

4. Комахин Р.А., Комахина В.В., Жученко А.А. Создание генетических конструкций содержащих бактериальный ген *recA E. coli* для индукции рекомбинации в растениях // Сельскохозяйственная биология.-2007.-Т 3.- С.25-32.
5. Корнеева И.В., Парашина Е.В., Лебедев В.Г., Харченко П.Н., Долгов С.В. Получение трансформированных растений томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.).- Москва.- 2005.- 13.
6. Ланцов В.А. Гомологическая ДНК-трансфераза RecA: функциональные активности и поиск гомологии рекомбинирующими ДНК // Молекулярная биология.-2007. – Т. 41, №3.-С.467-477.
7. Cox M.M. Historical overview: Searching for replication help in all of the rec places // Proc Natl Acad Sci USA.- 2001.- vol. 98, №15.- P. 8173–8180.
8. Grelon M., Vezon D., Gendrot G., Pelletier G. AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants // EMBO J.- 2001.- vol. 20, №3.- P.589-600.
9. Park S.H., Morris J.L., Park J.E., Hirschi K.D., Smith R.H. Efficient and genotype-independent Agrobacterium--mediated tomato transformation // J Plant Physiol.- 2003.- vol. 160, № 10.- P.1253-1257.

#### **Резюме**

Для изучения мейотической рекомбинации получены трансгенные растения томата сорта Марглоб и гибриды F<sub>1</sub>, экспрессирующие ген *NLS-recA-licBM3*. В настоящее время проводятся исследование мейоза у растений F<sub>1</sub> и получение гибридов F<sub>2</sub> для изучения rf и распределения участков кроссинговера.

For studying of meiotic recombination we have constructed transgenic tomato plants and hybrid F<sub>1</sub> which are expressing gene *NLS-recA-licBM3*. At present are conducted research meiosis at plants F<sub>1</sub> and creation of hybrids F<sub>2</sub> for studying rf and distribution sites of crossing over.

**МАЙДАНИЮК Д.Н.<sup>1,2</sup>, АНДРЕЕВ И.О.<sup>1</sup>, СПИРИДОНОВА Е.В.<sup>1</sup>, КУНАХ В.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, ул. Академика Заболотного 150, г.Киев, 03680, Украина; e-mail: i.o.andreev@imbg.org.ua

<sup>2</sup>Луганский национальный аграрный университет, г. Луганск, 91008, Украина

#### **RAPD-ФРАГМЕНТ, ВАРИАБЕЛЬНЫЙ В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ КУКУРУЗЫ**

Культура тканей высших растений является уникальной искусственно созданной биологической системой, которую применяют в разнообразных фундаментальных исследованиях и в биотехнологических разработках. В ряде работ [1-3] сообщается о высоком уровне геномной изменчивости, сопровождающей культивирование тканей кукурузы *in vitro*. Поскольку традиционным источником эксплантов для получения каллусных культур кукурузы являются незрелые зародыши, то возникает вопрос, в какой мере эти результаты отражают изменения генома индуцированные культивированием в условиях *in vitro*, а в какой – обусловлены генетической гетерогенностью исходного материала. В данном исследовании мы применили подход, который исключает влияние последнего фактора, а именно, в качестве эксплантов использовали ткани проростков, что позволило провести сравнительный анализ ДНК индивидуальных растений и полученных от них каллусных культур.

#### **Материалы и методы**

В работе использовали инбредные линии кукурузы Black Mexican Sweet (BMS) (семена предоставлены Maize Genetics Cooperative Stock Center, г. Урбана, США), ВИР-27 (Селекционно-генетическим институтом УААН, г. Одесса) и ЧК-218 (Институтом физиологии растений и генетики НАН Украины, г. Киев). В качестве эксплантов использовали апикальные части 1-2-дневных проростков длиной 2-5 мм. Для

выделения ДНК использовали ткани проростков и каллусных культур возрастом от 4 до 12 месяцев. Состав питательных сред, условия культивирования, методика выделения ДНК, условия проведения ПЦР и электрофоретического фракционирования продуктов амплификации описаны в [4]. ПЦР повторяли дважды. Блот-гибридизацию проводили по [5]. Полиморфный ампликон выделяли из геля при помощи набора «DNA extraction kit» (Fermentas) и метили [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP (GE Healthcare) методом рассеянной затравки [5]. Полиморфный ампликон клонировали в плазмиде pUC19, нуклеотидную последовательность определяли на генетическом анализаторе ABI Prism 3730.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Анализ геномной изменчивости каллусных тканей линии BMS.* Анализ ДНК интактных растений и полученных от них каллусных тканей возрастом 4, 7, 12 месяцев проводили при помощи RAPD-ПЦР с использованием 40 десятинуклеотидных праймеров (табл. 1). При проведении ПЦР с каждым из праймеров были получены четкие ампликоны, количество которых в спектрах варьировало от 3 до 14.

Всего было учтено 275 RAPD-ампликонов, среди которых полиморфными оказались только два (0,73%). Оба они выявлены в спектре продуктов ПЦР каллусных тканей, полученных с праймером А-01 (рис. 1, верхняя панель). Так, ампликон длиной около 390 п.н. отсутствовал в спектре растения №1, появлялся в четырехмесячном каллусе и не обнаруживался при увеличении длительности пассирования. Аналогичный ампликон наблюдали в RAPD-спектре растения №2, при этом он отсутствовал в спектрах каллусов этого растения. Второй ампликон размером ~1300 п.н. также характеризовался количественной вариабельностью в каллусах обоих растений.

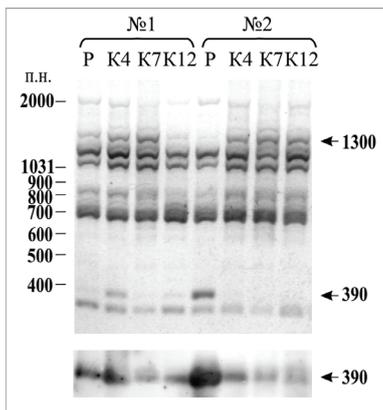
Таблица 1.

Праймеры, использованные для RAPD-анализа

Название праймера	Последовательность (5'-3')	Название праймера	Последовательность (5'-3')	Название праймера	Последовательность (5'-3')
А-01*	CAGGCCCTTC	А-17*	GACCGCTTGT	В-08	GTCCACACGG
А-02*	TGCCGAGCTG	А-18*	AGGTGACCGT	В-10	CTGCTGGGAC
А-03*	AGTCAGCCAC	А-19	CAAACGTCGG	В-18	CCACAGCAGT
А-04*	AATCGGGCTG	А-20*	GTTGCGATCC	Г-01	CCTGTTAGCC
А-05*	AGGGGTCTTG	Аg-01	AGGTCACTGA	М-06	CTGGGCAACT
А-07*	GAAACGGGTG	АН-29	TGGTGACTGA	М-07	CCGTGACTCA
А-08*	GTGACGTAGG	АН-30	TGGTCACTGT	М-14	AGGGTCGTTT
А-09*	GGGTAACGCC	В-01*	GTTTCGCTCC	ОРА-02	TGCCGAGCTG
А-10*	GTGATCGCAG	В-02*	TGATCCCTGG	QR-01	CGGTCACTGT
А-11*	CAATCGCCGT	В-04*	GGACTGGAGT	QR-05	CGGCCCCGGC
А-12*	ATCGCACACT	В-05*	TGCGCCCTTC	340	GAGAGGCACC
А-13	CAGCACCCAC	В-06	TGCTCTGCCC	450	CGGAGAGCCC
А-14*	TCTGTGCTGG	В-07	GGTGACGCAG	474	AGGCGGGAAC
А-16*	AGCCAGCGAA				

*Примечание:* \* – Праймеры, использованные в анализе линий ВІР-27 и ЧК-218

Фрагмент длиной ~390 п.н., полученный путем амплификации из ДНК растения №2, гибридизовали с RAPD-продуктами интактных растений и их каллусных тканей, полученных с праймером А-01. Результаты гибридизации показали наличие последовательностей, гомологичных данному фрагменту, у всех объектов (рис. 1, нижняя панель).



Анализ геномной изменчивости каллусных тканей линий ВИР-27 и ЧК-218.

Методом RAPD-анализа исследовали шестимесячные каллусные ткани, полученные от 8 индивидуальных растений линий ВИР-27 и 7 – ЧК-218 (см. список использованных праймеров в табл.1). Как и в случае линии BMS, каллусные ткани обеих линий характеризовались низкой геномной изменчивостью. Снова полиморфные продукты амплификации были обнаружены лишь в спектре праймера А-01. Полиморфизм заключался в увеличении интенсивности ампликона длиной около 390 п.н., которое наблюдали в культивируемых тканях трех растений линии ВИР-27 (рис. 2). Во всех растениях обеих линий, в каллусах остальных пяти растений линии ВИР-27, а также в культивируемых тканях линии ЧК-218 данный фрагмент выявлялся в незначительном количестве. Полиморфный ампликон был выделен из спектра ПЦР-продуктов ДНК культивируемых тканей одного из растений линии ВИР-27, клонирован и секвенирован. В результате было установлено, что длина фрагмента составляет 397 п.н. Нуклеотидная последовательность данного ампликона представлена на рис. 3.

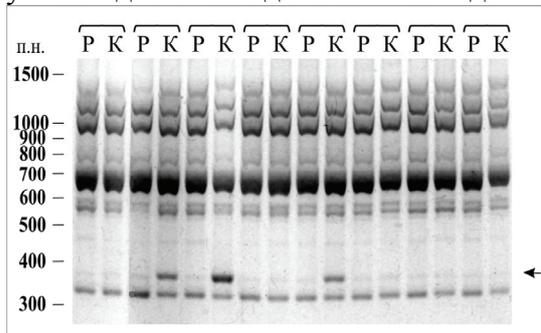


Рис. 2. Генетический полиморфизм растений кукурузы линии ВИР-27 и полученных от них каллусных культур. RAPD-спектры, полученные с праймером А-01: Р – растения-доноры эксплантов, К – каллусные ткани возрастом 6 месяцев. Полиморфный фрагмент размером около 390 п.н. обозначен стрелкой.

Содержание GC-оснований в последовательности составляет 43,3 %, на обеих цепях фрагмента обнаружены открытые рамки считывания, кодирующие полипептиды длиной не более 40 аминокислотных остатков. Поиск в базе данных GenBank среди геномных последовательностей кукурузы и других видов не выявил последовательностей, обладающих значительным сходством с данным фрагментом.

1	AGGCCSTTCC	TCAAACAAG	AGCGTAGGCA	TCCGATGCAA	AGGGAATAATC	CTCAGTACA	CCSTTAGATA	GAACCTGTGT	AATACCAACG	AAAGGAATAC
	TCCGGGAAGG	AGTTTGTTC	TCCGATCCGT	AGGCTACGTT	TCCSTTTTAG	GAGTCCGATG	GGGAATCTAT	CTTGAGCACA	TTATGGTTGC	TTTCCSTTATG
101	СТТАСАСГАГ	ТАТААААААА	СААААААААА	АААААААААА	СТАААААААА	СААААААААА	СААААААААА	СААААААААА	СААААААААА	СААААААААА
	GAATGTGCTC	ATATTTCTCTG	GTCGGGTTTC	TTCGTTATTT	GACTGGGTGT	CTCACTCAA	TTTGTCCGCT	ATTCGGCTGA	TGTAACGATG	GACTTTTCCG
201	AGCTTACGCT	AATGGAGTTA	AAGCAATAAA	TAAACCAATA	CTCTCCTCT	TGCTAAAAGG	GGGAAGAAAG	TACTACTACT	GAGTTTAAAG	CAAGAAGGG
	TGGAATGGGA	TTACCTCAAT	TTCGTTATTT	ATTTGGTTAT	GGAGAGGAGA	ACGATTTTCC	CCCTTCTTTC	ATGATGATGA	CTCAAAATTC	GTTTCTTCCC
301	AGATGAGGGA	GTTCCAGGTT	GGAGSTCAAC	CCTATAGTTT	AGGGAATGCC	ATCCGAAGCT	AACTACGATA	TTAGAGTTAT	ACTAGTTAGA	AGGGCST
	TCTACTCCCT	CAAGGTCCAA	CCTCGAGTTG	GGATATCAAA	TCCSTTACGG	TAGGCTTCCA	TGATGCTAT	AATCTCAATA	TGATCAATCT	TCCCGGA

Рис. 3 Нуклеотидная последовательность варибельного ампликона размером около 390 п.н. из ДНК каллуса кукурузы линии ВИР-27, полученного с праймером А-01.

В данной работе проведен молекулярно-генетический анализ растений и культивируемых тканей трех инбредных линий кукурузы: Black Mexican Sweet C456, культивируемой в Северной Америке, а также линий отечественной селекции ВИР-27 и ЧК-218. Последняя была получена из линии ВИР-27 путем обработки семян стрептомицином и обладает более высокими агрономическими показателями по

сравнению с исходной [6]. Полученные нами результаты свидетельствуют о низком уровне изменчивости генома всех изученных линий кукурузы в культуре тканей. Выявлено лишь два полиморфных ампликона, причем блот-гибридизацией одного из них показано, что полиморфизм обусловлен изменением его количества в составе продуктов ПЦР. Вместе с тем, Осипова и соавторы при помощи RAPD-анализа ранее показали значительные отличия групп регенерантов, полученных из двух- и шестимесячных каллусных культур линии кукурузы А188, как друг от друга, так и от интактного растения [1,2]. Степень отличия соматоклонов от исходной линии варьировала от 6,5% до 23%. Браун и соавторы [3] методом ПДРФ также обнаружили значительный полиморфизм в каллусных тканях и соматоклонах линии А188. Такие расхождения в результатах, полученных нами и другими исследователями, можно объяснить генетическими особенностями исследованных линий кукурузы. Еще одним отличием нашей работы является то, что в ней исследовали каллусные культуры, происходящие от индивидуальных растений, благодаря чему была проведена непосредственная оценка изменения отдельных геномов путем сравнения культивируемых тканей с растением-донором экспланта. Это позволило исключить возможный вклад внутрилинейной гетерогенности в полиморфизм RAPD-продуктов, выявляемый в культуре тканей.

В результате исследований было обнаружено два полиморфных фрагмента, один из которых оказался вариабельным в культуре тканей двух линий, а именно ампликон размером около 390 п.н. из спектра ПЦР-продуктов праймера А-01. В случае линии BMS по наличию данного фрагмента между собой отличались как растения, так и полученные из них культуры тканей разного возраста. В случае линии ВИР-27 данный ампликон отсутствовал во всех растениях, но появлялся в каллусных культурах. На примере линии BMS методом блот-гибридизации было показано, что этот фрагмент в разном количестве присутствует в составе ПЦР-продуктов праймера А-01 у всех объектов, т.е. ее полиморфизм носит количественный характер. Мы предполагаем, что причиной этого явления может быть эпигенетическая изменчивость (избирательная амплификация отдельных участков генома) при смене физиологического состояния клеток в условиях культуры *in vitro*. Попытка выяснить функциональное значение вариабельного фрагмента путем анализа его нуклеотидной последовательности и последующего поиска в базе данных GeneBank не увенчалась успехом. Отсутствие в ней открытых рамок считывания достаточной протяженности позволяет отнести фрагмент к некодирующим участкам генома.

### **Выводы**

На основе сравнительного анализа индивидуальных растений и полученных от них каллусных культур показано, что культивируемые ткани инбредных линий кукурузы BMS, ВИР-27, ЧК-218 в культуре *in vitro* характеризуются низким уровнем геномной изменчивости. Полиморфизм заключался в изменениях количества ампликонов в спектрах продуктов ПЦР. В культивируемых тканях двух линий кукурузы (BMS, ВИР-27) обнаружен вариабельный ампликон размером около 390 п.н., однако выяснить его функциональное значение путем анализа нуклеотидной последовательности не удалось.

### **Литература**

1. Осипова Е.С., Кокаева З.Г., Троицкий А.В., Долгих Ю.И., Шамина З.Б., Гостимский С.А. RAPD-анализ соматоклонов кукурузы // Генетика. – 2001. – Т.37, №1. – С. 91–96.
2. Осипова Е.С., Ковеза О.В., Троицкий А.В., Долгих Ю.И., Шамина З.Б., Гостимский С.А. Выявление специфических фрагментов у соматоклонов кукурузы и создание на их основе SCAR-маркеров // Генетика. – 2003. – Т.39, №12. – С. 1664–1672.
3. Brown P.T.H., Göbel E., Lörz H. RFLP analysis of *Zea mays* callus and their regenerated plants // Theor. Appl. Genet. – 1991. – vol. 81. – P. 227–232.

4. Майданюк Д.Н., Андреев И.О., Спиридонова Е.В., Чеченева Т.Н., Кунах В.А. Геномная изменчивость линии кукурузы Black Mexican Sweet Corn C456 в культуре тканей *in vitro*: результаты RAPD-анализа // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2006. – Т.4, №1. – С. 58-67.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
6. Борейко В. С. Индуцированные мутации у инбредных линий кукурузы при помощи химических мутагенов // Дис. на соискание уч. ст. канд. биол. наук. – К.: Ин-т молекулярной биологии и генетики АН УССР, 1978. – 190 с.

### Резюме

RAPD-анализ геномов индивидуальных растений кукурузы линий Black Mexican Sweet, ВІР-27 и ЧК-218 и полученных от них каллусов показал низкий уровень изменчивости *in vitro*. В культивируемых тканях двух линий кукурузы обнаружен варибельный ампликон размером около 390 п.н., однако выяснить его функциональную роль путем анализа нуклеотидной последовательности не удалось.

RAPD-аналіз геномів окремих рослин кукурудзи ліній Black Mexican Sweet, ВІР-27 і ЧК-218 та отриманих від них калусних культур показав низький рівень мінливості *in vitro*. В культивованих тканинах двох ліній (BMS та ВІР-27) знайдено варибельний амплікон розміром близько 390 п.н., проте з'ясувати його функціональну роль шляхом аналізу нуклеотидної послідовності не вдалося.

RAPD-analysis of maize plants from Black Mexican Sweet, VIR-27 and ChK-218 inbred lines as well as derived from them cultured tissues revealed low genetic variability *in vitro*. A variable amplicon of approximately 390 bp was found in cultured tissues of two inbred lines. An analysis of amplicon sequence did not allow to recognize it's function.

**МАТВЄЄВА Н.А., ШАХОВСЬКИЙ А.М., КВАСКО О.Ю., ВАСИЛЕНКО М.Ю.,  
ГЕРАСИМЕНКО І.М., КУЧУК Н.В.**

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України  
Україна, 03143, Київ, вул. Заболотного 148. e-mail [joyna@i.com.ua](mailto:joyna@i.com.ua)*

### ***CICHORIUM INTYBUS* L. ЯК ПЕРСПЕКТИВНИЙ ОБ'ЄКТ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ**

Дослідження в галузі біотехнології рослин відрізняє їх практична спрямованість, зокрема, науковий і практичний інтерес становить використання досягнень генетичної інженерії в медицині та ветеринарії [1, 2]. Відомо, що гени, які кодують антигени бактеріальних чи вірусних патогенів, можуть експресуватися в клітинах рослин. При цьому вони зберігають свої імуномодулюючі властивості та можуть слугувати лікувальними і профілактичними засобами. Отже, генетично модифіковані рослини можуть бути використані для продукування фармакологічно активних білків, включаючи антитіла, вакцини, гормони. Нині розроблено методи, що дозволяють ініціювати в рослинах синтез бактеріальних антигенів. Це може бути здійснено шляхом генетичної трансформації [3], наприклад, методом агробактеріальної трансформації. Харчові культури, що не потребують термообробки, можуть стати природним, готовим до вживання продуктом для профілактики та лікування низки захворювань, тобто, так званими їстівними вакцинами [1]. Фармацевтичні препарати