



ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ И ГЕНЕТИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ФАКТОРЫ СРЕДЫ

© О. А. Кулаева, В. Е. Цыганов

УДК 575.1/.2:574.2

ГНУ Всероссийский научно — исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии, лаборатория молекулярной и клеточной биологии

✿ У гороха посевного описан мутант *SGECd^t* (*cdt*), характеризующийся повышенным уровнем накопления кадмия и устойчивостью к данному тяжелому металлу, по сравнению с исходной линией. Проведенный ранее *SSAP* анализ позволил локализовать локус *cdt* в VI группе сцепления гороха. Для более подробного картирования локуса *cdt* были разработаны молекулярные маркеры, основанные на известных последовательностях генов гороха, выявленных с помощью анализа геномной микросателлитности между горохом посевным и модельным бобовым *Medicago truncatula*. Было выявлено тесное сцепление локуса *cdt* и маркеров, разработанных на основе генов *Pentatricopeptide repeat* и *Exosome complex exonuclease RRP45*. Таким образом, были созданы условия для дальнейшего позиционного клонирования гена *cdt*.

✿ **Ключевые слова:** генетический анализ устойчивости к кадмию; локализация генов; SNP (Single Nucleotide Polymorphism) маркеры; CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) маркеры; *Pisum sativum* L.

ТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ МУТАЦИИ ПО ЛОКУСУ *CDT*, ПРИВОДЯЩЕЙ К ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ГОРОХА (*PISUM SATIVUM* L.) К КАДМИЮ

ВВЕДЕНИЕ

Кадмий является одним из наиболее токсичных тяжелых металлов. Соли кадмия хорошо растворяются в воде и могут быть легко поглощены растениями. Передача кадмия по пищевым цепям вызывает серьезные нарушения у многих живых организмов (Sanita di Toppi, Gabbrielli, 1999), поэтому исследование механизмов устойчивости к кадмию является крайне актуальной задачей. Для выявления системы генетического контроля аккумуляции и устойчивости растений к тяжелым металлам используются два подхода: анализ варьирования данных признаков в природных популяциях и экспериментальный мутагенез (Кулаева, Цыганов, 2010).

Генетический анализ популяций ряда высших растений выявил широкий полиморфизм по признакам устойчивости к кадмию и его аккумуляции (Кулаева, Цыганов, 2010).

К настоящему времени описано несколько мутантов с измененной чувствительностью или аккумуляцией тяжелых металлов (Кулаева, Цыганов, 2010). У *Arabidopsis thaliana* выявлено два мутанта чувствительных к кадмию: *cad1* и *cad2*, мутантный фенотип которых возникает вследствие нарушений в работе фитохелатинсинтазы (Howden et al., 1995, Ha et al., 1999) и γ -глутамилцистеинсинтазы (Cobbett et al., 1998). Данные ферменты играют ключевую роль в синтезе фитохелатинов и, соответственно, в процессах детоксикации кадмия в растительной клетке. Корневая система мутанта *A. thaliana* MRC-22 также является чувствительной к действию кадмия (Watanabe et al., 2010). Лишь совсем недавно получены мутанты *A. thaliana*, устойчивые к кадмию (Watanabe et al., 2010). У мутанта *cdr3-1D* показано сниженное содержание кадмия в тканях, вследствие усиленной работы переносчика *AtPDR8/AtPDR12*, переносящего кадмий из вакуоли. У мутанта MRC-26 наблюдается сниженное содержание кадмия в побеговой части, вследствие нарушенного транспорта кадмия из корней в побег. Предполагается, что устойчивость мутанта MRC-32 связана с измененным содержанием фитохелатинов. К настоящему моменту природа данных мутаций не выявлена (Watanabe et al., 2010).

Ранее нами был описан новый мутант гороха, полученный после ЭМС-мутагенеза линии SGE, характеризующийся повышенным накоплением кадмия в биомассе растений и устойчивостью к токсичным концентрациям кадмия (Tsyganov et al., 2007). Мутация *SGECd^t* характеризуется моногенным рецессивным характером наследования. Биохимический анализ маркеров стресса ((хитиназа, пероксидаза и пролин) (Sharma, Dietz, 2006, Graham, Sticklen, 1993)) показал, что у данного мутанта снижен уровень стрессового ответа на действие кадмия (Tsyganov et al., 2007). Выявлено, что устойчивость мутанта *SGECd^t* к кадмию не связана с процессами синтеза глутатиона и работой фитохелатинсинтазы. Таким образом, этот мутант аккумулирует кадмий, является устойчивым к его токсическому действию и представляет собой новую и уникальную модель для изучения адаптации

Поступила в редакцию 14.11.2011.
Принята к публикации 10.02.2012

растений к токсическим концентрациям тяжелых металлов (Tsyganov et al., 2007). Мутация *cdt* была локализована нами в VI группе сцепления гороха (Цыганов и др., 2012). В данном исследовании нами проведена точная локализация мутации по локусу *cdt* на генетической карте гороха.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Растительный материал

В работе были использованы мутант гороха посевного SGECD¹ из коллекции ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии (Tsyganov et al., 2007) и линия J1281 из коллекции Центра Джона Иннеса (Норвич, Великобритания).

Условия вегетации растений

Для проведения анализа признака устойчивости к кадмию растения выращивались в режиме чередования день/ночь 16/8 ч, при температуре 21 °С, относительной влажности 75 % и освещенности 38 тыс. люкс в условиях гидропоники с аэрацией. Перед посадкой семена стерилизовали концентрированной серной кислотой в течение 30 мин, затем промывали дистиллированной водой 6 раз.

Раствор хлорида кадмия определенной концентрации (12 мкМ CdCl₂) добавляли в сосуды с питательной средой (Tsyganov et al., 2007) к пятидневным проросткам гороха.

Гибридологический анализ

Для картирования локуса *cdt* линия гороха J1281 была скрещена с мутантной линией SGECD¹. Чистоту скрещиваний в поколении F₁ контролировали с использованием разработанных молекулярных маркеров. Соответствие реальных расщеплений теоретическим в поколении F₂ рассчитывали с помощью критерия χ².

Анализ совместного наследования локуса *cdt* и молекулярных маркеров был проведен с использованием компьютерной программы PLANT (С. М. Розов, Институт цитологии и генетики СО РАН). Построение генетической карты района локализации локуса *cdt* проводили с помощью программы AntMap (Iwata, Ninomiya, 2006).

Были проанализированы две независимые популяции F₂. Анализ поколения F₂ представляет собой определенную сложность, так как велика вероятность получения недостоверных результатов, связанная с неравномерным прорастанием семян, и, как следствие, проявление различий в развитии проростков, что может влиять на их устойчивость к кадмию. Таким образом, в начале исследований, расщепление по признаку устойчивости к кадмию было проанализировано в поколении F₃. После подбора условий эксперимента, позволяющих нивелировать вышеописанные сложности, расщепление по признаку устойчивости к кадмию во второй популяции было проанализировано в поколении F₂. Расщепление по молекулярным маркерам было проанализировано

в поколении F₂ для обеих популяций. Расщепление по признаку устойчивости к кадмию проводилось в условиях гидропоники с аэрацией с использованием 12 мкМ хлорида кадмия.

Дизайн молекулярных маркеров и условия ПЦР

Геномная ДНК была выделена из 30 мг свежих листьев с использованием стандартной методики (Dellaporta, Wood, 1983) и стеклянных шариков диаметром 2 мм (Sigma Aldrich, США), использовавшихся в качестве разрушающего агента. Для проведения каждой ПЦР было использовано 100 нг растительной ДНК. Праймеры для создания ПЦР-маркеров были синтезированы компаниями Евrogen (<http://evrogen.ru>) и Бигль (<http://www.biobeagle.com>). Было разработано два типа маркеров: маркеры, основанные на аллель-специфичной ПЦР и маркеры, основанные на аллель-специфичной рестрикции продуктов ПЦР (табл. 1, 2). Праймеры были подобраны таким способом, чтобы амплифицировать участок соответствующего гена, содержащий хотя бы один интрон. Секвенирование аллелей исследуемых генов проводилось с использованием автоматического секвенатора SEQ 8000 (Beckman Coulter, США). ПЦР проводилась с использованием амплификатора C1000 Thermal Cycler, (BioRad, США). Реакционная смесь содержала 2,5 мМ MgCl₂, 0,125 мМ каждого из дезоксирибонуклеотидов, 1 единицу Taq полимеразы (Силекс, Россия) 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 °С — 5 мин), 30 циклов амплификации: денатурация (94 °С — 30 с), отжиг праймеров (температура отжига праймеров подбиралась на основе свойств пары конкретных олигонуклеотидов и варьировала в пределах 56–65 °С — 30 с), синтез ДНК (72 °С — 40 с), окончание синтеза ДНК (72 °С — 10 мин). Для создания ген-специфичных молекулярных маркеров типа CAPS использовались эндонуклеазы рестрикции, опознающие специфическую последовательность нуклеотидов. Для анализа первичных последовательностей родительских аллелей маркеров с целью подбора подходящих для анализа рестриктаз была использована программа dCAPS Finder 2.0 (Neff et al., 2002; <http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>). Рестрикционный анализ проводился в объеме 10 мкл с использованием 5 мкл продуктов амплификации и 1 единицы соответствующей рестриктазы при температуре 37°С в течение ночи. Фрагменты амплификации и продукты рестрикции разделяли с использованием системы автоматического электрофореза MultiNA (Shimadzu, Япония) и электрофоретически в 2 %-м агарозном геле в 0,5-кратном трис-ацетатном буфере (пример анализа с использованием системы автоматического электрофореза MultiNA представлен на рисунке 2).

Таблица 1

Маркеры, основанные на аллель-специфичной ПЦР

Маркер	Прямой и обратный праймеры 5'-3'	Температура отжига, °C	Продукт, кодируемый соответствующим геном	Источник последовательности в GeneBank	ПЦР, специфичная для линии
<i>Pskn16</i>	GTGGTGGCCTATGTCCTCC AAGTGCATCACCACCCATTCTA	57	<i>Pisum sativum</i> knotted1 like class I homeodomain protein	AF080104	SGECd ^t
	GTGGTGGCCTATGTCCTCC AAGTGCATCACCACCCATTCTC	68			JI 281
<i>HptB</i>	CCGCAACTTCTGCGAGGAAC TGTTCTTCTACGCCTGAATTTT	65	<i>Pisum sativum</i> mRNA for putative His Asp phospho- transfer protein	AJ831475	SGECd ^t
	CCGCAACTTCTGCGAGGAAC TGTTCTTCTACGCCTGAATTTT	65			JI 281
<i>SUS3 (Aubert et al, 2006)</i>	GCCTGCATTCCGAAACCAACG GATGCGTTTGAGCATCTCCTC	62	<i>Pisum sativum</i> mRNA for sucrose synthase isoform 3	AJ311496	JI 281
<i>HMA3</i>	AATGGCCAGACATATATACGATG CAACMGGTGTGGAKAGGATAAGA	65	Heavy metal ATPase 3	*	SGECd ^t
	AATGGCCAGACATATATACGATT CAACMGGTGTGGAKAGGATAAGA	66			JI 281

Символом * отмечены гены, последовательности которых не известны для гороха посевного

Таблица 2

Маркеры, основанные на аллель-специфичной рестрикции продуктов ПЦР

Маркер	Прямой и обратный праймеры 5'-3'	Температура отжига, °C	Рестриктаза	Продукт, кодируемый соответствующим геном	Источник последовательности в GeneBank	Рестриктаза, специфичная для линии
<i>S27E</i>	TTGTAAACCCACCAGCTGAG CGCACACCACAACAGTTTGGAG	58	MnlI	Ribosomal protein S27E	*	JI 281
<i>IF</i>	TCCTCCGCCACTTCCAAACC TCCATTCCCACCATTAGCACA	58	HhaI	<i>Pisum sativum</i> eukaryotic translation initiation factor 4E	DQ641471	JI281
<i>P450</i>	AACACAARAATCTCCGCCGTC ACCGCTYCGTGTACTTCATC	58	HpaII	Cytochrome P450	*	SGECd ^t
<i>GH</i>	TTYACRGATCGGTGAGGACAG ACCGCTYCGTGTACTTCATC	58	AluI	Glycoside hydrolase	*	SGECd ^t
<i>AAA</i>	CTGCRGACACKGTAAACACTGT GGTCAGGAGCMAGTTGAAGCA	58	Csp6I	<i>Arabidopsis thaliana</i> AAA type ATPase family protein	*	JI281
<i>PTAC</i>	GGAAYTGGAGAAAGCCGGAGA TCAYGGTTGGRTAAACTGGATC	59	SalI	<i>Arabidopsis thaliana</i> plastid transcriptionally active 12	*	SGECd ^t
<i>PTP</i>	TCCGTTGGACAKCCCAACAAC TTCCACYCTCCCTTCTCACA	56	TspEI	Pentatricopeptide repeat	*	JI281
<i>EX</i>	CTGATCCCTCCTTTGAGCCTG GACSGCAAYTGAAGATGATGT	60	MboII	Exosome complex exonuclease RRP45	*	JI281

Символом * отмечены гены, последовательности которых не известны для гороха посевного

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ устойчивости мутанта SGECD¹ и линии JI281 к различным концентрациям хлорида кадмия

Так как различные линии гороха посевного могут значительно отличаться по признаку устойчивости к кадмию (Belimov et al., 2003), развитие корневых систем мутанта SGECD¹ и линии JI281 было проанализировано при выращивании в присутствии различных концентраций хлорида кадмия. В результате была выбрана концентрация 12 мкМ CdCl₂, при добавлении которой к пятидневным проросткам гороха растения мутанта SGECD¹ продолжали нормально развиваться, в то время как рост корневой системы линии JI281 останавливался (рис. 1). Данная концентрация была использована при анализе расщепления поколений F₂ и F₃ по признаку устойчивости к кадмию.

Анализ расщепления по фенотипу популяций F₂ и F₃, полученных от скрещивания мутанта SGECD¹ и линии JI 281

Был проведен анализ признака устойчивости к кадмию в первой популяции F₃, полученной от скрещивания мутанта SGECD¹ и линии JI281. При этом были выявлены семь устойчивые, неустойчивые и семьи, где встречались как устойчивые так и неустойчивые растения, соответствующие в поколении F₂ соответственно растениям с генотипом рецессивных гомозигот *cdt/cdt*, доминантных гомозигот *Cdt/Cdt* и гетерозигот *cdt/Cdt*.

Анализ совместного наследования признака устойчивости к кадмию и молекулярных маркеров

Исходя из первоначальной локализации мутации *cdt* в VI группе сцепления и на основе последовательностей известных генов гороха (Aubert et al., 2006; Kalo et al., 2004; Ellis, Poyser, 2002) были разработаны маркеры *Pskn16*, *HptB*, *SUS3*. Был проведен анализ совместного наследования признака устойчивости к кадмию и разработанных молекулярных маркеров. Результаты анализа представлены в таблице 3.

Основываясь на полученных данных, был проведен анализ микросинтезии геномов *P. sativum* и *M. truncatula*. Был выявлен регион второй группы сцепления *M. truncatula*, в пределах которого расположен предполагаемый ортолог локуса *cdt*, при этом было установлено, что данный регион инвертирован относительно гомологичной области у *P. sativum*.

С использованием ресурса *arabidopsis.org* были отобраны различные гены *A. thaliana*, экспрессия которых изменяется при действии тяжелых металлов. Последовательности данных генов были подвергнуты BLAST-анализу для выбора тех генов, для которых гомологичные последовательности у *M. truncatula* располагались в выявленном ранее районе второй группы сцепления. Последовательности данных генов были использованы для разработки новых маркеров: *HMA3*, *S27E*, *IF4E* и *GH*. Результат анализа совместного наследования признака устойчивости к кадмию и разработанных молекулярных маркеров представлен в таблице 4.

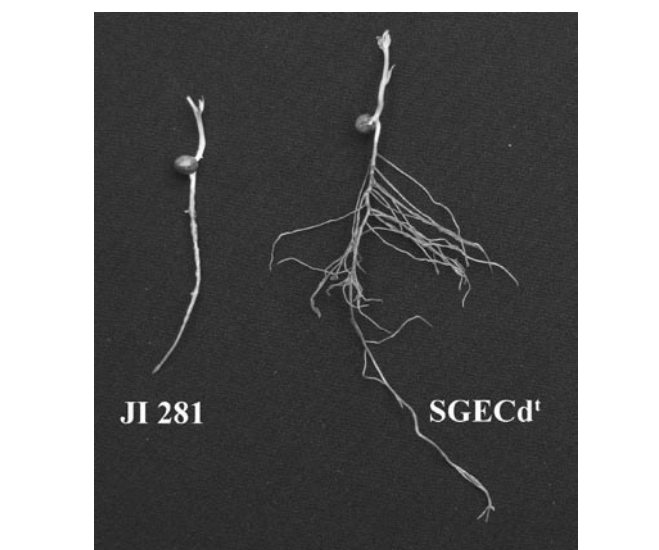


Рис 1. Корневые системы растений мутанта SGECD¹ и линии JI281, выросших в питательном растворе с добавлением 12 мкМ хлорида кадмия

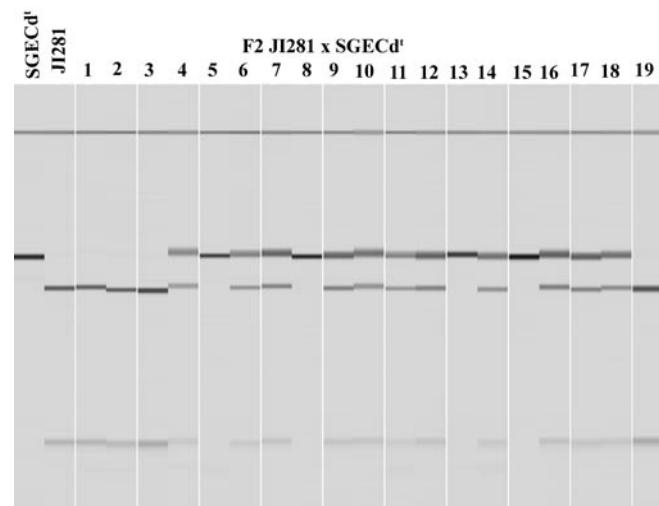


Рис 2. Фрагмент анализа расщепления F₂ (JI281 x SGECD¹) по молекулярному маркеру *IF4E* с использованием системы автоматического электрофореза MultiNA.

Пояснения к рисунку 2. SGECD¹, растения 7, 10, 15, 17 — рецессивные гомозиготы; JI 281, растения 3, 4, 5, 21 — доминантные гомозиготы; растения 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 19, 20 — гетерозиготы по полиморфному локусу гена *IF4E*

Для уточнения локализации локуса *cdt* и подтверждения полученных ранее данных был проведен анализ совместного наследования признака устойчивости к кадмию и разработанных молекулярных маркеров с использованием второй независимо полученной популяции поколения F₂, полученной от скрещивания мутанта SGECD¹ и линии JI281. Также с использованием поколения F₂ были проанализированы молекулярные

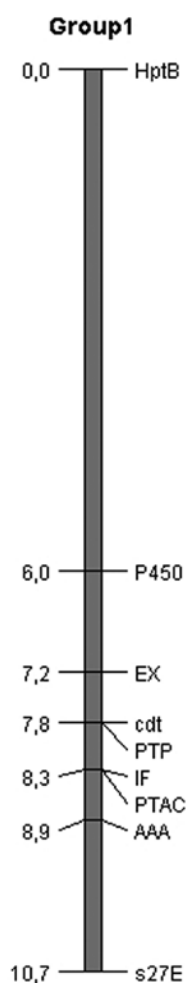


Рис. 3. Генетическая карта района локализации локуса *cdt*

маркеры *P450*, *PTP*, *AAA*, *P450*, *PTAC* и *EX*, разработанные с целью детализации расположения локуса *cdt*. Результат анализа совместного наследования признака устойчивости к кадмию и разработанных молекулярных маркеров представлен в таблице 5.

В результате проведенных исследований было выявлено очень близкое сцепление признака устойчивости к кадмию и маркеров *PTP* и *EX* (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Получение мутантов с интересующим фенотипом и последующая идентификация мутантного локуса является одним из наиболее распространенных подходов в изучении функций генов растений. По сравнению с ДНК-инсерционным или транспозон-опосредованным мутагенезом химический мутагенез имеет ряд преимуществ. Так, не для всех растительных видов известны надежные способы трансформации. Кроме того, для выявления мутантного фенотипа в случае химического мутагенеза требуется подвергнуть проверке в 20 раз меньше растений, чем при инсерционном мутагенезе. Инсерционный мутагенез чаще всего приводит к выключению функции гена, что может привести к летальности, в то время как при использовании химического мутагенеза могут возникать миссенс-мутации или нуклеотидные замены в области промотора, приводящие к изменению активности продукта, кодируемого соответствующим геном. Нам представляется, что активное использование экспериментального мутагенеза является перспективным, но все еще недостаточно востребованным методом для изучения механизмов детоксикации тяжелых металлов.

Таблица 5

Анализ расщепления по фенотипу растений поколений F_2 от скрещивания линий J1281 и SGECD^t

Пара маркеров	AB	AN	Ab	NB	NN	Nb	aB	aN	ab	Сцепление, cM ± ст. ошибка	Объединенный χ^2	P _(9:3:3:1)
<i>cdt-HptB</i>	25	30	0				0	3	15	4,5 ± 2,53	58,3	0,0001
<i>cdt-HMA3</i>	15	26	9				2	6	11	28,1 ± 6,28	10,9	0,005
<i>cdt-S27E</i>	35	88	3				0	3	41	3,4 ± 1,42	140,3	0,0001
<i>cdt-IF4E</i>	36	89	1				0	0	44	0,56 ± 0,52	164,9	0,0001
<i>cdt-AAA</i>	35	89	2				0	0	44	1,1 ± 0,82	160,0	0,0001
<i>cdt-P450</i>	34	91	1				0	0	43	1,1 ± 0,82	159,7	0,0001
<i>cdt-PTAC</i>	35	89	1				0	0	44	0,56 ± 0,52	164,9	0,0001
<i>cdt-PTP</i>	36	90	0				0	0	44	2,22 ± 1,14	170	0,0001
<i>cdt-EX</i>	35	91	0				0	0	44	2,22 ± 1,14	170	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

Таблица 3

Анализ расщепления по фенотипу растений поколений F₂ и F₃ от скрещивания линий J1281 и SGECd^t

Пара маркеров	AB	АН	Ab	НВ	НН	НЬ	aB	aH	ab	Сцепление, сМ ± ст. ошибка	Объединенный χ^2	P _(9:33:1)
<i>cdt-Pskn16</i>	8	19	3				0	2	10	11,22 ± 5,12	21,8	0,0001
<i>cdt-HptB</i>	7	16	2				0	1	9	8,0 ± 4,73	22,3	0,0001
<i>cdt-SUS3</i>	8	15	3				0	6	9	19,7 ± 6,81	12,8	0,005

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 поколений F₂ и F₃ от скрещивания линий J1281 и SGECd^t

Пара маркеров	AB	АН	Ab	НВ	НН	НЬ	aB	aH	ab	Сцепление сМ ± ст. ошибка	Объединенный χ^2	P _(9:33:1)
<i>cdt-HMA3</i>	15	27	9				2	6	11	27,9 ± 6,11	11,2	0,005
<i>cdt-S27E</i>	18	38	1	0			0	1	18	2,6 ± 1,85	65,7	0,0001
<i>cdt-IF4E</i>	19	37	1				0	0	19	1,31 ± 1,21	70,9	0,0001
<i>cdt-GH</i>	18	37	1				0	2	16	2,6 ± 1,87	65,7	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

Горох посевной является одним из самых известных объектов, на которых были сделаны исследования в области генетики. Он активно используется как модель для изучения генетического контроля процессов симбиогенеза с клубеньковыми бактериями (Greshoff, 2005) и формирования сложного листа (Tattersall et al., 2005). Также данный вид является ценной сельскохозяйственной культурой, обладающей превосходными пищевыми качествами и играющей большую роль в восстановлении плодородия земель, минуя использование минеральных удобрений. Несколько лет назад был получен мутант гороха, характеризующийся повышенным накоплением кадмия в биомассе растений и устойчивостью к токсичным концентрациям кадмия, что делает данный мутант уникальной моделью для изучения адаптаций растений к токсическим концентрациям тяжелых металлов (Tsyganov et al., 2007).

Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению генов гороха, молекулярно-генетические исследования данного вида все еще представляют собой сложную задачу. Затруднения связаны, во-первых, с большим количеством повторяющихся последовательностей, составляющих от 75 до 97 % всего генома гороха посевного (Flavell et al., 1974, Murray et al., 1981). Геном гороха почти в 10 раз превышает таковой у диплоидной люцерны. Функциональное изучение генов гороха осложнено тем фактором, что агробактериальная трансформация гороха до сих пор является трудной задачей. Несмотря на постоянную необходи-

мость локализации новых генов гороха, еще не создана единая молекулярно-генетическая база данных, и процент известных последовательностей очень мал. Однако достижения последних лет в области секвенирования геномов модельных растений значительно облегчают и ускоряют исследование новых генов у гороха. Так, завершение проекта секвенирования генома диплоидной люцерны и, в результате, создание ресурса с открытым доступом (<http://www.medicagohapmap.org/?genome>) позволяет исследовать микросинтению отдельных участков хромосом гороха и люцерны. На основе аннотированных участков определенной группы сцепления люцерны становится возможным разрабатывать маркеры на основе генов, локализация которых не была до этого известна у гороха. Примером такой возможности является данная работа.

Расширить возможности изучения генов гороха можно не только благодаря использованию микросинтении с модельными бобовыми, но и более отдаленной синтении с *A. thaliana*, результаты секвенирования генома которого на сегодняшний день являются наиболее полными. Такой подход становится возможным благодаря разработке экспрессионных профилей для большого количества генов *A. thaliana*. Однако не всегда знание о генах, находящихся в данной области у модельных объектов позволяет точно узнать, в каком гене произошла мутация. При наличии большого числа генов-кандидатов снова встает необходимость позиционного клонирования исследуемого гена.

Для *A. thaliana* разработано несколько баз данных, позволяющих клонировать мутантный локус в течение года, однако для менее изученных растений этот срок по-прежнему составляет от 3 до 5 лет (Jander et al., 2002).

В данном исследовании нами был использован анализ микросинтезии как с *M. truncatula*, так и с *A. thaliana*. В результате была проведена точная локализация мутации по локусу *cdt* на генетической карте гороха и выявлены 2 фланкирующих маркера (маркер *PTP* созданный на основе последовательности гена, кодирующего белок, относящийся к семейству PPR и маркер *EX*, созданный на основе последовательности гена, кодирующего экзонуклеазу), которые показали очень близкое сцепление с локусом *cdt*. Полученные результаты создают реальные предпосылки для позиционного клонирования локуса *cdt*.

Благодарности:

Авторы выражают большую признательность В. А. Жукову, А. Г. Пинаеву и Е. Е. Андронову за ценные консультации при проведении исследований и С. М. Розову за критическое чтение рукописи.

Данная работа была финансово поддержана ОНТП Россельхозакадемии, Министерством образования и науки (государственные контракты № 16.552.11.7047, П290) грантом Президента России (НШ–3440.2010.4) и Российским фондом фундаментальных исследований (11-04-01675).

ЛИТЕРАТУРА

1. Кулаева О. А., Цыганов В. Е., 2010. Молекулярно-генетические основы устойчивости высших растений к кадмию и его аккумуляции // Экол. генетика. Т. 8. С. 3–15.
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, N 1. С. 42–46.
3. Aubert G., Morin J., Jacquin F. et al., 2006. Functional mapping in pea, as an aid to the candidate gene selection and for investigating synteny with the model legume *Medicago truncatula* // Theor. Appl. Genet. Vol. 112. P. 1024–1041.
4. Belimov A. A., Safronova V. I., Tsyganov V. E. et al., 2003. Genetic variability in tolerance to cadmium and accumulation of heavy metals in pea (*Pisum sativum* L.) // Euphytica. Vol. 131. P. 25–35.
5. Cobbett C. S., May M. J., Howden R., Rolls B., 1998. The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in γ -glutamylcysteine synthetase // The Plant J. Vol. 16. P. 73–78.
6. Dellaporta S., Wood J., 1983. Plant DNA miniprep- aration // Plant Mol. Biol. Rep. Vol. 1. P. 19–21.
7. Ellis T., Poyser S., 2002. An integrated and comparative view of pea genetic and cytogenetic maps // New Phytol. Vol. 153. P. 17–25.
8. Flavell R., Bennett M., Smith J., Smith D., 1974. Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants // Biochem. Genet. Vol. 4. P. 257–269.
9. Greshoff P. M., 2005. Positional Cloning of Plant Developmental Genes // The Handbook of Plant Genome Mapping. Genetic and Physical Mapping / Eds.: Meksem K. and Kahl G. Wiley-VCH, Weinheim. P. 233–256.
10. Graham L., Sticklen B., 1993. Plant chitinases // Can. J. Bot. Vol. 72. P. 1057–1083.
11. Howden R., Goldsbrough P. B., Andersen C. R., Cobbett C. S., 1995. Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient // Plant Physiol. Vol. 107. P. 1059–1066.
12. Ha S., Howden R., Dietrich W., Bugg S., 1999. Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe* // Plant Cell. Vol. 11. P. 1153–1163.
13. Iwata H., Ninomiya S., 2006. AntMap: Constructing genetic linkage maps using an ant colony optimization algorithm // Breed. Sci. Vol. 56. P. 371–377.
14. Jander G., Norris S., Rounsley S. et al., 2002. *Arabidopsis* map based cloning in the post genome era // Plant Physiol. Vol. 129. P. 440–450.
15. Kaló P., Seres A., Taylor S. et al., 2004. Comparative mapping between *Medicago sativa* and *Pisum sativum* // Mol. Genet. Genomics. Vol. 272. P. 235–246.
16. Murray M., Peters D., Thompson W., 1981. Ancient repeated sequences in the pea and mung bean genomes and implications for genome evolution // J. Sci. Food Agr. Vol. 17. P. 31–42.
17. Neff M., Turk E., Kalishman M., 2002. Web based primer design for single nucleotide polymorphism analysis // Trends Genet. Vol. 18. P. 613–615.
18. Sanita di Toppi L., Gabbriellini R., 1999. Response to cadmium in higher plants // Environ. Exp. Bot. Vol. 41. P. 105–130.
19. Sharma S., Dietz K., 2006. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress // J. Exp. Bot. Vol. 57. P. 711–726.
20. Tattersall A.D., Turner L., Knox M. R. et al., 2005. The Mutant *crispa* reveals multiple roles for *PHANTASTICA* in pea compound leaf development // Plant Cell. Vol. 17. P. 1046–1060.
21. Tsyganov V., Belimov A., Borisov A. et al., 2007. A chemically induced new pea (*Pisum sativum*) mutant SGECD^t with increased tolerance to, and

accumulation of, cadmium // Ann. Bot. London. Vol. 99. P. 227–237.

22. Watanabe A., Ito H., Chiba M. et al., 2010. Isolation of novel types of Arabidopsis mutants with altered reactions to cadmium: cadmium gradient agar plates are an effective screen for the heavy metal related mutants // Planta. Vol. 232. P. 825–836.

FINE MAPPING OF A *CDT* LOCUS MUTATION THAT LEADS TO INCREASED CADMIUM TOLERANCE

Kulaeva O. A., Tsyganov V. E.

✿ **SUMMARY:** A pea mutant SGECdt (*cdt*), which has an increased cadmium tolerance and an increased cadmium accumulation, as compared to the initial line, was recently obtained. Earlier, a SSAP (sequence specific amplified polymorphism) analysis revealed localization of the *cdt* locus in VI linkage group. For fine mapping of the *cdt* locus a set of PCR based markers was developed. PCR markers were based on known sequences of pea genes, which were determined using analysis of genome microsynteny between pea and model legume *Medicago truncatula*. The close linkage of the *cdt* locus and markers based on the *Pentatricopeptide* repeat and *Exosome* complex exonuclease RRP 45 genes was revealed. Thus, prerequisites for *cdt* positional cloning were developed.

✿ **KEY WORDS:** genetic analysis of cadmium tolerance; gene mapping; SNP markers; CAPS markers; *Pisum sativum* L.

✿ 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.

Кулаева Ольга Алексеевна — младший научный сотрудник. 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: koa1983@yandex.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.

Kulaeva Olga Alekseevna — Junior Scientific Researcher. 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: koa1983@yandex.ru.