме и способность к термопартеногенезу формировавшихся таким путем яиц.

Використовуючи партеноклони та лінії шовковичного шовкопряда, вивчали розвиток яєчників, імплантованих у порожнину тіла самиць та самців. Оцінювали їх розвиток в чужорідній сомі та здатність до термопартеногенезу яєць, що формувалися у такий спосіб.

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.

ЗАГОРСКАЯ А.А., СИДОРЧУК Ю.В., ДЕЙНЕКО Е.В.

Институт цитологии и генетики СО РАН,

Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева 10, e-mail:zagorska@bionet.nsc.ru

МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА ПРИ СПОНТАННОЙ ПОЛИПЛОИДИЗАЦИИ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

В созданной нами ранее коллекции трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) были выделены растения с аномальной морфологией цветков и сниженной мужской фертильностью [1]. Изменения морфологии проявились в нарушении пропорций цветка, в частности, соотношения диаметра венчика к его длине. Кроме того, для этих трансформантов была характерна особая форма цветка с закрученными к основанию лепестками, а рыльце пестика было увеличено в диаметре. Такой фенотип получил название «волнистый венчик». Проведенный цитологический анализ показал, что растения с фенотипом «волнистый венчик» характеризовались удвоенным набором хромосом $2n=96$. Представляло интерес исследовать морфофизиологические изменения, возникающие в растениях в процессе введения его в культуру и после генетической трансформации. Цель данной работы – анализ содержания и соотношения фитогормонов в цветках полиплоидных трансгенных растений табака с измененным фенотипом, находящихся на разных стадиях развития.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили растения табака (*Nicotiana tabacum*, L.) с фенотипом «волнистый венчик», обозначенные Res79; Res60; Res61; 121.89; 16.70, выделенные нами ранее из серии независимо полученных трансформантов. Для анализа фитогормонального состава были выбраны растения с наиболее ярко выраженным измененным фенотипом. Для выявления таких растений был проведен морфометрический анализ элементов цветка, включающий измерение следующих параметров: длины пестика, тычиночных нитей и венчика, а также диаметра венчика и рыльца пестика полностью раскрывшихся цветков, находящихся на XII стадии развития [2]. Для измерения брали по 20 - 50 цветков с каждого растения. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента. В таблице представлены средние значения и их стандартные ошибки.