

© В. Е. Цыганов¹,
С. М. Розов², М. Нокс³,
А. Ю. Борисов¹, Т. Г. Н. Эллис^{3,5},
И. А. Тихонович^{1,4}

¹ ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии; ² Институт цитологии и генетики СО РАН; ³ John Innes Centre, Norwich Research Park; ⁴ Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и селекции; ⁵ Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences, Aberystwyth University

✿ Проведен анализ совместного наследования симбиотического локуса *sym31* и 12 молекулярных и морфологических маркеров III группы сцепления гороха. Показано сцепление симбиотического локуса *sym31* с 11 проанализированными маркерами. С использованием компьютерной программы AntMap была построена подробная генетическая карта района локализации локуса *sym31* и определено его точное положение в III группе сцепления гороха.

✿ **Ключевые слова:** локализация генов; симбиотические гены; геномная синтения; SSAP-анализ; молекулярные маркеры.

ТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЛОКУСА *SYM31* В III ГРУППЕ СЦЕПЛЕНИЯ ГОРОХА

ВВЕДЕНИЕ

С использованием методов классического генетического анализа у гороха посевного было выявлено более 40 генов, контролирующих развитие симбиотических клубеньков (Борисов и др., 1998). С конца 1990-х годов исследования по выявлению симбиотических генов бобовых вступили в новую стадию, когда стало возможным идентифицировать их нуклеотидные последовательности (Schäuser et al., 1999). Данный успех стал возможен благодаря активному использованию двух модельных бобовых: *Lotus japonicus* ((Regel.) K. Larsen) и диплоидной люцерны (*Medicago truncatula* Gaertn.), характеризующихся небольшими размерами геномов и хорошо разработанными протоколами трансформации (Stougaard, 2001). В результате за прошедшее десятилетие с использованием анализа геномной синтении были выявлены серии ортологичных симбиотических генов у ряда бобовых культур (Kouchi et al., 2010). У гороха посевного были определены нуклеотидные последовательности симбиотических генов *sym7* (Dolgikh et al., 2011), *sym8* (Edwards et al., 2007), *sym9* (Lévy et al., 2004), *sym10* (Zhukov et al., 2008), *sym19* (Endre et al., 2002), *sym28* (Kruse et al., 2011), *sym29* (Kruse et al., 2002), *sym33* (Ovchinnikova et al., 2011), *sym35* (Borisov et al., 2003) и *sym37* (Zhukov et al., 2008). Тем не менее, у гороха не всегда оказывается возможным клонировать ген по гомологии с модельными бобовыми, т.к. у него известен ряд мутантов с фенотипическими проявлениями, не выявленными у модельных бобовых. Таким образом, идентификация нуклеотидных последовательностей уникальных для гороха мутаций возможна лишь с помощью позиционного клонирования. Одним из таких мутантов является линия гороха Sprint-2-Fix⁻, формирующая на корнях белые неэффективные клубеньки, полученная после ЭМС-мутагенеза (Borisov et al., 1992). Генетический анализ показал, что мутация произошла в неизвестном ранее локусе, обозначенном как *sym31* (Borisov et al., 1997), а ультраструктурный анализ выявил, что данный ген гороха контролирует дифференциацию бактерий *Rhizobium* в эндоклеточные бактериоиды (Borisov et al., 1992, 1997). Работы по локализации данного локуса на генетической карте гороха с использованием морфологических маркеров позволили поместить его в III группу сцепления гороха (Rozov et al., 1993, 1994), однако точное его местоположение оставалось неизвестным (Rozov et al., 1999), несмотря на попытку использования в анализе молекулярных маркеров (Men et al., 1999).

Как уже отмечалось выше, в настоящее время активно развиваются молекулярно-генетические исследования модельного бобового *M. truncatula*, сейчас геном этого растения практически полностью секвенирован (Cannon et al., 2009). Следует отметить, что *M. truncatula* и *Pisum sativum* характеризуются очень высокой степенью синтении геномов (Kalo et al., 2004), что позволяет разрабатывать молекулярные маркеры для гороха на основе последовательностей известных генов у *M. truncatula*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал

В скрещиваниях были использованы рекомбинантные линии 23-1-1-1, 42-1, 25-1-1, 56-3-4 с генотипом *a2-uni^{lac}-sym31-st*, отоб-

Поступила в редакцию 14.11.2011
Принята к публикации 27.01.2012

Таблица 1

Маркеры, основанные на аллель-специфичной ПЦР

маркер	Праймеры (прямой и обратный) 5' 3'	Температура отжига, °С	Продукт, кодируемый соответствующим геном по: http://www.ncbi.nlm.nih.gov	Источник последовательности
<i>mtmt_GEN_00097_03_1</i>	CCCATATGTCCACCACCTTC ATCCACATGCTGATTTTCCC	61	EST638430 MTUS <i>Medicago truncatula</i> cDNA clone MTUS 31E4, mRNA sequence	CA920712
<i>Max4 (Rms1)</i>	CAAGAAAGATGGGAAGGAG TGTCCATCCTCAAAGTGAAG	57	<i>Pisum sativum</i> cultivar Terese dioxygenase RAMOSUS1 (RMS1) gene, complete cds	AY557341
<i>psmt_EST_00197_01_1</i>	AAGTGAAGGGCAGGGAAGT GCAGTGTCTCGTCATCAGA	60	<i>Pisum sativum</i> cDNA clone WP009C09	CD861247
<i>SN4TDR</i>	TGTGATTATCACTTTCTTTC CACCTCCCAAGACATCTGTA	54	<i>Pisum sativum</i> SN4TDR mRNA for 110 kDa 4SNc Tudor domain protein	AB078603
<i>calnexin</i>	AGGAAATACAAATTCTTCTGA TACAATAATCTTCTCTTTTG	54	<i>Pisum sativum</i> mRNA for calnexin	Y17329
<i>polyaden</i>	ACTTCTTTGTGCCCATGATG AGACCTGTTGCTGCATCATT	60	<i>Pisum sativum</i> J115 polyA binding protein gene	EU271219
<i>G protein</i>	GGTGGATTTACTGGCAGCA GAGTTCATTACCACGGGCAT	60	<i>Pisum sativum</i> pectin methylesterase (rcpme1) gene, complete cds	AF081457

Таблица 2

Анализ расщепления по фенотипу растений поколения F₂ от скрещивания рекомбинантной линии 23-1-1-1 *a2-uni^{lac}-sym31-st* и линии J115

Пары маркеров	Численность фенотипических классов							Расстояние, сМ ± ст. ошибка	Объединенный χ^2	P _{9:3:3:1}
	AB	Ah	Ab	aB	ah	ab	Всего			
<i>sym31-uni^{lac}</i>	55		1	0		13	69	1,58 ± 1,51	62,93	0,0001
<i>sym31-a2</i>	53		3	2		11	69	8,22 ± 3,48	40,98	0,0001
<i>sym31-st</i>	52		4	7		6	69	20,90 ± 5,62	12,96	0,0005
<i>sym31-Mtnt_GEN_00097_03_1</i>	43		22	12		1	68	22,77 ± 11,30	4,74	0,05
<i>sym31-Max4 (Rms1)</i>	52		4	4		9	69	13,83 ± 4,54	26,60	0,0001
<i>sym31-Tps1/64+</i>	50		6	4		8	68	17,96 ± 5,23	18,92	0,0001
<i>sym31-Tps1/70+</i>	52		4	4		9	69	13,83 ± 4,54	26,60	0,0001
<i>sym31-psmt_EST_00197_01_1</i>	17	35	1	0	0	13	66	1,62 ± 1,56	60,13	0,0001
<i>sym31-SN4TDR</i>	55		1	0		13	69	1,58 ± 1,51	62,93	0,0001
<i>sym31-calnexin</i>	55		1	0		13	69	1,58 ± 1,51	62,93	0,0001
<i>sym31-polyaden</i>	53		3	3		10	69	10,11 ± 3,86	35,34	0,0001
<i>sym31-G-protein</i>	50		6	3		10	69	15,09 ± 4,75	25,97	0,0001

А,а — первый ген, В,в — второй ген, Н — гетерозигота. Если оба гена доминантны, заглавные буквы обозначают доминантные аллели. Если второй ген является кодоминантным, заглавная А обозначает доминантную аллель первого гена, заглавная В обозначает в этом случае аллель второго гена, который находится в фазе притяжения с А. Если оба гена кодоминантны, заглавной буквой обозначена аллель первого родителя

ранные в ходе ранее проведенных экспериментов по локализации симбиотического локуса *sym31* относительно морфологических маркеров (Rozov et al., 1993, 1994), и генетическая линии J115 (Hall et al., 1997) из коллекции Центра Джона Иннеса (Норвич, Великобритания).

Выделение ДНК

Выделение ДНК проводили с использованием DNeasy 96 Plant Kit согласно протоколу фирмы производителя (Qiagen, Германия).

SSAP

Для локализации были использованы SSAP (sequence specific amplified polymorphism) маркеры (Schulman et al., 2004). Методика проведения SSAP-анализа детально описана нами ранее (Цыганов и др., 2012). В потомстве от скрещиваний рекомбинантов *a2-uni^{lac}-sym31-st* и линии J115 для локализации симбиотического гена *sym31* можно было использовать 2 молекулярных маркера: *Tps1/64+* и *Tps1/70+*.

ПЦР-маркеры, основанные на последовательностях известных генов

В данное исследование были включены два маркера, полученные в ходе реализации проекта «The Grain Legumes Integrated Project» (<http://www.pcg.in.org/GLIP/GLIP.htm>): *mtmt_GEN_00097_03_1* и *psmt_EST_00197_01_1* (любезно предоставлены Георгием Кишем — Институт генетики, Биологический научный центр, Сегед, Венгрия). Для второго маркера наблюдалась разница по электрофоретической подвижности амплифицируемых фрагментов, что позволило проанализировать данный маркер как кодоминантный (табл. 1). Остальные аллель-специфичные маркеры были разработаны на основе последовательностей известных генов гороха так, чтобы продукт амплифицировался у линии J115, что позволило проанализировать данные маркеры и симбиотический локус *sym31* в фазе сцепления (табл. 1). Секвенирование аллелей исследуемых генов для разработки аллель-специфичных маркеров проводилось с использованием автоматического секвенатора CEQ 8000 (Beckman Coulter, США).

ПЦР

ПЦР проводилась с использованием амплификатора PTC 200 Thermo Cycler (MJ Research, США). Реакционная смесь содержала 2,5 мМ $MgCl_2$, 0,125 мМ каждого из дезоксирибонуклеотидов, 1 единицу Taq полимеразы (Invitrogen, США) и 0,5 мкМ прямого и обратного праймеров. Объем реакционной смеси составлял 20 мкл. Условия проведения ПЦР (оптимизировались для каждой пары используемых праймеров): начальная денатурация ДНК (94 °C — 5 мин), 30 циклов амплификации: денатурация (94 °C — 30 с), отжиг праймеров (температура отжига праймеров подбиралась на основе свойств пары конкретных олигонуклеотидов в программе Primer Select и варьировала в пре-

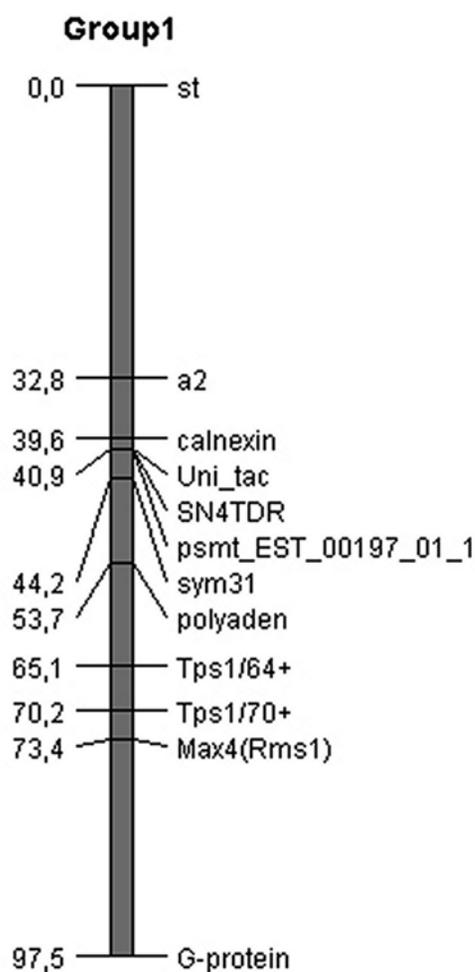


Рис 1. Генетическая карта района локализации симбиотического локуса *sym31*.

делах 54–60 °C — 30 с), синтез ДНК (72 °C — 40 с), окончание синтеза ДНК (72 °C — 10 мин).

Фрагменты амплификации и продукты рестрикции разделяли электрофоретически в 1,5 %-м агарозном геле в 0,5-кратном трис-ацетатном буфере и регистрировали с помощью системы Gell Doc XR System (BioRad, США).

Анализ совместного наследования

Анализ расщепления в F_2 по локусу *sym31* и использованных маркеров проводили с помощью компьютерной программы PLANT (С. М. Розов, Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск). Построение генетической карты района локализации симбиотического локуса *sym31* проводили с помощью программы AntMap (Iwata, Ninomiya, 2006).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Рекомбинантные линии с генотипом *a2-uni^{lac}-sym31-st*, отобранные в предыдущем гибридо-

Таблица 3

Анализ расщепления по фенотипу растений поколения F_2 от скрещивания рекомбинантной линии 25-1-1 $a2-uni^{lac}-sym31-st$ и линии J115

Пары маркеров	Численность фенотипических классов							Расстояние, сМ \pm ст. ошибка	Объединенный χ^2	$P_{9:3:1}$
	AB	Ah	Ab	aB	ah	ab	Всего			
<i>sym31-uni^{lac}</i>	31		0	1		15	47	1,94 \pm 2,03	42,69	0,0001
<i>sym31-a2</i>	23		1	2		9	45	8,32 \pm 4,91	22,29	0,0001
<i>sym31-st</i>	26		5	9		7	47	32,30 \pm 8,59	4,23	0,05
<i>sym31-Mtnt_GEN_00097_03_1</i>	24		7	15		1	47	28,40 \pm 13,24	1,99	0,2
<i>sym31-Max4(Rms1)</i>	27		4	4		12	47	16,09 \pm 5,94	18,12	0,0001
<i>sym31-Tps1/64+</i>	27		4	3		13	47	13,76 \pm 5,48	21,35	0,0001
<i>sym31-Tps1/70+</i>	28		3	3		13	47	11,89 \pm 5,09	24,08	0,0001
<i>sym31-psmt_EST_00197_01_1</i>	10	20	0	1	1	14	46	5,92 \pm 3,57	37,79	0,0001
<i>sym31-SN4TDR</i>	31		0		3	13	47	6,07 \pm 3,61	34,82	0,0001
<i>sym31-calnexin</i>	31		0		3	13	47	6,07 \pm 3,61	34,82	0,0001

A,a — первый ген, B,b — второй ген, H — гетерозигота. Если оба гена доминантны, заглавные буквы обозначают доминантные аллели. Если второй ген является кодоминантным, заглавная A обозначает доминантную аллель первого гена, заглавная B обозначает в этом случае аллель второго гена, который находится в фазе притяжения с A. Если оба гена кодоминантны, заглавной буквой обозначена аллель первого родителя

Таблица 4

Анализ расщепления по фенотипу растений поколения F_2 от скрещивания рекомбинантной линии 56-3-4 $a2-uni^{lac}-sym31-st$ и линии J115

Пары маркеров	Численность фенотипических классов							Расстояние, сМ \pm ст. ошибка	Объединенный χ^2	$P_{9:3:1}$
	AB	Ah	Ab	aB	ah	ab	Всего			
<i>sym31-uni^{lac}</i>	35		0	4		9	48	9,01 \pm 4,37	29,82	0,0001
<i>sym31-a2</i>	25		3	3		5	36	19,39 \pm 7,49	9,65	0,005
<i>sym31-st</i>	21		14	9		4	48	54,64 \pm 11,37	0,34	0,6
<i>sym31-Mtnt_GEN_00097_03_1</i>	29		6	11		2	48	47,41 \pm 11,13	0,02	0,9
<i>sym31-Max4(Rms1)</i>	30		5	5		8	48	22,63 \pm 7,03	10,72	0,005
<i>sym31-psmt_EST_00197_01_1</i>	10	25	0	2	2	19	69	12,91 \pm 5,13	30,12	0,0001
<i>sym31-SN4TDR</i>	35		0	4		9	48	9,01 \pm 4,37	29,82	0,0001
<i>sym31-calnexin</i>	35		0	4		9	48	9,01 \pm 4,37	29,82	0,0001
<i>sym31-polyaden</i>	34		1	3		10	48	8,71 \pm 4,30	29,44	0,0001
<i>sym31-G-protein</i>	33		2	4		9	48	13,40 \pm 5,35	21,65	0,0001

A,a — первый ген, B,b — второй ген. Если оба гена доминантны, заглавные буквы обозначают доминантные аллели. Если второй ген является кодоминантным, заглавная A обозначает доминантную аллель первого гена, заглавная B обозначает в этом случае аллель второго гена, который находится в фазе притяжения с A. Если оба гена кодоминантны, заглавной буквой обозначена аллель первого родителя

гическом анализе, были скрещены с линией J115. В результате было получено 4 популяции растений F_2 . Для линии J115 был описан целый ряд SSAP маркеров, насыщающих генетическую карту гороха. Анализ расщепления в F_2 после скрещивания рекомбинантных линий 23-1-1-1, 42-1, 25-1-1, 56-3-4 с генотипом $a2-uni^{lac}-sym31-st$ и генетической линии J115 выявил сцепление локуса *sym31* с большинством из SSAP, ПЦР и морфологических маркеров (табл. 2-5). Тем не менее, в разных популяциях величины сцепления несколько различались.

С использованием компьютерной программы AntMap (Iwata, Ninomiya, 2006) на основе полученных данных была построена генетическая карта района III группы сцепления гороха, содержащего симбиотический локус *sym31*. Карта построена с использованием методов ближайших соседей (nearest neighboring locus) и минимальной доли смежных рекомбинантов (sum of adjacent recombination fractions) (Lui, 1998).

В целом, исследованный район составляет значительную часть III группы сцепления гороха — более 100 сМ, но основная масса проанализированных мар-

Таблица 5

Анализ расщепления по фенотипу растений поколения F2 от скрещивания рекомбинантной линии 42-1 *a2-uni^{lac}-sym31-st* и линии J115

Пары маркеров	Численность фенотипических классов					Расстояние, сМ ± ст. ошибка	Объединенный χ^2	P _{9:3:3:1}
	AB	Ab	aB	ab	Всего			
<i>sym31-uni^{lac}</i>	35	0	2	11	48	4,26 ± 3,00	38,42	0,0001
<i>sym31-a2</i>	34	0	1	11	46	2,20 ± 2,19	40,96	0,0001
<i>sym31-st</i>	32	3	7	6	48	24,74 ± 7,37	8,79	0,0005
<i>sym31-Mntn_GEN_00097_03_1</i>	23	12	12	1	48	26,13 ± 13,29	3,40	0,1
<i>sym31-psmt_EST_00197_01_1</i>	35	0	2	11	48	4,26 ± 3,00	38,42	0,0001
<i>sym31-SN4TDR</i>	33	0	0	13	46	0	46	0,0001
<i>sym31-calnexin</i>	35	0	2	11	48	4,26 ± 3,00	38,42	0,0001
<i>sym31 polyaden</i>	32	1	2	11	46	6,54 ± 3,79	32,19	0,0001

А,а — первый ген, В,в — второй ген. Если оба гена доминантны, заглавные буквы обозначают доминантные аллели. Если второй ген является кодоминантным, заглавная А обозначает доминантную аллель первого гена, заглавная В обозначает в этом случае аллель второго гена, который находится в фазе притяжения с А. Если оба гена кодоминантны, заглавной буквой обозначена аллель первого родителя.

ков сосредоточена в гораздо более узкой области — менее 40 сМ (рис. 1). Как видно из построенной карты, с одной стороны локус *sym31* ограничен 2 морфологическими (*a2*, *Uni^{lac}*) и 3 молекулярными маркерами (*calnexin*, *SN4TDR*, *psmt_EST_00197_01_1*), причем *calnexin* отделяет от *sym31* 4,5 единицы карты, а маркеры *psmt_EST_00197_01_1*, *SN4TDR* и ген *Uni^{lac}* находятся от него на расстоянии всего 3,2 сМ. С другой стороны локус *sym31* фланкируется только молекулярными маркерами *polyaden*, *Tps/64+ u* *Tps/70+*, причем ближайший к нему — *polyaden* — расположен на расстоянии 8,7 сМ.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов было значительно уточнено строение района III группы сцепления гороха, содержащего симбиотический ген *sym31* и определено его точное расположение относительно 8 молекулярных и 3 морфологических маркеров, также позиционированных в этом районе.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Принадлежность локуса *sym31* к III группе сцепления гороха была установлена еще в 90-х годах прошлого века с использованием морфологических маркеров (Rozov et al., 1993, 1994), но морфологические маркеры давали только приблизительную картину строения этого района. В ходе проведенных исследований были отобраны рекомбинантные линии, несущие в гомозиготе несколько морфологических мутаций и мутантную аллель гена *sym31*. Данные рекомбинанты были скрещены с линией J115, которая использовалась ранее в серии скрещиваний, и для которой был разработан широкий набор SSAP-маркеров.

В ходе проведенного анализа было выявлено сцепление локуса *sym31* с SSAP-маркерами *Tps1/64+и*

Tps1/70+ (табл. 2, 3). Величина сцепления оказалась больше 10 сМ. Ранее метод SSAP-анализа был успешно использован нами для первичной локализации мутации *cdt* в VI группе сцепления (Цыганов и др., 2012), в то же время, вероятно, для точной локализации генов данный метод не всегда приемлем, поскольку не каждый район генетической карты гороха насыщен SSAP-маркерами, как это было показано в данном исследовании.

Достижения в изучении генома *M. truncatula* позволили использовать последовательности известных генов диплоидной люцерны для поиска гомологичных генов у гороха и разработки на их основе ПЦР-аллель-специфичных молекулярных маркеров. Были найдены 3 молекулярных и 1 морфологический маркер, фланкирующие локус *sym31* с одного конца на расстоянии 3–4 сМ от него. С другой стороны ближайший маркер фланкирует ген *sym31* на расстоянии приблизительно 8–10 сМ.

Таким образом, в данной работе симбиотический локус *sym31* был локализован относительно серии морфологических и молекулярных маркеров. Тем не менее, очевидно, что необходимо продолжение исследований для выявления более близко расположенных маркеров для создания условий для позиционного клонирования этого симбиотического гена.

Благодарности:

Данная работа была финансово поддержана ОНТП Россельхозакадемии, Министерством образования и науки (государственные контракты № 16.552.11.7047, П1301) и грантом Президента России (НШ–3440.2010.4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисов А. Ю., Проворов Н. А., Тихонович И. А., Цыганов В. Е., 1998. Генетический контроль взаи-

- модействия бобовых растений с клубеньковыми бактериями // Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции / Под ред. Тихоновича И. А. и Проворова Н. А. Санкт Петербург: Наука. С. 8–62.
2. Цыганов В. Е., Кулаева О. А., Нокс М., и др., 2012. Использование SSAP анализа для первичной локализации мутации *cdt* (cadmium tolerance) в VI группе сцепления гороха // Экол. генетика. Т. X, N1. С.42–46.
 3. Borisov A. Y., Morzhina E. V., Kulikova O. A. et al., 1992. New symbiotic mutants of pea (*Pisum sativum* L.) affecting either nodule initiation or symbiosome development // Symbiosis. Vol. 14. P. 297–313.
 4. Borisov A. Y., Rozov S. M., Tsyganov V. E. et al., 1997. Sequential functioning of *Sym-13* and *Sym-31*, two genes affecting symbiosome development in root nodules of pea (*Pisum sativum* L.) // Mol. Gen. Genet. Vol. 254. P. 592–598.
 5. Borisov A. Y., Madsen L. H., Tsyganov V. E., et al., 2003. The *Sym35* gene required for root nodule development in *Pisum sativum* is an orthologue of *Nin* from *Lotus japonicus* // Plant Physiol. Vol. 131. P. 1009–1017.
 6. Cannon S. B., May G. D., Jackson S. A., 2009. Three sequenced legume genomes and many crop species: rich opportunities for translational genomics // Plant Physiol. Vol. 151. P. 970–977.
 7. Dolgikh E. A., Leppyanen I. V., Osipova M. A., et al., 2011. Genetic dissection of *Rhizobium* induced infection and nodule organogenesis in pea based on *Enod12a* and *Enod5* expression analysis // Plant Biol. Vol. 13. P. 285–296
 8. Hall K. J., Parker J. S., Ellis T. H. N. et al., 1997. The relationship between genetic and cytogenetic maps of pea. II. Physical maps of linkage mapping populations // Genome. Vol. 40. P. 755–769.
 9. Endre G., Kereszt A., Kevei Z. et al., 2002. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development // Nature. Vol. 417. P. 962–966.
 10. Edwards A., Heckmann A. B., Yousafzai F. et al., 2007. Structural implications of mutations in the pea *SYM8* symbiosis gene, the *DM11* ortholog, encoding a predicted ion channel // Mol. Plant–Microbe Interact. Vol. 20. P. 1183–1191.
 11. Iwata H., Ninomiya S., 2006. AntMap: Constructing genetic linkage maps using an ant colony optimization algorithm // Breed. Sci. Vol. 56. P.371–377.
 12. Kaló P., Seres A., Taylor S. A., 2004. Comparative mapping between *Medicago sativa* and *Pisum sativum* // Mol. Gen. Genomics. Vol. 272. P. 235–246.
 13. Kouchi H., Imaizumi–Anraku H., Hayashi M. et al., 2010. How many peas in pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground // Plant Cell Physiol. Vol. 51. P. 1381–1397.
 14. Krusell L., Madsen L. H., Sato S. et al., 2002. Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor like kinase // Nature. Vol. 420. P. 422–426.
 15. Krusell L., Sato N., Fukuhara I. et al., 2011. The *Clavata2* genes of pea and *Lotus japonicus* affect autoregulation of nodulation // Plant J. Vol. 65. P. 861–871.
 16. Lévy J., Bres C., Geurts R. et al., 2004. A putative Ca²⁺ and calmodulin dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses // Science. Vol. 303. P. 1361–1367.
 17. Liu B. H., 1998. Statistical Genomics: Linkage, Mapping, and QTL Analysis. New York: CRC Press. 614 pp.
 18. Men A. E., Borisov A. Y., Rozov S. M. et al., 1999. Identification of DNA amplification fingerprinting (DAF) markers close to the symbiosis ineffective *sym31* mutation of pea (*Pisum sativum* L.) // Theor. Appl. Genet. Vol. 98 P. 929–936.
 19. Ovchinnikova E., Journet E. P., Chabaud M. et al., 2011. IPD3 controls the formation of nitrogen fixing symbiosomes in pea and *Medicago* Spp // Mol. Plant–Microbe Interact. Vol. 24. P. 1333–1344.
 20. Rozov S. M., Borisov A. Y., Tsyganov V. E., Tikhonovich I. A., 1993. A new Fix⁻ mutation in pea shows linkage with group 3 marker M // Pisum Genet. Vol. 25. P. 45.
 21. Rozov S. M., Borisov A. Y., Tsyganov V. E., 1994. Further evidence that the new Fix gene refers to pea linkage group 3 // Pisum Genet. Vol. 26. P. 24–25.
 22. Rozov S. M., Borisov A. Y., Tsyganov V. E., Kosterin O. E., 1999 The history of the pea gene map: last revolutions and the new symbiotic genes // Pisum Genet. Vol. 31. P. 55–57.
 23. Schauser L., Roussis A., Stiller J., Stougaard J., 1999. A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules // Nature. Vol. 402. P. 191–195.
 24. Schulman A. H., Flavell A. J., Ellis T. H., 2004, The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants // Meth. Mol. Biol. Vol. 260. P. 145–173.
 25. Stougaard J., 2001. Genetics and genomics of root symbiosis // Curr. Opin. Plant Biol. Vol. 4. P. 328–335.
 26. Zhukov V. A., Radutoiu S., Madsen L. H. et al., 2008, The pea *Sym37* receptor kinase gene controls infection thread initiation and nodule development // Mol. Plant–Microbe Interact. Vol. 21. P. 1600–1608.

FINE LOCALIZATION OF THE *SYM31* LOCUS IN PEA LINKAGE GROUP III

Tsyganov V. E., Rozov S. M., Knox M., Borisov A. Yu., Ellis T. H. N., Tikhonovich I. A.

✿ **SUMMARY:** Analysis of joint inheritance of symbiotic locus *sym31* and 12 molecular and morphological markers of pea linkage group III was performed. The linkage between symbiotic locus *sym31* and 11 analyzed markers was observed. Using the AntMap software, a detailed genetic map of the *sym31* locus was constructed and its fine position in linkage group III was determined.

✿ **KEY WORDS:** gene localization; symbiotic genes; genome synteny; SSAP analysis; molecular markers.

✿ Информация об авторах

Цыганов Виктор Евгеньевич — заведующий лабораторией, кандидат биологических наук. Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии. Лаборатория молекулярной и клеточной биологии. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, д. 3. E-mail: tsyganov@arriam.spb.ru.

Розов Сергей Михайлович — старший научный сотрудник, кандидат биологических наук. Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН. Лаборатория биоинженерии растений. 630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10. E-mail: rozov@bionet.nsc.ru.

Маги Нокс — исследователь. Центр Джона Иннеса, Исследовательский парк Норвича, Колни, Норвич NR4 7UH, Великобритания. E-mail: maggie.knox@bbsrc.ac.uk.

Борисов Алексей Юрьевич — заведующий лабораторией, доктор биологических наук. Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии. Лаборатория генетики растительно-микробных взаимодействий. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, д. 3. E-mail: ayborisov@yandex.ru.

Томас Генри Ноел Эллис — профессор. Институт биологии и проблем окружающей среды, Университет Аберистута, Гогерддан кампус, Аберистут, Кередигон, SY23 3EB, Великобритания. E-mail: noe2@aber.ac.uk.

Тихонович Игорь Анатольевич — директор, профессор, доктор биологических наук, академик Россельхозакадемии. Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, д. 3. E-mail: arriam@arriam.spb.ru, contact@arriam.spb.ru.

Tsyganov Viktor Evgenevich — Head of the laboratory. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology RAAS. Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Podbelsky chausse 3, Saint-Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia. E-mail: tsyganov@arriam.spb.ru.

Rozov Sergei Mikhailovich — Senior Scientist. Institute of Cytology and Genetics, The Siberian Division of RAS. Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Siberian department. Laboratory of Plant Bioengineering. Lavrentjev avenue, 10, Novosibirsk, 630090, Russia. E-mail: rozov@bionet.nsc.ru.

Maggie Knox — Scientific Researcher. John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UH, UK. E-mail: maggie.knox@bbsrc.ac.uk.

Borisov Aleksei Yurievich — Head of the Laboratory. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology RAAS. Laboratory of Genetics of Plant-Microbe Interactions. Podbelsky chausse 3, Saint-Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia. E-mail: ayborisov@yandex.ru.

Thomas Henry Noel Ellis — Professor. Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences, Aberystwyth University, Gogerddan Campus, Aberystwyth, Ceredigion, SY23 3EB, UK. E-mail: noe2@aber.ac.uk.

Tikhonovich Igor Anatolievich — Director, Professor, Full Member of RAAS. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology. Podbelsky chausse 3, Saint-Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia. E-mail: arriam@arriam.spb.ru, contact@arriam.spb.ru.