пероксидазы хлоропластов // Физиология и биохимия здорового и больного растения. – М.: Изд-во МГУ, 1970. – С. 305-311.

3. Множинні форми деяких ферментів у тканинах рослин озимої пшениці з контрастною стійкістю до бурої листової іржі / Дьяченко Л.Ф., Тоцький В.М., Топтіков В.А., Бабаянц Л.Т. // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. – К.: ЛОГОС, 2007. – Т. 1. – С. 23-27.

4. Легкобит М.П., Хадеева Н.В. Изоферментные спектры кислых пероксидаз у представителей рода *Stachys* // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 7. – С. 930-934.

5. Сафонов В.И., Сафонова М.Р. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле // Биохимические методы в физиологии растений. – М.: Наука, 1971. – 113 с.

6. Сопряженность устойчивости озимых мягких пшениц к *Fusarium graminearum* Schwabe и множественных молекулярных форм некоторых ферментов / Топтиков В.А., Мирось С.Л., Дьяченко Л.Ф., Тоцкий В.Н., Залогина М.А. // Цитология и генетика. – 2002. – Т. 36, № 3. – С. 3-11.

7. Хуссейн И.А., Кочиева Е.З., Хадеева Н.В. Изменение спектров пероксидаз у регенерантов *Stachys sieboldii* в результате гормональных и мутагенных воздействий // Генетика. – 2000. – Т. 36, № 8. – С. 1093-1099.

8. Cober E.R., Madill J., Voldeng H.D. Early tall determinate soybean genotype E1E1e3e3e4e4dt1dt1 sets high bottom pods // Can. J. Plant Sci. – 2000. – V. 80, N 3. – P. 527-531.

## ИЗУЧЕНИЕ ВНУТРИВИДОВОГО И МЕЖВИДОВОГО КОНСЕРВАТИЗМА ЛОКУСОВ МИКРОСАТЕЛЛИТОВ (SSR)

А.В. ЗЛАЦКАЯ, *кандидат биологических наук*;
Ю.В. ШИТИКОВА; Л.В. КОРОЛЬ
Украинский институт экспертизы сортов растений, Киев

### Введение

Локусы микросателлитных (SSR) последовательностей ДНК растений в настоящее время занимают одну из ключевых позиций в исследовании их геномов, картировании и маркировании локусов хозяйственно ценных признаков, идентификации интрогрессии чужеродного генетического материала переданного от вида-донора в геном вида-реципиента и изучении организации определенных регионов растительного генома. Ценность локусов SSR для исследований заключается в том, что они относительно равномерно распространены по всему геному растения, а также для большинства культурных растений, в том числе мягкой пшеницы, созданы генетические карты сцепления SSR [13]. В последнее время значительный интерес представляют работы по исследованию организации геномов культурных растений, изучение богатых генами регионов [11], коллинеарность порядка расположения генов при межвидовых сравнениях в пределах родов, порядков и классов [4], а также выявлении консервативных локусов. Последнему направлению способствовала серия работ по сравнению расположения локусов EST у мягкой пшеницы и арабидопсиса, мягкой пшеницы и риса [10].

Кроме теоретической ценности данные работы позволяют решить и ряд прикладных задач. Например, микросателлитные маркеры, идентифицированные в геноме мягкой пшеницы, использовали в исследованиях близкородственных видов семейства *Triticeae* (http://wheat.pw.usda.gov), что дало возможность увеличить число

маркерных локусов у менее изученных видов и насытить их генетические карты сцепления [1, 2, 7, 12].

В связи с этим основной целью данной работы было изучение полиморфизма 107 SSR мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L. (AABBDD)), расположенных на всех хромосомах этого вида у растительного материала с разной степенью генетического родства: двух сортов этой культуры Кавказ и Безостая 1, которые происходят из одного селекционного центра, и у пшеницы группы *timopheevii* – *Triticum militinae* Zhuk. & Migush ($A^bA^bGG$) – отличающейся от *T. aestivum* по происхождению двух геномов, у *Aegilops tauschii* Coss. (DD) – эволюционного донора субгенома DD *T. aestivum*, а также у двух сортов сахарной свеклы *Beta vulgaris* L. Два сорта сахарной свеклы были выбраны для исследования по двум причинам: с одной стороны как образцы представителя генетически отдаленного вида, а с другой – с целью идентификации новых микросателлитных маркеров. Поскольку в отличие от большинства культурных злаков, для которых идентифицировано огромное количество SSR маркеров и информация о которых находится в свободном доступе (http://wheat.pw.usda.gov), для сахарной свеклы количество идентифицированных маркеров SSR очень мало [5, 6, 9], кроме того информация о их последовательностях является, за редким исключением, закрытой [5].

## Объекты и методы исследования

Объектом для исследования послужили два сорта озимой мягкой пшеницы *T. aestivum* Кавказ и Безостая 1, по одному образцу *T. militinae* и *A. tauschii*, и два сорта сахарной свеклы Япола и Ахат.

Экстракцию ДНК проводили из проростков пшеницы, егилопса и сахарной свеклы, с использованием СТАВ-метода [8]. ПЦР и визуализацию продуктов амплификации проводили согласно методике [13]. Список исследованных SSR-маркеров представлен в табл. 1. При массовом анализе продукты амплификации разделяли в 2%-ном агарозном геле, а визуализацию проводили в ультрафиолетовом свете с использованием бромистого этидия. Точный размер ампликона определяли методом капиллярного электрофореза на базе лаборатории John Innes Centre (Великобритания).

## Результаты и обсуждение

Наименьший уровень полиморфизма был зафиксирован между двумя сортами *T. aestivum*: из 107 SSR 22 оказались полиморфными, причем менее полиморфными были SSR субгенома D. Из 36 исследованных SSR этого субгенома лишь один маркер barc143 (табл. 1) обнаружил полиморфизм между двумя сортами. Наивысший уровень полиморфизма между сортами был установлен при помощи SSR субгенома B (31%), т.е. 11 маркеров из 36 оказались полиморфными, причем полиморфные маркеры были обнаружены на большинстве хромосом этого субгенома: по одному на хромосомах 3B, 4B, 5B и 6B, два – на хромосоме 2B и 4 полиморфных маркера – на хромосоме 1B, что можно объяснить присутствием 1B/1R транслокации в геноме сорта Кавказ в отличие от сорта Безостая 1 [3]. При этом у 8 маркеров разница между ампликонами у исследуемых сортов составляла 6-20 пар нуклеотидов (п.н.) и у 1 маркера gwm011 полиморфизм был следствием наличия нуль аллеля у одного из сортов, что дает возможность использовать эти маркеры для массового анализа данного растительного материала и его производных путем разделения продуктов их амплификации в агарозном геле. Полиморфизм с разницей в 2-3 п.н. у исследуемых сортов обнаружен у двух SSR-маркеров субгенома B. Из 39 SSR-маркеров субгенома A 26% (10 SSR) оказались полиморфными. Из них полиморфизм двух SSR-маркеров был следствием наличия нуль аллеля у одного из сортов. У еще двух SSR-маркеров – следствием разницы в размерах ампликонов между исследуемыми сортами в 7-20 п.н., а у шести – в 2-4 п.н. При сравнении уровня полиморфизма исследуемых маркеров у близкородственных видов прогнозировано наблюдалось увеличение уровня полиморфизма SSR в

гомеологичных парах субгеномов A и $A^b$, B и G *T. aestivum* и *T. militinae,* а также субгенома D *T. aestivum* и генома D *A. tauschii.*

Таблица 1

**Список использованных SSR-маркеров хромосом пшеницы***

| Хр-ма | Маркер |
|---|---|
| 1A | psp3001 (159, 159, 161), gwm164 (125, 123, 101+113.), barc083 (146, нуль аллель, 151), wmc093 (153, 172, 152), gwm135 (275, 278, 278) |
| 1B | barc008 (190, 257, нуль аллель), psp3000 (219, 222, 245), gwm011 (нуль аллель, 192, нуль аллель), psp3100 (180, 174, нуль аллель), wmc044 (213, 213, 197+213) |
| 1D | gwm337 (185, 185, 193), gdm111 (213, 213, нуль аллель), gwm458 (110, 110, 113), gwm642 (203, 203, нуль аллель) |
| 2A | gwm636 (117, 117, 89),wmc177 (194, 196, 173), gwm095 (126, 126, нуль аллель), psp3088 (166, 166, нуль аллель), gwm445 (194, 194, 174), barc005 (310, 310, нуль аллель) |
| 2B | gwm257 (204, 204, нуль аллель), wmc154 (160, 166, 124), barc167 (259, 265, нуль аллель), gwm338 (170,170,нуль аллель) |
| 2D | gwm455 (160, 160, 190), barc095 (197, 197, 232), barc168(190, 190, 187), gwm539 (138, 138, 134+155), wmc018 (240, 240, 240) |
| 3A | psp3001 (171, 171, нуль аллель), barc045 (191, 191, 198), gwm369 (162, 162, 170), gwm674 (161, 161, 173), gwm155 (140, 140, нуль аллель), wmc264 (138, 140, 127) |
| 3B | psp3001 (208, 223, нуль аллель), gwm285 (229, 229, нуль аллель), gwm493 (146, 146, нуль аллель), psp3030 (197, 197, нуль аллель), barc164 (187, 187, нуль аллель) |
| 3D | gdm072 (138, 138, нуль аллель), gwm161 (152 , 152, 138), gwm456 (142, 142, 202), gwm003 (77, 77, 65), gwm383 (193, 193, 172 ) |
| 4A | gwm165 (192, 192, 186), barc106(139, 139, 108), barc184(220, 220, 200), dupw004(201, 201, нуль аллель), gwm610 (169, 169, 171). |
| 4B | wmc047 (143, 143, нуль аллель), barc163 (165, 165, нуль аллель), gwm107 (213, 213, нуль аллель), gwm165 (255, 257, 255), gwm495 (182, 182, нуль аллель), psp3030 (210, 210, нуль аллель) |
| 4D | wmc457 (168, 168, 168), gdm129 (124, 124, 122), wmc285 (302, 302, 294), wmc331 (133, 133, 137), psp3007 (182, 182, 174), gwm165 (200, 200, 218) |
| 5A | barc056 (122, 122, нуль аллель), barc141 (259, 259, 259.), gwm129 (224, 228, 202), gwm205 (158, 164, нуль аллель), barc151 (250, 250, 200), gwm126 (193, 193, 193) |
| 5B | barc109 (241, 241, 176), gwm159 (201, 201, нуль аллель), gwm234 (238, 238, нуль аллель), gwm213 (166, 166, нуль аллель), barc140 (145, 145, 134), gwm408 (199, 185, 200) |
| 5D | barc143 (нуль аллель, 137, нуль аллель), gwm190 (209, 209, 259), gwm205 (143, 143, нуль аллель), barc110 (204, 204, 186), barc144 (245, 245, нуль аллель), gwm583 (172, 172, нуль аллель) |
| 6A | barc171 (232, 232, 192), gwm334 (122, 122, нуль аллель), dupw167 (233, 233, 280), gwm570 (153, 153, нуль аллель), psp3071 (162, 162, 158) |
| 6B | barc198 (127, 127, 196), gwm193 (175, 175, нуль аллель), psp3009 (213, 213, нуль аллель), wmc105 (351, 351, 376), barc134 (204, 204, нуль аллель), gwm219 (183, 194, нуль аллель) |
| 6D | barc173 (242, 242, 233), gwm 469 (175, 175, 171), barc096 (194, 194, 191), barc175 (234, 234, нуль аллель) |
| 7A | barc108 (160, 160, 140), psp3001 (161, 161, 163), gwm130 (123, 127, 107), wmc168 (нуль аллель, 314, нуль аллель), barc029 (192, 192, нуль аллель), dupw254 (159, 159, 184) |
| 7B | barc072 (185, 185, 202), gwm046 (175, 175, 167), gwm333 (156, 156, 156), psp3033 (187, 187, 183) |
| 7D | gwm130 (129, 129, 125), barc214 (222, 222, нуль аллель), gwm295 (250, 250, 258), barc076 (221, 221, 221), psp3123 (177, 177, 185), psp3113 (177, 177, 175) |

* - Хр-ма – хромосома; в табл. указано название SSR, в скобках – размер ампликона в парах нуклеотидов у сорта Казказ, Базостая 1 и *T. militinae* в случае субгеномов A и B или *A. tauschii* в случае субгенома D

При исследовании субгеномов A и $A^b$ была обнаружена следующая тенденция: 35 из 39 SSR-маркеров субгенома A оказались полиморфными, причем в 12 случаях в субгеноме $A^b$ идентифицировали нуль аллели, в 14 случаях полиморфизм между двумя субгеномами был следствием меньшего числа копий микросателлитного повтора у субгенома $A^b$ в сравнении с субгеномом A, а в 7 случаях – следствием большего числа. Причем разница в размерах ампликонов между исследуемыми видами в подавляющем большинстве случаев была велика, в 10-50 п.н. При исследовании субгенома G в сравнении с субгеномом B из 36 SSR-маркеров в 23 случаях были идентифицированы нуль аллели в субгеноме G, в 6 случаях полиморфизм между двумя субгеномами был следствием меньшего числа копий микросателлитного повтора у субгенома G, а в 4 случаях – следствием большего числа. При сравнении полиморфизма микросателлитных маркеров у субгенома D мягкой пшеницы и *A. tauschii* 33 из 36 SSR-маркеров оказались полиморфными, из которых лишь 9 давали нуль аллели в геноме *A. tauschii*, а приблизительно равное количество, 11 и 13 соответственно, оказались полиморфными; в первом случае это было следствием увеличения числа микросателлитных повторов, а во втором – уменьшением. При чем разница между ампликонами при идентификации полиморфизма в большинстве случаев была невелика – 2-6 п.н. Для исследования генома сахарной свеклы нами произвольно были отобраны 37 SSR-маркеров трех субгеномов мягкой пшеницы A (10 SSR), B (14 SSR) и D (13 SSR). Из них 15 SSR-маркеров (6 SSR субгенома A, 3 SSR субгенома B и 6 SSR субгенома D) выявили нуль-аллели в геноме сортов сахарной свеклы, что можно было ожидать, поскольку наличие нуль-аллелей свидетельствует об отсутствии искомого локуса в геноме исследуемого растения. Однако наибольший интерес представили другие две группы SSR. Одна из них состояла из 8 SSR (dupw004, gwm129, bac167, psp3033, barc095, barc110, psp3123, gwm295), идентифицирующих полиморфизм между пшеничным геномом и геномом сахарной свеклы (рис. 1 а), а другая – из 14 SSR, которые не проявили видимого полиморфизма между изученными сортами сахарной свеклы и одним из исследуемых сортов мягкой пшеницы – Кавказ.

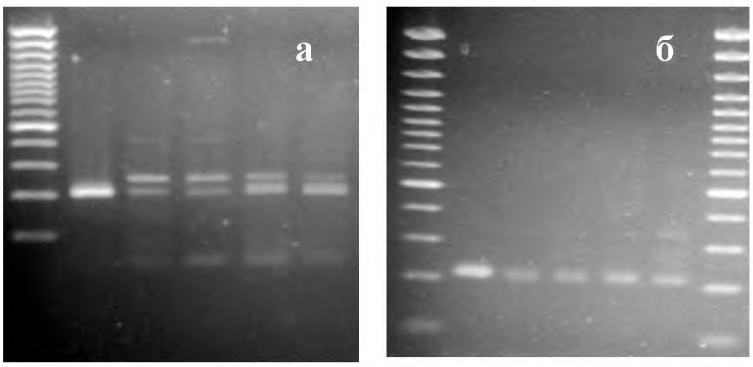


**Рис. 1. Идентифицированный полиморфизм некоторых SSR-маркеров в геноме сахарной свеклы: а) dupw 004, б) gwm190 (слева направо 1, 7 – маркер молекулярного веса 100 п.н.; 2 – сорт Кавказ; 3, 4 – сорт Япола; 5,6 –сорт Ахат)**

Преимущественно это были SSR разных хромосом субгенома B пшеницы. Причем 2 маркера wmc044 и gwm165 не выявили полиморфизма как при исследовании межсортового, так и межвидового полиморфизма у пшеницы, что свидетельствует о высоком уровне консерватизма этих локусов даже у генетически отдаленных видов. Интересным оказался тот факт, что 9 SSR (barc045, barc184, gwm257, gwm388, barc109, barc072, gwm455, gwm539, gwm190) (рис. 1 б), не обнаружившие межсортовой полиморфизм у исследованных сортов мягкой пшеницы, но оказавшиеся полиморфными при исследовании диких сородичей мягкой пшеницы, а также 3 SSR psp3000, wmc154, barc008, идентифицировавшие как межсортовой, так и межвидовой полиморфизм у пшеницы, не выявили полиморфизма

между сортом мягкой пшеницы и образцами сахарной свеклы. Эти факты также могут свидетельствовать о консерватизме определенных локусов генома растений в межвидовых сравнениях.

## Выводы

Результаты исследования межсортового и межвидового полиморфизма в пределах семейства *Triticeae* показали, что наиболее дивергентными оказались субгеномы B в межсортовом и B-G в межвидовом сравнении, а наименее в обоих случаях – субгеномы (геном) D. Субгеном A и пара $A\text{-}A^b$ занимала промежуточное положение в сравнении с субгеномами, рассмотренными выше. Анализ полиморфизма некоторых SSR пшеницы в геноме генетически отдаленного вида *Beta vulgaris* выявил ряд консервативных локусов. Некоторые SSR-маркеры пшеницы оказались пригодными для использования в анализе полиморфизма гибридов и линий этой культуры.

## Список литературы

1. Леонова И.Р., Редер М., Будашкина Е.Б. Молекулярный анализ устойчивых к бурой ржавчине интрогрессивных линий, полученных при скрещивании гексаплоидной пшеницы *T. aestivum* с тетраплоидной пшеницей *T. timopheevii* // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 12. – С. 1648-1655.

2. Микросателлиты пшеницы: перспективы использования для картирования генов и анализа реконструированных геномов / Салина Е.А., Леонова И.Р., Редер М., Лайкова Л.И., Майстренко О.И., Будашкина Е.Б., Шумный В.К. // Физиол. раст. – 2001. – Т. 48, № 3. – С. 441-446.

3. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. – М.: Наука, 1985. – 272 с.

4. A 2600-Locus Chromosome Bin Map of Wheat Homoeologous Group 2 Reveals Interstitial Gene-Rich Islands and Colinearity With Rice / Conley E.J., Nduati V., Gonzalez-Hernandez J.L., Mesfin A., Trudeau-Spanjers M., Chao S., Lazo G.R., Hummel D.D., Anderson O.D., Qi L.L., Gill B.S., Echalier B., Linkiewicz A.M., Dubcovsky J., Akhunov E.D., Dvorák J., Peng J.H., Lapitan N.L.V., Pathan M.S., Nguyen H.T., Ma X.-F., Miftahudin, Gustafson J.P., Greene R.A., Sorrells M.E., Hossain K.G., Kalavacharla V., Kianian S.F., Sidhu D., Dilbirligi M., Gill K.S., Choi D.W., Fenton R.D., Close T.J., McGuire P.E., Qualset C.O., Anderson J.A. // Genetics. – 2004. – V. 168. – P. 625-637.

5. Dornte J. Entwicklung, Charakterisierung und Kartierungvon Mikrosatellitenmarkern bei der Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.) // Dissertation PhD. – Universität Gatersleben. – Gatersleben, 2001. – 125 s.

6. QTL mapping of BNYVV resistance from the WB41 source in sugar beet / Gidner S., Lennefors B.-L., Nilsson N.-O., Bensefelt J., Johansson E., Gyllenspetz U., Kraft T. // Genome. – 2005. – V. 48. – P. 279-285.

7. Advanced backcross QTL analysis for the identification of quantitative trait loci alleles from wild relatives of wheat (*Triticum aestivum* L.) / Huang X.Q., Coster H., Ganal M.W., Roder M.S. // Theor. and Appl. Genet. – 2003. – V. 106. – P. 1379-1389.

8. A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome / Kleinhofs A., Kilian A., Maroof M.A.S., Biyashev R.M., Hayes P., Chen F.Q. // Theor. and Appl. Genet. – 1993. – V. 86. – P.705-712.

9. Abundance and length polymorphisms of microsatellite repeats in *Beta vulgaris* L. / Morchen M., Cuguen J., Michaelis G., Hanni C., Saumitou-Laprade P. // Theor. Appl. Genet. – 1996. – 92. – P. 326-333.

10. Chromosome Bin Map of Expressed Sequence Tags in Homoeologous Group 1 of Hexaploid Wheat and Homoeology With Rice and Arabidopsis / Peng J.H., Zadeh H., Lazo G.R.,

Gustafson J.P., Chao S., Anderson O.D. // Genetics. – 2004. – V. 168. – P. 609-623.

11. Deletion Mapping of Homoeologous Group 6-Specific Wheat Expressed Sequence Tags / Randhawa H. S., Dilbirligi M., Sidhu D., Erayman M., Sandhu D. // Genetics. – 2004. – V. 168. – P. 677-686.

12. Fluorescently labeled M13 tagged SSR markers in map construction and assessment of allelic diversity in wheat and durum wheat / Raman R., Thomas A., Imtiaz M., Stodart B., Raman H., Martin P., Hare R., Milgate A., Mackay M. // Proc. X Intern. Wheat Genet. Symposium, 1-6 September 2003. – Roma: SIMI, 2003. – V. 2. – P.798-800.

13. A microsatellite map of wheat / Roder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P. Ganal M.W. // Genetics. – 1998. – 149. – P. 2007-2023.

# БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ ПОИСК РАСТИТЕЛЬНЫХ ГОМОЛОГОВ АССОЦИИРОВАННОЙ С МИКРОТРУБОЧКАМИ ПРОТЕИНКИНАЗЫ MAST2

П.А. КАРПОВ[1], *кандидат биологических наук*;
А.И. ЕМЕЦ[1], *кандидат биологических наук*; В.Г. МАТУСОВ[1];
А.Ю. НЫПОРКО[1], *кандидат биологических наук*;
Е.С. НАДЕЖДИНА[2, 3], *доктор биологических наук*;
Н.Ю. ШАШИНА[3]; Я.Б. БЛЮМ[1], *доктор биологических наук*
[1] Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев
[2] Институт белка РАН, Пущино, Московская область, Россия
[3] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

## Введение

Протеинкиназа MAST2 (microtubule associated serine/threonine protein kinase 2) семейства MAST, принадлежит к группе цАМФ-, цГМФ-зависимых протеинкиназ и протеинкиназ С (AGC) и играет значительную роль в регуляции микротрубочек и клеточного цикла [7, 11]. У животных она отвечает за фосфорилирование дистрофина/утрофина в клетках мозга, модуляцию их сродства к микротрубочкам и ассоциированным с ними белкам (БАМ), образование мультибелкового комплекса при созревании сперматозоидов, а также за взаимодействие с PTEN – регулятором клеточного роста и апоптоза [10, 11].

Считается, что у человека протеинкиназа MAST2 участвует в комплексе фосфорилирования белков микротрубочек посредством БАМ [11]. Взаимодействие MAST2 (Q6P0Q8) с микротрубочками происходит за счет двух доменов – киназного и PDZ (PROSITE: PDOC50106, область 948-1212 аминокислотных остатков) [8, 11]. PDZ домены служат для контакта трансмембранных белков с цитоскелетом, что в свою очередь, обеспечивает фиксированное положение сигнальных комплексов [8].

Несмотря на фундаментальную роль протеинкиназ MAST2 в животных клетках, их растительных гомологи долгое время оставались неизвестными. Недавно нами было показано существование потенциальных гомологов протеинкиназы MAST2 человека у высших растений [1]. Соответственно целью настоящей работы явился расширенный поиск растительных гомологов MAST2, основанный на идентификации характерного для данной группы протеинкиназ комплекса каталитического (S_TKc) и вспомогательного (S_TK_x) доменов.

## Объекты и методы исследования

Для поиска растительных гомологов протеинкиназ, ассоциированных с микротрубочками, использовалась аминокислотная последовательность каталитического комплекса (домены S_TKc и S_TK_x) протеинкиназы MAST2 (Q6P0Q8) человека (*Homo*