

ГЕРАЩЕНКОВ Г.А., РОЖНОВА Н.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН
Россия, 450054, Уфа, проспект Октября, 71, e-mail: apomixis@anrb.ru

СКРИНИНГ ГЕНОМНЫХ ЛОКУСОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ГАМЕТОФИТНЫМ АПОМИКСИСОМ У РАСТЕНИЙ *BOECHERA HOLBOELLII* (СЕМЕЙСТВО BRASSICACEAE)

Апомиксис определяют как бесполое размножение цветковых растений без мейоза и фертилизации [1–3]. Очевидно апомиксис – это интригующая особенность растений, позволяющая осуществлять клонирование материнского организма через семена. Апомиксис не согласуется с эволюционными представлениями об апомиксисе как якобы эволюционном тупике в отсутствие рекомбинации и скрещиваний, поскольку показан высокий уровень генного, хромосомного и морфологического разнообразия в агамных комплексах. Фундаментальная важность проблем пола и мейоза / рекомбинации определяют важность проблемы апомиксиса (асексуальности). Исследование молекулярных механизмов функционирования апомиксиса преследует главную мечту селекционеров – использовать апомиксис для закрепления гетерозиса в селекции важнейших сельскохозяйственных культур. Биотехнологический потенциал апомиксиса основан на «преодолении» генетической сегрегации и создании основ новой «зеленой революции».

В последнее время возрос интерес к пониманию молекулярных механизмов апомиксиса.

Материалы и методы

В работе использовали североамериканские эндемичные формы рода *Boechera* с различными репродуктивными модами и уровнями плоидности из ведущих лабораторий Нидерландов и Германии (табл. 1).

Тотальную ДНК экстрагировали из проростков и листьев растений фенольно-детергентным методом. В связи с малым количеством растительного материала некоторых образцов все выделенные варианты ДНК были повторно наработаны методом полногеномной амплификации, позволяющим осуществлять эквивалентное накопление всех ДНК последовательностей генома в количествах, достаточных для молекулярно-генетического анализа с помощью *phi* 29 полимеразы.

SSAP и SCAR маркеры апомиксиса секвенировали на приборах ABI 310 DNA Sequencer или Beckman Coulter Sequencer. Гомологию нуклеотидных последовательностей анализировали на

Становится понятным, что генетика апомиксиса является более сложной, чем было принято предполагать раньше [3–5]. Молекулярные основы апомиксиса не легко детектировать у растений. Апомиксис, видимо, контролируется комплексом генов вместе с некоторыми факторами внешней среды. После того, как были секвенированы геномы арабидопсиса и риса, стали доступны новые стратегии функциональной геномики для понимания ключевых регуляторных элементов мейоза, партеногенеза и развития эндосперма. В настоящее время в области апомиксиса работает около 100 групп и лабораторий. Известно, что апомиксис находится под сложным генетическим контролем, но основы его наследования часто остаются противоречивыми и труднообъяснимыми. Тем не менее, на активное использование молекулярно-генетических маркеров возлагают надежды в поиске генов, контролирующих апомиксис. Выделение генов апомиксиса является ключевым направлением в апомиксисных исследованиях. Цель работы – выделение и идентификация геномных локусов, ассоциированных с апомиксисом.

сайте национального центра по биоинформатике (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih>, используя BLASTN программу. Специфичные ПЦР праймеры были подобраны при помощи специальных программ DNASTAR. ПЦР выполняли в общем объеме 20 мкл, содержащем 1x буфер, 10 пмоль каждого из праймеров, 10 – 50 нг матричной ДНК, 250 мкмоль каждого из dNTP и 2 ед. Taq полимеразы. Условия проведения ПЦР были следующие: 94 °C 2 мин; 30 – 35 циклов при 94 °C – 45 сек, отжиг праймера при специфической температуре (около 55 °C) – 1 мин, 72 °C – 1 мин; финальная элонгация при 72 °C – 10 мин. ПЦР проводили в приборе Терцик и фрагменты разделяли в ПАА или агарозном гелях. Визуализацию ДНК в полиакриламидном геле осуществляли серебром, а в агарозном геле – бромистым этидием.

Детекцию геномных последовательностей, гомологичных полученных нами пробам на основе SCAR маркеров, осуществляли методом Саузерн

гибридизации. Препараты ДНК гидролизовали рестриктазами BamHI, EcoRI, Eco130I, HindIII, MvaI и PstI (Fermentas). Перенос фрагментов ДНК из геля осуществляли по методу Саузерна с некоторыми

модификациями. Реакцию случайного праймирования ДНК зондов, гибридизацию, и регистрацию хемилюминесцентного сигнала осуществляли, как описано в прописи фирмы Roche.

Таблица 1. Коллекция форм растений рода *Boechea* с бесполосеменным (Apo) и половым (Sex) способами размножения

№№	Виды и формы растений	Особенности размножения	Источник происхождения
Голландская коллекция			
1	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 3x #36-1	Apo	Dr. Kim Boutilier, Plant Research International, Netherlands
2	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 3x #6-3	Apo	
3	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 3x #5-10	Apo	
4	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 2x #4-2	Apo	
5	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 2x #8-7	Apo	
6	<i>Arabis drummondii</i> 2x #10	Sex	
Немецкая коллекция			
7	<i>Arabis holboellii</i> Rc#1	Apo	Dr. Thomas Mitchell-Olds, Max Planck Institute of Chemical Ecology, Germany
8	<i>Arabis holboellii</i> cg#25	Apo	
9	<i>Arabis drummondii</i> 4	Sex	
10	<i>Arabis drummondii</i> 11	Sex	

Результаты и обсуждение

Работа состояла из двух больших этапов и включала (1) конвертацию мультилокусных SSAP маркеров в монолокусные SCAR маркеры для создания гибридизационных проб и (2) собственно детекцию геномных локусов, ассоциированных с апомиксисом методом Саузерн блот гибридизации.

На первом этапе было завершено верификационное секвенирование созданных SCAR_Cin_220 (проба 1), SCAR_Cin_240 (проба 2), SCAR_Cin_380 (проба 3) и SCAR_Isaak_230 (проба 4) маркеров апомиксиса. В генбанке установлено сходство SCAR_Cin_220 с 5 последовательностями (гомология 85 - 93%), сходство SCAR_Cin_240 с 9 последовательностями арабидопсиса (гомология 91%), SCAR_Cin_380 сходство с короткими последовательностями до 20 нуклеотидов (существенной гомологии нет), сходство SCAR_Isaak_230 с 2 анонимными последовательностями (гомология 100%).

Саузерн гибридизация дала предварительные результаты, совпадающие с результатами, полученными прежде методом ПЦР. Так, у генотипа с апомиктичным размножением при использовании пробы 1 – SCAR_Cin_220 детектируется PstI фрагмент размером около 2 Kb (рис. 1). При использовании пробы 2 – SCAR_Cin_240 у генотипа с апомиктичным размножением детектируются Eco130I фрагменты размером около 1 и 6 Kb, HindIII фрагменты – около 1.5 и 6 Kb, MvaI фрагменты – около 1 и 8 Kb (рис. 2). Известно, что средний размер растительных генов 2 – 4 кб. Можно предполагать, что

обнаруженные фрагменты, являются участками генов.

Несмотря на активное использование боечер в качестве модельного объекта при изучении генетики полового размножения и апомиксиса, к настоящему моменту не известно ни одного SCAR маркера у боечер. Единичные примеры, приведенные в табл. 2, демонстрируют степень новизны полученных нами результатов.

Таким образом, в ходе выполненной работы году было завершено множественное независимое секвенирование полученных SCAR_Cin_380 и SCAR_Isaak_230, а также дополнительно SCAR_Cin_220 и SCAR_Cin_240, маркеров апомиксиса у растений рода *Boechea*. Начаты эксперименты по детекции геномных локусов, ассоциированных с апомиксисом, методом Саузерн гибридизации на основе рестриктаз BamHI, EcoRI, Eco130I, HindIII, MvaI и PstI. К сожалению, выделить геномные локусы пока не удалось ни в одной лаборатории, ведущей исследования в этой области. В перспективе выполнение настоящего проекта позволит идентифицировать геномные локусы, ассоциированные с гаметофитным апомиксисом. Полученные нами результаты позволяют надеяться на успех в идентификации геномных локусов, вовлеченных в генетический контроль апомиксиса, при скрининге на больших выборках коллекционного материала.

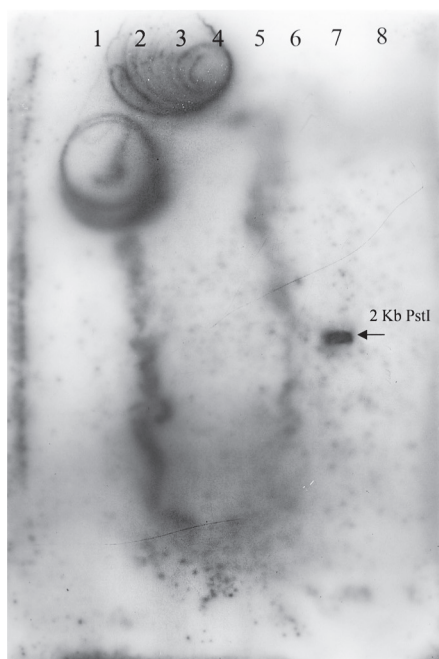


Рис. 1. Саузерн блот гибридизация апомиктического (нечетная дорожка) и амфимиктического (четная дорожка) растения *Boechera* с гибридизации с пробой 1

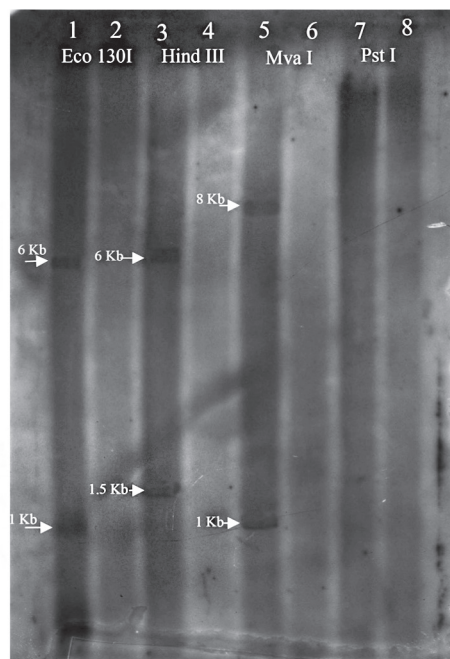


Рис. 2. Результаты Саузерн блот гибридизации апомиктического (нечетная дорожка) и амфимиктического (четная дорожка) растения *Boechera* с пробой 2

Таблица 2. Известные монолокусные маркеры апомиксиса

№ №	Вид	Монолокусные маркеры	Геномная область	Ссылки
1.	<i>Poa pretense</i>	SCAR маркеры Parth1 и Sex1	неизвестна	Италия: [6]
2	<i>Pennisetum squamulatum</i> и <i>Cenchrus ciliaris</i>	SCAR маркеры	ASGR (the apospory-specific genomic region)	США: [7]
3.	<i>Hypericum perforatum</i>	SCAR маркер → CAPS (cleaved amplified polymorphic site)	сходство с белком, принадлежащим к ARIADNE семейству белков, классу RING-finger белков с предполагаемой функцией убикутин-протеин лигаз E3.	ФРГ: [8]
4.	<i>Hieracium caespitosum</i>	4 SCAR маркера 3 SCAR маркера	локус потери апомейоза (LOA) локус потери партеногенеза (LOP)	Австралия и Новая Зеландия: [9]
5.	<i>Allium ramosum</i>	4 SCAR маркера диплоспории	неизвестна	Япония: [10]

Выводы

1. На основе найденных прежде мультилокусных SSAP маркеров апомиксиса были получены SCAR маркеры апомиксиса: SCAR_Cin_220, SCAR_Cin_240.

2. Осуществлена амплификация SCAR_Cin_220, SCAR_Cin_240 с препаратами ДНК из видов с половым размножением

(*Boechera stricta*) и апомиксисом (*Boechera holboellii*). Показана возможная гемизиготность полученных маркеров апомиксиса SCAR маркеров апомиксиса (существующих в виде единственного аллеля).

3. Выполнено верификационное секвенирование созданных SCAR_Cin_220 (проба 1),

SCAR_Cin_240 (проба 2) маркеров апомиксиса. В генбанке установлено сходство SCAR_Cin_220 с 5 последовательностями (гомология 85–93%), сходство SCAR_Cin_240 с 9 последовательностями арабидопсиса (гомология 91%).

4. Эксперименты по детекции геномных локусов, ассоциированных с апомиксисом, методом Саузерн гибридизации позволили выявить следующие маркеры:

У генотипа с апомиктичным размножени-

ем при гибридизации с пробой 1 детектируется PstI фрагмент размером около 2 Кб.

У генотипа с апомиктичным размножени-ем при гибридизации с пробой 2 детектируются Eco130I фрагменты размером около 1 и 6 Кб, HindIII фрагменты – около 1.5 и 6 Кб, MvaI фрагменты – около 1 и 8 Кб.

У генотипа с апомиктичным размножени-ем при гибридизации с пробой 3 детектируется PstI фрагмент размером около 4 Кб.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (гранты №11-04-97039 р_поволжье_а и №13-04-01404-а).

Литература

1. Gerashchenkov G., Rozhnova N. Genetic Control of Gametophytic Apomixis: Current Status of Knowledge // Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. – 2004. – Vol. 58. – P. 167–174.
2. Ozias-Akins P., van Dijk P.J. Mendelian Genetics of Apomixis in Plants // Annu. Rev. Genet. – 2007. – Vol. 41. – P. 509–537.
3. Rodriguez-Leal D. and Vielle-Calzada J.-P. Regulation of apomixis: learning from sexual experience // Curr. Opin. Plant Biol. – 2012. – <http://dx.doi.org/10.1016/>
4. Геращенко Г.А., Рожнова Н.А. Мобильные генетические элементы в эволюции пола у растений // Генетика. – 2010. – Т. 46. – С. 1445–1457.
5. Albertini E., Barcaccia G., Mazzucato A., Sharbel T.F., and Falcinelli M. Chapter 20 Apomixis in the Era of Biotechnology // E.C. Pua and M.R. Davey (eds.), Plant Developmental Biology – Biotechnological Perspectives. – 2010. – Vol. 1. – P. 405–436.
6. Albertini E., Barcaccia G., Porceddu A. et al. Mode of reproduction is detected by Parth1 and Sex1 SCAR markers in a wide range of facultative apomictic Kentucky bluegrass varieties // Mol. Breed. – 2001. – Vol. 7. – P. 293–300.
7. Akiyama Y., Conner J.A., Goel S. et al. High-resolution physical mapping in Pennisetum squamulatum reveals extensive chromosomal heteromorphism of the genomic region associated with apomixis // Plant Physiol. – 2004. – Vol. 134. – P. 1733–1741.
8. Schallau A., Arzenton F., Johnston A.J. et al. Identification and genetic analysis of the APOSPORY locus in *Hypericum perforatum* L. // Plant J. – 2010. – Vol. 62. – P. 773–784.
9. Okada T., Ito K., Johnson S.D., et al. Chromosomes Carrying Meiotic Avoidance Loci in Three Apomictic Eudicot Hieracium Subgenus Pilosella Species Share Structural Features with Two Monocot Apomicts // Plant Physiol. – 2011. – Vol. 157. – P. 1327–1341.
10. Yamashita K., Nakazawa Y., Namai K. et al. Modes of inheritance of two apomixis components, diplospory and parthenogenesis, in Chinese chive (*Allium ramosum*) revealed by analysis of the segregating population generated by back-crossing between amphimictic and apomictic diploids // Breeding Science. – 2012. – Vol. 62. – P. 160–169.

GERASHCHENKOV G.A., ROZHNOVA N.A.

*Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Research Center, Russian Academy of Sciences
Russia, 45005, Ufa, prospekt Oktyabrya, e-mail: apomixis@anrb.ru*

SCREENING OF GENOME LOCI ASSOCIATED WITH GAMETOPHYTE APOMIXIS AT BOECHERA HOLBOELLII PLANTS (BRASSICACEAE FAMILY)

Aims. Apomixis is the seeds-without-sex reproduction of floral plants at which germs in seeds arise from cells of maternal genotype without participation both genetic recombination and syngamy (fusion of male and female gametes). Nevertheless the genetic control of apomixis is not clear and speculative till now. The goal of work was to perform isolation and identification of genome loci associated with apomixis in *Boecheira* plants. **Methods.** DNA sequencing was performed to convert SSAP markers to SCAR markers of apomixis. Southern hybridization experiments on the basis BamHI, EcoRI, Eco130I, HindIII, MvaI and PstI for the detection polymorphisms among apomixis and amphimixis genomes were used. **Results.** It has been completed plural independent sequencing of created SCAR markers of apomixis (all 4 probes). The similarity and homology of the markers with known DNA sequences were established. In Southern hybridization

experiments among one apomixis and one amphimixis genotypes different genome marker fragments of apomixis were detected. **Conclusions.** The obtained results are the important precondition for the detection and identifications of the general genome fragments (genes) in a range from 1 up to 10 Kb at bulk samples of plant genomes with sexual and asexual reproduction in the following investigations.

Key words: *Boechera holboellii*, apomixis, molecular markers, DNA sequencing, Southern hybridization.

ГУЛЬКО Т.П.^{1,5}, ДРАГУЛЯН М.В.¹, РЫМАР С.Е.^{1,5}, КОРДИУМ В.А.¹, ЛЕВКИВ М.Ю.², БУБНОВ Р.В.^{3,4}

¹*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины*

Украина, 03143, Киев, ул. Акад. Заболотного 150, e-mail: kordium@imbg.org.ua

²*Киевский национальный университет им. Тараса Шевченка*

Украина, 01601, Київ, ул. Володимирська, 64/13

³*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины*

Украина, 03143, Киев, ул. Акад. Заболотного 154

⁴*Центр ультразвуковой диагностики и интервенционной сонографии Клинической больницы «Феофания» Государственного Управления делами*

Украина, 03680, Киев, ул. Акад. Заболотного 21

⁵*ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМНУ»*

Украина, 04114, м. Киев, ул. Вышгородская, 67

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ У КРЫС ЛИНИИ WISTAR РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Цирроз печени – хроническое полиэтиологическое прогрессирующее заболевание, протекающее с поражением паренхиматозных интестинциальных тканей органа с последующей дистрофией и некрозом гепатоцитов, нарушением архитектоники органа и развитием той или иной степени недостаточности печени [1]. Нынешние традиционные и хирургические методы лечения

цирроза печени малоэффективны, а порой и травматичны, поэтому использование модельного цирроза печени на животных дает возможность поиска новых подходов к лечению болезни. В связи с этим целью нашего опыта было получение модельного цирроза печени у самцов лабораторных крыс линии Wistar разного возраста.

Материалы и методы

В работе были использованы крысы линии Wistar 3-х и 8-и месячного возраста, массой 200г и 450г соответственно. Животные содержались в стандартных условиях вивария. Цирроз печени вызывали внутрибрюшинным введением опытным крысам 30%-ного масляного раствора (CCl₄) (0,01 мл/кг) 1 раз в неделю. Контрольным животным аналогичным образом вводили идентичный объем физиологического раствора. Клиническое наблюдение за животными велось ежедневно. На начало эксперимента у всех опытных и контрольных крыс были зафиксированы исходные биологические и физиологические параметры следующими метода-

ми (подсчет лейкоцитарной формулы, определение АЛТ, АСТ и прижизненное ультразвуковое исследование – УЗИ – по предложенному нами методу) [5]. Животные выводились из эксперимента на 14, 28 и 42 сутки. Крыс декапитировали под легким эфирным наркозом. Извлеченную печень в течении 48час фиксировали в 10% формалине. Затем промывали ткань и помещали в физиологический раствор, забуференный 0,1% М фосфатным буфером (рН 7,4), содержащий 30% сахарозы. На замораживающем микротоме готовили срезы толщиной 50мкм. В работе использовали гистологический метод окраски препаратов гематоксилин-эозином.

Результаты и обсуждение

В результате анализа лейкоцитарной формулы у молодых животных на 2-й неделе эксперимента выявлено интенсивное увеличение количества эозинофилов – в 3 раза; базофилов – в 2 раза, палочкоядерных нейтрофилов – в 1,7 раза, моноцитов – в 1,5 раза, и незначительное

снижение сегментоядерных нейтрофилов – в 0,5 раза по сравнению с контрольной группой животных (табл.1). У старых самцов крыс вторая неделя эксперимента характеризовалась незначительным увеличением количества палочкоядерных нейтрофилов.