

МОЛЕКУЛЯРНО - ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПОВ КАЛЛУСОГЕНЕЗА *IN VITRO* У *BRYOPHYLLUM DAIGREMONTIANUM*

©2013 Г.А.Герашенков², С.Н. Абрамов¹, В.Ю. Горбунова¹, Н.А.Рожнова²,
А.В. Гильмаева¹

¹Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы, г. Уфа

²Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Поступила 15.06.2013

В данной работе рассмотрены особенности начальных этапов развития каллусов в культуре листовых эксплантов каланхоэ. Выполнен молекулярно-генетический анализ каллусогенеза на основе ключевых локусов клеточного цикла.

Ключевые слова: каланхоэ, морфогенез, каллусогенез, ДНК-маркеры.

Вивипария – это способ воспроизведения потомства, при котором из полового зародыша в семени либо из выводковой почки образуются проростки (пропагулы) на материнском организме без периода покоя [1]. Проблема вивипарии напрямую связана с феноменом функционирования ствольных клеток растений, молекулярные механизмы этого процесса далеки от понимания. Цель нашего исследования – создание коллекции молекулярно-генетических маркеров на начальных этапах морфогенеза при формировании пропагулы *Bryophyllum daigremontianum*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

РНК выделяли из меристематических и паренхимных клеток фенольно - детергентным методом. Пробойником диаметром 1-1,5 мм брали ткань как из меристематической зоны (М2 - стадия глобулярного зародыша), так и окружающей паренхимы (П2 - стадия глобулярного зародыша) и каллуса (К) [2]. В работе использовали амплификационный полиморфизм специфичных последовательностей, или АПСР-ПЦР (SSAP, Sequence-Specific Amplification Polymorphisms) [3]. Вкратце метод можно описать следующим образом. Геномная ДНК или кДНК разрезается на мелкие фрагменты эндонуклеазой рестрикции, которая преимущественно расщепляет ДНК за пределами якорной последовательности. Таким образом, происходит упрощение генома. ДНК фрагменты затем лигируются (пришиваются) к адапторам, и осуществляется ПЦР амплификация при использовании праймеров, соответствующих адаптеру и оконечности специфической якорной последовательности. Этот метод создает набор АПСР-ПЦР фрагментов, содержащих участки якорной последовательности вплоть до ближайшего рестрикционного сайта [3].

Предположение, лежащее в основе метода, заключается в том, что каждый специфический якорный элемент расположен на статистически различном расстоянии от сайта рестрикции и, как ожидается, создает уникальный размер АПСР-ПЦР фрагмента. Затем фрагменты фракционируют в агарозных или полиакриламидных гелях для получения АПСР-ПЦР профилей, которые могут быть использованы в оценке генетического полиморфизма. Очевидно АПСР-ПЦР является модификацией метода AFLP (полиморфизма длины амплификационных фрагментов).

Формирование адаптеров V20/dv12 для селективной амплификации осуществляли на основе олигонуклеотидов, представленных в таблице 1.

Таблица 1. Праймеры на основе адаптеров для SSAP анализа

№№	5' 5'-3' последовательность
1.	V V20 ctcgaacacaccgtctctctc
2.	D dv12 tagaggagacga
3.	V V23 ctcgaacacaccgtctctctctac
4.	V Vgcc ctcgaacacaccgtctctctctac-gcc
5.	V Vtac gaacacaccgtctctctctac-tac

В отличие от классического варианта AFLP, где используются анонимные праймеры, метод АПСР-ПЦР предполагает применение одного праймера на основе адаптера и второго локуса специфического праймера, комплементарного к изучаемому геномному локусу. Использованные праймеры на основе адаптера содержали по 3 селективных нуклеотида на 3' конце для улучшения специфичности АПСР-ПЦР, а именно праймеры Vgcc и Vtac (табл. 1).

В качестве локуса специфичных олигонуклеотидов использовали праймеры, комплементарные локусам, некоторые из которых вовлечены в работу клеточного цикла (табл. 2). Использованы 12 вариантов таких праймеров (табл. 2). Результаты АПСР-ПЦР представлены на рис. 1-4. Как следует из представленных рисунков, в большинстве случаев нам удалось детектировать полиморфизм экспрессионных спектров, демонстрирующих принципиальную возможность участия этих локусов в каллусогенезе у *B. daigremontianum*.

Герашенков Григорий Алексеевич, к.б.н., старший научный сотрудник, e-mail: aromixis@anrb.ru; Абрамов Сергей Николаевич, к.б.н., доц., e-mail: abramov-67@mail.ru; Горбунова Валентина Юрьевна, д.б.н., проф., e-mail: obg-bspu@mail.ru; Рожнова Наталья Анатольевна, к.б.н., научный сотрудник, e-mail: aromixis@anrb.ru; Гильмаева Алина Владиславовна, студент, e-mail: abramov-67@mail.ru

Таблица 2. Олигонуклеотиды для SSAP анализа

№	5'----3' последовательность	Фрагмент гена, аминокислотная последовательность
1	Grig2 tgc-cgc-tac-ccc-tac-ga	Протеинкиназа cdc25, IID-CRYPYE
2	Grig3 ggc-gaa-ggc-aca-tac-gg	Протеинкиназа cdc2, GEGTYG
3	Grig4 gcg-aga-tgg-tat-gaa-tgg	Протеинкиназа cdc5, SKAR-WYEW
4	Grig5 gac-ata-cac-ggg-caa-t	Щелочная фосфатаза PP1, CGDIHGQY
5	Grig6 act-gtg-tgt-ggc-gat-gt	Щелочная фосфатаза PPP1/2, V(1)TVCGDV
6	Grig7 gat-ggg-gac-gga-atg-gt	Ген вивипарии VP14, LFDGDGMV
7	CDKB2,1_F ATGGACGAGGGAGTTATAGCAGTTTC	CyclinB2
8	CDKB2,1_R TCAAAAACCAGGTACAGTACAGTTTTGCC	CyclinB2
9	CYCD4,2_F TCAGAATCCAAGCCCTTGGT	CyclinD4
10	CYCD4,2_R ACGGTGTCACTGCCCGTAAC	CyclinD4
11	TUB4_F CTCTGTGCATCAGCTTGTCGAAAACG	Tubulin
12	TUB4_R CCGAGGGAGCCATTGACAACATCTT	Tubulin

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 видно, что спектры амплификации кДНК каллуса отличаются от спектров кДНК M2 и P2 для локусов протеинкиназ cdc2 и cdc5, вовлеченных в функционирование клеточного цикла. В дорожке № 6 детектируются маркерные фрагменты около 250 п.о. и 350 п.о., а в дорожке № 9 - ампликоны около 280 п.о. и 320 п.о.

Как следует из рис. 2, спектры амплификации кДНК каллуса отличаются от спектров кДНК M2 и P2 для локуса щелочной фосфатазы PP1. В треке № 3 детектируется маркерный фрагмент около 500 п.о. (комбинация праймеров Grig5+Vtac).

Рис. 3 демонстрирует, что спектры амплификации кДНК каллуса отличаются от спектров кДНК M2 и P2 для генов циклинов В и D, вовлеченных в функционирование клеточного цикла. Так, в дорожке №3 можно отметить ампликон около 850 п.о. и в дорожке № 6 ампликон около 650 п.о. Оба маркера получены для гена циклина В. В дорожке № 9 виден фрагмент около 700 п.о., ассоциированный с

возможной экспрессионной активностью гены циклина D4.

На рис. 4 показано, что спектры амплификации кДНК каллуса отличаются от спектров кДНК M2 и P2 для генов циклина D и тубулина. Так, в треке № 3 виден фрагмент около 650 п.о. характеризующий активность гена циклина D. В дорожке № 6 можно отметить маркерный фрагмент около 300 п.о., а в дорожке № 9 - маркерный фрагмент около 350 п.о., характеризующие активность гена тубулина.

Можно предполагать, что полученные нами молекулярные АПСР-ПЦР маркеры ассоциированы с процессами морфогенеза, а именно каллусогенеза, в культуре *in vitro* у *B.daigremontianum*, и потому представляют интерес огромный научный интерес для понимания проблем специализации растительных клеток и тканей.

Выявленные маркеры предстоит фракционировать в полиакриламидном геле, клонировать и секвенировать.

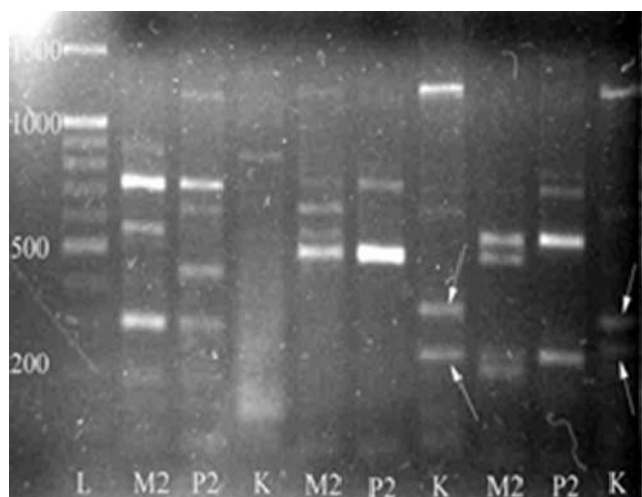


Рис. 1. Амплификационный полиморфизм специфических последовательностей, или АПСИ-ПЦР. (1) Праймеры Grig3+Vtac. Маркерные фрагменты около 250 и 350 п.о. (2) Праймеры Grig4+Vtac. Маркерные фрагменты около 280 и 320 п.о.

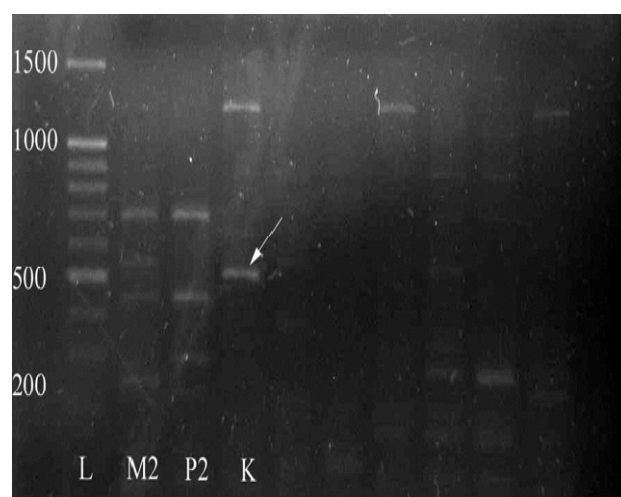


Рис. 2. Амплификационный полиморфизм специфических последовательностей, или АПСИ-ПЦР. Праймеры Grig5+Vtac. Маркерный фрагмент 500 п.о.

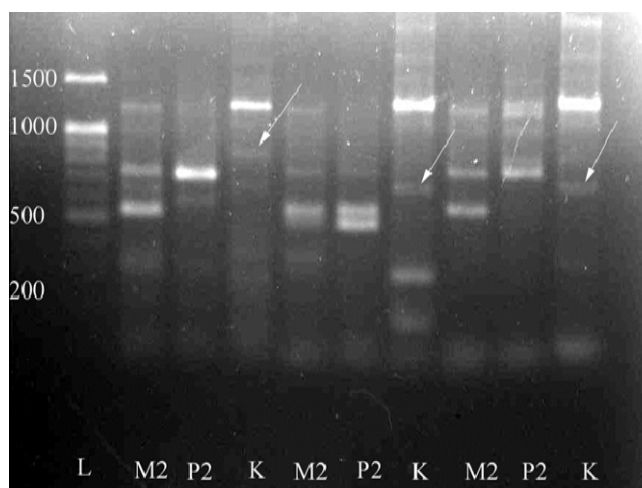


Рис. 3. Амплификационный полиморфизм специфических последовательностей, или АПСИ-ПЦР. (1) CYCD_R+Vtac Маркерный фрагмент около 850 п.о. (2) Праймеры CYCD_R+Vtac. Маркерный фрагмент около 650 п.о. (3) Праймеры CYCD_F+Vtac Маркерный фрагмент 700 п.о.

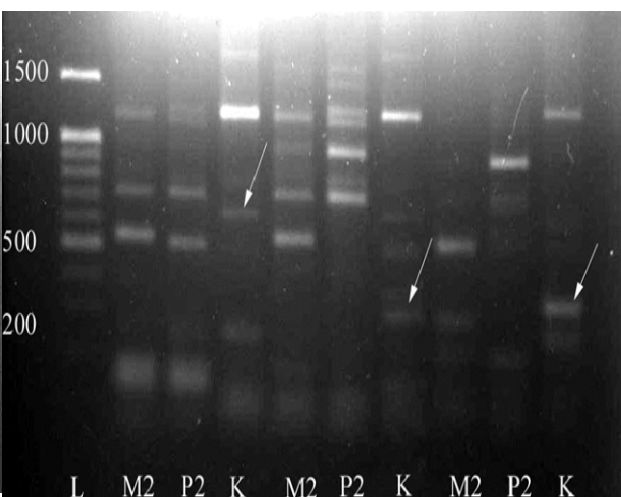


Рис. 4. Амплификационный полиморфизм специфических последовательностей, или АПСИ-ПЦР. (1) Праймеры CYCD_+Vtac Маркерный фрагмент около 650 п.о. (2) Праймеры TUB4_F+Vtac Маркерный фрагмент 300 п.о. (3) Праймеры TUB4_R+Vtac. Маркерный фрагмент около 350 п. о.

ВЫВОДЫ

У *B. daigremontianum* обнаружены специфические молекулярные маркеры на начальных этапах морфогенеза при формировании каллуса:

фрагменты около 250 п.о. и 350 п.о. на основе локуса протеинкиназы Cdc2;

фрагменты около 320 п.о. и 280 п.о. на основе локуса протеинкиназы Cdc5;

фрагмент около 500 п.о. на основе локуса щелочной фосфатазы PP1;

фрагменты около 850 п.о. на основе локуса циклина B2.1;

фрагмент около 700 п.о. на основе локуса циклина D4;

фрагмент около 300 п.о. на основе локуса тубу-

лина.

Очевидно, морфогенез *in vitro* и метод амплификационного полиморфизма специфических последовательностей (АПСИ-ПЦР) могут быть использованы в качестве биотехнологии нового поколения для снижения техногенной нагрузки на экосистемы при нетрадиционных системах размножения растений.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 11_04_97039 р_поволжье_а, № 13_04_01873 и № 13_04_01404).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Батыгина Т.Б., Брагина Е.А. Вивипария // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3 / Под ред. Т.Б. Батыгиной. СПб.: Мир и семья, 2000. С.39-42.
2. Геращенко Г.А., Постригань Б.Н., Бакирова А.В., Абрамов С.Н., Горбунова В.Ю. Скрининг молекулярных маркеров при вивипарии у *Bryophyllum daigremontianum* (Berger) // Мат. междунар. научно-практ. конф. «Роль классических университетов в формировании инновационной среды регионов». Уфа: БашГУ, 2009.
3. Waugh R., McLean K., Flavell A.J. et. al. Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (SSAP). // Mol. Gen. Genet. 1997. V. 253. P. 687-694.

MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF *BRYOPHYLLUM DAIGREMONTIANUM* AT THE INITIAL STAGES OF CALLUSOGENESIS *IN VITRO*

©2013 G.A. Gerashchenkov², S.N. Abramov¹, V.Y. Gorbunova¹, N.A. Rozhnova², A.V. Gilmaeva¹

¹Bashkir State Pedagogical University named M. Akmullah, Ufa

²Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Sci. Center of RAS, Ufa

This paper describes the features of the initial stages of callus culture in leaf explants of kalanchoe. Molecular genetic analysis of callus formation on the basis of key loci of the cell cycle is performed and results are discussed.

Key words: *kalanchoe*, *callusogenesis*, *morphogenesis*, *DNA markers*.

Grigory Gerashchenkov, Candidate of Biology, senior researcher, e-mail: apomixis@anrb.ru; Sergey Abramov, Candidate of Biology, assistant professor, e-mail: abramov-67@mail.ru; Valentina Gorbunova, professor, e-mail: obg-bspu@mail.ru; Natalia Rozhnova, Candidate of Biology, researcher, e-mail: apomixis@anrb.ru; Alina Gilmaeva, student, e-mail: abramov-67@mail.ru