

**ЖУКОВ В.А., НЕМАНКИН Т.А., ОВЧИННИКОВА Е.С., КУЗНЕЦОВА Е.В.,
ЖЕРНАКОВ А.И., ТИТОВ В.С., ГРИШИНА О.А., СУЛИМА А.С.,
БОРИСОВ Я.Г., БОРИСОВ А.Ю., ТИХОНОВИЧ И.А.**

*ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
микробиологии Россельхозакадемии,*

Россия, 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, 3,

e-mail: zhukoff01@yahoo.com

СОЗДАНИЕ СЕРИИ ГЕН-СПЕЦИФИЧНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ СРАВНИТЕЛЬНОГО КАРТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.) И ДИПЛОИДНОЙ ЛЮЦЕРНЫ (*MEDICAGO TRUNCATULA* GAERTN.)

Неотъемлемой частью изучения генетического контроля биологических процессов в настоящее время является клонирование ключевых генов, отвечающих за протекание этих процессов, осуществляемое обычно на основании генетического картирования. Генетическое картирование базируется на методах классической генетики — определении групп сцепления и частот рекомбинации, и основным его инструментом в настоящее время являются молекулярные маркеры, выявляющие полиморфизм в геномной ДНК или в белковых продуктах генов. Особое значение для сравнительного картирования, то есть сопоставления генетических и/или физических карт различных видов растений, имеют маркеры, создаваемые на основе последовательностей генов (Zhukov et al., 2007).

Среди бобовых растений подробные генетические карты создаются как для модельных видов (лядвенец японский *Lotus japonicus* (Regel.) Larsen и диплоидная люцерна *Medicago truncatula* Gaertn.), так и для сельскохозяйственно-ценных (горох *Pisum sativum* L., фасоль *Phaseolus vulgaris* L., бобы *Vicia faba* L., соя *Glycine max* (L.) Merr., арахис *Arachis hypogaea* L. и др.) (см. ресурс Интернет www.comparative-legumes.org). В настоящее время также развернуты международные программы по секвенированию геномов лядвенца японского и диплоидной люцерны (см. <http://www.kazusa.or.jp/lotus/> и <http://www.medicago.org/genome/>, соответственно). Благодаря сходной организации геномов бобовых растений, эти достижения могут быть использованы для создания маркеров, поиска генов и их позиционного клонирования у культурных бобовых (Young, Udvardi, 2009).

Горох посевной является одной из важнейших сельскохозяйственных культур мира после сои и фасоли (согласно данным FAOSTAT <http://faostat.fao.org>). Для некоторых генотипов гороха продемонстрировано увеличение семенной продуктивности и качества продукции под влиянием взаимодействия с почвенными микроорганизмами (Штарк и др., 2006). По этой причине изучение процессов развития симбиотических взаимоотношений гороха с почвенной микрофлорой представляется важным как для фундаментальной науки, так и для современного растениеводства. На горохе получено более 100 мутантов с нарушениями развития взаимовыгодных симбиозов

(Борисов и др., 2007), и изучение генов, несущих мутации, должно способствовать выявлению детальных механизмов контроля развития симбиотических систем.

Для определения нуклеотидных последовательностей ключевых симбиотических генов гороха, затронутых мутациями, можно использовать методологию сравнительной геномики бобовых растений. Картирование мутантных генов в геноме гороха при этом необходимо проводить с помощью ген-специфичных молекулярных маркеров. Одним из наиболее подходящих вариантов таких маркеров являются маркеры типа CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), основанные на амплификации фрагмента определенного гена и специфичного расщепления только одной из его аллелей определенной эндонуклеазой рестрикции (Konieczny, Ausubel, 1993). Преимуществами использования ген-специфичных CAPS-маркеров являются: 1) возможность создания маркеров на основе известных генов гороха или других бобовых, например, диплоидной люцерны; 2) возможность сравнения построенных генетических карт с физической картой генома диплоидной люцерны; 3) использование одного набора праймеров для анализа скрещиваний между различными линиями гороха.

Данная работа направлена на создание серии ген-специфичных молекулярных маркеров для картирования симбиотических генов гороха и сравнения полученных карт с физической картой генома диплоидной люцерны.

Материалы и методы

Методология: Для создания маркеров были использованы последовательности генов гороха с известной локализацией в геноме (описание генов и последовательности праймеров приведены в работах Aubert et al., 2006; Zhukov et al., 2007). Фрагменты генов были амплифицированы и секвенированы у серии линий гороха, затем на основании анализа полиморфизма были определены эндонуклеазы рестрикции, позволяющие различать аллельные состояния маркера. Маркеры были картированы на выборках F_2 (SGEFix-1×NGB1238) и F_2 (RisFixV×NGB1238), и позиции гомологичных им генов были определены в геноме диплоидной люцерны.

Молекулярно-биологические процедуры: Геномную ДНК из растений гороха выделяли с использованием буфера СТАВ по модифицированному протоколу Rogers, Bendich, 1985; ПЦР проводили в термоциклерах iCycler™ (Bio-Rad, США) и Personal Cycler (Biometra, Германия). Секвенирование осуществляли на автоматическом приборе CEQФ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, США) по протоколу производителя. Праймеры были синтезированы компанией “Евроген”, Москва, Россия. Анализ рестриционных фрагментов проводили в 3% агарозном геле.

Компьютерный анализ: в работе были использованы следующие программы и сайты:

— данные по секвенированию нуклеотидных последовательностей обрабатывали с помощью программного обеспечения автоматического

секвенатора CEQФ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, США). В программах Multalin (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>) и ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) проводили множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей;

— подбор необходимых эндонуклеаз рестрикции для детекции полиморфизма фрагментов осуществляли в программе dCAPS Finder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>);

— построение генетических карт проводили с помощью программы MapL98 (Prof. Yasuo Ukai, Biometrics Laboratory, Graduate School of Agricultural Life Science, the University of Tokyo);

— определение позиций генов, гомологичных использованным маркерам, в геноме диплоидной люцерны, проводили по алгоритму BLAST на сайте http://www.medicago.org/genome/cvit_blast.php.

Результаты и обсуждение

Фрагменты последовательностей генов можно использовать в качестве молекулярных маркеров лишь в случае наличия полиморфизма в пределах данного фрагмента, так как для генетического анализа необходимо различать их аллельные состояния. Вероятность обнаружения полиморфизма закономерно возрастает при сравнении генетически удаленных линий. Набор ген-специфичных маркеров планируется использовать для картирования симбиотических мутаций гороха, полученных на 5 линиях (Finale, Frisson, Rondo, SGE и Sparkle), поэтому на первом этапе работы были выявлены оптимальные партнеры для скрещивания с указанными линиями. Для этого фрагменты 14 генов были амплифицированы и секвенированы у упомянутых линий, а также у линий J115, NGB1238, NGB2715, NGB851 и RT9. Анализ последовательностей 10 генов, продемонстрировавших полиморфизм, позволил построить кладограммы, соответствующие генетической удаленности использованных линий, и выделить три группы линий: 1) Finale, Frisson, Rondo; 2) NGB2715, RT9, SGE; 3) J115, NGB1238, NGB851, Sparkle. Таким образом, можно рекомендовать для скрещиваний и последующего генетического анализа линии из разных групп, поскольку в таком случае полиморфизм в последовательностях генов, используемых в качестве молекулярных маркеров, будет наблюдаться наиболее часто.

Для картирования симбиотических генов гороха *Sym40* и *Sym42* линии гороха SGEFix-1 (*sym40*) и RisFixV (*sym42*) были скрещены с линией NGB1238, генетически удаленной от линий, на которых были получены указанные мутанты (SGE и Finale, соответственно). На геномной ДНК линий SGEFix-1 (*sym40*), RisFixV (*sym42*) и NGB1238 (“дикий тип”) были амплифицированы и секвенированы фрагменты 59 генов гороха, которые были использованы в качестве маркеров в случае обнаружения полиморфизма.

На выборке F_2 (SGEFix-1 x NGB1238) из 61 растения, 37 из которых являются рецессивными гомозиготами по *sym40*, к настоящему моменту картировано 19 ген-специфичных молекулярных маркеров, покрывающих

4 из 7 групп сцепления гороха. Сцепления с геном *Sym40* обнаружено не было, что свидетельствует о его вероятной локализации в 4, 6 или 7-ой группе сцепления. На выборке F_2 (RisFixV x NGB1238) из 96 растений, 14 из которых гомозиготны по *sym42*, к настоящему моменту картировано 12 маркеров из 5 групп сцепления, однако сцепления с геном *Sym42* также пока не обнаружено. Таким образом, для картирования генов *Sym40* и *Sym42* необходимо увеличение числа анализируемых маркеров, что, в свою очередь, вызывает необходимость вовлечения в работу дополнительного количества генов гороха.

Порядок следования маркеров в группах сцепления, а также расстояния между ними, определенные в результате проведенного компьютерного анализа, соответствуют литературным данным (Aubert et al., 2006), что подтверждает состоятельность используемых методик. Для всех использованных маркеров путем анализа физической карты генома диплоидной люцерны были определены позиции гомологичных им генов *M. truncatula*. Маркеры, демонстрировавшие сцепление у гороха, также локализуются на небольшом расстоянии друг от друга на физической карте генома люцерны, и порядок их следования дополнительно подтверждает синтению геномов гороха и люцерны. Тем не менее, некоторые гены являются исключениями из данного правила, и их локализация на физической карте *M. truncatula* не соответствует локализации на генетической карте гороха.

Для полного покрытия генетической карты гороха ген-специфичными молекулярными маркерами в настоящее время ведется работа по созданию новых маркеров на основе последовательностей генов диплоидной люцерны. Локализация создаваемых маркеров также будет определена с использованием выборок F_2 (SGEFix-1 x NGB1238) и F_2 (RisFixV x NGB1238), что в дальнейшем позволит картировать симбиотические гены гороха *Sym40* и *Sym42*. Использование для картирования ген-специфичных молекулярных маркеров делает возможным последующий поиск генов-кандидатов и секвенирование генов гороха *Sym40* и *Sym42*.

Выводы

В работе созданы ген-специфичные молекулярные маркеры, картированные в геноме гороха посевного с использованием выборок F_2 (SGEFix-1 x NGB1238) и F_2 (RisFixV x NGB1238). Позиции генов, гомологичных указанным маркерам, определены на физической карте генома диплоидной люцерны с использованием анализа по алгоритму BLAST. Это позволяет создавать новые ген-специфичные маркеры на основе генов люцерны, локализованные в областях генома гороха с небольшим количеством известных генов.

Секвенированные последовательности 10 генов гороха посевного могут быть использованы для генотипирования линий Finale, Frisson, Rondo, SGE и Sparkle (и симбиотических мутантов, полученных на этих линиях), а также линий JI15, NGB1238, NGB2715, NGB851 и RT9.

В целом, создаваемый набор маркеров является ценным инструментом для картирования генов гороха и последующего их клонирования с использо-

ванием достижений генетики и геномики модельного бобового растения *Medicago truncatula*.

Работа поддержана грантами РФФИ (09-04-00907, 09-04-13895, 09-04-91054, 09-04-91293, 10-04-00961, 10-04-01146), NWO 047.018.001, грантом Президента России (НШ-3440.2010.4); при поддержке Министерства образования и науки (Государственные контракты № 02.512.11.2280, 02.740.11.0276).

Литература

1. Борисов А.Ю., Васильчиков А.Г., Ворошилова В.А., Данилова Т.Н., Жернаков А.И., Жуков В.А., Королева Т.А., Кузнецова Е.В., Мадсен Л., Мофетт М., Неманкин Т.А., Павлова З.Б., Петрова Н.Э., Пинаев А.Г., Радутюу С., Розов С.М., Соловов И.И., Топунов А.Ф., Уиден Н.Ф., Цыганов В.Е., Штарк О.Ю., Стоугард Й., Наумкина Т.С., Тихонович И.А. Регуляторные гены гороха посевного (*Pisum sativum* L.), контролирующие развитие азотфиксирующих клубеньков и арбускулярной микоризы: фундаментальные и прикладные аспекты.— Прикладная биохимия и микробиология.— 2007.— Т.43, №3.— С. 265–271.

2. Штарк О.Ю., Данилова Т.Н., Наумкина Т.С., Васильчиков А.Г., Чеботарь В.К., Казаков А.Е., Жернаков А.И., Неманкин Т.А., Прилепская Н.А., Борисов А.Ю., Тихонович И.А. Анализ исходного материала гороха посевного (*Pisum sativum* L.) для селекции сортов с высоким симбиотическим потенциалом и выбор параметров для его оценки.— Экологическая генетика.— 2006.— Т.4, №2.— С. 22–28.

3. Aubert G., Morin J., Jacquin F., Loridon K., Quillet M.C., Petit A., Rameau C., Lejeune-Henaut I., Huguet T., Burstin J. Functional mapping in pea, as an aid to the candidate gene selection and for investigating synteny with the model legume *Medicago truncatula*.— Theor. Appl. Genet.— 2006.— V.112, N6.— P. 1024–1041.

4. Konieczny A., Ausubel F.M. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers.— Plant J.— 1993.— V.4, N2.— P. 403–410.

5. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues.— Plant Mol. Biol.— 1985.— V.5.— P. 69–76.

6. Young N.D., Udvardi M. Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes.— Curr. Opin. Plant Biol.— 2009.— V.12, N2.— P. 193–201.

7. Zhukov V.A., Kuznetsova E.V., Ovchinnikova E.S., Rychagova T.S., Titov V.S., Pinaev A.G., Borisov A.Y., Moffet M., Domoney C., Ellis T.H.N., Ratet P., Weeden N.F., Tikhonovich I.A. Gene-based markers of pea linkage group V for mapping genes related to symbioses.— Pisum Genetics.— 2007.— V.39.— P. 10–20.

Резюме

В настоящей работе была создана серия ген-специфичных молекулярных маркеров, предназначенных для картирования генов гороха посевного и создания предпосылок для их клонирования на основе синтении геномов гороха и диплоидной люцерны.

In this work, the set of gene-based molecular markers had been created, destined for mapping garden pea genes and for arrangement of conditions for gene cloning on the base of synteny of pea and barrel medic genomes.

КАВАЙ-ООЛ У.Н.¹, ЕЖОВА Т.А.²

¹Тувинский государственный университет

Россия, 667000, Кызыл, ул. Ленина, д.36, e-mail: dr.urana@mail.ru,

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

Москва, 119992, Воробьевы горы, д. 1, стр. 12, e-mail: ezhova2001@mail.ru

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕНОВ *ABRUPTUS/PINOID* И *APETALA2* В РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ ЦВЕТКА *ARABIDOPSIS THALIANA*

Развитие цветка контролируется сложной системой взаимодействующих генов и физиологических факторов. Важную роль в инициации развития меристемы цветка *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. играет ген *ABRUPTUS/PINOID1* (*ABR/PID1*), регулирующий полярный транспорт ауксина (ПТА). Ген *ABR/PID1* кодирует серин-треониновую протеинкиназу, которая участвует в обеспечении локализации на мембране клетки белка PIN1, выносящего ауксин из клетки [1–2]. Мутации в гене *ABR/PID1* приводят к нарушению ПТА в растениях и изменению многих признаков [3–5]. Одна из мутаций *abruptus* (*abr*) получена на кафедре генетики МГУ. Она приводит к температурозависимой инактивации гена *ABR/PID1*: при повышенной температуре (27–29 °С) растения формируют цветонос, который похож на булавку и на котором либо нет цветков, либо развиваются единичные стерильные цветки аномальной морфологии. При 21–24 °С растения фертильны. Цветки имеют небольшие чашелистики, крупные многочисленные лепестки, число которых достигает 10 (в среднем 5,4, вместо 4-х у дикого типа), тычинки и пестик (рис. 1, а, б). Цветонос таких растений после развития 8–12 цветков также

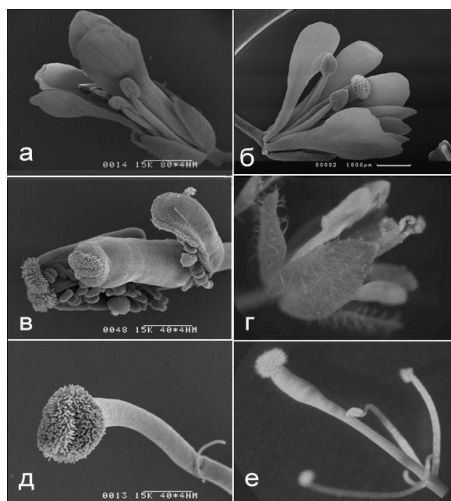


Рис. 1. Морфология цветков растений дикого типа (а), одиночных мутантов *abr* (б), *vaf2* (в), *ap2-1* (г) и двойных мутантов *abr vaf2* (д) и *abr ap2* (е)