

7. Гулько Т.П., Ковальчук М.В. Изучение некоторых физиологических и молекулярно-генетических свойств мышей, предрасположенным к спонтанным новообразованиям // Матер. міжнар. конф.: “Фактори експериментальної еволюції організмів”. Т.7.— 2009.— Київ.— С. 330–336.

Резюме

Показана можливість використання варіабельного мікросателіту гена *Eb* класу II H2 комплексу для диференціації гаплотипів та селекції гомозиготних і гетерозиготних мишей. За допомогою ПЛР ампліфікації було оптимізовано відбір тварин для досліду та перевірено чистоту використаних ліній мишей.

Показана возможность использования вариабельного микросателлита гена *Eb* класса II H2 комплекса для дифференциации гаплотипов и селекции гомозиготных и гетерозиготных мышей. С помощью ПЦР амплификации был оптимизирован подбор животных в опытах и проверена чистота используемых линий мышей.

A rapid screening method for discrimination of different MHC haplotypes, homozygous and heterozygous mice with using microsatellite in the class II *Eb* gene was shown. Appropriate animals could be selected by PCR genotyping. This method was properly used for verification of mice inbred strains pure.

КОМАХИН Р.А., КОМАХИНА В.В., МИЛЮКОВА Н.А., ФАДИНА О.А., КИНАШ Е.А., ЖУЧЕНКО А.А.*

*ГНУ ВНИИ Сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН,
Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д.42,
e-mail: recombination@iab.ac.ru*

**Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,
Россия, 119991, г. Москва, ул. Губкина, д.3, ГСП 1*

ГИБРИДЫ ТОМАТА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ГЕНЫ *recA* И *NLS-recA-licBM3*, КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕЙОТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ У РАСТЕНИЙ

Гомологичная генетическая рекомбинация в клетках про- и эукариот необходима, прежде всего, для поддержания стабильности и целостности генома. Функционирование гомологичной рекомбинации основано на репарации двухцепочечных разрывов ДНК, которая является элементарным биологическим механизмом, обеспечивающим нормальную работу репликативных вилок (Cox et al., 2000). В мейозе гомологичная генетическая рекомбинация необходима для создания хиазм — крестообразных структур, которые физически удерживают гомологичные хромосомы, позволяя им правильно распределиться между дочерними клетками и обменяться гомологичными участками. Генетическая детерминированность кроссинговера при внутри-видовых скрещиваниях и нарушение сегрегации хромосом у отдаленных

гибридов, приводящее к их стерильности, существенно ограничивают интрогрессию генов и получение уникальных генотипов. Изменение рекомбинации между гомо- и гомеологичными хромосомами может повысить эффективность селекционных методов. Последнее обстоятельство особенно важно при интрогрессивной гибридизации, ставящей своей целью перенос генов хозяйственно-ценных признаков из хромосом дикорастущих видов в хромосомы культурных растений (Жученко, 2001).

В нашей лаборатории для индукции мейотической рекомбинации было предложено использовать трансгенные растения, экспрессирующие гетерологичные гены, белковые продукты которых участвуют в рекомбинации. Молекулярный процесс гомологичной рекомбинации требует поиска гомологии и обмена нитями между двумя молекулами ДНК. У эукариот основным фактором, способным в соматических клетках и в микроспорах осуществить оба этих процесса, является рекомбиназа Rad51 (Li et al., 2004). Однако белку Rad51 для эффективной работы требуется участие белков-паралогов. В тоже время, бактериальный белок RecA имеет от 40 до 60% гомологии с эукариотическими рекомбиназами, 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). Экспрессия гена *recA* *E. coli* в клетках растений табака в три раза повышала количество двухцепочечных разрывов ДНК, восстановленных по механизму гомологичной рекомбинации, и более чем в два раза увеличивала число сестринских хроматидных обменов (Reiss et al., 2000). Это позволило нам предположить, что экспрессия *recA* в клетках растений может в профазе мейоза также изменить число и распределение обменов между гомологичными или гомеологичными хромосомами.

В качестве растительного объекта были выбраны томаты, поскольку в нашей лаборатории имеется обширная коллекция различных форм. Инбредные линии томата, содержащие сцепленные фенотипические маркерные гены, могут быть использованы в гибридологических исследованиях для оценки частоты мейотической рекомбинации. Настоящая работа посвящена созданию и изучению трансгенных растений томата, экспрессирующих гены *recA* или *NLS-recA-licBM3*, с использованием которых можно достоверно оценить влияние бактериальных рекомбиназ на мейотическую гомологичную и гомеологичную рекомбинацию у растений.

Материалы и методы

В качестве растительных объектов использованы растения томата сорта Маргlobe и маркерной линии Mo938. Репортерный ген *licBM3*, кодирующий термостабильную лихеназу *C. thermocellum*, любезно предоставлен профессором Э.С. Пирузян (ИОГен РАН).

Результаты и обсуждение

Первичные трансформанты, экспрессирующие гены *recA* и *NLS-recA-licBM3*, полученные нами ранее при агробактериальной трансформации томата векторами 35S-*recA* и 35S-NLS-*recA-licBM3* (Комахин и др, 2007),

были обозначены как *RecA* и *NLS-RecA-LicBM3*, соответственно. Для дальнейших генетических исследований были отобраны независимые трансформанты, экспрессирующие целевые гены: десять растений *RecA* и семь — *NLS-RecA-LicBM3*. Первичные трансформанты томата не отличались по маркерным признакам, необходимым для изучения мейотической рекомбинации, а также форме и окраске листа, от исходного сорта Марглоб или линии Мо938. Однако, для всех трансформантов сорта Марглоб, экспрессирующих ген *NLS-recA-licBM3*, отмечено формирование меньшего количества междоузлий и, как следствие, более короткого стебля, а также раннее зацветание и завязывание плодов (на 10–15 дней), по сравнению с трансформантами популяции *RecA* и контрольными растениями. Схожие фенотипические отличия отмечены нами ранее у растений T_0 табака, экспрессирующих гены *NLS-recA*, *NLS-recA-licBM3* и *NLS-ruvC*. Можно предположить, что отмеченные фенотипические отличия у трансформантов томата популяции *NLS-RecA-LicBM3* являются результатом локализации в ядре этих растений белка *NLS-RecA-LicBM3*.

Трансгенные растения как модели для изучения и индукции мейотической рекомбинации должны не только экспрессировать целевые гены, но и не отличаться по фертильности пыльцы от исходных растений. Сравнительный анализ всех трансформантов и контрольных растений томата показал, что экспрессия генов *recA* или *NLS-recA-licBM3* не оказывает негативного влияния на фертильность пыльцы, поскольку в каждой популяции трансформантов отмечены растения, сравнимые по этому показателю с контрольными. Однако, у некоторых первичных трансформантов томата фертильность пыльцы была существенно ниже, чем у контрольных растений, что может быть обусловлено изменением функционирования собственных генов растений при интеграции Т-ДНК в функционально-активные участки генома.

Для изучения наследования целевых генов *recA* и *NLS-recA-licBM3* была проведена гибридизация. При этом первичные трансформанты томата, экспрессирующие *recA* и *NLS-recA-licBM3*, использовали в качестве материнских форм, поскольку их фертильность могла сказаться на эффективности гибридизации. В качестве отцовского родителя, при опылении трансформантов растений, полученных на основе сорта Марглоб, использовали контрольные растения линии Мо938, а при опылении трансформантов растений, полученных на основе линии Мо938 — контрольные растения сорта Марглоб. В результате гибридизации было получено 62 растения F_1 , обозначенные как F_1 -*RecA* или F_1 -*NLS-RecA-LicBM3*. Для изучения экспрессии и наследования целевых генов проводили анализ всех гибридов F_1 . Экспрессия гибридного гена *NLS-recA-licBM3* была определена методом чашечного теста (просветленные пятна вокруг лунок), который позволил выявить 16 растений томата (рис. 1).

Последующий ПЦР-анализ геномной ДНК гибридов F_1 -*NLS-RecA-LicBM3*, показал, что последовательность гена *NLS-recA-licBM3* выявлена



Рис. 1. Чашечный тест белковых экстрактов гибридов F_1 -NLS-RecA-LicBM3 томата. Гибриды томата: 1-24, 27, 30, 25 — вода. 26, 28 и 29 — контрольные растения

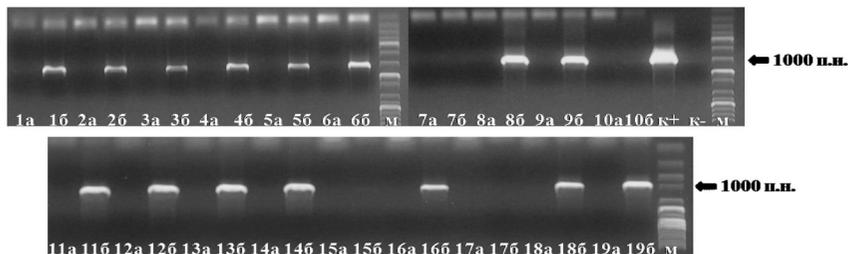


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации РНК (а) и кДНК (б) гибридов томата F_1 -RecA *recA*-специфичных праймеров. Гибриды томата, несущие ген *recA*: 1-19. М — маркер размера фрагментов ДНК. К⁻ — вода. К⁺ — положительный контроль

только у тех растений, у которых методом чашечного теста была выявлена активность репортерного белка лихеназы.

Анализ экспрессии гена *recA* у гибридов F_1 -RecA проводили методом ПЦР, используя геномную ДНК, РНК и кДНК в качестве матриц. В результате этого анализа отобрано 19 растений, большинство из которых по данным РТ-ПЦР экспрессировали нативный ген *recA* (рис. 2).

Отсутствие экспрессии целевого гена у некоторых гибридов F_1 -RecA дает основание предполагать наличие в геномах их родительских форм нескольких инсерций Т-ДНК, которые могли стать причиной замолкания *recA*. Однако среди потомства всех первичных трансформантов, за исключением растения F_1 -NLS-RecA-LicBM3 №7, отмечено расщепление по содержанию целевого гена 1:1, что свидетельствует об одной инсерции Т-ДНК в геноме растений T_0 (табл.).

Причиной отсутствия экспрессии целевого гена *recA* у гибридов F_1 -RecA, полученных от родительских форм T_0 №3, 5 и 7, может быть наличие нескольких сцепленных копий Т-ДНК, что приводит с одной стороны к наследованию их как одного локуса, а с другой к замолчанию у части потомков экспрессии целевого гена. В потомстве, полученном от трансформанта NLS-RecA-LicBM3 №7, не наблюдалось расщепления, у всех гибридов была обнаружена экспрессия целевого гена, что дает основание полагать о наличии двух и более несцепленных инсерций Т-ДНК в его геноме (табл.). Интересно,

Таблица

Анализ расщепления по целевым генам среди гибридов F₁ томата

№ растения T ₀	Целевой ген	Растений F ₁ , шт.		Расщепление		χ^2
		с ц. г.	без ц. г.	фактическое	ожидаемое	
1	recA	6	4	1 : 1	1,5 : 1	0,40
3		6	6		1 : 1	0
5		3	5		1 : 1,6	0,50
7		4	2		2 : 1	0,66
2	NLS-recA- licBM3	3	4		1 : 1,3	0,14
6		8	6		1,3 : 1	0,28
7		5	0		5 : 0	5,0

Для вероятности ошибки $pd \leq 0,05$ и $df = 1$ критическое значение $\chi^2 = 3,84$.

что потомки этого растения имели фенотипические отличия, такие как укороченный стебель, сокращенные сроки цветения и плодоношения, что косвенно подтверждает наше предположение о влиянии ядерной локализации белка NLS-RecA-LicBM3 на рост и развитие трансгенных растений.

Для того, чтобы избежать неправомερных выводов при изучении частоты мейотической рекомбинации с использованием трансгенных гибридов F₁ томата, необходимо выяснить действительно ли различия в фертильности пыльцы не связаны с экспрессией целевых генов *recA* и *NLS-recA-licBM3*? Для этого мы провели сравнительное изучение фертильности пыльцы у трансгенных и не трансгенных гибридов F₁.

Установлено, что у некоторых образцов популяции F₁-RecA фертильность пыльцы ниже, чем у стандарта. При этом пониженная фертильность пыльцы выявлена как среди трансгенных растений, экспрессирующих целевой ген, так и растений только содержащих, но не экспрессирующих его, а также у не трансгенных гибридов. В тоже время, часть растений, экспрессирующих ген *recA*, не отличается по этому показателю от контроля, а среди гибридов, популяции F₁-NLS-RecA-LicBM3 не отмечено достоверных отличий по фертильности пыльцы между трансгенными и не трансгенными растениями. Полученные результаты позволяют заключить, что различия в фертильности пыльцы между гибридами не зависят от экспрессии целевых генов *recA* или *NLS-recA-licBM3*, а, вероятно, определяются генотипом растений T₀, сформировавшимся в результате T-ДНК-инсерционного мутагенеза.

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

Литература

1. Жученко А.А. Адаптивная система селекции растений (эколого-генетические основы). Том I и II. М.: Агрорусс, 2001. с.780, с.1490.
2. 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. №3. с.25–32.

3. Ланцов В.А. Гомологическая ДНК-трансфераза RecA: функциональные активности и поиск гомологов рекомбинирующими ДНК. *Молекулярная биология*. 2007. Т.41. №3. с.467–477.

4. Cox M.M., Goodman M.F., Kreuzer K.N. et al. The importance of repairing stalled replication forks. *Nature*. 2000. V.404. P.37–41.

5. Li W.X., Chen C.B., Markmann-Mulisch U. et al. The Arabidopsis AtRAD51 gene is dispensable for vegetative development but required for meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004. V.101. P.10596–10601.

Резюме

Полученные экспериментальные данные позволяют заключить, что гены *recA* и *NLS-recA-licBM3* экспрессируются в растениях томата и не оказывают негативного влияния на формирование пыльцы. Гены *recA* и *NLS-recA-licBM3* стабильно наследуются через яйцеклетки. Гибриды F₁ томата, экспрессирующие гены *recA* и *NLS-recA-licBM3* могут быть использованы в качестве моделей для изучения мейотической рекомбинации.

The data we obtained allow making the conclusion that gene constructions *recA* and *NLS-recA-licBM3* are expressing in tomato plant and there are no negative effects on pollen fertility. Genes *recA* and *NLS-recA-licBM3* are inherited invariably through the egg cells. F₁ tomato plant with *recA* and *NLS-recA-licBM3* gene expression may be used in meiotic recombination researches.

МАЛЕЦКАЯ Е.И., ЮДАНОВА С.С.

Институт цитологии и генетики СО РАН; пр. Лаврентьева, 10, 630090, Новосибирск, Россия; e_mal@bionet.nsc.ru

СЕМЕННАЯ ПРОДУКТИВНОСТЬ ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ САХАРНОЙ СВЁКЛЫ (*BETA VULGARIS* L.) ПРИ АПОЗИГОТИЧЕСКОМ СПОСОБЕ РАЗМНОЖЕНИЯ

Для решения различных цитогенетических и селекционных задач на гаплоидию возлагают большие надежды: создание нового генетического материала, новых инбредных линий. Сахарная свекла (*Beta vulgaris* L.) — перекрестноопыляющееся растение, у которого самооплодотворение присуще лишь немногим растениям в популяциях, так как предотвращается системой генов самонесовместимости. Как показывают наблюдения многих авторов, самонесовместимые формы растений нередко склонны к гамоспермному способу семенной репродукции [1–3]. Учитывая это, можно заключить, что система репродукции семян у сахарной свеклы включает разные варианты репродукции семян: перекрестное оплодотворение, самооплодотворение и гамоспермию.

В процессе формирования семян при перекрестном оплодотворении участвуют оба родителя: материнский и отцовский. Поэтому получение семян путем перекрестного оплодотворения называют “двуродительским” или гамоспермным способом семенной репродукции. В отличие от гамосперм-