

КЛОНИРОВАНИЕ ФРАГМЕНТА ГЕНА МИСС-МАТЧ РЕПАРАЦИИ *MSH2* ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ТОМАТОВ

Креницына А.А.^{1,2}, Комахин Р.А.^{1,3}

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, 127550, e-mail: recombination@iab.ac.ru

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра высших растений, Москва, 119234

³Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева, факультет садоводства и ландшафтной архитектуры, кафедра ботаники, селекции и семеноводства садовых растений, Москва, 127550

Резюме

Система мисс-матч репарации поддерживает целостность генома путем коррекции неспаренных оснований, возникших в результате синтеза или повреждений ДНК, но ограничивает рекомбинацию между гомеологичными последовательностями ДНК. Подавление экспрессии гена мисс-матч репарации *MSH2* может повысить частоту кроссинговера между хромосомами разных видов томатов. Для эффективной РНК-интерференции генов *MSH2* у межвидовых гибридов необходимы знания об их нуклеотидных последовательностях в разных видах. В настоящей работе впервые установлены нуклеотидные последовательности, частично кодирующие II и IV, и полностью кодирующие III домены белка Msh2 у пяти дикорастущих видов томатов и культурного томата сорта «Марглоб». Показано наличие консервативной последовательности в III домене с ключевым остатком аргинина. Сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей подтвердило высокую степень консервативности генов *MSH2*. Обсуждаются возможности РНК-интерференции генов *MSH2* за счет использования нового промотора pro-SmAMP2, высокая активность которого отмечена в репродуктивных органах трансгенных растений.

Ключевые слова: томат, *Solanum lycopersicum*, рекомбинация, мейоз, кроссинговер, репарация, гены, ДНК, *MSH2*

Цитирование: Креницына А.А., Комахин Р.А. Клонирование фрагмента гена мисс-матч репарации *MSH2* из различных видов томатов. *Биомика*. 2018. Т.10(4). С. 336-343. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-43

CLONING OF THE MISMATCH REPAIR *MSH2* GENE FRAGMENT FROM VARIOUS TOMATO SPECIES

Krinitina A.A.^{1,2}, Komakhin R.A.^{1,3}

¹All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, 127550, e-mail: recombination@iab.ac.ru

²Department of Higher Plants, Moscow State University, Moscow, 119234

³Russian State Agrarian University – MTAA, Moscow, 127550

Resume

The miss-match reparation system maintains the integrity of the genome by correcting unpaired bases that result from the synthesis or damage of DNA, but limits the recombination between the homeological DNA sequences. Suppression of the expression *MSH2* miss-match repair gene may increase the crossing over frequency between the chromosomes of different species of tomatoes. For effective RNA-interference of *MSH2* genes in interspecific hybrids, knowledge of their nucleotide sequences in different species is necessary. In the present work, nucleotide sequences, partially encoding II and IV, and fully encoding the III domains of the Msh2 protein in five wild tomato species and a cultivar of the «Margolobe» variety have been established for the first time. Presence of a conserved sequence in the III domain with a key residue of arginine is shown. Comparison of nucleotide and amino acid sequences confirmed the high degree of conservatism of the *MSH2* genes. The possibility of RNA-interference of *MSH2* genes is discussed by using the new pro-SmAMP2 promoter, whose high activity is noted in the reproductive organs of transgenic plants.

Keywords: tomato, *Solanum lycopersicum*, recombination, meiosis, crossing over, repair, genes, DNA, *MSH2*

Citation: Krinitina A.A., Komakhin R.A. Cloning of the mismatch repair *MSH2* gene fragment from various tomato species. *Biomics*. 2018. V.10(4). P. 336-343. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-43 (In Russian)

Введение

Длительная селекция культурного томата *Solanum lycopersicum* L. исчерпала большую часть его биологического разнообразия. Донорами новых аллелей являются многочисленные дикорастущие виды томатов, которые скрещиваются с культурным томатом [Chetelat, Ji 2007]. У значительного числа межвидовых гибридов культурного и дикорастущих видов не обнаружено существенных нарушений синапсиса гомеологов и их сегрегации в мейозе, однако отмечено подавление кроссинговера, необходимого для формирования в потомстве рекомбинантов с кроссоверными хромосомами [Chetelat, Ji 2007].

Для запуска мейотического кроссинговера клетки по всему геному создают двухцепочечные разрывы (ДЦР) ДНК, репарация которых различными биохимическими путями используется для корректного завершения мейоза [Mézard et al., 2015]. Путь репарации ДЦР, известный как double-strand break repair, приводит к кроссинговерам, которые реализуются в виде обменов двухцепочечными участками ДНК между гомологами, и необходимы для их точной сегрегации в анафазе I [Page, Hawley, 2003]. В целом кроссинговеров между гомологами на порядок меньше, чем ДЦР [Basu-Roy et al., 2013]. Поэтому для поддержания целостности генома не преобразованные в кроссинговеры ДЦР репарируются либо по альтернативному пути synthesis-dependent strand annealing [McMahill et al., 2007], либо с использованием сестринской хроматиды в качестве матрицы [Goldfarb, Lichten, 2010], приводя к некроссоверным рекомбинационным продуктам. В случае кроссинговера или формирования некроссоверных рекомбинационных продуктов с использованием гомологов в качестве матрицы для репарации ДЦР возможно возникновение участков гетеродуплексной ДНК, содержащих неспаренные основания [Cole et al., 2012].

Система мисс-матч репарации (Mismatch Repair, MMR) обнаруживает и исправляет эти несоответствия, но из-за этой своей способности может разрушать гетеродуплексную ДНК при формировании кроссинговера и, таким способом, подавлять мейотическую рекомбинацию [Cole et al., 2012]. У отдаленных гибридов дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces paradoxus*) мутация гена мисс-матч репарации *MSH2* приводит к усилению мейотической рекомбинации и повышению жизнеспособности спор [Hunter et al., 1996], а у межлинейных гибридов арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) к усилению мейотического кроссинговера между гомологичными хромосомами [Emmanuel et al., 2006]. В то же время, исследования с использованием *Arabidopsis* не получили экспериментального продолжения на межвидовых гибридах, поскольку из-за различий в основном числе хромосом невозможно однозначно оценить влияние супрессии гена *MSH2* на кроссинговер между гомеологами. Подавление с помощью РНК-интерференции или биосинтеза мутантного белка *Msh2* экспрессии гена *MSH2* у линии культурного томата с дополненной хромосомой 8 от дикорастущего вида *Solanum lycopersicoides* Dunal, позволило на 3.8-

29.2 % повысить частоту кроссинговера между гомеологами [Tam et al., 2011]. Поскольку разные виды томатов содержат одинаковое число хромосом и неплохо скрещиваются друг с другом, а их межвидовые гибриды фертильны и в различной степени самосовместимы [Bedinger et al., 2011], то это дает основание использовать полученные ранее результаты для усиления кроссинговера между гомеологичными хромосомами непосредственно у межвидовых гибридов. Однако для реализации этой стратегии необходимо подавить экспрессию гена *MSH2* у межвидовых гибридов томатов либо описанными выше методами [Tam et al., 2011], либо с использованием более современного метода геномного редактирования CRISPR/Cas [Кулуев и др., 2017]. В последнем случае необходимо редактирование (нокаут-мутация) гена *MSH2* не только у культурного томата, но и у дикорастущего вида, с которым предполагается гибридизация с целью создания межвидовых гибридов с мутациями всех аллелей генов *MSH2*. В отличие от геномного редактирования, РНК-интерференция позволяет одновременно подавить экспрессию у межвидовых гибридов всех генов *MSH2*, однако для этого требуется выбрать в их последовательности идентичные участки, которые могут служить общей мишенью. Ранее из растений культурного томата изолировали полноразмерную нуклеотидную последовательность гена *MSH2*, методом молекулярного картирования показали, что этот ген существует в геноме в одной копии и располагается в хромосоме 6 [Tam et al., 2009]. Однако до настоящего времени нуклеотидные последовательности гена *MSH2* у других видов томатов не были секвенированы.

Целью наших исследований было установить нуклеотидные последовательности гена *MSH2* у разных видов томатов и оценить возможность их использования для подавления его экспрессии у межвидовых гибридов.

Материалы и методы

В работе использовали суммарную РНК из молодых листьев (3.5 ± 0.5 см) растений *Solanum habrohaite* S. Knapp & D.M. Spooner, *S. cheesmaniae* (L. Riley) Fosberg, *S. chilense* (Dunal) Reiche, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen, *S. corneliomuelleri* J.F. Macbr и *S. lycopersicum* сорта «Марглоб».

Выделение РНК и получение последовательностей кДНК целевых генов выполнили в соответствии с опубликованными ранее результатами, оптимизированными для томата [Комахин и др., 2010]. При получении кДНК использовали обратную транскриптазу M-MuLV согласно протоколу производителя («Thermo Fisher Scientific», США). В качестве праймера использовали oligo(dT)18, в качестве рибонуклеазного ингибитора в реакционную смесь добавляли RNAsin («Promega», США).

Полученную кДНК амплифицировали с применением праймеров antM2plus (5'-aagcttgatagccactcaccatt -3') и antM2minus (5'-ggatccgtttgtgtgcaattatg -3'). Дизайн праймеров выполнили с использованием последовательности

гена *MSH2* культурного томата [HM015771.1] и компьютерной программы Vector NTI Suite 8. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли на амплификаторе Терцик МС16 («ДНК-технология», Россия) с использованием смеси полимераз Encyclo и набора реактивов "Encyclo PCR kit" («Евроген», Россия). Температурный профиль ПЦР в ходе 30 циклов: начальная денатурация 94°C - 120 с, денатурация 94°C - 30 с, отжиг праймеров 61°C - 30 с, элонгация 72°C - 100 с. Праймеры для исследований синтезировали в центре коллективного пользования «Биотехнология» при ФГБНУ ВНИИСБ.

Продукты амплификации разделяли в 1% агарозном геле и клонировали в векторе pGEM-T согласно инструкции производителя («Promega», США). Секвенирование клонированных фрагментов ДНК (три клон для каждого из трех растений каждого вида томатов) осуществляли с использованием стандартных праймеров T7 и SP6 («Promega», США). Анализ полученных последовательностей осуществлялся при помощи программ BLAST, BioEdit 7.0 и MEGA 7.0.

Моделирование вторичной структуры доменов белка Msh2 осуществляли с помощью сервиса SWISS-MODEL [Waterhouse et al., 2018].

Результаты и обсуждение

Известно, что полноразмерная нуклеотидная последовательность кДНК гена *MSH2* культурного томата составляет 2832 п.н. [Tam et al., 2009]. При этом в его белке выделили пять основных консервативных доменов, которые включают в себя: N-концевой домен распознающий неспаренные основания (I), средний консервативный домен (II), центральный или основной домен (III), связывающий домен (IV), и консервативный C-концевой домен (V). Ранее при создании конструкции для РНК-интерференции в качестве мишени использовали последовательность кДНК гена *MSH2*, расположенную между 60 и 440 п.н. относительно иницирующего кодона ATG, нацеленную на I и II домены его белка [Tam et al., 2011]. Однако, поскольку эффективность этой конструкции оказалась низкой, то в данных исследованиях было решено уделить более пристальное внимание области гена, кодирующей II и III домены белка Msh2. Это предположение подкреплялось тем, что III домен содержит консервативную последовательность с ключевым остатком аргинина, мутации в которой нарушают работу белка [Wu and Marinus, 1994].

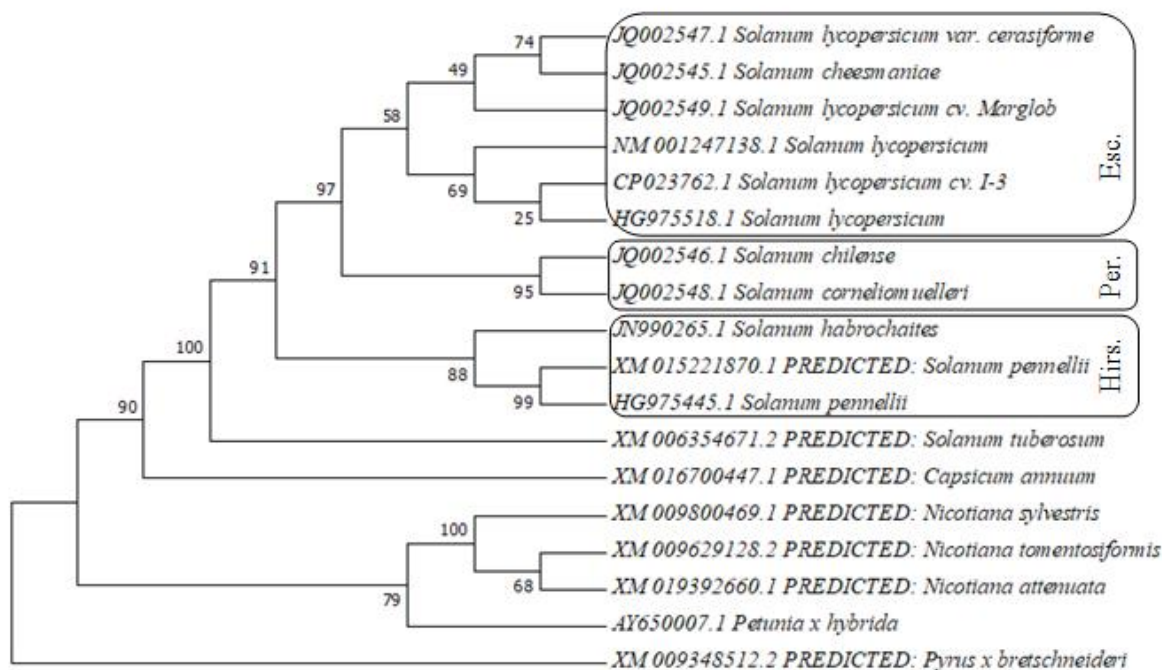


Рис. 1. Анализ методом максимального правдоподобия нуклеотидных последовательностей участка гена *MSH2*, кодирующего неполный II, III и неполный IV домены белка Msh2 различных видов томатов и других видов, относящихся к сем. Solanaceae (картофеля клубненосного (*Solanum tuberosum* L.), перца стручкового (*Capsicum annuum* L.), трех видов табака (*Nicotiana sylvestris* Spig & Comes., *N. attenuate* Torr. ex S. Wats, *N. tomentosiformis* Goodsp.) и петунии гибридной (*Petunia x hybrida* hort. ex Vilm.). В качестве внешней группы – последовательность *Pyrus x H. bretschneideri* Rehder. Рамками обозначены подгруппы «esculentum» (Esc.), «peruvianum» (Per.) и «hirsutum» (Hirs.) секции Lycopersicon.

Fig. 1. Analysis of the nucleotide sequences of the *MSH2* gene encoding incomplete II, III and incomplete IV domains of MSH2 protein of different types of tomatoes and other species related to family Solanaceae by the maximum likelihood method. Solanaceae (potato tuber (*Solanum tuberosum* L.), pepper (*Capsicum annuum* L.), three species of tobacco (*Nicotiana sylvestris* Spig & Comes., *N. attenuate* Torr. ex S. Wats, *N. tomentosiformis* Goodsp.) and Petunia hybrid (*Petunia x hybrida* hort. ex Vilm.). As the external group - sequence *Pyrus x H. bretschneideri* Rehder. The frames indicate the subgroups "esculentum" (Esc.), "peruvian" (Per.) and "hirsutum" (Hirs.) of section Lycopersicon.

С использованием последовательности гена *MSH2* [HM015771.1] культурного томата разработали праймеры antM2plus и antM2minus, ограничивающие его область между 530 и 1480 п.н. относительно иницирующего кодона ATG. С применением высокоточной полимеразы амплифицировали фрагменты кДНК ожидаемой длины 951 п.н. из генома растений видов *S. habrohaïtes*, *S. cheesmaniae*, *S. chilense*, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, *S. corneliomuelleri* и *S. lycopersicum*.

В результате секвенирования установили последовательности нуклеотидов, кодирующие II (частично), III и IV (частично) домены белков Msh2 у пяти дикорастущих видов томатов: *S. habrohaïtes* [JN990265.1], *S. cheesmaniae* [JQ002545.1], *S. chilense* [JQ002546.1], *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* [JQ002547.1], *S. corneliomuelleri* [JQ002548.1], и культурного томата [JQ002549.1], которые аннотировали в базе National Center for Biotechnological Information. При анализе полученных нуклеотидных последовательностей с использованием программы BLAST установили, что они консервативны и на 99% соответствуют части последовательности гена *MSH2* [HM015771.1] культурного томата и на 91% последовательности псевдогена *Phmsh2* [AY650010.1] петунии гибридной (*Petunia x hybrida*).

Сравнение нуклеотидных последовательностей между собой показало (рис. 1), что они объединяются в группы, в соответствии с тремя систематическими комплексами «esculentum» (красноплодные виды *S. cheesmaniae*, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* и *S. lycopersicum*), «reguvianum» (зеленоплодные виды *S. chilense* и *S. corneliomuelleri*) и «hirsutum» (зеленоплодные виды *S. habrohaïtes* и *S. pennellii*), которые предложили выделять на основании кладистического анализа последовательностей ядерной рибосомальной ДНК (5,8 S), RAPD-маркеров и полиморфизма микросателлитов [Marshall et al., 2001], а также полных транскриптомов этих видов [Pease et al., 2016]. Единичные нуклеотидные замены, однако, в некоторых случаях оказались значимыми и привели к изменению аминокислотного состава белков Msh2: D291N у *S. habrohaïtes*, *S. chilense* и *S. corneliomuelleri*; S474F у *S. corneliomuelleri*; L197V, G232D, D277E, A422V, R426K у *S. habrohaïtes* и S466F у всех изученных видов по сравнению с последовательностью Msh2 культурного томата сорта «VFNT Cherry» [HM015771.1] (рис. 2).

В результате оказалось, что по аминокислотному составу больше всего отличается от остальных последовательность *S. habrohaïtes*. Достаточно сильное отличие этого вида так же согласуется с его систематическим положением по отношению к остальным изучаемым видам [Moyle, 2008]. Анализ вторичной структуры II домена показал, что обнаруженные нами замены аминокислот в этом участке молекулы (L197V, G232D, D277E, D291N у *S. habrohaïtes* и D291N у *S. chilense* и *S. corneliomuelleri*) не приводят к нарушениям формирования регулярной вторичной структуры. В аминокислотной последовательности III домена так же присутствует консервативная последовательность из 39 а.о. с ключевым остатком аргинина [Tam et al., 2009], изменение которого в белке MutS у кишечной палочки

(*Escherichia coli*) приводит доминированию отрицательного фенотипа [Wu and Marinus, 1994]. Обнаруженные изменения аминокислотного состава не затронули этой консервативной последовательности у всех видов томатов, что свидетельствует о её функциональной значимости. Вторичная структура IV связывающего домена представляет собой две альфа-спирали, соединенные β-слоем [Drotschmann et al., 2002]. Замена S466F по расчетным данным не влияет на вторичную структуру IV домена всех изученных аминокислотных последовательностей. Однако, замена S474F, которая обнаружена нами в этом домене у *S. corneliomuelleri*, возможно, может приводить к его структурным изменениям и влиять на функцию молекулы, что требует дальнейших экспериментальных исследований.

В целом, полученные результаты о высокой степени сходства нуклеотидных последовательностей из различных, далеко отстоящих по систематическому положению видов, еще раз указывают на консервативность генов семейства *MSH*, а в частности на эволюционную стабильность последовательности, кодирующей белок Msh2 у растений.

Представленные результаты позволяют инициировать исследования направленные на создание нокаут-мутантов *msh2* томатов или трансгенных растений с пониженной экспрессией гена *MSH2*. Однако необходимо отметить, что у *msh2*-мутантов арабидопсиса наряду с увеличением частоты мейотического кроссинговера отметили геномную нестабильность в виде накопления у потомства разнообразных мутаций [Leonard et al., 2003]. Растения арабидопсиса с мутациями генов *MLH1* и *PMS1* системы MMR также демонстрировали снижение плодовитости и изменение частоты передачи потомству мутантных аллелей [Dion et al., 2007; Li et al., 2009]. Фенотипы растений семейства Solanaceae с мутациями гена *MSH2* в настоящее время не известны. Совокупность представленных результатов дает основание предполагать, что создание методом геномного редактирования растений томатов с мутациями всех аллелей гена *MSH2* может быть затруднительно или невозможно по причине их пониженной жизнеспособности. Ранее сообщалось, что РНК-интерференция гена *MSH2* у культурного томата не в полной мере подавляла его экспрессию в листьях, не влияла на фенотип растений, но и эффект от её использования для индукции мейотического кроссинговера был ограниченным [Tam et al., 2009]. В последней работе причина незначительных эффектов могла заключаться в использовании для РНК-интерференции вирусного промотора CaMV35S, эффективность которого в репродуктивных органах растений оставляет желать лучшего [Sunilkumar et al., 2002]. Ранее в наших исследованиях был разработан новый промотор pro-SmAMP2 из растения звездчатка белая (*Stellaria media* L.), который в трансгенных растениях табака (*Nicotiana tabacum* L.) был в два раза сильнее, чем вирусный промотор CaMV35S [Маджарова и др., 2018]. Кроме этого, оказалось, что промотор pro-SmAMP2 эффективен для экспрессии рекомбинантных генов в репродуктивных органах растений, поскольку результаты его активности были обнаружены, в том числе в микроспороцитах во время профазы I мейоза [Komakhin et al., 2016].

Клонирование фрагмента гена *MSH2* томатов

						
	125	135	145	155	165	175	
S habr	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----DSH
S ches	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----DSH
S chil	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----DSH
S l var cer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----DSH
S corn	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----DSH
S l	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----DSH
s1 msh2 ful	TPGNFGSFED	ILFANNEMQD	SPVIVALAPK	FDQNGCTVGL	GYVDITKRVL	GLAEFLDDSH	
						
	185	195	205	215	225	235	
S habr	FTNLESALVA	LGCREC V VPT	ETGKSSES R P	LYDAISRCGV	MVTERKKTEF	K DRDLVQDLG	
S ches	FTNLESALVA	LGCREC L VPT	ETGKSSES R P	LYDAISRCGV	MVTERKKTEF	KGRDLVQDLG	
S chil	FTNLESALVA	LGCREC L VPT	ETGKSSES R P	LYDAISRCGV	MVTERKKTEF	KGRDLVQDLG	
S l var cer	FTNLESALVA	LGCREC L VPT	ETGKSSES R P	LYDAISRCGV	MVTERKKTEF	KGRDLVQDLG	
S corn	FTNLESALVA	LGCREC L VPT	ETGKSSES R P	LYDAISRCGV	MVTERKKTEF	KGRDLVQDLG	
S l	FTNLESALVA	LGCREC L VPT	ETGKSSES R P	LYDAISRCGV	MVTERKKTEF	KGRDLVQDLG	
s1 msh2 ful	FTNLESALVA	LGCREC L VPT	ETGKSSES R P	LYDAISRCGV	MVTERKKTEF	KGRDLVQDLG	
						
	245	255	265	275	285	295	
S habr	RLVKG S VEPV	RDLVSS F ECA	AGALGCIL S Y	AELLAD E SNY	GN Y TVKQY N L	N SYMRLDSAA	
S ches	RLVKG S VEPV	RDLVSS F ECA	AGALGCIL S Y	AELLAD S SNY	GN Y TVKQY N L	DSYMRLDSAA	
S chil	RLVKG S VEPV	RDLVSS F ECA	AGALGCIL S Y	AELLAD S SNY	GN Y TVKQY N L	N SYMRLDSAA	
S l var cer	RLVKG S VEPV	RDLVSS F ECA	AGALGCIL S Y	AELLAD S SNY	GN Y TVKQY N L	DSYMRLDSAA	
S corn	RLVKG S VEPV	RDLVSS F ECA	AGALGCIL S Y	AELLAD S SNY	GN Y TVKQY N L	N SYMRLDSAA	
S l	RLVKG S VEPV	RDLVSS F ECA	AGALGCIL S Y	AELLAD S SNY	GN Y TVKQY N L	DSYMRLDSAA	
s1 msh2 ful	RLVKG S VEPV	RDLVSS F ECA	AGALGCIL S Y	AELLAD S SNY	GN Y TVKQY N L	DSYMRLDSAA	
						
	305	315	325	335	345	355	
S habr	MRALNV M ESK	SDAN K N F S L F	GLM N R T CTAG	M G K R LL H M W L	K Q PLLDVDEI	N C R L DLVQAF	
S ches	MRALNV M ESK	SDAN K N F S L F	GLM N R T CTAG	M G K R LL H M W L	K Q PLLDVDEI	N C R L DLVQAF	
S chil	MRALNV M ESK	SDAN K N F S L F	GLM N R T CTAG	M G K R LL H M W L	K Q PLLDVDEI	N C R L DLVQAF	
S l var cer	MRALNV M ESK	SDAN K N F S L F	GLM N R T CTAG	M G K R LL H M W L	K Q PLLDVDEI	N C R L DLVQAF	
S corn	MRALNV M ESK	SDAN K N F S L F	GLM N R T CTAG	M G K R LL H M W L	K Q PLLDVDEI	N C R L DLVQAF	
S l	MRALNV M ESK	SDAN K N F S L F	GLM N R T CTAG	M G K R LL H M W L	K Q PLLDVDEI	N C R L DLVQAF	
s1 msh2 ful	MRALNV M ESK	SDAN K N F S L F	GLM N R T CTAG	M G K R LL H M W L	K Q PLLDVDEI	N C R L DLVQAF	
						
	365	375	385	395	405	415	
S habr	VEDAAL R QDL	R Q HL K RISDI	ERL T H N L E RK	RASLL H V V KL	Y Q SGIRIPYI	K S VL E R Y DGQ	
S ches	VEDAAL R QDL	R Q HL K RISDI	ERL T H N L E RK	RASLL H V V KL	Y Q SGIRIPYI	K S VL E R Y DGQ	
S chil	VEDAAL R QDL	R Q HL K RISDI	ERL T H N L E RK	RASLL H V V KL	Y Q SGIRIPYI	K S VL E R Y DGQ	
S l var cer	VEDAAL R QDL	R Q HL K RISDI	ERL T H N L E RK	RASLL H V V KL	Y Q SGIRIPYI	K S VL E R Y DGQ	
S corn	VEDAAL R QDL	R Q HL K RISDI	ERL T H N L E RK	RASLL H V V KL	Y Q SGIRIPYI	K S VL E R Y DGQ	
S l	VEDAAL R QDL	R Q HL K RISDI	ERL T H N L E RK	RASLL H V V KL	Y Q SGIRIPYI	K S VL E R Y DGQ	
s1 msh2 ful	VEDAAL R QDL	R Q HL K RISDI	ERL T H N L E RK	RASLL H V V KL	Y Q SGIRIPYI	K S VL E R Y DGQ	
						
	425	435	445	455	465	475	
S habr	F V P L I K E R Y I	D S L E K W S D D N	H L N K F I A L V E	T A V D L D Q L E N	G E Y M I F S A Y D	P N L S A L K D E Q	
S ches	F A P L I R E R Y I	D S L E K W S D D N	H L N K F I A L V E	T A V D L D Q L E N	G E Y M I F S A Y D	P N L S A L K D E Q	
S chil	F A P L I R E R Y I	D S L E K W S D D N	H L N K F I A L V E	T A V D L D Q L E N	G E Y M I F S A Y D	P N L S A L K D E Q	
S l var cer	F A P L I R E R Y I	D S L E K W S D D N	H L N K F I A L V E	T A V D L D Q L E N	G E Y M I F S A Y D	P N L S A L K D E Q	
S corn	F A P L I R E R Y I	D S L E K W S D D N	H L N K F I A L V E	T A V D L D Q L E N	G E Y M I F S A Y D	P N L S A L K D E Q	
S l	F A P L I R E R Y I	D S L E K W S D D N	H L N K F I A L V E	T A V D L D Q L E N	G E Y M I F S A Y D	P N L S A L K D E Q	
s1 msh2 ful	F A P L I R E R Y I	D S L E K W S D D N	H L N K F I A L V E	T A V D L D Q L E N	G E Y M I F S A Y D	P N L S A L K D E Q	
						
	485	495	505	515	525	535	
S habr	ETLE Q Q I H N L	H R Q T -----	-----	-----	-----	-----	
S ches	ETLE Q Q I H N L	H R Q T -----	-----	-----	-----	-----	
S chil	ETLE Q Q I H N L	H R Q T -----	-----	-----	-----	-----	
S l var cer	ETLE Q Q I H N L	H R Q T -----	-----	-----	-----	-----	
S corn	ETLE Q Q I H N L	H R Q T -----	-----	-----	-----	-----	
S l	ETLE Q Q I H N L	H R Q T -----	-----	-----	-----	-----	
s1 msh2 ful	ETLE Q Q I H N L	H R Q T AND L D L	P I D K S L K L D K	G T Q F G H V F R I	T K K E E P K V R R	Q L N S H Y I V L E	

Рис. 2. Сравнение участка аминокислотных последовательностей, соответствующих неполному II, III и неполному IV доменам белка Msh2. Скобками показаны границы доменов, пунктиром выделена консервативная область домена III. Отличающиеся аминокислотные остатки выделены красным жирным шрифтом.

Fig. 2. Comparison of amino acid sequences corresponding to incomplete II, III and incomplete IV domains of MSH2 protein. The boundaries of domains are shown in brackets, the conservative area of domain III is marked with a dotted line. Different amino acid residues are highlighted in red bold.

Таким образом, поскольку различия между нуклеотидными последовательностями гена *MSH2* из разных видов томатов не существенны, то для РНК-интерференции этих генов у межвидовых гибридов может быть использована конструкция на основе последовательности гена культурного томата. Для ее экспрессии в микроспороцитах томатов целесообразно использовать промотор *pro-SmAMP2* из растения *S. media*.

Работа выполнена при поддержке средств государственного задания № 0574-2015-0005 (государственная регистрация № АААА-А17-117082950008-7).

Литература

- Комахин Р.А., Комахина В.В., Милюкова Н.А., Голденкова-Павлова И.В., Фади́на О.А., Жученко А.А. Трансгенные растения томата, экспрессирующие гены *recA* и *NLS-recA-licBM3*, как модель для изучения мейотической рекомбинации. *Генетика*. 2010. Т. 46. № 12. С. 1635-1644.
- Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., Баймиев Ан.Х., Вершинина З.Р., Князев А.В., Матниязов Р.Т., Гумерова Г.Р., Михайлова Е.В., Никоноров Ю.М., Чемерис Д.А., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. CRISPR/Cas редактирование геномов растений. *Биомика*. 2017. Т. 9. С. 155–182.
- Маджарова Н.В., Казакова К.А., Стрельникова С.Р., Снычева О.А., Ветчинкина Е.М., Ефремова Л.Н., Высоцкий Д.А., Бабаков А.В., Комахин Р.А. Промоторы *pro-SmAMP1* и *pro-SmAMP2* из дикорастущего растения *Stellaria media* для биотехнологии двудольных растений. *Физиология растений*. 2018. Т. 65. № 5. С. 388–400. DOI: 10.1134/S0015330318050202
- Basu-Roy S., Gauthier F., Giraut L. Mézard C., Falque M., Martin O.C. Hot Regions of Noninterfering Crossovers Coexist with a Nonuniformly Interfering Pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 2013. V. 195(3). P. 769–779. doi: 10.1534/genetics.113.155549
- Bedinger P.A., Chetelat R.T., McClure B., Moyle L.C., Rose J.K., Stack S.M., van der Knaap E., Baek Y.S., Lopez-Casado G., Covey P.A., Kumar A., Li W., Nunez R., Cruz-Garcia F., Royer S. Interspecific reproductive barriers in the tomato clade: opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation. *Sex Plant Reprod.* 2011. V. 24(3). P. 171-187. doi: 10.1007/s00497-010-0155-7
- Chetelat R.T., Ji Y. Cytogenetics and evolution. Razdan M.K., Mattoo A.K. (eds) Genetic Improvement of Solanaceous Crops. 2007. V. 1. Enfield: Science Publishers. P. 77–112.
- Cole F., Keeney S., Jasin M. Preaching about the converted: how meiotic gene conversion influences genomic diversity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2012. V.1267. P.95-102. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06595.x
- Dion E., Li L., Jean M., Belzile F. An *Arabidopsis MLH1* mutant exhibits reproductive defects and reveals a dual role for this gene in mitotic recombination. *Plant J.* 2007. V. 51(3). P. 431–440. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03145.x
- Drotschmann K., Hall M.C., Shcherbakova P.V., Wang H., Erie D.A., Brownwell F.R., Kool E.T., Kunkel T.A. DNA binding properties of the yeast Msh2-Msh6 and Mlh1-Pms1 heterodimers. *Biol. Chem.* 2002. V. 383(6). P. 969-975. doi: 10.1515/BC.2002.103
- Emmanuel E., Yehuda E., Melamed-Bessudo C., Avivi-Ragolsky N., Levy A.A. The role of AtMSH2 in homologous recombination in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO Rep.* 2006. V. 7(1). P. 100-105. DOI: 10.1038/sj.embor.7400577
- Goldfarb T., Lichten M. Frequent and Efficient Use of the Sister Chromatid for DNA Double-Strand Break Repair during Budding Yeast Meiosis. *PLoS Biol.* 2010. V. 8. 10. doi: 10.1371/journal.pbio.1000520
- Hunter N., Chambers S.R., Louis E.J., Borts R.H. The mismatch repair system contributes to meiotic sterility in an interspecific yeast hybrid. *EMBO J.* 1996. V. 15(7). P. 1726-1733.
- Komakhin R.A., Vysotskii D.A., Shukurov R.R., Voblikova V.D., Komakhina V.V., Strelnikova S.R., Vetchinkina E.M., Babakov A.V. Novel strong promoter of antimicrobial peptides gene *pro-SmAMP2* from chickweed (*Stellaria media*). *BMC Biotechnology*. 2016. V. 16. doi 10.1186/s12896-016-0273-x
- Leonard J.M., Bollmann S.R., Hays J.B. Reduction of stability of arabidopsis genomic and transgenic DNA-repeat sequences (microsatellites) by inactivation of AtMSH2 mismatch-repair function. *Plant Physiol.* 2003. V. 133(1). P. 328-38. doi: 10.1104/pp.103.023952
- Li L., Dion E., Richard G., Domingue O., Jean M., Belzile F.J. The *Arabidopsis* DNA mismatch repair gene *PMS1* restricts somatic recombination between homeologous sequences. *Plant Mol. Biol.* 2009. V. 69(6). P. 675–684. doi: 10.1007/s11103-008-9447-9
- Marshall J.A., Knapp S., Davey M.R., Power M.R., Cocking E.C., Bennett M.D., Cox A.V. Molecular systematics of *Solanum* section *Lycopersicon* (*Lycopersicon*) using the nuclear ITS rDNA region. *Theor. Appl. Genet.* 2001. V. 103(8). P. 1216-1222. DOI: 10.1007/s001220100671
- McMahill M.S., Sham C.W., Bishop D.K. Synthesis-Dependent Strand Annealing in Meiosis. *PLoS Biol.* 2007. V. 5. № 11. doi: 10.1371/journal.pbio.0050299
- Mézard C., Jahns M.T., Grelon M. Where to cross? New insights into the location of meiotic crossovers. *Trends Genet.* 2015. V. 31(7). P. 393-401. doi: 10.1016/j.tig.2015.03.008
- Moyle L.C. Ecological and evolutionary genomics in the wild tomatoes (*Solanum* sect. *Lycopersicon*). *Evolution.* 2008. V. 62(12). P. 2995-3013. doi: 10.1111/j.1558-5646.2008.00487.x
- Page S.L., Hawley R.S. Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science*. 2003. V. 301(5634). P. 785–789. doi: 10.1126/science.1086605
- Pease J.B., Haak D.C., Hahn M.W., Moyle L.C. Phylogenomics reveals three sources of adaptive variation during a rapid radiation. *PLoS Biol.* 2016. V. 14. 2. e1002379. doi:10.1371/journal.pbio.1002379 2016
- Sunilkumar G., Connell J.P., Smith C.W., Reddy A.S., Rathore K.S. Cotton α -globulin promoter: isolation and functional characterization in transgenic cotton, *Arabidopsis*, and tobacco. *Transgenic research*. 2002. V.11. P. 347-359. DOI: 10.1023/A:1016322428517
- Tam S.M., Hays J.B., Chetelat R.T. Effects of suppressing the DNA mismatch repair system on

- homeologous recombination in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 2011. V. 123(8). P. 1445-1458. doi: 10.1007/s00122-011-1679-4
- Tam S.M., Samipak S., Britt A., Chetelat R.T. Characterization and comparative sequence analysis of the DNA mismatch repair *MSH2* and *MSH7* genes from tomato. *Genetica*. 2009 V. 137(3). P. 341-354. doi: 10.1007/s10709-009-9398-3
- Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F.T., de Beer T.A.P., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R., Schwede T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 2018 V. 46(1). P. 296-303. doi: 10.1093/nar/gky427
- Wu T.H., Marinus M.G. Dominant negative mutator mutations in the *mutS* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1994. V. 176(17). P. 5393-5400.
- References**
- Basu-Roy S., Gauthier F., Giraut L. Mézard C., Falque M., Martin O.C. Hot Regions of Noninterfering Crossovers Coexist with a Nonuniformly Interfering Pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 2013. V. 195(3). P. 769-779. doi: 10.1534/genetics.113.155549
- Bedinger P.A., Chetelat R.T., McClure B., Moyle L.C., Rose J.K., Stack S.M., van der Knaap E., Baek Y.S., Lopez-Casado G., Covey P.A., Kumar A., Li W., Nunez R., Cruz-Garcia F., Royer S. Interspecific reproductive barriers in the tomato clade: opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation. *Sex Plant Reprod.* 2011. V. 24(3). P. 171-187. doi: 10.1007/s00497-010-0155-7
- Chetelat R.T., Ji Y. Cytogenetics and evolution. Razdan M.K., Mattoo A.K. (eds) Genetic Improvement of Solanaceous Crops. 2007. V. 1. Enfield: Science Publishers. P. 77-112.
- Cole F., Keeney S., Jasin M. Preaching about the converted: how meiotic gene conversion influences genomic diversity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2012. V.1267. P.95-102. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06595.x
- Dion E., Li L., Jean M., Belzile F. An *Arabidopsis MLH1* mutant exhibits reproductive defects and reveals a dual role for this gene in mitotic recombination. *Plant J.* 2007. V. 51(3). P. 431-440. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03145.x
- Drotschmann K., Hall M.C., Shcherbakova P.V., Wang H., Erie D.A., Brownell F.R., Kool E.T., Kunkel T.A. DNA binding properties of the yeast Msh2-Msh6 and Mlh1-Pms1 heterodimers. *Biol Chem.* 2002. V. 383(6). P. 969-975. doi: 10.1515/BC.2002.103
- Emmanuel E., Yehuda E., Melamed-Bessudo C., Avivi-Ragolsky N., Levy A.A. The role of AtMSH2 in homologous recombination in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO Rep.* 2006. V. 7(1). P. 100-105. DOI: 10.1038/sj.embor.7400577
- Goldfarb T., Lichten M. Frequent and Efficient Use of the Sister Chromatid for DNA Double-Strand Break Repair during Budding Yeast Meiosis. *PLoS Biol.* 2010. V. 8. 10. doi: 10.1371/journal.pbio.1000520
- Hunter N., Chambers S.R., Louis E.J., Borts R.H. The mismatch repair system contributes to meiotic sterility in an interspecific yeast hybrid. *EMBO J.* 1996. V. 15(7). P. 1726-1733.
- Komakhin R.A., Komakhina V.V., Milyukova N.A., Fadina O.A., Goldenkova-Pavlova I.V., Zhuchenko A.A. Transgenic tomato plants expressing *recA* and *NLS-recA-licBM3* genes as a model for studying meiotic recombination. *Russ. J. Genet.* 2010. T. 46(12). P. 1440-1448. (In Russian).
- Komakhin R.A., Vysotskii D.A., Shukurov R.R., Voblikova V.D., Komakhina V.V., Strelnikova S.R., Vetchinkina E.M., Babakov A.V. Novel strong promoter of antimicrobial peptides gene pro-SmAMP2 from chickweed (*Stellaria media*). *BMC Biotechnology*. 2016. V. 16. doi 10.1186/s12896-016-0273-x
- Kuluev B.R., Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A., Baymiev An.Kh., Vershinina Z.R., Knyazev A.V., Matniyazov R.T., Gumerova G.R., Mikhailova E.V., Nikonorov Yu.M., Chemeris D.A., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. CRISPR/Cas genome editing of plants. *Biomics*. 2017. 9(3). P. 155-182. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-15 (In Russian).
- Leonard J.M., Bollmann S.R., Hays J.B. Reduction of stability of arabidopsis genomic and transgenic DNA-repeat sequences (microsatellites) by inactivation of AtMSH2 mismatch-repair function. *Plant Physiol.* 2003. V. 133(1). P. 328-38. doi: 10.1104/pp.103.023952
- Li L., Dion E., Richard G., Domingue O., Jean M., Belzile F.J. The Arabidopsis DNA mismatch repair gene *PMS1* restricts somatic recombination between homeologous sequences. *Plant Mol. Biol.* 2009. V. 69(6). P. 675-684. doi: 10.1007/s11103-008-9447-9
- Madzharova N.V., Kazakova K.A., Strelnikova S.R., Snycheva O.A., Vetchinkina E.M., Efremova L.N., Vysotskii D.A., Babakov A.V., Komakhin R.A. Promoters pro-SmAMP1 and pro-SmAMP2 from wild plant *Stellaria media* for the biotechnology of dicotyledons. *Rus. J. Plant Physiol.* 2018. V. 65(5). P. 750-761. DOI: 10.1134/S1021443718040040 (In Russian)
- Marshall J.A., Knapp S., Davey M.R., Power M.R., Cocking E.C., Bennett M.D., Cox A.V. Molecular systematics of Solanum section Lycopersicum (*Lycopersicon*) using the nuclear ITS rDNA region. *Theor. Appl. Genet.* 2001. V. 103(8). P. 1216-1222. DOI: 10.1007/s001220100671
- McMahill M.S., Sham C.W., Bishop D.K. Synthesis-Dependent Strand Annealing in Meiosis. *PLoS Biol.* 2007. V. 5. № 11. doi: 10.1371/journal.pbio.0050299
- Mézard C., Jahns M.T., Grelon M. Where to cross? New insights into the location of meiotic crossovers. *Trends Genet.* 2015. V. 31(7). P. 393-401. doi: 10.1016/j.tig.2015.03.008
- Moyle L.C. Ecological and evolutionary genomics in the wild tomatoes (*Solanum* sect. *Lycopersicon*). *Evolution*. 2008. V. 62(12). P. 2995-3013. doi: 10.1111/j.1558-5646.2008.00487.x
- Page S.L., Hawley R.S. Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science*. 2003. V. 301(5634). P. 785-789. doi: 10.1126/science.1086605
- Pease J.B., Haak D.C., Hahn M.W., Moyle L.C. Phylogenomics reveals three sources of adaptive variation during a rapid radiation. *PLoS Biol.* 2016. V. 14. 2. e1002379. doi:10.1371/journal.pbio.1002379 2016
- Sunilkumar G., Connell J.P., Smith C.W., Reddy A.S., Rathore K.S. Cotton α -globulin promoter: isolation and

- functional characterization in transgenic cotton, Arabidopsis, and tobacco. *Transgenic research*. 2002. V.11. P. 347-359. DOI: 10.1023/A:1016322428517
- Tam S.M., Hays J.B., Chetelat R.T. Effects of suppressing the DNA mismatch repair system on homeologous recombination in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 2011. V. 123(8). P. 1445-1458. doi: 10.1007/s00122-011-1679-4
- Tam S.M., Samipak S., Britt A., Chetelat R.T. Characterization and comparative sequence analysis of the DNA mismatch repair *MSH2* and *MSH7* genes from tomato. *Genetica*. 2009 V. 137(3). P. 341-354. doi: 10.1007/s10709-009-9398-3
- Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F.T., de Beer T.A.P., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R., Schwede T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 2018 V. 46(1). P. 296-303. doi: 10.1093/nar/gky427
- Wu T.H., Marinus M.G. Dominant negative mutator mutations in the *mutS* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1994. V. 176(17). P. 5393–5400.