

На правах рукописи

Коновалов Федор Андреевич

**КАРТИРОВАНИЕ
И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
ГЕНОВ ГОРОХА (*Pisum sativum* L.)**

Специальность 03.00.15 – генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2006 г.

**ОБЯЗАТЕЛЬНЫЙ
БЕСПЛАТНЫЙ
ЭКЗЕМПЛЯР**

Работа выполнена в лаборатории генетики растений кафедры генетики Биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор **Гостимский Сергей Александрович**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
кандидат биологических наук

Голденкова-Павлова Ирина Васильевна
Малеева Юлия Владимировна

Ведущая организация:

Центр «Биоинженерия» РАН

Защита диссертации состоится « » _____ 2006г. в _____ часов на заседании
Диссертационного совета Д 002.214.01 при Институте общей генетики им.
Н.И.Вавилова РАН по адресу: 119991, ГСП-1, Москва, ул.Губкина, д.3.
Факс: (495) 132-89-62.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института общей генетики им.
Н.И.Вавилова РАН.

Автореферат разослан « » _____ 2006 года

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Г.Н.Полухина

2006А
15924

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Приоритетным направлением в картировании геномов высших растений сегодня является разработка надежных методов для сопряжения рекомбинационных и физических карт, а также поиск новых генетических маркеров, позволяющих проводить сравнительное картирование геномов различных видов. Среди множества типов молекулярных маркеров, удовлетворяющих указанным критериям, одними из самых удобных и надежных являются CAPS*-маркеры, выявляющие полиморфизм по наличию сайтов рестрикции внутри последовательностей уникальных генов растений.

В случае гороха посевного (*Pisum sativum* L.), важного объекта генетики растений, вышеупомянутые направления только начинают развиваться. До сих пор не создана полноценная система надежных маркерных локусов, пригодных для широкого использования в генетическом анализе и для сопоставления генетической карты гороха с физическими картами других бобовых, в первую очередь люцерны *Medicago truncatula*, геном которой будет секвенирован в 2007 г. В ряде работ уже составлены подробные карты групп сцепления гороха на основе маркеров, выявляемых с помощью произвольных праймеров [Weeden et al., 1998; Rameau et al., 1998; Irzikowska et al., 2001; Чегамирза, 2004], а также локализовано некоторое количество генов с помощью CAPS-метода [Brauner et al., 2002], однако область применения таких маркерных систем пока ограничена либо в силу малой воспроизводимости методов случайного ампликона, либо из-за отсутствия данных о полиморфизме маркеров среди подавляющего числа важнейших линий и сортов. Кроме того, количество известных CAPS-маркеров, выявляющих внутригенный полиморфизм у гороха, пока невелико. Для множества генов гороха с известной последовательностью, доступных в базе GenBank, отсутствует информация о локализации в геноме и о внутривидовой изменчивости. Микросателлитные маркеры, большое число которых описано в работе [Loridon et al., 2005], будучи достаточно надежными и высокополиморфными, мало пригодны для сопоставления генетической карты гороха с физической картой люцерны из-за недостаточного консерватизма большинства сайтов отжига праймеров.

Таким образом, существует необходимость локализации генов гороха с известной последовательностью и создания надежных молекулярных маркеров на их основе. Кроме того, возможность успешного использования маркерных локусов определяется наличием информации об их полиморфизме у репрезентативного набора линий и сортов, и любая работа по получению такой информации сегодня является актуальной и востребованной.

* CAPS – Cleaved Amplified Polymorphic Sequences

Цель настоящей работы – построить генетическую карту для гороха посевного на основе молекулярных маркеров типа CAPS, выявляющих полиморфизм в последовательностях уникальных генов. Для достижения цели работы были поставлены следующие задачи:

1. Амплифицировать фрагменты ряда уникальных генов гороха посевного с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР);
2. Выявить полиморфизм в амплифицированных последовательностях среди сортов и линий гороха;
3. Локализовать полиморфные генные последовательности на карте групп сцепления в ходе генетического анализа популяции гибридов F_2 от скрещиваний (Chi115 x WL1238) и (Флагман x WL1238);
4. Определить наиболее вероятное положение ортологичных локусов на физической карте генома *Medicago truncatula* и сравнить полученные данные с результатами генетического картирования у гороха.

Научная новизна

Впервые изучен полиморфизм по наличию сайтов рестрикции 12 эндонуклеаз во фрагментах 60 генов гороха, полученных из ДНК различных сортов и линий.

Проведена локализация полиморфных фрагментов 40 генов на карте групп сцепления гороха. Положение на карте 15 генов гороха определено впервые. Разработана система CAPS-маркеров, использованная для анализа полиморфизма и картирования генома гороха.

Предложена система для идентификации 24 линий, сортов и подвидов гороха на основе шести высокополиморфных CAPS-маркеров.

В результате поиска *in silico* предполагаемых ортологов изученных генов у люцерны *Medicago truncatula* на генетической карте гороха и физической карте люцерны выявлены участки с выраженной макросинтений.

Практическая значимость

Новая система из 40 маркерных локусов, подкрепленная данными о полиморфизме маркеров у важнейших линий и сортов гороха, позволит быстро и эффективно проводить точную локализацию генов хозяйственно важных признаков у данного модельного объекта.

Впервые полученная информация о локализации 15 генов гороха найдет свое применение в изучении мутантов с нарушениями, имеющими отношение к функциям данных генов.

Продемонстрировано успешное применение CAPS-метода у гороха в целях паспортизации линий и сортов. Предложенная система идентификации 24 линий, сортов и подвидов гороха на основе 6 маркеров может быть легко расширена и адаптирована для применения в биотехнологии и сельском хозяйстве.

Представленные в диссертации результаты использованы в подготовке задачи практикума по молекулярно-генетическому картированию у растений, проводимого на кафедре генетики МГУ.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на Международной конференции «Генетика в России и мире» (Москва, ИОГен РАН, 28 июня – 2 июля 2006 г.); на XIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2006» (Москва, 12-15 апреля 2006г.); на Конкурсе работ молодых ученых ИОГен РАН (Москва, 2006 г.); на XII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2005» (Москва, 12-15 апреля 2005г.); на Конкурсе работ молодых ученых ИОГен РАН (Москва, 2005 г.); на Международной школе-конференции молодых учёных «Системная биология и биоинженерия» (Звенигород, 28 ноября – 2 декабря 2005 г.); на Третьем международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 14-18 марта 2005 г.); на XI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2004» (Москва, 12-15 апреля 2004г.); на III Съезде Всероссийского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС), Москва, 6-12 июня 2004 г.; на Конкурсе работ молодых ученых ИОГен РАН (Москва, 2004 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на ____ страницах, состоит из введения, обзора литературы, глав «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», заключения, выводов и списка литературы, включающего ____ источников. Работа содержит ____ рисунков и ____ таблиц.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты 01-04-48080, 04-04-48956) и программы поддержки ведущих научных школ (грант НШ-1731, 2005).

Материалы и методы**Исходный материал**

В работе были использованы сорта, мутанты и маркерные линии гороха посевного (*Pisum sativum* L.), гороха полевого (*Pisum sativum* ssp. *arvense*; линия J12423), абиссинского подвида гороха (*P. sativum* ssp. *abyssinicum*; линия J12) а также видов *P. elatius* (линия J164) и *P. humile* (линия J11794) из коллекции кафедры генетики биологического факультета МГУ и коллекции центра Джона Иннеса (Норвич, Великобритания).

Для получения картирующих популяций скрещивали мутант "Chi115" и сорт "Флагман" с маркерной линией "WL1238". Две популяции F₂ (WL1238 × Chi115) и (WL1238 × Флагман), состоящие из 223 и 147 индивидуальных растений, соответственно, получили путем самоопыления гибридов первого поколения. Растения всех поколений выращивали в полевых условиях.

Выделение геномной ДНК гороха

Для выделения геномной ДНК из зеленой массы растений гороха использовался один из вариантов СТАВ-метода [Torres et al., 1993] с незначительными модификациями.

Полимеразная цепная реакция

Амплификацию проводили в приборе MC2 производства фирмы «ДНК-Технология». Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл и содержал 5 мкл раствора ДНК, 2,5 ед. Taq-полимеразы (Силекс М.), 250 мкМ каждого дНТФ (Силекс М.), по 0,5 мкМ каждого праймера и 2,5 мкл 10х стандартного ПЦР-буфера (Силекс М). Доводили объем деионизированной водой до 25 мкл. Для предотвращения испарения амплификационной смеси использовали 20 мкл минерального масла (Sigma). Амплификация проводилась по следующей программе:

- | | |
|--------------------------------|-----------------------|
| 1. Предварительная денатурация | 94°C, 2 мин 30 сек |
| 2. Пять циклов | 1) 94°C, 30 сек |
| | 2) Tm+2°C, 30 сек |
| | 3) 70°C, 1 мин 30 сек |
| 3. Тридцать пять циклов | 1) 93°C, 20 сек |
| | 2) Tm, 30 сек |
| | 3) 71,5°C, 1 мин |
| 4. Конечная элонгация | 72°C, 3 мин |

Tm (температура отжига) подбиралась для каждой пары праймеров с помощью программы Sigma-Genosys DNA Calculator и оптимизировалась эмпирически.

Обработка ПЦР-фрагментов эндонуклеазами рестрикции

Для анализа полиморфизма и генотипирования CAPS-маркеров использовались эндонуклеазы рестрикции *Tru9I*, *TaqI*, *RsaI*, *HaeIII*, *AspI*, *EcoRI*, *HpaII*, *HinfI*, *PspN4I*, *BstDEI*, *Bst4CI* и *AluI* производства компании «СибЭнзим». Сайты узнавания всех указанных ферментов имеют в своем составе 4 пары оснований или эквивалентны по своей специфичности сайтам из 4 п.о. при наличии в их составе вырожденных нуклеотидов (как, например, сайт эндонуклеазы *HinfI* G^{*}ANTC).

Обработка ПЦР-продуктов эндонуклеазами рестрикции проводилась в исходной ПЦР-смеси, разбавленной деионизированной водой в 2 раза или неразбавленной (в зависимости от концентрации фрагмента), с добавлением соответствующего буфера фирмы-производителя до рекомендованной концентрации 1х, а также BSA при использовании эндонуклеазы *TaqI*.

Фракционирование фрагментов ДНК

Разделение фрагментов ДНК, полученных в результате амплификации, проводили стандартным электрофорезом в 1.7% агарозном геле при напряженности электрического поля 3 В/см. В качестве буферной системы использовали TBE; для приготовления геля применяли агарозу Amresco Type I. Окрашивание ДНК проводили путем окрашивания геля раствором бромистого этидия (конечная концентрация 0,001%). Для определения длин фрагментов ДНК использовали маркер молекулярного веса 100bp + 1.5 kbp производства «СибЭнзим».

Клонирование и секвенирование ПЦР-фрагментов

ПЦР-фрагменты для клонирования были выделены из реакционной смеси и очищены с помощью набора Fermentas PureXtreme согласно протоколу производителя. Клонирование фрагментов проводилось в клетках *Escherichia coli* JM109 с использованием вектора pTZ57R/T и набора Fermentas InsT/Aclone согласно протоколу производителя.

Секвенирование клонированных фрагментов проводилось на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer в центре коллективного пользования «Геном» (ИМБ РАН, зав. центром Полтараус А.Б.). В качестве праймеров для секвенирования использовались стандартные олигонуклеотиды M13. Для секвенирования протяженных фрагментов (более 1000 п.о.) с помощью программы Oligo 4.0 были дополнительно подобраны 19- или 20-членные внутренние праймеры к двум концам секвенированных участков фрагмента.

Обработка результатов генетического анализа

При работе гибридологическим методом производили подсчет величин фенотипических классов в расщепляющихся популяциях F_2 с оценкой достоверности соответствия наблюдаемого соотношения H_0 -гипотезе статистическим методом χ^2 («хи-квадрат»). При этом рассчитывали суммарное значение χ^2 по следующей формуле:

$$\chi^2 = \sum_i (O_i - E_i)^2 / E_i,$$

где O_i – наблюдаемая величина фенотипического класса по i -компоненту, E_i – ожидаемое значение [Серебровский, 1970]. Полученное значение сравнивали с табличным по Фишеру, принимая число степеней свободы df равным числу фенотипических классов, уменьшенному на 1. Вероятность случайности отклонения p принимали не превышающим 0.05. Если полученное суммарное значение χ^2 не превышало табличное, делали вывод об отсутствии оснований для отвержения H_0 -гипотезы.

Для генетического анализа расщеплений в F_2 использован программный пакет Mapmaker/EXP 3.0 [Lander et al., 1987] с порогом $LOD \geq 3.0$ и максимальным расстоянием между сцепленными локусами 50 сМ. В качестве картирующей функции использовалась формула Косамби.

Для каждого CAPS-маркера в программе Mapmaker были найдены сцепленные с ним локусы. Для этого использовалась команда “near” с порогом LOD-балла 3.00. Используя ранее полученные данные о расположении маркеров и локусов морфологических признаков, а также определяя наиболее вероятное местонахождение среди них новых CAPS-маркеров с помощью команд “order” и “try”, мы провели локализацию изученных геновых фрагментов на карте групп сцепления гороха.

Каждый маркер считался локализованным в том случае, если между ним и известным якорным локусом (ранее изученным CAPS-маркером или локусом морфологического признака) было зарегистрировано сцепление при генетическом расстоянии менее 40 сМ (функция Косамби) и значении LOD-балла не менее 3.00. В ряде случаев локализация считалась подтвержденной, если новый маркер был сцеплен с ранее картированными случайными маркерами, составляющими непрерывную цепь (с LOD не менее 3.00 и расстоянием между соседями менее 40 сМ) до ближайшего якорного локуса. При построении общих карт «группы сцепления» считалась цепочка локусов, значение LOD-балла для всех интервалов между которыми было равно или превосходило 3.00. Карты групп сцепления строились с помощью команды “map”. Для вывода таблицы расстояний и значений LOD-балла для каждой последовательности локусов использовалась команда “lod”.

Поиск гомологичных последовательностей в базах данных

Поиск предполагаемых гомологов исследуемых генов гороха в геноме люцерны проводился с помощью программы WU-BLAST 2.0 на сайте TIGR (<http://tigrblast.tigr.org/erblast/index.cgi?project=mtbe>) в базе данных нуклеотидных последовательностей “Daily Contig Pipeline – All Medicago BACs” по состоянию на 24 мая 2006 г., включающую все секвенированные на тот момент участки генома люцерны, в том числе со статусом “draft”. При проведении анализа обычно использовался алгоритм tblastn, а в качестве запросов в форму вводились белковые последовательности предполагаемых продуктов генов гороха, приведенные на страницах с их описанием в Genbank. Такой подход обеспечивает повышенную чувствительность поиска и наибольшую функциональную близость обнаруженных фрагментов генома люцерны к исследуемым генам гороха. В ряде случаев, когда транслированная последовательность гена имела небольшой размер из-за наличия в нем крупных интронов, использовался стандартный алгоритм blastn. Обнаруженные BAC-клоны, имеющие наибольшее сходство с каждым геном (значение E-value не более 10^{-10}), были локализованы на физической карте генома люцерны с помощью программы CVIT-BACs (http://medicago.org/genome/cvit_bacs.php).

Результаты и обсуждение

ПЦР-амплификация фрагментов генов гороха

Среди литературных данных и в базе Genbank был проведен поиск генов гороха для подбора праймеров и постановки ПЦР-амплификации. Поскольку обязательным условием дальнейшего генетического картирования ПЦР-фрагментов являлась возможность выявить полиморфизм их последовательностей, приоритет получали те гены, в состав которых входили протяженные интроны, окруженные более консервативными экзонными участками. В ходе отбора было выявлено 62 гена, удовлетворяющих указанным критериям (Табл. 1 и 2).

Табл. 1. Гены, локализованные с помощью CAPS-метода в работе [Brauner et al., 2002] и использованные в качестве якорных локусов

№	Ген	Кодируемый белок	№ в Genbank
1	<i>Aair</i>	Изомероредуктаза гликолевой кислоты	AJ251333
2	<i>Apx1</i>	Аскорбатпироксидаза	M93051
3	<i>Apy</i>	Апираза типа S	AB038554
4	<i>Bfruct</i>	Бета-фруктозуфураногидаза	X85328
5	<i>CipPor</i>	Протохлорофиллидредуктаза	X63060
6	<i>Cop1</i>	Белок конститутивного фотоморфогенеза	AJ276592
7	<i>Fbpp</i>	Фруктозобисфосфатаза хлоропластная	AF378925
8	<i>Gsn1</i>	Глутаминсинтетаза цитоплазматическая	U28924
9	<i>Gsp</i>	Глутаминсинтетаза хлоропластная	U22971
10	<i>Hop1</i>	Гомеодомен-содержащий белок	AF063307
11	<i>HsfA</i>	Транскрипционный фактор теплового шока	AJ010644
12	<i>Ivdh</i>	Изовалерил-коА- дегидрогеназа	AJ010946
13	<i>P628</i>	Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа	—
14	<i>Paal</i>	Фенилаланин-аммоний-лиаза	D10002
15	<i>Pepc</i>	Фосфоенолпируваткарбоксилаза хлоропластов	D64037
16	<i>Phy</i>	Апопротеин фитохрома	X14077
17	<i>Rb</i>	АДФ-глюкозопирофосфорилаза	X96766
18	<i>Rpl22</i>	Рибосомальный белок большой субъединицы, 22 кДа	M60951
19	<i>Sahh</i>	S-аденозин-L-гомоцистеингидролаза	L36119
20	<i>Sodmt</i>	Mn-супероксиддисмутаза	X60170
21	<i>Ssyn</i>	Сахарозсинтаза II	AJ001071
22	<i>TubA1</i>	Альфа-тубулин	U12589
23	<i>Uni</i>	LEAFY-подобный белок UNI	AF010190
24	<i>Vc2</i>	Вицилин J/K	X67429
25	<i>Vc3</i>	Вицилин	X14076

Последовательности 25 генов среди отобранных уже были использованы зарубежными авторами в качестве CAPS-маркеров при картировании генома гороха, поэтому в настоящей работе они выполняли роль якорных локусов. Последовательности праймеров для их амплификации были взяты из литературных источников [Brauner et al., 2002].

Поиск в базе NCBI Nucleotide позволил найти последовательности более 500 генов гороха с различной степенью изученности, чаще всего без информации о локализации в геноме. Среди таких записей GenBank нами было отобрано 37 генов с оптимальной длиной и экзон-интронной структурой (длина не менее 2000 п.о., суммарная длина интронов между выбранными сайтами отжига праймеров не менее 500 п.о.; табл. 2).

Табл. 2. Гены, праймеры для амплификации которых были подобраны в ходе работы

№	Ген	Кодируемый белок	№ в Genbank
1	<i>Acs1</i>	1-Аминоциклопропан-1-карбоксилатсинтаза	AF016460
2	<i>Adh1</i>	Алкогольдегидрогеназа	X06281
3	<i>As2</i>	Аспарагинсинтаза 2	Y13322
4	<i>AtpF1</i>	F1-АТФаза, субъединица δ'	L13320
5	<i>Bgl1</i>	Бета-1,3-глюканаза	L02212
6	<i>Cbl</i>	Белок, сходный с кальциневрином В	AY883569
7	<i>Cry1</i>	Криптохром-1 апопротеин	AY508970
8	<i>Cyp73</i>	Гидроксилаза транс- β -фенилакриловой кислоты	AF175275
9	<i>Dbh</i>	DEAD-бокс РНК-хеликаза	AY513583
10	<i>Egl1</i>	Эндо-1,4-бета-глюканаза	L41046
11	<i>Fed1</i>	Ферредоксин I	M31713
12	<i>Fro1</i>	Железоредуктаза	AY747697
13	<i>GapC1</i>	Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа	X73150
14	<i>GapN</i>	Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа нефосфорилирующая	U34988
15	<i>GprAII</i>	G-белок, субъединица α -II	AF533439
16	<i>GprB</i>	G-белок, субъединица β	AF533440
17	<i>Gr</i>	Глутатион редуктаза	X90996
18	<i>Ho1</i>	Предшественник гемоксигеназы I	AF276230
19	<i>Hsp70</i>	Белок теплового шока	X69213
20	<i>Iaa6</i>	Ауксин-индуцируемый белок	X68218
21	<i>Icdh1</i>	НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа I	AY730588
22	<i>Lf</i>	TFL1-подобный белок, регулятор времени зацветания	AY343326
23	<i>Mccc</i>	3-Метилкротонил-КоА-карбоксилаза	AB075695
24	<i>Mdhar1</i>	Монодегидроаскорбатредуктаза I	AY662655
25	<i>MgchlD</i>	Магний-хелатаза, субъединица D	AF014399
26	<i>Mkrn</i>	Макорин, белок с доменом RING-finger	AB116263
27	<i>Mtl</i>	Металлотронеин-подобный белок	Z23097
28	<i>Nin</i>	Фактор инициации нодуляции	AJ493064
29	<i>P4*</i>	Орган-специфичный белок P4	X51594
30	<i>Peam4</i>	MADS-бокс транскрипционный фактор, гомолог AP1	AJ291298
31	<i>PhlC</i>	Фосфолипаза C	AF280748
32	<i>Pk4</i>	Фототропин I	AY093427
33	<i>Psi1</i>	Вакуолярная кислая инвертаза	AY112703
34	<i>Rnp33</i>	Рибонуклеопротеин с массой 33 кДа	AF255058
35	<i>S2*</i>	Орган-специфичный белок S2	X51595
36	<i>Sdh4</i>	Сукцинатдегидрогеназа, субъединица 4	AB070892
37	<i>Sym29</i>	CLV1-подобная рецепторная киназа с LRR-доменом	AJ495759

* Амплификацию фрагментов S2 и P4, имеющих сходные последовательности, предполагалось проводить мультиплексно с помощью универсальных праймеров

После подбора праймеров и отработки условий ПЦР удалось амплифицировать фрагменты почти всех целевых генов гороха, за исключением семи (*ChlSyn*, *Lf*, *S2*, *P4*, *CYP73a*, *Paal*, *Icdh1*). В указанных случаях синтез продуктов нужной длины не происходил.

Длины продуктов ПЦР при низком уровне неспецифической амплификации, которого удавалось добиваться путем оптимизации условий, соответствовали ожидаемым (Табл. 3). В некоторых случаях (гены *Adh1*, *Mil*, *Sym29*) с высокой повторяемостью наблюдалась амплификация одного-двух дополнительных продуктов, что может быть связано с неспецифическим отжигом праймеров или с наличием в геноме паралогичных последовательностей.

Табл. 3. Длины всех амплифицированных фрагментов генов гороха

№	Ген	Длина продукта, п.о.	№	Ген	Длина продукта, п.о.
1	<i>Aair</i>	2600	32	<i>Icdh1</i>	—
2	<i>Acs1</i>	1800	33	<i>Ivdh</i>	1950
3	<i>Adh1</i>	1500, 1300, 1200	34	<i>Lf</i>	—
4	<i>Apx1</i>	1700	35	<i>Mccc</i>	2250
5	<i>Apy</i>	2000	36	<i>Mdhar1</i>	2350
6	<i>As2</i>	1100	37	<i>MgchlD</i>	1000
7	<i>AtpF1</i>	2200	38	<i>Mkrn</i>	2350
8	<i>Bfruct</i>	500	39	<i>Mil</i>	850*, 370
9	<i>Bgl1</i>	1200	40	<i>Nin</i>	2600
10	<i>Cbl</i>	2250	41	<i>P628</i>	—
11	<i>CipPor</i>	1100	42	<i>Paal</i>	—
12	<i>Cop1</i>	2000	43	<i>Peam4</i>	2150
13	<i>Cry1</i>	2000	44	<i>Pepc</i>	3500
14	<i>Cyp73</i>	—	45	<i>PhlC</i>	2550
15	<i>Dbh</i>	2050	46	<i>Phy</i>	1650
16	<i>Egl1</i>	2400	47	<i>Pk4</i>	2200
17	<i>Fbpp</i>	1700	48	<i>Psi1</i>	1900
18	<i>Fed1</i>	800**	49	<i>Rb</i>	3000
19	<i>Fro1</i>	2400	50	<i>Rnp33</i>	2050
20	<i>GapC1</i>	2300	51	<i>Rpl22</i>	900
21	<i>GapN</i>	1400	52	<i>S2, P4</i>	—
22	<i>GprAll</i>	2300	53	<i>Sahh</i>	1500
23	<i>GprB</i>	2200	54	<i>Sdh4</i>	2200
24	<i>Gr</i>	2200	55	<i>Sodmt</i>	1400
25	<i>Gsn1</i>	1350	56	<i>Ssyn</i>	1850
26	<i>Gsp</i>	900	57	<i>Sym29</i>	1600, 300**
27	<i>Hol</i>	1850	58	<i>TubA1</i>	1350
28	<i>Hop1</i>	900	59	<i>Uni</i>	1250
29	<i>HsfA</i>	500	60	<i>Vc2</i>	1600
30	<i>Hsp70</i>	1950	61	<i>Vc3</i>	2350
31	<i>Iaa6</i>	1950			

* Выявлен полиморфизм по длине фрагмента, ** Выявлен полиморфизм по наличию/отсутствию амплифицированного фрагмента

В двух случаях (фрагмент *Fed1* длиной 850 п.о., соответствующий целевой последовательности и отсутствующий у линии WL1238, а также дополнительный продукт реакции с праймерами к гену *Sym29*, имеющий длину около 300 п.о., не соответствующий

целевой последовательности и амплифицирующийся только с ДНК линии Флагман) был обнаружен полиморфизм по наличию/отсутствию амплифицированного фрагмента, причем проверка растений F_2 показала, что в обоих случаях полиморфные варианты ведут себя как состояния менделевских признаков с взаимодействием по типу полного доминирования. Данный вид полиморфизма в случае гена *Fed1* был использован в генетическом анализе.

При амплификации участка гена *Mil* с ДНК различных линий гороха был обнаружен полиморфизм по длине фрагмента: среди двух продуктов реакции более протяженный (около 900 п.о.; этот фрагмент соответствует целевой последовательности) у линии WL1238 имел несколько большую длину (на ~5%), чем у линии Chi15. Полученный таким образом кодоминантный маркер с полиморфизмом по длине ПЦР-фрагмента был использован в генетическом анализе.

Многие гены морфогенеза, а также важные структурные гены цепи биосинтеза хлорофилла у гороха не секвенированы, однако их выделение из генома может быть осуществимо в ходе ПЦР с вырожденными праймерами. Данные о локализации таких генов стали бы важным подспорьем для идентификации различных мутантных локусов у сортов и линий гороха, содержащихся в отечественных и мировых коллекциях. В настоящей работе была предпринята попытка выделить шесть неизвестных генов гороха с целью их дальнейшего изучения и локализации. Для подбора праймеров были использованы последовательности шести генов *Arabidopsis thaliana*: генов *CLV2*, *FAS1* и *FAS2*, участвующих в регуляции структуры апикальной меристемы, и генов *CHLG*, *CHLI* и *CHLH*, продукты которых играют важную роль в синтезе хлорофилла. Интерес к данным локусам вызван прежде всего тем, что фенотип соответствующих мутантов *Arabidopsis* имеет сходные черты с фенотипом растений нескольких линий гороха, полученных в ходе работ по индуцированному мутагенезу на кафедре генетики МГУ.

Подбор вырожденных праймеров проводился вручную с использованием множественного выравнивания (ClustalW) последовательностей указанных генов и их известных гомологов у бобовых.

Табл. 4. Предполагаемые гены гороха с неизвестной последовательностью

№	Ген	Кодируемый белок	№ в Genbank	Ортолог <i>Arabidopsis</i>
1	<i>PsCHLG</i>	Хлорофилл-синтаза		NM_115041
2	<i>PsCLV2</i>	CLV2-подобный белок	DQ478949*	NM_105212
3	<i>PsFAS1</i>	FAS1-подобный белок	DQ480717*	NM_105221
4	<i>PsFAS2</i>	FAS2-подобный белок	DQ480716*	NM_203263
5	<i>PsCHLI</i>	Магний-хелатаза, субъед. I		NM_117962
6	<i>PsCHLH</i>	Магний-хелатаза, субъед. H		NM_121366

* [Коновалов и др., 2006]

В случае предполагаемых генов *PsCLV2*, *PsFAS1*, *PsFAS2*, *PsCHL1* и *PsCHLH* после оптимизации условий реакции удалось получить ПЦР-фрагменты ожидаемого размера без выраженного фона неспецифических продуктов (Табл. 5). Фрагменты *PsCLV2*, *PsFAS1* и *PsFAS2* были клонированы и секвенированы, а их последовательности были размещены в базе GenBank под соответствующими номерами (Табл. 4). При амплификации с праймерами для гена *PsCHLG* наблюдалось большое количество неспецифических продуктов, и выделение данного гена у гороха на текущий момент признано нами не удавшимся.

Табл. 5. Параметры ПЦР и длины фрагментов предполагаемых генов гороха

№	Фрагмент	Праймеры (прямой и обратный)	Tm, °C	Длина продукта, п.о.
1	<i>PsCHLG</i>	GATACAAATGGTRCCAATWGAWTGTTTGA TATGACAAGCTYGGWRTYCGGTAT	—	—
2	<i>PsCLV2</i>	CCTGAGAGTTTTRCTKTATTTGAAGTC GAGAAAGATACYTGAGGTTKGWCC	58	835
3	<i>PsFAS1</i>	CGTTGTCKAAGCTTGTWGTG AGCTTCWCWTCATTTTMTCC	55	933
4	<i>PsFAS2</i>	GATACCCATGCACACTATGTTTC CAAGTAGAAATGAACCATCWWGAG	60	368
5	<i>PsCHL1</i>	ATTGGWGGTGTRATGATMATG ACTATRTCWCCTCTYAAATCCATC	60	800
6	<i>PsCHLH</i>	GTTGAAGCTTGTGAGRACATTG ACATCCTTRTCAAGATTTCAYTG	60	1500

Таким образом, в ходе первого этапа работы были подобраны праймеры и успешно отработаны условия для амплификации фрагментов 60 генов гороха со средней длиной 1800 п.о. и максимальной длиной 3500 п.о.

Секвенирование и анализ последовательностей фрагментов генома гороха

Фрагменты предполагаемых генов гороха *PsCLV2*, *PsFAS1* и *PsFAS2* были клонированы в Т-векторе и секвенированы. Во всех трех последовательностях с помощью ORF Finder были выявлены открытые рамки считывания. Анализ последовательностей выявил их сильное сходство с теми генами *A. thaliana* и других видов растений (в первую очередь бобовых), которые были использованы при подборе праймеров. Сходство последовательностей гипотетических белковых продуктов с гомологами *Arabidopsis* составило 74% и 87% для *CLV2*, 52% и 71% для *FAS1*, 74% и 84% для *FAS2* (первое число – без учета синонимичных замен, второе – с учетом таковых; параметры результатов BLASTp *identities* и *positives*, соответственно).

Для определения экзон-интронной структуры секвенированных фрагментов был проведен поиск сайтов сплайсинга вручную и с помощью программы GenScan. Во фрагменте *PsCLV2* сайтов сплайсинга обнаружено не было; внутри фрагмента *PsFAS1* выявлено три предполагаемых интрона, а внутри фрагмента *PsFAS2* – один интрон (рис. 1; экзон-интронная структура фрагментов также указана в записях GenBank, см. Табл. 4).

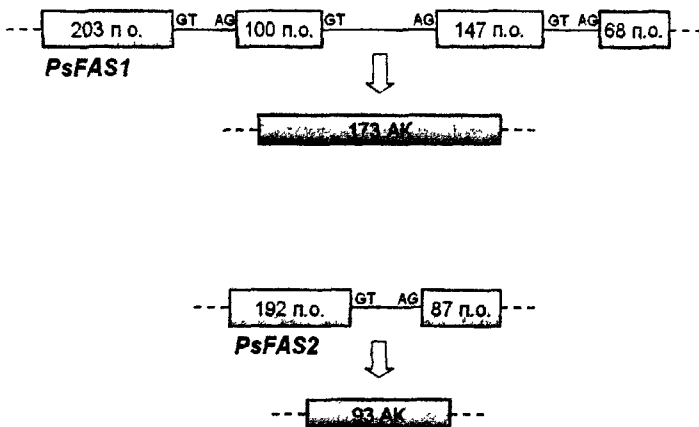


Рис. 1. Предполагаемая экзон-интронная структура фрагментов *PsFAS1* и *PsFAS2*. Экзоны заключены в прямоугольники, интроны представлены линиями «АК» - число аминокислотных остатков.

Поиск полиморфизма внутри фрагментов генов гороха среди набора контрастных линий и сортов

Среди различных методов поиска полиморфизма по наличию сайтов рестрикции в амплифицированных фрагментах генов нами было выбрано экспериментальное расщепление ПЦР-продуктов, полученных из ДНК ряда контрастных линий гороха, 12 эндонуклеазами рестрикции (рис. 2). Набор ДНК контрастных линий включал в себя три или четыре образца, полученных из растений сорта Флагман, мутанта *Chil15*, маркерной линии *WL1238* и представителя вида *Pisum humile* линии *J11794*, использованной авторами одной из генетических карт в качестве тестерной [Brauner et al., 2002]. В ряде случаев линия *J11794* не использовалась. Набор эндонуклеаз рестрикции был составлен на базе каталога «СибЭнзим» и включал в себя следующие ферменты: *AluI*, *AspLEI*, *Bst4CI*, *BstDEI*, *BstFNI*, *HaeIII*, *HinfI*, *HpaII*, *PspN4I*, *RsaI*, *TaqI*, *Tru9I*.

Продукты амплификации 60 фрагментов генов гороха, полученные из ДНК трех или четырех контрастных линий (включая или не включая *J11794*), были обработаны каждой из 12 эндонуклеаз рестрикции. Продукты расщепления были разделены электрофорезом в агарозном геле, после чего спектры фрагментов ДНК различных линий были сопоставлены между собой, а также с теоретическими ожидаемыми спектрами, полученными на основе последовательностей генов в GenBank с помощью программы REBase REBsites (<http://tools.neb.com/REBsites/index.php3>) (Рис. 2, 3, 4).

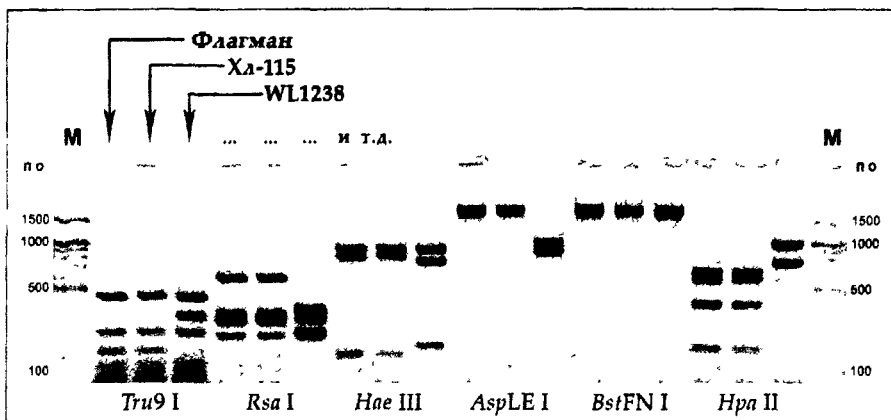


Рис. 2. Поиск рестриктивного полиморфизма во фрагменте гена *Ho1*, амплифицированного из ДНК линий гороха Флагман, *Chi115* и *WL1238* и обработанного шестью различными эндонуклеазами рестрикции. Электрофорез в 1.7% агарозном геле. Маркер длин фрагментов ДНК – “100 bp + 1.5 kbp DNA Ladder” (СибЭнзим).

В ходе проделанной работы был обнаружен полиморфизм внутри 43 фрагментов генов гороха, выявляемый одной или несколькими эндонуклеазами рестрикции (Табл. 6). 15 фрагментов были признаны мономорфными по наличию сайтов рестрикции всех использованных ферментов. Полиморфизм внутри фрагментов *PsCLV2* и *PsFAS2* не изучался в связи с их небольшой длиной (~300 п.о. в случае *PsFAS2*) или высокой степенью консерватизма последовательности, выявленной с помощью BLAST на межвидовом уровне (в случае *PsCLV2*). В трех случаях (*Acs1*, *Phy*, *Psi1*) полиморфизм был выявлен только между идентичными спектрами линий Флагман, *Chi115* и *WL1238*, с одной стороны, и спектром линии Л1794 – с другой стороны; отсутствие полиморфизма в картирующих популяциях не позволило локализовать данные гены.

Сравнение спектров с теоретически ожидаемыми позволило подтвердить специфичность амплификации и соответствие ампликонов целевой последовательности во всех случаях, кроме гена алкогольдегидрогеназы *Adhl* (среди трех амплифицированных фрагментов только самый протяженный соответствовал целевой последовательности, согласно спектрам его индивидуального расщепления эндонуклеазами рестрикции после выделения из геля и очистки).

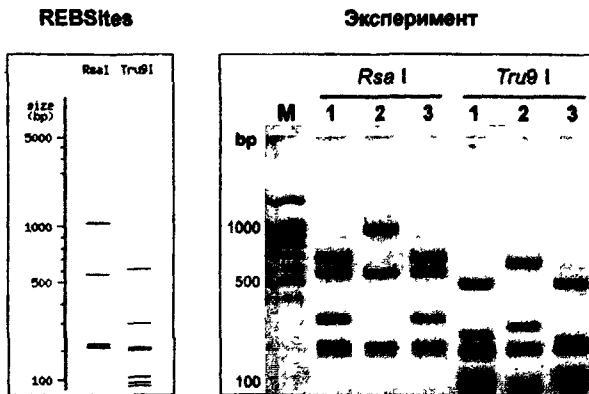


Рис. 3. Сравнение ожидаемых (слева) и наблюдаемых (справа) спектров рестриктивных фрагментов участка гена *Rnp33*. Слева – компьютерная модель электрофореграммы, полученная с помощью программы *REBSites* на основе известной последовательности фрагмента (№ в Genbank AF255058). Справа – обработка ампликона *Rnp33* эндонуклеазами *RsaI* и *Tru9I*; 1, 2, 3 – линии гороха Флагман, *Chi115* и *WL1238*, соотв. Электрофорез в 1.7% агарозном геле. Маркер длин фрагментов ДНК – “100 bp + 1.5 kbp DNA Ladder” (СибЭнзим). Видно, что спектры линии *Chi115* совпадают с теоретически ожидаемыми.

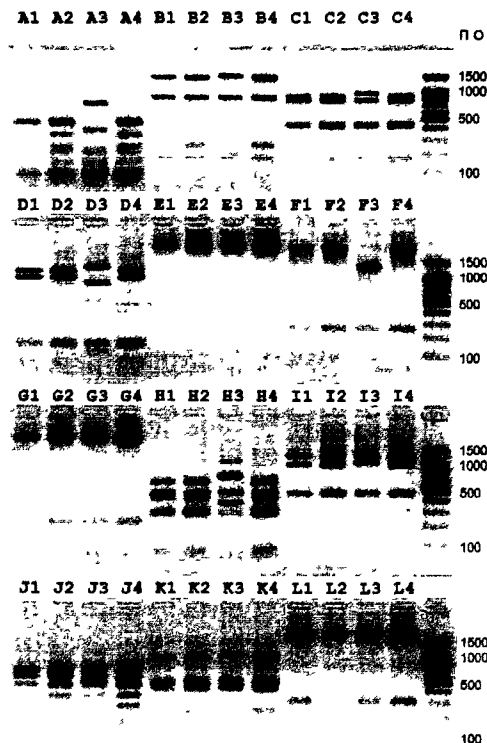


Рис. 4. Поиск рестриктоного полиморфизма во фрагменте гена *Aair*. 1, 2, 3, 4 – линии гороха Флагман, *Chi115*, *WL1238* и *LI1794*, соответственно; расщепление эндонуклеазами: A – *Tru9I*, B – *TaqI*, C – *RsaI*, D – *HaeIII*, E – *AspLEI*, F – *BstFNI*, G – *HpaII*, H – *HinfI*, I – *PspN4I*, J – *BstDEI*, K – *Bst4CI*, L – *AluI*. Электрофорез в 1.7% агарозном геле. Маркер длин фрагментов ДНК – “100 bp + 1.5 kbp DNA Ladder” (СибЭнзим).

Табл. 6. Число полиморфных вариантов для всех изученных фрагментов среди трех или четырех проанализированных линий гороха

№	Маркер	Число линий	Число ПВ	№	Маркер	Число линий	Число ПВ
1	<i>Aair</i>	4	2	31	<i>HsfA</i>	3	1*
2	<i>Acs1</i>	4	2*	32	<i>Hsp70</i>	4	1*
3	<i>Adh1</i>	3	2	33	<i>Iaa6</i>	3	2
4	<i>Apx1</i>	4	3	34	<i>Ivdh</i>	3	2
5	<i>Apy</i>	4	3	35	<i>Mccc</i>	4	2
6	<i>As2</i>	4	3	36	<i>Mdhar1</i>	4	3
7	<i>AtpF1</i>	3	2	37	<i>MgchlI</i>	3	2
8	<i>Bfruct</i>	3	1*	38	<i>MgchlD</i>	3	1*
9	<i>Bgl1</i>	3	2	39	<i>MgchlH</i>	3	1*
10	<i>Cbl</i>	4	4	40	<i>Mkrn</i>	3	1*
11	<i>CipPor</i>	3	3	41	<i>Mil</i>	4	2
12	<i>CLV2</i>	-		42	<i>Nin</i>	3	2
13	<i>Cop1</i>	3	2	43	<i>Peam4</i>	3	2
14	<i>Cry1</i>	4	3	44	<i>Pepc</i>	3	2
15	<i>Dbh</i>	4	2	45	<i>PhLypC</i>	3	3
16	<i>Egl1</i>	3	2	46	<i>Phy</i>	4	2*
17	<i>FAS1</i>	4	2	47	<i>Pk4</i>	3	2
18	<i>FAS2</i>	-		48	<i>Psil</i>	4	2*
19	<i>Fbpp</i>	3	2	49	<i>Rb</i>	3	3
20	<i>Fed1</i>	3	2	50	<i>Rnp33</i>	3	3
21	<i>Fro1</i>	4	4	51	<i>Rpl22</i>	3	2
22	<i>GapC1</i>	4	3	52	<i>Sahh</i>	4	3
23	<i>GapN</i>	3	1*	53	<i>Sdh4</i>	3	1*
24	<i>GprAII</i>	3	2	54	<i>Sodmt</i>	3	2
25	<i>GprB</i>	3	3	55	<i>Ssyn</i>	3	3
26	<i>Gr</i>	3	1*	56	<i>Sym29</i>	3	1*
27	<i>Gsn1</i>	3	2	57	<i>TubA1</i>	3	3
28	<i>Gsp</i>	3	1*	58	<i>Uni</i>	3	1*
29	<i>Hol</i>	3	2	59	<i>Vc2</i>	4	1*
30	<i>Hop1</i>	3	1*	60	<i>Vc3</i>	3	1*

* Полиморфизм между линиями Флагман, *Chi115* и *WL1238* не выявлен, что не дало возможности локализовать ген в ходе генетического анализа

Дополнительный анализ полиморфизма внутри амплифицированных фрагментов среди линий, сортов и различных видов гороха

Высокий уровень полиморфизма, обнаруженный в ходе предварительного анализа среди 3 или 4 линий гороха и проявляющийся как наличие множества полиморфных сайтов рестрикции в составе фрагментов ряда генов, делает полученные на их основе CAPS-маркеры многообещающим инструментом не только для картирования генома гороха, но и для надежной паспортизации линий и сортов этого важного вида культурных растений: воспроизводимость результатов при генотипировании методом CAPS значительно выше, чем

при работе с RAPD и другими методами случайного ампликона, и широкое распространение CAPS-маркеров в паспортизации сортов затруднено в первую очередь из-за недостатка полиморфизма по каждому отдельному локусу. У гороха до сих пор не проводилось масштабных исследований изменчивости последовательностей генов, ставших предметом изучения в настоящей работе. По этой причине нами был проведен дополнительный анализ рестриктивного полиморфизма по ряду CAPS-маркеров с вовлечением дополнительных линий, сортов, подвидов и видов гороха (рис. 5). Среди проанализированных сортов большая часть представляет собой исходные формы, использованные ранее в программе индуцированного мутагенеза на кафедре генетики МГУ; изученные маркерные линии обычно используются в качестве тестерных при проведении генетического анализа. Генотипирование 13 широко используемых в генетическом анализе сортов и линий гороха (рис. 5) было проведено с использованием 24 полиморфных CAPS-маркеров (Приложение 1); в определении генотипа по 9 наиболее полиморфным локусам (*Aair*, *Adhl*, *Apy*, *Cryl*, *Fbpp*, *Fro1*, *Hol*, *Peam4*, *Rnp33*) было задействовано 24 линии, сорта, вида и подвида гороха (табл. 7).

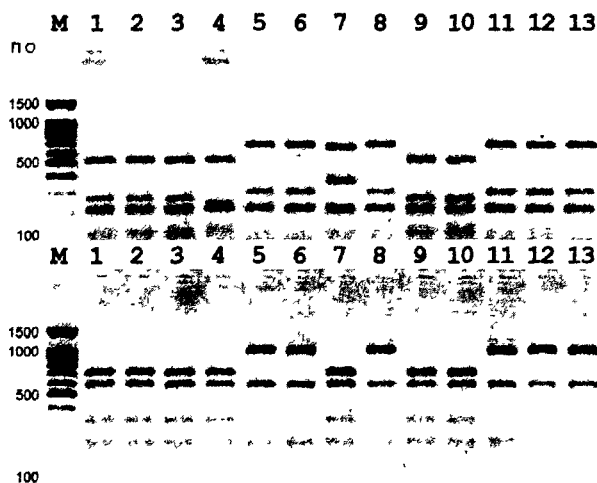


Рис. 5. Внутривидовой полиморфизм по спектрам рестрикционных фрагментов участка гена *Rnp33*, расщепленного эндонуклеазами *Tru9I* (вверху) и *RsaI* (внизу), среди 13 линий и сортов гороха (№№ 1–13, соответственно Ранний Зеленый, Капитал, Филби, Флагман, Немчиновский, Роза Краун, Виола, *Chil15*, *WL1238*, *WL1132*, *WL851*, *WL1072*, *Slow*) Электрофорез в 1.7% агарозном геле. Маркер длин фрагментов ДНК – “100 bp + 1.5 kbp DNA Ladder” (СибЭнзим)

Генотипирование линий и сортов гороха позволило выявить относительно высокий уровень полиморфизма, в случае ряда генов сопоставимый с таковым для микросателлитных маркеров гороха [Loridon et al., 2005] (к примеру, при обработке фрагмента *Hol* эндонуклеазой *HpaII* нами выявлено 7 полиморфных вариантов; в указанной работе для микросателлитных локусов было обнаружено в среднем по 5 полиморфных вариантов среди 8 контрастных линий гороха). Полученная информация о состоянии полиморфных сайтов рестрикции у 24 линий, сортов, видов и подвидов гороха позволила создать набор молекулярных маркеров для их надежной паспортизации и идентификации (Табл. 7).

Минимальное число маркеров, позволяющее однозначно различать все исследованные линии, равно 6; другими словами, для идентификации любой линии достаточно провести одновременно или последовательно 6 реакций. Используемые в созданном наборе эндонуклеазы рестрикции отличаются сравнительно невысокой стоимостью.

Табл. 7. Распределение полиморфных вариантов по 6 CAPS-маркерам у 24 линий, сортов, подвидов и видов гороха.

		Немалоосетский	Романский Земский	Калугин	Волода	Фадим	Ром Краун	Флагман	Torlas	Alaska	Slav	Spanta	SOE	Rondo	Finak	Fiscon	WL1238	WL151	WL112	WL1072	WL10102	WL1794	WL12	WL4	WL123
Aair	Нае III	1	1	1	1	2	1	1	1	3	2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Cry1	Taq I	3	3	3	3	1	3	1	1	1	3	1	1	1	1	1	3	3	1	3	1	6	4	5	3
Fbpp	Taq I	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1	3	1	1	1	4	1
Fro1	Taq I	5	1	2	1	3	3	1	2	5	1	1	2	5	5	2	3	1	3	3	1	4	2	4	2
HO1	Hpa II	1	1	1	3	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	3	2	1	2	2	1	5	4	6	7
Rnp33	Tlu9 I	3	3	4	3	3	1	2	2	2	2	2	4	3	3	2	3	2	3	2	2	5	4	5	1

Использование CAPS-полиморфизма для локализации генов на карте групп сцепления гороха

Для локализации генов с полиморфными последовательностями на карте групп сцепления гороха был проведен генетический анализ в популяциях гибридов F₂ от скрещиваний (Chi115 x WL1238) и (Флагман x WL1238). В данных популяциях уже проводился анализ с использованием большого числа случайных маркеров, в ходе которого были построены насыщенные карты групп сцепления гороха [Чегамирза, 2004].

В ходе генетического анализа было идентифицировано состояние всех полиморфных маркеров у 38-120 растений F₂ одной или двух популяций (рис. 6). Расщепления по каждому маркеру были проверены на соответствие гипотезе о моногенном наследовании (кодоминантное проявление, расщепление 1:2:1) с помощью подсчета χ^2 ; в большинстве случаев значительных отклонений обнаружено не было.

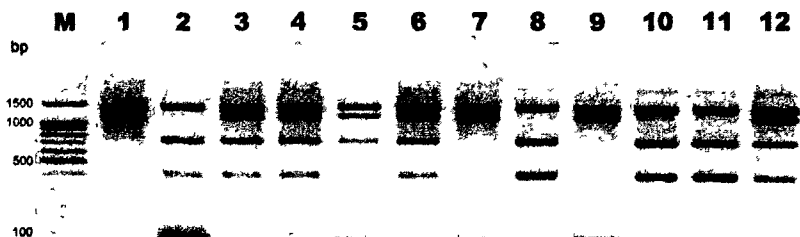


Рис. 6. Расщепление по полиморфным состояниям маркера PhlC (ген фосфолипазы C) у гибридов F₂ от скрещивания Chi115 x WL1238. Расщепление эндонуклеазой TaqI 1, 2 – родительские растения; 3–12 – растения F₂. Электрофорез в 1 % агарозном геле. Маркер для фрагментов ДНК – “100 bp + 1.5 kbp DNA Ladder” (СибЭнзим).

После проверки достоверности гипотез о моногенном наследовании полиморфных вариантов данные о расщеплениях были внесены в общие исходные файлы формата Mapmaker для двух указанных скрещиваний, содержащие ранее полученные данные о фенотипе растений по качественным морфологическим признакам и по ряду случайных маркеров (около 125 в каждой популяции) [Чегамирза, 2004; Чегамирза и др., 2004].

В ходе проведенного генетического анализа удалось локализовать большую часть исследованных маркеров. Некоторые гены с неясной локализацией (*Cry1*, *Peam4*, *Fro1*, *GapC1*) во время выполнения данной работы были картированы в других лабораториях [Grusak et al., 2004; Hecht et al., 2005], и поэтому могут быть использованы в качестве якорных локусов. Принадлежность ряда новых маркеров к известным группам сцепления определить не удалось. Среди локусов с неясным положением – гены *Dhh*, *Bgl1*, *Ho1* и *AtpF1*. Тем не менее, каждый среди указанных локусов проявил сцепление с несколькими RAPD-маркерами, сегрегирующими в картирующих популяциях, и в совокупности с ними изученные гены были выделены в отдельные «дополнительные» группы сцепления. Точное картирование генов будет завершено по мере ввода в анализ новых маркеров.

Проведенная работа показала, что исследованные локусы распределены по всем 7 хромосомам гороха. Наибольшее количество генов локализовано в самой протяженной III группе сцепления, длина которой составила 180,2 сМ. Протяженные участки с достоверным сцеплением исследованных локусов выявлены также в V (от гена *R* до *Fbpp*, 87,4 сМ) и в VII (от *Gsn1* до *Iaab*, 157,6 сМ) группах сцепления.

Интегрированные данные о локализации исследованных генов и маркеров, полученные в ходе генетического анализа на популяциях F₂, представлены на схеме (рис. 7). Положение 15 генов определено впервые; положения других локусов, известные по литературным данным, были подтверждены или по меньшей мере не опровергались: случаи их достоверного сцепления с маркерами других районов генома не зарегистрированы.

В ходе работы удалось локализовать два фрагмента генома гороха (*PsChl1* и *PsFas1*), предположительно гомологичные генам *A. thaliana* *CHL1* и *FAS1*. Полученная информация представляет большой интерес, поскольку картированные локусы могут выступать в качестве кандидатов для идентификации мутантных генов у растений гороха с дефектами биосинтеза хлорофилла (в случае *PsChl1*) и с признаком фасциации стебля (в случае *PsFas1*). Особенно важен тот факт, что фрагмент *PsFas1* локализован в том же районе V группы сцепления, что и одна из мутаций, приводящая к фасциации стебля в сочетании с гипернодуляцией [Sidorova and Uzhintseva, 1995]. Тест на косегрегацию между мутантным аллелем данного гена и полиморфным CAPS-маркером *PsFas1*, возможно, позволит ответить на вопрос о роли гена-гомолога *FAS1* у гороха посевного.

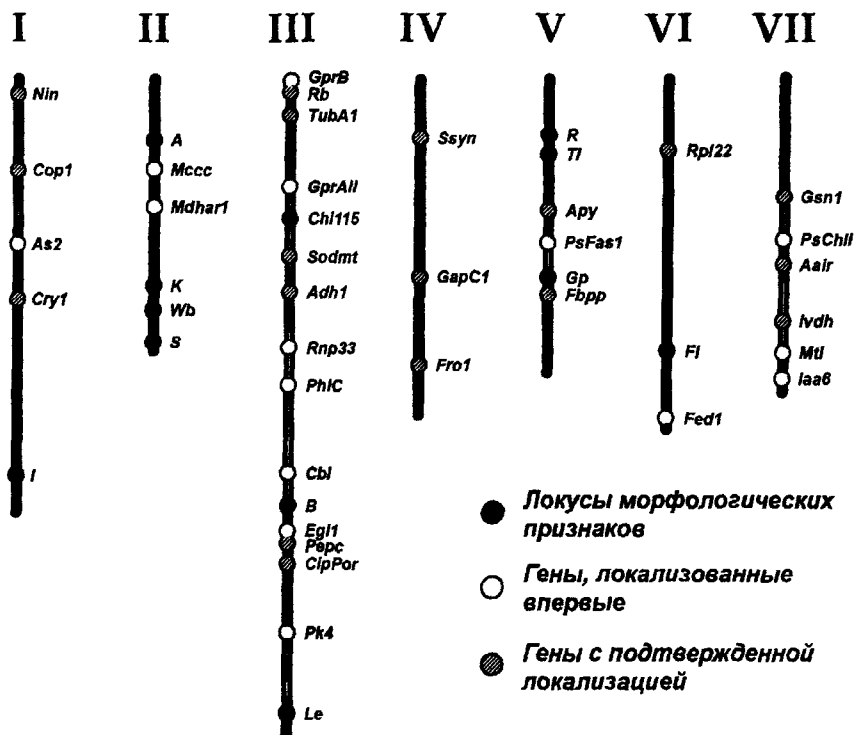


Рис. 7. Схема хромосом гороха с приблизительными положениями изученных генов, полученная при объединении карт для двух популяций F_2 и литературных данных. Белой линией отмечены участки между локусами, для которых хотя бы на одной популяции показано достоверное сцепление (LOD-балл не менее 3.00). Относительные длины групп сцепления соответствуют карте из работы [Ellis et al., 2002].

Сравнение генетической карты гороха с распределением предполагаемых ортологов изученных генов на физической карте генома *M.truncatula*

CAPS-маркеры, выявляющие внутривидовой полиморфизм, могут с успехом быть использованы для сопряжения генетических и физических карт [Meksem et al., 2005]. Наличие большого числа локализованных генов во всех группах сцепления позволило нам провести сопоставление полученной генетической карты гороха с распределением предполагаемых гомологичных последовательностей на физической карте генома люцерны *Medicago truncatula* (рис. 8). Поиск гомологов в секвенированной части генома люцерны был проведен *in silico* с использованием последовательностей генов гороха из GenBank и последовательностей их предполагаемых белковых продуктов. Для поиска в геноме люцерны предполагаемых гомологов гена *PsChl1* гороха использовалась последовательность гена *Chl1*

сои (D45857), так как ген субъединицы I Mg-хелатазного комплекса гороха еще не секвенирован. Аналогично, при поиске гомологов гена *Sahh* использовалась последовательность гена аденозилгомоцистеиназы люцерны *Medicago sativa* (№ в Genbank L36119), на базе которой были подобраны праймеры для ПЦР с ДНК гороха [Brauner et al., 2002].

Кроме того, на физической карте люцерны были локализованы участки, сходные с секвенированными генами классических морфологических признаков гороха. менделевскому локусу *R* (ответающему за форму семян) соответствует ген *SBEI* (№ в Genbank X80009), а локусу *Le* – ген гибберелин-3 β -карбоксилазы (№ в Genbank U93210).

20 локусов из 42 проанализированных оказались расположены у гороха и люцерны в тех хромосомах, для которых была показана высокая степень синтении в экспериментальных работах по сравнительному картированию на уровне генетического анализа. Такие локусы были обнаружены во всех группах сцепления гороха, в первую очередь в III группе (8 локусов). Таким образом, физическая карта генома люцерны *M. truncatula* сохраняет определенную степень соответствия генетической карте гороха, хотя и в меньшей степени, чем генетическая карта люцерны *M. sativa* [Kalo et al., 2004].

Многие предполагаемые ортологи генов гороха оказались локализованы в негомологичных, согласно литературным данным, районах хромосом люцерны. Отчасти это может быть связано с тем, что найденные *in silico* последовательности не являются наиболее близкими гомологами генов гороха, а обнаружение последних в настоящий момент было невозможным из-за незавершенности процесса секвенирования генома люцерны. Кроме того, расположение ряда ВАС-клонов на незаконченной физической карте может быть ошибочным, поскольку применяемая при ее построении степень избыточности секвенируемых клонов довольно невелика и в настоящий момент составляет около 2 [VandenBosch and Stacey, 2003]. Тем не менее, в некоторых случаях при сохранении общей синтении района хромосомы имеет место локальное несоответствие порядка следования локусов в геномах гороха и люцерны, которое может быть объяснено наличием инверсий и других перестроек хромосом (в частности, у люцерны не соблюдается порядок следования локусов III группы сцепления гороха *Adhl* – *PhlC* – *Cbl* – *CipPor*, хотя все сходные с ними фрагменты располагаются в гомологичной 3 хромосоме). Кроме того, очень высокая степень сходства (значение E-value меньше 10^{-200}) последовательностей ряда генов гороха с некоторыми участками генома люцерны, расположенными в несинтенных районах, может говорить о наличии в геноме люцерны паралогичных локусов, небольших дупликаций или транслокаций. По мере завершения работы в области физического картирования и секвенирования генома люцерны полученные результаты будут уточнены.

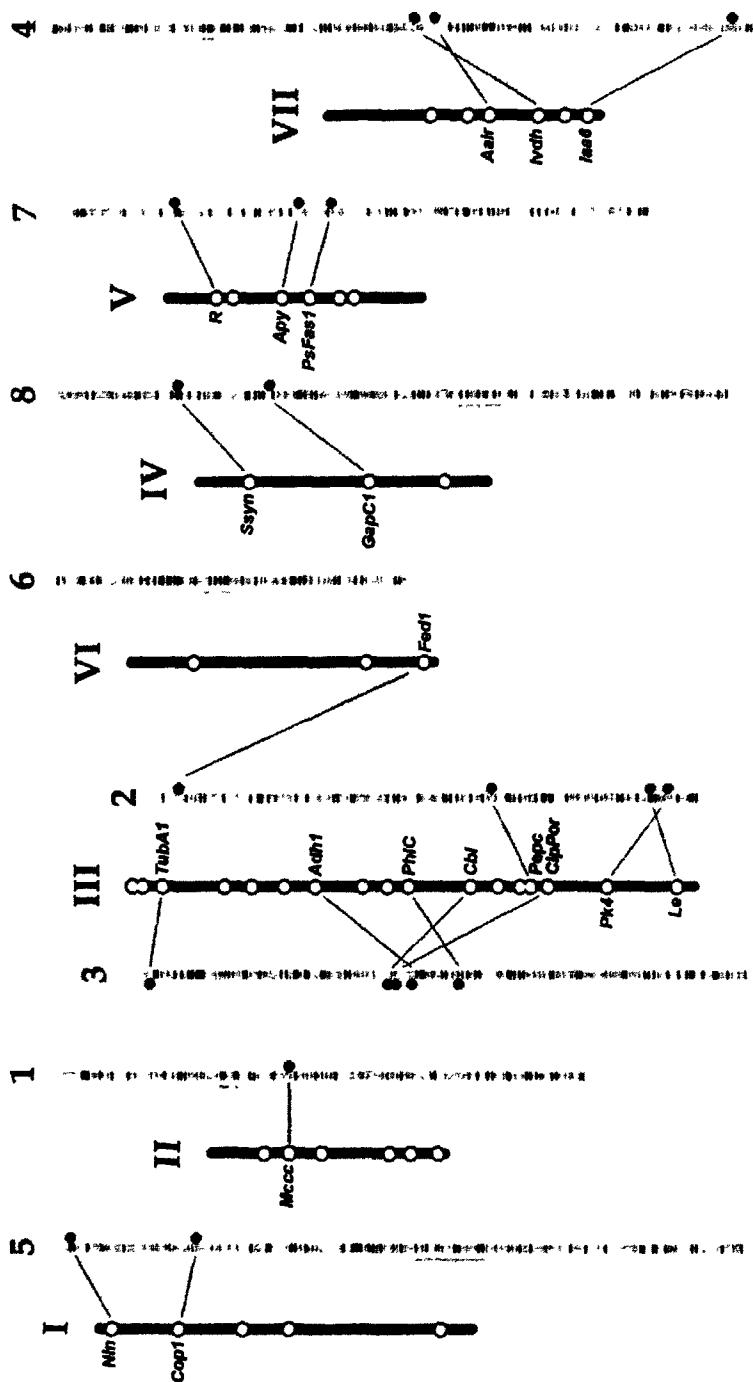


Рис. 8. Составление карты групп сцепления гороха (римские цифры) и физической карты хромосом люцерны (арабские цифры). Сегменты хромосом, сцепления между которыми предполагается исходя из литературных данных [Kato et al., 2004; Choi et al., 2004a, b], объединены тонировкой. На карте отмечены гены, расположенные в синенных районах хромосом.

Как и следовало ожидать, относительные расстояния между локусами на генетической и физической картах могут различаться (см. участки *Nin – Cop1*, *PhlC – Adh1 – TubA1*, *R – Apy – PsFasI*). Тем не менее, полученные данные могут быть использованы в качестве ориентира при поиске генов-кандидатов для мутаций, картированных у гороха с помощью генетического анализа, а при проведении более точной локализации мутантных локусов – как инструмент для позиционного клонирования генов *in silico*.

Выводы

1. Подобраны последовательности праймеров и оптимизированы условия для амплификации фрагментов 60 генов гороха посевного;
2. Обнаружен существенный уровень внутривидового полиморфизма у гороха по наличию сайтов рестрикции в амплифицированных фрагментах 43 генов, что обеспечивает возможность широкого применения полученных CAPS-маркеров в генетическом анализе, в том числе в других лабораториях;
3. Показана возможность применения CAPS-метода в качестве средства для надежной паспортизации линий и сортов растений. Предложен набор из 6 CAPS-маркеров для идентификации 24 линий, сортов, видов и подвидов гороха;
4. Клонированы фрагменты генома гороха, сходные с генами *CLV2*, *FAS1*, *FAS2*, *CHLG*, *CHLI* и *CHLH Arabidopsis thaliana*;
5. На базе 40 генов гороха получены полиморфные CAPS-маркеры с кодоминантным проявлением, локализованные на карте групп сцепления гороха в ходе генетического анализа. 15 уникальных генов гороха локализовано впервые. Обнаружена макросинтения между группами сцепления гороха и участками физической карты генома люцерны *Medicago truncatula*.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в научных журналах:

1. Kononov F.A., Toshchakova E.A. and Gostimsky S.A. A CAPS Marker Set for Mapping in Linkage Group III of Pea (*Pisum sativum* L.). Cell. Mol. Biol. Lett. 10 (2005) p.163-172.
2. Гостимский С.А., Кокаева З.Г., Коновалов Ф.А. Изучение организации и изменчивости генома растений с помощью молекулярных маркеров. Генетика. т.41 (2005) №4 с.480-492.
3. Ковеза О.В., Кокаева З.Г., Коновалов Ф.А., Гостимский С.А. Выявление и картирование полиморфных RAPD-маркеров генома гороха (*Pisum sativum* L.). Генетика. т.41 (2005) №3 с.341-348.
4. Чегамирза К., Ковеза О.В., Коновалов Ф.А., Гостимский С.А. Идентификация и локализация гена *chil15* и сцепленных с ним ДНК-маркеров у гороха посевного (*Pisum sativum* L.). Генетика. т.40 (2004) №7 с. 909-915.
5. Cheghamirza K., Koveza O.V., Kononov F.A. and Gostimsky S.A. Identification of RAPD markers and their use for molecular mapping in pea (*Pisum sativum* L.). Cell. Mol. Biol. Lett. 7 (2002) p. 649-655.

Тезисы докладов на конференциях:

1. Коновалов Ф.А. Молекулярные маркеры и постгеномные технологии в изучении генетики бобовых. Материалы Международной Конференции «Генетика в России и мире», посвященной 40-летию ИОГен им. Н.И.Вавилова РАН. М.: ИИИС ФИАН, 2006, с. 96.
2. Коновалов Ф.А., Вячеславова А.О. Клонирование и локализация фрагментов генома гороха посевного, сходных с генами *FAS1* и *FAS2 Arabidopsis thaliana*. Материалы XIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2006». М.: Макс-пресс, 2006, с.119.
3. Коновалов Ф.А. Разработка CAPS-маркеров для анализа генома гороха посевного (*Pisum sativum* L.) и создание базы данных на основе полученной информации. Материалы международной конференции «Ломоносов-2005» М.: Макс-пресс, 2005, с. 102.
4. Коновалов Ф.А., Тошакова Е.А., Гостимский С.А. Молекулярно-генетическое картирование генома гороха посевного (*Pisum sativum* L.). Материалы международной школы-конференции молодых ученых «Системная биология и биоинженерия». М.: Макс-пресс, 2005, с.180.
5. Коновалов Ф.А., Тошакова Е.А. Внутригенный полиморфизм линий и сортов гороха, выявляемый с помощью метода CAPS. Материалы Третьего Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», 2005, с.259.
6. Коновалов Ф.А. CAPS-маркеры с вырожденными праймерами и их потенциал в картировании геномов растений. Материалы XI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2004». М.: ООО «Артхамая», 2004, с.69.
7. Гостимский С.А., Кокаева З.Г., Ковеза О.В., Чегамирза К., Коновалов Ф.А., Дрибноходова О.П. Использование молекулярных маркеров для анализа генома гороха. Материалы III Съезда Всероссийского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) «Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития». М.: Издательство УРСС, т.1, 2004, с.69.
8. Cheghamirza K., Kononov F.A. Gene-based CAPS markers and their use for genetic mapping in pea (*Pisum sativum* L.). Proceedings of the Fourth International Iran and Russia Conference "Agriculture and Natural Resources". Iran, Shahrecord, Dadyar pub., 2004, p.82.

Напечатано с готового оригинал-макета

Издательство ООО "МАКС Пресс"

Лицензия ИД N 00510 от 01.12.99 г.

Подписано к печати 14.07.2006 г.

Формат 60х90 1/16. Усл. печ. л. 1,5. Тираж 100 экз. Заказ 507.

Тел. 939-3890. Тел./Факс 939-3891.

119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М. В. Ломоносова,
2-й учебный корпус, 627 к.

2006A
15824

15924