

произрастающих в регионах Prayon (а) и St.Felix (б).

Попытки получить регенеранты из листовых эксплантов были до сих пор неудачны. Большая часть эксплантов гибнет в течение первых двух недель. Каллусы, которые формируются у оставшихся эксплантов, не способны к дальнейшему росту и развитию.

В ближайшее время планируется детальное изучение растений регенерантов, у которых снижена экспрессия целевого гена МТЗ.

ПЕРСПЕКТИВЫ

Изучение процессов, регулирующих концентрации тяжелых металлов у растений, важно не только для понимания фундаментальных явлений, но и для практического применения. Например, увеличив накопление токсичных металлов в наземной части растений, можно очищать почвы. А также можно создавать растения, способные расти на загрязненных почвах.

Литература

1. Hanikenne M, Talke IN, Haydon MJ, Lanz C, Nolte A, Motte P, Kroymann J, Weigel D, Krämer U. Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4 // Nature. 2008. V. 15. P.391-405
2. Valvekens D, Montagu MV, Lijsebettens MV. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Arabidopsis thaliana root explants by using kanamycin selection. // Proc Natl Acad Sci U S A. 1988. V. 85(15). P. 5536-5540.
3. Vera-Estrella R. , Miranda-Vergara M. C., Barkla B. J.. Zinc tolerance and accumulation in stable cell suspension cultures and in vitro regenerated plants of the emerging model plant *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae) // Planta. 2009. V. 229. P. 977–986
4. Verbruggen N., Hermans C. and Schat H.. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants // *New Phytologist* (2009) V. 181. P.759–776

КОМАХИН Р.А., КОМАХИНА В.В., МИЛЮКОВА Н.А., ТРАЧУК Л.А., ЖУЧЕНКО А.А.*

ГНУ ВНИИ Сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН,

Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д.42, e-mail: recombination@iab.ac.ru

*Российская академия сельскохозяйственных наук,

Россия, 117218, г. Москва, ГСП-7, г. Москва, ул. Кржижановского, дом 15, корпус 2.,

e-mail: plant@pochta.ru

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕЙОТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН *NLS-recA-licBM3*

Рекомбинация – фундаментальный процесс, который наравне с репликацией и репарацией, необходим для метаболизма ДНК у про- и эукариот. В клетках существуют несколько ферментативных систем обеспечивающих различные пути рекомбинации ДНК. Одним из них является гомологичная генетическая рекомбинация (ГР), механизм функционирования которой основан на репарации двунитевых разрывов ДНК с использованием в качестве матрицы гомологичной молекулы ДНК. У прокариот и в соматических клетках эукариот ГР необходима для нормальной репликации и перезапуска поврежденных репликативных вилок (Сох, 2001).

В мейозе у эукариот ферменты ГР, интегрированные в структуры синаптонемного комплекса в виде рекомбинационных узелков, необходимы для правильной сегрегации хромосом и создания новых гаплотипов (Grelon et al., 2001; Богданов, Коломиец, 2007). Наряду с кроссинговером мейотическая рекомбинация

обеспечивается «перетасовкой» отдельных хромосом. Кроссинговер и «перетасовка» хромосом – главные генераторы образования преобладающей части адаптивно значимых генотипов в расщепляющихся поколениях у высших эукариот (Жученко, 2001). Практически все сорта сельскохозяйственных растений и породы животных, а также значительная часть полезных штаммов микроорганизмов созданы с использованием мейотической рекомбинации.

Однако известно, что в профазе I мейоза распределение кроссоверных событий между гомологичными хромосомами неслучайно и носит неравномерный характер, сохраняя недоступные для кроссинговера зоны. Между тем включение в кроссоверный обмен выше названных «молчащих» участков может повысить эффективность селекционных методов за счет изменения частоты рекомбинации между сцепленными генами. Последнее обстоятельство особенно важно при интрогрессивной гибридизации, ставящей своей целью перенос генов хозяйственно-ценных признаков из генома дикорастущих видов в геном культурных растений.

В нашей лаборатории для изучения и индукции частоты мейотической рекомбинации в растительных клетках было предложено использовать стратегию, заключающуюся в создании трансгенных растений конститутивно экспрессирующих гены, белковые продукты которых участвуют в рекомбинации. В качестве модельного гена было предложено использовать *recA* из *Escherichia coli* (Комахин и др., 2005; Комахин и др., 2007). Основанием для этого послужило то, что бактериальный белок RecA на 40-60 % гомологичен эукариотическим рекомбиназам Rad51, но в отличие от них универсален, т.е. способен выполнять разные и даже уникальные функции без участия белков-паралогов и с большей эффективностью (Ланцов, 2007). Для определения экспрессии гена *recA* в качестве репортера использовалась термостабильная лихеназа *licBM3*, поскольку ранее показано, что в составе гибридного белка RecA-LicBM3 белок RecA может связываться с одонитевой ДНК и защищать ее от действия нуклеазы S1, а лихеназа сохраняет термостабильность и активность (Комахин и др., 2005). Для направления белкового продукта RecA-LicBM3 в ядро растительной клетки использован сигнал ядерной локализации NLS (Комахин и др., 2007). Для трансформации растений создан агробактериальный штамм, содержащий растительный экспрессионный вектор, в котором ген *NLS-recA-licBM3* находится под контролем сильного конститутивного промотора 35S вируса мозаики цветной капусты (Комахин и др., 2007).

Основной целью данной работы было получение и изучение первичных трансформантов и гибридов F₁ томата, экспрессирующих ген *NLS-recA-licBM3*.

Материалы и методы

Вектор pBI *NLS-recA-licBM3*, содержащий ген *NLS-recA-licBM3* под контролем промотора 35S ВМЦК и агробактериальный штамм для трансформации растений, созданы нами ранее (Комахин и др., 2007).

Трансформацию растений томата сорта Марглоб проводили согласно опубликованным ранее данным (Sung Hun Park et al., 2003; Корнеева и др., 2005).

Репортерная система на основе термостабильной лихеназы из *Clostridium thermocellum* предоставлена профессором Э.С. Пирузян (ИОГен РАН). Определение активности лихеназы с помощью метода энзимограмм и чашечного теста проводилось согласно опубликованным ранее данным (Комахин и др., 2005).

Молекулярно-биологический анализ проводили с использованием полимеразной цепной реакции и разработанных нами праймеров на ген *virE2* (GeneID:1224338) и на область *NLS-recA* гибридного гена *NLS-recA-licBM3*. Температура отжига праймеров («Синтол», Россия) 58°C, количество циклов 35. Для определения размеров продуктов ПЦР использован маркер GeneRuler™ 1000 п.н.+ ДНК-маркер («Fermentas», Литва).

Результаты и обсуждение

Первой задачей данной работы было проведение агробактериальной трансформации растений томата, получение каллуса и регенерантов, устойчивых к селективному агенту – канамицину. В качестве экплантов использовали семядоли 10-14 дневных проростков томата. Кокультивацию растительных экплантов с агробактериями, содержащими растительный экспрессионный вектор с геном *NLS-recA-licBM3*, проводили газонным методом при 20°C в темноте. Для элиминации агробактерии после кокультивации использовали тиментин в концентрации 150-300 мг/л. Получение каллуса, регенерацию побегов и их селекцию на канамицине проводили согласно опубликованным ранее работам (Sung Hun Park et al., 2003; Корнеева и др., 2005). В результате было получено 35 независимых регенерантов томата, устойчивых к канамицину в концентрации 100 мг/л.

Отбор регенерантов с помощью только селективного агента не гарантирует, что все полученные растения будут содержать целевой ген. Поэтому с помощью ПЦР был проведен молекулярно-биологический анализ ДНК, выделенной из регенерантов. Первоначально с помощью праймеров на агробактериальный ген *virE2* установлено отсутствие агробактериальной ДНК в образцах, поскольку агробактерии могут быть источником контаминации при анализе генома регенерантов растений на наличие целевого гена (рис. 1А).

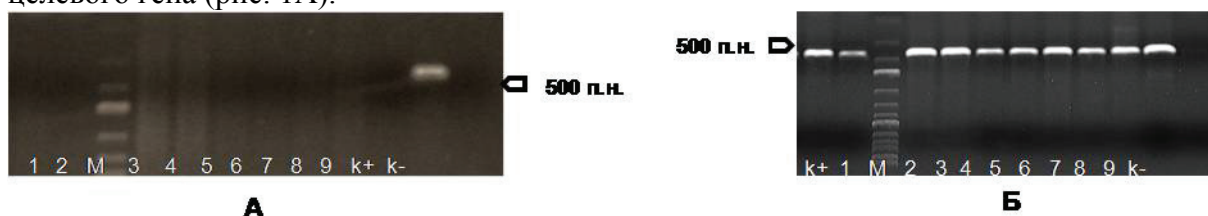


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных с использованием ДНК, выделенной из регенерантов растений томата популяции *NLS-recA-licBM3* (1-9). А – реакция с праймерами на ген *virE2* (к+ – ДНК из *A. tumefaciens*, к- вода); Б – реакция на ген *NLS-recA* (к+ – рВI *NLS-recA-licBM3*). М – маркер.

Затем с помощью ПЦР было показано наличие в геноме регенерантов томата гибридных участков *NLS-recA* целевого гена *NLS-recA-licBM3* (рис. 1 Б).

Однако необходимо, чтобы трансген не только содержался в геноме растений, но и экспресировался. Ранее для отбора бактериальных трансформантов, экспрессирующих ген *NLS-recA-licBM3*, были использованы методы чашечного теста и энзимограмм (Комахин и др., 2007). Этот же подход мы применили и для тестирования регенерантов томата. Активность термостабильной лихеназы – просветленные пятна вокруг лунок - была выявлена у всех регенерантов (рис. 2).

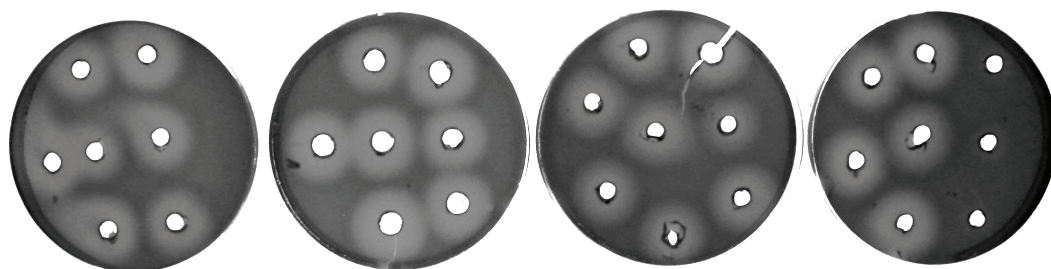


Рис. 2. Чашечный тест некоторых трансформантов томата популяции *NLS-recA-licBM3*; три правых лунки – отрицательный контроль (нетрансгенное растение).

Активность лихеназы в листьях регенерантов только косвенно свидетельствует о биосинтезе в них белка *NLS-RecA-LicBM3*, поскольку метод чашечного теста не позволяет идентифицировать гибридные белки в совокупности растительных. Поэтому белковые экстракты из регенерантов томата были также проанализированы методом энзимограмм (рис. 3).

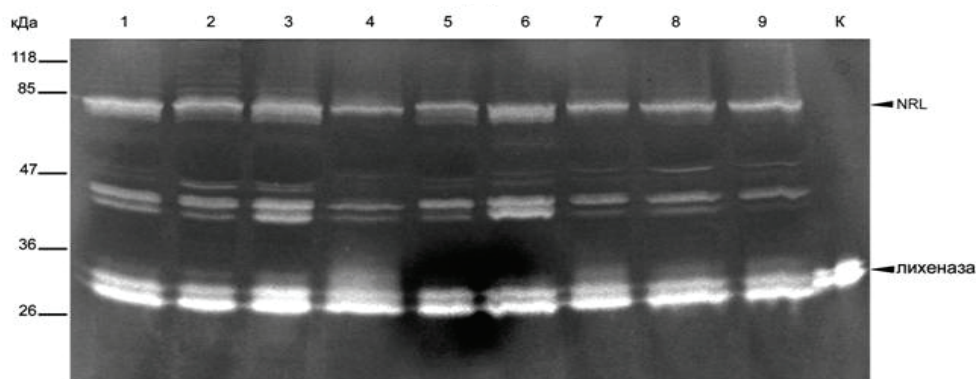


Рис. 3. Энзимограмма водорастворимой фракции белков из листьев некоторых регенерантов томата. NRL - гибридный белок NLS-RecA-LicBM3; К – лихеназа LicBM3; 1-9 – регенеранты томата популяции *NLS-recA-licBM3*.

Как видно из представленных результатов в клетках регенерантов происходит образование гибридных белковых продуктов с молекулярной массой, соответствующей теоретически рассчитанной - 67 кДа (рис. 3). Полосы с более низкой молекулярной массой, чем у полноразмерных рекомбинантных белков, обнаруженные методом энзимограмм, очевидно, являются результатом ограниченного протеолиза.

Таким образом, получены первичные трансформанты растений томата, содержащие и экспрессирующие целевой ген *NLS-recA-licBM3*, которые по маркерным признакам, форме и окраске листа не отличались от исходного сорта Марглоб. Отобранные растения были адаптированы и высажены в почву в условиях защищенного грунта для изучения и получения гибридов.

За время вегетации растения томата популяции *NLS-recA-licBM3* формировали меньшее количество более длинных междоузлий и в целом, имели более короткий стебель, зацветали и завязывали плоды на 15-25 дней раньше контроля. При анализе фертильности пыльцы установлено, что среднее ее значение в популяциях первичных трансформантов томата 81.42 ± 8.0 %. С помощью дисперсионного анализа показано, что различия в фертильности пыльцы у разных растений неслучайны, и скорее всего, являются следствием интеграция Т-ДНК в различные области генома, или же возможно действием соматоклональной либо модификационной изменчивости. В любом случае уровень фертильности пыльцы был достаточным для проведения скрещиваний и получения гибридов F_1 .

Большинство семян гибридов F_1 проросли и были высажены в почву. С помощью чашечного теста установлено, что у некоторых гибридов F_1 в белковых экстрактах тестируется лихеназная активность.

В настоящее время продолжают исследования по изучению мейотического деления в пыльниках бутонов гибридов F_1 и получение гибридов F_2 для сравнительного изучения частоты мейотического кроссинговера (rf).

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 08-04-13596-офи_ц.

Литература

1. Богданов Ю.Ф., Коломиец О.Л. Синаптонемный комплекс – индикатор динамики мейоза и изменчивости хромосом. – Москва.- 2007.-358с.
2. Жученко А.А. Адаптивная система селекции растений (эколого-генетические основы).- Москва.- 2001.- Т. 1.- 779с.
3. Комахин Р.А., Абдеева И.А., Салехи Джузани Г.Р., Голденкова И.В., Жученко А.А. Термостабильная лихеназа как трансляционный репортер // Генетика.- 2005.- Т. 41, № 1. С. 31-39.

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 F₁, экспрессирующие ген *NLS-recA-licBM3*. В настоящее время проводятся исследование мейоза у растений F₁ и получение гибридов F₂ для изучения rf и распределения участков кроссинговера.

For studying of meiotic recombination we have constructed transgenic tomato plants and hybrid F₁ which are expressing gene *NLS-recA-licBM3*. At present are conducted research meiosis at plants F₁ and creation of hybrids F₂ for studying rf and distribution sites of crossing over.

МАЙДАНЮК Д.Н.^{1,2}, АНДРЕЕВ И.О.¹, СПИРИДОНОВА Е.В.¹, КУНАХ В.А.¹

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

²Луганский 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