

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ДЕПАРТАМЕНТ КАДРОВОЙ ПОЛИТИКИ И ОБРАЗОВАНИЯ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧЕРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
МОСКОВСКАЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ
имени К.А. ТИМИРЯЗЕВА**

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

на тему: *Введение в культуру in vitro и отработка прямой регенерации отдаленных гибридов томата*

Исполнитель: студент 507 группы

плодоовощного факультета

Высотский **Станислав Михайлович**

Руководитель: доцент **Соловьев А.А.**

Москва 2004

<http://yadyra.ru>

Содержание:

Содержание	2
Введение	2
I. Литературный обзор	3
1. Томат как модельный объект селекционно-генетических исследований	4
2. Механизмы генетической изменчивости	5
2.1 Мейоз и мейотическая рекомбинация	5
2.1.1 Генетический контроль мейотической рекомбинации	8
3. Пути повышения генетической изменчивости	11
3.1 Генетическая трансформация растений	11
3.2 Отдалённая гибридизация и её использование в селекции томата	15
3.3 Использование методов биотехнологии и генной инженерии для повышения эффективности отдалённой гибридизации	17
3.3.1 Проблемы культивирования <i>in vitro</i> и получения прямых регенерантов у томата	18
3.3.2 Особенности томата волосистого <i>L. hirsutum</i> и его использования в селекции культурного томата	20
II. Экспериментальная часть	24
2.1 Обоснование исследований	24
2.2 Цели и задачи	25
2.3. Исходный материал	26
2.4 Методы	29
2.5 Результаты и обсуждение	41
2.6 Выводы	52
Список использованной литературы	53

Введение

Культурный томат (*Lycopersicon esculentum*) является одной из наиболее ценных овощных культур. Он же используется в качестве удобной модели для генетических исследований хозяйственно ценных двудольных овощных культур [1].

Методика агробактериальной трансформации томата, как и других двудольных растений, по сей день остаётся неотработанной до конца. До сих пор не существует универсальной процедуры трансформации для различных культурных сортов в пределах одного вида. При этом наличие эффективной системы регенерации является, как правило, необходимым предварительным условием для генетической модификации конкретного растения.

Первые сообщения об успешных опытах по переносу чужеродных генов в томат появились ещё в 1986 году [2;3]. Однако сама методика далека от совершенства – большинство факторов, оказывающих влияние на эффективность трансформации, остаются до сих пор неизученными [4]. В настоящее время в литературе чётко просматривается большой интерес к поиску новых, более эффективных, надёжных, простых, быстрых и универсальных методов трансформации [5]. При этом следует иметь в виду, что, как правило, при генетической трансформации осуществляется перенос одиночных генов.

Другим методом, позволяющим передавать ценные признаки культурному виду, является отдалённая гибридизация. Однако процесс передачи хозяйственно ценных признаков из диких видов затрудняют барьеры нескрещиваемости и нежизнеспособность отдалённых гибридов. Если всё же удастся получить жизнеспособное потомство, то часто в поколении F_1 из-за пониженной частоты или полного отсутствия кроссинговера затруднено образование гамет с наиболее интересными комбинациями генов, или же они оказываются вовсе нежизнеспособными. Таким образом, отбору подвергается лишь «верхушка айсберга» - ничтожное число вариантов сочетаний генов скрещиваемых видов.

Возможно, одно из решений проблемы сохранения, а также увеличения различных сочетаний генов родительских видов скрывается в молекулярных механизмах мейотической рекомбинации. В бактериях, а чуть позже и у

эукариотических организмов (в том числе у растений и в человеческих клетках) были обнаружены гены, контролирующие процессы гомологичной рекомбинации [6-17]. Искусственная регуляция их экспрессии, а также привнесение в геном того или иного организма подобных генов из других видов может существенно отразиться на процессах мейотической рекомбинации в клетке, что особенно актуально для отдалённых гибридов с нарушенной конъюгацией хромосом.

Один из таких генов, *recA*, был выделен и охарактеризован в числе первых у кишечной палочки *Escherichia coli*. В середине 90-х годов его успешно перенесли в геном растений и показали, что продукт экспрессии этого гена действительно влияет на гомологичную рекомбинацию в эукариотических клетках, но только на митотическую рекомбинацию [18; 19]. Исследований относительно возможности использования его (или других генов, участвующих в контроле мейотической рекомбинации) для повышения уровня мейотической рекомбинации в каких-либо организмах пока нет.

Исходя из того, что белок *recA* участвует в контроле гомологичной рекомбинации, мы надеемся, что в нашем опыте удастся повысить частоту нормально конъюгирующих хромосом у отдалённого гибрида томата, что позволит получить в F_2 потомство с большим числом вариантов сочетаний признаков культурного и дикого видов, что, в свою очередь, может послужить основой для увеличения генетического разнообразия томата.

I. Литературный обзор

1. Томат как модельный объект селекционно-генетических исследований

Томат (*L. esculentum* Mill.) является одним из наиболее хорошо генетически изученных объектов. Это обусловлено рядом его свойств и характеристик, среди которых:

1. Томаты легко культивируются в различных условиях среды, имеют относительно короткий вегетационный период, что позволяет выращивать до 3-х поколений в год (в условиях теплиц и фитотронов). В то же время, возможно многолетнее выращивание и вегетативное размножение томатов. Цветение у большинства видов не зависит от длины дня.

2. Структура цветка томатов обеспечивает неслучайное самоопыление и в то же время позволяет проводить в широком масштабе контролируемую гибридизацию, получая при этом большое количество семян на одном растении (от 5000 до 25000).

3. Культурный томат можно скрещивать со всеми видами и полукультурными разновидностями рода *Lycopersicon* Tourn. и получать при этом гибриды с фертильностью, достаточной для продолжения исследования. Использование многомаркерных мутантов *L. esculentum* Mill. при проведении межвидовой гибридизации позволяет более полно исследовать межвидовые связи.

4. Возможно получение полиплоидов и анеуплоидов - трисомиков, и как следствие возможно изучение структуры генома томата. Поддержание форм с измененными числами хромосом обеспечивается вегетативным размножением.

5. Растения легко переносят вегетативные прививки, в том числе межвидовые и межродовые.

6. Наличие огромного количества морфологических признаков, четко идентифицируемых на различных стадиях развития.

7. Наряду с морфологическими признаками выявлено достаточно большое разнообразие по биохимическим признакам.

8. Известно более 1300 генов, из которых 242 локализованы на 12 хромосомах.

9. Пыльца томатов может сохраняться в течение длительного времени (до двух лет).
10. Томат оказался удобным объектом для культивирования *in vitro*, что сделало его модельной культурой для выполнения различных молекулярно-биологических и генно-инженерных манипуляций.
11. Каждая из 12 хромосом генома томатов (культурных и диких форм) может быть идентифицирована в стадии пахитены по своей относительной длине, положению центромеры, распределению гетеро- и эухроматина.
12. Небольшой геном (0,74 пг ДНК на геном и 10^9 п.н., что составляет 10% от размера генома кукурузы) удобен для молекулярного изучения, что позволило создать насыщенные молекулярные карты, создать молекулярные маркеры на ряд ценных признаков. Молекулярное маркирование позволяет картировать чужеродный (интрогрессионный из других видов) генетический материал в потомках отдаленных скрещиваний.

2. Механизмы генетической изменчивости

2.1 Мейоз и мейотическая рекомбинация

Исследование механизмов мейоза стало приоритетным направлением мировой генетики. Среди прочих можно выделить четыре основные проблемы: пусковые механизмы мейоза и дифференцировка мейоцита, механизмы конъюгации хромосом, механизмы кроссинговера, метаболизм, сопутствующий мейозу.

Мейоз — один из немногих биологических процессов, происходящих принципиально сходным образом у разных организмов. Универсальность мейоза позволяет предполагать, что у самых разных организмов он контролируется гомологичными генами. Каждый из ключевых этапов мейоза контролируется блоком генов. При этом можно выделить 7 относительно независимых ключевых цитогенетических этапов мейоза: 1) вступление в мейоз; 2) конъюгация гомологичных хромосом; 3) рекомбинация; 4) хиазмообразование; 5) расхождение хромосом; 6) цитокинез; 7) второе деление [20].

Именно в результате мейоза у гибрида возникают различные комбинации генов, расширяющие спектр генетической изменчивости. В связи с этим изучение процесса рекомбинации является одним из важнейших направлений исследований.

В настоящее время, в рамках концепции молекулярных явлений в мейозе, установлена последовательность событий, обеспечивающих рекомбинационные события. Она объединяет модель генетической рекомбинации с явлением синапсиса хромосом и деталями формирования синаптонемного комплекса. При рекомбинации в мейозе происходят следующие события:

- ✦ двунитевые разрывы ДНК в G2-периоде;
- ✦ точечное спаривание гомологов в лептотене;
- ✦ -синапсис гомологов – построение синаптонемный комплекс (СК) в зиготене;
- ✦ появление рекомбинационных узелков в зиготене;
- ✦ завершение формирования СК и рекомбинации в пахитене;
- ✦ формирование хиазм в диплотене;
- ✦ коориентация и сегрегация гомологов в метафазе-I и анафазе-I соответственно [20].

Кроссинговер — термин, предложенный Морганом для обозначения процесса взаимного (реципрокного) обмена идентичными участками гомологичных хромосом в мейозе. Для того чтобы мог произойти кроссинговер, каждая из четырех цепей должна быть разорвана и затем соединена с новым партнером. Соответствующие цепи обоих линейных гомологичных дуплексов ДНК надрезаются, и свободные концы одной спирали спариваются с комплементарными участками другой. Перекрест стабилизируется сшиванием концов донорных цепей со свободными концами реципиентных спиралей. Точка перекреста обменивающихся цепей перемещается вдоль спиралей, — этот процесс называется миграцией ветви. При этом происходит одновременное расхождение цепей исходных спиралей и их реассоциация с новыми партнерами с образованием дочерних дуплексов. Образовавшиеся структуры называются фигурами Холлидея по имени исследователя, впервые их предложившего. Структуры Холлидея могут

переходить в рекомбинантные двойные спирали путем внесения разрыва и воссоединения цепей.

В настоящее время общеизвестно, что одним из основных источников адаптивно и эволюционно значимой генетической изменчивости организмов является рекомбинация, в основе которой лежит кроссинговер, происходящий у высших эукариот в мейозе. Во время созревания половых клеток у высших организмов, гомологичные хромосомы могут обмениваться участками, и в результате кроссинговера возникают новые сочетания наследственных факторов. Такая комбинативная наследственная изменчивость дает возможность данному виду лучше приспособиться к изменяющимся условиям среды. Одна из основных функций мейотического деления и состоит в рекомбинации — перераспределении генетической информации родителей в потомстве [21].

На сегодняшний день обосновано положение, что совершенствование адаптации высших эукариот обеспечивается в филогенезе, главным образом, за счет рекомбиногенеза. Исследования на различных объектах приводят к заключению, что в результате межхромосомных обменов, рекомбинации сцепленных генов и внутригенного кроссинговера высвобождается значительная доля генотипической вариабельности, создавая возможность появления новых форм и обеспечивая отбор из них наиболее жизнеспособных комбинаций.

Изучение молекулярных механизмов, связанных с рекомбинацией ДНК, показало, что кроме общей рекомбинации посредством кроссинговера, возможны сайт-специфическая рекомбинация (для которой не требуется протяженных участков гомологии, обмен происходит в определенных участках с ограниченным структурным сходством), и незаконная, в которую могут вовлекаться негомологичные молекулы ДНК [20]. Кроме обмена участков ДНК при нормальной конъюгации хромосом, важным источником рекомбинации генетического материала является перенос генов (блока генов) в пределах хромосомного набора клетки. Следствием этих межхромосомных обменов («незаконных» рекомбинаций) могут быть существенные перестройки генома, в связи с чем возможно возникновение адаптивно значимых трансгрессивных рекомбинантов.

Отклонения в генетической программе половой репродукции приводят к стерилизации и нарушению физической связи и эволюционной наследственности поколений. В этом отношении нормальное прохождение мейоза, споро- и гаметогенеза имеют решающее значение. Судьба вновь возникающих организмов зависит от того, смогут ли их гаметы пройти стадию мейоза и оставят ли эти особи жизнеспособное потомство. Здесь мейоз выступает в одной из своих важнейших эволюционных функций — в качестве барьера на пути нежизнеспособных комбинаций. Особенно сильно это проявляется у гибридных генотипов с несовместимыми геномами. Степень фертильности гибрида зависит от степени гомологичности геномов: чем больше гомология, тем выше фертильность. Это объясняется конъюгационными свойствами хромосом (и обеспечивается специальными генами, ингибирующими негомологическую конъюгацию) и образованием бивалентов, а также правильностью их расхождения в редукционном делении. Изменения в системе генетического контроля мейоза существенно повлияют на воспроизводительные особенности растений и их способность к выживанию.

2.1.1 Генетический контроль мейотической рекомбинации

Еще Морган писал о возможности влияния генетических, точнее внутренних факторов на уровень мейотической рекомбинации. Однако специальные исследования в этой области были начаты гораздо позднее.

Многочисленными исследованиями доказано, что общая интенсивность рекомбинационных процессов находится под генетическим контролем. Так, у разных видов выявлены десятки генов, оказывающих значительное влияние на процесс рекомбинации в определенных сегментах хромосом. Существенно, что гены одной хромосомы могут влиять на частоту рекомбинаций в сегментах других хромосом. Кроссинговер, прошедший в одном участке хромосомы, обычно препятствует кроссинговеру в близлежащих ее участках (явление интерференции). Генетическая рекомбинация складывается из нескольких событий, которыми управляют серии различных генов, контролирующих мейоз. Действие этих и других факторов

существенно влияет на возможности комбинационной селекции, особенно при межвидовой гибридизации.

На сегодняшний день у кишечной палочки *E. coli* (одном из основных модельных объектов молекулярной биологии) определены три различные схемы прохождения гомологичной рекомбинации. Наряду с основным, связанным с действием фермента *RecBCD*, выделяют ещё два пути: *RecF* и *RecE*, которые включаются в определённых ситуациях [22]. Во всех трёх случаях одну из основных ролей играет белок *RecA*, который в функциональном состоянии представляет собой тетрамер полипептида, состоящего из 352 а.к., и имеет два сайта связывания с ДНК [23].

Одновременно с появлением в хромосомной ДНК одно- и двухцепочечных разрывов (оцДНК и дцДНК), в клетке должны образовываться, вследствие действия экзонуклеаз (например, *RecBCD* в *E. coli*), и одноцепочечные участки ДНК, т.к. только в этом случае становится возможным связывание белка *RecA*, присутствие которого необходимо для прохождения последующих этапов рекомбинации [7].

Мономеры *RecA* взаимодействуют с АТФ, что необходимо для их последующей полимеризации; затем, в комплексе с АТФ, они связываются с оцДНК в направлении 5'→3', образуя правозакрученный нуклеопротеиновый филамент (рис. 1) [23; 24].

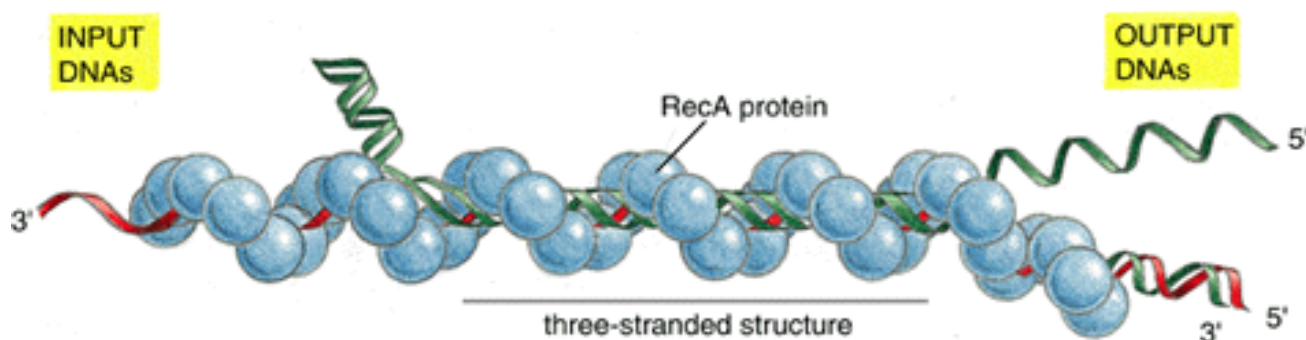


Рисунок 1. Схематическое изображение комплекса оцДНК-RecA-дцДНК.

В составе этой структуры оцДНК находится в необычно растянутом состоянии и её основания, видимо, наиболее активно спариваются с гомологичной ДНК. Присутствие белка *SSB* (он интенсивно связывается с оцДНК и предотвращает образование её вторичной структуры) существенно облегчает связывание *RecA* с

оцДНК, которое в данном случае происходит путём вытеснения белка *SSB* с предварительно расправленной им нити ДНК [6].

Далее образовавшийся комплекс *RecA*-оцДНК-АТФ проникает в интактную двойную спираль ДНК гомологичного партнёра. Он вытесняет одну из спаренных нитей (при этом происходит раскручивание двойной спирали для облегчения считывания её последовательности) и связывается с комплиментарным участком частично денатурированной дцДНК, вследствие чего образуется т.н. D-образная петля (рис. 2).

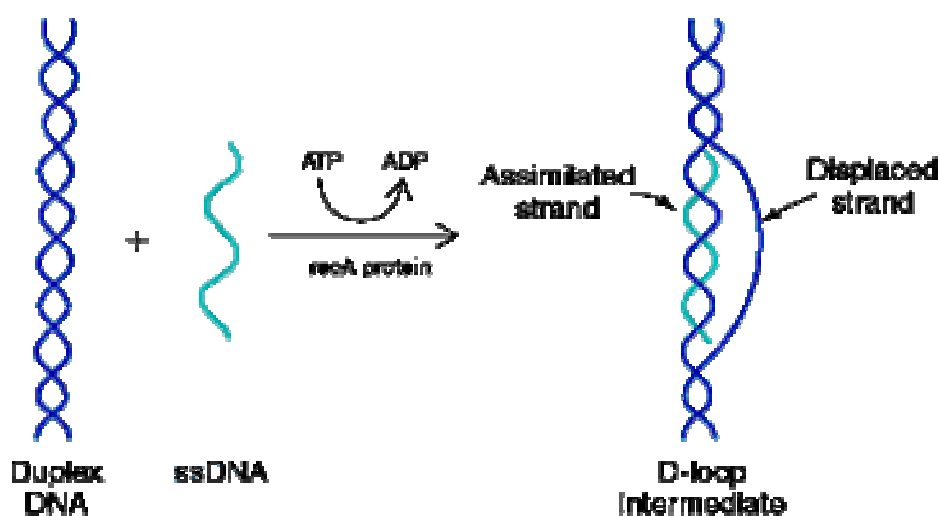


Рисунок 2. Встраивание оцДНК в дцДНК.

Затем начинается направленный, но ограниченный по времени, процесс поиска гомологии оцДНК в дцДНК и, если она не обнаружена, поиск прекращается, но вскоре начинается вновь уже на другом участке дцДНК. Если же гомология найдена, то гомологичные участки спариваются и оцДНК внедряется в гомологичный регион дцДНК, что, в конечном счёте, приводит к образованию структуры Холлидея.

По современным представлениям, гидролиз АТФ в ходе гомологичной рекомбинации необходим, по крайней мере, в двух ситуациях. Первая – направленное миграционное расширение гетеродуплекса, в особенности если при этом встречается участок негомологичной ДНК. Вторая – при высвобождении белка с ДНК, что способствует завершению рекомбинационной реакции [6].

В отсутствии АТФ комплекс оцДНК-*RecA* способен перемещаться лишь на небольшие расстояния от места внедрения в дцДНК и успешный поиск гомологии маловероятен [23].

Нельзя не упомянуть и о другой, не менее важной функции белка *RecA* – SOS или рекомбинационной репарации ДНК [20].

В эукариотических организмах процесс гомологичной рекомбинации проходит гораздо сложнее: в него вовлечены целые группы генов, например *RAD52* [8]. Однако наряду с этим во многих эукариотах (прежде всего в дрожжах, а также в растениях, человеческих и животных клетках) были обнаружены не только функциональные, но и структурные гомологи бактериального белка *RecA* [8-13]. Это продукты таких широко известных генов, как *RAD51*, *SPO-11*, *MRE11*, *DMC1* и др.

3. Пути повышения генетической изменчивости

Изучение молекулярных механизмов рекомбинационных событий дает толчок развитию исследований в области индуцирования процесса мейотической рекомбинации у высших эукариот, в т.ч. растений. Известно, что на частоту кроссинговера влияют температура, возраст, пол, генотип (определённые гены или структурные изменения хромосом уменьшают частоту кроссинговера или совершенно подавляют его), состояние цитоплазмы, структура генома, расположение генов относительно центромеры, мутации, концентрация в субстрате и в самом организме соединений азота, кальция, фосфора, калия, магния и т.д. [21].

Большое число данных указывает на эффективность использования химических мутагенов и различных видов облучения с целью индуцирования мейотического кроссинговера [21].

3.1 Генетическая трансформация растений

Семейство конъюгативных плазмид *Ti* (от англ. - *tumor-inducing* – вызывающий опухоль) обнаружено в грамотрицательных бактериях *Agrobacterium tumefaciens*. Замкнутые кольцевые двухцепочечные *Ti*-плазмиды имеют размер от 140 до 250 т.п.н. и содержат разнообразные уникальные гены. Бактерии *A. tumefaciens* попадают в пораженные ткани растений, а затем плазмиды проникают в растительные клетки и рекомбинируют с клеточной ДНК. Трансформированные клетки образуют опухоли, получившие название корончатых галлов. В лабораторных условиях трансформацию осуществляют путем инокуляции *A.*

tumefaciens в пораненные растительные ткани (в ткани стебля, корней или кусочков листьев) или путем совместного культивирования бактерий с протопластами клеток растений.

Геномы Ti-плазмид. Обычно в ДНК клеток корончатого галла бывает встроена лишь небольшая (от 13 до 25 т.п.н.) часть генома *Ti*-плазмиды, однако эта часть всегда включает определенный сегмент, получивший название Т-ДНК. В клетках корончатых галлов с интегрированной Т-ДНК синтезируются РНК и белки, которые ответственны за опухолевый фенотип этих клеток. Кроме того, образуются ферменты, катализирующие синтез аргининовых производных, известных под названием опины. В нетрансформированных клетках опины не синтезируются. *Ti*-плазмиды классифицируют в соответствии с теми опидами, синтез которых они индуцируют. Например, октопиновые *Ti*-плазмиды индуцируют синтез октопина в трансформированных клетках растений, а нопалиновые *Ti*-плазмиды - синтез нопалина. Однако каждая *Ti*-плазида имеет также гены, экспрессируемые в *A. tumefaciens*; они находятся вне Т-ДНК. Некоторые из них, например гены вирулентности (*vir*), нужны для переноса Т-ДНК в клетки растений и, следовательно, существенны для образования опухоли. Другие связаны с катаболизмом тех же опинов, чей синтез кодируется Т-ДНК. Экспрессия генов метаболизма опинов индуцируется в клетках бактерий самими опидами.

В трансформированных растительных клетках Т-ДНК активно транскрибируется. Т-ДНК в растительных клетках устроены аналогично эукариотическим мРНК, т. е. на их 5'-концах находится 7-метилгуанозин, а на 3' - концах - сайты полиаденилирования ААУАА и полиадениловые цепочки. "Эукариотической" особенностью транскрипционного механизма Т-ДНК является отсутствие в ней оперонов, в то время как в других частях *Ti*-плазмид опероны есть. Это пока единственный обнаруженный в природных условиях пример функционирования прокариотической нуклеотидной последовательности в эукариотических организмах. Следует полагать, что функциональная часть Т-ДНК за исключением механизма переноса эволюционно происходит из растений [25].

Таким образом, *Ti*-плазмиды обеспечивают клетки бактерий источником метаболита (путем трансформации растительных клеток) и механизмом

использования этого метаболита в качестве источника углерода, азота и энергии. Секрция опинов трансформированными клетками растений создает для *A. tumefaciens* благоприятные условия, поскольку другие распространенные почвенные бактерии не способны метаболизировать эти необычные соединения [26].

Инсерционная трансформация с участием Ti-плазмид. Механизм инсерционной (вставочной) трансформации *Ti*-плазмидой отличается от механизма трансформации других эукариотических систем, но имеет некоторое сходство с бактериальной конъюгацией. В хромосоме *A. tumefaciens* закодирована информация о функциях, необходимых для прикрепления бактерий к клеткам растений. *Ti*-плазида кодирует цис- и транс-функции, нужные для интеграции. Для осуществления интеграции Т-ДНК на правом ее конце должен присутствовать сегмент из 25 п.н.; переносятся только те последовательности, которые расположены слева от этой области. Подобная же последовательность встречается на левом конце Т-ДНК. По-видимому, она не требуется для интеграции, но помогает обозначить конец интегрируемой Т-ДНК. Транс-функции обеспечиваются продуктами *iw*-генов. Среди них имеется сайт-специфическая эндонуклеаза, которая разрезает нижнюю цепь Т-ДНК в пределах обеих пограничных последовательностей. 3'-конец ДНК *Ti*-плазмиды, ближайший к правостороннему разрезу, служит праймером для синтеза ДНК, замещающей нижнюю цепь Т-ДНК. Свободная цепь Т-ДНК переносится в растительные клетки, начиная с 5'-конца правой пограничной последовательности к 3'-концу. Механизм ее включения в случайные сайты ДНК клеток растений остается неясным.

Конструирование векторов рекомбинантных ДНК с использованием Ti-плазмид. Использование *Ti*-плазмид в качестве вектора комбинантных ДНК зависит от того, можно ли встроить нужный фрагмент в область Т-ДНК, провести отбор и поддерживать рекомбинантные молекулы в клетках *A. tumefaciens*, с тем, чтобы ввести их затем в клетки растений. Из-за отсутствия уникальных сайтов рестрикции в большой молекуле *Ti*-плазмиды прямое включение в нее чужеродной ДНК невозможно, но существует обычный способ встраивания генов в Т-ДНК. Нужные сегменты ДНК встраивают в подходящие сайты рестрикции в Т-ДНК выделенной плазмиды и полученные рекомбинанты повторно клонируют в *E. coli*. Если такие

плазмиды ввести путем конъюгации в клетки *A. tumefaciens*, которые уже несут *Ti*-плазмиду дикого типа, то Т-ДНК с встроенным фрагментом перейдет в результате гомологичной рекомбинации в область Т-ДНК интактной плазмиды. Отбор клеток *A. tumefaciens*, несущих рекомбинантные плазмиды *Ti* можно осуществить, если в чужеродную ДНК включить маркирующий ген типа гена *neo* из *E. coli*. Репликация рекомбинантной *Ti*-плазмиды в клетках *A. tumefaciens* и последующее инфицирование растений ведут к образованию корончатых галлов, несущих сегмент рекомбинантной Т-ДНК.

Используя те преимущества, которые дает различие между цис- и транс-функциями плазмиды, сконструировали относительно простую векторную *Ti*-систему. Основной вектор - челночная плазида, способная реплицироваться как в *E.coli*, так и в широком круге других бактерий (включая *A. tumefaciens*), содержащая оба пограничных сегмента Т-ДНК из 25 п.н. Путем клонирования в *E. coli* уже получены производные векторы, содержащие различные вставки слева от правостороннего пограничного сегмента из 25 п.н. Если перенести такие молекулы конъюгативным путем в клетки *A. tumefaciens*, несущие *Ti*-плазмиду дикого типа, то они реплицируются, а продукты генов, необходимые для встраивания рекомбинантной плазмиды в ДНК растений, будут поставлены генами, находящимися в транс-положении. Растительные клетки, инфицируемые такими клетками *A. tumefaciens*, интегрируют либо Т-ДНК дикого типа, либо рекомбинантную Т-ДНК, либо и ту и другую. Функциональные маркерные гены, включенные в рекомбинантную Т-ДНК, экспрессируются в интегрированном состоянии в ДНК растений, если они оказываются под контролем элементов генома эукариотической клетки, контролирующих синтез РНК. Для этого, например, можно подключить маркерный ген к 3'-концу регуляторного участка гена *nos* в рекомбинантной Т-ДНК. Если в качестве помощника вместо плазмиды дикого типа используется *Ti*-плазида, из которой делегированы либо цис-активная последовательность длиной 25 п.н., либо весь сегмент Т-ДНК, то способностью к переносу обладает только рекомбинантная Т-ДНК.

Многие клетки растений тотипотентны (т.е. способны размножаться, дифференцироваться и образовывать целые плодоносящие растения). Векторные

системы, сконструированные на основе *Ti*-плазмид, можно использовать для получения генотипически измененных растений из трансформированных клеток.

3.2 Отдалённая гибридизация и её использование в селекции томата

Значение отдалённой гибридизации в селекции растений трудно переоценить. Впервые успешные эксперименты по скрещиванию отдалённых видов проводились И.Г. Кёльрейтером в России ещё в 1755 году. Однако до сих пор в этой области существует множество нерешённых проблем.

В практической селекции с использованием отдалённой гибридизации селекционеры и генетики встречаются со следующими проблемами:

- нескрещиваемость генетически отдалённых видов;
- непрорастание гибридных семян;
- бесплодие гибридов первого поколения.

Рассмотрим последний пункт более подробно, т.к. наши исследования, в конечном счете, направлены, помимо всего прочего, и на решение этой проблемы.

Главная причина бесплодия отдалённых гибридов – нарушения в мейозе. Они вызываются отсутствием или нарушением конъюгации хромосом у гибридов первого поколения из-за отсутствия гомологии, наличия хромосомных aberrаций, взаимодействия геномов исходных видов при наличии родства хромосом, что приводит к образованию мультивалентов [21].

Дело в том, что даже при конгруэнтных скрещиваниях культурного томата с дикими видами рода *Lycopersicon* часто в мейозе гибридных растений наблюдается неопределённая конъюгация (пойкилосиндез по Г.Д. Карпеченко), при которой число бивалентов у гибрида варьирует от 0 до 12, что, естественно, не может не отразиться негативным образом на репродуктивных свойствах растений (например, приводит к снижению их фертильности) [27].

Также отмечено, что при нарушениях конъюгации хромосом в мейозе у гибридов передать отдельные признаки от одного вида другому довольно трудно [28]. Кроме того, в комбинациях скрещивания, когда геномы родителей значительно различаются, в гибридной популяции преобладают формы, близкие к одному или

другому родительскому типу, при отсутствии или незначительном количестве промежуточных форм. Такое расщепление объясняется тем, что преимущественно выживают гаметы и зиготы, имеющие сбалансированные наборы хромосом, характерные для каждого из скрещиваемых родителей или близкие к ним [29].

Таким образом, стерильность гамет и зигот является важным фактором ограничения доступной отбору изменчивости. На путях формирования потенциальной, свободной и доступной искусственному отбору генотипической изменчивости у высших растений имеются и другие многочисленные барьеры:

- снижение частоты кроссинговера в сегментах хромосом, перенесённых культурному реципиенту от диких видов;

- организация адаптивно значимых генов в коадаптированные блоки (кластеры), т.е. наиболее постоянные в рекомбинационном отношении генетические структуры;

- рецессивность *rec*-аллелей, увеличивающих частоту кроссинговера, снижающая т.о. общий уровень рекомбинации в гетерозиготах;

- существование «запретных» в рекомбинационном отношении зон;

- экологическая зависимость функционирования рекомбинационной системы вида и сбалансированный переход потенциальной генетической изменчивости в свободную и доступную отбору [21].

Указанные и другие ограничения генотипической изменчивости выдвинули проблему её эндогенного и экзогенного индуцирования в число первоочередных в генетике и селекции. Проблема индуцированного рекомбиногенеза стоит особенно остро в связи с необходимостью мобилизации мировых генетических ресурсов растений, улучшения уже используемых и вовлечения в культуру новых видов. Важность такого масштабного подхода диктуется рядом причин, к основным из которых относятся следующие:

- необходимость разрыва тесно сцепленных локусов или блоков генов в случаях нежелательности объединения контролируемых ими признаков в одном генотипе, а также с целью получения новых сочетаний генов;

- индуцирование процесса интрогрессивной рекомбинации в межвидовых и межродовых гибридах (эти события происходят особенно редко);

-индуцирование множественных обменов для сочетания большего числа разных признаков, поскольку множественные обмены в одной хромосоме и геноме в целом обычно оказываются весьма редкими событиями [21].

Можно с уверенностью сказать, что проблема индуцирования генетических рекомбинаций (в том числе для решения вышеописанных проблем в селекции и генетики сельскохозяйственных культур) станет одной из главных, поскольку именно от её решения зависит, будет ли селекция и дальше искусством, успех в котором определяется талантом одиночек и масштабом работы, или же эволюцией, управляемой по воле человека [21].

3.3 Использование методов биотехнологии и генной инженерии для повышения эффективности отдалённой гибридизации

Всё большее значение в селекции растений приобретают современные методы биотехнологии.[28]. С их помощью, в зависимости от культивируемой части растения, возможно решение следующих задач при отдалённой гибридизации:

цветковые почки, завязи, семяпочки – преодоление половой несовместимости при межвидовых и межродовых скрещиваниях путём оплодотворения *in vitro* (оплодотворение в пробирке);

зародыш – преодоление постгамной несовместимости при межвидовых и межродовых скрещиваниях и размножение гибридных растений;

клетки – преодоление про- и постгамной несовместимости путём соматической гибридизации.

Исследования последних лет показывают эффективность методов генетической инженерии [14, 18, 19, 30, 31]. Внедрение в геном организма хорошо изученных генов, контролирующих процессы гомологичной рекомбинации, позволяет значительно повысить частоту рекомбинации. В частности, встроенный в геном табака бактериальный ген *recA* в несколько раз повысил частоту сестринских хроматидных обменов [18, 19]. Клеткам дрожжей этот же ген придавал устойчивость к УФ-излучению (которое, как известно, вызывает различные повреждения ДНК) [30]. Ещё один бактериальный ген, *ruvC*, вызывал в табаке

многократное повышение частоты соматического кроссинговера, а также внутриврохромосомных перестроек [31].

3.3.1 Проблемы культивирования *in vitro* и получения прямых регенерантов у томата

Всё большее значение в научных исследованиях и практической селекции приобретают различные методы биотехнологии. Использование культуры *in vitro* позволяет решить ряд важнейших задач, таких как: размножение в стерильных условиях отдельных растений (клонирование); получение линий в селекции на гетерозис; получение безвирусного материала сортов и селекционных форм; использование повышенной генетической вариабельности для создания нового исходного материала; генетическая трансформация и многие другие [28]. Однако для этого необходимо тщательное изучение того или иного вида. Возможность работы с растением обуславливают его биологические особенности, чувствительность к биотическим и абиотическим воздействиям, удобство работы и проч. Одним из таких «удобных» модельных объектов является арабидопсис (*Arabidopsis thaliana*) или «резуховитка Таля» [32]. Малое количество хромосом ($2n = 10$), короткий жизненный цикл (4 недели), неприхотливость к условиям произрастания, большое разнообразие признаков и прочие особенности сделали его одним из наиболее удобных растительных объектов в современной биологии растений.

Однако в сельскохозяйственном производстве каждый вид уникален и не может быть заменён другим. Исходя из этого, исследователю приходится адаптировать и зачастую разрабатывать новые методики для каждого вида (и даже сорта) в отдельности.

Культурный томат *Lycopersicon esculentum* является одной из наиболее полно генетически изученных и хорошо проработанной в молекулярном плане сельскохозяйственных культур. На томате создана огромная маркерная коллекция, включающая более 1000 мутантных форм.

К сожалению, несмотря на накопленные знания о биологии и генетике томата, остаётся ещё очень много неразрешённых вопросов. Одним из таких является вопрос о генетической трансформации, хотя коммерческие гибриды трансгенных томатов и стали появляться на прилавках магазинов, начиная с середины 90-х годов.

Это связано с выбором наиболее подходящего способа трансформации: для двудольных растений очень часто применяется метод с использованием агробактерий. Тогда дело сводится к поиску достаточно агрессивного штамма по отношению к растению томата.

Существенным моментом, объединяющим многие методы генетической инженерии, является культивирование растений *in vitro* и возможность получения из различных их частей каллуса с последующей регенерацией из него полноценных растений.

Если выбор способа трансформации не особо богат, то составляющие успешного выращивания растения в стерильной культуре могут быть самые разнообразные: от светового и температурного режимов до едва различимых концентраций компонентов питательных сред. На этом этапе наиболее полно проявляются различия между видами и даже сортами одного вида растений. Иногда из-за сложности получения достаточного количества регенерантов в дальнейшем становится невозможным получение трансформантов.

Ещё одной важной проблемой, возникающей на этапе культивирования *in vitro* и получения регенерантов, является соматональная изменчивость – изменчивость какого-либо признака в клетках, группах клеток или генерируемых из культуры соматических клеток или тканей организмах, происходящих от одного (материнского) предка, т.е. представляющий собой клон. Мутации, или соматональные варианты, возникают вследствие перестроек в ДНК, хромосомных мутаций и активации или инактивации генов. Индукция мутаций может быть обусловлена стрессовыми условиями при культивировании клеток *in vitro* [33].

Как отмечает Brigitzer, при трансформации наблюдаются высокая частота и обширный спектр соматональной изменчивости, которая сохранялась в последующих поколениях [34].

Однако в целом сложно отследить какие-либо закономерности возникновения подобных отклонений: изменение частоты рекомбинации зависит от группы сцепления, возникновение мутаций и прочих отклонений – от генотипа и т.п.

Что касается томата, то, если для культурных сортов уже ведутся попытки по поиску универсальных процедур, для гибридов (внутри- и межвидовых), для которых помещение на питательную среду является иногда единственным способом получить полноценное растение (некоторые межвидовые гибриды), практически отсутствуют какие-либо данные. Каждый гибрид требует индивидуального подхода с учётом особенностей обоих родителей. В случае отдалённых гибридов результаты могут быть и вовсе непредсказуемыми.

Таким образом, отработка методов получения каллусной культуры и прямой регенерации растений позволит расширить границы применения многих биотехнологических методов в отношении сельскохозяйственных культур и в частности томата.

3.3.2 Особенности томата волосистого *L. hirsutum* и его использования в селекции культурного томата

Если о культурном томате некоторое представление имеют почти все, то с томатом волосистым дело обстоит иначе.

Вид волосистого томата *L. hirsutum* Humb. et Bonpl. считается одним из наиболее отличительных видов в роде *Lycopersicon* Tourn. Впервые его растения были найдены Гумбольдтом и Бонпланом в начале XIX в., тогда как подробное биосистематическое описание *L. hirsutum* Humb. et Bonpl. с зачислением этого вида в род впервые встречается в работе Dunal [35]. Этот вид широко распространен в высокогорных районах Чили и Эквадора как многолетняя культура. *L. hirsutum* Humb. et Bonpl. называют волосистым из-за густо расположенных на стебле и листьях трихом, наполненных маслянистой жидкостью с характерным запахом. Типичный *L. hirsutum* Humb. et Bonpl. считается самонесовместимым, относится к растениям короткого дня и завязывает плоды лишь при 8-10-часовой продолжительности освещения. Он имеет общие признаки с такими видами, как *L. peruvianum* Mill. и особенно с *L. glandulosum* C. H. Mull.: вилкообразное соцветие,

хорошо развитые псевдоприлистники, характер фотопериодической реакции, распространение по высоте в горах.

В пределах вида *L. hirsutum* Humb. et Bonpl. по своим морфологическим и биологическим признакам выделяется разновидность *L. hirsutum* var. *glabratum* С. Н. Mull.

Первые сведения о цитологической характеристике генома этого вида встречаются в работе Luckwill [36]. В кариотипе *L. hirsutum* Humb. et Bonpl. Жученко легко идентифицировал две хромосомы: 1) спутничную, спутничная нить которой намного короче, чем у других видов томатов, 2) хромосому С, почти метацентрическую, длиной 3, 25 мкм, одно из плеч которой примерно на 1/3 длины загнуто. Этой длинной хромосоме автор не смог найти гомолога не только в пределах того же кариотипа, но и в геномах других видов рода [37]. По данным Upadhyа и Majid [38], главным отличительным признаком генома *L. hirsutum* Humb. et Bonpl. является наличие спутничной хромосомы с сильно субтерминальным расположением центромеры и большого, уникального для этого вида, спутника.

Более детальное описание морфологии хромосом *L. hirsutum* Humb. et Bonpl. на стадии пахитены микроспорогенеза дают Barton и Gottschalk [39]. По отношению к *L. esculentum* Mill. и другим видам геном *L. hirsutum* Humb. et Bonpl. проявляет в некоторых хромосомах небольшие, но явные структурные различия в составе средних гетерохроматических сегментов. Полное совпадение авторы находили в хромосомах 1, 2, 3, 4, 7, и 12; в то время как хромосомы 5, 6, 8, 9, 10 и 11 частично проявляли отклонения.[37; 39]

Вид *L. hirsutum* является донором генов хозяйственно ценных признаков. Так, он содержит ген *Tm*, обуславливающий устойчивость к ВТМ (в условиях естественного заражения), который находится в гомозиготном состоянии и сцеплен с нежелательным фактором, контролирующим пониженную фертильность, с геном, обуславливающим пожелтение листьев и прекращение роста, а также ещё с одним летальным рецессивным геном [40]. У гибридов *L. esculentum* x *L. hirsutum* гомозигота по гену *Tm* устойчива даже в условиях искусственного заражения. Позже был выделен ген *Tm* без сцепления с этими нежелательными признаками.

Вид *L. hirsutum* Humb. et Bonpl. является также источником:

-гена *B*, определяющего высокое содержание β -каротина и низкое – ликопина в плодах. *mo_B* – модификатора гена *B*, обеспечивающего в присутствии последнего увеличение содержание β -каротина [37];

-гена *Se*, определяющего устойчивость растений к *Septoria lycopersici* [37];

-гена *Cf* – устойчивость к *Cladosporium fulvum* [40];

-генов устойчивости к *Alternaria solani* [37];

-гена *Ol-1* – устойчивость к *Oidium lycopersicon* [40];

-генов *Ty-1* и *Ty-2*, определяющих устойчивость к вирусу жёлтой курчавости листьев [40];

-генов устойчивости к вирусу мозаики люцерны *alfalfa* [41].

Однако этот вид интенсивно поражается фитофторозом и мелойдогинозом [37].

По данным Daskaloff, Ognjanova (1967), семена *L. hirsutum* Humb. et Bonpl. хорошо всходят при темп. +10°C, тогда как минимальной температурой для культурных сортов при этом оказывается +15°C [30].

Вопросы скрещиваемости *L. hirsutum* Humb. et Bonpl. с *L. esculentum* Mill. широко освещены в литературе. По данным RFLP-анализа 17% ядерных генов *L. hirsutum* Humb. et Bonpl. не были обнаружены в культурном томате [42].

Установлено, что скрещивание между *L. esculentum* Mill. и *L. hirsutum* Humb. et Bonpl. осуществляется сравнительно легко, если *L. esculentum* Mill. используется в качестве материнской формы. Вследствие подобной односторонней несовместимости возникают сложности при передаче культурному томату из волосистого хозяйственно важных генов, которые наследуются только по материнской линии [42].

У гибридов *L. esculentum* x *L. hirsutum* фертильность гибридов *F*₁ составляет 74,9%, в то время, как процент абортивной пыльцы ни у одного из родителей не превышает 9%. При этом в гибридных растениях на стадии мейоза наблюдалось значительное понижение числа хиазм по сравнению с родительскими растениями [43].

Использование при скрещивании *L. esculentum* x *L. hirsutum* полиплоидных форм приводит к отрицательному результату, в то время, как диплоидные образцы скрещиваются нормально [37].

Гибриды F_1 *L. hirsutum* x *L. esculentum* вследствие действия гена *B* (6-ая хр.) имеют плоды оранжевого цвета [44]. В гибридных плодах, как правило, образуется пониженное число семян, что затрудняет передачу в культурный томат возможных полезных признаков, которые сцеплены с генами, обуславливающими постзиготическую гибель гибридов. Эти же гены могут значительно искажать картину распределения генов в гибридных популяциях. Невозможность изучения крупных гибридных популяций от скрещиваний культурного и волосистого томатов может также сдерживать прогресс относительно совместного переноса множественных генов (блоков), особенно тех, которые отвечают за проявление количественных признаков в растении [42].

II. Экспериментальная часть

2.1 ОБОСНОВАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

На сегодняшний день очень актуален вопрос увеличения генетического разнообразия. Для этих целей наиболее целесообразно применение современных методов биотехнологии. Получение гибридов во множестве комбинаций невозможно традиционным путём – здесь на помощь приходит биотехнология. А одним из важнейших её направлений является генетическая трансформация.

В современной биологии есть примеры успешного использования генов, контролирующих мейоз и происходящие на этой стадии процессы в клетке, которые являются определяющими при формировании генетической изменчивости, для повышения уровня рекомбинации [18, 19, 31]. Однако подобные работы проводятся лишь с сугубо научными целями. Это и дало нам идею о применении генетической трансформации для увеличения генетического разнообразия хозяйственно ценной культуры – томата.

Попутно возникла ещё одна проблема, на решение которой также была направлена наша работа: непредсказуемая регенерационная способность томата, несмотря на его хорошую изученность, как модельного объекта. Она является генотипоспецифичной, а работы, связанные с культивированием растений в стерильной культуре и получением регенерантов очень редко проводятся на гибридах первого поколения, тем более межвидовых.

Таким образом, основной целью данной работы являлась разработка реципиентной системы для генетической трансформации отдалённого гибрида томата и отработка всех необходимых и вспомогательных методов.

Все работы выполнены в 2000-2004 годах на кафедре генетики МСХА им. К.А. Тимирязева, Селекционной станции им. Н.Н. Тимофеева МСХА им. К.А. Тимирязева, кафедре биотехнологии МСХА им. К.А. Тимирязева и в лаборатории индуцированного рекомбиногенеза (ВНИИСБ).

2.2 ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Цель работы заключалась в разработке эффективной методики генетической трансформации отдалённого гибрида томата для возможного дальнейшего применения её в качестве механизма, увеличивающего генетическую изменчивость.

Для этого было необходимо решить ряд определённых задач:

1. Создание отдалённого гибрида *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon hirsutum*.

2. Цитогенетическая характеристика гибридов F_1 и F_2 - с целью изучения характера распределения и наследования признаков, оценки частоты рекомбинации и получения данных о наличии нарушений в гибридных растениях на стадиях мейоза.

3. Отработка методики и введение гибридов F_1 в культуру *in vitro*.

4. Отработка методики прямой регенерации из листовых дисков томата.

5. Разработка селективной системы для отбора генетически трансформированных растений.

6. Подготовка векторов для агробактериальной трансформации.

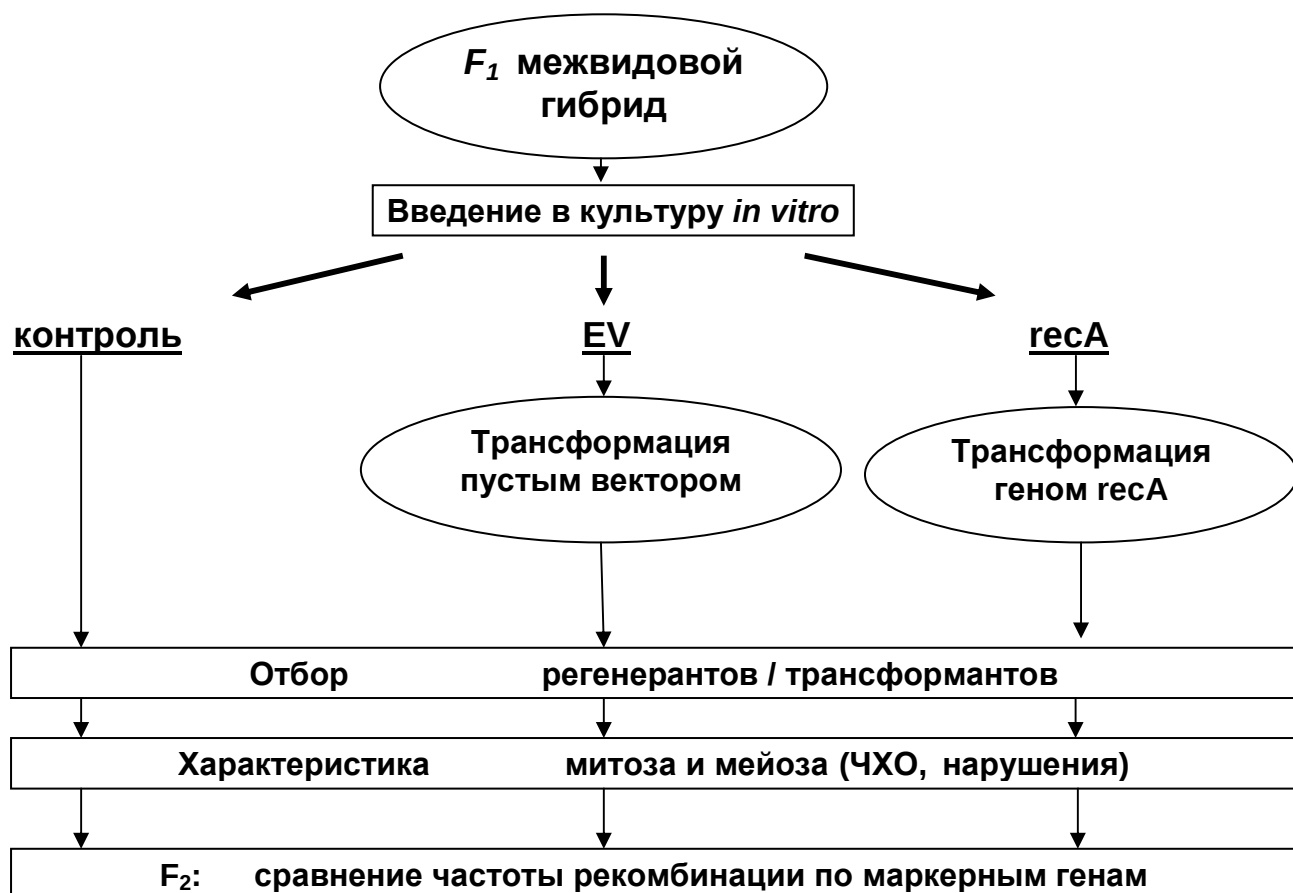


Рисунок 3. Общая схема проведения опыта.

2.3. ИСХОДНЫЙ МАТЕРИАЛ

Lycopersicon hirsutum Humb. et Bonpl. (CGN 15878). Происхождение – Южная Америка.

Морфологические признаки. Растения от интенсивно-зеленых до светло-зеленых, ветвящиеся, опушенные длинными (0,5-0,6 мм) нежелезистыми волосками. Стебли мощные, толстые (10-25 мм), высотой до 120-165 см, густо мохнатые, с простыми торчащими, шелковистыми, разделенными на перегородки, несколько сжатыми, звездчатыми волосками. Они периодически опадают и снова появляются. Между длинными волосками расположены короткие железистые, редко рассеянные по стеблям и побегам. В молодом возрасте прямые, затем ниспадающие под собственной тяжестью. Листья крупные, 34-49 см в длину и 20- 28 см в ширину, узкоовальные по контуру, с ложными прилистниками у основания, светло-зеленые с верхней стороны и белесоватые с нижней, гладкие, опушенные с обеих сторон густыми короткими и редкими длинными волосками. Конечные доли листа широколанцетные с короткими черешками и многочисленными мелкими зубчиками по краю. Концы долей от заостренных до острых. Боковых долей от 7 до 9, светло-зеленые или интенсивно-зеленые, овально-яйцевидные, 10 см длиной и 6 см шириной, концы долей острые, неравномерно-зубчатые, неравномерно-закругленные у основания. Дольки сидячие, овальные или зубчатые, густо покрытые короткими, чередующимися с длинными жесткими волосками. Долячки маленькие, 1-5 мм длины, сидячие, овальные, не сплошные, черешки опушенные, как и стебель.

Соцветие среднего размера, длиной 15-20 см, вилкообразное, редко простое, покрытое волосками. На каждой ветви соцветия по 10-15 плотно расположенных цветков; ножки соцветия с парой прицветников у основания, идентичных с псевдоприлистниками листьев. Цветоножки от 15 до 25 мм длины, нитчатые, 0,3-0,5 мм толщины, несколько утолщающиеся после цветения. Этот изгиб обычно происходит около цветка. Цветки 3-4 см в диаметре, расположенные на длинных опушенных цветоножках. Чашечка пятичленная, маленькая, внешняя поверхность покрыта железистыми, длинными волосками, внутренняя - железистыми, короткими. Чашелистики шиловидные, кончики сильно закручены в обратную

сторону. Венчик ярко-желтый, пятичленный, блюдцеобразный, разделен менее чем на половину длины венчика. Неразделенная часть венчика расширенной части лепестков шириной до 2 см, трубка 1,5 мм длины, внешняя поверхность густо опушена волосками; расположенными вдоль средней жилки каждой дольки. Тычиночная колонка веретенообразная, 3-4 мм толщиной, 10-11 мм длиной, более узкая, чем у обыкновенного томата. Тычинки прикреплены к венчику на вершине трубки. Пестик слегка или значительно выдвинут из тычиночной трубки, 12-13 мм длиной, нитевидный, покрытый до половины длинными волосками. Рыльце пестика булабовидное.

Плоды мелкие (0,8-3 г), округлые, тонкостенные, двугнездные, высотой 1,5-2 см, диаметром 1-1,8 см, густо покрыты длинными волосками, зеленые или слабо белесоватые, реже с рисунком в виде коричневых или бурых черточек, несъедобные, горькие на вкус и содержат гликоалкалоиды. Семена темно-коричневые, гладкие, за исключением узкого апикального крыла, находятся в светло-зеленой мякоти. Средний вес - 0,7 г . [3].

Мейоз начинается в бутонах длиной 3-6 мм и диаметром 1,9 - 3 мм [44].

Mo 504 - многомаркерный мутант *Lycopersicon esculentum* [45].
Происхождение – кафедра генетики МСХА.

Маркерные гены (локализованы во 2-й хромосоме):

Wo, Wooly. Проявление на стадии роста: все части растения, включая гипокотиль, густо опушены. Волоски ветвистые и звездчатые, но не длиннее нормальных. Доминантная гомозигота летальна. Гибель растений происходит до или на стадии семядолей и очень редко позже.

aw (aba, ab. a₁₇₉), without anthocyanin. Проявление на стадии сеянцев: антоциан отсутствует во всех частях (стебли и листья всегда без антоциана). На интенсивность антоциановой окраски влияют условия выращивания [46].

d (rob^{imm}), dwarf. Проявление на стадии сеянцев: все части растения уменьшены, листья тёмные, морщинистые, края закручены вниз.

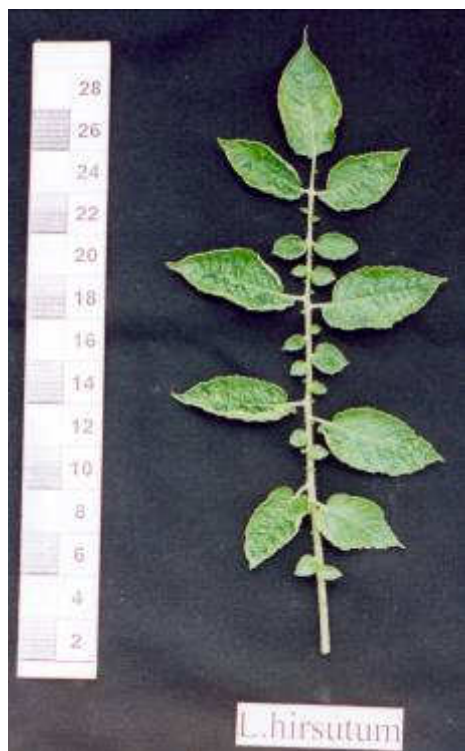
s, compound inflorescence. Сложное соцветие со значительно увеличенным числом цветков. Сильно разветвленное соцветие в форме полушария образуется из

80 и более цветков и почек. Соцветия появляются на каждом 6-м узле, тогда как у нормального типа – на третьем [37; 45].

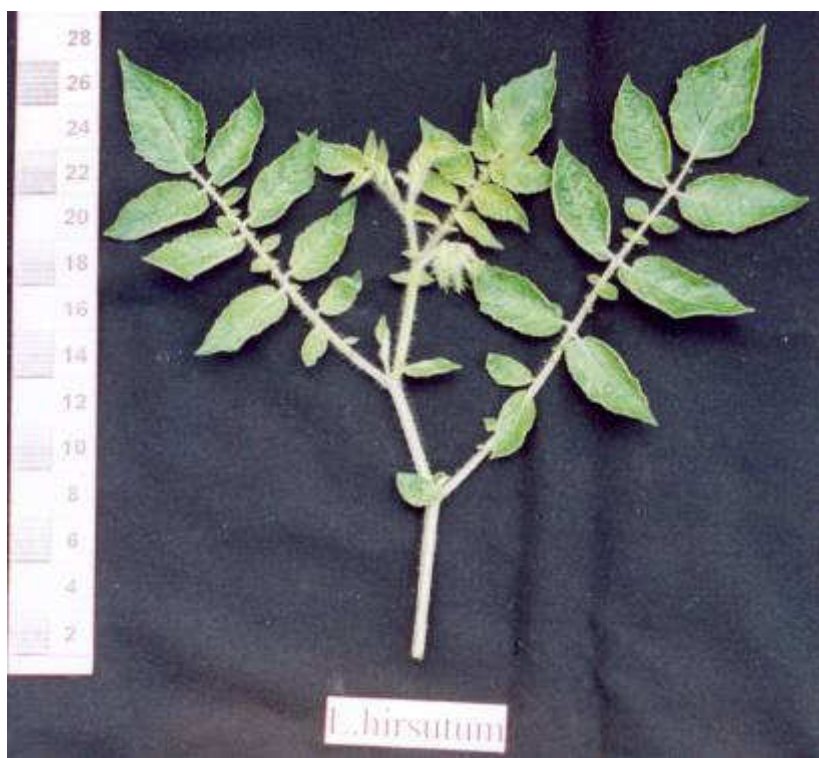
bk, beaked. Плоды с заострённым концом.

o, ovate. Овальные или грушевидные плоды.

p, peach. Более густое и устойчивое опушение эпидермиса плода придает матовый вид его поверхности. Листья более опушенные и имеют сине-серый оттенок.



a)



b)



B)



r)

Рисунок 4. Внешний вид *Lycopersicon hirsutum* Humb. et Bonpl. (CGN 15878): а)-лист, б)-побег, в)-цветок, г)-плод.

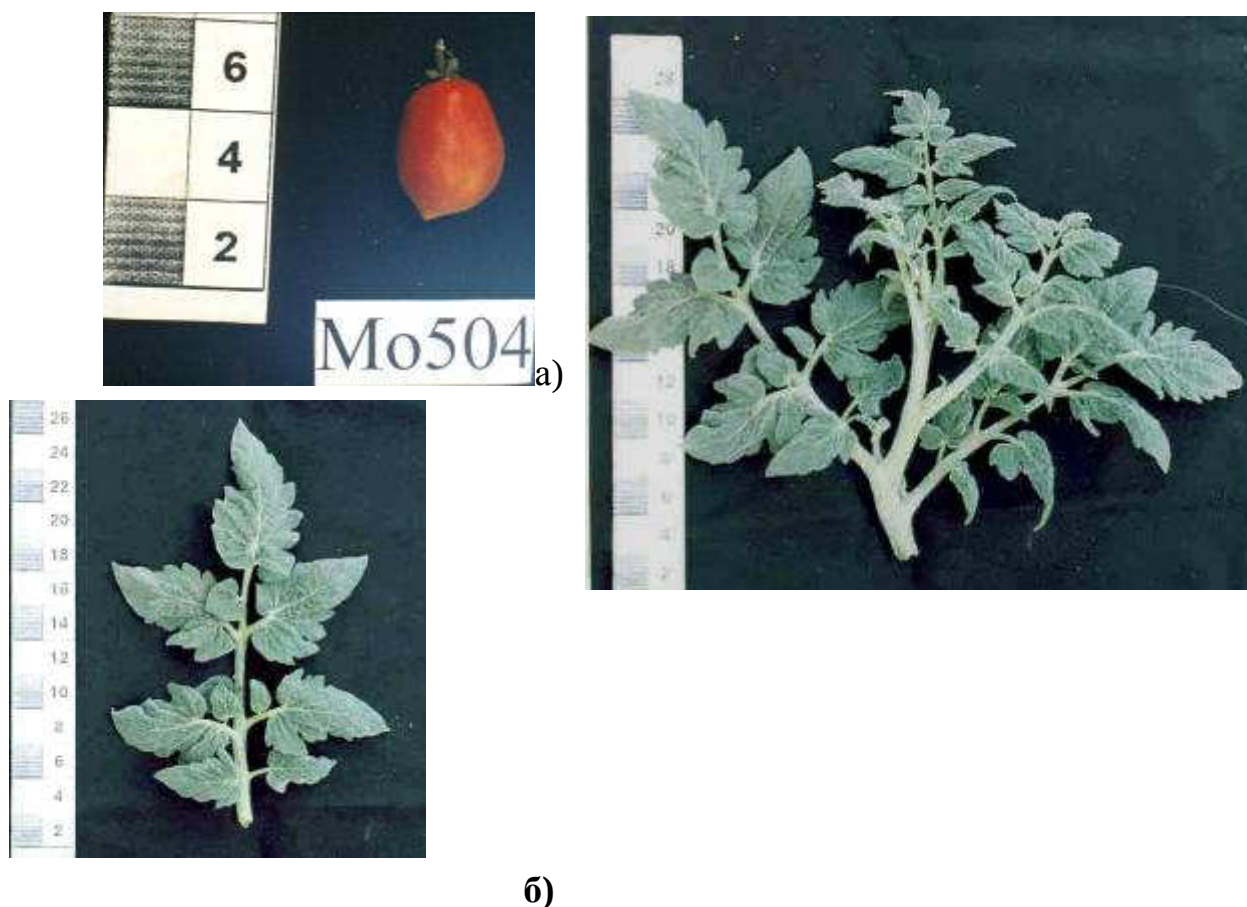


Рисунок 5. Внешний вид *Lycopersicon esculentum* Mill. (Mo 504): а)-плод, б)-лист, в)-побег.

2.4 МЕТОДЫ

1) Посадка и уход за исходным материалом.

Растения томата выращивали по общепринятой схеме в стеклянной теплице. Для анализа расщепления F_2 семена проращивали в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге, после чего их высаживали в ящики с грунтом. Анализ маркерных признаков проводили на стадии 3-5 настоящих листьев при чётком проявлении всех маркерных признаков.

2) Техника сбора пыльцы, кастрации и гибридизации.

Гибридизацию проводили путём предварительной кастрации бутонов материнской формы (Mo504) и изоляцией ватным изолятором с последующим опылением свежей пыльцой *L. hirsutum* в соответствии со схемой скрещивания.

Опыление проводили в утренние часы. В некоторых случаях опыление проводили через 1-2 дня после кастрации. В отдельных случаях проводили доопыление.

3) Техника выделения семян из плодов.

Выделенные из плодов семена сбрасывали в ёмкостях с соком (ферментация). Признак окончания брожения – появление плёнки и осветление сока. Перебродившие семена опускаются на дно. После ферментации семена промывают и сушат [29].

4) Определение фертильности пыльцы.

Фертильность пыльцы определяли ацетокарминовым методом на свежем материале. Для анализа фертильности отбирали по 3 пыльника из разных полностью раскрывшихся цветков одного растения. Свежесобранные пыльники заливали ацетокармином и оставляли на сутки при комнатной температуре. Затем пыльник помещали на предметное стекло и измельчали препаровальными иглами под бинокулярной лупой в капле ацетокармина, затем удаляли ткани пыльника пинцетом, накрывали покровным стеклом, слегка давили и подогревали на пламени спиртовки, после чего просматривали под микроскопом [47].

Фертильными считали зерна с равномерно окрашенной цитоплазмой розового цвета, стерильными – зерна, не окрашенные ацетокармином или окрашенные неравномерно.

Анализировали не менее 300 пыльцевых зерен на препарат.

5) Анализ расщепления, статистическая обработка результатов.

Для объективной оценки значимости отклонений при гибридологическом анализе использовали метод χ^2 : $\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$, где Σ – сумма результатов по всем классам, наблюдаемым в эксперименте, O – наблюдаемое, E – ожидаемое. Полученное значение сравнивается с табличным при определённых степенях свободы (обычно это: общее число классов-1) и уровне значимости. Если вычисленное значение χ^2 не превышает табличного, то можно утверждать, что

отклонения от теоретически ожидаемого соотношения вызваны случайными причинами и исходная гипотеза подтверждается [48].

частота рекомбинации (rf) – доля рекомбинатов от общего количества потомков. Согласно С. Дарлингтону, она равна сумме гаплоидного числа хромосом (n) и количества хиазм (x) в одной мейотической клетке (тогда возможное количество рекомбинационных гамет – 2^{n+x}). rf прямо пропорциональна расстоянию между генами на хромосоме – в генетическом картировании она принимается за единицу расстояния на генетической карте (единицу рекомбинации).

rf – количественная мера для определения частоты генетических рекомбинаций у потомков любой группы скрещиваемых между собой особей.

Чем выше rf, тем выше число новых генных комбинаций, которые возникают благодаря расщеплению и рекомбинациям за определённое число поколений.

Чем ниже rf, тем дольше в ряду поколений сохраняется благоприятная (определённая или данная) комбинация генов [33, 49, 50].

Анализ расщепления F_2 проводили на сеянцах в стадии 3-5 настоящего листа по следующим признакам: тип роста, проявление опушения, проявление антоциана во всех частях растения. Расчёт частоты rf в расщепляющейся популяции проводили методом извлечения квадратного корня из доли двойных рецессивов, а также методом произведений [58].

6) Методика морфологического описания растений [51, 52].

Описание растений проводили по следующим признакам (в соответствии с методикой): тип куста, опушение стебля, тип листа, окраска листьев, форма и рассечённость края долей, поверхность листовой пластинки, опушение листа, тип и длина соцветия, количество цветков в соцветии, высота заложения первого соцветия, фертильность пыльцы, форма, индекс, величина, поверхность, опушение и окраска плода, камерность плода, содержание сахара в плодах, параметры элементов цветка.

7) Отбор пыльников для цитологического анализа; фиксация материала.

Бутоны отбирали в утренние или вечерние часы. Оптимальный размер бутонов подбирался опытным путём, учитывая, что мейоз проходит в пыльниках размером 1-1,5 мм. Затем их сразу помещали на сутки в фиксатор Кларка (3:1) (этиловый спирт,

96%-й – 3 части; ледяная уксусная кислота – 1 часть). После фиксации материал промывали в трёх сменах 96%-го спирта по 30 мин в каждой до исчезновения запаха уксусной кислоты, затем его переносили в 70% этиловый спирт для хранения при +4°C. Перед приготовлением препаратов бутоны промывали в дистиллированной воде [47].

8) Методика приготовления препаратов.

Для цитологического изучения мейоза препараты готовили методом «распластывания» клеток. Проводили анализ клеток, находящихся в стадии диакинеза - метафазы-1.

Приготовление постоянных препаратов из пыльников.

Для получения качественных препаратов предметные стёкла предварительно выдерживали в 5 н HCl 30 мин, а затем непосредственно перед приготовлением – в 96% спирте. Предварительно отобранные и зафиксированные пыльники промывали в проточной воде в течение 15 мин и помещали в 0,6% раствор ферментов (целлюлаза, пектиназа, мацеразим, 1:1:1), приготовленные в цитратном буфере (pH=4.0), на 3 ч при 37°C. Пыльник вынимали из ферментов и дробили его на предметном стекле препаровальными иглами под бинокляром в капле 60% уксусной кислоты. Полученную суспензию окаймляли фиксатором 3:1 и затем добавляли каплю фиксатора в центр суспензии. Приготовленный препарат ополаскивали в 96% спирте. Контроль эффективности действия ферментов осуществляли под микроскопом по приготовленным препаратам [47].

Приготовленные постоянные препараты окрашивали в 1% растворе красителя Гимза, приготовленном в фосфатном буфере (pH – 6,8). Время экспозиции для пыльников – 25 мин.

9) Техника цитологического анализа.

Цитологический анализ проводили на световом микроскопе Zeiss Axiolab с фотонасадкой MC 80 DX. Препараты анализировали при увеличении 40^x, 63^x и 100^x. По каждому образцу анализировали не менее 50 клеток. Фотографирование проводили на плёнку ФоМос. Вегетирующие растения, введённые в стерильную культуру, а также регенеранты фотографировали как на цветную плёнку Kodak

фотоаппаратом «Зенит», так и на цифровую фотокамеру Olympus Camedia. Полученные снимки обрабатывали при помощи программы Adobe Photoshop 7.0.

10) Отбор и стерилизация материала для введения в культуру *in vitro*.

Асептические условия работы.

Одно из основных условий успешного культивирования изолированных органов, тканей и клеток является соблюдение строгой стерильности, поскольку на искусственных питательных средах хорошо развиваются микроорганизмы, что представляет известную опасность. Во-первых, в результате жизнедеятельности микроорганизмов может существенно измениться состав питательных сред, во-вторых, изолированные от растения ткани и клетки легко повреждаются микроорганизмами. Поэтому все опыты проводят в стерильных помещениях ламинар – боксах, предварительно стерилизуя бокс, инструменты, посуду, растительный материал, питательные среды и все другие материалы.

Стерилизация ламинар – бокса.

Ламинар-боксы предназначены для культуры изолированных клеток, тканей и некоторых других работ, требующих стерильности. Стерильность обеспечивается с помощью бактериальных фильтров, установленных в ламинар - боксе, через которые нагнетается воздух. За 2 часа до начала работы ламинар - бокс облучают бактерицидными ультрафиолетовыми лампами. Предварительно в ламинаре размещают спиртовую горелку, зажигалку, емкости с 96%-ным спиртом и стерильной водой, а также прочее необходимое оборудование. Внутреннюю поверхность ламинара и внешние поверхности всего вносимого в ламинар оборудования протирают 70%-ным спиртом.

Перед работой в ламинар - боксе необходимо вымыть руки с мылом и протереть их спиртом.

Стерилизация посуды.

Вначале посуду тщательно моют с использованием детергентов. Вымытую посуду ополаскивают дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу. Чтобы избежать заражения простерилизованных предметов из воздуха, перед стерилизацией их заворачивают в оберточную бумагу (у стаканов, колб достаточно обернуть только горлышко).

Затем посуду помещают в сушильный шкаф и прогревают при 160 °С в течение 2 часов (с момент установки нужной температуры). За это время погибают не только бактерии, но и их споры. Еще более строгой стерилизации добиваются под давлением в автоклаве, поскольку влажный жар более губителен для микроорганизмов и спор. Посуду (стаканы с крышками, чашки Петри) заворачивают в фольгу или оберточную бумагу. Автоклавируют под давлением 2 атмосферы в течение 25-30 минут.

Стерилизация инструментов.

Предварительная стерилизация инструментов (скальпелей, пинцетов, игл и т.д.) заключается в нагревании сухим горячим жаром в сушильном шкафу в течение 2 часов при 140°С. Металлические предметы нельзя автоклавировать: под действием пара они ржавеют и тупятся. Непосредственно перед работой и в ее процессе инструменты (пинцеты, скальпели) еще раз стерилизуют в ламинаре, помещая их в емкость с 96%-ным этиловым спиртом и обжигая в пламени спиртовки. После чего каждый инструмент помещают между листами предварительно простерилизованной плотной бумаги, сложенной в пачку. Стерильный инструмент используют только для одноразовой манипуляции. Перед повторным употреблением его следует снова простерилизовать спиртом и обжечь. Очень тонкие инструменты стерилизуют, погружая в спирт.

Стерилизация материалов.

Вату, марлю, ватные пробки, бумажные матрасики, фильтровальную бумагу стерилизуют в автоклаве под давлением 2 атмосферы в течение 25-30 минут.

Стерилизация питательных сред.

Питательные среды плотно закрывают ватными пробками, заворачивают в фольгу, обворачивают оберточной бумагой и автоклавируют при температуре 120°С и давлении 1 атмосфера в течение 20 минут.

Стерилизация растительного материала

Полученные фрагменты стеблей отмывали мыльной водой, подсушивали и подвергали поверхностной стерилизации в течение 3-4 минут. В качестве стерилизатора использовали гипохлорит натрия (3:1). Затем стебли ополаскивали 3-5 раз стерильной дистиллированной водой.

11) Приготовление питательных сред.

Питательные среды для культивирования изолированных клеток и тканей должны содержать все необходимые растениям макроэлементы: азот, фосфор, калий, кальций, серу, магний, железо; микроэлементы: бор, цинк, медь, марганец и др., а также витамины, углеводы, фитогормоны. Кроме того, в состав питательных сред входит ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или ее натриевая соль, которые улучшают доступность железа для клеток в широких пределах pH. В качестве источника углерода, необходимого для гетеротрофного питания, используют сахарозу или глюкозу в концентрациях 20-40 г/л.

Твердые питательные среды готовят на агар-агаре. Он представляет собой полисахарид, получаемый из морских водорослей. К среде добавляют 0,7-0,9% агара.

С целью экономии времени готовят концентрированные растворы макросолей, микросолей, витаминов и фитогормонов, что позволяет многократно их использовать. Маточные растворы хранят в холодильнике при отрицательной температуре.

Маточные растворы солей готовят на дистиллированной воде и имеют следующий состав:

1) NH_4NO_3 , KNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (каждую соль растворяют в отдельном стаканчике при нагревании, а затем сливают и объем доводят до 1л, причем раствор $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ вливают последним без нагревания в охлажденную смесь, что предотвращает выпадение осадка);

2) CaCl_2 ;

3) Хелат железа (раствор FeSO_4 и $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, необходимый для образования хелата железа), нагретый до кипения;

4) Микроэлементы.

Полученные растворы макро- и микроэлементов сливают в склянки с притертой пробкой (хелат железа – в темную склянку), снабжают этикеткой и помещают в холодильник.

Для приготовления концентрированных растворов витаминов берут 10^x навески и растворяют их (каждый витамин в отдельности) в 10 мл воды; 1 мл

содержит порцию витамина, необходимую для приготовления 1 л раствора. Хранят растворы во флакончиках в замороженном состоянии.

Растворы фитогормонов готовят следующим образом: берут 10 мг вещества, ауксины растворяют в 0,5-2,0 мл этанола, цитокинины – в небольшом количестве 0,5 н. HCl или KOH. Затем растворы подогревают и заливают водой до объема 100 мл (1мл содержит 1 мг гормона). В холодильнике их можно хранить при температуре 4 °C не больше 1 месяца.

Процесс приготовления питательной среды следующий: в химический стакан емкостью 1 л помещают 30 г сахарозы, доливают дистиллированной водой примерно до 400 мл и после растворения сахарозы добавляют необходимые количества маточных растворов макро -, микросолей, витаминов и гормонов; также прибавляют агар. Измеряют pH, доводят до 5,5-5,8 с помощью 0,1%-ого раствора HCl или KOH.

Таблица 1

Состав среды Мурасиге и Скуга [53].

Компоненты сред	мг/л	Компоненты сред	мг/л
Макросоли		Микросоли	
NH ₄ NO ₃	1650	H ₃ BO ₃	6,2
KNO ₃	1900	MnSO ₄ x H ₂ O	22,3
NaH ₂ PO ₄	170	ZnSO ₄ x H ₂ O	8,6
CaCl ₂ x H ₂ O	440	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025
MgSO ₄ x 7H ₂ O	370	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25
Органические добавки		CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025
Сахароза	50000	KY	0,83
Мио-инозитол	100	FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,8
Тиамин HCl	1	Na ₂ EDTA	37,3
PP (никотиновая к-та)	0,5		
Пиридоксин HCl	0,5		
Глицин	2,0		

12) Методы введения и поддержания растений в стерильной культуре.

Получение стерильной культуры гибридов *in vitro* начали с подбора питательной среды для выращивания эксплантов. Известно, что состав питательной среды играет значительную роль в возникновении регенерантов. Изучение литературы показало, что для культивирования тканей томатов следует избегать сред, содержащих высокие концентрации минерального азота (среда Гамборга), так как происходит отмирание эксплантов. Малопригодны и среды Ульриха, Уайта с низким содержанием минеральных веществ. Оптимальной для регенерации томатов является среда Мурасиге — Скуга, модифицированная некоторыми исследователями по составу, содержащая концентрации регуляторов роста в соответствии с требованиями отдельных генотипов.

После стерилизации из фрагментов стеблей при помощи скальпеля в условиях ламинара извлекали пазушные меристемы, освобождали от прилегающих покровных тканей и высаживали на питательную среду.

Культивирование эксплантов на питательной среде и размножение полученных растений.

Для активации развития меристем и для микроклонального размножения использовали питательную среду Мурасиге-Скуга. Растения выращивали до образования 3-4 пар листьев, затем их черенковали таким образом, чтобы на каждом черенке присутствовало по одной пазушной почке, и высаживали в банки, где культивировали в течение 4 недель, после чего пересаживали на свежую среду. Условия световой комнаты: 16-и часовой световой день, температура – около 25 °С, освещенность-3000 люкс (белые люминесцентные лампы низкого давления ЛД).

13) Получение и укоренение регенерантов.

Техника высадки листовых дисков для регенерации.

Одна из важнейших задач при разработке методики генетической трансформации растений заключается в подборе подходящих эксплантов, из которых может произойти эффективная регенерация побегов.

Метод листовых дисков прост в исполнении и достаточно результативен, однако, существенным его недостатком то, что проведение регенерации происходит через каллусную ткань, а при культивировании каллуса томатов часто наблюдается

цитогенетическая нестабильность клеток. Для каллуса томатов характерны высокая ploидность клеток, различного рода нарушения в метафазе и анафазе. Подобная нестабильность обуславливает морфологическую неоднородность возникающих регенерантов, таким образом, делая возможным появление соматоклональных мутантов.

На молодых листьях делали насечки по центральной жилке, а также по боковым жилкам – там находятся скрытые точки роста, затем их помещали на питательную среду верхней стороной вниз. Чашки с эксплантами инкубировали при температуре +24 °C и 14-ти часовом световом дне.

Регенерировавшие растения вырезали из каллусной массы и пересаживали на свежую среду МС с содержанием ИМК.

14) Выделение плазмидной ДНК из *Agrobacterium tumefaciens* и *Escherichia coli*.

Плазмиду выделяли следующим методом:

1. выросшую культуру (~30ml) центрифугировать (C) 5' 14000rpm 4 C и удалить супернатант.
2. Добавить и ресуспендировать: 2 мл (1V) раствора №1 (можно ice cold) (50mM Glucose, 10mM EDTA, 25mM TrisCl (pH=8,0), 1-5 mg/ml Лизоцима. Большая концентрация лизоцима уменьшает время инкубации. Инкубация 30' r.t. – при 1мг/мл Лизоцима.
3. Добавить и аккуратно перемешать переворачиванием 4 мл (2V) solution №2 (0,2M NaOH / 1% SDS) (после однократного приготовления раствор держать всегда плотно закрытым). Инкубация при комн. т-ре 10-30 минут с постоянным перемешиванием покачиванием, пока раствор не станет гомогенным/прозрачным вследствие лизирования.
4. Добавить и аккуратно перемешать переворачиванием 3 мл (1,5V, важно соблюсти пропорции для получения необходимого pH) cold 3M KOAc (pH=4,8) – при смешивании с SDS выпадает в осадок, в отличие от NaOAc. Инкубация 20' on ice (by -20 C). При необходимости на льду можно держать несколько часов.
5. Встряхнуть как следует (как шампанское), C 10' 14000rpm комн. темп., slowly start and stop.

6. Перенести супернатант в новую тару.
7. Добавить RNase A до конц. 20мкг/мл и инкубировать 20 мин при 37 С.
8. Добавить равный объём CHCl_3 , минуту перемешивать, при этом всё ненужное уйдёт в хлороформ (липиды, нерастворимые в воде, но в хлороформе, мембраны)
9. $\curvearrowright$ 5' 14000rpm комн. темп
повторить п.8 и 9.
10. Перенести водную фазу в новую тару.
11. Добавить равный объём изопропилового спирта (100%), ice cold (-20 С), и перемешать переворачиванием. Если малое количество ДНК – инкубировать на льду 5 мин.
12. $\curvearrowright$ 10' 14000rpm комн. темп
13. Удалить супернатант и высушить.
14. (сначала можно промыть 1 мл 70% EtOH) Добавить 336мкл MQ воды, растворить пеллет, добавить 64 мкл 5M NaCl, перемешать, добавить 400мкл 13% р-ра PEG8000 (ice cold). Инкубировать на льду 20-40 минут (дольше – лучше), можно оставить в холодильнике на ночь.
15. $\curvearrowright$ 15' 14000rpm 4 С и удалить супернатант.
16. промыть 1 мл 70% EtOH или 95%, но не меньше 70%. (Добавить спирт и встряхнуть, чтобы бляшка отстала от стенки).
17. $\curvearrowright$ 5' 14000rpm комн. темп, удалить супернатант.
18. Пеллет растворить в MQ и хранить при -20 С.

15) Ферментативное разрезание ДНК (работа с рестриктазами) и лигирование.

Инкубация с соответствующей рестриктазой в буфере - 1,2 часа при 37 °С.

Результат рестрикции проверяли, добавив к 1V смеси 1/5V бромфенолового синего, затем нанесли на агарозный гель (1,3%) и разгоняли при 70 Вольт.

Лигирование проводили, помещая смесь ДНК и лигазы в соответствующем буфере в лёд. Инкубация при комнатной температуре 12 часов.

16) Приготовление агарозного геля.

1. Взвесить необходимое количество агарозы;

2. Долить буфер до нужного объёма (измерять по весу; объём, занятый агарозой вы учитываете, не сбрасывая на "0" в п.1);
3. Сбросить весы на "0";
4. Агарозу довести до кипения, кипятить 30-60";
5. Банку поместить на весы, довести вес до "0" добавляя H₂O mQ;
6. Остудить до 50-60°C (можно спокойно держать банку в руках), лучше с покачиванием;
7. Залить плашки, дать агарозе застыть в течении 0.5-1h.

17) Клонирование в *E. coli*.

Разморозить компетентные клетки во льду. Добавить охлаждённую предварительно ДНК (200пг-10нг в объёме 1-5 мкл). Инкубировать во льду в течение 30 мин, периодически встряхивая. Сделать температурный шок, поместив пробирки на 30" в водяную баню с температурой +42 °C. Вернуть пробирки в лёд и через 5' добавить в них 800 мкл среды SOB без Mg²⁺, а также 10 мкл 2М раствора Mg²⁺ и 10 мкл 2М глюкозы. Инкубировать клетки 60' при +37 °C и высеять на чашки Петри с селективной средой.

18) Трансформация *Agrobacterium tumefaciens* плазмидной ДНК (трёхродительское скрещивание).

1. В одну ёмкость помещаем ночную культуру:
200 мкл *E. coli* HB101 с плазмидой PRK 2013 (хелпер);
200 мкл *E. coli* JM109 с плазмидой ps/nt-RecA+;
200 мкл *A. tumefaciens* GV3101.
2. Осадить 5' при 5000об/мин
3. Супернатант слить, оставив на дне немного, и ресуспендировать осадок.
4. Высадить на селективную среду.

19) Выращивание бактериального штамма.

Штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 выращивали на среде LB с соответствующими антибиотиками и сахарозой для поддержания плазмиды.

Состав LB среды

На 1 л:

-пептон 140 - 10г;

- дрожжевой экстракт – 5г;
- NaCl – 5г;
- сахароза – 5г.

Для поддержания плазмиды на 100 мл LB добавляли 100 мг/л карбеницилина. Штамм поддерживали на твердой среде LB (2% агара) того же состава для поддержания плазмиды и вставки при температуре 2 °С. На свежую среду штамм пересаживали каждые 4 недели.

2.5 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1.Создание отдалённого гибрида и его цитогенетическая характеристика.

1.1 Завязываемость плодов при гибридизации.

Скрещивания культурного томата с волосистым, как правило, являются удачными, несмотря на то, что эти виды относятся к разным группам – красно- и зелёноплодных томатов, соответственно. В наших опытах, прежде всего из-за высокой температуры, завязываемость плодов оказалась очень низкой (2,11 %) (табл. 2). По литературным данным, оптимальная температура для роста томатов +22-+25°C, а при температуре +36°C рост приостанавливается из-за прекращения процессов ассимиляции и усиленного расхода углеводов на дыхание [37, 44]. В теплице же во время проведения опыта в отдельные дни температура достигала +45°C.

Таблица 2

Завязываемость плодов при получении гибридных семян.

Комбинация скрещивания:	Количество опылённых цветков	Количество завязавшихся плодов
<i>Lycopersicon esculentum</i> (Мо 504) х <i>Lycopersicon hirsutum</i> Humb. et Bonpl. (CGN 15878)	190	4

В каждом гибридном плоде завязалось от нескольких до 10шт. гибридных семян, которые в дальнейшем были использованы в нашей работе.

1.2 Морфологическая характеристика.

Проведено морфологическое описание и сравнение гибридных и родительских растений. Полученные гибридные растения обладали промежуточным фенотипом по некоторым признакам, в т.ч. по типу соцветия, а также по индексу, окраске и массе плода.

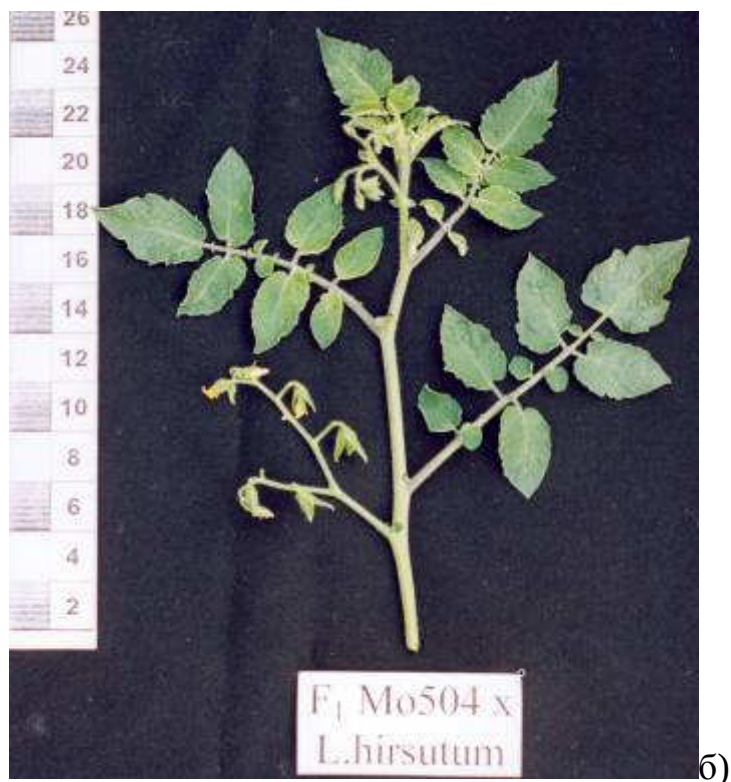


Рисунок 6. Внешний вид гибрида *F₁ Lycopersicon esculentum (Mo 504) x Lycopersicon hirsutum* Humb. et Bonpl. (CGN 15878): а)-плод, б)-побег.

Из расщепляющейся популяции F_2 были отобраны растения всех фенотипических классов по маркерным признакам. У этих растений на более поздних стадиях вегетации можно было наблюдать проявление остальных маркерных признаков *Mo 504*, таких, как *s* и *bk* (рис. 7).



Рисунок 7. Проявление генов *s* – сложное соцветие (слева) и *bk* – плод с кончиком (справа) в расщепляющейся популяции F_2 .

Таблица 3

Результаты изучения морфологии, фертильности, и некоторых биохимических свойств растений F_1 и F_2 .

	Mo 504	<i>L. hirsutum</i> CGN 15878	F_1	F_2	F_2	F_2	F_2	F_2	F_2	F_2	F_2
			1	2 1	2 2	2 3	2 4	2 5	2 6	2 7	2 8
Тип куста	Индетерминантный										
Опушение стебля	Есть										
Тип листа	Сорт-эталон <i>Marmande</i> , <i>Lucullus</i>										
Рассечённость края долей	Слаборассечённый										
Форма долей	Широколанцетная										
Окраска листьев	Зелёная	Бледно-зелёная	Зелёная								
Поверхность листовой пластинки	Гофрированная	Гладкая	Слабогофрированная	ладкая	Слабогофрированная	ладкая	лабогофрированная	ладкая	лабогофрированная	ладкая	ладкая
Опушение листа	есть										
Тип соцветия	Очень сложное	Полусложное	Сложное	Очень сложное	ложное	Очень сложное					
Длина соцветия (зрелые плоды)	10-15	18-25	12-25 см среднее	>25 см длинное	12см короткое	>25 см длинное	12см короткое	25 см длинное			
Цветки в соцветии, шт.	20-50	<20	15	20	50	-10	20	50	-10	20	

Высота заложения первого соцветия	15-18 см	50-70 см	Над 6-7 листом (невысока я)		ад 8-9 листом (средн яя	ад 10 листом и более (высок ая	Над 8-9 листом (средняя)		ад 10 листом и более (высок ая	Над 8-9 листом (сред няя)	
Характер заложения соцветия	Через 1-2 листа	Через 3 листа и более	Через 1-2 листа		ерез 3 листа и более	Через 1- 2 листа		ерез 3 листа и более	Через 1-2 листа		
Фертильность пыльцы, %	85	89	1,9	8 7,0	2,2	8,9	5,5	7 6,3	7,3	5,8	0,3
Тип плодоножки	С сочленением										
Форма плода	Удлинённая с носиком	Округлая	длинён ноовал ьная	Округлая							
Индекс плода (h+d)	-	1,2+1,8	,9+2,1	2 ,2+2,0			,0+2,1		,8+1,6	,5+1,7	,2+ 2,0
Окраска плода – <i>незрелого</i>	Светлозелёный	зелёный	ветлоз елёный	зелёный			ветлозе лёный		Зелёный		

<i>-зрелого</i>	Жёлтый	Зелёный	елёно- жёлто- бурый	К оричнев ый	ранжев ый		ранжев ый		елёно- Оранж евый	ледно- Оранж евый	лед нок рас ный
Величина плода, г	20	0,8-3	,46	4 ,73			,66		,6	,3	,8
Поверхность плода	гладкая										
Опушение плода	есть	есть	есть		ет		есть		ет	есть	
Камерность	2		1-3 малокамерные				1 -3		1-3 малокамерные		
Число – чашелистиков лепестков тычинок	5 5 5										
Длина – чашелистиков Лепестков Тычинок Пестиков (с завязью)			9 1 3 8 8	8 1 0 7 7	7 1 4 7 0	.5 1 4 9 1	8 6 2 6 7	8 1 5 9 1	0 0 0 8 8	1 5 9 8 0	8 1 0 1 1
Ширина – чашелистиков - лепестков			1 7	1 4	1 7	1 5 .3	1 .8 6	1 1 6	1 6	1 8	1 8 ,5
Содержание сахара в плодах, %			0	9	6				0	0,5	

1.3 Цитологическая характеристика.

Цитологический анализ мейоза гибрида первого поколения подтвердил предположения о наличии нарушений в метафазе I: при преобладании бивалентной конъюгации наблюдалась пониженная частота хиазмообразования. В целом же конъюгация хромосом гибрида F_1 ниже, чем у родителей.

Более чем в 41% клеток наблюдалась хотя бы одна пара унивалентов. При этом наибольшее количество унивалентов составило 14 на клетку, но доля таких клеток - лишь 0,24%. Процент клеток, в которых количество унивалентов было 8 и выше оказался также невысоким – 1,92% [54, 55].

Необходимо отметить, что всего среди 822 изученных клеток встретилось 36 вариантов хромосомных ассоциаций (табл. 4).

Частота образования хиазм составила в среднем 17,08 хиазм на клетку. При этом по данным А.А. Жученко конъюгация хромосом у гибридов первого поколения между культурным томатом и *Lycopersicon hirsutum* аналогична родительским видам, т.е. практически все хромосомы в диакинезе - метафазе I образуют биваленты, включая открытые и закрытые [37].

Таблица 4

Цитологический анализ диакинеза - метафазе I гибрида F_1 *L. esculentum* (Mo 504) x *L. hirsutum*

Хромосомная ассоциация	Номер препарата, количество клеток, шт.											
										0	и того:	
$8^{II}_3 + 4^{II}_0$			1								5 9	,08
$7^{II}_3 + 5^{II}_0$			8								9 2	1,04
$6^{II}_3 + 6^{II}_0$			1		4	4					1 31	5,72
$5^{II}_3 + 7^{II}_0$				4	0						5 4	,48
$5^{II}_3 + 6^{II}_0$											8	

$+2^I$			6						0		9	0,68
$4^{II}_3+8^{II}_0$			8					0			⁷ 4	,88
$2^{II}_3+3^{II}_0$ $+14^I$											2	,24
остальн ые	8		32	5	4	1	5	1	0	1	³ 21	9,88
Итого:											⁸ 22	00

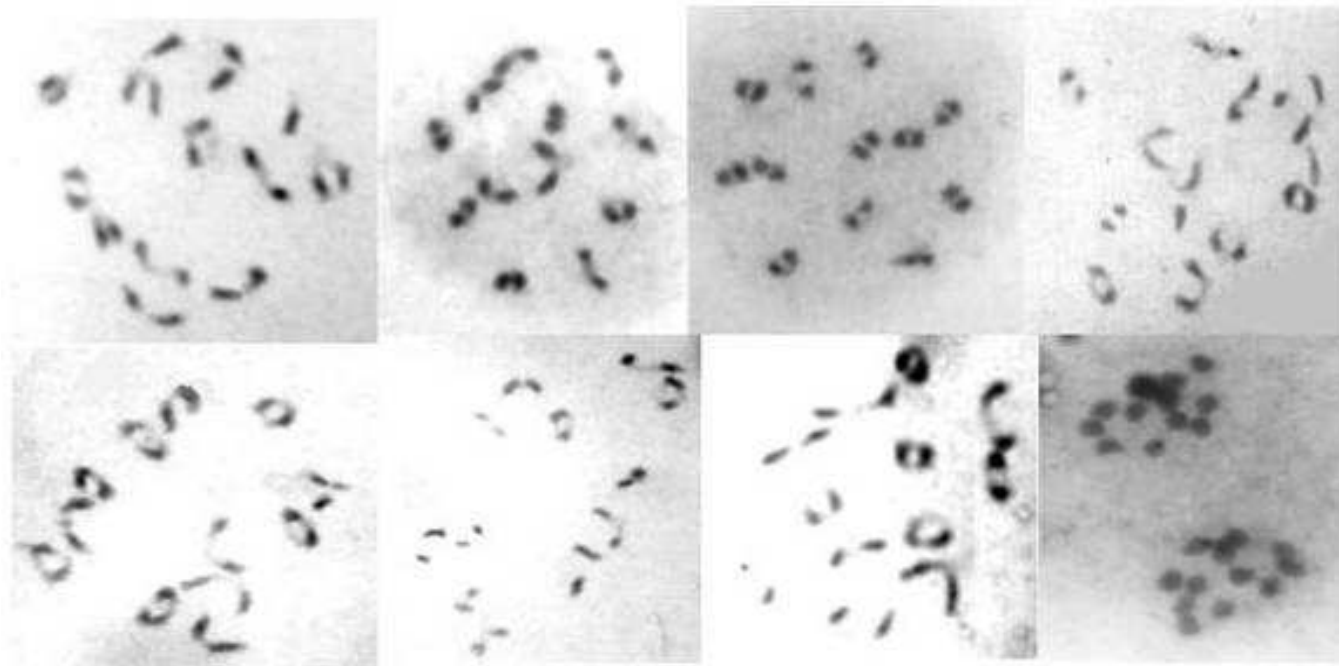


Рисунок 8. Метафаза I и Анафаза I (внизу крайний справа) мейоза гибрида F_1 *Lycopersicon esculentum* (Mo 504) x *Lycopersicon hirsutum* Humb. et Bonpl. (CGN 15878).

1.4 Наследование маркерных признаков в поколении F_2 .

При посеве F_2 наблюдалась всхожесть семян 72,6%. Анализ расщепления F_2 показал моногенный (3:1) характер наследования по всем трём изучаемым генам.

Анализ частоты рекомбинации между маркерными признаками в расщепляющейся популяции поколения F_2 показал, что расстояние между генами *Wo* и *aw* составило 12сМ, и между генами *aw* и *d* – 12сМ. Эти данные хорошо согласуются с данными генетической карты. Вероятно, это обусловлено

нормальной конъюнацией хромосомы 2 культурного томата с хромосомой 2 томата волосистого, несмотря на наличие нарушений в мейозе у гибрида F_1 .

2. Культивирование *in vitro*.

2.1 Введение в культуру *in vitro* и подбор оптимальных сред.

Осуществлено введение в культуру *in vitro* образцов гибридов F_1 *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon hirsutum*. На среду МС после стерилизации были посажены части стеблей томатов, содержащих пазушные меристемы. Для микроклонального размножения было опробовано несколько вариантов сред. Среда Мурасиге и Скуга без гормонов оказалась оптимальной для роста растений (табл. 5).



Рисунок 9. Томаты в культуре *in vitro*.

Таблица 5

Влияние БАП на рост пазушных меристем томата.

Варианты сред:	МС0	МС + 2,5мг/л 6-БАП	МС + 5мг/л 6-БАП
F_1 <i>L. esculentum</i> (Мо 504) x <i>L. hirsutum</i>	Хороший рост, листья до 5 см, хорошо выраженный стебель	Сильный рост каллуса, регенерационный рост слабый, листья 1-2 см.	Очень слабый рост, каллус, листья до 1 см

Эта среда позволяла получать регенеранты с хорошо развитыми листьями и стеблями, в то время как добавление 6-БАП вызывало образование каллуса.

3. Разработка реципиентной системы для осуществления генетической трансформации томатов.

3.1 Получение прямой регенерации и поиск оптимального соотношения компонентов среды и фазы развития растения для наилучшей регенерационной способности.

При подборе оптимальной среды для получения регенерантов, как и ожидалось, возникли трудности. В частности, обнаружилось, что на средах, ранее рекомендованных как наиболее подходящие для регенерации растений томатов, не удаётся получить прямой регенерации из листовых дисков [56; 57]. Нами было испробовано более 20 вариантов питательных сред. Все они были приготовлены на основе среды Мурасиге-Скуга и различались только по составу и концентрации гормонов. В отличие от культурного томата, по литературным данным *L. hirsutum* не обладает выраженной регенерационной способностью [57]. Поэтому возникшие трудности, возможно, объясняются влиянием его генома.

После этого, в результате экспериментального подбора сочетания гормонов в среде, был получен желаемый результат: наиболее подходящей оказалась среда, содержащая 2 мг/л 6-БАП, 0,2 мг/л ГК и 0,5 мг/л ИУК. Попытки модификации этой среды для уменьшения каллусообразования и увеличения выхода регенерантов результатов практически не дали (табл. 6). Лишь на среде 2,5 6-БАП; 0,2 ГК и 0,1 ИУК наблюдалась регенерация, причём интенсивность каллусообразования действительно снизилась. Однако выход регенерантов был всё же очень низким.

Таблица 6

Влияние соотношения фитогормонов на прямую регенерацию растений томата.

состав среды, мг/л (на основе МС)	время экспозиции, дней	результат
2.0 БАП; 0,2 ГК; 0,5 ИУК	30	прямая регенерация, образование каллуса
2.0 БАП; 0,2 ГК; 0,1 ИУК	30	роста нет

2.5 БАП; 0,2 ГК; 0,1 ИУК	30	прямая регенерация, образование каллуса
2.0 БАП; 0,5 ГК; 0,1 ИУК	30	роста нет
2.5 БАП; 0,5 ГК; 0,5 ИУК	30	роста нет

Регенерационная способность растений, как известно, зависит от очень многих факторов. Одним из таких является возраст растений. Дополнительную сложность при получении регенерантов создавало то, что растения к моменту проведения опыта уже более полутора лет находились в культуре *in vitro*. Показатели регенерации, характеризующие как среду, так и регенерационную способность растения, представлены в следующей таблице:

Таблица 7

Влияние возраста экспланта и соотношения фитогормонов на прямую регенерацию растений томата.

среда:	2.0 БАП 0,2 ГК 0,5 ИУК	2.0 БАП 0,2 ГК 0,5 ИУК	2.5 БАП 0,2 ГК 0,1 ИУК	2.5 БАП 0,2 ГК 0,1 ИУК
возраст растений, с которых были взяты листья, дни	31	21	31	21
число заложённых эксплантов	101	65	49	78
число полученных регенерантов	31	164	1	24
число регенерировавших эксплантов	9	19	1	8
% регенерации	8,9	29,2	2,0	10,3
число регенерантов на 1 исходный эксплант	0,31	2,5	0,02	0,31

среднее число регенерантов из одного регенерировавшего экспланта	3,4	8,63	1	1,3
--	-----	------	---	-----

Как видно из табл. 7, наиболее оптимальным вариантом является использование листовых дисков с 21-дневных регенерантов на среде с концентрациями фитогормонов: 6-БАП – 2мг/л, ГК – 0,2мг/л, ИУК – 0,5мг/л.

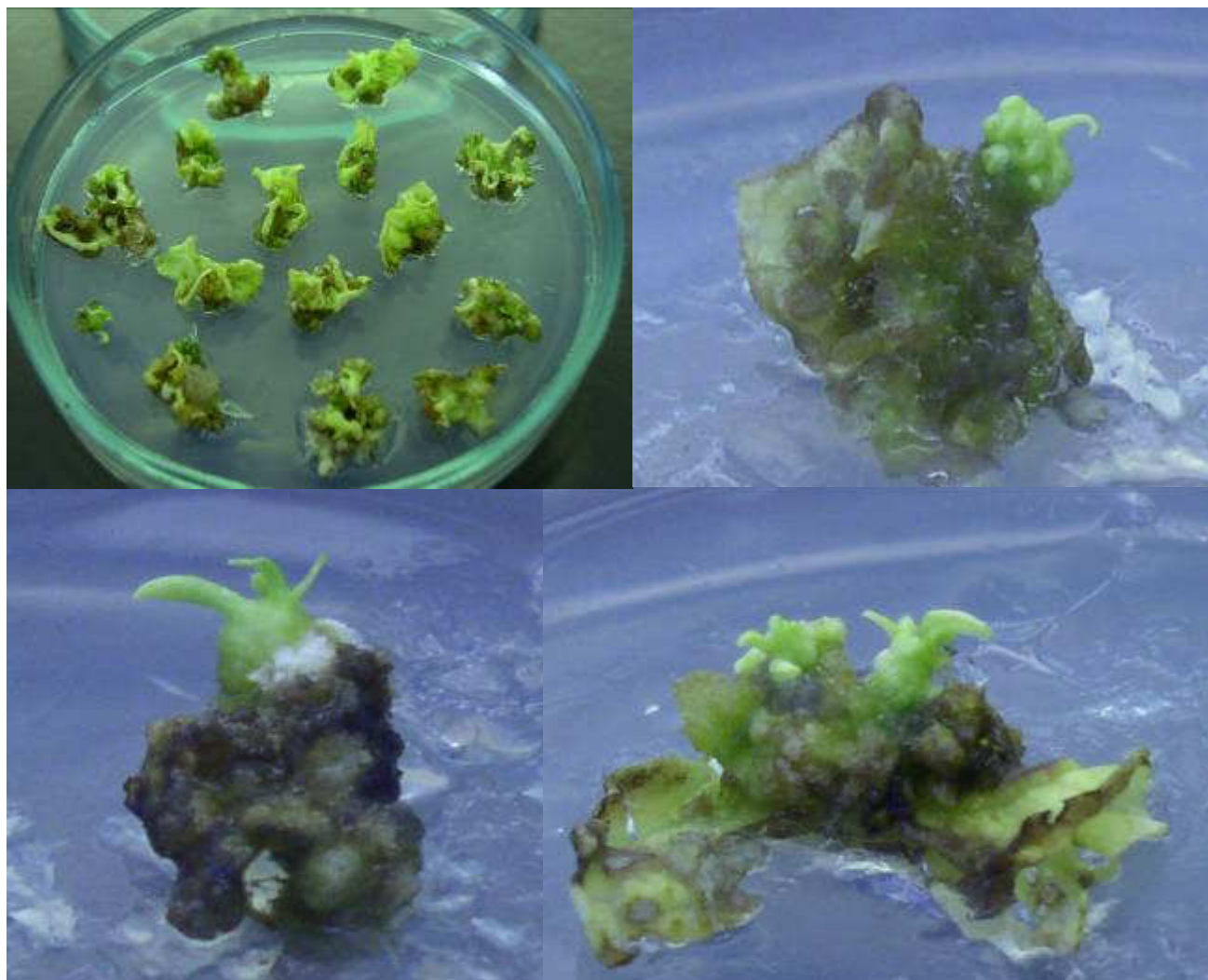


Рисунок 10. Прямая регенерация из листовых дисков.

Полученные регенеранты укореняли на среде с добавлением 0,5 мг/л ИМК и размножали микрочеренкованием. В настоящее время они продолжают поддерживаться в культуре *in vitro*.

4. Разработка селективной системы для отбора генетически трансформированных растений.

Известно, что чувствительность растений к антибиотикам зависит от их генотипа и возраста. Это определяет необходимость в каждом отдельном случае подбирать специфическую концентрацию антибиотика. В случае использования

плазмиды pS/nt-recA в качестве селективного агента в растениях применяется сульфадиазин.

Полученные данные, несмотря на некоторые противоречия результатов и недостаточную полноту проведённых исследований, позволили установить оптимальную для селекции и размножения трансформантов концентрацию сульфадиазина 105 мг/л (табл. 8). При использовании этой концентрации на месте срезов и в местах поранения эксплантов наблюдалось незначительное побеление тканей, а некротизация листовых высечек составила 50%. При данной концентрации антибиотика существенно замедлялся рост меристематических тканей в растениях.

Таблица 8

Изучение действия сульфадиазина на растения томата (через 14 дней после посадки).

концентрация, мг/л	пазушные меристемы, среда МС0	листовые высечки, среда МС0 + 2.0 БАП; 0,2 ГК; 0,5 ИУК
90	рост замедлен, 1-1,5 см	-
100	рост замедлен, 1-3 см	некротизация 90%
105	рост замедлен, 1-6 см	некротизация 50%
110	рост замедлен, 1-4 см	некротизация 100%
115	-	некротизация 100%
120	рост замедлен, 0,1-1 см	некротизация 100%
125	-	некротизация 90%
130	-	некротизация 100%

Полученные результаты вполне согласуются с подобными опытами, проведёнными на табаке [18, 19].

5. Подготовка штаммов *Agrobacterium tumefaciens* для трансформации.

Вектор для трансформации на основе штамма *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, содержащий плазмиду со встроенным гесА-геном, сшитым с сигналом ядерной локализации, были получены из института Макса Планка (Германия) [18;

19]. В качестве контроля выступит модифицированная нами плазмида, идентичная вышеописанной, в которой отсутствует кассета *recA*, состоящая из промотора CaMV35S, сигнала ядерной локализации, целевого гена и терминатора - сигнала полиаденилирования.

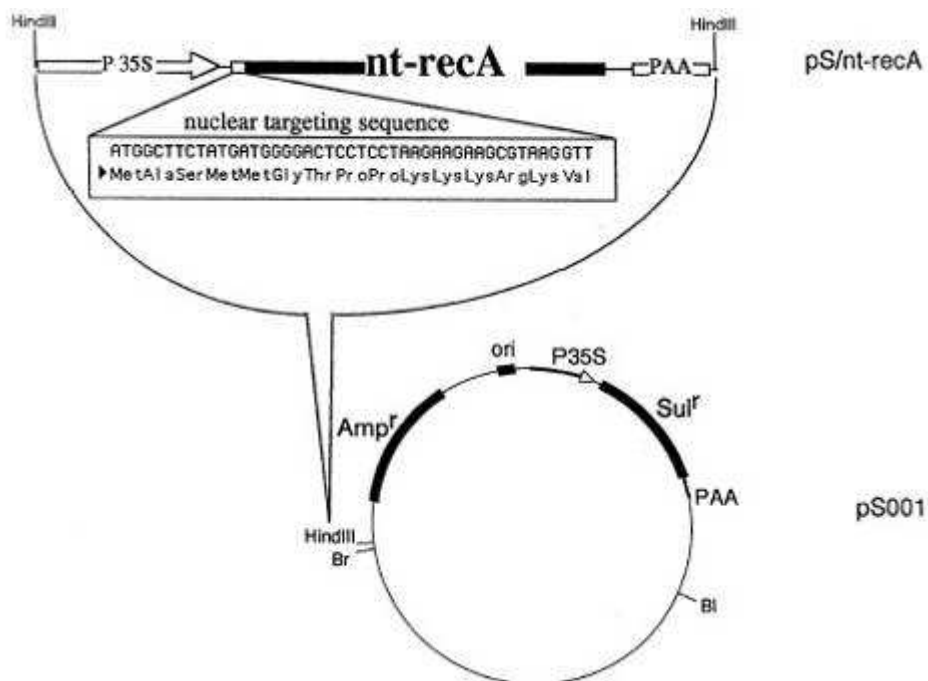


Рисунок 11. Генетическая карта плазмиды pS/nt-recA вектора для трансформации на основе штамма *Agrobacterium tumefaciens* GV3101.

2.6 ВЫВОДЫ

1. Создан отдалённый гибрид F_1 *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon hirsutum*.

2. Отдалённый гибрид F_1 *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon hirsutum* характеризуется пониженной частотой хиазм в пахитене – метафазе I, что обусловлено частичной утратой гомологии хромосом родительских видов, выражающейся в появлении открытых бивалентов и унивалентов в MI.

3. Оптимальной средой для микроклонального размножения отдалённого межвидового гибрида является среда Мурасиге-Скуга без добавления гормонов.

4. Для получения прямой регенерации из листовых дисков необходимо культивирование листовых высеков 21-дневных растений на среде Мурасиге-Скуга с добавлением фитогормонов: 6-БАП – 2мг/л, ГК – 0,2мг/л, ИУК – 0,5мг/л.

5. Для отбора трансформантов на селективной среде оптимальной концентрацией антибиотика сульфадиазина является 100-105 мг/л.

6. Отработаны все этапы для проведения генетической трансформации отдалённого гибрида томата.

7. Цитогенетическое изучение (цитологический анализ мейоза и гибридологический анализ наследования маркерных признаков), а также удовлетворительная регенерационная способность свидетельствуют о возможности использования межвидового гибрида *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon hirsutum* в качестве модельного объекта при генетической трансформации с целью повышения генетического разнообразия.

Список использованной литературы:

1. Sun Hun Park et al. 2003. J Plant Physiol
2. McCormick S. et al. 1986. Plant Cell Rep 5:81-84
3. Chyi Y.S., Phillips G.C. 1987. Plant Cell Rep 6:105-108
4. Ling H.-Q. et al. 1998. Plant Cell Rep 17:843-847
5. Pozueta-Romero J. et al. 2001. Plant Cell 67:173-180
6. Намсараев Е.А. и др. 1995. Молекулярная Биология, том 29, вып. 4
7. Churchill J.J. et al. 1999. Genes Dev 13:901-911
8. Anderson L.K. et al. 1997. Proc Natl Acad Sci USA 94:6868-6873
9. Schwarzacher T. 2003. J Exp Bot 54:11-23
10. Baumann P., West S.C. 1998. TIBS 23
11. Лосева Е.Ф. и др. 1996. Генетика, том 32, вып. 4
12. Engelhardt P. et al. 1991. Biopolymers and Cell 7:13-20
13. Bleuyard J.-Y., White C.I. 2004. The EMBO Journal 23:439-449
14. Puchta H. 2000. DNA-Recombination im Kerngenom hoeherer Pflanzen
15. Башкиров В.И. и др. 1993. Генетика, том 29, вып. 12
16. Kato R., Kuramitsu S. 1999. Eur J Biochem 259:592-601
17. Weinstock G.M. 1981. J Biol Chem 256:8845-8849
18. Reiss B. et al. 1996. Proc Natl Acad Sci USA 93:3094-3098
19. Reiss B. et al. 2000. Proc Natl Acad Sci USA 97:3358-3363
20. Албертс Б. и др. 1994. Молекулярная биология клетки (в 3-х томах), 2-е изд. Мир, Москва
21. Жученко А.А. и др. 2003. Генетика. Колосс, Москва
22. Kornberg A., Baker T.A. 1992. DNA Replication, 2nd ed.
23. Stryer L. 1995. Biochemistry, 4th ed.
24. McEntee K. et al. 1981. J Biol Chem 256:8835-8844
25. Рыбчин В.Н. 1999. Основы генетической инженерии, 2-е изд. СПбГТУ, Санкт-Петербург
26. Сингер М., Берг П. 1998. Гены и геномы (в 2-х томах). Мир, Москва

27. Карпеченко Г.Д. 1971. Избранные труды. Наука, Москва
28. Гужов Ю.Л. и др. 1999. Селекция и семеноводство культивируемых растений, 2-е изд. Изд-во Российского университета дружбы народов, Москва
29. Прохоров И.А. и др. 1997. Селекция и семеноводство овощных культур, 2-е изд. Колосс, Москва
30. Brozmanova J. et al. 1991. Mol Gen Genet 227(3):473-480
31. Shalev G. et al. 2000. Proc Natl Acad Sci USA 96:7398-7402
32. Янушкевич С. И. 1985. Использование арабидопсис в практических занятиях по общей генетике. Изд-во Московского Университета, Москва
33. Глазко В.Н., Глазко Г.В. 2001. Русско-англо-украинский толковый словарь по прикладной генетике, ДНК-технологии и биоинформатике. КВИЦ, Киев
34. Brigitzer P. et al. 1998. Theoretical and Applied Genetics 96: 421-425
35. Dunal M.F. 1813. The Genus Lycopersicon. Aberdeen. The University Press
36. Luckwill, L.C. 1943. The Genus Lycopersicon: An Historical, Biological and Tax Survey of the Wild and Cultivated Tomatoes. Aberdeen Univ. Press.
37. Жученко А.А. 1973. Генетика томатов. «Штинница», Кишинев
38. Upadhya M.D., Majid D. 1964. Ind J Genet Plant Breeding 24, 3:244-251
39. Gottschalk W. Die Chromosomenstruktur verschiedener Wildtomaten im Vergleich zur Kultur tomate. TGCR No. 5
40. Grube et al. Genetics 155(2):873
41. Parella G. et al. 1996. TGCR No. 46
42. Sacks E.J., Clair D.A.St. 1998. Euphytica 101:185-191
43. Sawant A.C. et al. TGCR No. 6
44. Жученко А. А. и др. 1974. Дикie виды и полукультурные разновидности томатов и их использование в селекции. Картя Молдовеняске, Кишинёв
45. Бочарникова Н. И., Козлова В. М. 1992. Мутантные формы томатов (каталог). «Штинница», Кишинев
46. Barton D.W. et al. 1955. Heredity 46:22-26

47. Барыкина Р.П. и др. 2004. Справочник по ботанической микротехнике. Изд-во Московского Университета, Москва
48. Инге-Вечтомов С.Г. 1989. Генетика с основами селекции. Высшая школа, Москва
49. Картель Н.А. и др. 1999. Генетика: Энциклопедический словарь. Тэхналогія, Минск
50. Арефьев В.А., Лисовенко Л.А. 1995. Англо-русский толковый словарь генетических терминов. ВНИРО, Москва
51. Мамонов Е. В. 2001. Сортной каталог. Овощные культуры. ЭКСМО-Пресс, Лик пресс, Москва
52. Методика проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность. Томат. 1997. Государственная комиссия РФ по испытанию и охране селекционных достижений.
53. Murashige T, Skoog F. 1962. *Physiol Plant* 15:473-497
54. Высотский С.М. Соловьёв А.А. 2002. Сборник студенческих научных работ. МСХА, Москва
55. Высотский С.М. 2002. Материалы научной генетической конференции. МСХА, Москва
56. Tatchell S., Binns A. *TGCR* No. 36
57. Сидоров В.А. и др. 1985. Соматическая гибридизация пасленовых. Наук. думка, Киев
58. Орлова Н.Н. 1991. Генетический анализ. Издательство Московского Университета, Москва