

Розроблено підхід у виявленні ретротранспозонів у бузку звичайному. При використанні даного підходу виявлено два різних ретротранспозона у бузку. Отримані послідовності частини кожного транспозона.

An approach to the detection of retrotransposons of common lilac was proposed. Two different retrotransposons of the lilac were found with using of this approach. Partial sequences of each retrotransposon were obtained.

**ВИНИЧЕНКО Н.А., КИРИКОВИЧ С.С., ЛЕВИТЕС Е.В.**

*Институт цитологии и генетики СО РАН,*

*Россия, 630090, Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 10, e-mail: levites@bionet.nsc.ru*

### **ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ ЭПИМУТАГЕНОМ «ТРИТОН X-100» НА ОРГАНИЗАЦИЮ ЛОКУСА *Adh1* САХАРНОЙ СВЕКЛЫ,**

Ранее нами была предложена модификация метода ISSR-амплификации (inter-simple sequence repeat, «между повторяющихся простых последовательностей») [1-3]. В отличие от базового метода, основанного на применении в индивидуальном эксперименте одиночного микросателлитного праймера для ПЦР [1], модифицированный метод предполагает использование микросателлитного праймера в паре с праймером, специфичным к целевому локусу. Это позволяет увеличить специфичность и упростить структуру получаемых ПЦР-профилей [2, 3].

Используя модифицированный метод ISSR-амплификации при изучении ДНК листьев агамоспермных потомков гетерозиготных растений сахарной свеклы, мы обнаружили полиморфизм ПЦР-профилей локуса *Adh1*, контролирующего фермент алкогольдегидрогеназа (ADH). Родительское растение, имеющее в геноме один *F* и один *S* аллель локуса *Adh1*, дало потомство, в котором обнаружилось четыре типа ПЦР-профилей *F*-аллеля и два типа ПЦР-профилей *S*-аллеля. Изоферментные спектры гетерозигот различались между собой по относительной активности аллельных изоформ и, следовательно, по уровню экспрессии аллелей *Adh1-F* и *Adh1-S* [2-4].

В ходе последующих исследований нами были выявлены тканевые различия ПЦР-профилей локуса *Adh1* у сахарной свеклы. Обнаружилось отсутствие разнообразия ПЦР-профилей, полученных на корневой ДНК родственных растений, тогда как соответствующие ПЦР-профили, полученные на ДНК листьев, отличались [5]. Выявленные различия ПЦР-профилей локуса *Adh1* разных тканей свидетельствует о тканевых различиях организации хромосом. Выявление этих различий говорит в пользу гипотезы о многомерности кодирования наследственной информации у растений [6, 7]. В основе этой гипотезы лежит предположение о дифференциальной эндоредупликации различных районов хромосомы. Известно, что дифференцировка тканей растения сопровождается эндоредупликацией хромосом [8]. Можно предположить, что полиморфизм ПЦР-профилей обусловлен разной степенью эндоредупликации района хромосомы, несущего локус *Adh1*, у исследуемых растений. Поскольку важную роль в структурно-функциональной организации генома играет взаимодействие хромосом с ядерной мембраной и ядерным матриксом, не исключено, что степень эндоредупликации хромосом или их отдельных участков может, так или иначе, зависеть от контакта с ядерной мембраной. Поэтому нарушение такого взаимодействия может сказаться как на степени эндоредупликации, так и на характере получаемых ПЦР-профилей исследуемого района хромосомы. Проверке этого предположения посвящена данная работа. Для нарушения связи хромосом с ядерной мембраной взят детергент Тритон X-100. В связи с этим проведено сравнение ПЦР-профилей, получаемых на матрице ДНК контрольных и обработанных Тритоном X-100 растений.

## Материалы и методы

**Растительный материал.** Для исследования были взяты листья растений сахарной свеклы, выращенных из гибридных семян, полученных от скрещивания двух растений, различающихся по локусу *Adh1*. Материнское растение было гетерозиготным и имело генотип *Adh1-F/Adh1-S*, а отцовское растение имело генотип *Adh1-F/Adh1-F*.

**Обработка прорастающих семян Тритоном X-100.** Сухие семена сахарной свеклы замачивали в 0.1% растворе Тритона X-100 в течение 22 часов в термостате при 29 градусах Цельсия, затем отмывали водой от Тритона X-100, проращивали в термостате и высаживали в гидропонную теплицу, где растения выращивали при искусственном освещении и минеральном питании по Кноппу.

**Электрофоретическое разделение изоферментов.** Определение фенотипов растений по ферменту алкогольдегидрогеназа проводили после его предварительной индукции, осуществляемой полным погружением срезанных листьев в воду при комнатной температуре на 24 часа. Экстракцию АДН после индукции осуществляли, растирая высечки листьев в ступке при 4<sup>0</sup>С в 0.2 V экстракционной смеси, представляющей собой 0.1М трис-НСl (рН 8.3), 0.3% динатриевой соли ЭДТА, 3.6% сахарозы и 0.3% дитиотрейтола. Электрофорез в крахмальном геле и окрашивание электрофореграмм проводили по методам, описанным ранее [9, 10].

**Выделение ДНК, ПЦР-амплификация.** Суммарную ДНК растений выделяли из 200 мг свежих листьев или корней стандартным СТАВ-методом [11]. Для проведения ПЦР-амплификации была использована следующая пара праймеров: *Adh1r* (5'-act(ct)acagca-ag(ct)cc-(ct)ac(ct)g-ctcc-3'), специфичный к локусу *Adh1*, и микросателлитный *Mic2* (5'-gacag-acaga-cagac-a-3'). ПЦР-реакцию проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10-200 нг суммарной ДНК, 65 мМ трис-НСl (рН 8.0), 16 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05% твин-20, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.2 мМ каждого из dNTP, 1мкМ каждого праймера, 2.5 ед. акт. *Taq*-полимеразы. Был использован следующий температурный режим: Предварительная денатурация – 94<sup>0</sup> С (4 мин.). Далее 30 циклов - 94<sup>0</sup> С (1 мин.), 52<sup>0</sup> С (42 сек.), 72<sup>0</sup> С (4 мин.). Последний цикл – 72<sup>0</sup> С (7 мин.). Продукты амплификации разделяли в 5% полиакриламидном геле (0.5xTBE буфер) и окрашивали бромистым этидием.

## Результаты и обсуждение

Методом электрофореза было установлено, что полученное потомство представлено двумя фенотипическими классами АДН1-FF и АДН1-FS.

Для проведения ПЦР нами был использован микросателлитный праймер *Mic2* в паре со специфичным к локусу *Adh1* праймером *Adh1r*, ориентация которого позволяет анализировать 5'-область гена алкогольдегидрогеназы. Как в контрольных, так и в опытных растениях выявлен полиморфизм ПЦР-профилей локуса *Adh1*. Однако какой-либо корреляции между АДН-фенотипами и ПЦР-профилями в настоящее время пока не установлено. В то же время сравнение ПЦР-профилей у контрольных и обработанных Тритоном X-100 растений выявило четкие различия.

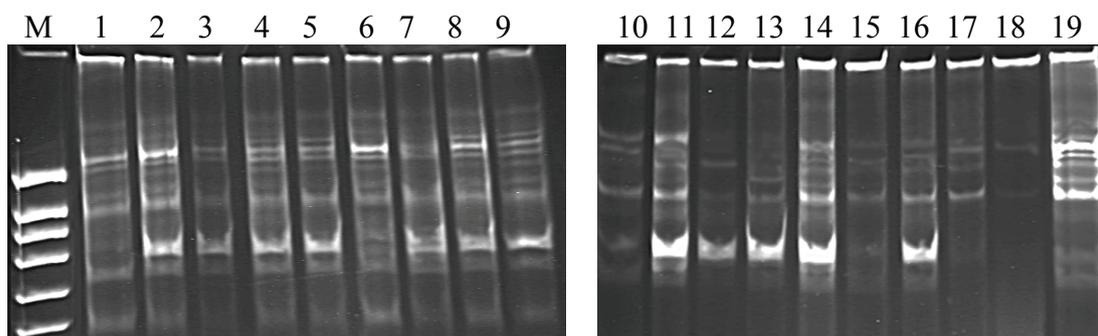


Рис 1. ПЦР-профили, полученные на матрице ДНК контрольных растений (1-9 дорожки) и растений, обработанных Тритоном X-100 (10-19 дорожки). М – маркер молекулярного веса ДНК pBlueScript/MspI.

На электрофореграммах видно, что на ПЦР-профилях обработанных детергентом растений количество полос меньше, чем на ПЦР-профилях контрольных растений, причем это уменьшение происходит, в основном, за счет более высокомолекулярных фрагментов ДНК. Воздействие Тритона X-100 проявилось не у всех растений, однако изменение ПЦР-профилей у других растений под влиянием детергента подтверждает известные данные о том, что контакт хромосом с ядерной мембраной играет существенную роль в организации генома у эукариот. В предыдущих исследованиях нами был выявлен полиморфизм ПЦР-профилей в листьях растений, имеющих одинаковый фенотип по ферменту АДН, а также был выявлен тканевой полиморфизм ПЦР-профилей в пределах одного и того же растения. Нами было выдвинуто предположение о том, что эти различия обусловлены разным уровнем эндоредупликации района, содержащего локус *Adh1*. Реакция ПЦР-профилей на воздействие Тритона X-100 позволяет предположить, что существует связь между уровнем эндоредупликации участков хромосом и контактом этих участков с ядерной мембраной и ядерным матриксом. В то же время необходимо отметить, что с момента воздействия Тритоном X-100 на семена до анализа ПЦР-профилей в листьях растений прошло длительное время и, соответственно, большое число клеточных делений. Отсюда можно заключить, что изменения, вызванные Тритоном X-100 в ядерной мембране и, по-видимому, в хромосомах сохраняются в ряду клеточных поколений. Это позволяет рассматривать Тритон X-100 как эпимутаген.

#### **Выводы**

Обработка прорастающих семян Тритоном X-100 приводит к изменению ПЦР-профилей у опытных растений по сравнению с контрольными растениями. Это свидетельствует о зависимости организации локуса *Adh1* сахарной свеклы от взаимодействия хромосом с ядерной мембраной и ядерным матриксом.

*Работа финансировалась грантом № 99 по интеграционному проекту СО РАН 2009-2011 гг. «Индукция эпигенетических изменений как новый эффективный метод создания исходных селекционных форм растений».*

#### **Литература**

1. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // *Genomics*. -1994. -№ 20. - P. 176-183.
2. Виниченко Н.А., Кирикович С.С., Левитес Е.В. Модификация метода ISSR - амплификации для изучения изменчивости аллелей локуса *Adh1* в агамоспермном потомстве сахарной свеклы // *Фактори експериментальної еволюції організмів (Збірник наукових праць)*. - Київ: «Логос». - 2006. - т. 3. - С. 80-84.
3. Vinichenko N.A., Kirikovich S.S., Levites E.V. The genetic instability of the *Adh1* locus alleles in sugar beet agamosperous progeny // *Sugar Tech*. - 2006. - vol. 8, № 4. - P. 288-291.
4. Виниченко Н.А., Кирикович С.С., Левитес Е.В. Полиморфизм ПЦР-профилей и экспрессии аллелей локуса *Adh1* в агамоспермных потомствах сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // *Генетика*. - 2008. – т. 44, № 9. - С. 1252-1256.
5. Виниченко Н.А., Кирикович С.С., Левитес Е.В. Тканевые различия в организации локуса *Adh1* сахарной свеклы // *Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології (Збірник наукових праць)*. - Київ: «Логос». - 2007. -т. 2. - С. 247-251.
6. Levites E.V. Sugarbeet plants produced by agamospermy as a model for studying genome structure and function in higher plants // *Sugar Tech*. - 2005. - vol. 7, № 2-3. - P. 67–70.

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. 1431-1433.
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.

<sup>1</sup>ГЕРАЩЕНКОВ Г.А., <sup>2</sup>ЭЛЬКОНИН Л.А., <sup>3</sup>ГОРБУНОВА В.Ю.

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики УНЦ РАН,

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

<sup>2</sup>ГНУ НИИ сельского хозяйства Юго-Востока Россельхозакадемии,

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

<sup>3</sup>ГОУ 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.