

УДК 633.63:523.11:581.3

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ У ГЕНОМОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ, УСТОЙЧИВЫХ К ГЛИФОСАТУ

Н.Р.Фоменко, Т.П.Жужалова

Представлены морфологические отличия трансгенных форм сахарной свеклы, устойчивой к глифосату, выражающиеся в изменении формы листьев, структуры цветков, фертильности пыльцевых зерен. Это, возможно, обусловлено встраиванием чужеродной ДНК в районы расположения генов, отвечающих за флоральный морфогенез.

При создании трансгенных растений посредством векторного переноса чужеродных генов инсерции экзогенной ДНК могут происходить в транскрипционно активные районы растительного генома, изменяя функционирование отдельных генов растения (Koncz С, Martini N., Mayerhofer R. et al., 1989). Это явление получило название Т-ДНК-индуцированного мутагенеза. Спектр описанных в литературе Т-ДНК-индуцированных мутаций очень широк: изменение величины и формы листовых пластинок (Van Lijsebettens M., Vanderhaeghen R., Van Montagu M., 1991), структуры цветка и соцветия (Komari T., 1990; Дейнеко Е.В., 2000), эмбриолетальность и мужская стерильность (Soon Ki Park, Yong Hwi Yoon, Byung Chul Kim et al., 1996; Дейнеко Е.В., 2000)

В связи с этим целью наших исследований было установить, существуют ли цитоморфологические отличия у геномодифицированных растений сахарной свеклы, устойчивых к гербициду широкого спектра действия глифосату в сравнении с нетрансгенными формами.

Материалы и методы. Для проведения исследований использовались растения трансгенного сорта сахарной свеклы НМ-1807-RR, устойчивого к гербициду глифосату. Для выявления морфологических отличий проводилась визуальная оценка трансгенных и контрольных растений I и II года жизни. Для изучения развития мужского гаметофита фиксировали бутоны, находящиеся на разных этапах развития в растворе Карнуа. Определение фертильности пыльцевых зерен и изучение мейоза при микроспорогенезе проводили по общепринятой цитологической методике (Паушева З.И., 1970). Просмотр цитологических препаратов проводили на микроскопе Jenaval. Для изучения морфологического строения цветков у каждого исследуемого растения под бинокулярной лупой просматривалось не менее 100 цветков.

Результаты исследований. При проведении исследований у трансгенных форм сахарной свеклы были выявлены морфологические отличия в ходе онтогенетического развития, выражающиеся в появлении у растений I года жизни и у 45% растений II года жизни розеточных листьев, сросшихся между собой по два и по три черешками, а в ряде случаев и листовыми пластинками (рис.1).

У части растений помимо сросшихся листьев, были обнаружены розеточные листья с редуцированными листовыми пластинками. Отмечалось

широкое разнообразие формы и размеров розеточных листьев. Наряду с растениями, имеющими листья яйцевидной формы, были обнаружены растения с гладкими стреловидными, удлинено-продолговатыми, овальными, округлыми листьями.

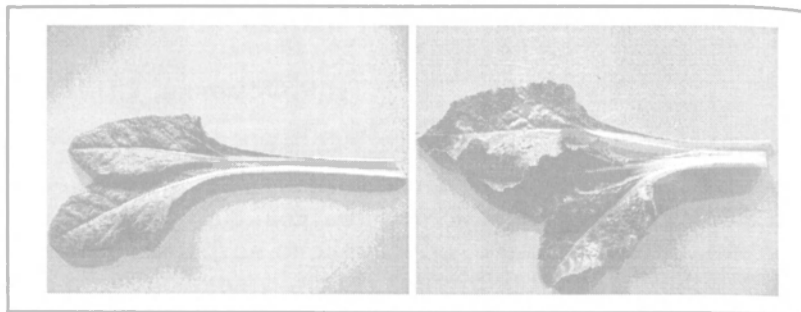


Рисунок 1 — Розеточные листья трансгенных растений свеклы, сросшиеся черешками и листовыми пластинками.

Основные отклонения у трансгенов были связаны с прохождением репродуктивного цикла развития. У 6% исследуемых форм центральный побег отрастал, но генеративные органы на нем не формировались, и характерного для свеклы моноподиального ветвления побега не наблюдалось (рис. 2).



Рисунок 2 — Трансгенное растение свеклы II года жизни, у которого не сформировались соцветия и отсутствует характерное моноподиальное ветвление побега.

У изучаемых трансгенов были обнаружены аномалии в структуре цветков, выражающиеся в увеличении или уменьшении числа чашелистиков, тычинок, лопастей рыльца. В норме сформированный цветок свеклы обоеполый, имеет простой раздельнолепестной околоцветник, состоящий из 5 чашелистиков. Андроцей представлен кругом из 5 тычинок, расположенных против чашелистиков. Гинецей состоит из трех не полностью срастающихся плодолистиков, верхушки которых образуют трехлопастное сидячее рыльце, покрытое сосочками. У исследуемых форм число чашелистиков и тычинок в цветке могло варьировать от 4 до 7 штук (рис. 3).

Наблюдалось срастание 2 или более чашелистиков попарно между собой (рис.4).

Количество тычинок не соответствовало...

цветника. Отмечалось образование добавочных тычинок, располагающихся между чашелистиками. В ряде случаев в цветках наблюдалось срастание 2 тычинок друг с другом по всей длине тычиночных нитей (рис.5). Одним из наиболее часто встречаемых нарушений было образование 4-х и 5-ти лопастного рыльца, встречались так же цветки с 2-х, 6-ти лопастным рыльцем. Характерным было формирование ассиметричных рылец с неравно развитыми лопастями и слабозразвитыми сосочками. Количество цветков с измененным строением варьировало на растениях от 6,8 до 50 % .

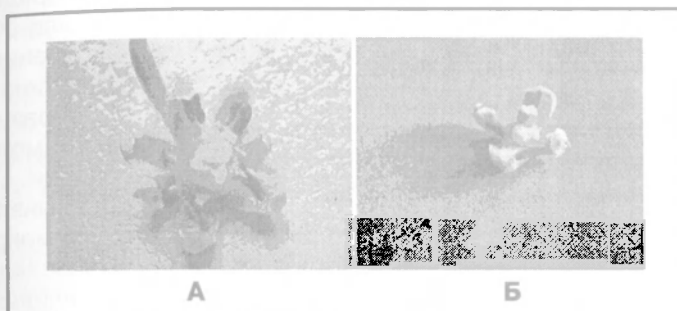


Рисунок 3 — Аномалии в структуре цветков трансгенной свёклы
Примечание. а) чашечка цветка состоит из 7 чашелистиков, андроцей представлен 6 тычинками, рыльце 4-х лопастное; б) цветок имеет 4 чашелистика и 4 тычинки.



Рисунок 4 — Срастание двух чашелистиков в цветке трансгенной свёклы.

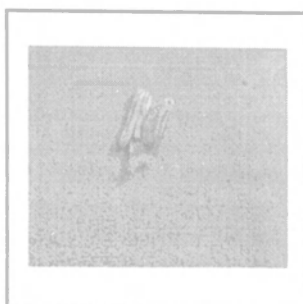


Рисунок 5 — Две тычинки срастаются в цветке трансгенной свёклы.

У контрольных растений были замечены цветки, имеющие по 6 чашечек и тычинок, а так же с 4-х, 5-ти лопастным рыльцем, которые встречались единично.

Изучение развития мужского гаметофита позволило выявить некоторые отклонения от нормы в ходе мейоза при микроспорогенезе. Наиболее частыми нарушениями были выбросы хромосом в цитоплазму клетки в метафазе I и II, отставание хромосом в анафазе I и II. Несколько реже встречались образование межполюсных мостов и параллельных веретен в анафазе II. В метафазе II наблюдались выбросы хромосом в цитоплазму, беспорядочный выброс хроматина по клетке. На стадии тетрад микроспор были обнаружены моноады, диады, триады, иногда встречались пентады. По мнению ряда исследователей (Малюта, 1984; Жужалова, Знаменская, Подвигина, Ярмолюк, 2007) из нередуцированных микроспор монад, диад, триад образуются крупные по размерам пыльцевые зерна с нередуцированными гаметами, которые, по-видимому, не способны участвовать в оплодотворении.

Помимо перечисленных нарушений у трансгенов было выявлено от 0,5 до 5 % тетрад, содержащих наряду с нормально развитыми микроспорами мелкие карликовые микроспоры, которые вероятно образовались путем обособления цитоплазмы вокруг участков хроматина, отделившихся в результате отставаний и разброса хромосом в мейозе. В дальнейшем они по-видимому, превращались в мелкие безъядерные стерильные микроспоры. Общее число, встречаемых в мейозе, нарушений у трансгенных форм не превышало 8 %. Вместе с тем, выявленные отклонения приводили к уменьшению числа нормально развитых пыльцевых зерен, снижая тем самым мужскую фертильность.

У контрольных растений были обнаружены единичные нарушения в виде отставаний хромосом в AI, AII, выбросов хромосом в MII, образования монад, диад, триад. Общее число клеток с аномалиями в мейозе не превышало 1 %.

Анализ фертильности пыльцевых зерен показал, что у большинства исследуемых форм (73,7 %) отмечался пониженный уровень мужской фертильности (от 0 до 39 %). Среди зрелой пыльцы у трансгенных растений было обнаружено незначительное количество (от 0,4 до 3,5 %) пыльцевых зерен с аномалиями в виде образования добавочных спермиев и ядер, что, по-видимому, было связано с нарушениями процессов микроспоро- и микрогаметогенеза (рис.6). По результатам исследований Т.Н. Шакиной (2007) причиной формирования в пыльцевых зернах более двух спермиев могут быть дополнительные деления генеративной клетки.

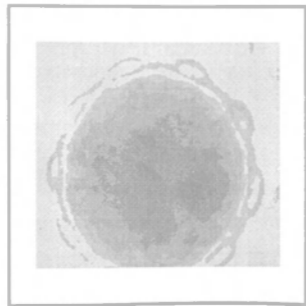


Рисунок 6 — Пыльцевое зерно трансгенной свеклы, содержащее три спермия и одно вегетативное ядро.

Таким образом, выявленные у трансгенных форм сахарной свеклы морфологические нарушения, возможно обусловлены встраиванием чужеродной ДНК в районы расположения генов, регулирующих флоральный морфогенез, микроспоро- и микрогаметогенез, или же вызваны действием на растения гербицида.

Список литературы

1. Koncz C., Mayerhofer R., Koncz-Kalman Z. et. al. Isolation of a gene encoding a novel chloroplast protein by T-DNA tagging in Arabidopsis thaliana // EMBO. 1990.V.9.№5. P.1337-1346.
2. Van Lijsebettens M., Vanderhaeghen R., Van Montagu M. Insertional mutagenesis in Arabidopsis thaliana: isolation of T-DNA-linker mutation that alters leaf morphology // Theor. Appl. Genet. 1991. V. 81. P.277-284.
3. Komari T. Genetic characterization of a double-flowered tobacco plants obtained in a transformation experiment // Theor. Appl. Genet. 1990. V.80. P.167-171.
4. Дейнеко Е. В., Загорская А.А., Сидорчук Ю.В. и др. Особенности морфологических признаков и фертильность пыльцы у трансгенных растений табака // Физиол. растений.- 2000, Т. 47.- №1. - С.73-78.
5. Малюта Э.Н. Получение мейотических тетраплоидов сахарной свеклы с помощью мутации, приводящей к образованию нередуцированных гамет // Генетика сахарной свеклы. – Новосибирск: Наука сиб. отд.- 1984.-С.161-171.
6. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос. - 1970.-115с.
7. Репродуктивная биология сахарной свеклы / Жужалова Т.П., Знаменская В.В., Подвигина О.А., Ярмолюк Г.И. –Воронеж: Тип. ООО «Сотрудничество». - 2007. - 232 с.
8. Шакина Т.Н. Цитозэмбриологическая специфика системы размножения видов рода POA L. / Автореф. дис... кандидата б. н. – Саратов. - 2007.-18с.

Анотація

Відображені морфологічні відмінності трансгенних форм цукрових буряків стійких до гліфосату, які характеризуються зміною форми листя, структури квіток, фертильності пилоквіток. Це, можливо, обумовлено вбудуванням чужерідної ДНК в райони розміщення генів, які відповідають за флоральний морфогенез.

Annotation

Morphological differences of resistant to glyphosate sugar beet transgenic forms expressed in changes of leaf shape, flower structure, and pollen grain fertility are presented. This perhaps is caused by alien DNA inserting into sites where genes responsible for floral morphogenesis are located.