

На правах рукописи

КНЯЗЕВ АНДРЕЙ НИКОЛАЕВИЧ

**Дополненные линии как модель интрогрессии
чужеродного материала *S. lycopersicoides* в геном
культурного томата**

03.00.15 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва - 2007

Работа выполнена в 2003-2006 гг. на кафедре генетики Российского государственного аграрного университета – МСХА им. К.А. Тимирязева.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, академик РАН, академик РАСХН,
профессор **А.А. Жученко**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук **А.В. Поляков**
кандидат биологических наук **Р.А. Комахин**

Ведущее учреждение: Всероссийский научно-исследовательский институт селекции и семеноводства овощных культур РАСХН

Защита состоится «20» июня 2007г. в 15.00 на заседании диссертационного совета Д.220.043.10 при Российском государственном аграрном университете – МСХА имени К.А. Тимирязева по адресу: 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49.

Факс: (495)-976-0894

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Н.И. Железнова РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Автореферат разослан «18» мая 2007 г.
и размещен на сайте <http://www.timacad.ru>

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Г.И. Карлов

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Адаптации к абиотическим и биотическим факторам внешней среды, возникшие у диких видов в процессе эволюции, являются мощным резервом для улучшения культурных видов растений. *Solanum lycopersicoides* обладает генетически детерминируемой толерантностью к пониженным температурам, а так же устойчивостью к возбудителям некоторых болезней, таких как *Botrytis cinerea*, *Phytophthora parasitica*, вирусу мозаики огурца (CMV), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Rick, Yoder, 1988, Rick et al., 1995). Ввиду стерильности гибридов F₁ интрогрессия чужеродного материала затруднена, но может быть достигнута путем использования моносомно дополненных линий с добавлениями отдельных хромосом этого вида (Chetelat, 1998). Для оценки вероятности получения интрогрессий в потомстве таких линий и насколько стабильно моносомно дополненные линии сохраняют исходный генетический материал *S. lycopersicoides* при половом размножении могут быть использованы показатели цитогенетической стабильности мейотического деления, такие как частота конъюгации хромосом в профазе I – метафазе I и частота нарушений мейотического деления в присутствии дополненной хромосомы от профазы I до образования тетрад.

Цели и задачи исследований. Целью настоящего исследования являлась оценка возможности интрогрессии генетического материала *S. lycopersicoides* в геном культурного томата с использованием моносомно дополненных линий. Исходя из цели были поставлены следующие задачи:

- Идентифицировать дополненные линии культурного томата с хромосомами *S. lycopersicoides*.
- Оценить степень гомо- и гомеологии хромосом *S. lycopersicoides* и культурного томата.
- Определить частоту передачи хромосом *S. lycopersicoides* в потомстве дополненных линий.

- Выявить влияние дополненной хромосомы на мейотическое деление.
- Оценить влияние дополненной хромосомы на мейотическую рекомбинацию.
- Определить возможность применения ПЦР-анализа для идентификации чужеродного генетического материала.

Научная новизна и практическая значимость. Выполнен цитогенетический анализ пяти моносоно дополненных линий томата с хромосомами *Solanum lycopersicoides*. Анализ мейотического деления показал, что дополнительные хромосомы в целом вызывают нарушения мейотического деления. Впервые показано, что разные хромосомы *S. lycopersicoides* обладают специфическими эффектами на конъюгацию хромосом. Так, хромосомы II и IV *S. lycopersicoides* могут вступать в хромосомные ассоциации в виде тривалентов с хромосомами томата, тогда как хромосома XI представлена во всех клетках только в унивалентном состоянии. Наличие конъюгации хромосом свидетельствует о гомологии хромосом и возможности интрогрессии генов *S. lycopersicoides* в культурный томат. Пахитенный анализ позволил установить особенности конъюгации хромосом гомеологичной группы II. Применение молекулярных маркеров позволило ускорить идентификацию интрогрессий генетического материала *S. lycopersicoides*.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены на научной конференции «Памяти Грегора Менделя» (Москва, 2001), XLI Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2003), на 2-й конференции МОГиС «Актуальные проблемы генетики» (Москва, 2003), на научной конференции молодых ученых и специалистов, посвященной 140-летию РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва, 2005), на научной конференции молодых ученых по агрономии в г. Чачак (Сербия, 2005), на научной конференции молодых ученых Ломоносов-2006 (Москва, 2006).

Публикации результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 7 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на

___ страницах, включает ___ таблиц, ___ приложений. Состоит из введения, обзора литературы, результатов и обсуждения, выводов и ___ предложений. Список использованных литературных источников содержит ___ источников, в том числе ___ иностранных.

Материал и методы

Материал. Материалом для исследований служили расщепляющиеся популяции растений моносомно дополненных линий (МДЛ) с хромосомами II, IV, V, X, XI *S. lycopersicoides*, любезно предоставленные Р. Четелатом из центра генетических ресурсов томата (США, Калифорнийский Университет).

Методы. Семена расщепляющихся популяций проращивали в чашках Петри при температуре 28⁰С. Проростки переносили в кассеты (6 x 12 ячеек объемом 50 см³). Опытные растения выращивали в сосудах объемом 7 л в закрытом грунте при естественном освещении.

Для выделения дополненных растений из расщепляющихся популяций использовали прямой подсчёт числа хромосом в метафазе митоза в меристемах корешков молодых растений. Фиксацию материала проводили в утренние часы в уксусном спирте. Препараты готовили методом «распластывания» клеток и окрашиванием красителем Гимза (Пухальский и др., 2004).

Для изучения мейотического деления у томата использовали небольшие (0,1-0,25 мм) бутоны. При фиксации бутонов предварительно проводили оценку стадии развития материнских клеток пыльцы приготовлением временных ацетокарминовых препаратов пыльников томата (Паушева, 1988). Отобранные бутоны фиксировали в уксусном спирте (3:1) и хранили в холодильнике при +4°С.

Пахитенный анализ выполняли на постоянных препаратах. В качестве стандарта использовали стандартную пахитенную карту культурного томата (Жученко, 1978).

При работе с расщепляющимися популяциями с дополненными хромосомами II, X и XI для выявления чужеродного генетического материала использовали SCAR-маркеры: TG91, TG361, TG608 и CT113 (Bai et al., 2004; Alpert et al., 1996; Canady et al., 2005) (табл.1).

Выделение ДНК осуществляли из молодых листьев семян томата по стандартной методике (Fulton et al., 1995). Для амплификации использовали праймеры, представленные в таблице 1.

Таблица 1

Молекулярные маркеры для идентификации интрогрессий

Маркер	Хр.	Последовательность праймера 5'-3'	Размер ампликонов	Рестриктаза
TG91	II	tgcaagctgtaatatagac cggctcagttgcaactca	400	Dra I
TG361	II	gtacaggagtcctctgagatgatc caacgacaagcattccagtc	600	Apo I
TG608	II	gaagctttctaagcaggttggtg tcattagtgttaggcaagtggaa	1000 (1200 <i>S.L.</i>)*	—
CT240	X	atccaagtaccctcgattagt agccttcttgtcccatcag	850	HaeIII
CT203	X	tagaatatgggaagcgaatgga gaggaggcgtaatagg	650	HaeIII
CT113	XI	acaacgggcaacagacgcaacc agctcgaggatggccgacttt	352	Mbo II, BstENII

Условия ПЦР: денатурация при температуре 94°C – 1 минута, отжиг праймеров – 50°C 1 минута, синтез – 72°C 2 минуты.

Рестриксию ампликонов осуществляли с использованием рестриктаз – Dra I, Apo I, Mbo I (Bai et al., 2004; Alpert et al., 1996; Canady et al., 2005). Электрофорез проводили в 2% агарозном геле (Alpert et al., 1996).

Результаты исследований и обсуждение

Числа хромосом как прямой метод идентификации растений с дополненными хромосомами

Основным методом идентификации моносомно дополненных линий является подсчет числа хромосом в метафазе митоза или мейоза. Проведение этой

работы требует достаточно много времени, особенно при анализе больших по численности популяций. Необходимость постоянного цитологического анализа моносомно дополненных линий существенно ограничивает их использование. Однако именно этот метод является самым надежным при выделении дополненных линий.

Анализ числа хромосом в расщепляющихся популяциях показал сходный процент моносомно дополненных растений. Доля растений с числом хромосом $2n=25$ (рис. 1) составила около 10% по хромосомам II и XI, что значительно ниже теоретически ожидаемой. Это может быть обусловлено пониженной жизнеспособностью мужских гамет с дополнительной хромосомой $n=12+1$. Однако появление растений с числом хромосом $2n=26$ свидетельствует о том, что эти гаметы могут быть жизнеспособны.

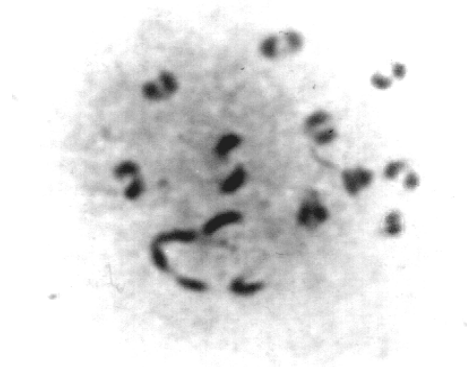


Рис. 1. Метафазная пластинка растений с дополненной хромосомой II (МДЛ II), $2n=25$.

Для доказательства того, что дополнительная хромосома действительно принадлежит другому виду была проведена геномная гибридизация *in situ*, которая показала, что речь идет именно о хромосоме этого вида. Для второй хромосомы томата, ядрышкообразующей, возможна визуализация ядрышкоорганизующего региона методом флуоресцентной гибридизации *in situ* – FISH. Сочетание этого метода с геномной гибридизацией *in situ* показано, что дополнительная хромосома является хромосомой II *S. lycopersicoides* (Соловьев и др., 2001).

Пахитенный анализ как метод идентификации хромосом *S. lycopersicoides*

Пахитенный анализ, несмотря на его трудоемкость, является эффективным инструментом при идентификации хромосом видов с небольшим числом морфологически сходных метафазных хромосом. Для томата этот метод успешно применяется и в настоящее время.

Выполненный на моносомно дополненных растениях пахитенный анализ позволил провести идентификацию хромосом, а также установить факт конъюгации между хромосомами культурного томата и *S. lycopersicoides*. На рис. 2 представлены хромосомы моносомно дополненного растения на стадии пахитены и схемы хромосомы II обоих видов.

Отмеченная конъюгация между длинными плечами хромосомы II свидетельствует о наличии гомологии между ними и о возможности интрогрессии генетического материала *S. lycopersicoides* в хромосому томата в результате рекомбинации между гомеологичными хромосомами.

Пахитенный анализ выявил морфологические различия коротких плеч хромосомы II культурного томата и *S. lycopersicoides*. Так короткое плечо хромосомы культурного томата содержит гетерохроматиновый регион значительно большего размера в сравнении с хромосомой *S. lycopersicoides* (рис. 3).

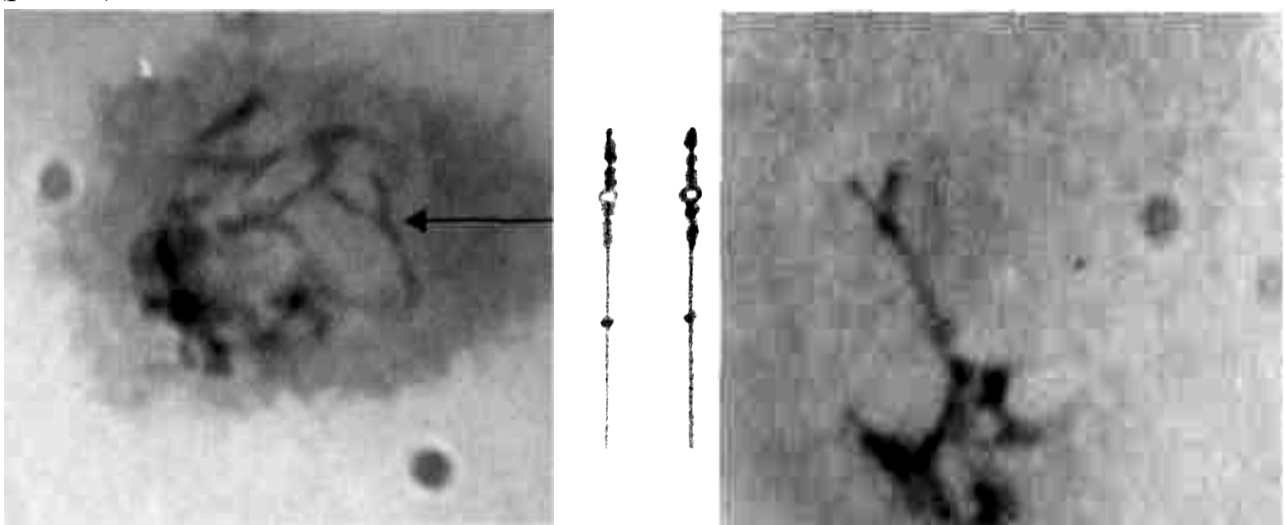


Рис. 3. Хромосома II культурного томата и *S. lycopersicoides* в стадии пахитены у моносомно дополненного растения.

Молекулярные маркеры для идентификации интрогрессий и чужеродных хромосом

Молекулярные маркеры специфические для хромосом определенного вида, могут быть использованы для выявления дополнений чужеродных хромосом. Применение маркеров значительно сокращает затраты времени и труда на идентификацию растений с чужеродным генетическим материалом. Совместное использование маркеров и цитологического анализа значительно сокращает объем цитологических исследований.

При использовании маркера Ct113, локализованного в коротком плече хромосомы XI, показан полиморфизм по наличию сайта рестрикции у культурного томата и дикорастущих видов (Bai et al., 2004). Анализ исходных форм и расщепляющейся по хромосоме XI популяции показал, что маркер Ct113 может быть использован для выявления растений с генетическим материалом хромосомы XI *S. lycopersicoides*. На рисунке 3 б видно, что у образца 2 (X-3-37) помимо двух рестрикционных фрагментов присутствует и нерестрицированный ампликон. Это свидетельствует о присутствии у данного растения хромосомы *S. lycopersicoides*. Цитологический анализ этого растения подтвердил ее наличие.

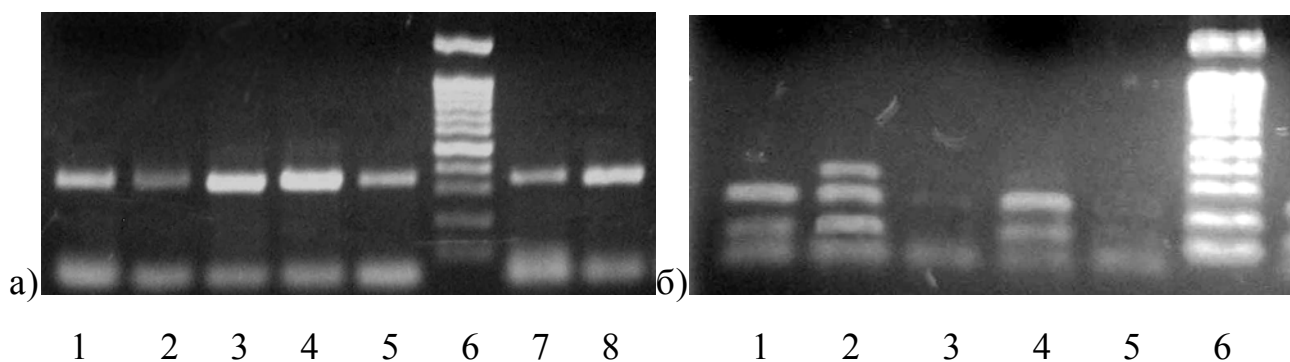


Рис. 3. Электрофореграмма локуса Ct113. а) ампликоны: 1 – XI-1-25; 2 – XI-1-2; 3 – XI-3-37; 4 – XI-3-13; 5 – XI-1-7; 6 – маркер 100, 7 – XI-1-8; 8 – XI-3-4; б) после рестрикции: 1 – XI-1-5; 2 – XI-3-37; 3 – XI-3-11; 4 – XI-3-47; 5 – XI-3-34; 6 – маркер 100 bp.

По локусам TG91 получен фрагмент длиной 400 п.н. (рис. 4). Рестрикция продуктов амплификации этого маркера рестриктазой *DraI* не выявила

различий между культурным томатом и видом *S. lycopersicoides* по этому локусу.

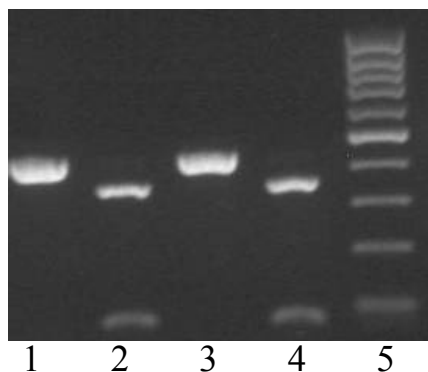


Рис. 4. Электрофореграмма локуса TG91. 1 – ампликон культурного томата VF36, 2 – после рестрикции культурного томата, 3 – ампликон *S. lycopersicoides*, 4 – после рестрикции *S. lycopersicoides*, 5 – маркер 100 bp.

Анализ локуса TG361 выявил различия между культурным томатом и *S. lycopersicoides*. У дикорастущего вида сайт рестрикции отсутствовал (рис. 6), что свидетельствует о возможности применения этого маркера для идентификации генетического материала хромосомы II в культурном томате.

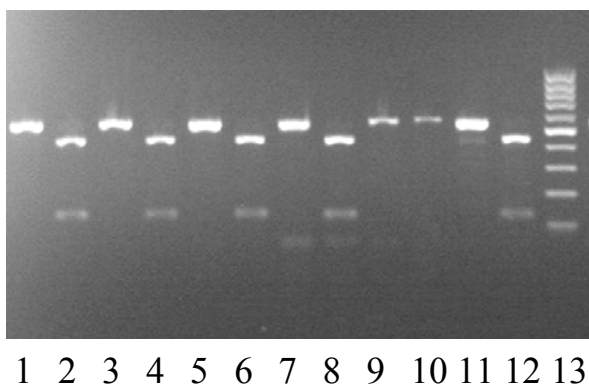


Рис. 6. Электрофореграмма локуса TG361. 1 – 6 – образцы; 7, 8 – культурный томат; 9, 10 – *S. lycopersicoides*; 11, 12 – растение популяции МДЛ-II (нечетные – ампликоны, четные – после рестрикции).

Анализ расщепляющейся популяции по хромосоме II показал, что у всех растений данный маркер отсутствует. Это может свидетельствовать как об отсутствии хромосомы II *S. lycopersicoides*, так и о возможной рекомбинантной природе у анализируемых растений. Об этом свидетельствуют и результаты пахитенного анализа дополненных растений, показавшие конъюгацию длинных плеч хромосом культурного томата и *S. lycopersicoides*. Это может служить основой появления рекомбинантных хромосом.

Конъюгация хромосом в профазе I – метафазе I как критерий оценки интрогрессии чужеродного генетического материала

Доказательство конъюгации между хромосомами томата и *S. lycopersicoides* имеет важное значение для объяснения частоты интрогрессии и прогноза вероятности интрогрессии генетического материала *S. lycopersicoides* в геном культурного томата. Выполненные исследования первого мейотического деления на линиях с дополнениями хромосом II, IV и XI *S. lycopersicoides* свидетельствуют, что разные хромосомы *S. lycopersicoides* обладают разной степенью гомологии с хромосомами культурного томата и обладают разным влиянием на поведение других хромосом в мейозе.

Формирование тривалентов в метафазе I свидетельствует о наличии гомологичных участков у хромосом культурного томата и *S. lycopersicoides*, что показано для хромосом II и IV. Частоты клеток с тривалентами у линий с дополнениями хромосом II и IV оказались сходными – 27,9 и 23,0% соответственно (табл. 4). Однако влияние этих хромосом на поведение других хромосом оказалось различным. Так, в случае хромосомы II на стадии метафазы отмечены клетки с 3 унивалентами (12,0%), с 5 унивалентами (2,2 %), а так же с тривалентом и двумя унивалентами (3,8%). Эти данные свидетельствуют, что хромосома II может не только участвовать в образовании тривалентов, но и вызывать асинапсис в отношении других хромосом, что вполне согласуется с отмеченным преждевременным расхождением хромосом у этих растений.

Анализ конъюгации хромосом у линий с дополнением хромосомой IV *S. lycopersicoides* показал, что эта хромосома представлена либо в унивалентном состоянии, либо ассоциирована в тривалент – 23,0% и 73,0% соответственно. Появление дополнительных унивалентов у этих образцов минимально – лишь 4 % МКП имели 3 унивалента.

Особенно показательны результаты, полученные на дополненных растениях

с хромосомой XI, у которых не установлено образование тривалентов. Хромосома XI *S. lycopersicoides* не вступает в конъюгацию с хромосомами томата. В то же время она вызывает асинапсис хромосом культурного томата у 21,6% МКП, у которых выявлено присутствие 3 унивалентов.

Особенности мейотического деления у дополненных растений

Моносомно дополненные растения отличаются пониженной фертильностью пыльцы, что вероятно обусловлено нарушениями мейотического деления. Характер этих нарушений для форм томата с хромосомами *S. lycopersicoides* практически не известен. Цитологический анализ моносомно дополненных растений с хромосомами II, IV, V, XI выявил, что разные хромосомы могут оказывать неодинаковые эффекты на ход мейотического деления.

Преждевременное расхождение хромосом на стадии метафазы I в большей степени отмечено у МДЛ-II – более 60 % (табл. 2). В то же время для дополненных растений с хромосомами V и XI этот показатель был значительно ниже – 8,8 и 15,4% соответственно.

Таблица 2

Характеристика метафазы I моносомно дополненных растений

Образец	МДЛ-II	МДЛ-V	МДЛ-XI
Клетки в метафазе I			
Норма, шт.	38	93	110
с нарушениями, шт.	70	9	20
%	64,8%±4,6%	8,8%±2,7%	15,4%±3,2%
Всего, шт.	108	102	130

Во время анафазы I дополнительная хромосома в мейотическом делении в большинстве случаев проявляется в отставаниях хромосом и образовании мостов (табл. 3). Доля всех клеток с такими нарушениями составила 41,4%. Преимущественно встречались клетки с нарушениями в виде отставаний хромосом.

Таблица 3

Характеристика анафазы I моносомно дополненной формы МДЛ-II

Проанализировано клеток, всего	Клеток с нормальным делением		Клеток с отставанием хромосом		Клеток с мостами	
	шт.	%	шт.	%	шт.	%
130	76	58,6	53	40,65	1	0,75

Анализ второго мейотического деления у моносомно дополненных растений с хромосомой II показал, что нарушения встречаются на всех его стадиях (табл. 4 – 6). У 15% клеток наблюдалось нерасхождение одной хромосомы; доля клеток с нарушениями в анафазе II составила лишь 18,3 %, что согласуется с предыдущими результатами.

Таблица 4

Характеристика метафазы II моносомно дополненной формы

Проанализировано клеток, всего	Клеток с расхождением хромосом 12-:-13		Клеток с расхождением хромосом 12-:-12-:-1	
	шт.	%	шт.	%
20	17	85	3	15

Анафаза второго деления, где хроматиды расходятся к полюсам, протекает в целом нормально; лишь 18,3% клеток имеют нарушения в виде отставаний как одной, так и нескольких (рис. 5, табл. 5).

Таблица 5

Характеристика анафазы-II моносомно дополненной формы МДЛ-II

Проанализировано клеток, всего	Клеток с нормаль- ным делением		Клеток с отставанием,		Клеток с мостами	
	шт.	%	шт.	%	шт.	%
109	89	81,7	20	18,3	0	0

хромосомой II.

Частота рекомбинации у дополненных линий с хромосомой 2 *S. lycopersicoides*

Для оценки влияния хромосомы 2 *S. lycopersicoides* на частоту рекомбинации были использованы гибриды с маркерной формой Мо755 с тремя мутациями: aa – отсутствие антоциана, d – карликовый рост, wv – желтая пятнистость, локализованными во второй хромосоме. Анализ расщепления F₂ и F_a по маркерным признакам показал существенные различия частот рекомбинации у диплоидных и дополненных линий по всем изученным парам признаков. Изменения частоты рекомбинации было как в сторону увеличения (у моносомно дополненных линий) так и уменьшения (у дисомно дополненных) по сравнению с контрольной популяцией и расстоянием по генетической карте (табл. 7).

Таблица 7

Частота rf у диплоидных растений, моносомно и дисомно дополненных линий

	ДЛ	МДЛ	ДДЛ
wv - aa	4,3	31,2	5,6
aa - d	24,5	24,8	28,5
d - wv	24,7	43,5	30

Эти изменения являются следствием как конъюгации 2-й хромосомы *S. lycopersicoides* с гомеологами культурного томата, так и наблюдаемых нарушений во время всего мейотического деления.

Выводы

1. Характер конъюгации хромосом в профазе I – метафазе I может служить критерием для оценки возможности интрогрессии генетического материала *S. lycopersicoides* в геном культурного томата.
2. Хромосомы *S. lycopersicoides* имеют разную степень гомеологии с хромосомами культурного томата, что проявляется в характере конъюгации. Хромосомы II и IV частично гомологичны, между хромосомами XI культурного томата и *S. lycopersicoides* гомология

недостаточна для образования тривалентов.

3. Дополненные хромосомы *S. lycopersicoides* вызывают нарушения конъюгации негомологичных хромосом.
5. Частота передачи чужеродной хромосомы варьирует от 10 % до 50%.
6. Изменения частоты рекомбинации между маркерными признаками могут быть обусловлены как влиянием дополнительных хромосом на конъюгацию, так и на ход всего мейоза в целом.
7. Дополненные хромосомы *S. lycopersicoides* вызывают нарушения мейотического деления, которые проявляются на всех стадиях от профазы-I до тетрад.
8. Использование ПЦР-анализа для идентификации чужеродного генетического материала позволяет значительно сократить время на выделение дополненных форм из расщепляющейся популяции.

Список опубликованных работ

1. Кирюхова О.Б., Локтионов А.Н., Князев А.Н. Характеристика моносомно дополненных форм культурного томата с хромосомами *Solanum lycopersicoides* // Материалы научной конференции "Памяти Грегора Менделя" – М., 2001. - С. 48-49.
2. Князев А.Н., Соловьев А.А. Моносомно дополненные линии томата с хромосомами *Solanum lycopersicoides* и возможности их использования // Сборник студенческих научных работ, выпуск 9. М., 2003.
3. Князев А.Н., Соловьев А.А. Характеристика мейотического деления моносомно дополненной линии культурного томата со 2-й хромосомой *Solanum lycopersicoides* // Материалы 2-й конференции Московского общества генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова «Актуальные проблемы генетики». Т. 2. М., 2003, С. 289-290.
4. Князев А.Н. Моносомно дополненные линии томата с хромосомами *Solanum lycopersicoides*: возможности использования // Материалы XLI

Международной научной студенческой конференции "Студент и научно-технический прогресс".. Новосибирск, 2003. Серия биология. С. 21.

5. Князев А.Н., Александров О.С. Характеристика мейоза моносомно дополненных линий томата с хромосомами *Solanum lycopersicoides* // Материалы международной конференции молодых ученых и специалистов, посвященной 140-летию РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, 2006.
6. Князев А.Н., Александров О.С. Особенности мейотического деления моносомно дополненных линий томата с хромосомами IV и XI *Solanum lycopersicoides* (Features meiosis division of monosomic alien addition lines of tomato with chromosomes IV and XI from *Solanum lycopersicoides* // Review of scientific papers of the students of agronomy. Сасак, 2005, р. 23.). (на английском языке).
7. Ломоносов
8. Соловьев А.А., Князев А.Н., Александров О.С. Цитогенетическая характеристика дополненных форм культурного томата с хромосомами *Solanum lycopersicoides* Dun // Генетика. М. 2007. Т. 43. С. 1-5.