

ГЕНЕТИКА

УДК 575.17.015.3:582.739

АНАЛИЗ ИНСЕРЦИЙ PDR1 РЕТРОТРАНСПОЗОНА
У ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.)

З.Г. Кокаева, А.В. Алешин, Ю.И. Березов

(кафедра генетики, кафедра физиологии растений; e-mail: zaremak@inbox.ru)

Проведено исследование полиморфизма PDR1 инсерций в сортах, линиях и мутантах гороха с помощью семи пар специфических RBIP-праймеров. Идентифицировано семь локусов PDR1 инсерций в исследованных формах. Установлен высокий уровень полиморфизма вставок ретротранспозона PDR1 с праймерами RBIP2, RBIP1794, RBIP64, который составил 92, 82,98, 78% соответственно. Проведен генетический анализ в популяциях гибридов F2 (Chi115 × WL1238). На генетической карте гороха в III группе сцепления локализован молекулярный маркер RBIP4₇₀₀.

Ключевые слова: ретротранспозон, молекулярный маркер, генетическое картирование, SSAP, IRAP, REMAP, RBIP.

В последние годы проводится активное изучение структуры и полиморфизма мобильных элементов гороха, в первую очередь ретротранспозонов. На основе ретротранспозонов получено большое количество молекулярных маркеров [1–3]. Информация о полиморфизме ретротранспозонов позволяет сделать выводы о происхождении различных подвидов и сортов [4–6]. Маркеры, основанные на ретротранспозонах, очень удобны для генетического картирования и изучения генетического разнообразия растений [2].

Благодаря использованию общих маркеров удалось создать “консенсусную” карту хромосом гороха [7], объединившую морфологические и молекулярные локусы. Однако детальная карта хромосом гороха еще не создана, и требуется дополнительный поиск новых морфологических и молекулярных маркеров и их локализация.

Процесс разработки новых маркерных систем, сводящихся к детекции наличия или отсутствия инсерции ретротранспозонов, идет непрерывно. В настоящее время наиболее широко используются четыре основных метода: **SSAP** (Sequense-Specific Amplification Polymorphism) [8], **IRAP** (inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) [3], **REMAP** (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphisms) [3], **RBIP** (Retrotransposon-Based Insertion Polymorphisms) [1]. От всех перечисленных технологий RBIP (метод, выявляющий полиморфизм конкретных вставок ретротранспозонов в геноме) отличается тем, что позволяет исследовать кодоминантные аллельные варианты, а также дает возможность использовать для дот-блот анализа значительное количество образцов. На кафедре генетики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова были созданы наборы ДНК-

маркеров с помощью IRAP- и REMAP-методов для надежной идентификации сортов и линий гороха [9, 10]. Ведется планомерная работа по картированию генома гороха, для чего ранее были успешно использованы RAPD- и ISSR-маркеры: результатом исследований стали полноценные карты всех групп сцепления гороха, построенные на двух картирующих популяциях (Chi115 × WL1238 и P64 × WL1238), содержащие более 200 молекулярных маркеров [11].

PDR1 был первой группой Ty1-*copia* ретротранспозонов, исследованных в геноме гороха [12], где было выявлено около 200 его копий. Он относится к группе небольших ретротранспозонов (3925 п.н.) с типичным порядком генов gag-pr-int-rt-rnaseH, а LTR (длинные концевые повторы) содержат 156 п.н.

Цель настоящей работы — исследование полиморфизма RBIP-инсерций в сортах, линиях и мутантах гороха с помощью 7 пар специфических RBIP-праймеров, подобранных к ретротранспозону PDR1, и локализация выявленных ДНК-маркеров на генетической карте гороха в ходе генетического анализа F2 от скрещивания (Chi115 × WL1238).

Методика

В работе были использованы 50 образцов гороха посевного, представляющих сорта и линии различных направлений селекции, а также популяция гибридов F2 (Chi115 × WL1238), включающая 110 растений. Родительские линии: Chi115 — хлорофильный мутант, полученный обработкой семян сорта Торсдаг этилметансульфонатом и характеризующийся бледно-зеленой окраской листьев, и маркерная линия WL1238, имеющая большое число морфологических маркеров.

Таблица 1

RBIP-праймеры

Название праймера	t° отжига праймера	Последовательность	V _{смеси} для 1 реакции, мкл
Birte-x16-F	54	CTTACCACCAAGCGCGCGAC	0,57
Birte-x16-R	54	AGGCTTCTGATCCAACCAG	0,39
Birte-X5-F	54	CGAACTCATATAGTAATACTTAG	0,43
Birte-X5-R	54	CTCTTATGTCTTGCTGAGGGTG	0,60
MKRBIP2-F	54	TGTAGATGGTATGCTGTACTC	0,42
MKRBIP2-R	54	ATCTACCATTATTTCCACGC	0,54
MKRBIP4-F	54	TTGATACTaTCATGCTTGGCC	0,50
MKRBIP4-R	54	ATGAGAGTTGAGTTATATTCC	0,40
1794-2-F	54	GGGCCATGTACGACACATTC	0,33
1794-2-R	54	GAGGAAATAAGAATGGTAGAGCATC	0,52
64-x45-F	54	CAAAGTATAACGTGTATCAAG	0,39
64-x45-R	54	GTCATCGTCCAAACACACTC	0,38
RBIP A	65,8	CCCATTGATTCTCGTCTCAAGAC	0,14
RBIP B	65,3	GGCTTTGACTAATGGACCTC	0,16
RBIP C	64,5	TCCTGTTTACGATGACAGGAC	0,11

Процедура выделения растительной ДНК проводилась по методике [13] с незначительными модификациями. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала: 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.). Амплификацию проводили в амплификаторе “Терцик” фирмы “ДНК-технология” по следующей программе: 1. Предварительная денатурация 94°C, 1 мин 30 с; 5 циклов (94°C, 1 мин; 54°C, 40 с; 72°C, 1 мин); 30 циклов (93°C, 1 мин; 54°C, 40 с; 72°C, 1 мин). Конечная элонгация 72°C, 10 мин. Праймеры были синтезированы в ЗАО “Синтол”. Температура отжига праймеров рассчитывалась при помощи компьютерной программы OLIGO. Разделение фрагментов ДНК, полученных в результате амплификации, проводили стандартным электрофорезом в 2%-м агарозном геле (Amresco) в TBE буфере, с последующим окрашиванием бромистым этидием (конечная концентрация 0,001%). Напряженность электрического поля при электрофорезе составляла 3 В/см. После электрофореза гели анализировали в УФ свете и фотографировали с использованием цифровой фотокамеры.

Для генетического анализа расщеплений в F₂ использован программный пакет Mapmaker 3.0, разработанный в институте Whitehead (США) и широко используемый в современных работах по картированию [14].

Результаты

В работе было проведено исследование распределения RBIP-инсерций в сортах, линиях и мутантах гороха с помощью 7 пар специфических RBIP — праймеров, подобранных к ретротранспозону PDR1 [1]. Характеристики использованных праймеров представлены в табл. 1.

В результате проведенной работы идентифицировано 7 локусов RBIP-инсерций в исследованных

формах гороха. На рис. 1 представлен результат электрофоретического разделения амплифицированных продуктов ПЦР одного локуса “RBIP ABC” в сортах, линиях и мутантах гороха. Продукт амплификации размером 537 п.н. соответствует наличию ретротранспозона в данном локусе, а 243 п.н. — отсутствию ретротранспозона. Таким образом амплифицируются оба аллеля данного локуса. Результаты, полученные по всем исследованным RBIP-локусам, представлены в табл. 2.

Установлен высокий уровень полиморфизма вставок ретротранспозона PDR1 с праймерами RBIP2, RBIP1794, RBIP64, который составил 92, 82, 98, 78% соответственно. Эти данные согласуются с результатами, полученными в работах [4, 6].

С целью локализации ДНК-маркеров с полиморфными последовательностями на карте групп сцепления гороха был проведен генетический анализ в популяциях гибридов F₂ от скрещиваний (Chi115 × WL1238). В данной популяции ранее проводился

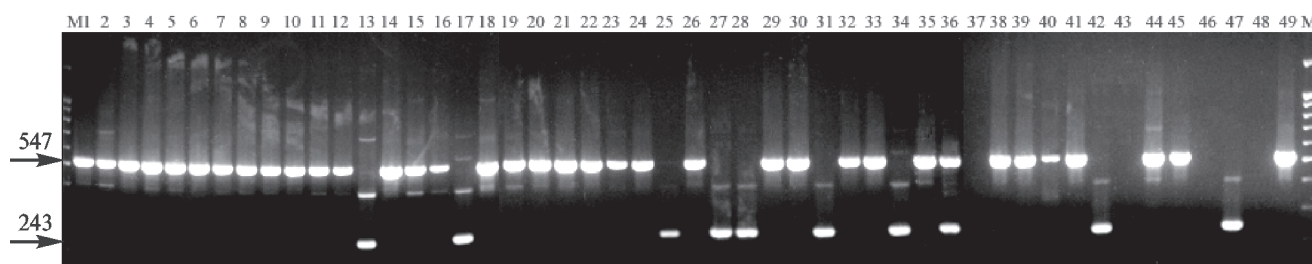


Рис. 1. RBIP-спектры ДНК сортов, линий и мутантов гороха, полученных с использованием праймера RBIP ABC. 1—49 — индивидуальные растения исследованных форм гороха (отсутствует мутант Хл.-13). M-DNA ladder 100bp + 1,5kb. Стрелками указаны аллели локуса RBIP ABC

Таблица 2

Молекулярно-генетический анализ инсерций PDR1 ретротранспозона гороха с помощью RBIP-метода

Метод	Праймеры	Наличие ретротранспозона в локусе (число форм)	Отсутствие ретротранспозона в локусе (число форм)	Уровень полиморфизма, %
RBIP	1794	8	39	82,98
RBIP	Birte 16	46	4	8
RBIP	Birte X5F	23	26	53,06
RBIP	RBIP 2FR	4	46	92
RBIP	RBIP 4FR	36	11	23,4
RBIP	RBIP 64FR	11	39	78
RBIP	RBIP ABC	38	11	22,45

анализ с использованием большого числа случайных маркеров, в ходе которого были построены насыщенные карты групп сцепления гороха [11, 15].

В ходе нашей работы удалось локализовать на карте полиморфный фрагмент RBIP4₇₀₀, полученный в ходе анализа инсерций PDR1 ретротранспозона и отличающийся в родительских линиях Chi115 и WL1238 (рис. 2). После проверки достоверности гипотез о моногенном наследовании полиморфных вариантов данные о расщеплениях были внесены в общие исходные файлы формата Mapmaker для указанных скрещиваний, содержащие ранее полученные данные о фенотипе растений по качественным морфологическим признакам и по ряду случайных маркеров (по 125 маркеров в каждой картирующей популяции) [11]. Затем, учитывая информацию о хромосомной локализации генов морфологических признаков [7] и тех генов, которые были картированы ранее [15, 16], был проведен поиск случаев сцепления данного локуса RBIP4₇₀₀ с другими генами (CAPS-маркерами) и сегрегирующими в картирующих популяциях случайными маркерами.

С помощью компьютерной программы MAP-MAKER 3.0 были рассчитаны генетические расстояния между молекулярными маркерами и генами,

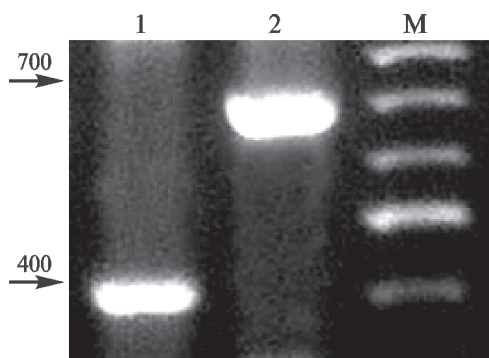


Рис. 2. Электрофореграмма результатов RBIP-анализа. 1 — линия WL1238, 2 — линия Chi115. М — DNA ladder 100bp + 1,5kb. Стрелками указаны аллели локуса RBIP4

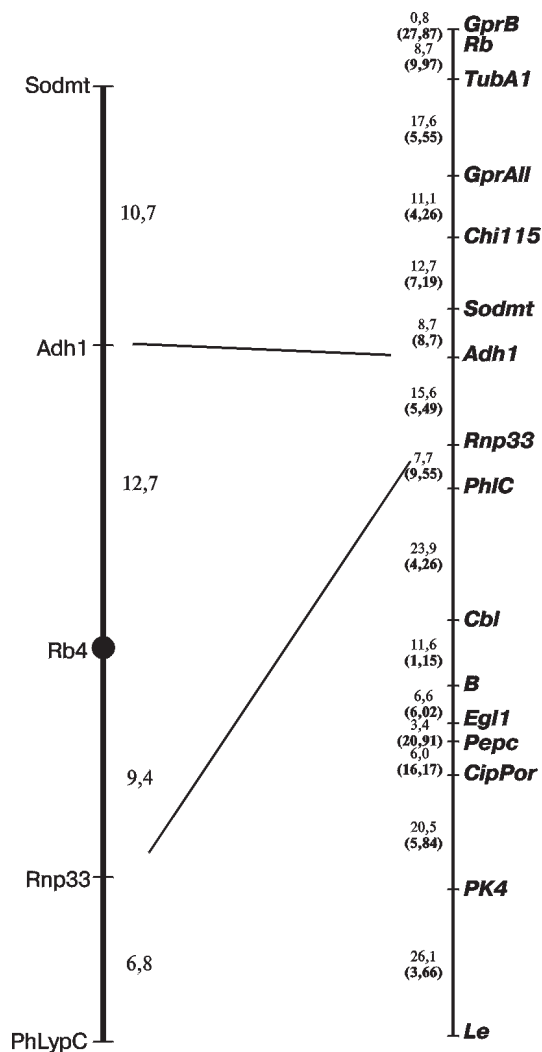


Рис. 3. Фрагмент карты III ГС с локализованным на ней маркером RBIP4 (Rb4) (слева) и сопоставление данного фрагмента с картой ГС III, построенной на популяции Chi115 × WL1238 (справа) [15]

с которыми они сцеплены, а также определено взаимное расположение маркеров. В результате проведенной работы на основе популяции Chi115 × WL1238 фрагмент RBIP4₇₀₀ был локализован в III группе сцепления гороха. Локус расположен в верхнем плече хромосомы на расстоянии 12,7 сМ от маркера *Adh1* и 9,4 сМ от маркера *Rnp33* и 34,1 сМ от гена *Chi115* (рис. 3).

Выводы

Проведено исследование полиморфизма инсерций PDR1 ретротранспозона у сортов, линий и мутантов гороха и идентифицировано семь локусов PDR1 инсерций в исследованных формах гороха. Установлен высокий уровень полиморфизма вставок ретротранспозона PDR1 с праймерами RBIP2, RBIP1794, RBIP64, который составил 92, 82,98, 78% соответственно. Локализован молекулярный маркер RBIP4₇₀₀ в третьей группе сцепления гороха. Локус распо-

ложен в верхнем плече хромосомы между маркерами *Adh1* и *Rnp33* и на расстоянии 34,1 сМ от гена *Chi115*, обуславливающего хлорофильную недоста-

точность. Таким образом, полученный нами маркер RBIP4₇₀₀ может быть использован в качестве якорного маркера в дальнейших исследованиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Flavell A.J., Knox M.R., Pearce S.R. Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis // *Plant J.* 1998. Vol. 16. P. 643–650.
2. Schulman A.H. Molecular markers to assess genetic diversity // *Euphytica on-line.* 2006. P. 1–9.
3. Kalendar R., Schulman A. IRAP and REMAP for retrotransposon — based genotyping and fingerprinting // *Nature Protocols.* 2006. Vol. 1. N 5. P. 2478–2484.
4. Vershinin A.V., Allnutt T.R., Knox M.R., Ambrose M.J., Ellis T.H.N. Ttransposable elements reveal the impact of introgression, rather than transposition, in *Pisum* diversity, evolution, and domestication // *Molec. Biol. Evol.* 2003. Vol. 20. N 12. P. 2067–2075.
5. Smýkal P., Horasec J., Dostalova, Hybl M. Variety discrimination in pea (*Pisum sativum* L.) by molecular, biochemical and morphological markers // *Genet.* 2008. Vol. 49. N 2. P. 155–166.
6. Jing R., Vershinin A., Grzebytaet J., Shaw P., Smykal P., Marshall D., Ambrose M.J., Ellis T.H.N., Flavell A.J. The genetic diversity and evolution of field pea (*Pisum*) studied by high throughput retrotransposon based insertion polymorphism (RBIP) marker analysis // *BMC Evol. Biol.* 2010. Vol. 10. P. 44.
7. Weeden N.F., Ellis T.H.N., Timmerman-Vaughan G.M., Swiecicki W.K., Rozov S.M., Berdnikov V.A. A consensus linkage map for *Pisum sativum* // *Pisum Genetics.* 1998. Vol. 30. P. 1–4.
8. Waugh R., McLean K., Flavell A.J., Pearce S.R., Kumar A., Thomas B.T., Powell W. Genetic distribution of BARE-1 retrotransposable elements in the Barley (*Hordeum vulgare*) genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP) // *Mol. Gen. Genet.* 1997. Vol. 253. P. 687–694.
9. Кокаева З.Г., Гостимский С.А. Идентификация сортов и линий гороха с помощью молекулярных маркеров, основанных на ретротранспозонах // *Сельскохозяйственная биология.* 2007. № 3. С. 38–43.
10. Кокаева З.Г., Аleshin A.B. Паспортизация сортов гороха посевного (*Pisum sativum* L.) // Доклады Московского общества испытателей природы, посвященные 205-летию МОИП. 2010. Т. 47. С. 52–54.
11. Чегамирза К. Молекулярно-генетическое картирование локусов качественных и количественных признаков у гороха: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2004. 26 с.
12. Lee D., Ellis T.H.N., Turner L., Hellens R.P., Cleary W.G. A copia — like element in *Pisum* demonstrates the uses of dispersed repeated in genetic analysis // *Plant Mol. Biol.* 1990. Vol. 15. P. 707–722.
13. Torres A.M., Weeden N.F., Martin A. Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba* // *Theor. Appl. Genet.* 1993. Vol. 85. P. 937–945.
14. Schneider K. Mapping populations and principles of genetic mapping // *The handbook of plant genome mapping. Genetic and physical mapping* / Eds. K. Meksem, G. Kahl. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.
15. Коновалов Ф.А. Картирование и молекулярно-генетический анализ генов гороха (*Pisum sativum* L.): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2006. 24 с.
16. Brauner S., Murphy R.L., Walling J.G., Przyborowski J., Weeden N.F. STS markers for comparative mapping in legumes // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 2002. Vol. 127. N 4. P. 616–622.

Поступила в редакцию
23.12.10

ANALYSIS INSERTIONS PDR1 RETROTRANSPOSON IN THE PEA (*PISUM SATIVUM* L.)

Z.G. Kokaeva, A.V. Aleshin, Y.I. Beriozov

The research of polymorphism PDR1 insertions grades, lines and mutants of peas by means of seven pairs specific RBIP — primers is carried out in this work. There are identified seven PDR1 loci of inserts in the investigated forms of peas. The high level of polymorphism of inserts retrotransposon PDR1 with primers RBIP2, RBIP1794, RBIP64 which has made 92, 82,98, 78% accordingly is established. The genetic analysis in populations of hybrids F2 (*Chi115* × *WL1238*) is lead. RBIP700 polymorphic fragment is localized on a genetic card of peas in III group of coupling.

Key words: retrotransposon, molecular marker, genetic mapping, SSAP, IRAP, REMAP, RBIP.

Сведения об авторах

Кокаева Зарема Григорьевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры генетики биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-11-79; e-mail: zaremak@inbox.ru

Аleshin Александр Владимирович — аспирант 2-го года обучения кафедры генетики биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-11-79; e-mail: starshina_pp@mail.ru

Березов Юрий Иванович — канд. с.-х. наук, вед. инженер кафедры физиологии растений биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-14-06; e-mail: phlora@list.ru