

© В. Е. Цыганов<sup>1</sup>,  
О. А. Кулаева<sup>1</sup>, М. Нокс<sup>2</sup>,  
А. Ю. Борисов<sup>1</sup>,  
И. А. Тихонович<sup>1,3</sup>,  
Т. Г. Н. Эллис<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии; <sup>2</sup> John Innes Centre, Norwich Research Park; <sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный университет; <sup>4</sup> Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences

✳ С целью локализации мутации *cdt*, приводящей к повышенной устойчивости мутанта гороха к кадмию и его увеличенному накоплению в биомассе растений, по сравнению с исходной линией, был проведен сегрегационный анализ F<sub>2</sub> и F<sub>3</sub> поколений гибридов от скрещивания мутантной линии SGECD<sup>t</sup> и линии JI281. В эксперименте проанализировано совместное наследование 89 SSAP (от англ. sequence specific amplified polymorphism) маркеров, по которым различались анализируемые линии и мутантного признака устойчивости к кадмию. Было выявлено сцепление 4-х SSAP маркеров (Tps1/146+, Tps1/167+, Tps1/44+ и Tps1/58+), расположенных в VI группе сцепления гороха, с признаком устойчивости к кадмию. Таким образом, продемонстрирована перспективность использования SSAP-анализа для первичной локализации мутации в группе сцепления.

✳ Ключевые слова: локализация генов; молекулярные маркеры; SSAP-маркеры; устойчивость к кадмию; *Pisum sativum* L.

Поступила в редакцию 14.11.2011  
Принята к публикации 22.02.2012

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ SSAP-АНАЛИЗА ДЛЯ ПЕРВИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ МУТАЦИИ *CDT* (*CADMIUM TOLERANCE*) В VI ГРУППЕ СЦЕПЛЕНИЯ ГОРОХА

### ВВЕДЕНИЕ

Получение мутантов с уникальным фенотипом, не выявленным у модельных видов растений с секвенированными геномами, создает большие трудности в идентификации нуклеотидной последовательности, затронутой мутацией. Это связано с невозможностью использования геномной микросинтезии с целью клонирования выявленного гена по гомологии с ранее известным ортологом у модельного вида. Очевидно, что локализация мутантного локуса на генетической карте является первым необходимым шагом для создания условий для дальнейшего позиционного клонирования выявленного гена. У гороха в течение долгого времени для первичной локализации мутантных локусов использовался анализ потомства от скрещивания мутантной и тестерной линии, несущей ряд морфологических маркеров. Такой подход использовался нами ранее, при этом он оказался успешным для первичной локализации ряда генов гороха (Rozov et al., 1999; Tsyganov et al., 2000). Использование множественно маркированной тестерной линии NGB1238 позволяло охватывать при анализе примерно половину генетической карты гороха, что, безусловно, делало невозможным локализовать мутации в регионах, не имеющих морфологических маркеров. С развитием молекулярных методов для локализации генов гороха стал развиваться подход, базирующийся на использовании серий различных молекулярных маркеров с известным положением в геноме (Чегамирза и др., 2004; Konovalov et al., 2005).

Около 10 лет назад стали активно использоваться молекулярные маркеры, созданные на основе полиморфизма ретротранспозонов. У растений с большим размером генома ретротранспозоны являются основным классом повторяющихся последовательностей (SanMiguel et al., 1996). При этом основные семейства ретротранспозонов относительно равномерно распределены по хромосомам (Suoniemi et al., 1996; Kumar et al., 1997; Waugh et al., 1997). Поэтому ретротранспозоны являются удобным материалом для создания молекулярных маркеров. Такого рода маркеры активно использовались для анализа эволюции генетического разнообразия и происхождения различных сортов растений (Vershinin et al., 2003). К этому типу маркеров принадлежат SSAP-маркеры, основанные на амплификации фрагмента ДНК между местом интеграции ретротранспозона и сайтом рестрикции в лигированном адаптере (Schulman et al., 2004). Мы использовали SSAP-маркеры для первичной локализации мутации *cdt*, которая приводит к повышенной, по сравнению с исходной линией, устойчивости растений гороха к кадмию, характеризующихся при этом увеличенным накоплением кадмия (Tsyganov et al., 2007).

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### *Растительный материал*

Растения мутантной линии SGECD<sup>t</sup> были скрещены с линией JI281. В результате были получены растения поколений F<sub>2</sub> и F<sub>3</sub>. SSAP-анализ проводился с использованием популяции растений F<sub>2</sub>, анализ признака устойчивости проводился в поколении F<sub>3</sub>.

#### *Выделение ДНК*

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

*SSAP-анализ*

SSAP-анализ основан на однократной рестрикции геномной ДНК с использованием рестриктазы *TaqI*, с последующим лигированием адаптера к липким концам. ПЦР проводится с использованием радиоактивно меченного праймера к последовательности ретро-транспозона и праймера к адаптеру с селективными основаниями, при этом в качестве матрицы служат рестрицированные и лигированные с адаптером фрагменты ДНК. Продукты ПЦР далее разделяются в электрофорезе (Schulman et al., 2004).

Ниже приведены последовательности использованных праймеров и адаптера. В качестве ретротранспозона был использован *PDR1* элемент, на основе PPT (polypurine tract) данного элемента был синтезирован *PDR1*-PPT праймер.

Тaq адаптер: 5'-ATGAGTCCTGAA-3'  
3'-TACTCAGGACTTGC-5'  
Праймер к Тaq адаптеру ATGAGTCCTGAACGAXX  
Радиоактивно меченный праймер *PDR1*-PPT ATTCAACAGCTTGAGGGGAG

Рестрикция геномной ДНК проводилась в объеме 40 мкл с использованием 0,5 мкг матрицы, 5 единиц рестриктазы *TaqI* (Invitrogen, США), 8 мкл 5-ти кратного буфера RL (10 mM TRIS ацетата pH 7,5, 10 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 50 mM KCH<sub>3</sub>COO, 5 mM 1,4 дитиоэритрита, 5 нг/мкл бычьего сывороточного альбумина (BSA). Реакционная смесь инкубировалась при 65°C 3 часа.

Для лигирования с адаптером к 40 мкл рестриционной смеси добавляли 12,5 пмоль Тaq адаптера, 1 mM АТФ и 1 единицу Т4 ДНК лигазы (Invitrogen, США), 2 мкл 5-ти кратного буфера RL, доводя объем до 50 мкл. Реакционная смесь инкубировалась при 37°C в течение ночи. Полученная в результате лигирования SSAP-матрица растворялась в 100 мкл 0,1 буфера TE (pH 8,0) и хранилась при температуре -20°C. Для проведения ПЦР использовалось 3 мкл данной смеси.

Для создания меченого праймера использовались следующие компоненты: *PDR1*-PPT праймер, концентрацией 100 нг/мкл, [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]АТФ (концентрацией 370 кБк/мкл), 10-кратный буфер для полинуклеотидкиназы Т4, вода, 5 единиц полинуклеотидкиназы Т4. Смесь инкубировали 1 ч при 37 °C.

ПЦР с меченым праймером проводилась с использованием амплификатора PTC-200 Thermo Cycler (MJ Research, США). Реакционная смесь на 30 реакций содержала 20 мкл меченого <sup>33</sup>P праймера *PDR1*-PPT, 15 нг немеченого праймера с селективными основаниями (концентрацией 7,5 нг/мкл), 200 мкМ каждого из дезоксирибонуклеотидов, 6 единиц Тaq полимеразы (Invitrogen, США), 30 мкл 10-кратного буфера для полимеразы и 3 мкл полученной ранее SSAP-матрицы. Объем реакционной смеси составлял 10 мкл. Условия проведения ПЦР (по Vos et al., 1995): 12 циклов амплификации: денатурация (94 °C — 30 с), отжиг прай-

меров 65 °C (с уменьшением температуры на 0,7 °C за цикл до 56 °C) — 30 сек), синтез ДНК (72 °C — 60 с), 24 цикла амплификации: денатурация (94 °C — 30 с), отжиг праймеров 56 °C — 30 с), синтез ДНК (72 °C — 60 с) окончание синтеза ДНК (72°C — 7 мин). После окончания синтеза к реакционной смеси добавлялся 10 мкл стоп-раствора (94 % формамид, 10мМ ЭДТА pH 8,0, 0,5 мг/мл ксилена цианола, 0,5 мг/мл бромфенола голубого), смесь прогревали при 95 °C 3 мин и затем охлаждали при 12 °C. Реакционную смесь хранили при температуре -20 °C.

*Гель электрофорез*

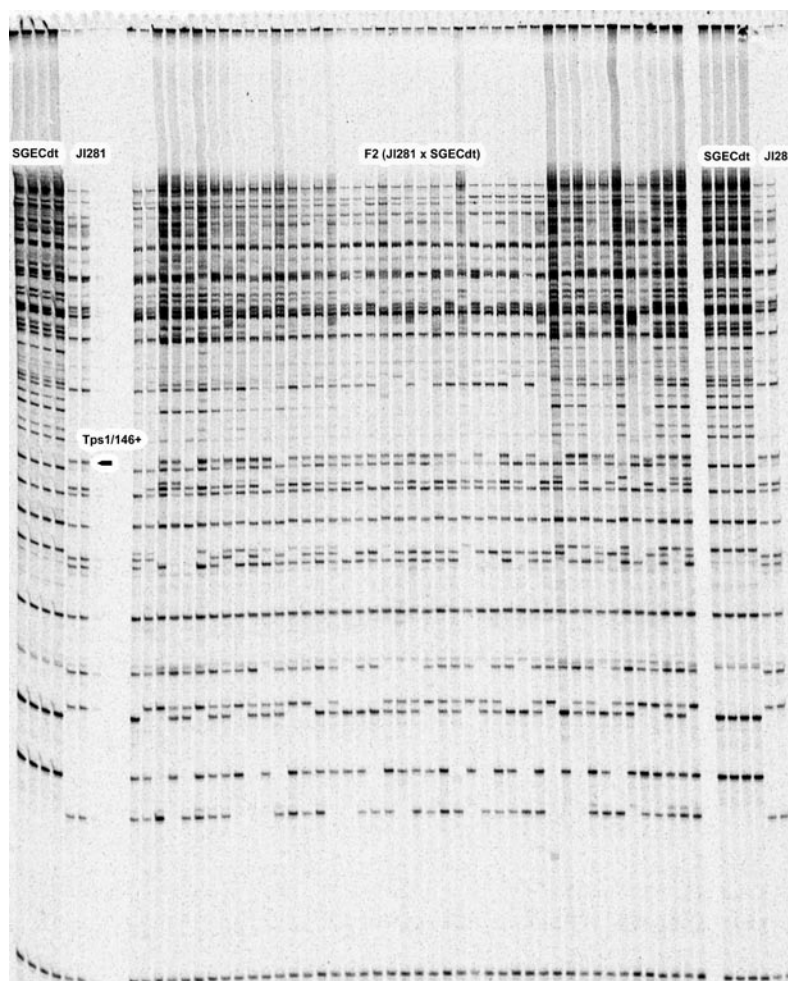
Фрагменты разделяли в 6%-м денатурирующем акриламидном геле согласно (Sambrook et al., 1989) в течение 2 часов при напряжении 1500 В. Высушенный гель на 3ММ бумаге анализировали с помощью системы для визуализации Typhoon 9200 Scanner GE (Healthcare Life Sciences, Великобритания) и проявляли с использованием рентгеновских пленок (Fuji, Япония).

**РЕЗУЛЬТАТЫ**

В работе были проанализированы растения F<sub>2</sub> и F<sub>3</sub> от скрещивания мутантной линии SGECD<sup>i</sup> с линией JI281.

Для создания SSAP-маркеров, по которым различались бы линии SGECD<sup>i</sup> и JI281, были использованы следующие праймеры к Тaq адаптеру с парами селективных оснований: TC, AA, TG, TA, AT, AG, AC и GA. В случае использования праймера с селективными основаниями TC родительские линии отличались по 13 маркерам, AA — по 12 маркерам, TG — по 14 маркерам, TA — по 10 маркерам, AT — по 15 маркерам, AG — по 17 маркерам, GA — по 8 маркерам. В результате было выявлено 89 SSAP-маркеров. Пример анализа SSAP-маркеров приведен на рисунке 1.

Был проведен анализ совместного наследования выявленных SSAP-маркеров и признака устойчивости к кадмию. В ходе анализа F<sub>3</sub> по признаку устойчивости к кадмию возникли сложности с выявлением фенотипических различий между растениями. Данные трудности оказались связаны с повышенной, по сравнению с исходной линией SGE, устойчивостью линии JI281 к хлориду кадмия, что привело к ошибочному в ряде случаев определению фенотипа и, как следствие, значительному превышению класса рецессивных гомозигот (проявляющих устойчивость к хлориду кадмия). Поэтому признак устойчивости к кадмию не анализировался как кодоминантный при анализе совместного наследования. Тем не менее, было выявлено сцепление локуса *cdt* с 8 SSAP-маркерами. 4 из них представляли собой новые маркеры, характерные для линии SGECD<sup>i</sup>, другие 4 были идентифицированы как ранее описанные маркеры в скрещиваниях с участи-



**Рис. 1.** SSAP-анализ. Рисунок показывает автордиографический снимок, позволяющий видеть SSAP-продукты. Продукты получены из  $F_2$  от скрещивания линии JI281 с мутантной линией SGECdt<sup>1</sup> при использовании ПЦР-праймера, специфичного к PPT (polypurine tract) ретротранспозона гороха *PDR1*, меченного изотопом фосфора  $^{33}\text{P}$  и праймера, с селективными основаниями TC, соответствующего сайту адаптера *Taq* I

ем линии JI281: Tps1/146+, Tps1/167+, Tps1/44+ и Tps1/58+/ (табл. 1). Данные маркеры локализованы в VI группе сцепления гороха, на основании чего был сделан вывод о принадлежности локуса *cdt* к данной группе сцепления.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данном исследовании были использованы 8 праймеров к *Taq* адаптеру с селективными основаниями, что составляет половину от возможных комбинаций, при этом было получено 89 SSAP маркеров, по которым различались скрещиваемые линии. Таким образом, использование полного набора комбинаций праймеров позволяет получить 150–200 SSAP маркеров. Безусловно, такое количество маркеров создает хорошие предпосылки для первичной локализации исследуемой мутации. При этом равномерное распределение ретротранспозонов по геному гороха (Suoniemi

et al., 1996, Kumar et al., 1997) позволяет охватить все группы сцепления. Использование метода SSAP представляется перспективным для проведения исследований по первичной локализации неизвестной мутации на генетической карте.

В данном исследовании SSAP-маркеры были использованы для первичной локализации мутации по локусу *cdt*, приводящей к повышенной, по сравнению с исходной линией, устойчивости к кадмию и увеличенной аккумуляции кадмия в тканях растения (Tsyganov et al., 2007). Возникшие трудности в определении фенотипа при анализе растений  $F_2$  связаны с определенной сложностью в проявлении данного признака, зависящего от генетического фона, а также физиологической стадии развития растений, на которой в среду добавляется кадмий. Тем не менее, был установлен факт сцепления с 4 SSAP-маркерами VI группы сцепления гороха, при этом для 3 из них вероятности случайного отклонения от независимого наследования с локусом *cdt* были крайне низки (табл. 1).

Таблица 1

Анализ расщепления по фенотипу растений поколения F<sub>2</sub> от скрещивания линии JI281 и мутанта SGECDt

Пары маркеров	Численность фенотипических классов					Расстояние, см ± ст. ошибка	Общий $\chi^2$	Р <sub>9:3:3:1</sub>
	AB	Ab	aB	ab	Всего			
<i>cdt-Tps1/146+</i>	13	1	27	25	66	29,55 ± 6,91	7,74	0,01
<i>cdt-Tps1/167+</i>	6	8	45	6	65	32,60 ± 10,90	13,39	0,0005
<i>cdt-Tps1/44+</i>	2	11	43	3	59	23,13 ± 12,20	34,15	0,0001
<i>cdt-Tps1/58+</i>	8	6	48	4	66	27,11 ± 11,26	10,61	0,005

А,а — первый ген, В,в — второй ген. Если оба гена доминантны, заглавные буквы обозначают доминантные аллели

Следует отметить, что до недавнего времени у высших растений не было описано мутаций, приводящих к повышенной устойчивости к кадмию (Кулаева, Цыганов, 2010). Лишь совсем недавно у *Arabidopsis thaliana* были выявлены мутанты, характеризующиеся повышенной устойчивостью к кадмию, однако молекулярная природа данных мутаций еще не выяснена (Watanabe et al., 2010).

Таким образом, проведенная первичная локализация мутантного локуса *cdt* позволяет провести его дальнейшее точное картирование на генетической карте.

#### Благодарности:

Авторы выражают большую признательность 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

- 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.
- Чегамирза К., Ковеза О. В., Коновалов Ф. А., Гостимский С. А., 2004. Идентификация и локализация гена *chi115* и сцепленных с ним ДНК-маркеров у гороха посевного (*Pisum sativum* L.) // Генетика. Т. 40. С. 909–915.
- Kononov F., Toshchakova E., Gostimsky S., 2005. A CAPS marker set for mapping in linkage group III of pea (*Pisum sativum* L.) // Cell. Mol. Biol. Lett. V. 10. P. 163–171.
- Kumar A., Pearce S. R., McLean K., et al., 1997. The *Tyl copia* group of retrotransposons in plants: genomic organisation, evolution, and use as molecular markers // Genetica. Vol. 100. P. 205–217.
- 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.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual (2nd edn.). Cold Spring Harbor N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SanMiguel P., Tikhonov A., Jin Y. K. et al., 1996. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome // Science. Vol. 274. P. 765–768.
- Schulman A. H., Flavell A. J., Ellis T. H., 2004. The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants // Methods Mol. Biol. Vol. 260. P. 145–173.
- Suoniemi A., Ananthawat Jonsson K., Arna T., Schulman A. H., 1996. Retrotransposon BARE-1 is a major, dispersed component of the barley (*Hordeum vulgare* L.) genome // Plant Mol. Biol. Vol. 30, P. 1321–1329.
- Tsyganov V. E., Pavlova Z. B., Kravchenko L. V. et al., 2000. New gene *Crt* (*curly roots*) controlling pea (*Pisum sativum* L.) root development // Ann. Bot. Vol. 86. P. 975–981.
- Tsyganov V., Belimov A., Borisov A. et al., 2007. A chemically induced new pea (*Pisum sativum*) mutant SGECDt with increased tolerance to, and accumulation of, cadmium // Ann. Bot. Vol. 99. P. 227–237.
- Vershinin A. V., Allnutt T. R., Knox M. R. et al., 2003. Transposable elements reveal the impact of introgression, rather than transposition, in *Pisum* diversity, evolution, and domestication // Mol. Biol. Evol. Vol. 20. P. 2067–2075.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M. et al., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting // Nucl. Acid Res. Vol. 23. P. 4407–4414.
- 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.
- Waugh, R., McLean K., Flavell A. J. et al., 1997. Genetic distribution of *Bare-1*-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by

sequence specific amplification polymorphisms (SSAP) // Mol. Gen. Genet. Vol. 253. P. 687–694.

# USING THE SSAP ANALYSIS FOR THE PRIMARY LOCALIZATION OF THE *CDT* (*CADMIUM TOLERANCE*) MUTATION IN PEA LINKAGE GROUP VI

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

✿ **SUMMARY:** To localize the *cdt* mutation leading to an increased cadmium tolerance in the pea mutant and an increased cadmium

accumulation in the biomass, F2 and F3 progenies from crosses between the mutant SGECDt line and the JI 281 line were analyzed. The joint inheritance of 89 SSAP (sequence specific amplified polymorphism) markers, by which the analyzed lines differed, and the mutant trait of cadmium tolerance was performed. The linkage between the trait of cadmium tolerance and 4 SSAP markers: Tps1/146+, Tps1/167+, Tps1/44+ and Tps1/58+, localized in VI pea linkage group, was shown. Thus, prospects of using SSAP analysis for primary localization of a mutation in the linkage group were demonstrated.

✿ **KEY WORDS:** gene localization; molecular markers; SSAP markers; cadmium tolerance; *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.

**Маги Нокс** — исследователь. John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UH, UK. 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. Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences, Aberystwyth University, Gogerddan Campus, Aberystwyth, Ceredigion, SY23 3EB, UK. 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 Evgenievich** — 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.

**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.