

10. Anan'ina T.V., Vedernikov A.E., Khodzhanov A.E., and Stegnii V.N. Development of ovarioles and nurse cell cytoskeleton in *Calliphora erythrocephala* Mg (Diptera: Calliphoridae) // Cell and Tissue Biology. – 2010. – 4, N 2. – P. 192–198.
11. Anan'ina T.V., Kokhanenko A.A., Stegniy V.N. Cyst geometry in the egg chambers of *Calliphora erythrocephala* Mg. (Diptera: Calliphoridae) ovaries [Электронный ресурс] // Protoplasma. – 2013. DOI 10.1007/s00709-013-0593-9.
12. Robinson D.N., Cant K., Coole L. Morphogenesis of *Drosophila* ovarian ring canals // Development. – 1994. – 120. – P. 2015–2025.
13. Guild G.M., Connelly P.S., Shaw M.K., Tilney L.G. Actin filament cables in *Drosophila* nurse cells are composed of modules that slide passively past one another during dumping // J Cell Biol. – 1997. – 25, N 138 (4). – P. 783–797.
14. Cell-cell channels. Edited by: Baluska F., Volkmann D., Barlow P. – Landes Bioscience & Shpringer Science, 2006. – 319 p.
15. Li M., Serr M., Edwards K., Ludmann S., Yamamoto D., Tilney L.G., Field Ch.M., Hays T.S. Filamin is required for ring canal assembly and actin organization during *Drosophila* oogenesis // The Journal of Cell Biology. – 1999. – 146, N 5. – P. 1061–1073.

ANAN'INA T.V., STEGNIY V.N.

*Research Institute of Biology and Biophysics, Tomsk State University,
Russia, 634050, Tomsk, Lenin str., 36, e-mail: tany_a@list.ru*

CHANGE OF THE ACTIN CYTOSKELETON AND RING CHANNELS IN THE NURSE CELLS CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA IN OOGENESIS

Aims. The purpose of this study was to investigate changes of the actin cytoskeleton syncytial clusters in ovaries *C. erythrocephala* at different stages of oogenesis. **Methods.** Ovarioles were stained phalloidin-FITC and DAPI. Series of optical sections were obtained using fluorescent microscope Axiomager Z.1 and module ApoTome (Zeiss). In a software module In Side 4D doing graphic reconstruction of the optical sections and analyzed by three-dimensional models of individual egg chambers, cells and nuclei. **Results.** We studied the changes that occur in the actin cytoskeleton cysts in different stages of oogenesis. The changes in the morphology of the ring channels which occur during normal oogenesis and violations in the formation of ring canals in the wrong formation of cysts. **Conclusions.** Increasing amounts of F-actin in the areas around the ring channels associated with an increase in synthetic activity of nurse cells and is aimed at ensuring the smooth movement of the cytoplasm of the nurse cells into the oocyte. Changing the shape and bandwidth ring channels may be a consequence of a breach of the formation of cysts in germarium.

Key words: *Calliphora erythrocephala*, oogenesis, ring channels, actin cytoskeleton.

УДК 575.1:581.163:577.151.64:633.413:577.213

ВИНИЧЕНКО Н.А., КИРИКОВИЧ С.С., ЛЕВИТЕС Е.В.

Институт цитологии и генетики СО РАН,

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

ВЛИЯНИЕ ВОЗРАСТА ЛИСТЬЕВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ НА ПЦР-ПРОФИЛИ ФЕРМЕНТНЫХ ГЕНОВ

В настоящее время большое внимание уделяется изучению молекулярных механизмов, лежащих в основе наблюдаемых у растений изменений экспрессии генов под действием различных внутренних и внешних условий. Удобными маркерными локусами для таких исследований являются гены, контролирующие ферменты. Для изучения полиморфизма ДНК районов хромосом, содержащих маркерные ферментные гены, нами был предложен

модифицированный метод ISSR-амплификации (inter-simple sequence repeat, «между повторяющихся простых последовательностей»). В отличие от исходного оригинального метода, мы использовали в паре с микросателлитным праймером праймер, специфичный к локусу ферментного гена. Это упростило выявляемый на электрофореграмме профиль ПЦР-продуктов и позволило нам выявлять различия между ПЦР-профилями,

полученными от растений, гомозиготных по одному и тому же аллелю ферментного локуса [1–3]. Этот факт указывает на высокую чувствительность примененной методики и на возможность её использования для изучения организации ферментного локуса при различных внешних и внутренних условиях. При помощи такой модификации ISSR-амплификации нам удалось выявить тканевые различия ПЦР-профилей ферментных локусов [4]. Этот факт указывает на то, что в процессе дифференцировки происходит некий процесс изменения организации ДНК. Характерно, что процесс этот различен в разных тканях. Эти представления хорошо согласуются с известными данными о влиянии типа ткани и её возраста на содержание ДНК в соматических клетках [5, 6]. В последующих исследованиях мы рассмотрели динамику изменения ПЦР-профилей ферментных генов в процессе прорастания семян [7]. Было обнаружено, что по мере того, как из зародыша развивается растение, происходит изменение структуры ДНК (дифференцировка) по совершенно четкой программе. Эти изменения не затрагивают первичную структуру гена, поскольку изменений в электрофоретической подвижности ферментов замечено не было. Сбой в программе «дифференцировки» ДНК приводит к гибели зародыша. Это можно было видеть на ДНК непроросших семян, у которых ПЦР-профили либо соответствовали профилям живых зародышей самых первых суток проращивания, либо качественно отличались от профилей нормально развивающихся зародышей [5]. Это говорит о том, что программа развития либо останавливается на ранней стадии, либо онтогенетическое изменение структуры ДНК проходит неправильно и приводит к гибели зародыша. Возникает вопрос: ограничивается ли процесс «дифференцировки» ДНК только начальными стадиями развития растения, или подобные процессы происходят и во взрослом растении? Для ответа на этот вопрос представляет интерес исследование ПЦР профилей листьев разного возраста одного и того же взрослого растения.

Материалы и методы

Растительный материал. В исследование были взяты растения двух разных агамоспермных потомств сахарной свеклы, обозначенных рабочими номерами как 11-2 и 12-2. Данные потомства были получены на пыльцестерильных растениях под бязевыми изоляторами в 2004 году. Для выделения ДНК с

индивидуального растения брали по три образца из разных листьев: 1) самый молодой, еще не раскрывшийся лист, обозначаемый нами как лист первой пары, 2) третий по возрасту лист из третьей пары, 3) самый старший на момент взятия пробы лист. Были взяты растения с разными фенотипами по ферментам.

Выделение ДНК, ПЦР-амплификация. Суммарную ДНК растений выделяли из 200 мг свежих листьев стандартным СТАВ-методом [8].

Для проведения ПЦР-амплификации были использованы следующие специфические праймеры:

adh1r (5'-act(ct)a-cagca-ag(ct)cc-(ct)ac(ct)g-ctcc-3'), специфичный к локусу *Adh1*, кодирующему алкогольдегидрогеназу-1,

malic1 (5'-tgtac-ggtga-agata-ctgcc-ac-3'), специфичный к локусу *Mel1*, кодирующему цитозольный малик-фермент-1,

gpi1 (5'-cttcg-acagt-aatcc-t-3'), специфичный к локусу *Gpi1*, кодирующему глюкозофосфатизомеразу-1 (GPI1) свеклы,

got1 (5'-cagat-ggtgg-tgaat-g-3'), специфичный к локусу *Got1*, контролирующему глутаматоксалоацетаттрансаминазу-1.

В паре с каждым специфическим праймером использовался микросателлитный *Mic2* (5'-gacag-acaga-cagac-a-3').

ПЦР-реакцию проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10–200 нг суммарной ДНК, 65 mM трис-HCl (pH 8,0), 16 mM (NH₄)₂SO₄, 0,05% твин-20, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM каждого из dNTP, 1мкМ каждого праймера, 2,5 ед. акт. *Taq*-полимеразы. Был использован следующий температурный режим:

Предварительная денатурация – 94 °C (4 мин.). Далее 30 циклов – 94 °C (1 мин.), 52 °C (42 сек.), 72 °C (4 мин.). Последний цикл – 72 °C (7 мин.)

Продукты амплификации разделяли в 5% полиакриламидном геле (0,5 x TBE буфер) и окрашивали бромистым этидием.

Результаты и обсуждение

Получены ПЦР-профили регуляторной части локуса *Adh1* у растений потомств 11-2 и 12-2. На рисунке 1 показаны профили двух индивидуальных растений из потомства 12-2, и трех индивидуальных растений из потомства 11-2. Растения потомства 11-2, полученные агамоспермным путем от одного растения и гомозиготные по аллелю *Adh1-F*, имели фенотип FF по алкогольдегидрогеназе. ПЦР-профили локуса *Adh1* у этих растений значительно различались. Поскольку эти растения представляют собой потомство от одного

растения, то выявленные различия, следовательно, не связаны с различиями в последовательности нуклеотидов в локусе *Adh1*. Не исключено, что эти различия могут быть обусловлены разной степенью политемии аллеля в том или ином растении. Характерно, что наблюдаемые различия могут проявляться на любой стадии: как в самом молодом, так и в самом старшем по возрасту листе. Изменение структуры ДНК по мере развития листа у гомозигот *FF* происходит по-разному (рис. 1). Это указывает на динамичность структурной организации ферментного локуса, а также на то, что эта динамика подвержена влиянию различных внутренних и внешних факторов, определяющих экспрессию данного гена у конкретного растения.

Это подтверждает полученные ранее данные, свидетельствующие о различии ПЦР-профилей, полученных от растений, имеющих один и тот же фенотип по алкогольдегидрогеназе [1–3]. Отмечалось также, что гомозиготы *FF* по локусу *Adh1* в агамоспермных потомствах демонстрируют большее разнообразие ПЦР-профилей по сравнению с гомозиготами *SS*. Эти различия ПЦР-профилей у различающихся гомозигот указывают на объективность получаемых данных, а также на существование специфических различий в организации *F* и *S* аллелей локуса *Adh1* у сахарной свеклы. Полученные результаты хорошо согласуются с известными данными, полученными при

изучении АДГ у кукурузы. Генетическими методами было показано, что у кукурузы существует 14 вариантов аллеля *Adh1-F* и 6 вариантов аллеля *Adh1-S* [9]. В потомстве 12-2 у растений с разными фенотипами также происходит изменение структуры ДНК по мере взросления листа. Выявленные различия профилей у двух представленных на рисунке 1 растений из потомства 12-2 могут быть обусловлены различиями их генотипов: *FF* и *FS*.

Исследованные ПЦР-профили структурной части локуса *Me1* не давали большого разнообразия (рис. 2), но продемонстрировали характерную особенность. В профиле самого младшего листа у гомозиготы *FF* из потомства 11-2 имеется высокомолекулярный банд, в среднем листе появляется низкомолекулярная фракция, и в самом старом листе высокомолекулярный банд исчезает, зато усиливается низкомолекулярный. Таким образом, в наблюдаемом постепенном изменении профиля средний лист представляет собой переходный этап. Постепенное изменение ПЦР-профиля локуса *Me1* с возрастом листа хорошо согласуется с полученными нами ранее данными о постепенной активации в растущем листе фермента ME1 у гомозиготного по аллелю *Me1-F* растения сахарной свеклы [10]. В гомозиготах *SS* потомства 12-2 мы просто наблюдаем появление низкомолекулярной фракции у среднего и самого старшего листа, а у самого молодого листа профиль пуст.

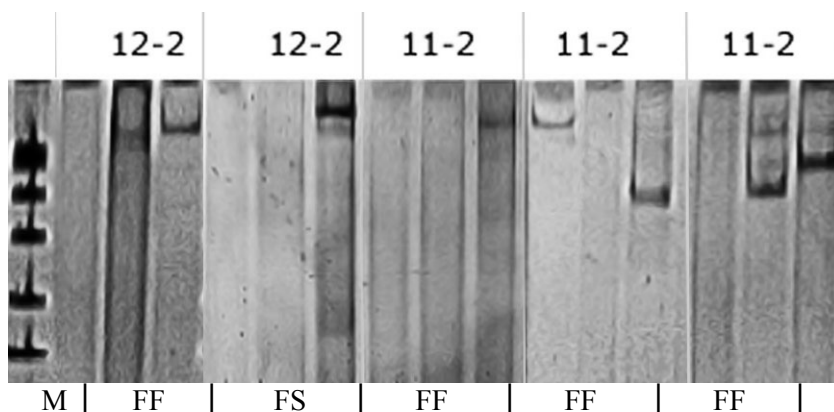


Рис 1. ПЦР-профили локуса *Adh1*, полученные на матрице ДНК растений из агамоспермных потомств 11-2 и 12-2. Каждое растение представлено тремя дорожками: слева самый молодой лист, условно обозначаемый как первый, в середине – третий лист, справа – самый старший лист. М – маркер pBluescript/MspI

ПЦР-профили структурной части локусов *Gpi1* и *Got1* в растущих листьях сахарной свеклы характеризуются постепенным усложнением, связанным с появлением дополнительных бандов и увеличением их интенсивности (рис. 3, 4). Фенотипы исследуемых растений по локусам *Gpi1* и *Got1* не идентифицировали.

Выводы

Полученные результаты свидетельствуют

о том, что у взрослого растения сахарной свеклы в процессе развития листа происходят не затрагивающие нуклеотидные последовательности изменения структуры ДНК ферментных локусов *Adh1*, *Mel*, *Gpi1*, *Got1*. На примере одного ферментного аллеля локуса *Adh1*, контролирующего алкогольдегидрогеназу, показано, что эти изменения могут происходить у разных растений по-разному и приводить к различным результатам.

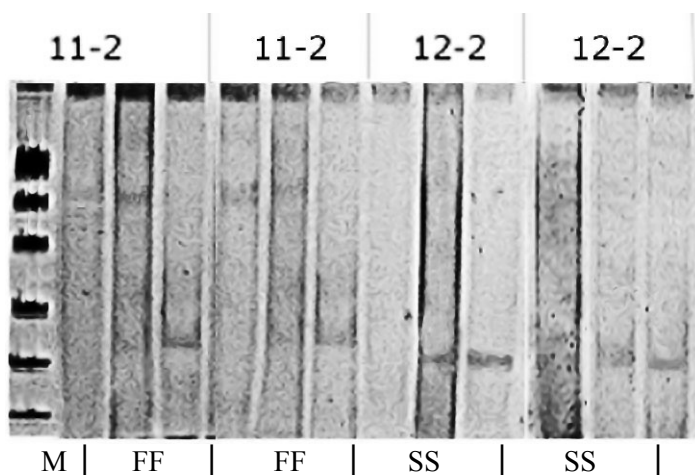


Рис 2. ПЦР-профили локуса *Mel*, полученные на матрице ДНК растений из агамоспермных потомств 11-2 и 12-2. Каждое растение представлено тремя дорожками: слева самый молодой лист, условно обозначаемый как первый, в середине – третий лист, справа – самый старший лист. М – маркер pBluescript/MspI

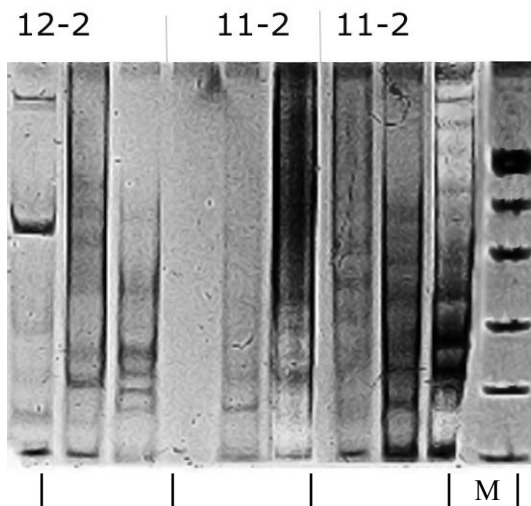


Рис 3. ПЦР-профили локуса *Gpi1*, полученные на матрице ДНК растений из агамоспермных потомств 11-2 и 12-2. Каждое растение представлено тремя дорожками: слева самый молодой лист, условно обозначаемый как первый, в середине – третий лист, справа – самый старший лист. М – маркер pBluescript/MspI

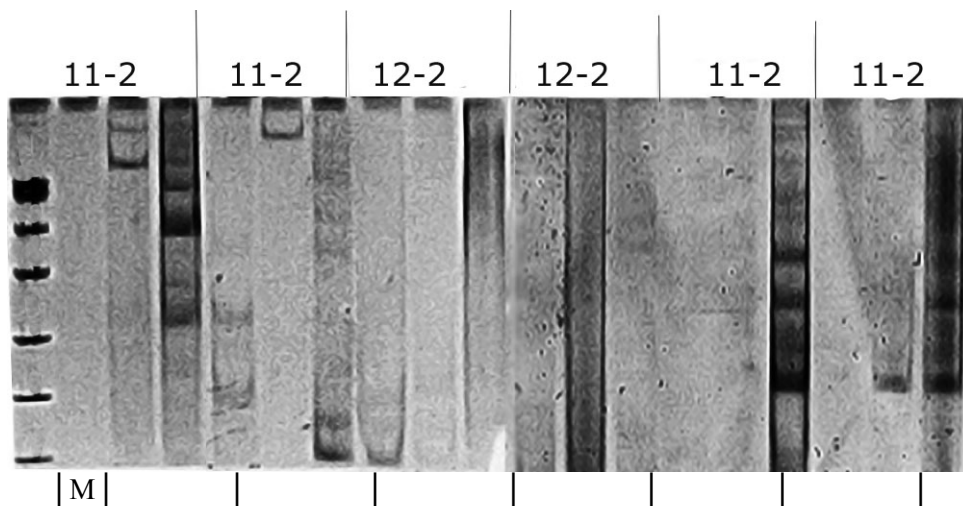


Рис 4. ПЦР-профили локуса *Got1*, полученные на матрице ДНК растений из агамоспермных потомств 11-2 и 12-2. Каждое растение представлено тремя дорожками: слева самый молодой лист, условно обозначаемый как первый, в середине – третий лист, справа – самый старший лист. М – маркер pBluescript/MspI

Литература

1. Виниченко Н.А., Кирикович С.С., Левитес Е.В. Модификация метода ISSR-амплификации для изучения изменчивости аллелей локуса *Adh1* в агамоспермном потомстве сахарной свеклы // Фактори експериментальної еволюції організмів. – Київ: «Логос». – 2006. – 3. – С. 80–84.
2. Vinichenko N.A., Kirikovitch S.S., Levites E.V. The genetic instability of the *Adh1* locus alleles in sugar beet agamosperous progeny // Sugar Tech. – 2006. – 8, N 4. – P. 288–291.
3. Виниченко Н.А., Кирикович С.С., Левитес Е.В. Полиморфизм ПЦР-профилей и экспрессии аллелей локуса *Adh1* в агамоспермных потомствах сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Генетика. – 2008. – 44, № 9. – С. 1252–1256.
4. Виниченко Н.А., Кирикович С.С., Левитес Е.В. Тканевые различия в организации локуса *Adh1* сахарной свеклы // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології (Збірник наукових праць). – Київ: Логос, 2007. – 2. – С. 247–251.
5. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 1. Изменчивость в онтогенезе // Биополимеры и клетка. – 1994. – 10, № 6. – С. 5–35.
6. Кунах В.А. Онтогенетическая пластичность генома как основа адаптивности растений // Жебраковские чтения. III. – Минск, 2011. – 56 с.
7. Виниченко Н.А. Влияние температурной обработки прорастающих семян пшеницы и сахарной свеклы на ПЦР-профили ферментных локусов // Фактори експериментальної еволюції організмів. – Київ: Логос, 2011. – 11. – С. 131–136.
8. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull. – 1987. – 19. – P. 11–15.
9. Woodman J.G., Freeling M. Identification of a genetic element that controls the organ-specific expression of *Adh1* in maize // Genetics. – 1981. – 98, N 2. – P. 357–378.
10. Левитес Е.В. Генетика изоферментов у сахарной свеклы // Генетика сахарной свеклы. – Новосибирск: Наука, Сибирское отделение, 1984. – С. 45–60.

VINICHENKO N.A., KIRIKOVICH S.S., LEVITES E.V.

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Russia, 630090, Novosibirsk, ave. Lavrent'eva, 10, e-mail: levites@bionet.nsc.ru

INFLUENCE AGE SUGAR BEET LEAVES ON PCR PROFILES OF ENZYME GENES

Aims. In the previous researches we showed that during a sprout growth process and a tissue differentiation there is a change of DNA structure of enzyme loci. These changes, however, do not concern primary structure of coding genes part. We were interested by a question, whether there is a change of DNA in adult plants. For this purpose we decided to use PCR-profiles of leaves of different age from one plant. **Methods.** For researches were taken two sugar beet agamosperous progenies. For receiving PCR-profiles we used the

modified method of the ISSR analysis. The main peculiarity of this modification is those: together with a microsatellite primer for PCR we used the primer which was specific to the enzyme locus. DNA was extracted from the youngest, average and senior leaves. **Results.** PCR-profiles for *Adh1*, *Me1*, *Gpi1*, *Got1* loci were received. A wide variety of PCR-profiles of *Adh1* locus was revealed even in homozygous plants at all studied stages of growth. PCR-profiles of a *Me1* locus did not show a wide variety, but showed gradual transition of one PCR-profile to another one during leaf growth. It was revealed complication of PCR-profiles of *Gpi1* and *Got1* loci during leaf development and growth. **Conclusions.** Obtained results point out that there are changes of DNA structure of enzyme loci the adult plant of sugar beet during development and growth of a leaf. At present there are no data which point that these changes connected with changes of the nucleotide sequences of studied genes.

Key words: PCR-profiles, sugar beet, enzyme loci, ISSR analysis.

УДК 575.113. + 581.162

ГЕРАЩЕНКОВ Г.А., РОЖНОВА Н.А.

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

ДЕТЕКЦИЯ ГЕМИЗИГОТНОГО ГЕНОМНОГО ФРАГМЕНТА У ФОРМ *BOECHERA HOLBOELLII* (СЕМЕЙСТВО BRASSICACEAE) С БЕСПОЛОСЕМЕННЫМ РАЗМНОЖЕНИЕМ

Апомиксис – это бесполое размножение цветковых растений, при котором зародыши в семенах возникают из клеток материнского генотипа без мейоза и фертилизации [1, 2]. Ключевыми событиями при апомиксисе являются (1) замена мейоза апомейозом, (2) партеногенетическое развитие яйцеклетки и (3) существование механизмов развития эндосперма, без которых невозможно формирование семени. Такая специфическая трансформация полового размножения (амфимиксиса) в бесполое (в связи с полным или частичным отсутствием мейоза и оплодотворения) дает их обладателям несомненные преимущества: апомикты имеют превосходную семенную продуктивность вне зависимости от нарушений мейоза, слабую зависимость от опыления, позволяют фиксировать эффект гетерозиса в ряду поколений.

С теоретической точки апомиксис интересен эволюционистам, так как не согласуется с принципами синтетической теории эволюции в связи с отсутствием комбинативной изменчивости. Генотипы видов с бесполое размножением не только не выявляют инбредного вырождения, но и удерживают самые экстремальные ареалы в конкуренции с формами, размножающимися половым способом. Понимание молекулярных механизмов наследования апомиксиса является

важной предпосылкой для успешного использования его потенциала у сельскохозяйственных растений. Прикладное использование апомиксиса обещает экономические и социальные выгоды, превышающие выигрыш от «зеленой революции» Нормана Борлауга, решившей проблему голода во многих развивающихся странах. Так, только прибыль от мирового производства апомиктического риса оценивается более чем в 2,5 млрд. \$ в год [2, 3].

В настоящее время ведется активный поиск биохимических и молекулярно-генетических маркеров апомиксиса у различных видов цветковых растений, и в том числе у *Boechera* [3, 4]. Исследования в области генетики апомиксиса у цветковых растений обоснованно относят к числу прорывных исследований [2, 3]. Тем не менее, успехи в понимании молекулярной природы апомиксиса и его практическом использовании не так впечатляющи. Многолетние попытки многие лабораторий выделить гены апомиксиса пока не привели к успеху. Цель работы – детектировать геномных локусов, ассоциированных с апомиксисом.

Материалы и методы

При исследовании систем размножения цветковых растений вообще и апомиксиса в частности принципиально важным является подбор модельных объектов [1, 4]. В работе был