

На правах рукописи



ХЛЁСТКИНА

Елена Константиновна

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ RAPD-, STS- И SSR-ПОДХОДОВ ДЛЯ
МОЛЕКУЛЯРНОГО КАРТИРОВАНИЯ И МАРКИРОВАНИЯ
ГЕНОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ *T. aestivum* L.**

Генетика - 03.00.15

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск 2001

Работа выполнена в секторе молекулярной генетики злаков Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия и в лаборатории картирования генома Института генетики растений, Гатерслебен, Германия.

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

кандидат биологических наук
Салина Е. А.,
Институт цитологии и генетики
СО РАН, г. Новосибирск

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор биологических наук,
Дымшиц Г. М.,
Институт цитологии и генетики
СО РАН, г. Новосибирск

доктор биологических наук
Константинов Ю. М.,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений, г. Иркутск

ВЕДУЩЕЕ УЧРЕЖДЕНИЕ:

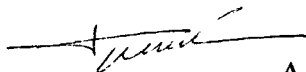
Институт общей генетики РАН,
г. Москва

Защита диссертации состоится "24" апреля 2002 г. на утреннем заседании диссертационного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора биологических наук (Д-003.011.01) в Институте цитологии и генетики СО РАН в конференц-зале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск-90, проспект академика Лаврентьева, 10, факс: (3832) 33-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Института цитологии и генетики СО РАН.

Автореферат разослан "15" сентября 2002 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук



А.Д. Груздев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Мягкая пшеница *T. aestivum* L. (AABBDD) является одной из важнейших сельскохозяйственных культур. Повышение урожайности и улучшение свойств мягкой пшеницы с помощью традиционных методов селекции не соответствует темпам роста населения земного шара. Требуется разработка более эффективных подходов. Изучение структуры генома мягкой пшеницы, картирование генов, ответственных за проявление полезных свойств, с помощью молекулярных маркеров, является основой для более быстрого и эффективного улучшения данной культуры. Использование молекулярных маркеров в селекции позволит получать информацию о том или ином признаке уже на ранних стадиях развития, не дожидаясь фенотипического проявления данного признака, упростит тестирование таких свойств, как, например, устойчивость к различным заболеваниям, требующих кропотливой оценки традиционными методами исследования. Молекулярные маркеры могут быть использованы для выделения и клонирования генов с целью изучения контролируемых ими свойств и передачи этих свойств другим сортам (т.е. для генетической трансформации). К настоящему моменту составлены десятки молекулярных карт мягкой пшеницы, содержащих от единичных до нескольких сотен маркеров, охватывающих от одной хромосомы (Kota et al., 1993; Ogihara et al., 1994), гомеологической группы (Chao et al., 1989; Xie et al., 1993) и до полного набора хромосом мягкой пшеницы (Röder et al., 1998; Stephenson et al., 1998). Хромосомная локализация определена более чем для 300 генов мягкой пшеницы, но лишь немногие из них картированы с помощью молекулярных маркеров (McIntosh et al., 1998). Области локализации уже картированных генов, не всегда насыщены удобными для практического применения молекулярными маркерами, в частности маркерами, основанными на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР) - такими как RAPD¹, SSR²-, STS³-маркеры и др.

Для молекулярного картирования и маркирования были выбраны, главным образом, гены, относящиеся (или предположительно относящиеся) к гомеологическим сериям. То есть гены, контролирующие один и тот же признак, расположенные на гомеологичных хромосомах геномов А, В, D мягкой пшеницы. Маркирование таких генов особенно важно, так как по фенотипическому проявлению контролируемого признака трудно определить, какой именно ген (гены) из гомеологической серии отвечает за его проявление у того или иного сорта. Наличие тесно сцепленных с генами молекулярных маркеров облегчает решение этой проблемы. Успешному решению задач, поставленных в работе, способствовало разнообразие используемых молекулярных подходов (RAPD-, STS-, SSR-анализ) и способов локализации генов на молекулярных картах (анализ изогенных линий, популяций F₂).

¹ RAPD – random amplified polymorphic DNA (произвольно амплифицированные полиморфные ДНК)

² SSR – simple sequence repeats (повторы простых последовательностей)

³ STS – sequence-tagged sites (характеризуемые последовательностью сайты)

Цель и задачи исследования. Целью данной работы являлось молекулярное маркирование и картирование генов первой (*Bg*, *Hg*, *Rg1*), пятой (*Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, *B1*, *Ph1*) и седьмой (*Rc1*, *Rc2*, *Rc3*) гомеологических групп хромосом мягкой пшеницы на основе ПЦР-анализа изогенных линий и популяций F₂.

Непосредственные задачи работы состояли в следующем:

1. Установление локализации генов окраски (*Bg*, *Rg1*) и опушения (*Hg*) колосковых чешуй на SSR-карте первой гомеологической группы хромосом мягкой пшеницы с помощью анализа изогенных линий, несущих доминантные аллели этих генов.

2. Насыщение RAPD-маркерами районов локализации гена чувствительности к яровизации *Vrn-A1* (5AL) и основного гена-ингибитора развития остей мягкой пшеницы *B1* (5AL) с помощью анализа изогенных линий, несущих рецессивные аллели этих генов.

3. Разработка STS-маркеров для генов чувствительности к яровизации серии *Vrn-1* пятой гомеологической группы хромосом и основного гена-супрессора спаривания гомеологических хромосом *Ph1* (5B).

4. Молекулярно-генетическое картирование генов красной окраски колеоптиля (*Rc*) седьмой гомеологической группы хромосом мягкой пшеницы на основе SSR-анализа популяций F₂, а также анализа рекомбинантных инбредных линий популяции ТТМГ.

5. Изучение географического распределения генов серии *Rc* с помощью фенотипических и молекулярных данных.

Научная новизна. Впервые показано, что анализ коллекций изогенных линий с помощью молекулярных маркеров позволяет не только выявлять молекулярные маркеры, локализованные в районе целевого гена, но и уточнять взаимную ориентацию маркера и гена на хромосоме. Гены окраски и опушения колосковых чешуй мягкой пшеницы (*Bg*, *Hg* и *Rg1*) впервые маркированы с помощью ДНК-маркеров и нанесены на молекулярно-генетическую карту мягкой пшеницы. Впервые разработаны ПЦР-маркеры для генов серии *Vrn-1* пятой гомеологической группы хромосом. Гены красной окраски колеоптиля (*Rc1*, *Rc2*, *Rc3*) картированы с помощью SSR-маркеров на одинаковом расстоянии от центромеры хромосом 7AS, 7BS и 7DS, в связи с чем, получили новые обозначения (*Rc-A1*, *Rc-B1*, *Rc-D1*), как гены, принадлежащие одной гомеологической серии.

Практическая ценность. SSR-маркеры *Xgwm136*, *Xgwm550*, *Xgwm33b*, локализованные, как показано в настоящем исследовании, вблизи генов окраски и опушения колосковых чешуй, могут быть использованы как для маркирования данных генов, так и для молекулярного картирования ряда генов устойчивости к заболеваниям пшеницы, расположенных в 1-6 cM от генов окраски и опушения колосковых чешуй: *Lr10* (1AS), *Pm3* (1AS) и *Yr10* (1BS) (Howes et al., 1986; Briggie, Sears, 1966; Metzger, Silbaugh, 1970). Маркер *Xsts426a* (5AL), разработанный в настоящем исследовании, может быть использован в качестве тестерного маркера для основного гена

чувствительности к яровизации *Vrn-A1*, маркеры *Xsts426b,d* (5BL) и *Xsts426c* (5DL) - для картирования и маркирования генов *Vrn-B1* и *Vrn-D1*, соответственно, а маркер *Xsts1201c* (5BL) для картирования и маркирования основного гена-супрессора спаривания гомеологичных хромосом *Ph1*.

Апробация работы. Результаты исследования были представлены в виде 7 устных и стендовых докладов на различных всероссийских и международных конференциях и симпозиумах: XXXVI международная научная студенческая конференция "Студент и научно-технический прогресс", Новосибирск, 1998 (2 тез.); международная конференция "Молекулярная генетика и биотехнология", Минск, 1998; всероссийский симпозиум "Изучение генома и генетическая трансформация растений", Иркутск, 1999; "6-th International wheat conference", Budapest, 2000; международная конференция "Genetic collections, isogenic and alloplasmic lines", Новосибирск, 2001 (2 тез.).

Публикации. По результатам исследования опубликовано 4 статьи в отечественных и зарубежных журналах. В целом, список публикаций по теме диссертации содержит 11 печатных работ.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Материал диссертации изложен на 182 страницах печатного текста, включая 21 таблицу и 18 рисунков. Список цитированной литературы содержит 344 работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для определения хромосомной локализации ДНК-маркеров использовали нуллитетрасомные и дителосомные линии сорта мягкой пшеницы 'Chinese Spring' (Sears, 1944, 1946; использовались линии, поддерживаемые в ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, и в IPK-Gatersleben, Германия). Для молекулярного маркирования генов *Vrn-A1*, *B1*, *Bg*, *Hg*, *Rg1* и локализации генов *Bg*, *Hg*, *Rg1* на молекулярной карте использовали коллекции изогенных линий мягкой пшеницы (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, более подробно см. Хлесткина с соавт., 1999, 2000). Молекулярно-генетическое картирование генов красной окраски колеоптиля осуществляли на основе популяций F_2 и RIL (IPK-Gatersleben, более подробно см. Khlestkina et al., 2001a, 2002), а географическое распределение данных генов изучали при использовании 468, главным образом европейских, сортов мягкой пшеницы, поддерживаемых в IPK-Gatersleben (список сортов см. в Khlestkina et al., 2001b). Выделение ДНК изогенных и нуллитетрасомных линий осуществляли с применением протеиназы "K" (Дрейпер с соавт., 1991, с модификациями), ДНК растений из популяций для картирования выделяли экспресс-методом (Plaschke et al., 1995, с модификациями). Рекомбинантные клоны, содержащие используемые в работе (Хлесткина с соавт., 1999) RFLP-последовательности, предоставлены д-ром Гейлом (Xie et al., 1993) и д-ром Сорреллсом (Kleinhofs et al., 1993). ДНК рекомбинантных плазмид выделяли методом щелочного

лизиса (Maniatis et al., 1982). Определение нуклеотидной последовательности RFLP-маркеров проводилось по методу Сэнгера (Sanger et al., 1977). Праймеры к RFLP-последовательностям сконструированы при использовании компьютерной программы "OLIGO" (W. Rychlik, США). Для RAPD-анализа использовался набор случайных праймеров длиной 10-11 нуклеотидов с G-C составом 45-72%. Праймеры для RAPD- и STS-анализа синтезированы с помощью Н-фосфонатного метода (В.Ф. Кобзев, ИЦиГ СО РАН). В работе (Хлесткина с соавт., 1999, 2000; Khlestkina et al., 2001a, 2002) также использовались праймеры к SSR-локусам 1, 5 и 7 гомеологических групп хромосом мягкой пшеницы, которые любезно предоставила д-р М. Родер (Röder et al., 1998a). ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 50 мкл, содержащей 100 нг ДНК-матрицы, 67 мМ трис-НСl (pH 8.8), 1.8 мМ MgCl₂, 0.01 % Tween 20, 18мМ (NH₄)₂SO₄, по 0.2 мМ каждого дНТФ, по 0.25 мкМ прямого и обратного специфических праймеров, 1 ед. ДНК-полимеразы Taq, в следующих условиях: денатурация – 1 минута при 94⁰С; отжиг матрицы с праймером - 1 минута при 37, 50, 55 или 60⁰С; полимеризация - 2 минуты при 72⁰С; число циклов – 25-45; достраивание ПЦР-фрагментов: 10 минут при 72⁰С. Разделение продуктов амплификации со случайными праймерами проводили в 1- 2 % агарозном геле, со специфическими - в 5 или 10 % ПАА геле (Maniatis et al., 1982). Электрофоретический анализ флуоресцентно-меченных амплифицированных фрагментов ДНК (в случае SSR-картирования генов *Rc*) проводился в 6 % денатурирующем ПААГ толщиной 0.35 мМ в автоматическом лазерном флуоресцентном секвенаторе (пр-во "Pharmacia"; процедуры выполнялись согласно протоколам фирмы). Хромосомную локализацию STS- и SSR-маркеров проводили с помощью нуллитетрасомных и дителосомных линий сорта мягкой пшеницы 'Chinese Spring', как описано ранее (Sharp et al., 1989; Plaschke et al., 1996). Принцип использования изогенных линий для маркирования генов описан ранее (Muehlbauer et al., 1988). Построение молекулярно-генетических карт проводилось с помощью компьютерной программы "MAPMAKER 2.0" (Lander et al. 1987). Соответствие наблюдаемого в популяциях расщепления теоретически ожидаемому определяли с помощью метода χ^2 (Гершензон, 1979).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Локализация генов Vg, Hg и Rg1 на молекулярной (SSR) карте мягкой пшеницы с помощью коллекций изогенных линий

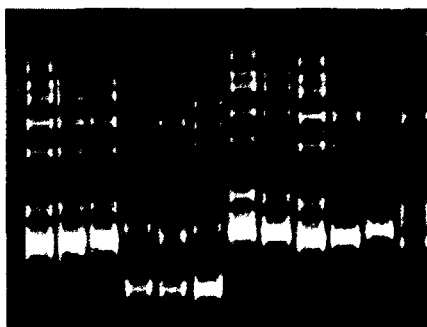
Первая группа гомеологических хромосом мягкой пшеницы *T aestivum* L. несет ряд генов, контролирующих морфологические признаки колоса. К ним относятся такие важные таксономические признаки, как окраска и опушение колосковых чешуй. Сообщалось о молекулярно-генетическом картировании генов опушения и окраски чешуй колоса диплоидной и тетраплоидной пшениц (Van Deynze et al., 1995a; Blanco et al., 1998; Kozzun et al., 1999). У гексаплоидной пшеницы на молекулярную карту нанесен лишь ген *Rg2* красной окраски колосковых чешуй (Börner et al., 2001).

В настоящей работе проводилось установление локализации генов черной окраски и опушения *Bg*, *Hg* (1AS; тесно сцеплены между собой) и красной окраски чешуй колоса *Rgl* (1BS) на молекулярной карте мягкой пшеницы (Röder et al., 19986) с помощью SSR-анализа изогенных линий (Хлесткина с соавт., 2000). Из четырех SSR-маркеров хромосомы 1A (*Xgwm33a*, *Xgwm164*, *Xgwm136* и *Xgwm691*), взятых для анализа изогенных линий, лишь один маркер *Xgwm136* оказался перенесенным вместе с генами *Bg* и *Hg* в изогенные линии от донорных линий, причем только в тех линиях, которые маркированы сразу двумя доминантными аллелями *Bg* и *Hg* (линии АНК-22А, АНК-22В и i:C29BgHg) (Рис. 1). Полученные результаты указывают на то, что гены *Bg* и *Hg* располагаются в районе локализации маркера *Xgwm136* на хромосоме 1AS молекулярно-генетической карты мягкой пшеницы (Рис. 2а), аналогичным образом показано, что ген *Rgl* располагается в районе локализации маркеров *Xgwm33b* и *Xgwm550* на хромосоме 1BS (Рис. 2б; более подробно см. Хлесткина с соавт. 2000). Интересно, что оба гена окраски колосковых чешуй - *Bg* и *Rgl* - оказались, в результате, локализованы вблизи SSR-маркеров хромосом 1AS (*Xgwm136*) и 1BS (*Xgwm550* и *Xgwm33b*), удаленных на почти одинаковое расстояние от центromеры (-47 сМ), причем, на таком же расстоянии от центromеры в хромосоме 1DS находится и ген *Rg2*, интегрированный в ту же самую молекулярно-генетическую карту (Bömer et al., 2001). Это может служить доказательством принадлежности генов окраски колосковых чешуй первой гомеологической группы хромосом к одной гомеологической серии. Изучение глиадиновых маркеров с помощью той же самой коллекции изогенных линий (Пшеничникова Т.А., ИЦиГ СО РАН) в совокупности с полученными результатами (Хлесткина с соавт., 2000) позволило предложить следующий наиболее вероятный порядок расположения изученных генов и маркеров: "центromера-*Xgwm136* - *Gli-A1* - *Bg/Hg*-теломера (1AS)" и "центromера-*Xgwm33* - *Gli-B1* - *Rgl* - *Xgwm550*-теломера (1BS)". Результат по хромосоме 1AS в сочетании с известными данными об аналогичной взаимной ориентации локусов "центromера-*Xgwm136* - *Gli-A1* - *Hg*-теломера" в хромосоме 1AS твердой пшеницы (Korzun et al., 1999) дополнительно свидетельствует в пользу гомеологии А-геномов твердой и мягкой пшениц.

Получение ПЦР-маркеров для генов Vrn-A1, Vrn-B1, Vrn-D1, Ph1 и B1 пятой гомеологической группы хромосом мягкой пшеницы

Хромосомы пятой гомеологической группы контролируют ряд важных признаков мягкой пшеницы. Сюда, в первую очередь, относятся чувствительность к яровизации, которая контролируется, в числе других генов, генами серии *Vrn-1* (*Vrn-A1* - 5AL; *Vrn-B1* - 5BL; *Vrn-D1* - 5DL). В пятой гомеологической группе локализованы также основной ген-супрессор спаривания гомеологических хромосом *Ph1* (5BL) и основной ген-ингибитор развития остей *B1* (5AL). Несмотря на активное проведение работ по составлению молекулярно-генетических карт хромосом пятой гомеологической группы, на которые уже нанесены гены *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 пп



пп 278 278 278 232 232 232 288 288 278 278 288 278

Рис. 1. ПЦР-амплификация SSR-последовательности *Xgwm136* у изогенных линий и родительских линий: 1 – *T. persicum*, 2 - АНК-22А, 3 - С29ВgHg; 4 - 'Саратовская 29', 5 - С29Нg; 6 - 'Пиротрикс 28', 7 – АНК-9А, 8 – 'Новосибирская 67', 9 - АНК-22В, 10 - k-20551, 11 - АНК-22С, 12 - *T. turanicum*. Электрофоретический анализ в 10 % ПААГ с окрашиванием бромистым этидием. На рисунке справа даны длины фрагментов стандартной длины (λ /Pst), внизу даны длины маркирующих последовательностей у разных линий (пп).

Группы «донорная/ изогенная/ рекуррентная линия» находятся в дорожках: 6/7/8; 10/2/8; 1/9/8; 12/11/8, 6/5/4; 2/3/4. 1,12 – линии тетраплоидной пшеницы, остальные – линии гексаплоидной пшеницы *T. aestivum*. Линии 1-3, 9-10 имеют аллели *Bg*, *Hg*; линии 5-7 - *bg*, *Hg*; линии 11-12 - *Bg*, *hg*; линии 4 и 8 - *bg*, *hg*.

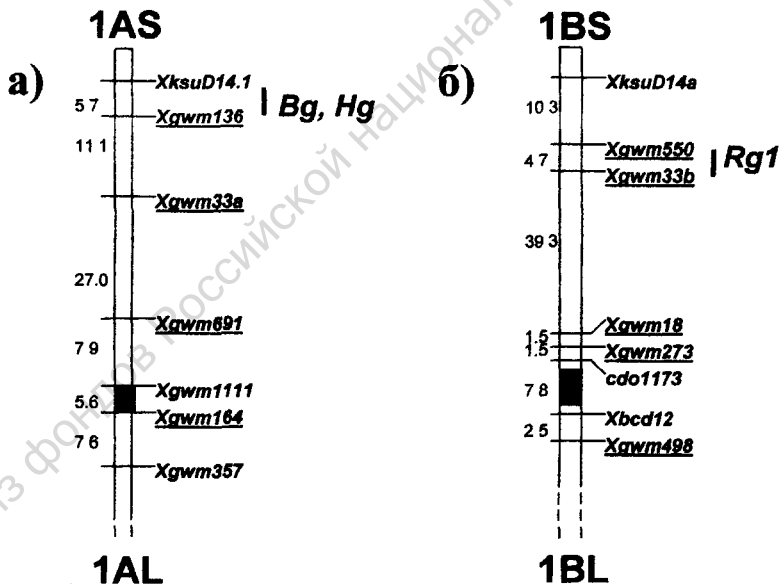


Рис. 2. Молекулярные карты хромосом 1А (а) и 1В (б) мягкой пшеницы (Röder et al., 1998a; Röder et al., неопубл. данные). Слева даны расстояния между маркерами в сантиморганах. Черным цветом обозначена область локализации центromеры. На данных картах обозначена установленная в настоящей работе область локализации генов *Bg*, *Hg* (а) и *Rg1* (б).

D1, Ph1, B1 (Galiba et al., 1995; Snape et al., 1995; Korzun et al., 1997; Kato et al., 1998, 1999в), районы их локализации до сих пор остаются недостаточно насыщенными ДНК-маркерами, в частности удобными в применении ПЦР-маркерами. В настоящей работе проводилось получение ПЦР-маркеров для генов *Vrn-A1, Vrn-B1, Vrn-D1, Ph1, B1* с помощью RAPD-анализа изогенных и STS-анализа нуллитетрасомных и изогенных линий (Хлесткина с соавт., 1999). RAPD-анализ изогенных линий, несущих рецессивные аллели генов *Vrn-A1* и *B1*, с использованием 95 случайных праймеров позволил выявить один RAPD-маркер для гена *Vrn-A1* (Рис. 3а). Маркировать ген *B1* не удалось из-за низкого уровня межсортового полиморфизма, выявляемого между сортами пшеницы - родительскими линиями изогенных линий. Полученные результаты подтверждают более ранние сообщения о низком уровне межсортового полиморфизма пшеницы, выявляемого при RAPD-анализе (Gupta et al., 1999б; Penner, 1996). STS-маркеры разрабатывались на основе локализованных ранее вблизи генов чувствительности к яровизации и спаривания гомеологических хромосом RFLP-последовательностей: *Vrn-A1* - *Xpsr426a, Xcdo504* (Galiba et al., 1995), *Vrn-B1* - *Xpsr426b* (предположительно, согласно гомеологии), *Vrn-D1* - *Xpsr426c* (на основе сопоставления данных Worland et al., 1998б и Xie et al., 1993), *Ph1* - *Xpsr1201c* (Clarke et al., 1992; Xie et al., 1993). Нами была проанализирована первичная структура данных RFLP-последовательностей (Рис. 4). Сравнение первичной структуры маркеров с базой данных нуклеотидных последовательностей (NCBI Blast E-Mail Server) проводилось с помощью компьютерной программы "BLASTN" (Altschul et al., 1990). Не обнаружено гомологии первичной структуры RFLP-клонов PSR426, CDO504 и PSR1201 с какими-либо нуклеотидными последовательностями из базы данных. Нуклеотидная последовательность PSR1201 была отправлена в банк данных EMBL, где ей был присвоен номер AJ009763. На основе расшифрованной первичной структуры RFLP-последовательностей PSR426, CDO504 и PSR1201 были сконструированы праймеры для ПЦР. Данные праймеры использовались далее для амплификации ДНК нуллитетрасомных линий сорта 'Chinese Spring' мягкой пшеницы. По отсутствию того или иного фрагмента в ПЦР-спектре нуллитетрасомных линий по сравнению с нормальной линией сорта 'Chinese Spring' можно судить о хромосомной локализации этого фрагмента (Plaschke et al., 1996). Все три пары праймеров амплифицировали фрагменты от 0.2 до 2 тпн. При сравнении ПЦР-спектров нормальной и нуллитетрасомных линий сорта 'Chinese Spring' удалось установить, что амплифицируемые с помощью праймеров к RFLP-последовательности PSR426 фрагменты ДНК длиной 800 и 805 пн локализованы в хромосомах 5А (*Xsts426a*) и 5D (*Xsts426c*), а фрагменты ДНК длиной 450 и 1150 пн - в хромосоме 5В (*Xsts426b,d*). Аналогичным образом показано, что амплифицируемый с помощью праймеров к RFLP-последовательности PSR1201 фрагмент ДНК длиной около 600 пн находится в хромосоме 5А (*Xsts1201b*), а три фрагмента почти одинаковой длины (около 450 пн) локализованы в хромосомах 5А (*Xsts1201a*), 1А (*Xsts1201a*) и 5В

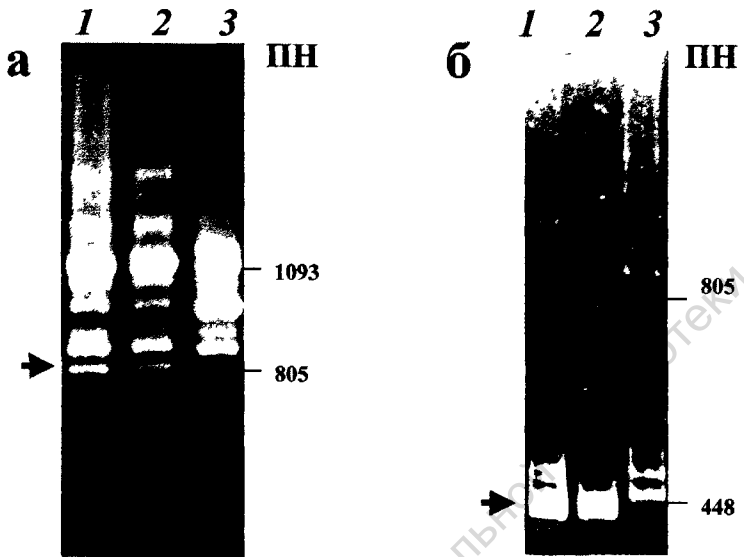


Рис. 3. Анализ продуктов ПЦР в 2 % агарозном геле (а) и 5 % ПААГ (б). а) RAPD-маркер *Xr405* (tgtagccctg): 1 - АНК-18А (ИЛ), 2 - 'Безостая 1' (РД), 3 - 'Новосибирская 67' (РР); б) STS-маркер *Xsts426a*: 1 - 'Triple Dirk B' (РД); 2 - АНК-18В (ИЛ); 3 - 'Новосибирская 67' (РР). ИЛ – изогенная линия, РД – донорная и РР – рекуррентная родительские линии. На рисунке справа даны длины фрагментов стандартной длины (λ /Pst)

PSR1201 476 п.н.

5' AGGATCCGCCCTCAATATTTGGTTGGATACGGTCAGAAAGACTTGGCCTGCAAAATTCGAAGTTCATAAATAATGGTGTCCAGTTATTTTTTCATTTGGTGGTAAGGGGATGCGTTTCACTCTAGAGGGGAATAAAGCGTTACCTACGTCGACCTGCCTATAAGAAA AAGAAAAGGATGGATGTCATATACGGGGCAAACTTCCTGAAACAGTGGCGGTACATTCGTTAATACTATAGTTTTTGTGTGTTG CTACCTGACCAATCTGACAGACCTGCCTAAAGGGAAAGTCAATTAAGAGAAAAGGACAGCATGCGGGTAATAGCGAATCGG CCACTCCAAATCCCGAGGCCAAGGTTTGCACGTGCGCAGGAACTGTGCGTGTGTGCGCATCTTGTATGGCACTCAATTA CATGAGTGATGTATAAGCAAAAACCAGAGGGAGTACCAGTAAGTGCACAAATGCAGTATGCATATAATGTGAGAGA-3'

PSR426 497 п.н.

5' AATTATACGTGCTGGTGGGAAATCGAAATCGGGTTATCTTTCTCATTTCGACCGCATCGTTCTCGTGTTCGCTGAATCGT GGTCCATTTGCTTATCAGGAATCACTTGGCTTTAGTAGATGAAAGGCCAAACCGCTGCTAGTTCGACTTGCATTCATCGGTCC GGTGTGGCTCTTTATCCGTTGTGACACTCTTGTGCGAGCTCTCGGGGGGAAAAGGGGAAATTCGAACTAGTGTGCTCT CGCTTCTCTGTGTGATCCACTCACTGGTAAAGAAAAGTGTCTTATGAGAAGTCTAGGTGCTACCATGACCTAAATCCAG CACCAAGTTATGAGTATCTCCCACTAGTGACACCTGAGATGCGACGATCAGCTAACAAATGTCTTTGTAAACGAGAGA CA CGTTCCAAAAGCTACCAAAATGTCTTTGTAACCAGGAGGTGACTAGTGGTACCTCCATGCGACAGACTTTGTGAGGATCAG TGATATCGAATTC-3'

CDO504 412 п.н.

5' AATTCCGGCAGAGGCAGAGCAGCCCGAGCAAAACGAAGACGACGCCCGAAGAGGAGAAGAAGATGGTGTATGCCAGGACCGA TGTATGGACAAGGTGCCCGCGTGTGCTGTCTTGGACTTGGCACTACGAGCGACATGTTCCGCCAGACCTAGATACAGA AGTACTTGGCAGATCCCTTCCCTACCATCTGT--GCCTTACTGCTTAACCTGGCTACCGCTAGACAGGAAGTCTACCA GCAAGTGGTCTGTTCACTATGCTGCTTGGCCAGCCTGCTTCTGATTTGACCTGTCTAGCCGCTGAAAACATATGTACTTTA CCAAGGTTTGTATTTGTTGCTCTACTAGACCATGATGACTGATGTGCCACACATCTAGAAGAAATGAAAATAAAATAATTC CCTTGTATGTTT-3'

Рис. 4. Первичная структура ДНК RFLP-последовательностей.

(*Xsts1201c*). RFLP-маркер *Xcdo504* конвертировать в STS-маркер не удалось, в то время как разработанные, перечисленные выше, маркеры серии *Xsts426* и *Xsts1201* сохранили хромосомную локализацию своих RFLP-предшественников, как показал анализ нуллитетрасомных линий. Кроме того, для маркера *Xsts426a*, RFLP-предшественник которого, *Xpsr426a* тесно сцеплен с геном *Vrn-A1* (Galiba et al., 1995), было также показано наличие тесного взаиморасположения с данным геном при использовании изогенных линий (Рис. 3б, длина маркирующего фрагмента от донорной родительской линии 'Tripl Dirk B' около 450 пн) (более подробно см. Хлесткина с соавт., 1999). В молекулярно-генетическом картировании злаков STS-подход использовался уже неоднократно (Blake et al., 1996; Erpelding et al., 1996; Talbert et al., 1994; Gill, Gill, 1996) с 69% успешной разработки у пшеницы и 56 % у ячменя (Erpelding et al., 1996). Есть основания считать, что полученные маркеры *Xsts426b,d* (5B), *Xsts426c* (5D), *Xsts1201c* (5B) также, помимо хромосомной локализации, сохранили и внутривхромосомную локализацию своих RFLP-предшественников и, следовательно, могут быть использованы для маркирования (и молекулярного картирования) генов *Vrn-B1*, *Vrn-D1* и *Ph1*, соответственно.

Молекулярное картирование и изучение географического распределения генов серии Rc

Использование молекулярных маркеров позволило в последние годы установить точную локализацию ряда генов мягкой пшеницы, и подтвердить тем самым их принадлежность к гомеологическим, а для некоторых и к ортологическим сериям. Примером могут служить гены чувствительности к длине дня (*Ppd*), к яровизации (*Vrn*), гены красной окраски зерна (*R*), сферококкоидной мутации (*S*) (Börner et al., 1998; Flintham, Gale, 1995; Salina et al., 2000). В настоящей работе проводилось молекулярное картирование генов красной окраски coleoptilia *Rc1* (7A), *Rc2* (7B) и *Rc3* (7D), локализованных в седьмой гомеологической группе хромосомом (McIntosh et al., 1998). Картирование осуществлялось на основе SSR-анализа популяций F₂. Из 31 SSR-маркера хромосомы 7A - 20 маркеров (65%), из 34 маркеров хромосомы 7B - 23 (68%), а из 26 маркеров хромосомы 7D - 11 маркеров (42%) выявляли полиморфизм между родительскими линиями соответствующих популяций. Исходя из того, что гены *Rc1*, *Rc2* и *Rc3* располагаются в районе, близком к центромере (McIntosh et al., 1998), для дальнейшего анализа популяций были выбраны полиморфные SSR-маркеры, локализованные, главным образом, в данной части хромосом. В качестве примера на рисунке 5 приведен фрагмент результата анализа популяции '7A' с одним из маркеров (*Xgwm748*). По молекулярным маркерам наблюдалось расщепление 1:2:1 (в отдельных случаях 3:1). Соответствие наблюдаемого расщепления теоретически ожидаемому подтверждено с помощью метода χ^2 . Расщепление по окраске coleoptilia также указывало на моногенный характер наследования данного признака в трех используемых популяциях.

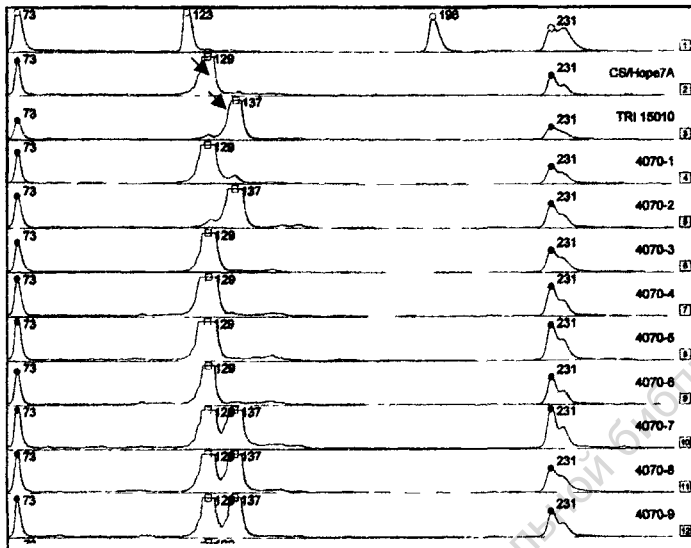


Рис. 5. Фрагмент результата SSR-анализа (маркер *Xgwm748*) популяции F_2 , проведенного в 6% денатурирующем ПААГ при помощи автоматического лазерного флуоресцентного секвенатора. 1 – фрагменты ДНК стандартной длины (пн); 2, 3 - родительские линии, 4 - 12 – представители популяции F_2 . Маркирующие фрагменты ДНК у родительских линий обозначены стрелками.

Полученные молекулярные и фенотипические данные анализировались с помощью программы "MAPMAKER 2.0". Результат картирования представлен на рисунке 6. С целью локализации центromеры на полученных картах нанесены на них SSR-маркеры использовались для тестирования дителосомных линий мягкой пшеницы (сорта 'Chinese Spring'). В результате установлено, что гены *Rc1*, *Rc2* и *Rc3* локализуются на почти одинаковом расстоянии от центromеры (15, 21 и 17 сМ, соответственно) в коротких плечах хромосом седьмой гомеологической группы (Рис. 6). Полученные результаты согласуются с данными Чао с соавторами, локализовавшими ген *Rc3* с помощью RFLP-анализа в 14 сМ от центromеры в хромосоме 7DS (Chao et al., 1989), с данными Нельсона и соавторов, установившими с помощью QTL-анализа локализацию гена *Rc1* на расстоянии около 10 сМ от центromеры в хромосоме 7AS (Nelson et al., 1995a). Полученные результаты служат доказательством принадлежности генов *Rc1*, *Rc2* и *Rc3* к одной гомеологической серии. В соответствии с правилами обозначения генов, принадлежащих к одной гомеологической серии (McIntosh et al., 1998), им присвоены новые обозначения *Rc-A1*, *Rc-B1* и *Rc-D1*. Кроме того, ген красной

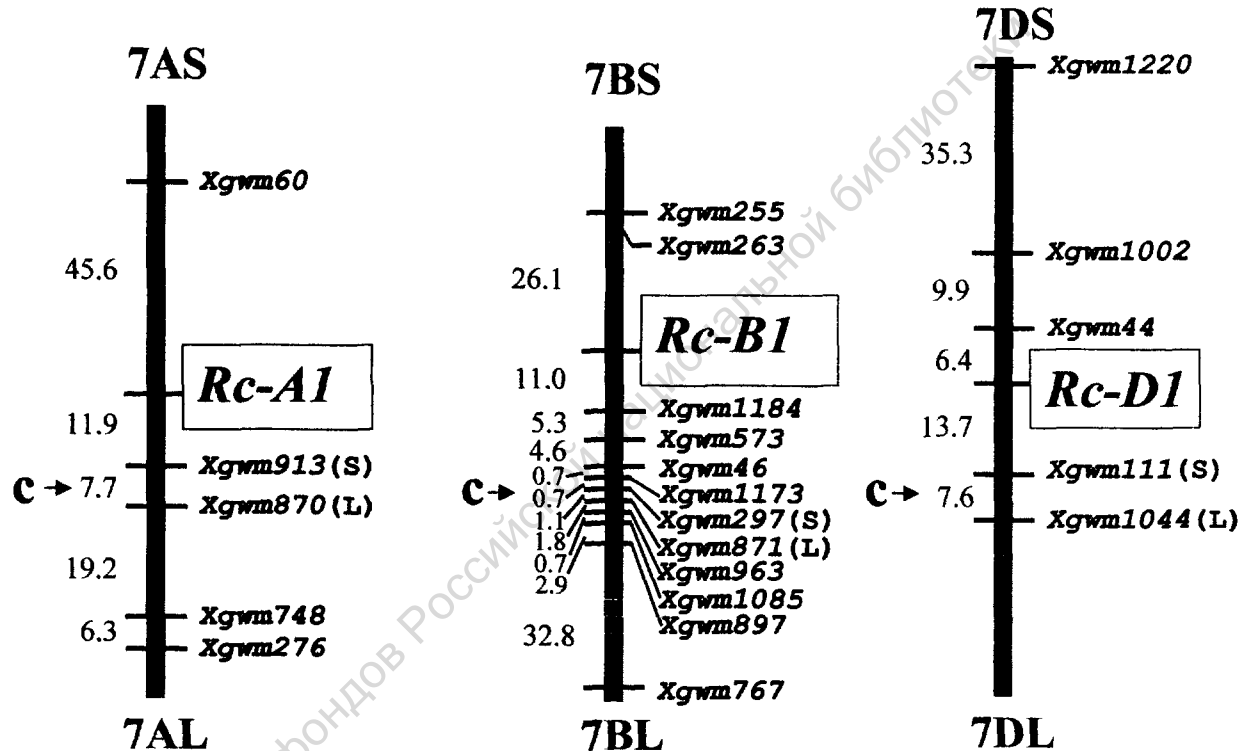


Рис. 6. Результаты построения молекулярно-генетической карты 7 гомеологической группы хромосом мягкой пшеницы с помощью программы «MAPMAKER 2.0». Слева даны генетические расстояния в сантиморганах. С – центромера.

окраски колеоптиля интегрирован в молекулярно-генетическую карту популяции 'ТТМГ', в хромосому 7D, также вблизи центромеры (более подробно см. Khlestkina et al., 2001a). Поскольку родительская линия популяции 'ТТМГ', несущая ген красной окраски колеоптиля в доминантной форме, является синтетическим аллогексаплоидом и получила этот ген от *Ae. squarrosa*, можно судить о наличии ортологической серии генов красной окраски колеоптиля, к которой также, возможно, относятся ген *an1* (7RS) ржи (De Vries, Sybenga, 1989; Malyshev et al., 20016) и ген *ant1* (7HS) ячменя (Frankowiak, 1997; Lundqvist et al., 1997).

Географическое распределение такого признака, как окраска колеоптиля, проводилось около 30 лет назад (Zeven, 1973). В настоящей работе был изучен фенотип 468, главным образом европейских, сортов мягкой пшеницы (Khlestkina et al., 2001b). Выявлено, что большинство сортов имеют неокрашенный колеоптиль (около 60%), тогда как около 23% и 6% имеют окрашенный и темно окрашенный колеоптиль, соответственно. Около 13% сортов гетерогенны по данному признаку. Наблюдается тенденция к уменьшению количества сортов с неокрашенным колеоптилем с 80% (Zeven, 1973) до 60% (Khlestkina et al., 2001b). Интересно, что в настоящее время частота встречаемости сортов с окрашенным колеоптилем существенно выше в западноевропейских странах, по сравнению со странами восточной и южной европейской части. Самый высокий процент сортов с окрашенным колеоптилем наблюдается в Великобритании (62%), затем во Франции (38%) и Германии (23%). Была также изучена возможность тестирования сортов мягкой пшеницы, имеющих красную окраску колеоптиля, с помощью картированных в настоящей работе молекулярных маркеров. Аналогичное тестирование сортов мягкой пшеницы с помощью SSR-маркеров проводилось ранее для гена карликовости *Rht8* (Worland et al., 1998a). Тестирование сортов, имеющих окрашенный колеоптиль, с помощью молекулярных маркеров, к сожалению, не позволило изучить географическое распределение генов *Rc-A1* и *Rc-B1*, ввиду высокой специфичности маркирующих аллелей, амплифицируемых у сорта 'Норе' (донор доминантных аллелей генов *Rc-A1* и *Rc-B1*), имеющего отдаленное происхождение от тестируемых европейских сортов. Между тем, на основе результатов, полученных с маркером *Xgwm111* (7D, донор - 'Мироновская 808'), удалось предположить, что у 14% изученных сортов красная окраска колеоптиля контролируется хромосомой 7D.

Молекулярное картирование генома пшеницы - стратегии для эффективного решения проблемы

Создание насыщенных молекулярно-генетических карт мягкой пшеницы *T. aestivum* L (AABBDD) - задача трудоемкая, требующая больших затрат времени и средств и совместных усилий многих исследователей. Огромный размер генома, сложный его состав, полигенный контроль большинства признаков гексаплоидной пшеницы усложняют картирование генома мягкой пшеницы, по сравнению с картированием геномов других злаков, других видов животных и растений в целом. Учитывая, что за локализацией и

картированием каждого маркера, будь то молекулярного или генетического, стоит трудоемкая работа по получению необходимого для картирования генетического материала, необходимо максимально использовать возможности созданных ранее генетических линий, популяций.

Так оказалось, что анеуплоидные линии пшеницы могут эффективно использоваться для хромосомной локализации молекулярных маркеров пшеницы (Sharp et al., 1989; Plaschke et al., 1996). В настоящей работе нуллитетрасомные линии сорта 'Chinese Spring' мягкой пшеницы успешно использовались для определения хромосомной локализации STS-маркеров, а дителосомные линии того же сорта - с целью установления локализации центромер хромосом 7 гомеологической группы относительно SSR-маркеров (Хлесткина с соавт., 1999; Khlestkina et al., 2002).

С развитием подходов по получению молекулярных маркеров возникла идея использования созданных ранее в селекционных целях изогенных линий для того, чтобы определять, был ли тот или иной маркер перенесен вместе с геном в составе небольшого участка хромосомы, передаваемого изогенной линией от донорной линии, и, следовательно, выявлять маркеры, наиболее близко расположенные к данному гену (Muehlbauer et al., 1988). Это с одной стороны позволяет эффективно маркировать гены, быстро насыщать область расположения уже картированных генов новыми ДНК-маркерами, а с другой стороны дает возможность уточнять локализацию еще некартированных генов на молекулярно-генетических картах, устанавливая с помощью изогенных линий, в районе какого ДНК-маркера тот или иной ген располагается. Данный подход применялся в настоящей работе для определения локализации на молекулярно-генетической карте мягкой пшеницы генов окраски и опушения колосковых чешуй (*Bg*, *Rgl*, *Hg*), а также для маркирования гена чувствительности к яровизации (*Vrn-A1*) и гена-ингибитора развития остей (*B1*) (Хлесткина с соавт., 1999, 2000).

К настоящему времени создано довольно много популяций, с помощью которых картированы те или иные гены и маркеры. Однако нет необходимости каждый раз для картирования очередного гена создавать новую популяцию, так как потенциал имеющихся в наличии популяций еще не исчерпан. Использование их позволяет избежать дополнительных затрат времени и средств на подбор исходных родительских линий и создание новых популяций. Например, в молекулярно-генетическую карту популяции 'ТТМ1', содержащую более 600 SSR- и около 200 RFLP-маркеров (Röder et al., 1998b; Röder et al., неопубл. данные), было дополнительно интегрировано около 200 QTL-локусов, для чего было достаточно получить только фенотипические данные популяции 'ТТМ1' по изучаемым признакам и добавить их к имеющимся молекулярным данным (Börner et al., 2001). В настоящей работе ген *Rc-D1* был интегрирован в эту же самую молекулярно-генетическую карту, а также был картирован в популяции F₂ (полученной от скрещивания сортов 'Мионовская 808'x'Ai-bian') (Khlestkina et al., 2001a, 2002), созданной ранее для картирования одного из генов карликовости (Börner et al., 1997).

Таким образом, предварительный анализ уже имеющегося в наличии генетического материала с целью выяснения возможности использования его в работах по молекулярной локализации и картированию генов, позволяет избежать затрат времени и средств на создание нового генетического материала, и тем способствует более быстрому и эффективному решению поставленных задач. Однако, помимо подбора генетического материала, стратегически важным является и выбор ДНК-маркеров, с помощью которых будет осуществляться молекулярный анализ.

По мере создания все более новых типов молекулярных маркеров предпочтение отдавалось то одному, то другому методу. Однако на данный момент очевидно, что различные типы ДНК-маркеров скорее не исключают, а взаимно дополняют друг друга. В создании насыщенных маркерами генетических карт пшеницы важную роль играет сочетание различных методов молекулярного анализа. RFLP-карты пшеницы, хотя и являются надежными, не слишком насыщены молекулярными маркерами в силу низкого межсортового полиморфизма пшеницы, выявляемого с помощью RFLP-анализа. Однако RFLP-карты служат хорошим каркасом для внедрения других типов маркеров - SSR, AFLP, отличающихся более высоким уровнем полиморфизма и более удобных в применении (Gupta et al., 1999). Кроме того, избежать трудностей, связанных с непосредственным использованием RFLP-анализа, позволяет создание на их основе более дешевых и удобных в применении STS-маркеров. Так, например, в настоящей работе на основе RFLP-маркеров, локализованных вблизи генов чувствительности к яровизации и подавления спаривания гомеологических хромосом, созданы более удобные в применении STS-маркеры (Хлесткина с соавт., 1999).

На данный момент в геноме мягкой пшеницы картировано больше всего SSR-маркеров, поэтому они довольно широко используются для маркирования генов и локализации их на молекулярных картах. В настоящей работе, например, для маркирования генов окраски и опушения колосковых чешуй проводился SSR-анализ изогенных линий, позволивший достаточно быстро маркировать данные гены и установить их локализацию на молекулярной карте мягкой пшеницы (Рис. 2, Хлесткина с соавт., 2000). В то же время, районы локализации многих генов (в том числе генов серии *Vrn* пятой гомеологической группы хромосом и гена *B1* ингибирования остей) до сих пор остаются ненасыщенными SSR-маркерами, поэтому для маркирования этих генов приходится обращаться к другим подходам, в том числе, к RAPD-анализу (Хлесткина с соавт., 1999). Сравнительно высокая плотность SSR-маркеров на молекулярной карте мягкой пшеницы, равномерное распределение между хромосомами и внутри хромосом позволяют проводить работы по картированию и доказательству гомеологии генов, контролирующих один и тот же признак и расположенных в гомеологических группах хромосом. Например, с помощью SSR-маркеров были картированы и отнесены к одной гомеологической группе гены сферококкоидной мутации пшеницы (Salina et al., 2000). Аналогичное

исследование было проведено в настоящей работе для генов красной окраски колеоптиля (Рис. 6; Khlestkina et al., 2001a, 2002).

Таким образом, сочетание различных методов молекулярного анализа позволяет эффективно маркировать гены мягкой пшеницы, устанавливать их локализацию на молекулярных картах и эффективно насыщать молекулярно-генетические карты мягкой пшеницы новыми молекулярными маркерами.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны новые ПЦР-маркеры на основе RFLP-последовательностей, сцепленных с генами серии *Vrn* пятой гомеологической группы хромосомом мягкой пшеницы и геном-супрессором спаривания гомеологических хромосом *Ph1* (5BL). С помощью анализа изогенных линий показано, что полученный STS-маркер *Xsts426a* локализован вблизи гена чувствительности к яровизации *Vrn-A1* (5AL) и может быть успешно использован для маркирования данного гена. Получены основания считать, что другие разработанные STS-маркеры, а именно: *Xsts426b,d* (5BL), *Xsts426c* (5DL), *Xsts1201c* (5BL), - могут использоваться для молекулярного маркирования и картирования генов *Vrn-B1*, *Vrn-D1* и *Ph1*, соответственно.
2. Впервые проводилась работа по насыщению RAPD-маркерами области локализации гена чувствительности к яровизации *Vrn-A1* (5AL), в результате которой при использовании изогенных линий выявлен RAPD-маркер, обозначенный *Xr405*, подходящий для маркирования гена *Vrn-A1*.
3. Гены окраски (*Bg*, 1AS; *Rgl*, 1BS) и опушения (*Hg*, 1AS) чешуй колоса мягкой пшеницы с помощью SSR-анализа коллекций изогенных линий впервые локализованы на молекулярно-генетической карте мягкой пшеницы: гены *Bg* и *Hg* в субтеломерной части хромосомы 1AS дистальнее маркеров *Xgwm136* и *Gli-A1*; ген *Rgl* в субтеломерной части хромосомы 1BS дистальнее маркеров *Xgwm33b* и *Gli-B1*, проксимальнее маркера *Xgwm550*. Полученные результаты в совокупности с литературными данными указывают на гомеологию генов окраски чешуй колоса первой гомеологической группы хромосомом мягкой пшеницы.
4. Гены красной окраски колеоптиля мягкой пшеницы *Rc1* (7AS), *Rc2* (7BS) и *Rc3* (7DS) картированы с помощью популяций F₂ относительно 5, 12 и 5 SSR-маркеров хромосом 7A, 7B и 7D, соответственно. Результаты картирования указывают на локализацию данных генов в прицентромерных районах хромосом 7AS, 7BS, 7DS на почти одинаковом расстоянии (около 15 - 21 сМ) от центромеры, что доказывает принадлежность этих генов к одной гомеологической серии, в связи с чем, генам даны новые обозначения: *Rc-A1*, *Rc-B1*, *Rc-D1*, соответственно. Ген *Rc-D1*, кроме того, интегрирован в хромосому 7DS молекулярно-генетической карты популяции 'ТТМ' также вблизи центромеры.
5. Изучено географическое распределение генов серии *Rc* на основе анализа более 450 европейских сортов мягкой пшеницы. Результаты анализа европейских сортов, имеющих красную окраску колеоптиля, с помощью SSR-

маркера *Xgwm111* (7DL) позволяют предположить, что у 14% из них данный признак контролируется хромосомой 7D.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Салина Е.А., Хлѣсткіна Е.К., Леонова И.Н., Коваль С.Ф. (1998) Идентификация STS- и RAPD-маркеров, тесно сцепленных с генами *Vrn1* и *B1* хромосомы 5AL мягкой пшеницы. Материалы междунар. конф. "Молекулярная генетика и биотехнология", Минск, с. 93-94.
2. Хлѣсткіна Е.К., Салина Е.А. (1998) Использование микросателлитных маркеров для картирования генов пшеницы с помощью изогенных линий. Материалы XXXVI МНСК "Студент и научно-технический прогресс", Новосибирск, с. 106.
3. Хлѣсткіна Е.К., Салина Е.А. (1998) Идентификация STS- и RAPD-маркеров, тесно сцепленных с генами *Vrn1* и *B1* мягкой пшеницы. Материалы XXXVI МНСК "Студент и научно-технический прогресс", Новосибирск, с. 107.
4. Хлѣсткіна Е.К., Салина Е.А., Леонова И.Н., Лайкова Л.И., Коваль С.Ф. (1999) Идентификация ПЦР-маркеров для генов 5 гомеологической группы хромосом мягкой пшеницы. Материалы всероссийского симпозиума "Изучение генома и генетическая трансформация растений", Иркутск, с. 31.
5. Хлѣсткіна Е.К., Салина Е.А., Леонова И.Н., Лайкова Л.И., Коваль С.Ф. (1999) Использование RAPD- и STS-анализа для маркирования генов 5 гомеологической группы хромосом мягкой пшеницы. Генетика 35: 1349-1357.
6. Khlestkina E.K., Salina E.A., Pshenichnikova T.A., Arbutzova V.S., Koval S.F. (2000) The use of near-isogenic line collections to identify linked RAPD, STS and SSR markers for wheat genes. Abstr. Conf. "6-th International Wheat Conference", Budapest, p. 216.
7. Хлѣсткіна Е.К., Салина Е.А., Пшеничникова Т.А., Арбузова В.С., Коваль С.Ф. (2000) Анализ изогенных линий мягкой пшеницы, несущих доминантные аллели генов *Bg*, *Hg* и *Rgl*, с помощью микросателлитных и белковых маркеров. Генетика 36: 1374-1379.
8. Khlestkina E.K., Pestsova E.G., Röder M.S., Börner A. (2001a) The utilisation of intervarietal substitution lines for molecular mapping of genes determining red coleoptile colour in wheat. Proc. Conf. "Genetic collections, isogenic and alloplasmic lines", Novosibirsk, p. 21-22.
9. Salina E.A., Khlestkina E.K., Arbutzova V.S., Koval S.F. (2001) Application of microsatellites for developing wheat near-isogenic lines with target gene located in subtelomeric region. Proc. Conf. "Genetic collections, isogenic and alloplasmic lines", Novosibirsk, p. 44-46.
10. Khlestkina E.K., Strich A., Röder M.S., Börner A. (2001b) Geographical distribution of red coleoptile color genes. Annual Wheat Newsl. 47: 50-57.
11. Khlestkina E.K., Pestsova E.G., Röder M.S., Börner A. (2002) Molecular mapping, phenotypic expression and geographical distribution of genes determining anthocyanin pigmentation of coleoptiles in wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor. Appl. Genet. In press.

Из фондов Российской национальной библиотеки

Подписано к печати 20. 12. 2001 г.

Формат бумаги 60 x 90 1/16. Печ. л. 1. Уч. изд. л. 0.7

Тираж 100 экз. Заказ 202

Ротапринт Института цитологии и генетики СО РАН
630090, Новосибирск, проспект академика М. А. Лаврентьева, 10.

РНБ Русский фонд

2003-4

24419

Из фондов Российской национальной библиотеки



05 ФЕВ 2002