

7. Levites E.V. Marker enzyme phenotype ratios in agamosperous sugarbeet progenies as a demonstration of multidimensional encoding of inherited information in plants // on-line: <http://arxiv.org/abs/q-bio/0701027>
8. Nagl W. Nuclear organization // Ann. Rev. Plant Physiol. - 1976. – vol. 27. - P. 39–69.
9. Schwartz D. The genetic control of alcohol dehydrogenase in maize: gene duplication and repression // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. -1966. - vol. 56. - P. 1431-143.
10. Левитес Е.В. Генетика изоферментов растений. - Новосибирск: Наука, СО РАН. - 1986. - 145с.
11. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull. -1987. - vol. 19. - P. 11-15.

Резюме

С помощью модифицированного метода ISSR-амплификации было показано влияние обработки Тритоном X-100 на организацию локуса *Adh1* сахарной свеклы. Обнаружились различия между ПЦР-профилями, полученными на ДНК листьев обработанных и контрольных растений.

Effect of Triton X-100 on *Adh1* locus organization of sugar-beet was demonstrated by means of modified ISSR-amplification method. PCR-profiles obtained from leaf DNA of treated and control plants were different.

¹ГЕРАЩЕНКОВ Г.А., ²ЭЛЬКОНИН Л.А., ³ГОРБУНОВА В.Ю.

¹Институт биохимии и генетики УНЦ РАН,

Россия, 450054, Уфа, проспект Октября, 71, e-mail: apomixis@anrb.ru

²ГНУ НИИ сельского хозяйства Юго-Востока Россельхозакадемии,

Россия, 410010, Саратов, ул. Тулайкова, 7, elkonin@mail.saratov.ru

³ГОУ ВПО «Башкирский государственный педагогический университет»,

Россия, 450000, Уфа, проспект Октябрьской революции, 3а, e-mail: obg_bspu@mail.ru

МАРКИРОВАНИЕ ДИПЛОСПОРИЧЕСКОГО АПОМИКСИСА У СЕВЕРОАМЕРИКАНСКИХ ЭНДЕМИКОВ *BOECHERA* МЕТОДОМ ТРАНСПОЗОН ДИСПЛЕЯ

Исследования в области генетики бесполосеменного размножения, или апомиксиса, у цветковых растений обоснованно относят к числу прорывных исследований (Gerashchenkov and Rozhnova, 2004; Ozias-Akins and van Dijk, 2007). Тем не менее, возможное участие мобильных генетических элементов (МГЭ) в манифестации этого признака выпало из поля зрения исследователей. Как правило, роль МГЭ при апомиксисе у растений более трудно установить, нежели у животных, в связи со сложной организацией репродуктивных процессов (чередование поколений гаметофита и спорофита в жизненном цикле, двойное оплодотворение и т.д.), а также отсутствием подходящего материала. Все это делает проблемным анализ эпигенетической регуляции бесполосеменного размножения у растений. Возможно по этой причине, начиная с первых экспериментов Менделя на *Hieracium* и вплоть до настоящего времени, молекулярные механизмы, контролирующие апомиксис у растений, остаются слабо понятыми. Очевидно, особенности структурно-функциональной организации МГЭ позволяют рассматривать их в качестве потенциальных молекулярных маркеров в генетическом анализе систем размножения цветковых растений. Цель работы – скрининг молекулярных маркеров апомиксиса методом транспозон дисплея из основных групп 1 и 2 классов МГЭ у форм *Boechera* с половой и бесполосеменной репродукцией.

Материалы и методы

В исследовании были использованы растения *B. holboellii* с половым и бесполосеменным размножением из голландской и германской коллекций (Табл.1.). Тотальную ДНК экстрагировали из проростков и листьев растений фенольно-детергентным методом. Для скрининга молекулярных маркеров применяли адаптированный метод транспозон дисплея. Амплифицированные фрагменты фракционировали в 1.0–1.5% агарозных гелях, которые окрашивали бромистым этидием, либо в 5.1% полиакриламидных гелях, которые окрашивали серебром.

Результаты и обсуждение

Впервые обнаружены потенциальные маркеры, ассоциированные с апомиксисом у бочечер как из нидерландской, так и германской коллекций. Методом транспозон дисплея выявлены следующие маркеры, ассоциированные с апомиксиса. Это маркеры на основе non-LTR транспозона, принадлежащего классу 1 МГЭ, C_{in}4a+V_{tat} с размерами 220 п.о., 240 п.о. и 380 п.о., и маркер на основе ДНК-транспозона, принадлежащего классу 2 МГЭ, Isaak+V_{caa} размером 230 п.о. (рис.1). В настоящее время идет секвенирование полученных ДНК маркеров.

Вне всякого сомнения, видовой комплекс *Boechnera* – привлекательная система для изучения апомиксиса, поскольку это высоко полиморфный таксон, включающий как сексуальные, так и апомиктические формы, проявляющие апомиксис на разных уровнях пloidности, включая диплоидный (крайне редкое явление при апомиксисе), триплоидный и тетраплоидный (Naumova et al, 2001). Развитие зародышевых мешков характеризуется

-- при апомейозе диплоспорическим образованием диад (Taraxacum-тип) и

--при мейозе мейотическим образованием тетрад (Polygonum-тип).

В настоящее время ведется активный поиск биохимических и молекулярно-генетических маркеров апомиксиса у различных видов цветковых растений, и в том числе у *Boechnera* (Gerashchenkov and Rozhnova, 2007).

Таблица 1.

Описание форм *Boechnera* с бесполосеменным (apo) и половым (sex) способами репродукции

##	Растительные генотипы	Источник происхождения
1	<i>Boechnera holboellii</i> Colorado 3x #36-1 (apo)	Dr. Kim Boutilier, Plant Research International, Netherlands
2	<i>Boechnera holboellii</i> Colorado 3x #6-3 (apo)	
3	<i>Boechnera holboellii</i> Colorado 3x #5-10 (apo)	
4	<i>Boechnera holboellii</i> Colorado 2x #4-2 (apo)	
5	<i>Boechnera holboellii</i> Colorado 2x #8-7 (apo)	
6	<i>Boechnera stricta</i> 2x #10 (sex)	
7	<i>Boechnera holboellii</i> Rc#1 (apo)	Dr. Thomas Mitchell-Olds, Max Planck Institute of Chemical Ecology, Germany
8	<i>Boechnera holboellii</i> cg#25 (apo)	
9	<i>Boechnera stricta</i> 4 (sex)	
10	<i>Boechnera stricta</i> 11 (sex)	

Геномы фактически всех видов с половым размножением содержат МГЭ (Arkhipova and Meselson, 2005). Тем не менее, их участие в половом процессе в значительной степени остается предметом теоретических спекуляций (Попадьин, 2003; Arkhipova and Meselson, 2005). Очевидно, особенности структурно-функциональной организации МГЭ позволяют рассматривать их в качестве потенциальных маркеров в генетическом анализе систем размножения цветковых растений.

Физическое и функциональное картирование геномной области, сцепленной с апоспорией у *Pennisetum squamulatum* и *Cenchrus ciliaris* (семейство *Poaceae*), осуществленное группой Пэгги Озиас-Акинс (США), показало, что маркерный регион богат транспозонами и ретротранспозонами и беден генами (Ozias-Akins and van Dijk,

2007). В частности этот регион включал высокоповторенные последовательности из Oriе-2-подобного семейства РЭ, которые, впрочем, обычны в этой области генома.

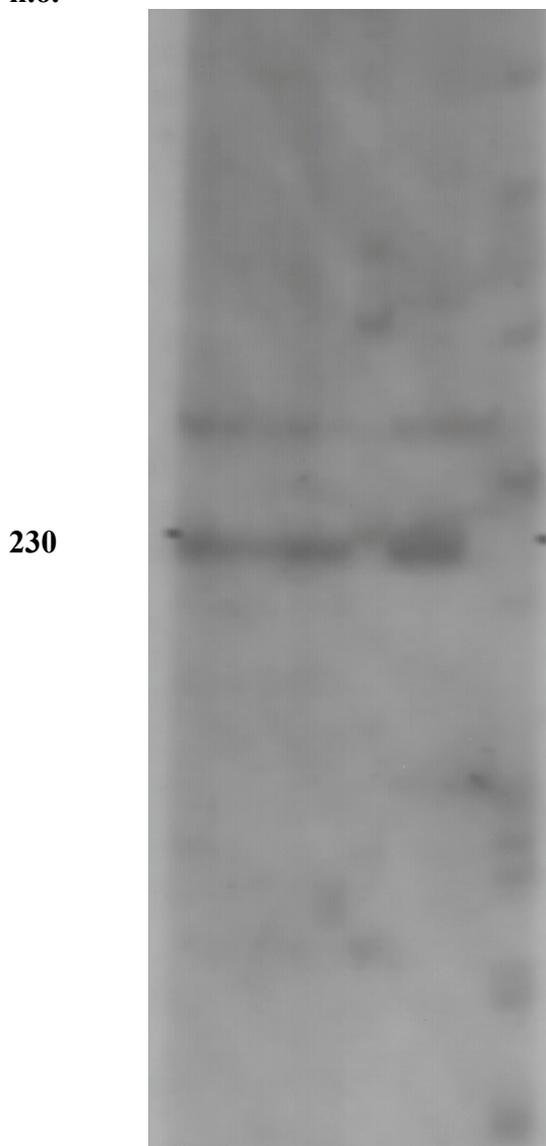
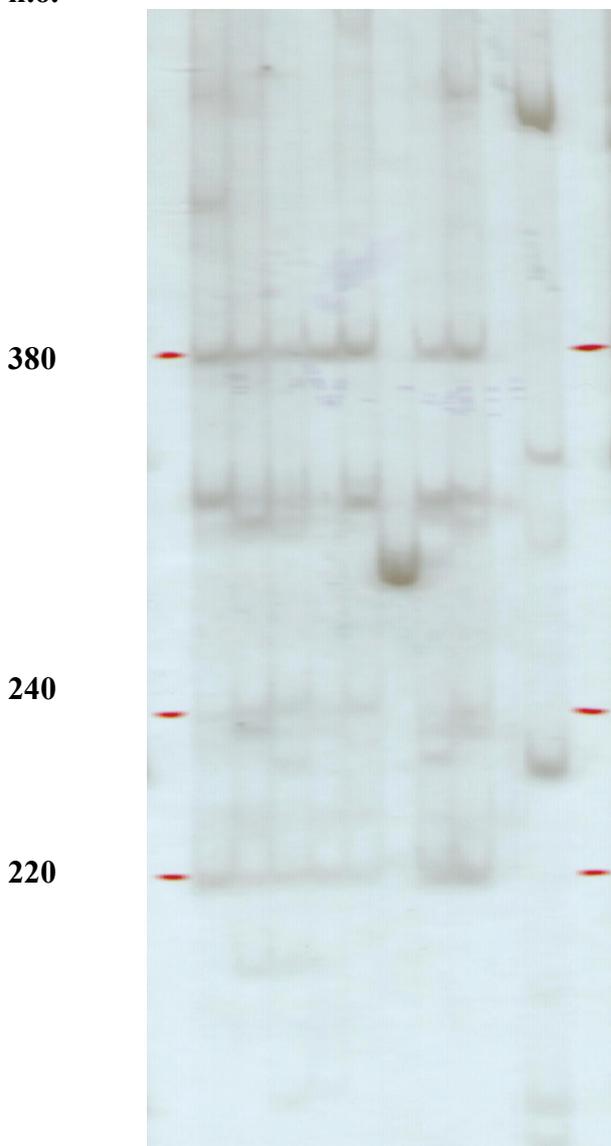
В работе канадских коллег, исследовавших генетический полиморфизм РЭ у 4-х растительных видов "с облигатным апомиксисом", сообщалось, что авторы не обнаружили достоверных различий нуклеотидных замен исследованных РЭ у асексуальных форм растений в сравнении с "половыми" РЭ (Docking et al, 2006).

Полученные нами маркеры будут использованы далее в экспериментах по верификации на ближайших родственниках бочечер из семейства *Brassicaceae*, а также для клонирования и секвенирования генетических последовательностей, потенциально вовлеченных в апомиксис у растений.

Анализ литературы показывает, что скрининг молекулярных маркеров бесполосемянности у растений среди МГЭ прежде не проводился. Таким образом, полученные нами экспериментальные данные всецело носят оригинальный характер и могут свидетельствовать в пользу гипотезы о возможном участии МГЭ в генетическом контроле апомиксиса у *Boecheira*.

Размер, 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 п.о.

Размер, 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 п.о.



а

б

Рис.1. Молекулярные маркеры бесполосемянного размножения у североамериканских эндемиков *Boecheira* на основе

а) ретроэлемента Cin4a и б) ДНК-транспозона Isaak

1 – 10 – генотипы форм *Boechea* приведены в таблице 1.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты РФФИ №№ 08-04-97011-р_поволжье_a, 08-04-97050-р_поволжье_a и 09-04-01153-а).

Выводы:

1. Исследовали генетический полиморфизм спектров МГЭ основных групп 1 и 2 классов у форм *Boechea* с половым и бесполосеменным способами размножения методом транспозон дисплея. Общее число праймерных комбинаций составило более 400 вариантов.

2. Впервые разработан и применен новый вариант транспозон дисплея на основе рестриктазы *CspBI*, показавший свою эффективность при решении поставленной цели.

3. Впервые экспериментально показаны ассоциации молекулярных маркеров на основе МГЭ обоих классов с бесполосеменным способом размножения у бочечер как из голландской, так и германской генетических коллекций.

4. Впервые обнаружены потенциальные маркеры, ассоциированный с диплоспорическим апомиксисом у бочечер одновременно из германской и нидерландской коллекций, а именно:

Cin4a+Vtat размером 220 п.о

Cin4a+Vtat размером 240 п.о

Cin4a+Vtat размером 380 п.о и

Isaak+Vcaa размером 230 п.о.

Литература

1. *Попадьин К.Ю.* Эволюция полового размножения: роль вредных мутаций и мобильных элементов // Журнал Общей Биологии.- 2003.- Т. 64, № 6.- С.463-478.

2. *Arkhipova I. and Meselson M.* Deleterious transposable elements and the extinction of asexuals // BioEssays.- 2005.- vol. 27, № 1.- P.76-85.

3. *Docking T.R., Saader F.E., Elliott M.C., Schoen D.J.* Retrotransposon sequence variation in four asexual plant species // J. Mol. Evol.- 2006.- vol. 62.- P.375–387.

4. *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, №. 5-6.- P.167-174.

5. *Gerashchenkov G., Rozhnova N., Gorbunova V. and Timirkaeva A.* The analysis of hormonal levels in top leaves and flower buds of the *Boechea* accessions with asexual (apomictic) and sexual (amphimictic) reproduction // Proceedings of the Latvian Academy of Sciences.- 2007.- Section B, vol. 61, № 6.- P.1-7.

6. *Naumova T.N., van der Laak J., Osadtchiy J., Matzk F., Kravtchenko A., Bergervoet J., Ramulu K.S., Boutilier K.* Reproductive development in apomictic populations of *Arabis holboellii* (Brassicaceae) // Sex. Plant Reprod.- 2001.- vol. 14, №. 4.- P.195-200.

7. *Ozias-Akins P. and van Dijk P.J.* Mendelian genetics of apomixis in plants // Annu. Rev. Genet. 2007. vol. 41.- P.509–37.

Резюме

Исследовали генетический полиморфизм спектров основных групп 1 и 2 классов мобильных генетических элементов у североамериканских эндемичных форм *Boechea* методом транспозон дисплея. Впервые обнаружены четыре потенциальные маркера, ассоциированных с апомиксисом одновременно у бочечер из германской и голландской коллекций на основе транспозонов Cin4a и Isaak.

Spectra of genetic polymorphisms of the general groups of 1 and 2 classes of mobile genetic elements at North American endemic *Boecheera* accessions were investigated by transposon display technique. For the first time the potential markers on the basis Cin4a and Isaak associated with apomixis at *Boecheera* accessions from the German and Netherlands collections simultaneously were found out.

**КАРПОВ П.А.¹, ЕМЕЦ А.И.¹, МАТУСОВ В.Г.¹, НЫПОРКО А.Ю.¹,
НАДЕЖДИНА Е.С.^{2,3}, БЛЮМ Я.Б.¹**

¹ Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев

² Институт белка РАН, Москва

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ ПОИСК РАСТИТЕЛЬНЫХ ГОМОЛОГОВ STE20-ПОДОБНЫХ СЕРИН/ТРЕОНИН ПРОТЕИНКИНАЗ

Серин-треониновые протеинкиназы дрожжей STE20 и их животные гомологи SLK (STE20-подобные серин/треонин-протеинкиназы) отвечают за регуляцию полярности клеток на различных стадиях клеточного цикла [1-3]. Показано, что в клетках дрожжей протеинкиназа STE20 активирует MAPKKK каскады [4], регулирует рост и обратную связь в условиях дефицита глюкозы [5], участвует в осмосенсорных Sho1-сигнальных путях [6], феромон-зависимой передаче сигналов [7], прямой регуляции апоптоза [8], фосфорилировании белков [9], регуляции роста псевдогифов [10], регуляции выхода из митоза [11], передаче сигналов во время роста мицелия [12], детерминации сайтов почкования клетки [13]. В клетках млекопитающих протеинкиназа SLK (LOSK) ассоциирована с микротрубочками и центросомами, а ее ингибирование приводит к дезориентации и беспорядочному расположению микротрубочек. Таким образом, LOSK обеспечивает радиальное расположение микротрубочек и необходима для правильной локализации аппарата Гольджи в различных типах клеток [14]. На основании аналогии с *Xenopus laevis* [15] предполагается, что SLK (гомолог xPlk1 *X. laevis*) может регулировать активность Plk1 (гомолога Plx1 *X. laevis*) [14, 16]. Считается, что SLK фосфорилируется протеинкиназами ATM или ATR, которые принимают участие в опосредовании клеточного ответа на повреждения ДНК [17]. Предполагаемая связь протеинкиназы SLK с процессом репарации ДНК подтверждается ее способностью индуцировать апоптоз путем непосредственного фосфорилирования и активации протеинкиназы-1, регулирующей апоптотические сигналы (ASK-1), с последующей активацией p38 митоген-активированной протеинкиназы, участвующей в МКК4/МКК7-JNK и МКК3/МКК6-p38 каскадах, контролирующей цитокинез и ответ на стресс [18]. Вероятно, этим свойством объясняется роль протеинкиназы SLK в регуляции клеточного деления, в частности, в контроле микротрубочек в интерфазе [14].

Для протеинкиназ SLK животных характерно наличие каталитического домена (порядка 250-260 аминокислотных остатков) в N-концевой области молекулы [19]. В свою очередь, каталитический домен (порядка 248-252 аминокислотных остатков) STE20 дрожжей расположен в C-концевой области молекулы [20]. Несмотря на различную локализацию, киназные домены STE20-подобных протеинкиназ животных и дрожжей имеет высокую степень сходства аминокислотных последовательностей. В свое время это явилось основой для биоинформационного предсказания SLK киназ у животных на основании их гомологии STE20 дрожжей [21].

В настоящее время информация о растительных гомологах STE20-подобных протеинкиназ практически отсутствует. Единственным потенциальным растительным гомологом является протеинкиназа SIK1 из *Arabidopsis thaliana* [21, GenBank: