

ГЕРАЩЕНКОВ Г.А.¹, РОЖНОВА Н.А.¹, АБРАМОВ С.Н.², ГОРБУНОВА В.Ю.²

¹ Институт биохимии и генетики УНЦ РАН,

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

² ГОУ ВПО “Башкирский государственный педагогический университет”,

Россия, 450000, Уфа, проспект Октябрьской революции, 3а,

e-mail: obg_bspu@mail.ru

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МАРКЕРОВ АПОМИКСИСА У ФОРМ *BOECHERA* И БЛИЖАЙШИХ РОДСТВЕННИКОВ ИЗ СЕМЕЙСТВА *BRASSICACEAE*

Исследования в области генетики апомиксиса у цветковых растений обоснованно относят к числу прорывных исследований (Ozias-Akins and van Dijk, 2007). Тем не менее, возможное участие МГЭ в манифестации апомиксиса выпало из поля зрения исследователей. Как правило, роль МГЭ в бесполом размножении 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 апомиксиса у растений. Возможно по этой причине, начиная с первых экспериментов Грегора Менделя на *Hieracium* и вплоть до настоящего времени, молекулярные механизмы, контролирующие апомиксис у растений, остаются слабо понятными. В настоящее время ведется активный поиск биохимических и молекулярно-генетических маркеров апомиксиса у различных видов цветковых растений, и в том числе у *Boechea* (Naumova et al, 2001; Gerashchenkov et al, 2007). Цель исследования: анализ особенностей наследования маркеров диплоспорического апомиксиса у представителей рода и родственных форм из семейства *Brassicaceae*.

Материалы и методы

Диплоспорический вид *Boechea holboellii* характеризуется рядом особенностей, позволяющих рассматривать его в качестве перспективного модельного объекта при исследованиях морфо-физиологической и молекулярной регуляции апомиксиса. Это близкий родственник *Arabidopsis thaliana*, для которого доступны обширные молекулярно-генетические ресурсы (полностью секвенированный геном, мутанты), что облегчает поиск участвующих в контроле апомиксиса генов. Вид *Boechea holboellii* высоко полиморфен, включает половые и апомиктичные формы различной пloidности из ряда изолированных друг от друга географически популяций. Развитие зародышевых мешков характеризуется: при апомейозе диплоспорическим образованием диад (*Taraxacum*-тип) и при мейозе мейотическим образованием тетрад (*Polygonum*-тип) (Naumova et al, 2001). Наконец, это единственный описанный апомикт в семействе *Brassicaceae*, содержащем ряд важных для сельского хозяйства видов. В исследовании сравнивали апомик-

Таблица 1

Описание представителей семейства *Brassicaceae* с бесполосеменным (апо) и половым (sex) способами репродукции

№№	Виды	Способ размножения	Источник происхождения
Представители рода <i>Boechnera</i>			
1	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 3x #36-1	Апо	Dr. Kim Boutillier, Netherlands
2	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 3x #6-3	Апо	
3	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 3x #5-10	Апо	
4	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 2x #4-2	Апо	
5	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 2x #8-7	Апо	
6	<i>Arabis drummondii</i> 2x #10	Sex	
7	<i>Arabis holboellii</i> Rc#1	Апо	Dr. Thomas Mitchell- Olds, Germany
8	<i>Arabis holboellii</i> cg#25	Апо	
9	<i>Arabis drummondii</i> 4	Sex	
10	<i>Arabis drummondii</i> 11	Sex	
Другие представители семейства <i>Brassicaceae</i>			
11	<i>Arabis canadensis</i>	Sex	Dr. Anne E. Hall, USA
12	<i>Boechnera beckwithii</i>	Unknown	Dr. Michael Windham, USA
13	<i>Boechnera falcifruca</i>	Unknown	
14	<i>Boechnera perennans</i>	Unknown	Dr. David Siemens, USA
15	<i>Boechnera stricta</i> 10	Sex	
16	<i>Arabis drummondii</i>	Sex	Dr. Diana Wolf, USA
17	<i>Arabis lyrata</i>	Sex	
18	<i>Arabis pendula</i> L.	Sex	Dr. Olga Zhirona, Russia
19	<i>Brassica napus</i> , canola cv. Westar	Sex	
20	<i>Arabidopsis thaliana</i> DiJohn	Sex	

тичные и половые формы *Boechnera* из нидерландской (популяции США и Гренландии) и германской коллекций, а также ближайшие родственники из семейства *Brassicaceae* (табл. 1).

В работе использовали трансозон дисплей – один из вариантов ПЦР стратегии, основанный на наличии в геноме мобильных генетических элементов, выступающих в роли своеобразного геномного якоря. Метод позволяет одновременно детектировать множественный полиморфизм в исследуемом геноме. Амплифицированные фрагменты фракционировали в 1,0–1,5% агарозных гелях, которые окрашивали бромистым этидием, или в 5,1% полиакриламидных гелях, которые окрашивали серебром.

Маркерные ПЦР фрагменты вырезали из геля и реамплифицировали. Секвенирование маркеров апомикса осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM® 310, используя BigDye® терминатор.

Результаты и обсуждение

Разработан и применен новый вариант транспозон дисплея на основе рестриктазы *CspBI* и дополнительной рестриктазы с CG- или AT-богатыми сайтами узнавания. В качестве рестриктаз с CG-богатым сайтом узнавания использовали *SmaI* (ccc“!ggg) и *PdiI* (gcc“!ggc). Всего 2 варианта рестриктаз для 19 транспозонов. В итоге, подвергнуто анализу (2x19 МГЭ) = 38 вариантов праймерных комбинаций для 10 форм генотипов с апомиксисом и половым размножением. В качестве рестриктаз с AT-богатым сайтом узнавания использовали *VspI* (at“!taat), *SspI* (aat“!att) и *DraI* (ttt“!aaa). Всего 3 варианта рестриктаз для 19 транспозонов. В итоге, подвергнуто анализу (3x19 МГЭ) = 57 вариантов праймерных комбинаций для 10 форм генотипов с апомик-

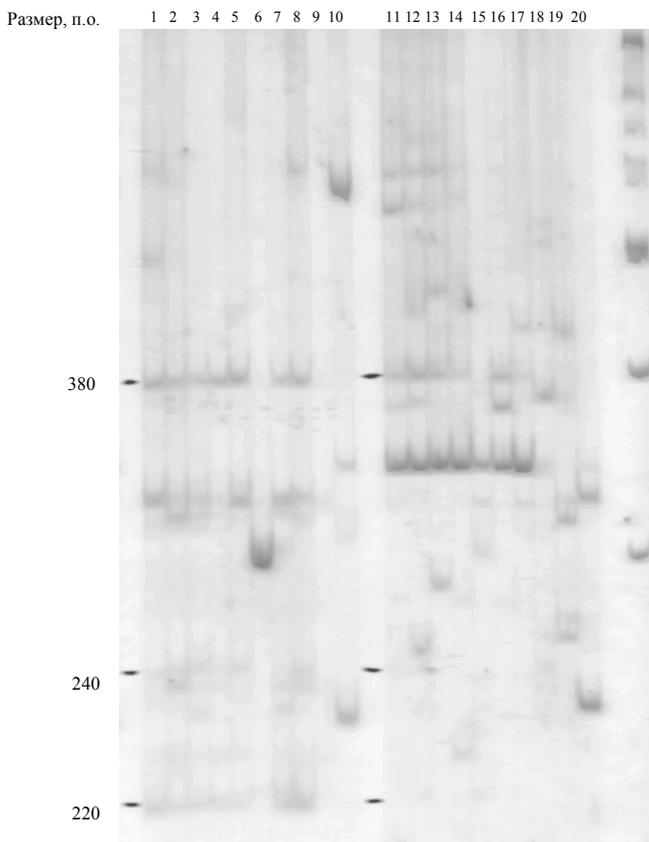


Рис. 1. Экспансия маркеров апомиксиса на основе *Cin4a* ретротранспозона среди представителей семейства *Brassicaceae*. Генотипы растительных форм приведены в табл. 1

сисом и половым размножением. Однако новых в сравнении с 2008 годом ассоциативных с апомиксисом комбинаций для АТ-богатых областей генома обнаружено не было.

Начато секвенирование обнаруженных в 2008 году молекулярных маркеров, ассоциированных с апомиксисом. Обнаружено сходство секвенированных ДНК фрагментов в GenBank+EMBL+DDBJ+PDB с разным количеством уже известных ДНК последовательностей. При этом гомология секвенируемых маркеров с известными последовательностями составляла от 85 до 100%.

Сформулированы предположения о возможных механизмах возникновения и экспансии маркеров апомиксиса в связи с типом размножения, уровнем плоидности и генетико-географическим происхождением боечер. Манифестация маркеров апомиксиса, видимо, не связана с уровнем плоидности боечер.

Выводы

1. С целью проверки выдвинутой ранее гипотезы о транспозонной природе апомиксиса исследовали генетический полиморфизм ДНК спектров у форм *Boecheira* с апомиксисом и амфимиксисом методом транспозон-дисплея. Разработан и применен новый вариант транспозон дисплея на основе рестриктазы CspBI и дополнительной рестриктазы с CG- или АТ-богатыми сайтами узнавания. Однако новых маркеров бесполосемянности обнаружено не было.

2. Исследована экспансия маркеров апомиксиса среди 20 представителей семейства *Brassicaceae*. Предварительные маркеры апомиксиса Cln4a+Vtat размером 220 п.о., 240 п.о. и Isaak+Vcaa размером 230 п.о. обнаружены только у форм *Boecheira* с бесполосемянным размножением.

3. Начато секвенирование обнаруженных в 2008 году молекулярных маркеров, ассоциированных с апомиксисом. Обнаружено сходство секвенированных ДНК фрагментов в GenBank+EMBL+DDBJ+PDB с разным количеством уже известных ДНК последовательностей. При этом гомология секвенируемых маркеров с известными последовательностями составляла от 85 до 100%.

Работа поддержана грантами РФФИ № 08-04-97011 p_поволжье_a и №08-04-97050 p_поволжье_a.

Литература

1. Ozias-Akins P. and van Dijk P.J. Mendelian genetics of apomixis in plants // Annu. Rev. Genet.— 2007.— V.41.— P. 509–537.

2. Naumova T.N.: van der Laak J., Osadtchiy J. et al. Reproductive development in apomictic populations of *Arabis holboellii* (*Brassicaceae*) // Sex Plant Reprod.— 2001.— V.14.— P. 195–200.

3. Gerashchenkov G., Rozhnova N. Genetic control of gametophytic apomixis: current status of knowledge // Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B.— 2004.— V.58., N5/6.— P. 167–174.

4. Gerashchenkov G., Rozhnova N., Gorbunova V., Timirkaeva A. The analysis of hormonal levels in top leaves and flower buds of the *Boecheira* accessions with asexual

(apomictic) and sexual (amphimictic) reproduction // Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B.— 2007.— V.61, N6.— P. 1–7.

Резюме

Разработан и применен новый вариант транспозон дисплея на основе рестриктазы Csp6I и дополнительной рестриктазы с CG- или AT-богатыми сайтами узнавания. Исследована экспансия выявленных маркеров апомиксиса в пределах семейства *Brassicaceae*. Гомология секвенированных маркеров с известными последовательностями составляла от 85 до 100%.

The new variant of the transposon display on the basis of Csp6I and additional restrictase with CG-or AT-rich sites of recognition is developed and applied. Expansion of the revealed markers of apomixis is investigated among some forms of *Brassicaceae*. Homology of sequenced markers with known sequences was from 85 up to 100%.

**ГОРБАЛЬ Л.О., ОСТАШ Б.О., РЕБЕЦЬ Ю.В., РАБИК М.В.,
МИРОНОВСЬКИЙ М.Л., ЦИПІК О.В., ГРОМИКО О.М., ОСТАШ І.С.,
ЛУЖЕЦЬКИЙ А.М.,* БЕХТОЛЬД А.,* ФЕДОРЕНКО В.О.**

*Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна, 79005,
Львів, вул. Грушевського, 4*

**Альберт-Людвіг університет, Німеччина, 72076, Фрайбург,
вул. Стефана-Мейєра, e-mail: lidutko@yahoo.com*

МЕРЕЖІ ГЕНІВ, ЗАДІЯНИХ У РЕГУЛЯЦІЇ БІОСИНТЕЗУ ПОЛІКЕТИДНИХ АНТИБІОТИКІВ У СТРЕПТОМІЦЕТІВ

Вивчення механізмів регуляції вторинного метаболізму і морфогенезу актиноміцетів є однією з центральних проблем генетики та біотехнології мікроорганізмів. Це зумовлено здатністю цих бактерій продукувати широкий спектр біологічно активних сполук. Цікавими в цьому плані є штами *S. antibioticus* Tü6040, *S. aureofaciens* Tü117 та *S. globisporus* 1912 — продуценти полікетидних антибіотиків сімоциклінону D8, α -ліпоміцину і ландоміцину E відповідно (рис.). Усі ці антибіотики володіють антибактерійною активністю, а сімоциклінон D8 та ландоміцин E виявляють також цитостатичну активність щодо різних типів пухлинних клітин [3, 5, 8, 11]. Проведені нами дослідження дали змогу з'ясувати деякі нові аспекти генетичного контролю біосинтезу цих антибіотиків та розробити підходи до отримання їхніх надпродуцентів.

Регуляція біосинтезу сімоциклінону D8. У кластері генів біосинтезу сімоциклінону D8 *S. antibioticus* Tü6040 виявлено три регуляторні гени *simReg1*, *simReg2* і *simReg3*. Біоінформатичний аналіз амінокислотних послідовностей відповідних білків, свідчить про те, що вони кодують регулятори SARP-, TetR- і MarR-родин відповідно. Продукт гена *simReg1* є шлях-специфічним транскрипційним активатором. Його спрямоване руйнування в