

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА СОРТОВ, ЛИНИЙ И МУТАНТОВ ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*Pisum sativum* L.) С ПОМОЩЬЮ ДНК-МАРКЕРОВ НА ОСНОВЕ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ*

З.Г. КОКАЕВА, С.А. ГОСТИМСКИЙ

IRAP-метод использовали для изучения инсерционного полиморфизма ретротранспозонов группы *Ty1-copia* у 16 сортов, линий и мутантов гороха посевного (*Pisum sativum* L.). Оценили эффективность десяти комбинаций праймеров при выявлении полиморфизма у анализируемых образцов, получили полиморфные маркеры генома гороха. На основании IRAP-анализа определили генетические дистанции и построили дендрограмму, отражающую генетическое сходство и родство между исследованными образцами. Для каждого из анализируемых сортов и линий получили индивидуальный IRAP-спектр с целью выявления сортоспецифичных фрагментов, пригодных для паспортизации и маркирования изученных форм.

Ключевые слова: горох, (*Pisum sativum* L.), Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism, RAPD, LTR (long-terminal repeat), филогенетический анализ, ретротранспозон.

Идентификация сортов растений в последнее время становится все более актуальной для селекции и семеноводства, в связи с чем возрастает необходимость разработки эффективных методов анализа генетического полиморфизма. Один из перспективных подходов в решении этой задачи — молекулярные маркеры, полученные с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) (1). При этом ДНК-маркеры на основе ретротранспозонов информативнее полученных другими методами (2). Известно, что ретротранспозоны — мобильные генетические элементы, широко распространенные в геномах растений: в некоторых случаях их копии могут составлять более половины ядерного генома (3). В виде повторяющихся последовательностей ретротранспозоны рассеяны по всему геному, что делает их удобными для ДНК-генотипирования растений и филогенетических исследований. Использование методов, основанных на амплификации фрагментов генома с ретротранспозонами, оказалось эффективным при изучении особенностей филогенеза и биоразнообразия в родах *Brassica* (4), *Hordeum* (5), *Oryza* (6), *Pisum* (2), *Musa* (7). В IRAP-PCR-методе (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism—Polymerase Chain Reaction) для создания праймеров используют последовательности длинных терминальных повторов LTR (long-terminal repeats), имеющих определенную консервативную первичную структуру. В ПЦР такие праймеры позволяют амплифицировать различно ориентированные в геноме последовательности ДНК между близко расположенными ретротранспозонами, образующими семейство (8).

Ранее для паспортизации и идентификации сортов и линий гороха посевного мы применили RAPD-метод (9).

Целью настоящей работы было изучение генетического полиморфизма сортов, линий и мутантов гороха *Pisum sativum* L. с использованием ДНК-маркеров на основе ретротранспозонов группы *Ty1-copia*.

Методика. Анализировали растения 16 образцов гороха посевного: сорта Демон, Филби, Флагман, Виола, Немчиновский, Ранний Зеленый, Торсдаг, Finale, Rondo из коллекции кафедры генетики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, линии L-131, L-851, L-1132, L-1238, L-102 из Института генетики сельскохозяйственных растений (Швеция) и хлорофильные мутанты Хл 42 и Хл 15, полученные обработкой семян соответственно сортов Немчиновский и Торсдаг этилметансульфонатом. Тотальную ДНК выделяли из молодых листьев методом СТАВ с изменениями (10).

В работе использовали следующие праймеры (11):

Tps 3	5'-CCTTTGGGATATTAACCACAC-3'
Tps 6	5'-GTGAGATAGTTATATGTC-3'
Tps 7	5'-CTATAATACATAACAAGC-3'
Tps 10	5'-GGAATGATAGGCCTTGCC-3'
*RNaseH 1	5'-MGNACNAARCAAYATHGA-3'
*RNaseH 2	5'-GCNGAYATNYTNACNAA-3'

* Последовательности вырожденных праймеров.

Амплификацию проводили в термоциклере «Терцик» («ДНК-технология», Россия) по следующей программе: предварительная денатурация при 95 °С в течение 2 мин; 30 циклов при 95 °С в течение 60 с; при температуре отжига в течение 60 с; при 72 °С в течение 2 мин; конечная элонгация при 72 °С в течение 10 мин. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 50 нг ДНК, 2 ед. Таq-полимеразы («Силекс М», Россия), 2,5 мкл стандартного 10-кратного буфера для ПЦР («Силекс М», Россия), 25 пМ каждого праймера, 2,5 мМ Mg²⁺ и 0,25 мМ dNTP; на смесь наслаивали две капли минерального масла.

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 07-04-00652) и программы президиума РАН «Динамика генофондов растений, животных и человека».

Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 2 % агарозном геле с однократным ТВЕ-буфером и окрашивали бромистым этидием. Длину фрагментов определяли по маркерам молекулярной массы 100 bp + 1,5+3 Kb DNA Ladder («Сибэнзим», Россия). Гели просматривали в УФ-свете ($\lambda = 312$ нм); результаты документировали с использованием цифровой фотокамеры. Эксперименты проводили в нескольких повторностях.

Для количественной оценки полиморфизма и определения генетического расстояния между исследованными формами данные IRAP-анализа были представлены в виде матрицы состояний, в которой наличие или отсутствие в IRAP-спектрах фрагментов одинаковой длины обозначили соответственно 1 или 0. По матрице состояний была составлена матрица различий, генетические расстояния в которой рассчитывались по формуле Nei и Li (12) с помощью компьютерной программы Treecon (13).

На основании полученной матрицы невзвешенным парно-групповым методом (UPGMA — Unweighted Pair-Group Method) (13) была построена генеалогическая дендрограмма, отражающая степень различий между IRAP-спектрами исследуемых форм. Для построения дендрограммы использовали компьютерную программу Treecon (13). Оценку значимости генеалогических реконструкций проводили методом бутстрепа (14). Топология дерева в участках со значениями больше 50 % может считаться надежно установленной.

Результаты. Из 21 протестированной комбинации праймеров десять эффективно выявляли полиморфизм, а три могли быть использованы при паспортизации сортов и линий гороха (табл. 1). Для оценки полиморфизма генома в каждой комбинации праймеров определяли отношение числа полиморфных фрагментов к общему числу амплифицированных. Было показано, что у проанализированных сортов, линий и мутантов гороха отдельные праймеры выявляли от 7 до 25 фрагментов размером 150–1500 п.н., из которых от 4 до 13 были полиморфными (рис. 1). Всего получили 130 ДНК-фрагментов, из них 72 были полиморфными. Общий уровень полиморфизма с десятью комбинациями IRAP-праймеров составил 55,38 %. При оценке внутрелинейной изменчивости у линии L-131 показали, что IRAP-спектры растений гороха, полученные с парой праймеров (Tps 7–Tps 10), идентичны (рис. 2).

1. Эффективность комбинаций праймеров при выявлении полиморфизма IRAP-фрагментов ДНК

Праймер	Tps 3	Tps 6	Tps 7	Tps 10	RNaseH 1	RNaseH 2
Праймер						
Tps 3	+ (40 °C)	+ (40 °C)	+ (40 °C)	+ (40 °C)	+ (46 °C)	+ (46 °C)
Tps 6	+ (40 °C)	–	–	+ (40 °C)	–	–
Tps 7	+ (40 °C)	–	–	+ (40 °C)	–	–
Tps 10	+ (40 °C)	+ (40 °C)	+ (40 °C)	–	+ (46 °C)	+ (46 °C)
RNaseH 1	+ (46 °C)	–	–	+ (46 °C)	–	–
RNaseH 2	+ (46 °C)	–	–	+ (46 °C)	–	–

Примечание. «+» и «–» — соответственно эффективная и неэффективная пара; в скобках приведены соответствующие температуры отжига.

Для количественной оценки полиморфизма и определения степени дивергенции между изученными формами гороха данные, полученные при анализе IRAP-полиморфизма, представили в виде матрицы состояний 130 бинарных признаков, которую использовали для расчета генетических расстояний и построения дендрограммы.

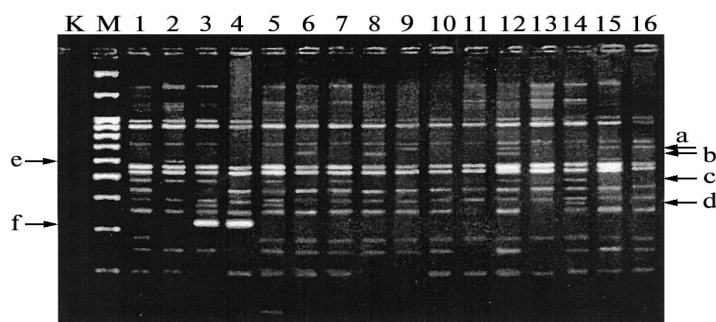


Рис. 1. Продукты IRAP-амплификации ДНК сортов (1–7, 10, 11), линий (8, 9, 12, 15, 16) и мутантов гороха (13, 14) с парой праймеров (Tps 7–Tps 10): 1 — Демон, 2 — Филби, 3 — Флагман, 4 — Виола, 5 — Немчиновский, 6 — Rondo, 7 — Finale, 8 — L-1238, 9 — L-102, 10 — Ранний Зеленый, 11 — Торсдаг, 12 — L-851, 13 — Хл 15, 14 — Хл 42, 15 — L-131, 16 — L-1132. К — отрицательный контроль; М — маркер молекулярной массы 100 bp + 1,5 + 3 Kb DNA Ladder. Стрелками отмечены полиморфные фрагменты: а — 690 п.н., б — 680 п.н., с — 490 п.н., d — 380 п.н., е — 600 п.н., f — 320 п.н.

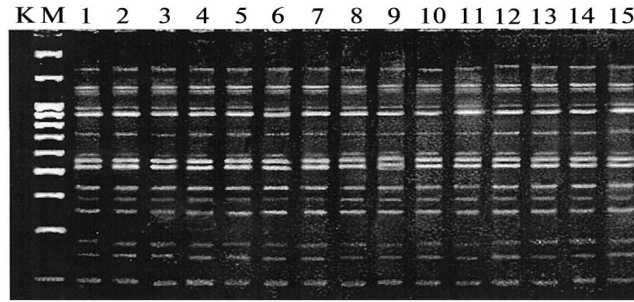


Рис. 2. IRAP-спектры ДНК-фрагментов у растений гороха линии L-131, полученные с парой праймеров (Tps 7–Tps 10): 1-15 — индивидуальные растения гороха линии L-131. К — отрицательный контроль; М — маркер молекулярной массы 100 bp + 1,5 + 3 Kb DNA Ladder.

Уровень различий между мутантами Хл 42, Хл 15 и исходными сортами составил 0 %, средний уровень полиморфизма между формами — 23,74 %, что согласуется с ранее полученными данными (9).

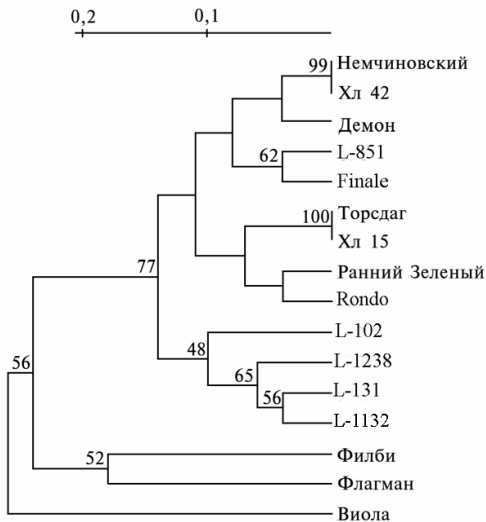


Рис. 3. Дендрограмма исследованных линий, сортов и мутантов гороха (по методу UPGMA). Верхняя шкала — генетическое расстояние по Nei и Li (12). Цифрами указаны значения бутстрепа, %.

Дендрограмма, отражающая степень различий между IRAP-спектрами образцов гороха, представлена на рисунке 3. Исходя из матрицы различий, наибольшие генетические расстояния были установлены между сортом Флагман и маркерными линиями (37,77 %), наименьшие — между мутантами и исходными сортами (0 %). Дендрограмма показывает, что сорт Немчиновский и полученный из него мутант Хл 42, а также сорт Демон кластеризуются в одну группу; сорт Торсдаг и полученный из него мутант Хл 15, сорта Ранний Зеленый и Rondo — в другую (уровень различий между кластерами составил 0,03). Вместе кластеризуются маркерные линии шведской селекции L-1132, L-131, L-1238 и линия L-102 (уровень различий между маркерными линиями и сортами — 0,02-0,1). Сорт Виола оказался обособленным от остальных, что, возможно, объясняется их разным происхождением. Эти результаты также согласуются с полученными нами ранее (9).

2. Матрица ДНК-фрагментов для паспортизации сортов, линий и мутантов гороха посевного (*Pisum sativum* L.) с помощью IRAP- маркеров

Образец	Длина ДНК-фрагментов, п.н.										
	710	690	680	600	490	440	380	320	280	250	200
Сорта											
Демон	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
Филби	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
Флагман	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-
Виола	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
Немчиновский	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
Rondo	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+
Finale	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
Ранний Зеленый	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Торсдаг	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
Линии											
L-851	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+
L-131	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
L-1132	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
L-1238	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-
L-102	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
Мутантные формы											
Хл 15	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
Хл 42	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+

Примечание. «+» и «-» означает наличие и отсутствие маркера. ДНК-фрагменты получены с комбинацией праймеров (Tps 7–Tps 10).

Для однозначной идентификации изученных форм гороха посевного методом IRAP-PCR оказалось достаточно использовать несколько пар праймеров: (Tps 7–Tps 10), (Tps 3–Tps 6), (Tps 3–Tps 7). IRAP-маркирование с этими праймерами позволяло амплифицировать уникальные для каждого образца IRAP-спектры у всех исследованных сортов и линий. Так, в спектре, полученном с комбинацией праймеров (Tps 7–Tps 10), фрагмент размером 680 п.н. присутствовал только у сорта Rondo и трех маркерных линий — L-1238, L-102, L-1132; фрагмент 690 п.н. — только у маркерных линий (кроме L-1238); фрагмент 600 п.н. обнаружили у сорта Филби и у двух маркерных линий — L-1238, L-1132; фрагмент 320 п.н. — только у сортов Флагман и Виола, а фрагмент 380 п.н. — у сортов Флагман и Немчиновский, а также у мутанта сорта Немчиновский Хл 42 (см. рис. 1). Фрагмент 280 п.н. отсутствовал только у трех сортов — Филби, Флагман и Виола.

Выявленная специфичность спектров позволяет проводить быструю идентификацию образцов. Набор ДНК-фрагментов, полученный в результате амплификации, может служить молекулярно-генетическим паспортом сорта или линии гороха (табл. 2).

Таким образом, использование IRAP-метода позволяет достаточно эффективно дифференцировать разные генетические формы гороха. Полученные IRAP- маркеры можно использовать не только для идентификации и паспортизации сортов и линий гороха, но также для филогенетических исследований и в работе по картированию хромосом. По сравнению с другими маркерными системами выявления генетического полиморфизма IRAP-метод чувствительнее и специфичнее, при этом он прост в исполнении, не требует использования радиоактивных изотопов и эндонуклеаз рестрикции, полученные результаты хорошо воспроизводимы. Единственное ограничение применения метода состоит в том, что необходимо знать нуклеотидную последовательность терминальных участков мобильных элементов.

ЛИТЕРАТУРА

- Гостимский С.А., Кокаева З.Г., Коновалов Ф.А. Изучение организации и изменчивости генома растений с помощью молекулярных маркеров. Генетика, 2005, 41, 4: 1-15.
- Pearce S.R., Knox M., Ellis T.H.N. et al. Pea Ty1-copia group retrotransposons: transpositional activity and use as markers to study genetic diversity in *Pisum*. Mol. Gen. Genet., 2000, 263: 898-907.
- Kumar A., Bennetzen J. Plant retrotransposons. Annu. Rev. Genet., 1999, 33: 479-532.
- Tatout C., Warwick S., Lenoir A. et al. Sine insertions as clad markers for wild *Crucifer* species. Mol. Biol. Evol., 1999, 16: 1614-1621.
- Waugh R., McLean K., Flavell A.J. et al. Genetic distribution of BARE-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). Mol. Gen. Genet., 1997, 253: 687-694.
- Iwamoto M., Nagashima H., Nagamine T. et al. p-SINE-like intron of the CatA catalase homologs and phylogenetic relationships among AA-genome *Oryza* and related species. Theor. Appl. Genet., 1999, 98: 853-861.
- Teo C.H., Tan S.H., Ho C.L. et al. Genome constitution and classification using retrotransposon-based markers in the Orphan Crop Banana. J. of Plant Biology, 2005, 48: 96-105.
- Kalendar R., Grob T., Regina M. et al. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. Theor. Appl. Genet., 1999, 98: 704-711.
- Дрибноходова О.П., Кокаева З.Г., Гостимский С.А. Идентификация сортов, линий и мутантов гороха посевного с помощью RAPD-маркеров. С.-х. биол., 2005, 5: 61-66.
- Torges A.M., Weeden N.F., Martin A. Linkage among sozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. Theor. Appl. Genet., 1993, 5: P.937-945.
- Pearce S.R., Stuart-Rogers C., Knox M.R. et al. Rapid isolation of plant Ty1-copia group retrotransposon LTR sequences for molecular marker studies. The Plant Journal, 1999, 19: 711-717.
- Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, 76: 5269-5273.
- Vandepeer Y. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Mi-

crosoft Windows environment. Computer Application in the Biosciences, 1994, 10, 5: 569-570.
14. F e l s e n s t e i n J. Confidence limits in phylogenies: an approach using bootstrap. Evolution, 1985, 39, 4: 783-791.

*Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова,
119899 г. Москва, Воробьевы горы,
e-mail: phlora@list.ru*

*Поступила в редакцию
15 мая 2006 года*

ESTIMATION OF GENETIC POLYMORPHISM IN CULTIVARS, LINES AND MUTANTS OF GARDEN PEA (*Pisum sativum* L.) USING DNA-MARKERS ON THE BASIS OF RETROTRANSPOSONS

Z.G. Kokaeva, S.A. Gostimskii

S u m m a r y

IRAP-method was used for study of insertional polymorphism of Ty1-*copia* retrotransposons in 16 cultivars, lines and mutants of garden pea (*Pisum sativum* L.). 10 combinations of primers distinguishing polymorphism in analyzed lines were designed. 72 polymorphic markers were found. Using IRAP-analysis genetic distances were counted and comparative dendrogramm reflexing genetic similarity and relationship between samples analyzed. Individual IRAP-spectrums were analyzed for every cultivar and line; some cultivar-specific fragments suitable for identification and marking of analyzed forms were found. Usage of IRAP-analysis for such purposes in pea cultivars and lines was shown may be prospective.