

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 сформировавшихся 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.

Содержание ИУК и суммарных цитокининов (зеатина и зеатинрибозид) определяли в цветках, находящихся на разных стадиях развития, после фиксации жидким азотом и последующей лиофилизации по общепринятым методикам [3, 4]. Измерения проводили в 3-5 биологических повторностях. В качестве контроля использовали цветки исходной нетрансгенной линии табака SR1.

Результаты и обсуждение

Результаты морфометрического анализа растений с фенотипом «волнистый венчик», представленные в таблице 1, показали, что признаками, определяющими фенотип, были диаметр венчика и диаметр рыльца. Диаметр венчика контрольных растений составлял в среднем 8 мм. У исследуемых же растений этот показатель изменялся от 9,6 мм у растения Res60 до 10,5 мм у 121.89. Диаметры рыльца пестика у трансгенных тетраплоидных растений также были больше, чем у растений линии SR1, и изменялись от 2,5 мм (минимальное значение у растения Res60) до 3,1 мм (максимальное значение - у 121.86). Растение же 16.70 характеризовалось не только изменением строения венчика, но и превышением длины пестика над длиной тычиночных нитей, то есть было лонгостильным.

Таблица 1. Морфометрический анализ трансгенных растений T₀ с фенотипом «волнистый венчик» (мм)

	SR1	Res79	Res60	Res61	121.89	16.70
Длина пестика	42,17±0,29	43,40±0,22*	41,37±0,24	41,77±0,24	41,73±0,05	45,20±0,49*
Длина тыч.нити	42,67±0,25	42,30±0,23	40,33±0,26*	40,73±0,20*	41,07±0,21*	41,67±0,41
Длина венчика	41,90±0,29	42,23±0,20	40,53±0,29*	39,47±0,26*	40,97±0,26	42,27±0,36
Диаметр венчика	8,02±0,07	10,08±0,06*	9,65±0,16*	9,94±0,11*	10,54±3,01*	10,16±0,06*
Диаметр рыльца	2,23±0,02	3,08±0,02*	2,54±0,04*	2,98±0,02*	3,04±0,02*	3,23±0,04*

- - имеется достоверное различие по сравнению с контролем SR1 ($t_{\phi} > t_{0,95}$)

Иммуноферментный анализ ИУК и суммарных цитокининов на различных стадиях развития цветка (от стадии тетрад до стадии зрелого цветка) выявил значительные отличия в содержании и динамике фитогормонов между полиплоидными трансгенными растениями и контрольным растением SR1.

Установлено, что у контрольного растения SR1 содержание ИУК в тканях цветков достигало максимальных значений на стадии I развития цветка (стадия тетрад) и составляло 1785 нг/г. На последующих стадиях концентрация ИУК постепенно снижалась до значений 133,5 нг/г на стадии XII (стадия зрелой пыльцы) (рис 1).

В цветках трансгенного растения табака Res79 с фенотипом «волнистый венчик» концентрация ИУК также равномерно снижалась со значения 1956,8 нг/г на стадии I до 523,1 нг/г на стадии VI (стадия первого митоза в пыльце). На этой стадии содержание ИУК в опытном и контрольном образцах было практически одинаковым (519,0 нг/г у нетрансгенного контроля SR1). Однако, на стадии VIII (объединение пыльцевых сумок в пыльнике) в цветках растения Res79 наблюдалось резкое повышение содержания ИУК до значений, более чем втрое превышающих концентрации ИУК у контроля (1505,6 нг/г и 480,4 нг/г, соответственно). На последующих стадиях развития цветка содержание ИУК у растения Res79 постепенно снижалось, однако на XII стадии продолжало оставаться высоким и превышало в 3-5 раз уровень данного гормона у контрольного растения (669,7 нг/г и 133,5 нг/г у Res79 и SR1, соответственно).

Динамика ИУК

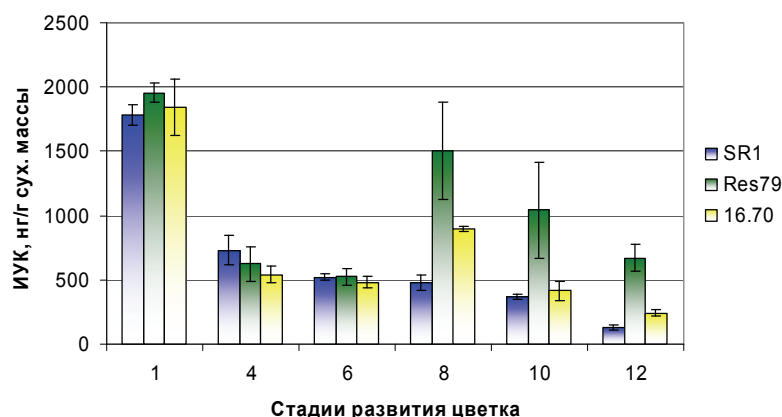


Рис. 1. Содержание ИУК в тканях цветков табака на разных стадиях развития у трансгенных полиплоидных растений и у контроля SR1

В цветках трансгенного растения 16.70 с сочетанием лонгостилии и фенотипа «волнистый венчик» наблюдалась аналогичная динамика содержания ИУК. На VIII стадии развития также наблюдалось повышение концентрации ИУК по сравнению с контролем, однако у этого растения оно было только двукратным и составило 898,3 нг/г. На стадиях X и XII уровень ИУК постепенно снижался, оставаясь вдвое более высоким, чем у контрольного образца (417,2 нг/г и 242,2 нг/г, соответственно).

Анализ содержания цитокининов показал, что суммарное количество зеатина (Z) и зеатинрибозида (ZR) в цветках растений контрольной линии SR1 незначительно (с 103,6 нг/г до 166,3 нг/г) повышалось со стадии I до VI (рис. 2). На стадии VIII наблюдали скачкообразное повышение концентрации цитокининов до 323,4 нг/г. На X стадии уровень гормона снижался (217,4 нг/г) и уже практически не менялся к моменту раскрытия цветка.

В цветках трансгенного растения Res79 суммарное содержание цитокининов на всех стадиях развития, кроме стадии I, было несколько ниже, чем в цветках контрольных растений (133,0 нг/г, 101,2 нг/г; 124,5 нг/г на I-VI стадиях, соответственно). Динамика данной группы гормонов в ходе развития цветка соответствовала динамике цитокининов у контроля. Как и у контрольного растения, у Res79 наблюдали резкое (двукратное) повышение уровня цитокининов на VIII стадии, а на последующих стадиях проявлялась тенденция к снижению их содержания до стадии раскрытого цветка.

Сумма цитокининов

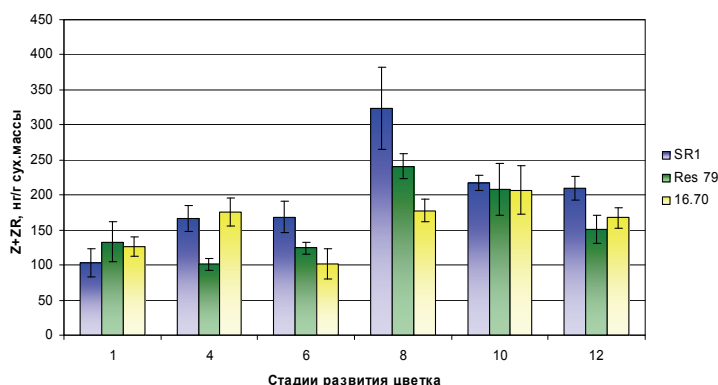


Рис. 2. Содержание суммарных цитокининов в тканях цветков табака на разных стадиях развития у трансгенных полиплоидных растений и у контроля SR1

Определение уровня цитокининов у растения 16.70 показало, что на начальных стадиях развития цветка содержание цитокининов практически не отличается от значений контрольного растения. Однако к стадии VI их концентрация у трансгенного растения в 1,6 раза ниже, чем у контрольного (101,9 нг/г у растения 16.70, у растения SR1 - 166,3 нг/г). На стадиях VIII и X содержание цитокининов у данного образца

несколько повышается (177,8 нг/г и 207,0 нг/г, соответственно), но также остается более низким, чем у контрольного растения. На завершающей XII стадии оно снижается до значения 167,8 нг/г, в отличие от контроля, у которого содержание цитокининов остается неизменным на X-XII стадиях.

Формирование измененного фенотипа цветка, проявляющегося в виде волнистого венчика, также может быть вызвано колебаниями фитогормонального фона в процессе его развития. Известно, что морфогенез органов и тканей у растений определяется ориентацией цитоскелетных структур в ходе деления и роста клетки, включающих веретено деления, расположение которого определяет направление роста клеточных клонов, и интерфазные кортикальные спирали микротрубочек, направляющие рост клетки растяжением. Как показано ранее, реориентация цитоскелетных структур происходит под влиянием ряда факторов: при созревании клетки, освещении, поранении и др. [5]. Однако одним из самых действенных факторов являются фитогормоны. В частности, в ряде работ исследовалось влияние ауксинов на деление и рост клеток [6,7]. Установлено, что попеременная обработка клеток эпидермиса гипокотилей фасоли растворами, содержащими и не содержащими ауксины, приводила к обратимому изменению ориентации расположения микротрубочек и микрофиламентов [5]. Аналогичные результаты были получены и на изолированных клетках мезофилла табака [8]. Следовательно, можно предположить, что колебание содержания ауксинов в процессе морфогенеза цветка могут явиться причиной изменения морфологии венчика, а описанный нами фенотип «волнистый венчик» формируется в связи со скачкообразным увеличением содержания ИУК в цветках растения Res 79 на VIII стадии развития цветка.

Вариации уровня пloidности, полученные в результате экспериментов по трансформации и регенерации растений, были описаны ранее [9]. Важно понять роль эндорепликации в процессах регенерации и трансформации для того, чтобы контролировать уровень соматоклональной вариации и полиплоидизации в культуре ткани. Ряд исследований посвящены изучению возможности появления полиплоидных клеток в результате процессов эндоредупликации в различных типах тканей у различных растений. Показано, что ткань листа часто является миксоплоидной, с высокой долей тетраплоидных клеток. Соответственно, существует корреляция между долей полиплоидных клеток в ткани экспланта и количеством полиплоидных регенерантов, полученных в результате данных опытов.

Еще одним фактором, влияющим на образование полиплоидных форм в процессе получения трансгенных растений, как известно, является воздействие на растительные ткани регуляторов роста. Многолетние исследования показывают, что длительное приводит к изменению уровня пloidности у регенерантов. Показано, что частота появления тетраплоидных трансформантов томатов [9], полученных в результате агробактериальной трансформации, зависит от длительности процедуры регенерации.

Таким образом, проведенные исследования выявили значительные морфофизиологические изменения у трансгенных растений табака, связанные со спонтанной полиплоидизацией в культуре *in vitro* и изменениями в содержании и динамике фитогормонов между полиплоидными трансгенными и контрольными нетрансгенными растениями.

Работа выполнялась при поддержке гранта НШ-1814.2008.4.

Литература

1. Дейнеко Е.В., Загорская А.А., Сидорчук Ю.В., Новоселя Т.В., Филипенко Е.А., Комарова М.Л., Шумный В.К. Особенности морфологических признаков и фертильности пыльцы у трансгенных растений табака// Физиология растений. 2000. Т.47.№ 1. С.73-78.

2. Koltunow A.M., Truettner K. H. Cox K.H., Wallroth M., Goldberg R.B. Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development// *The Plant Cell*. 1990. V.2. P. 1201 -1 224.
3. Vysotskaya L. B., Timergalina L. N., Simonyan M. V. , Veselov S. Yu., Kudoyarova G.R. Growth rate, IAA and cytokinin content of wheat seedling after root pruning // *Plant Growth Regulation*. 2001. V. 33. P 51–57.
4. Veselov S.Yu., Kudoyarova G.R., Egutkin N.L., Gyuli-Zade V.Z., Mustafina A.R., Kof E.M. Modified solvent partitioning scheme providing increased specificity and rapidity of immunoassay for indole 3-acetic acid // *Physiol Plant*. 1992. V. 86. P. 93–96.
5. Клячко Н.Л. Фитогормоны и цитоскелет// *Физиология растений*. 2003. Т.50. №3. С.475-480.
6. Campanoni P., Nick P. Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-Naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways// *Plant Physiology*. 2005. V. 137. P. 939–948.
7. Chilley P., Casson S, Tarkowski P., Hawkins N., Wang K., Hussey P., Beale M., Ecker J., Sandberg G., Lindsey K. The POLARIS peptide of *Arabidopsis* regulates auxin transport and root growth via effects on ethylene signaling// *Plant Cell*. 2006. V. 18. № 11. P. 3058–3072.
8. Vissenberg K., Quelo A.H., Van Gestel K., Olyslaegers G., Verbelen J.P. From hormone signal, via the cytoskeleton, to cell growth in single cells of tobacco// *Cell Biol Int*. 2000. V.24. №6. P. 343-349.
9. Ellul P, Garcia-Sogo B, Pineda B, Ríos G, Roig LA, Moreno V. The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is genotype and procedure dependent // *Theor Appl Genet*. 2003 Jun;107(1):190. 2003

Резюме.

Были изучены морфофизиологические изменения у трансгенных растений табака при спонтанной полиплоидизации в культуре *in vitro*. Выявлены значительные отличия в уровне ИУК и суммарных цитокининов между трансгенными полиплоидными растениями с измененным фенотипом цветка и нетрансгенным контролем.

The morphophysiological changes in transgenic tobacco plants during spontaneous polyploidization coming from *in vitro* cultures were analyzed. Considerable distinctions in IAA and total cytokinin levels between polyploidy plants with altered flower phenotype and nontransgenic control plants were discovered.

ИШМУРАТОВА Н.М.¹, ИСМАГИЛОВА А.Ф.², ЯКОВЛЕВА М.П.¹, ТОЛСТИКОВ Г.А.¹

¹*Институт органической химии Уфимского научного центра РАН, Россия, 450054, г. Уфа, проспект Октября, 71, e-mail: insect@anrb.ru*

²*Башкирский государственный аграрный университет, Россия, 450001, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34.*

НЕИЗВЕСТНОЕ О «МАТОЧНОМ ВЕЩЕСТВЕ» МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ

Внимание ученых и практиков все больше привлекают препараты, созданные на основе доступных из природных источников биологически активных веществ и применяемые для стимулирования жизнедеятельности, повышения иммунитета, устойчивости к стрессовым факторам и лечения заболеваний пчел. Известно, что защитные силы организма состоят из неспецифического и специфического звеньев. Естественная резистентность – это первичная неспецифическая защита организма от