

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: апомиксы 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 апомиксиса 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 *Boechea* [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 многих 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

использован уникальный коллекционный материал, а именно североамериканские эндемичные формы рода *Boechea* с различными репродуктивными модами и уровнями плоидности из ведущих лабораторий Нидерландов, Германии и США (таблица). Диплоспорический вид *Boechea holboellii* характеризуется рядом особенностей, позволяющих рассматривать его в качестве перспективного модельного объекта при исследованиях морфо-физиологической и молекулярной регуляции апомиксиса. *Boechea holboellii* – это близкий родственник *Arabidopsis thaliana*, для которого доступны обширные молекулярно-генетические ресурсы (полностью секвенированный геном, мутанты), что облегчает поиск участвующих в контроле апомиксиса генов.

В работе были использованы стандартные методы молекулярной биологии [5]. Тотальную ДНК экстрагировали из проростков и листьев растений фенольно-детергентным методом. В связи с малым количеством растительного материала некоторых образцов все выделенные варианты ДНК далее были наработаны с помощью phi 29 полимеразы методом полногеномной амплификации, позволяющим осуществлять эквивалентное накопление всех ДНК последовательностей генома в количествах, достаточных для молекулярно-генетического анализа. Препараты ДНК гидролизуют рестриктазами BamHI, EcoRI, Eco130I, HindIII, MvaI, PstI (Fermentas). Электрофорез и перенос фрагментов ДНК с геля

на мембрану осуществляли по методу Саузерна с некоторыми модификациями. Мечение и детекцию ДНК набором от фирмы Роше выполняли на полиамидных фильтрах, следуя прописи производителя.

Результаты и обсуждение

Несмотря на активное использование растений рода *Boechea* в качестве модельного объекта при изучении генетики полового размножения и апомиксиса, к настоящему моменту не известно ни одного гена кандидата апомиктического размножения. В 2011–2012 годах 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*. Полученные молекулярные маркеры были использованы в качестве гибридизационных проб. В 2013 году методом Саузерн гибридизации ДНК апомиктических и амфимиктических растений рода *Boechea* из голландской и немецкой коллекций с пробой № 4 (SCAR_Isaak_230) детектирован геномный фрагмент Apo_Isaak_1.2 размером около 1.2 kb, общий для европейских апомиктических растений *Boechea holboellii*. Этот геномный фрагмент, близкий по размеру к среднестатистическим растительным генам (2–4 kb) характеризуются гемизиготностью, как и исходный SCAR_Isaak_230 маркер. Однако для австралийской выборки растений описанный Apo_Isaak_1.2 геномный фрагмент обнаружить не удалось.

Таблица. Коллекция форм растений с бесполосеменным и половым способами размножения

№	Виды и формы	Особенности размножения	Источник происхождения
I	Выборка = Представители рода <i>Boechea</i> семейства <i>Brassicaceae</i>		
	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	

Примечание: * Apo – апомиктическое размножение; Sex – половое размножение.

Пробы № 1, 2 и 3 (на основе SCAR_Cin маркеров апомиксиса) были не эффективны при Саузерн анализе. Методом полногеномной амплификации получены препараты ДНК, пригодные для клонирования обнаруженных фрагментов, ассоциированных с апомиксисом у европейских форм *Boechea*. В настоящее время идет работа по созданию геномных библиотек для выделения геномного фрагмента Apo_Isaak_1200, близкого по размеру среднестатистическим растительным генам.

Напомним, что вплоть до настоящего времени молекулярные механизмы, контролирующе апомиксис, остаются слабо понятными [1, 2, 6, 7]. К настоящему времени все

попытки выделить гены кандидаты из различных модельных систем апомиксиса у цветковых растений заканчивались неудачей [2, 3]. Полученные нами результаты могут быть применены в генетическом конструировании апомиксиса для создания гетерозисных форм и сложных полиплоидов сельскохозяйственных растений. Таким образом, результаты апомиксисных исследований, полученные в 2011–2013 годах, являются совершенно новыми. Теоретический уровень ожидаемых результатов сопоставим с мировым, а по ряду позиций опережает аналогичные зарубежные разработки в данной области науки.



Рис. 1. Саузерн блот гибридизация ДНК 10 форм *Boechea* из голландской и немецкой коллекций с маркером SCAR_Isaak_230

Примечание: Apo_Isaak_1.2 kb фрагменты указаны на блот паттерне; молекулярный размер дан в тысячах пар оснований (kb).

Выводы

1. Методом Саузерн гибридизации ДНК апомиктических и амфимиктических растений рода *Boecheera* из голландской и немецкой коллекций с пробой № 4 (SCAR_Isaak_230) детектирован геномный фрагмент Apo_Isaak_1.2 размером около 1.2 kb, общий для европейских апомиктических растений *Boecheera holboellii*.

2. Apo_Isaak_1.2 фрагмент близок по размеру к среднестатистическим растительным генам (2–4 kb), а также характеризуется гемизиготностью, как и исходный SCAR_Isaak_230 маркер.

3. Пробы № 1, 2 и 3 (на основе SCAR_Cin маркеров апомиксиса) были не эффективны при Саузерн анализе.

4. Полученные результаты могут быть применены в генетическом конструировании апомиксиса для создания гетерозисных форм и сложных полиплоидов сельскохозяйственных растений.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (гранты № 11-04-97039 р_поволжье_а, № 13-04-01404-а и 14-04-97089 р_поволжье_а).

Литература

1. Gerashchenkov G., Rozhnova N. Genetic Control of Gametophytic Apomixis: Current Status of Knowledge // Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. – 2004. – Section B. – 58. – P. 167–174.
2. Ozias-Akins P., van Dijk P.J. Mendelian Genetics of Apomixis in Plants // Annu. Rev. Genet. – 2007. – 41. – P. 509–537.
3. Barcaccia G, Albertini E. Apomixis in plant reproduction: a novel perspective on an old dilemma // Plant Reprod. – 2013. DOI 10.1007/s0497-013-0222-y
4. Gerashchenkov G., Rozhnova N., Gorbunova V., Timirkaeva A. The analysis of hormonal levels in top leaves and flower buds of the *Boecheera* accessions with asexual (apomictic) and sexual (amphimictic) reproduction // Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. – 2007. – Section B. – 61, N 6. – P. 1–7.
5. Green M.R., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition): Three-volume set // Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 2012. – P. 2028.
6. Геращенко Г.А., Рожнова Н.А. Мобильные генетические элементы в эволюции пола у растений // Генетика. – 2010. – 46. – С. 1445–1457.
7. Геращенко Г.А., Рожнова Н.А. Участие фитогормонов в регуляции пола у растений // Физиология растений. – 2013. – 60. – С. 634–648.

GERASHCHENKOV G.A., ROZHNOVA N.A.

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Research Center, Russian Academy of Sciences, Russia, 45005, Ufa, prospekt Oktyabrya, 71, e-mail: apomixis@anrb.ru

DETECTION OF HEMIZYGIOUS GENOME FRAGMENT AT FORMS OF *BOECHERA HOLBOELLII* (BRASSICACEAE FAMILY) WITH SEEDS-WITHOUT-SEX REPRODUCTION

Aims. Apomixis is the clonal reproduction of floral plants by seeds without both meiosis and fertilization. Apomixis has great biotechnological benefits in excess of the gain from the “green revolution” Norman Borlaug. Nevertheless the genetic control of apomixis is not clear and speculative till now. The goal of the work was to detect genome loci associated with apomixis. **Methods.** Whole genome amplification and Southern hybridization were used to detect hemizygous genome fragment associated with apomictic reproduction of *Boecheera holboellii*. **Results.** The generated molecular markers were used as the hybridization probes. Apo_Isaak_1.2 genomic fragment about 1.2 kb, common to European apomictic plants *Boecheera holboellii* was detected by means of Southern hybridization of apomictic and amphimictic plants DNAs from Dutch and German collections with the probe 4 (SCAR_Isaak_230). **Conclusions.** Apo_Isaak_1.2 fragment has the molecular size close to is similar in size to the mean plant genes (2–4 kb) and is the hemizygous fragment as the original SCAR_Isaak_230 marker. Our results can be used in genetic engineering of apomixis to create complex forms and heterosis polyploid crops.

Key words: amphimixis, apomixis, *Boecheera* sp., Southern hybridization, hemizygous.