



на правах рукописи

Дрибноходова

Дрибноходова Ольга Павловна

**Анализ ДНК-полиморфизма гороха
посевого (*Pisum sativum* L.)**

Специальность 03.00.15. – генетика

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2009

03 СЕН 2009

Диссертационная работа выполнена на кафедре генетики биологического факультета Московского Государственного Университета им. М.В Ломоносова.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Гостимский Сергей Александрович.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Кудрявцев Александр Михайлович,

кандидат биологических наук
Малеева Юлия Владимировна.

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук
Центр «Биоинженерия» РАН.

Защита диссертации состоится «01» сентября 2009 г. в «16» часов на заседании диссертационного совета Д 002.214.01 при учреждении Российской Академии Наук Институте общей генетики им. Н.И Вавилова РАН по адресу: 119991, г. Москва, ГСП-1, ул. Губкина, д. 3. Факс (499) 132-89-62, электронная почта iogen@vigg.ru, адрес в Интернете: www.vigg.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения Российской Академии Наук Институте общей генетики им. Н.И Вавилова РАН.

Автореферат разослан «24 августа» 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета Т.А. Синельщикова.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Горох посевной (*Pisum sativum* L.) является старейшим модельным генетическим объектом, имеющим огромное практическое значение. Он широко используется в учебной и научной работе, на нем ведется изучение фотосинтеза и генетики развития, строения генома растений и мутагенеза (Vershinin et al, 2002; Гостимский и др, 2005). При этом общая площадь его посевов в Российской Федерации превышает 800 тыс. га, а собираемый урожай – полтора миллиона тонн в год; по производству зернового гороха Россия занимает третье место в мире (<http://faostat.fao.org>), что делает необходимым детальное изучение генома этого вида.

Однако его генетическая карта в настоящее время находится в стадии изучения и корректировки. Количество известных генетических маркеров гороха недостаточно для проведения точного картирования генов важных качественных и количественных признаков. Кроме того, для картирования на основе конкретных скрещиваний и эффективной селекционной работы необходима дополнительная информация о генотипах скрещиваемых линий, прежде всего по ДНК-маркерам. Поэтому в настоящее время перед исследователями стоят вопросы создания системы идентификации сортов гороха, картирования селекционно-ценных генов и оценки уровня генетических различий между сортами и их селекционного потенциала. Разработка системы надежных молекулярных маркеров, отражающих разнообразие сортов и линий гороха, и получение информации об их полиморфизме у репрезентативного набора сортов являются основой для решения этих задач.

Одним из наиболее современных методов ДНК-анализа является изучение микросателлитных локусов. Метод SSR-анализа (Simple Sequence Repeats) нашел широкое применение в научных и прикладных исследованиях для анализа генома растений и в качестве маркеров при конструировании генетических карт и идентификации видов и сортов (Хлесткина, Салина, 2006). Этот метод позволяет выявлять разнообразие генома по количеству нуклеотидных повторов в конкретных микросателлитных локусах. Большое число обнаруживаемых аллелей и высокий уровень изменчивости делают этот метод одним из наиболее информативных и надежных для изучения

генетического разнообразия. В геноме гороха посевного было обнаружено большое число микросателлитных локусов, однако распределение их аллелей в генотипах отдельных линий и сортов практически не исследовано, что ограничивает их практическое применение (Loridon et al., 2005).

RAPD-метод (Random Amplified Polymorphic DNA), позволяющий быстро выявлять большое число полиморфных локусов, расположенных в различных районах генома, является эффективным методом выявления генетического разнообразия, применяемым на многих культурах. На кафедре генетики Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова RAPD-метод широко применяется для изучения генома гороха, в ходе исследований был получен большой материал по распределению RAPD-фрагментов у различных сортов и линий генетической коллекции гороха (Гостимский и др., 2005).

Одновременное применение RAPD- и SSR-методов позволяет проводить сравнительный анализ изменчивости генома гороха, основанный на разных мутационных механизмах, имеющей разную природу и скорость эволюции.

Цели и задачи

Целью данной работы являлся анализ молекулярно-генетической изменчивости гороха посевного по микросателлитным (SSR) и произвольным (RAPD) маркерам.

В работе были поставлены следующие задачи:

1. Идентифицировать полиморфные RAPD- и SSR-маркеры в ДНК различных линий, сортов и мутантов гороха из коллекции кафедры генетики МГУ и определить генотипы этих форм по обнаруженным локусам.
2. Оценить уровень генетических различий между исследованными формами.
3. Выявить молекулярные маркеры, сцепленные с генами морфологических признаков гороха посевного и построить молекулярно-генетическую карту I группы сцепления.
4. Использовать полученные ДНК-маркеры для изучения изменчивости генома гороха в условиях космического полета.

Научная новизна

Проделанная работа впервые в России представляет данные по распределению аллелей микросателлитных локусов у различных линий, сортов и мутантов гороха посевного и сравнительной оценке генетического разнообразия по двум типам молекулярных маркеров. Впервые проведено генотипирование 40 линий, сортов и мутантов по 24 микросателлитным локусам. В результате проведенной работы была составлена база данных генотипов линий и сортов гороха, широко употребляемых в научной и практической работе, по 205 RAPD-фрагментам и 24 SSR-локусам. На основе полученных данных были определены уровни внутривидового разнообразия гороха по RAPD- и SSR-маркерам. Проведено сравнение мутантных линий с исходными сортами по молекулярным маркерам.

Впервые было обнаружено, что сорта гороха разных направлений селекции различаются как по общему биоразнообразию по обоим типам маркеров, так и по распределению частот аллелей отдельных микросателлитных локусов. В частности, показано, что генетические различия между овощными сортами значительно ниже, чем между зерновыми сортами и маркерными линиями.

В ходе работы было показано, что обе использованные маркерные системы позволяют проводить идентификацию линий и сортов гороха.

Впервые было выявлено наличие внутрилинейного полиморфизма у различных линий, сортов и мутантов гороха посевного как по RAPD-, так и по SSR-маркерам.

В результате проведенной работы впервые была определена локализация гена *Chi42*, участвующего в синтезе хлорофилла, микросателлитного маркера AA155, а также семи RAPD-маркеров. Кроме того, было уточнено взаимное расположение генов *I* и *Af*.

Впервые было установлено, что пребывание растений гороха в условиях космического полета на протяжении трех последовательных поколений не приводит к возникновению новых мутаций на уровне проанализированных последовательностей ДНК.

Практическое значение

В результате проведенной работы была составлена база данных, представляющая молекулярно-генетическое описание исследованных линий,

сортов и мутантов гороха из генетической коллекции кафедры генетики МГУ, используемых в научной и учебной работе. Эта база может быть использована как основа для создания системы идентификации и паспортизации сортов гороха и для сравнения ранее исследованных образцов с вновь изученными.

Анализ генетического родства между разными сортами гороха необходим для планирования скрещиваний как в научной и учебной работе, так и для селекционных мероприятий, а учет внутрисортной гетерогенности – при разработке систем идентификации сортов.

Молекулярные маркеры, положение которых было определено в данной работе, могут быть использованы в дальнейшем при картировании в качестве генетических маркеров. Данные по локализации гена гороха, участвующего в биосинтезе хлорофилла, могут иметь селекционную ценность.

Молекулярно-генетический анализ генома растений, подвергавшихся воздействию условий космического полета, является необходимым этапом для разработки биологических систем жизнеобеспечения человека вне земной биосферы.

Апробация результатов исследований

Основные положения и результаты работы были представлены на XI международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2004» (Москва, 2004); III съезде ВОГиС (Москва, 2004); XII международной конференции «Ломоносов-2005» (Москва, 2005); третьем московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2005); международной конференции «Современные проблемы генетики» (к 40-летию Института генетики и цитологии НАН Беларуси), (Минск, 2005); международной конференции «Генетика в России и мире», посвященной 40-летию ИОГен им. Н.И. Вавилова РАН (Москва, 2006); XIV международной конференции «Ломоносов-2007» (Москва, 2007); конференции молодых ученых, аспирантов и студентов по молекулярной биологии и генетике, посвященной 120-летию рождения Н.И. Вавилова (Киев, 2007); и заслушаны на научном семинаре отдела генетики растений Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН 15 мая 2009 г.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в журналах, включенных в перечень научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, и 9 тезисов.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 155 страницах и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы, состоящий из 173 источников, и приложения. Работа иллюстрирована 24 рисунками, 12 таблицами и 7 диаграммами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

В работе было использовано 40 форм гороха посевного из коллекции кафедры генетики МГУ, в том числе 8 мутантов (Хлорофилл 2, Хлорофилл 13, Хлорофилл 42, Хлорофилл 115, Штамбовый, Скрученный, Waxu 1, Хлорофилл 18), полученных на основе четырех зерновых сортов (Ранний Зеленый, Торсдаг, Капитал, Немчиновский), 13 линий (L-102, L-108, L-131, L-577, L-1132, WL-1238, L-1449, П-2671, Новая Форма 42, R94, Хамелсон, Люпиноид, Роза Краун), несущих от 3 до 12 морфологических маркеров, а также 10 овощных (Анвенд, Афила, Виола, Изумруд, Московский Деликатес, Узкобобовый, Амброзия, Жегаловский, Король Гурмапов, Сахарный) и 9 зерновых (Богатырь, Капитал, Немчиновский, Неосыпающийся, Ogus, Ранний Зеленый, Торсдаг, Филби, Флагман) сортов гороха. Для анализа внутрелинейного полиморфизма было выбрано четыре сорта (Афила, Немчиновский, Торсдаг, Флагман), три мутанта (Штамбовый, Хлорофилл 2, Хлорофилл 42) и пять линий (Новая Форма 42, L-102, L-108, WL-1238, Люпиноид). Генетический анализ и картирование проводили на двух расщепляющихся популяциях второго поколения, полученных от скрещивания линии Новая Форма 42 с мутантом Штамбовый (в популяции было 160 растений), и мутанта Хлорофилл 2 с маркерной линией L-108 (59 растений). Полевые работы проводили на Звенигородской биостанции МГУ в 2004-2007 годах. Для изучения влияния условий длительного космического

полета на геном гороха было использовано 28 растений линии L-131 и 13 растений линии L-102, полученных в результате эксперимента по выращиванию трех последовательных поколений двух генетически маркированных линий гороха – L-102 и L-131. Растения обеих линий высаживали на борту Международной Космической Станции в оранжерее «Лада-3», где они проходили полный цикл вегетации. После созревания половину получаемых семян высаживали в оранжерею для следующего цикла, а остаток передавали на Землю, где выращивали методом гидропоники в условиях, аналогичных оранжерее «Лада-3». Из этих растений выделяли ДНК.

Выделение тотальной ДНК проводили СТАВ-изопропанольным методом. Для анализа было использовано 19 RAPD-, 5 ISSR-, и 4 IRAP-праймера, а также 24 микросателлитных локуса. Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе «Терцик» и МС-2 фирмы «ДНК-технология» по программам: для RAPD-маркеров денатурация при 94°C - 2 мин 30 сек; пять циклов денатурация при 94°C - 30 сек, отжиг праймеров при 40 °C - 30 сек, элонгация при 70,5°C - 1 мин 20 сек; тридцать пять циклов денатурация при 93°C - 20 сек, отжиг праймеров при 37°C - 30 сек, элонгация при 71,5°C - 1 мин; конечная элонгация при 72°C - 5 мин; для SSR, ISSR и IRAP-маркеров денатурация при 94°C - 2 мин 30 сек; пять циклов денатурация при 94°C - 30 сек, отжиг праймеров при t+2 °C - 30 сек, элонгация при 70,5°C - 10 сек; тридцать пять циклов тридцать пять циклов денатурация при 93°C - 20 сек, отжиг праймеров при t°C - 30 сек, , элонгация при 71,5°C - 1 мин; конечная элонгация при 72°C - 5 мин. Температура отжига (t) для каждой пары SSR-праймеров была подобрана экспериментально, для IRAP-праймеров использовали температуру отжига 50°C, для ISSR-праймеров – 56°C.

Для электрофоретического разделения продуктов амплификации с RAPD, ISSR и IRAP-праймерами использовали 1,7% агарозный гель, приготовленный на TBE буфере с добавлением бромистого этидия в конечной концентрации 0,001%. SSR-маркеры с длиной амплифицируемого фрагмента менее 250 п.н. разделяли в 6% неденатурирующем полиакриламидном геле, а с длиной фрагмента более 250 п.н. – в 3% агарозном геле. Напряженность электрического поля при горизонтальном электрофорезе составляла 3 В/см, при вертикальном электрофорезе – 10 В/см.

Для проверки воспроизводимости полученных результатов эксперименты проводили в нескольких (не менее двух) повторностях.

Для генетического анализа расщеплений в F_2 использовали программный пакет Mapmaker 3.0 (Lander et al., 2005), а для оценки генетических расстояний между исследованными формами была использована компьютерная программа TREECON 1.3 (van de Peer, Wachter, 1993)

Результаты и обсуждение

Поиск молекулярно-генетических различий между линиями и сортами гороха

Для изучения генетической изменчивости гороха посевного было использовано 8 RAPD-праймеров. Отдельные праймеры выявляли от 18 до 32 фрагментов, из которых 11-25 были полиморфными. С ДНК отдельных форм гороха всеми праймерами амплифицировалось от 115 до 149 фрагментов, в среднем 132,3 маркера на линию. Всего было получено 205 RAPD-маркеров, 155 из них обнаруживали различия между исследованными линиями (рис.1). Доля полиморфных фрагментов менялась от 61,11% до 84,21%, в зависимости от использованного праймера, составляя в среднем 75,46%. Данные по распределению обнаруженных маркеров среди всех сорока проанализированных образцов были представлены в виде матрицы состояний 205 бинарных признаков.

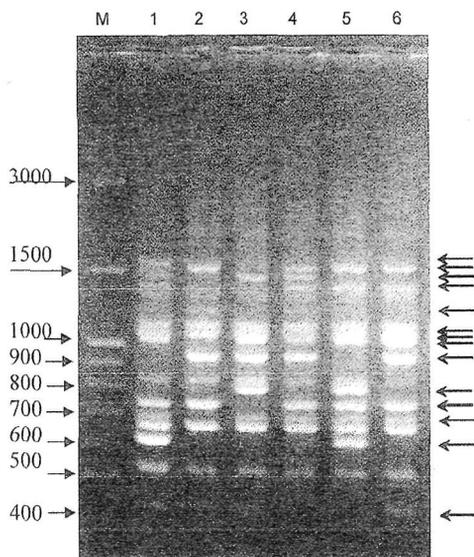
В результате проведенной работы впервые в России были получены данные по аллельному состоянию 24 микросателлитных локусов у 40 форм гороха посевного. Все проанализированные линии и сорта отличались уникальным сочетанием аллелей, а сами аллели хорошо распознавались при повторных анализах (рис. 2).

Количество аллелей, амплифицирующихся в конкретном локусе, менялось от 2 (PSU51918), до 10 (AB71). Всего было получено 124 аллеля, что составляет в среднем 5,17 аллеля на локус. Индекс полиморфизма каждого локуса PIC (Polymorphism information content), равный

$$PIC = 1 - \sum(p_i)^2, \text{ где } p_i - \text{частота аллеля}$$

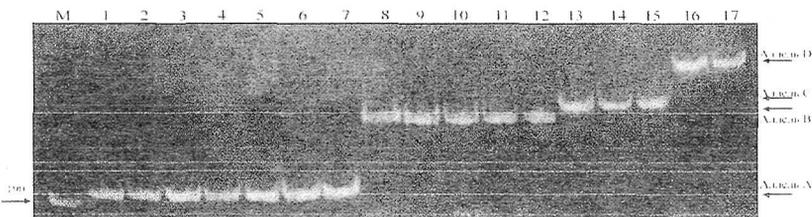
менялся от 0,119 (AA258) до 0,840 (AB71), составляя в среднем 0,635. (таблица 1).

Рисунок 1. RAPD-спектры, полученные при амплификации ДНК линий гороха с праймером K8.



Обозначения: 1 – L-131, 2 – L-577, 3 – L-1132, 4 – L-1449, 5 – Л-2671, 6 – Люпиноид, М – маркер 100 + 1,5 + 3 кб (производство «СибЭнзим»). Электрофорез в 1,7% агарозном геле. Стрелками указаны полиморфные фрагменты.

Рисунок 2. SSR-спектры линий и сортов гороха, полученные при амплификации локуса AD160.



Обозначения: 1 - Анвенд, 2 – Амброзия, 3 – Виола, 4 – Орус, 5 – Ранний Зеленый, 6 – Скрученный, 7 – Л-2671, 8 – Афилла, 9 – R94, 10 – L-131, 11 – L-577, 12 – L-1449, 13 – Немчиновский, 14 – Роза Краун, 15 – Новая Форма 42, 16 – L-1132, 17 – WL-1238. М – маркер pUC322/*MspII*, фрагмент 190 п.н. (производство «СибЭнзим»). Стрелками указаны четыре амплифицируемых аллеля. Электрофорез в 6% полиакриламидном геле.

Полученные матрицы представляют собой базу данных по аллельным состояниям исследованных RAPD- и SSR- маркеров и являются основой для расчета уровня внутривидовой изменчивости гороха посевного и определения сортовой принадлежности образцов.

Таблица 1. Аллельные варианты микросателлитных локусов.

	А-венд	Амброзия	Афилла	Богатырь	Виола	Жегаловский	Изумруд	Капитал	Король Гурманов	Московский Деликатес	Неосыпающийся	Ogus	Ранний Зеленый	Роза Краун	Сахарный	Тордаг	Узкобобовый	Филби	Флагман	Число аллелей	Размер аллелей (самого короткого и самого длинного, приближительный в п.н.)	PIС	группа сцепления	
A9	D	E	E	E	E	E	D	D	C	D	E	C	D	E	D	D	D	D	D	E	5	360-390	0,744	4
AA67#370	A	B	0	C	A	A	A	C	B	A	D	B	F	D	D	D	D	D	D	7	370-420	0,762	1	
AA81	F	C	F	A	F	C	F	D	C	F	B	D	C	A	F	D	D	D	D	7	220-240	0,794	5	
AA121	B	0	A	E	D	A	D	B	0	0	C	0	0	D	D	B	0	D	A	6	325-340	0,807	1	
AA155	C	C	C	B	C	C	C	B	C	B	0	E	0	0	C	C	C	C	A	6	335-365	0,697	1	
AA174	B	B	B	B	A	B	C	A	B	A	C	0	C	B	0	B	B	B	B	4	430-445	0,701	4	
AA200	A	A	0	E	D	0	D	E	A	0	E	0	E	D	A	B	0	E	E	6	205-220	0,792	6	
AA255 #371	0	0	0	0	0	C	0	0	C	0	0	B	A	0	C	B	0	A	C	4	370-380	0,561	4	
AA255 #295	0	0	0	A	B	0	A	0	B	0	B	A	A	B	0	0	A	0	0	3	295-300	0,607	2	
AA258	A	A	A	A	A	A	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	3	220-230	0,119	1	
AA335	D	A	C	D	A	A	A	D	C	A	A	D	A	A	B	D	D	A	A	4	214-230	0,614	6	
AB28	A	A	D	A	A	A	A	A	A	A	B	0	A	C	0	0	A	A	5	375-390	0,527	1		
AB56	B	B	B	A	B	B	B	D	B	B	C	0	0	C	B	C	C	A	5	345-360	0,668	1		
AB71	C	B	C	B	C	B	C	E	C	D	K	B	E	B	C	G	B	G	K	10	140-175	0,840	6	
AB83	B	B	B	D	B	B	D	B	B	D	B	D	C	B	D	B	D	D	5	360-370	0,633	5		
AC75	A	E	A	D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C	A	C	A	5	260-280	0,557	1		
AC76	E	C	E	E	E	C	E	A	C	E	E	E	A	E	F	D	B	6	245-275	0,670	6			
AD51	B	B	B	B	D	B	D	A	B	B	B	B	A	D	B	B	B	A	C	4	230-245	0,582	6	
AD147	F	C	D	C	F	F	F	C	F	D	C	F	B	D	G	E	G	G	7	300-330	0,823	1		
AD160	A	A	B	A	A	B	A	B	A	B	A	A	C	B	A	B	A	A	4	190-215	0,646	6		
C20 BF	A	A	A	A	A	A	C	A	A	A	A	A	A	C	A	0	A	A	4	230-250	0,392	1		
D21	I	I	I	C	I	I	I	B	I	I	E	G	I	E	I	F	I	G	C	9	200-285	0,687	1	
PSU51918	A	B	B	B	A	A	A	B	A	B	B	A	B	B	B	B	A	A	B	2	около 145	0,460	1	
PSU81288	C	A	A	A	C	C	C	A	C	A	A	C	C	A	C	B	C	C	C	3	135-140	0,566	1	

Обозначения: По горизонтали перечислены исследованные сорта, по вертикали – проанализированные локусы. Аллели обозначены буквами по возрастанию длины фрагмента, А соответствует самому короткому аллелю, 0 – нуль-аллель. Для маркеров указаны число обнаруженных аллелей, их примерный размер, индекс полиморфизма каждого локуса и группа сцепления.

Идентификация линий и сортов

Определение сортопринадлежности по молекулярным маркерам является наиболее быстрым и эффективным методом идентификации линий и сортов (Оганисян и др., 1996; Кожухова, Сиволап, 2004).

В данной работе определяли перспективы идентификации с помощью RAPD- и SSR-маркеров 10 овощных и 9 зерновых сортов гороха, а также 13 маркерных линий. Мутанты из анализа были исключены, так как для их дифференциации требуется специальный анализ тех локусов, по которым они отличаются от исходных сортов.

Среди исследованных в данной работе полиморфных маркеров было выявлено 6 RAPD-фрагментов, амплифицирующихся только у одной формы, и 5 RAPD-маркеров, присутствующих в спектрах всех линий, кроме одной. Из 124 аллелей, обнаруженных в результате SSR-анализа, 21 аллель встречается только у одного из 32 сортов и линий. Анализ генотипов изученных форм показал, что для идентификации 32 линий и сортов достаточно определить аллельные состояния 4 микросателлитных локусов, что позволяет использовать данный метод для быстрой и эффективной идентификации генотипов. В таблице 3 представлен фрагмент матрицы генотипов сортов гороха, позволяющей идентифицировать исследуемые образцы.

Таблица 3. Матрица генотипов сортов гороха, позволяющая идентифицировать исследуемые образцы.

	овощные										зерновые									
	Анванд	Афилла	Виола	Изуируд	Московский Деликатес	Узкобобовый	Амброзия	Жегаловский	Король Гурманов	Сахарный	Богатырь	Капитал	Немчиновский	Неосыпающийся	Orus	Ранний Зеленый	Тордаг	Филби	Флагман	
AB71	C	C	C	C	D	B	B	B	C	C	B	F	F	K	B	F	G	G	K	
AA255 #295	O	O	B	A	O	O	O	O	B	B	A	O	B	B	A	A	O	A	O	
AD147	F	D	F	F	D	G	C	F	F	G	C	C	C	C	F	B	F	G	G	
AA81	F	F	F	F	F	F	C	C	C	F	A	D	B	B	D	C	D	B	B	

Обозначения: по горизонтали перечислены сорта, по вертикали - локусы, анализ аллельных состояний которых позволяет идентифицировать эти сорта.

В случае RAPD-анализа для идентификации образца достаточно 10–15 полиморфных RAPD-маркеров, то есть возможно определение сорта по анализу его RAPD-спектра по 1-2 праймерам.

Предложенная система идентификации и паспортизации сортов гороха отличается высокой надежностью, простотой и эффективностью. SSR-анализ позволяет идентифицировать образец по меньшему числу локусов. Однако в случае возможной внутрисортовой гетерогенности этот метод менее надежен, так как при малом числе анализируемых локусов изменение генотипа образца по одному локусу может привести к неправильной идентификации сорта. RAPD-метод менее трудоемок, а анализ большого числа надежных локусов позволяет нивелировать влияние внутрисортовой гетерогенности. Оба метода позволяют проводить идентификацию образцов за один рабочий день.

Анализ межлинейного разнообразия

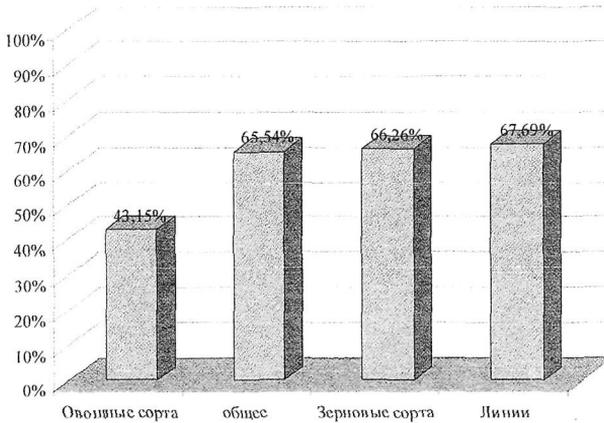
Средний уровень межлинейного RAPD-полиморфизма гороха посевного составляет 25,85%. Для SSR-маркеров средний уровень различий составил 65,54%, то есть в 2,5 раза выше. Тем не менее, данные, полученные при помощи обоих методов, дают сходные результаты.

Максимальный уровень различий в обоих случаях выявлен между сортом Король Гурманов и линией L-102 и составляет 92,36% для SSR-маркеров и 35,37% для RAPD-маркеров. Ближе всего друг к другу сорта Виола и Изумруд, они различаются на 8,33% по SSR и на 2,44% по RAPD-маркерам, что сопоставимо с уровнем различий между мутантами и исходными сортами. Такой уровень разнообразия по RAPD-маркерам обычен для растений-самоопылителей [Гостимский, 2005; Кудрявцев, 2007].

Сравнение уровня различий среди сортов разного селекционного направления показал, что они значительно отличаются по уровню разнообразия. В результате проделанной работы было установлено, что уровень внутрigrупповой SSR-изменчивости среди овощных сортов значительно меньше, чем среди зерновых сортов. Значения полиморфизма среди зерновых сортов и среди маркерных линий близки. При среднем уровне разнообразия, составляющем 65,54% по данным SSR-анализа, внутрigrупповая изменчивость зерновых сортов 66,26%, а линий – 67,69%, в то время, как для овощных сортов этот показатель составляет 43,15%, что в

1,54 раза ниже, чем у зерновых сортов (диагр. 1). По RAPD-маркерам зерновые и овощные сорта отличаются в 1,11 раза.

Диаграмма 1. Внутригрупповая изменчивость сортов разного направления селекции по данным SSR-анализа.



Обозначения: Над столбиками указаны значения внутригрупповой изменчивости в перечисленных группах.

Кроме этого, группы сортов разного направления значительно отличаются по представленности аллелей отдельных SSR-локусов. Среднее число аллелей на локус для овощных сортов значительно ниже, чем у зерновых сортов, а у зерновых сортов ниже, чем у линий. Для линий обнаружено 20 аллелей, встречающихся только в этой группе, для зерновых сортов - 10. В случае овощных сортов таких аллелей только 3. К тому же овощные сорта полностью мономорфны по четырём локусам (16%), мономорфных локусов у линий и зерновых сортов не обнаружено (табл. 2). Хотя средние уровни различий внутри зерновых сортов и маркерных линий близки, по количеству обнаруженных аллелей маркерные линии значительно превосходят обе группы промышленных сортов. По всей видимости, это связано с особенностями их селекции, во время которой привлекался более разнообразный генетический материал.

В целом, заметные различия по частотам аллелей различных микросателлитных локусов и внутригрупповой гетерогенности у разных групп наблюдаются для всех проанализированных локусов, хотя и в разной

степени. По восемнадцати локусам (75,00% от общего числа проанализированных локусов) все три исследованные группы отличаются друг от друга (диаграмма 2). Еще по пяти локусам (20,83%) зерновые сорта похожи на маркерные линии, но отличаются от овощных сортов. По локусу AA335 (4,17%) овощные сорта сходны с маркерными линиями и отличаются от зерновых сортов.

Таблица 2. Особенности распределения аллелей SSR-локусов у сортов разного селекционного направления.

	1	2	3	4	5
Овощные сорта	59	65	2,46	3	4
Зерновые сорта	87	37	3,63	10	0
Линии	105	19	4,38	20	0

Обозначения: 1 – число аллелей, обнаруженных в данной группе; 2 – число аллелей, не обнаруженных в данной группе; 3 – среднее число аллелей на локус; 4 – число аллелей, встречающихся только в этой группе, 5 – число локусов, по которым данная группа мономорфна.

Диаграмма 2. Частота аллелей локуса AV71 в сортах разного направления.



Обозначения: цифрами на диаграммах указаны частоты соответствующих аллелей в у овощных и зерновых сортах и маркерных линиях.

На основании этих данных можно сделать вывод, что овощные сорта отличаются значительно меньшим уровнем внутригрупповой изменчивости, чем сорта зернового направления, межсортовой полиморфизм которых сравним с уровнем изменчивости маркерных линий. При этом низкий уровень разнообразия овощных сортов, по-видимому, не связан с общностью происхождения (в группу входят сорта как отечественной, так и зарубежной селекции), что свидетельствует о снижении генетического разнообразия в этой группе.

На основе матриц генотипов исследованных линий, сортов и мутантов гороха невзвешенным парно-групповым методом (UPGMA) при помощи компьютерной программы TREECON1.3 были построены дендрограммы, отражающие различия между RAPD- и SSR-спектрами изученных образцов. В случае SSR-маркеров каждый аллель рассматривали как отдельный признак, характеризующийся наличием или отсутствием фрагмента определенного размера (112 бинарных маркеров).

Кластеры с высоким значением бутстрепа (более 70%), поддерживаемые обоими типами маркеров, образуют только мутанты и их исходные сорта. Кроме того, удалось выделить несколько дополнительных групп. Это кластеры, включающие родственные овощные сорта Анвенд, Виола и Изумруд; фасциированные формы Люпиноид, JI-2671 и Роза Краун (все несут мутацию *fa*). С группой сорта Немчиновский и его мутантов кластеризуются линия Новая Форма 42, несущая мутацию *chi42*, введенную в нее из мутанта Хлорофилл 42, и (только по данным RAPD-анализа) линия R94, родственная сорту Немчиновский.

На дендрограмме, построенной по данным SSR-анализа, все овощные сорта образуют единую группу. Зерновые сорта отдельной группы не образуют, но с овощными сортами не смешиваются. По данным RAPD-анализа выделяются два удаленных друг от друга кластера овощных сортов. Первый включает сорта Афилла, Амброзия и Московский Деликатес, а во второй, помимо остальных овощных сортов, включены две линии и зерновой сорт Богатырь.

Анализ генетических дистанций между изученными сортами свидетельствует о том, что овощные сорта образуют отдельную группу, характеризующуюся сниженным уровнем генетического разнообразия, и достаточно четко отделяющуюся от зерновых сортов и маркерных линий. При этом минимальные различия между отдельными овощными сортами (Виола и Изумруд) сопоставимы с различиями между мутантами и их исходными формами, что свидетельствует об их близком родстве. Таким образом, полученные результаты по молекулярно-генетическому анализу изученных образцов позволяют оценить родство и происхождение сортов гороха.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что для получения надежных генсалоогических реконструкций на основании SSR-маркеров

необходимо использовать большое число локусов, причем желательна каждая аллель рассматривать как отдельный признак.

Анализ мутантов

Среди форм, исследованных в данной работе, было 8 мутантов, полученных на кафедре генетики из четырех разных сортов зернового направления. Семь мутантов были получены путем индуцированного мутагенеза, еще один несет спонтанную морфологическую мутацию. Их сравнение с исходными сортами показало, что по распределению RAPD-маркеров все мутанты, исследованные в работе, отличались от исходных форм. Уровень различий между мутантами и исходными сортами составил от 0,98% до 9,51%, в среднем 3,63%.

Анализ SSR-спектров показал, что все индуцированные мутанты отличались от исходных сортов. Степень отличий составила 4,17–22,92%, в среднем 9,38%. Различий между спонтанным мутантом Скрученный и исходным сортом Ранний Зеленый по SSR-маркерам не обнаружено.

Установленные факты различий между мутантами и исходными сортами представляют значительный интерес, указывая на большой масштаб генетических изменений при мутагенном воздействии.

Анализ внутрелинейного разнообразия

Одним из основных условий проведения генетических исследований на любом объекте является знание уровня его генетической чистоты. Контроль за чистотой линии имеет большое значение в селекционной работе при формировании новых сортов и при решении вопросов, связанных с правами оригинаторов сортов, а также при необходимости использования однородного материала. Явление внутрелинейного полиморфизма описано у многих видов растений (Кудрявцев, 2006), однако у гороха посевного внутрисортная изменчивость до сих пор практически не изучена.

Для анализа внутрелинейного разнообразия были выбраны мутанты Хлорофилл 2 и Штамбовый, линии L-108 и Новая Форма 42, использованные в дальнейшем для картирования, мутант Хлорофилл 42, на основе которого была получена линия Новая Форма 42, сорт Немчиновский, являющийся исходным для мутантов Штамбовый и Хлорофилл 42. Кроме того, были взяты часто применяемая в учебной и научной работе маркерная линия WL-

1238, три промышленных сорта (Флагман, Торсдаг, Афилла) и две линии – L-102 и Люпиноид, у которых внутрилинейный полиморфизм был обнаружен ранее (Дрибноходова, 2007). Эти формы были протестированы по 8 RAPD-праймам и 12 микросателлитным локусам.

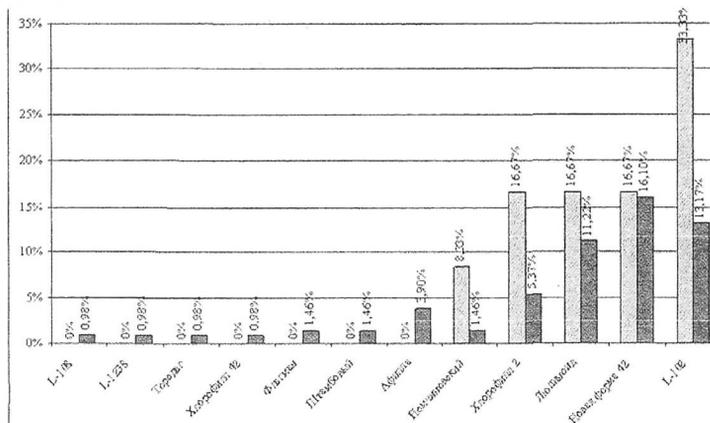
Проведенная работа показала, что все проверенные линии, сорта и мутанты неоднородны по RAPD-маркерам. Однако разные формы значительно различаются по уровню внутрилинейной изменчивости – у 7 из 12 сортов доля полиморфных фрагментов не превышает 2,00%, а в среднем равна 4,84%. По SSR-маркерам внутрилинейные различия были выявлены у 5 из 12 проанализированных форм, количество полиморфных локусов у разных линий менялось от 1 до 4. При этом значения внутрилинейной изменчивости по RAPD-фрагментам у форм, мономорфных по SSR-маркерам, не превышает 5,00% (Диаграмма 3).

В целом все исследованные формы можно условно разделить на три группы. К первой относится большинство сортов, часть маркерных линий и мутанты Хлорофилл 42 и Штамбовый. Для них характерен низкий уровень внутрилинейной неоднородности по обоим типам маркеров – менее 2% по RAPD-маркерам (2–3 локуса на использованном наборе маркеров) и 0–1 полиморфный SSR-локус. Такой уровень изменчивости не вызывает затруднений при научной работе и, по-видимому, является обычным для большинства сортов. Близкий уровень внутрисортных различий обнаружен у ячменя (Брик и др., 2006) и пшеницы (Кудрявцев, 2006). Ко второй группе со средним уровнем внутрилинейного полиморфизма можно отнести сорт Афилла и мутант Хлорофилл 2 – до 6% по RAPD-маркерам (8 и 11 RAPD-маркеров и 0 и 2 SSR-локуса, соответственно). К третьей группе относятся три линии (Новая Форма 42, Люпиноид и L-102), сортов и мутантов в этой группе нет. Для них характерен высокий уровень внутрилинейной изменчивости по обоим типам маркеров (24–33 RAPD-фрагментов и 2–4 SSR-локуса). Анализ известных данных по происхождению этих форм позволяет сделать вывод, что основной причиной столь высокого уровня неоднородности является недостаточная отселектированность линии по молекулярным признакам в процессе ее получения.

Выявление молекулярной гетерогенности индивидуальных растений разных линий гороха свидетельствует о том, что RAPD-метод, позволяющий быстро анализировать большое число локусов по всему геному, может с

успехом использоваться для выявления истинно чистых линий у гороха и других растений-самоопылителей.

Диаграмма 3. Внутрилинейный полиморфизм по SSR- и RAPD-маркерам



Обозначения: светло-серым указан уровень внутрилинейного полиморфизма по микросателлитным локусам, темно-серым – по RAPD-маркерам.

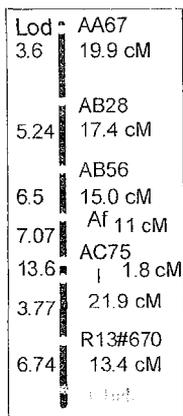
Картирование

Обнаруженные в работе полиморфные маркеры были использованы для картирования генов морфологических признаков. Локализация новых генов и насыщение карты молекулярными маркерами остается одной из основных задач генетики, сохраняющей свою важность на всех этапах изучения генома объекта.

В результате проведенной работы на основе популяции второго поколения Новая Форма 42 x Штамбовый были построены фрагмент молекулярно-генетической карты V группы сцепления длиной 6,4 сМ и фрагмент молекулярно-генетической карты I группы сцепления длиной 100,4 сМ. Ген *chi42* был локализован на молекулярно-генетической карте гороха посевного в I группе сцепления на расстоянии 35,3 сМ от гена *I* (рис. 3). Уточнена взаимная ориентация генов *I* и *Af*. Обнаружено сцепление RAPD-маркера Q20#1200 с генами *R* и *Tl* и RAPD-маркера R13#650 с генами *I* и *chi42*, а также сцепление RAPD-маркеров R15#710 и K8#420. Маркеры находятся в состоянии притяжения на расстоянии 4,3 сМ.

На основе второй популяции F₂ (Хлорофилл 2 x L-108) были построены два фрагмента молекулярно-генетической карты I группы сцепления протяженностью 18,3 и 14,5 сМ. Расстояния между якорными локусами, рассчитанные на основе этой популяции, оказались значительно меньше, чем можно было ожидать на основании литературных данных (Loridon et al., 2005). По всей видимости, это связано с влиянием транслокации. На полученной карте были локализованы 5 RAPD-маркеров и уточнено положение SSR-маркера AA155.

Рис.3. Карта участка I группы сцепления гороха в районе локусов *chi42 – Af*



Обозначения: Lod – значение Lod-балла.

Всего на двух картирующих популяциях было изучено расщепление по 7 морфологическим маркерам, 9 микросателлитным локусам и 25 RAPD-фрагментам. Консенсусная карта I группы сцепления гороха посевного, полученная в результате объединения фрагментов карт, построенных на основании двух скрещиваний, включает 3 морфологических, 6 RAPD- и 9 SSR-маркеров и имеет протяженность около 135 сМ.

Изучение влияния условий длительного космического полета на геном гороха.

Проведенная работа по изучению внутри- и межсортовой изменчивости гороха посевного позволила приступить к исследованию генетической изменчивости растений, прошедших несколько генераций на борту

Международной Космической Станции. Одним из приоритетных направлений космических исследований является изучение отдаленных генетических последствий длительного культивирования растений в космосе. Многими авторами высказывалось предположение, что космическое излучение, состав атмосферы орбитальной станции и прочие факторы космического полета могут вызывать изменения генетического аппарата у растений и при длительном воздействии могут способствовать возникновению мутаций. Это значит, что молекулярно-генетический анализ генома растений, подвергавшихся воздействию условий космического полета, является необходимым этапом для разработки биологических систем жизнеобеспечения человека вне земной биосферы.

В ходе работы было исследовано 28 растений линии L-131 и 13 растений линии L-102; в качестве контроля было использовано по 10 индивидуальных растений этих линий. Всего в ходе исследований было проанализировано 135 RAPD-фрагментов, полученных с помощью 10 RAPD-праймеров, 37 ISSR-маркеров, амплифицируемых 5 ISSR-праймерами, 149 межретротранспозонных фрагментов ДНК, выявляемых при помощи различных комбинаций четырех IRAP-праймеров, а также 10 микросателлитных локусов.

Анализ электрофореграмм индивидуальных контрольных растений показал, что линия 131 однородна по всем исследованным маркерам, кроме AD04#530 (0,75% внутрилинейного полиморфизма), а линия 102 проявила внутрилинейный полиморфизм по 12,4% RAPD-маркеров и по SSR-локусу AD147. Присутствие этих фрагментов в опытных растениях совпадает с контролем. Маркеры, по которым контрольные растения были неоднородны, были исключены из исследования изменчивости.

Сравнение спектров опытных и контрольных растений не обнаружило видимых отличий. Анализ спектров показал, что в каждом опытном растении амплифицируются все ожидаемые фрагменты, при этом новых фрагментов не наблюдается.

Таким образом, всеми использованными методами было показано, что у потомства растений, прошедших несколько генераций в условиях космического полета, новых мутаций на уровне исследованных фрагментов ДНК не обнаружено, что свидетельствует об отсутствии значительного влияния факторов космического полета на генетический аппарат растений.

ВЫВОДЫ

1. Проведен анализ молекулярно-генетического полиморфизма 40 линий, сортов и мутантов гороха посевного по SSR- и RAPD-маркерам. Составлена база данных, представляющая генотипы исследованных образцов по 24 микросателлитным локусам и 205 RAPD-фрагментам, на основе которой разработаны подходы для паспортизации и идентификации сортов и линий гороха этими методами. Выявлены полиморфные SSR- и RAPD-маркеры, характерные для определенных линий и сортов гороха.

2. Установлено, что средний уровень полиморфизма среди изученных форм составляет 65,54% по SSR-маркерам и 25,85% по RAPD-маркерам. Генетическое разнообразие у сортов овощного направления селекции по микросателлитным маркерам в 1,5 раза ниже, чем у сортов зернового направления и маркерных линий, а наименьшие различия по исследованным локусам наблюдаются между мутантами и их исходными сортами и составляют в среднем 9,38% по SSR-маркерам и 3,63% по RAPD-маркерам.

3. Обнаружен внутрилинейный полиморфизм по RAPD-маркерам у 12 различных форм гороха посевного, составляющий в среднем 4,84%. Внутрилинейный SSR-полиморфизм обнаружен у 5 из 12 проанализированных форм и составляет в среднем 7,64%

4. Построен фрагмент молекулярно-генетической карты I группы сцепления гороха посевного. Впервые локализованы новая морфологическая мутация *chi42*, 1 SSR- и 7 RAPD-маркеров.

5. Показано, что выращивание растений гороха в течение трех последовательных поколений в условиях космического полета не приводит к изменению аллельного состава изученных ДНК-маркеров у потомства этих растений.

ПУБЛИКАЦИИ

1. Дрибноходова О. П. «Использование молекулярных маркеров для генотипирования линий, сортов и мутантов гороха». Тезисы докладов XI международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2004» М.: МГУ, биологический факультет, 2004. С. 43-44.

2. 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 ВОГИС. т.1. Москва. 2004. С. 69.

3. Дрибноходова О.П. «Использование молекулярных маркеров для выявления изменчивости генома гороха, вызванной условиями космического полета». Материалы международной конференции «Ломоносов-2005». М.: Макс-пресс, 2005. С. 74-75.

4. Дрибноходова О.П., Хартина Г.А. «Использование RAPD-маркеров для генотипирования линий, сортов и мутантов гороха». Материалы Третьего Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», 2005. часть 1. С. 244.

5. Кокаева З.Г., Дрибноходова О.П., Гостимский С.А. «Исследование генетической изменчивости растений гороха под влиянием факторов космического полета». Материалы международной конференции «Современные проблемы генетики» (к 40-летию Института генетики и цитологии НАН Беларуси). Минск, 2005. С. 89.

6. Дрибноходова О.П. «Молекулярно-генетический анализ потомства растений гороха, выращенных в космической оранжерее на борту МКС». Материалы международной конференции «Генетика в России и мире», посвященной 40-летию ИОГен им. Н.И. Вавилова РАН. М.: РИИС ФИАН, 2006, С. 63.

7. Дрибноходова О.П. «Изучение меж- и внутрилинейного полиморфизма гороха посевного с помощью RAPD-маркеров. Материалы XIV международной конференции «Ломоносов-2007». М.: Макс-пресс, 2007. С. 52-53.

8. Dribnokhodova O.P., Kokaeva Z.G. «Study of intralinear DNA polymorphism in pea (*Pisum sativum* L.)». Abstract book conferece for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics, dedicated to 120th anniversary of N.I. Vavilov. Kyiv, Ukraine, 2007. P.13.

9. Kokaeva Z.G., Dribnokhodova O.P., Aleshin A.V. «Genetic variability of pea caused by space flight conditions». Abstract book conference for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics, dedicated to 120th anniversary of N.I. Vavilov. Kyiv, Ukraine, 2007, p. 23.

10. Дрибноходова О.П., Кокаева З.Г., Гостимский С.А. «Идентификация сортов, линий и мутантов гороха посевного (*Pisum sativum* L.) с помощью RAPD-маркеров». Сельскохозяйственная биология, 2005. № 5. С. 61-66.

11. Гостимский С.А., Левинских М.А., Сычев В.Н., Кокаева З.Г., Дрибноходова О.П., Хартина Г.А., Бингхем Г. «Исследование генетических эффектов в потомстве растений гороха, выращенных в течение полного цикла онтогенеза в космической оранжерее на борту РС МКС». Генетика, 2007, т.43, №8. С.1050-1057.

12. Дрибноходова О. П., Гостимский С. А. «Исследование аллельного полиморфизма микросателлитных локусов у разных линий, сортов и мутантов гороха посевного (*Pisum sativum* L.)». Генетика. 2009 т. 45, №7. С. 900-906.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 07-04-00652, программы «Ведущие научные школы» 4202.2006.4 и программы президиума РАН «Динамика генофондов растений, животных и человека».

Отпечатано в кооперативе «СТ ПРИНТ»
Москва, Ленинские горы, МГУ, 1 Гуманитарный корпус.
www.stprint.ru e-mail: globus9393338@yandex.ru тел.: 939-33-38
Тираж 70 экз. Подписано в печать 14.07.2009 г.