

на правах рукописи

БОГДАНОВА

Вера Сергеевна

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ
НЕСОВМЕСТИМОСТИ У ГОРОХА (*PISUM SATIVUM* L.).**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Новосибирск – 2017

Работа выполнена в лаборатории генетики и эволюции бобовых растений
Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный
исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук», г. Новосибирск

Официальные
оппоненты:

Агафонов Александр Викторович,
доктор биологических наук, старший
научный сотрудник, ведущий научный
сотрудник лаборатории интродукции
редких и исчезающих видов растений,
ФГБНУ Центральный сибирский
ботанический сад Сибирского отделения
РАН, г. Новосибирск

Дымшиц Григорий Моисеевич,
доктор биологических наук, профессор,
заведующий кафедрой естественных
наук Специализированного учебно-
научного центра Новосибирского
государственного университета (СУНЦ
НГУ), г. Новосибирск

Константинов Юрий Михайлович,
доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией генетической
инженерии растений ФГБНУ Сибирский
институт физиологии и биохимии
растений Сибирского отделения РАН, г.
Иркутск

Ведущая
организация:

ФГБНУ Институт общей генетики им.
Н.И. Вавилова РАН, г. Москва

Защита диссертации состоится «___» _____ 201__ г. на _____
заседании диссертационного совета Д 003.011.01 по защите диссертаций на
соискание ученой степени кандидата наук, ученой степени доктора наук в ИЦиГ СО
РАН в конференц-зале по адресу: 630090 г. Новосибирск, проспект академика
Лаврентьева, 10, тел. (383) 363-49-06, факс: (383) 333-12-78, e-mail:
dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте
Института <http://www.bionet.nsc.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 201__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Улучшение сельскохозяйственных культур является частью процесса возделывания растений, однако культивируемые в настоящее время сорта имеют ограниченное генетическое разнообразие. В то же время дикие сородичи многих культурных растений существуют в природе и являются потенциальными источниками генетических ресурсов.

Первые же попытки межвидового скрещивания встретились с существенными проблемами в виде несовместимости между дикими родичами и культурными сортами, стерильности гибридов в первом и последующих поколениях, сниженной жизнеспособности (Fernie et al., 2006). Существенную роль в формировании репродуктивной изоляции играет геномный конфликт (Johnson, 2010) по модели Бейтсона-Добжанского-Мюллера, то есть коадаптация разных клеточных геномов, разделение которых при отдаленном скрещивании приводит к внутриклеточному конфликту (Org, 1996). Зачастую репродуктивные барьеры возникают из-за конфликта ядерного и цитоплазматических геномов (Burton et al., 2013).

К началу настоящего исследования в литературе была подробно описана несовместимость пластидных и ядерных геномов, возникающая при скрещиваниях разных видов энотеры (*Oenothera L.*) (Greiner et al., 2011). Были предложены кандидаты на роль генов несовместимости со стороны хлоропластного генома, что стало возможным в результате тотального секвенирования 5 хлоропластных геномов (Greiner et al., 2008 b). Однако генетический анализ ядерных генов, участвующих в конфликте, не проводился. Значительный прогресс в понимании ядерно-цитоплазматического конфликта был достигнут в случае клеточных гибридов пасленовых – красавки (*Atropa belladonna L.*) и табака (*Nicotiana tabacum L.*). Было показано, что нарушение функции хлоропластов табака связано с отсутствием у красавки ядерного гена, осуществляющего редактирование мРНК пластидного гена, кодирующего альфа-субъединицу АТФазы (Schmitz-Linneweber et al., 2005). Участники конфликта со стороны ядерного генома неизвестны.

Напротив, для ядерно-цитоплазматического конфликта, возникающего в отдаленных скрещиваниях пшеницы, был проведен генетический анализ с целью локализации участников со стороны ядерного генома (Simons et al., 2003). С

развитием молекулярно-генетических методов и расшифровкой ядерных геномов растений существенно продвинулся генетический анализ одного из локусов несовместимости, *scs*. Ориентировочная длина участка хромосомы 1D, на котором может содержаться *scs*, была оценена в 1,1 Мб. На основании синтении геномов пшеницы, риса, сорго, коротконожки в этом районе были предсказаны 16 генов (Michalak de Jimenez et al., 2013). Участник (или участники) конфликта со стороны цитоплазматического генома остаются неизвестны.

Посевной горох (*Pisum sativum* L.) имеет диких сородичей, представляющих богатый потенциал в качестве доноров хозяйственно-ценных признаков, таких как устойчивость к разным видам грибных патогенов (Wroth, 1998; Fondevilla et al., 2007; 2011) или гороховой зерновке (Clement et al., 2002; Byrne et al. 2008; Aryamanesh et al., 2014). Однако, при скрещивании культурного гороха с дикими формами у гибридов часто возникают нарушения морфологии в виде уменьшения размеров растений (Ben-Ze'ev, Zohary, 1973), хлорофилльной недостаточности (Лутков, 1930), снижена фертильности пыльцы. В ходе работ, предшествующих настоящему исследованию, было обнаружено, что фенотип гибридов зависел от направления скрещивания, что указывало на нарушение взаимодействия ядра и цитоплазмы при гибридизации.

Для изучения ядерно-цитоплазматического конфликта нами была подобрана удобная модель, которая позволяла в первом же поколении гибридов регистрировать множественные, хорошо заметные глазом проявления конфликта. В качестве такой модели выступали гибриды с участием линии дикого гороха ВИР320, принадлежащей подвиду *Pisum sativum* subsp. *elatius* (Bieb.) Schmalh. Принадлежность модельной линии к тому же виду гороха, *P. sativum* делала возможным проведение гибридологического анализа.

Цель и задачи исследования. Целью работы было исследование генетической основы ядерно-цитоплазматического конфликта, происходящего при скрещивании культурного гороха (*P. sativum*. L. subsp. *sativum*) с дикими сородичами, принадлежащими тому же виду (*Pisum sativum* subsp. *elatius* (Bieb.) Schmalh.).

В работе были поставлены следующие задачи:

1. Описать аномалии фенотипа растений, полученных от скрещивания культурной и дикорастущей формы гороха.

2. Определить клеточный компартмент, ответственный за формирование конфликта цитоплазмы с ядерным геномом.
3. Провести генетический анализ ядерно-цитоплазматического конфликта и определить минимальное число ядерных генов, участвующих в конфликте.
4. Изучить особенности наследования ядерных локусов, участвующих в формировании конфликта.
5. Провести генетическое картирование ядерных генов, участвующих в формировании конфликта.
6. Определить и проаннотировать нуклеотидные последовательности пластидных геномов, совместимых и несовместимых с ядерным геном группы сцепления III культурного гороха.
7. Выдвинуть гены-кандидаты на роль участников ядерно-цитоплазматического конфликта.

Научная новизна работы. В настоящем исследовании впервые описано фенотипическое проявление ядерно-цитоплазматического конфликта у гороха, на модели скрещивания дикорастущего гороха, относящегося к подвиду *P. sativum* subsp. *elatius*, с культурными представителями *P. sativum* subsp. *sativum*. Показано, что данный конфликт связан с несовместимостью ядерного генома культурного гороха с пластидным, но не митохондриальным геномом дикого гороха. Методом генетического анализа впервые показано, что данный конфликт определяется по меньшей мере двумя комплементарными ядерными генами, обозначенными *Scs1* и *Scs2*. В ходе дальнейшего генетического анализа показано, что аллель *Scs1*, происходящий от культурного гороха, на фоне цитоплазмы от ВИР320 является леталью для спорофитов и мужских гаметофитов, и аллель *Scs2*, происходящий от культурного гороха, снижает жизнеспособность мужских гаметофитов, а в гомозиготе приводит к возникновению фенотипа с ярко выраженной ядерно-цитоплазматической несовместимостью. Локусы *Scs1* и *Scs2* локализованы в группах сцепления III и V, соответственно. Определена и впервые проаннотирована нуклеотидная последовательность хлоропластных геномов пяти линий гороха, одной культурной и четырех диких, имеющих пластиды совместимые и несовместимые с ядерным геном *Scs1* культурного гороха. На основании биоинформатического анализа полученных последовательностей,

выдвинуты гены-кандидаты на роль участников конфликта ядра и цитоплазмы: со стороны пластидного генома ген *accD*, кодирующий бета субъединицу карбоксилтрансферазы, входящей в состав пластидной ацетил-коА-карбоксилазы, и со стороны ядерного генома, ген *Vccp3*, кодирующий белок-переносчик биотина и карбоксила, участвующий в работе того же ферментного комплекса. Тем самым впервые описан конфликт ядерного и пластидного генома за счет нарушения белок-белкового взаимодействия. Подобный механизм несовместимости является теоретически ожидаемым, но до сих пор не был описан (Burton et al., 2013). Полученные результаты позволили впервые представить модель ядерно-цитоплазматической несовместимости, включающей как ядерные, так и пластидные гены.

Теоретическая и практическая значимость работы. Изучение генетических основ репродуктивной изоляции представляет собой важную задачу эволюционной биологии. С этой точки зрения описанный в данной работе феномен ядерно-цитоплазматической несовместимости, состоящий в нарушении хлорофилльной пигментации, снижении фертильности пыльцы, общем снижении жизнеспособности гибридов между культурным и диким горохом, представляет собой типичный постзиготический барьер, а описанные в данной работе локусы, имеют важную эволюционную функцию, участвуя в создании репродуктивной изоляции.

Снижение жизнеспособности и фертильности гибридов часто связано с нарушением функционирования пластид или митохондрий, поскольку органеллы в значительной степени зависят от белков, кодируемых в ядре (Даниленко, Давыденко, 2003). Несовместимость клеточных геномов может проявляться на уровне взаимодействия белка, кодируемого в ядре, с белком, ДНК или РНК органелл. Для растений в литературе описаны нарушения взаимодействия белка с митохондриальной РНК (Chase, 2007; Yamagata et al., 2010) и пластидной РНК (Schmitz-Linneweber et al. 2005), описан гипотетический случай нарушения взаимодействия кодируемой в ядре полимеразы с промоторным участком пластидной ДНК (Greiner et al. 2008 b). В настоящей работе впервые представлена модель нарушения белок-белкового взаимодействия между субъединицами ферментного комплекса, кодируемыми в ядре и пластидах. Кроме того, данная

модель позволяет исследовать генетическими методами функционирование важнейшего фермента липидного обмена – пластидной ацетил-коА-карбоксилазы.

С практической точки зрения, знание генетических систем, контролирующих совместимость или несовместимость в скрещиваниях разных форм гороха, существенно облегчит планирование селекционных программ, вовлекающих диких сородичей гороха в качестве доноров хозяйственно-ценных признаков.

Созданная в ходе работы серия рекомбинантных инбредных линий (РИЛ) на основе гибридизации культурного и дикого гороха, может быть использована для генетического картирования и в настоящее время используется с этой целью коллегами из Университета Палацкого, Чешская Республика (договор о сотрудничестве № 018-ЭАО).

Методология и методы диссертационного исследования. Основным методологическим подходом в данной работе являлся гибридологический анализ с использованием оригинальной модели – гибридов культурного и дикого гороха, уже в первом поколении демонстрирующих признаки конфликта внутриклеточных геномов. Использован цитологический анализ хромосом и пыльцы с помощью светового микроскопа, высокопроизводительное секвенирование на платформе Ion Torrent. Генетическое картирование и сборка последовательностей пластидных геномов проводилось с использованием современного программного обеспечения.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Ядерно-цитоплазматический конфликт при скрещивании дикой и культурной форм гороха возникает за счет несовместимости ядерного и пластидного генома.
2. Ядерно-цитоплазматический конфликт возникает при участии как минимум двух несцепленных ядерных генов *Scs1* и *Scs2*, взаимодействующих по модели доминантной комплементации.
3. Наследование аллелей ядерного локуса *Scs1* имеет особенности, связанные с летальностью мужских гаметофитов и спорофитов.
4. Гены, кодирующие субъединицы ферментного комплекса ацетил-коА-карбоксилазы, могут быть номинированы в качестве генов-кандидатов на роль участников ядерно-цитоплазматического конфликта.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов определяется большим числом проведенных экспериментов и публикациями в международных и

отечественных журналах. Достоверность локализации генов, контролирующих ядерно-цитоплазматический конфликт, доказана использованием большого числа растений и нескольких картирующих популяций. Особенности наследования аллелей локусов ядерно-цитоплазматической несовместимости подтверждаются совокупностью результатов по анализу генетического расщепления в разных скрещиваниях и в ряду поколений.

Апробация работы Результаты работы были представлены на Российско-французской конференции «Проблемы и перспективы биотехнологии растений» (Новосибирск, 2008), Международной конференции по генетике, геномике и биотехнологии растений (Новосибирск, 2010), Конференции ВОГиС «Проблемы генетики и селекции». Курсы повышения квалификации научно-педагогических кадров по генетике с основами селекции, медицинской генетики и эволюции (Новосибирск, 2013).

Публикации. Общее число работ по теме диссертации, включая сборники трудов конференций, составляет 19, в том числе 15 статей в изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 198 страницах компьютерного текста, содержит 12 таблиц и 30 рисунков. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, 3 глав с изложением результатов и их обсуждения, заключения, выводов, и списка цитированной литературы, содержащего 136 источников, из них 15 отечественных, приложение, содержащее 1 таблицу.

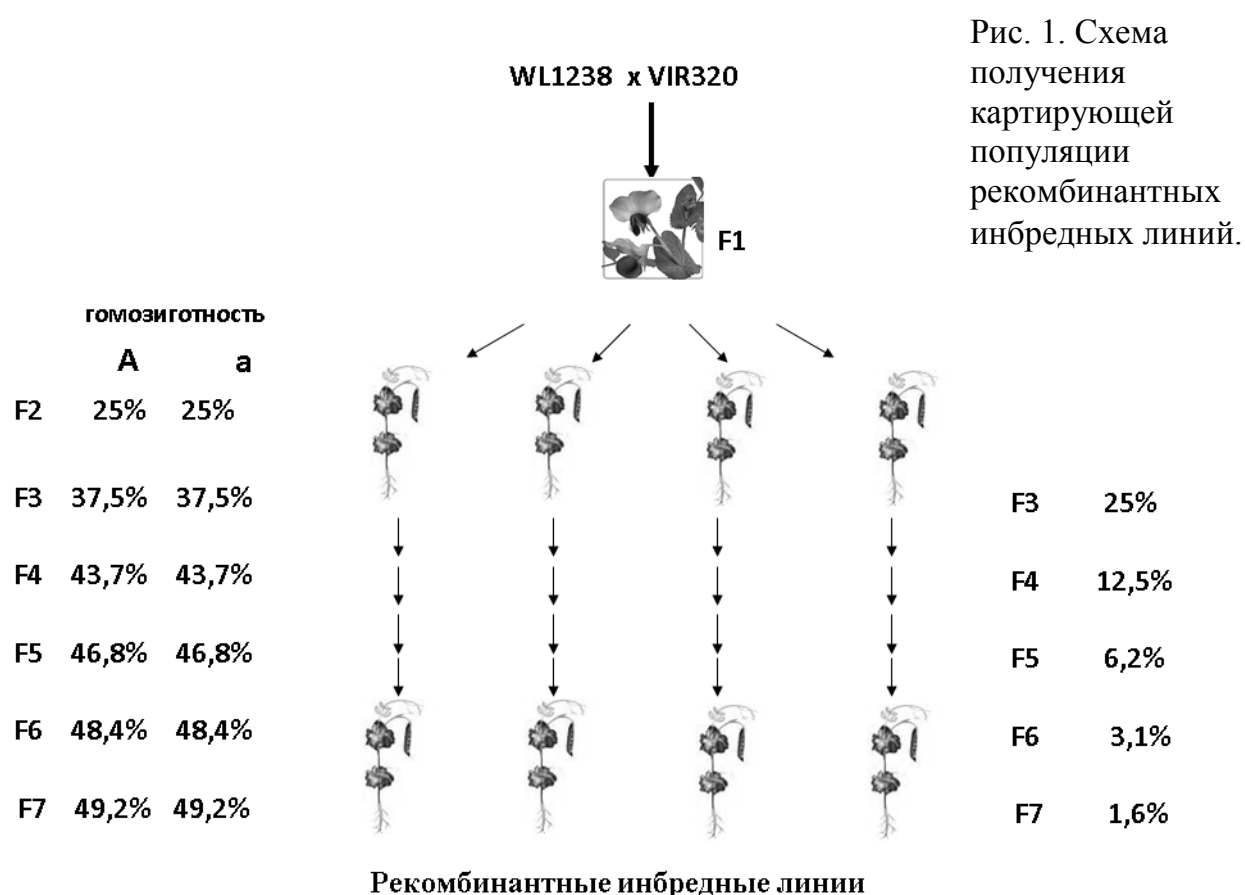
Личный вклад автора. Автору принадлежит постановка цели и задач исследования, обработка, интерпретация и обобщение результатов. Выращивание экспериментальных растений проводилось автором при участии технических сотрудников, их скрещивания производились самостоятельно. Молекулярно-генетическая и биоинформатическая часть экспериментальной работы выполнены автором самостоятельно. Выделение РНК, микроскопический анализ, выделение хлоропластной ДНК, высокопроизводительное секвенирование проведены в сотрудничестве с коллегами из ИЦиГ СО РАН

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 является литературным обзором, в котором представлены сведения о ядерно-цитоплазматическом конфликте у растений с акцентом на несовместимость ядерного и пластидного геномов. Описаны фенотипические проявления конфликта, его генетический анализ и молекулярно-генетические основы.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Для генетического анализа была создана картирующая популяция рекомбинантных инбредных линий (РИЛ) на основе скрещивания WL1238 x ВИР320.



Около 100 растений F₂ размножали самоопылением с отбором одного случайно взятого семени в качестве основателя в следующего поколения, вплоть до F₆ (Рис. 1). В поколении F₆ проводили фенотипирование линий РИЛ в отношении ядерно-цитоплазматической несовместимости путем их скрещивания в качестве источника пыльцы с линией ВИР320 в качестве донора цитоплазмы, индуцирующей ядерно-цитоплазматический конфликт (Рис. 2).

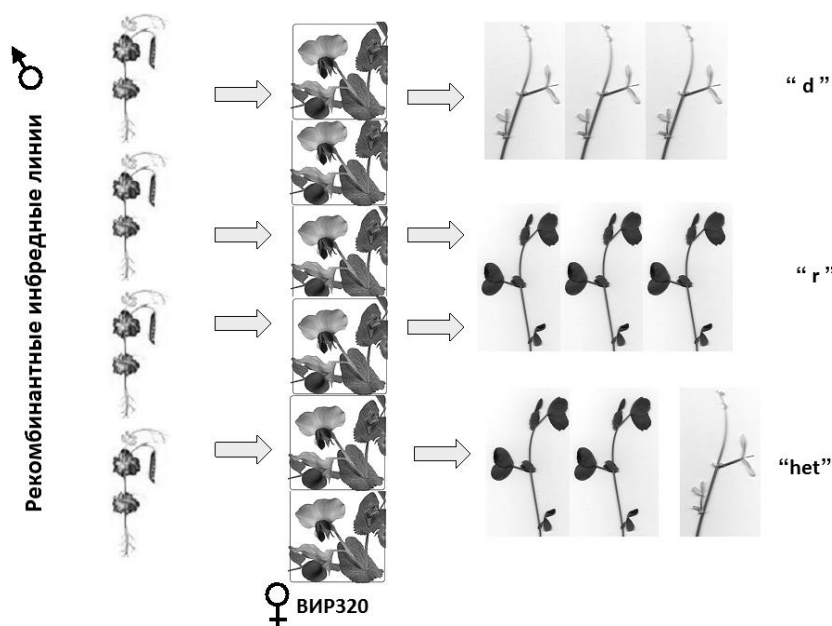


Рис. 2. Схематическое изображение оценки совместимости ядерных генов индивидиальных РИЛ из картирующей популяции с цитоплазмой ВИР320. "d" (от англ. dominant) – доминантный фенотип, "r" (от англ. recessive) – рецессивный фенотип, "het" (от англ. heterozygous) – гетерозигота.

Комбинация ядерного генома и цитоплазмы считалась несовместимой, если ее носители обладали недостаточной хлорофилльной окраской, которая варьировала от белой до бледно-зеленой, и имели изменения морфологии листовых органов в виде редукции листовых пластинок и прилистников.

Для оценки генетической дистанции использовали формулу Холдейна $r = R/(2 - 2R) \times 100$, где r – расстояние на генетической карте в сантиморганах (сМ), R – доля рекомбинантных линий (Haldane, Waddington, 1931). Генетическую карту строили с использованием программы Mapmaker 3.0 (Lander et al., 1987).

Выделение ДНК, ПЦР, расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции проводили как описано в (; Kosterin, Bogdanova, 2008). Секвенирование ПЦР-продуктов производили в ЦКП "Геномика" СО РАН на оборудовании ABI PRIZM с использованием BigDye terminators 3.0 или 3.1 и тех же праймеров, что использовались для амплификации. Пластидную ДНК выделяли согласно (Jansen et al., 2005) с изменениями. Для высокопроизводительного секвенирования образцы пластидной ДНК отправляли в ЦКП "Центр Геномных Исследований" ИЦиГ СО РАН. Последовательности пластидных геномов собирали с использованием оборудования ЦКП "Сибирский суперкомпьютерный центр" при помощи программы MIRA4 (Chevreux et al., 1999).

Образцы гороха включали тестерные линии из коллекции Weibullsholm, Landskrona, образцы, происходящие из дикой природы из коллекций ВИР, Института Джона Иннеса, Пульмановского Института Интродукции растений,

коллекции Г.Лампрехта, коллекции Ф. Мельбауэра, собранные О.Э.Костериным и Ю.А.Трусовым, образцы культурного гороха из коллекции ВИР.

Использовались аллели видных маркеров: *a* (отсутствие антоциановой окраски), *le* (укороченный стебель), *tl-w* (листочки вместо усиков), *d* (отсутствие антоцианового кольца в пазухах прилистников), *wb* (отсутствие воскового налета на прилистниках), *gp* (желтые бобы), *b* (розовые цветки), *k* (редуцированные крылья цветка), *m* (отсутствие мраморной окраски семенной оболочки), *U-st* (антоциановые штрихи на семенной оболочке), *st* (редуцированные прилистники). Используются молекулярные маркеры (с указанием номеров в публичных базах данных), относящиеся к группе сцепления III: *aatC* (L25334), *uni* (AF035163), *Rnp33* (AF255058), *Gsn* (AM238618), *PhlC* (AF280748), *AJ832139* (AJ832139), *bccp3* (GAMJ01025269), *Cbl* (AY883569), *Gpt* (AF020814), *Vc-3* (X14076), и группе сцепления V: *cri* (AF299140), *Met2* (AB176565), *Nca* (FG533805 + GH720541), *scr* (AB048713), *pnp* (AF010578), *Apy* (AB088208), пластидные гены *rbcL* (X03853), *trnK* (NC_014057 с3379-4025), митохондриальный ген *cox1* (X14409).

Глава 3. Фенотипическое описание ядерно-цитоплазматической несовместимости у гороха.

3.1. Фенотипические проявления ядерно-цитоплазматического конфликта.

При использовании ВИР320 в скрещиваниях в качестве материнского растения большинство потомков F₁ имели нарушения хлорофилльной окраски в виде белых или желтоватых секторов на зеленом фоне или зеленых секторов на желтоватом фоне, редуцированные листья и прилистники (Рис. 3), редуцированные боковые корни, цветки с сильно сниженной фертильностью пыльцы, многие растения не давали семян. Асимметрия в фенотипе растений от реципрокных скрещиваний свидетельствовала о наличии ядерно-цитоплазматической несовместимости, при которой страдала функция хлоропластов.



Рис. 3. Фенотип растений F_1 от скрещивания линии ВИР320 в качестве материнского растения. а – растение, проявляющее типичный ядерно-цитоплазматический конфликт; б – растение, частично скомпенсировавшее конфликт; в – растение, практически полностью скомпенсировавшее конфликт.

Данный конфликт мог быть скомпенсирован, о чем свидетельствовало наличие зеленых секторов на листьях, зеленых ветвей, иногда растения целиком имели нормальную хлорофилльную окраску. Далее будет показано, что такое восстановление функции хлоропластов возможно при попадании отцовских пластид к потомкам.

3.2. Связь ядерно-цитоплазматического конфликта с наследованием пластид.

Было изучено проявление маркера хлоропластной ДНК у растений F_1 , полученных от реципрокных скрещиваний линии ВИР320 с тестерной линией Спринт-1. В качестве маркера пластидной ДНК использовали фрагмент гена *rbcL*, кодирующего большую субъединицу рибулозобифосфаткарбоксилазы, который подвергали CAPS-анализу.

Было проанализировано 10 растений F_1 от скрещивания ВИР320 x Спринт-1, все они имели признаки ядерно-цитоплазматической несовместимости в виде нарушения хлорофилльной пигментации и редукции пластинок листочков и прилистников, при этом 3 растения частично скомпенсировали этот конфликт и имели сектора с нормальной зеленой окраской.

У гороха было показано наследование хлоропластов по материнской линии (Polans et al., 1990), поэтому у всех потомков ожидалось наличие двух фрагментов (около 800 и 300 п.о.), соответствующих наличию сайта рестрикции в локусе *rbcL* линии ВИР320. Однако, почти у всех растений в той или иной степени наблюдалась гетероплазмия: 7 растений без признаков преодоления ядерно-цитоплазматического конфликта имели материнский тип *rbcL*-кодирующей хлоропластной ДНК со следами присутствия отцовского варианта (Рис. 4, дорожки 2, 5-9, 11-12), тогда как у трех растений, имеющих сектора нормальной ткани, наблюдалось подавляющее преобладание отцовского типа хлоропластной ДНК (Рис. 4, дорожки 3, 4, 10). (Здесь и далее под отцовским или материнским типом хлоропластной ДНК подразумевается аллель маркерного гена *rbcL*).

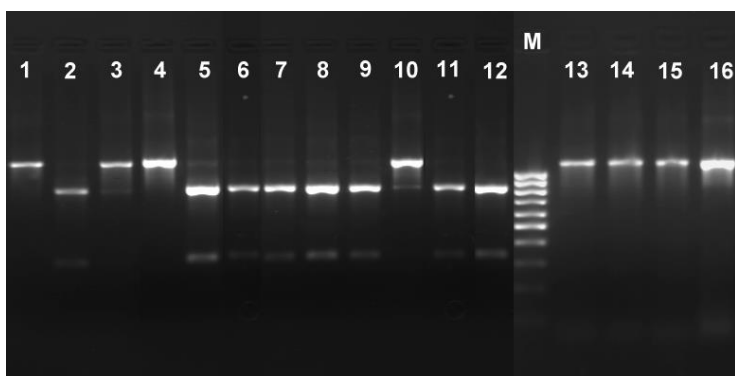


Рис. 4. Фрагмент кодирующей части пластидного гена *rbcL* после обработки рестриктазой *AspLEI*. 1 – родительская форма Спринт-1; 2–11 – индивидуальные растения F_1 от скрещивания ВИР320 x Спринт-1; 12 – родительская форма ВИР320; М – маркер молекулярного веса 100-1000 п.о.; 13–16 – индивидуальные растения F_1 от скрещивания Спринт-1 x ВИР320.

У одного из растений, имеющих сектора нормальной ткани, была проанализирована ДНК, выделенная из зеленых секторов, и ДНК, выделенная из хлоротичных частей. Оказалось, что хлоротичные части имели преобладающим материнский тип хлоропластной ДНК, а зеленые части – отцовский тип (Рис. 5).

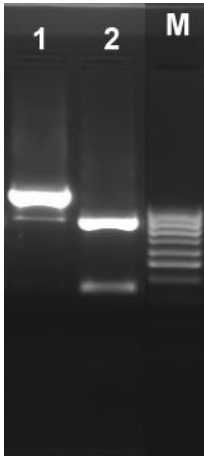


Рис. 5. Фрагмент кодирующей части гена *rbcL* после обработки рестриктазой *AspLEI*. ДНК выделена из одного растения F_1 . 1 – ДНК из зеленых частей; 2 – ДНК из хлоротичных частей листа. М – маркер молекулярного веса 100-1000 п.о. То же растение представлено на Рис. 4, дорожка 10.

На основании полученных данных был сделан вывод, что пластиды, происходящие от линии ВИР320, не могут нормально функционировать в клетках, где половина ядерного генома представлена генетическим материалом от линии Спринт-1. Восстановление зеленой ткани происходит в случае пролиферации отцовских хлоропластов, что не является типичным для гороха, но согласуется с потенциальной возможностью у него двуродительского наследования хлоропластов (Corriveau, Coleman, 1988; Corriveau et al., 1989).

Было проанализировано наследование митохондриальной ДНК у 10 растений F_1 от скрещивания ВИР320 x Спринт-1 и 4 растений F_1 от реципрокного скрещивания (Рис. 6).

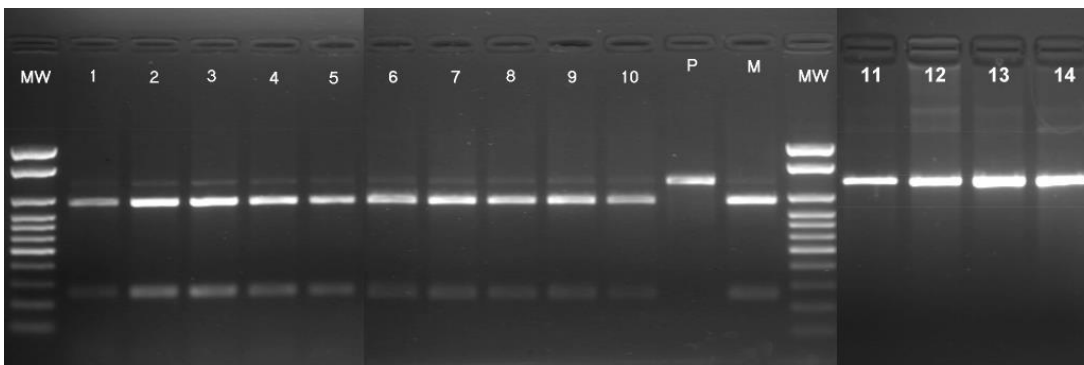


Рис. 6. Митохондриальный маркер *cox1* у индивидуальных растений после ПЦР-амплификации с последующей рестрикцией эндонуклеазрой *PsiI*. Дорожки 1–10 – растения F_1 от скрещивания ВИР320 x Спринт-1. Дорожки 11–14 – растения F_1 от реципрокного скрещивания, Спринт-1 x ВИР320. Р – линия Спринт-1, М – линия ВИР320, MW – маркер молекулярного веса 100–1000 п.о. + 1,5 тыс.п.о. + 2 тыс.п.о.

Расщепление ПЦР-продуктов рестриктазой *PsiI* было неполным, тем не менее, во всех случаях набор и интенсивность фрагментов CAPS-маркера *cox1* неотличимы от материнской формы, указывая на то, что ядерно-

цитоплазматический конфликт не влиял на наследование митохондриального генома, по крайней мере, это справедливо для маркера *cox1*.

3.3. Влияние ядерно-цитоплазматического конфликта на ультраструктуру хлоропластов.

Было проведено электронно-микроскопическое исследование четырех препаратов мезофила растений F₁ следующих типов: 1) гибриды от совместимого скрещивания WL1238 x ВИР320, имеющие нормальный фенотип, далее – «реципрокный гибрид»; 2) гибриды от скрещивания в несовместимом направлении ВИР320 x WL1238 желтовато-белые, визуальны не имеющие хлорофилльной окраски, далее – «желтый сектор»; 3) зеленый сектор на листочке гибрида «несовместимого направления», далее – «зеленый сектор»; 4) гибридное растение от скрещивания в несовместимом направлении, но имеющее зеленую окраску – далее «зеленое растение».

Как и ожидалось, все хлоропласты «желтого сектора» имели аномальную структуру: в неоднородном матриксе пластид наблюдались одиночные стромальные тилакоиды, граны отсутствовали. Зерна аккумулированного крахмала в строме этих органелл не обнаруживались. Такое недоразвитие фотосинтетического аппарата хлоропластов "желтого сектора" хорошо соответствует редукции хлорофилльной окраски на визуальном уровне. Сходные результаты были получены у энотеры (Glick, Sears, 1994). Хлоропласты «реципрокного гибрида», имеющего визуальны нормальный фенотип, имели хорошо развитую тилакоидно-гранальную систему, электронноплотный матрикс и зерна крахмала в строме (Рис. 7). Такими же были хлоропласты и у «зеленого растения». Однако структуру хлоропластов «зеленого сектора» нельзя считать полностью нормальной. Они имели хорошо развитую внутреннюю мембранную структуру, однако наблюдалось неравномерное расширение полостей цистерн тилакоидов в гранях, тилакоиды стромы и граны располагались нерегулярно. Не удалось найти ни одного среза с плотными правильными гранями (Рис. 7).

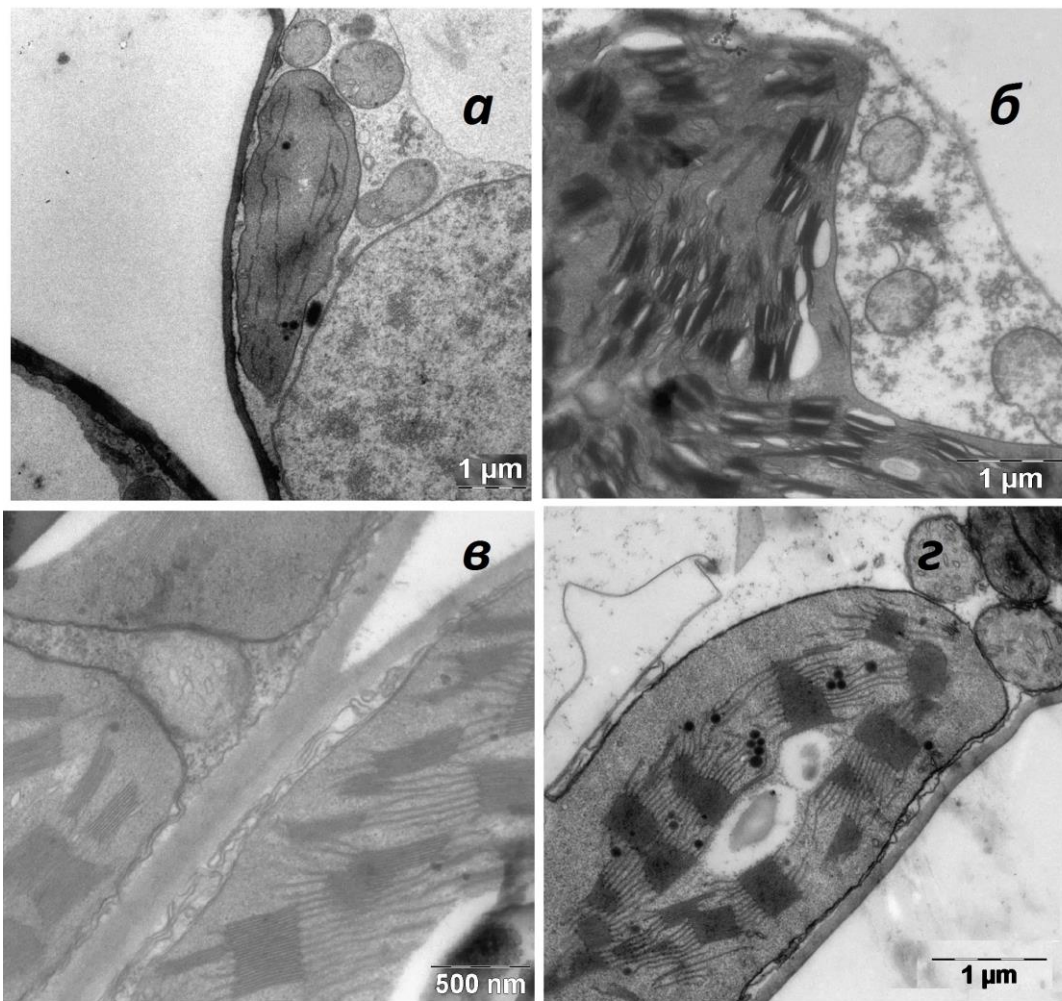


Рис. 7. Электронно-микроскопические фото хлоропластов растений, испытывающих и не испытывающих ядерно-цитоплазматический конфликт. а, сектор с хлорофилльной недостаточностью у растения F_1 от скрещивания ВИР320 x WL1238; б, зеленый сектор у растения F_1 от скрещивания ВИР320 x WL1238; в, полностью зеленое растение F_1 от скрещивания ВИР320 x WL1238; г, растение от реципрокного скрещивания WL1238 x ВИР320.

3.4. Нарушения мейоза как проявление ядерно-цитоплазматической несовместимости.

Был исследован мейоз в пыльниках гибридов F_1 от скрещиваний Спринт-1 x ВИР320 и ВИР320 x Спринт-1.

У гибрида от несовместимого направления скрещивания ВИР320 x Спринт-1 наблюдаются аномалии уже в первом делении мейоза (Рис. 8, а, б, в). Расхождение хромосом в анафазе I происходит асинхронно, две, реже одна, хромосомы не участвуют в расхождении к полюсам (Рис. 8, а) и наблюдаются в экваториальной зоне деления клеток вплоть до телофазы I (Рис. 8, б).

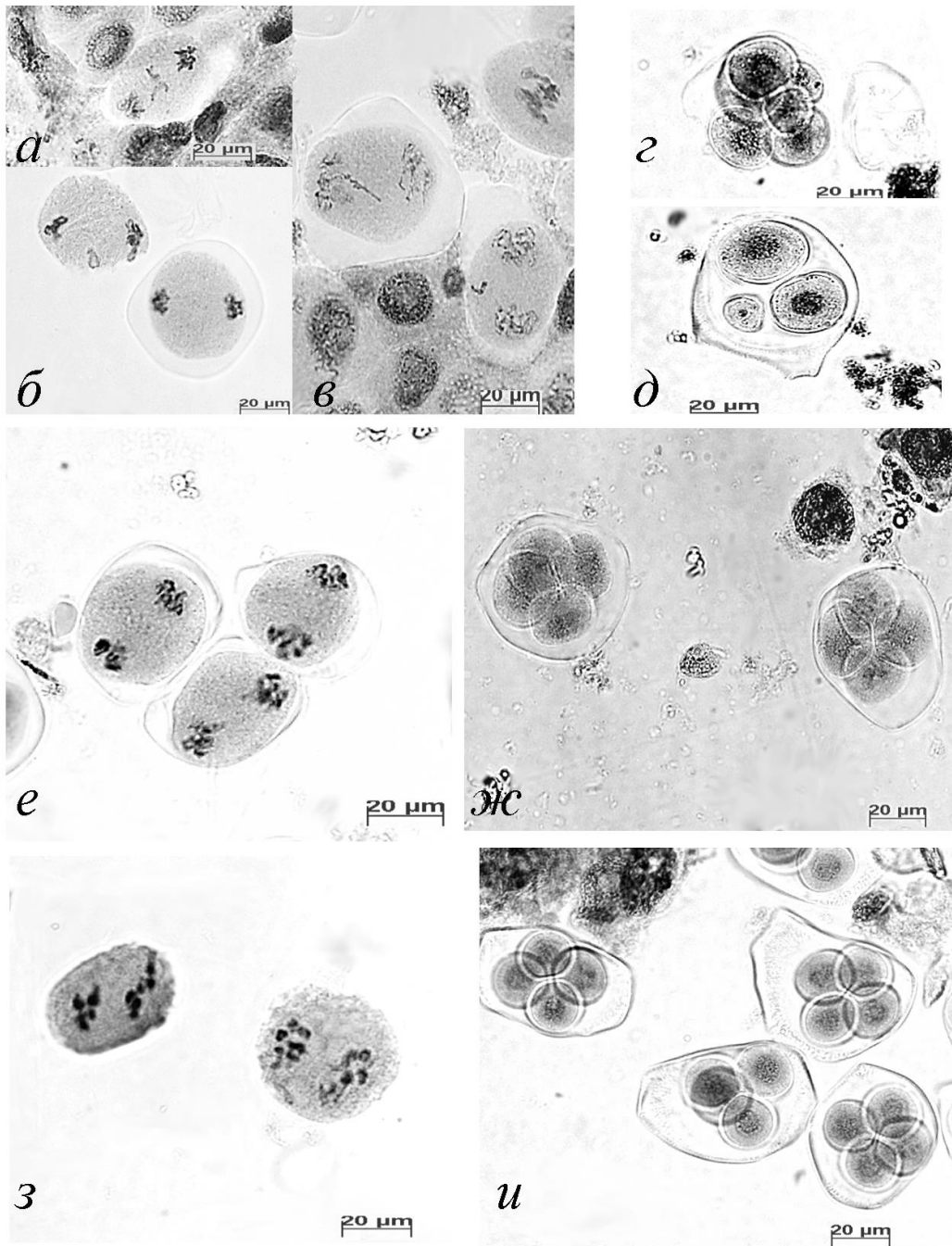


Рис. 8. Мейоз в материнских клетках пыльцы у реципрокных гибридов F_1 линии ВИР320. а-д – ВИР320 х Спринт-1; анафаза I, телофаза I и микроспоры, образовавшиеся в результате аномального цитокинеза; е, ж – Спринт-1 х ВИР320; анафаза I и тетрады микроспор; з, и – зеленые ветки гибрида ВИР320 х Спринт-1; анафаза I и тетрады микроспор.

Во время второго деления мейоза возможно деление отставших хромосом на хроматиды, однако включение их в состав вновь формирующихся ядер в телофазе II не происходит. Цитокинез у гибрида ВИР320 х Спринт-1 в связи с этим проходит аномально, и наряду с тетрадами микроспор формируются триады, пентады и гексады (Рис. 8, г, д). В пыльниках цветков гибридов совместимого направления,

Спринт-1 x ВИР320, нарушения в процессе мейоза наблюдаются значительно реже, задержки хромосом при расхождении к полюсам не происходит (Рис. 8, е), формирование тетрад микроспор проходит нормально (Рис. 8, ж). В пыльниках, взятых с зеленых веток ВИР320 x Спринт-1, у которых пластиды происходят от отцовского растения Спринт-1, нарушения мейоза также редки (Рис. 8, з, и).

Глава 4. Генетический анализ ядерно-цитоплазматической несовместимости у гороха.

4.1. Выявление ядерных генетических факторов, участвующих в конфликте ядра и пластид

Линии картирующей популяции РИЛ (Рис. 1) были охарактеризованы с точки зрения способности вызывать ядерно-цитоплазматический конфликт при скрещивании в качестве источника пыльцы с линией ВИР320. При этом ожидается, что те линии РИЛ, которые унаследовали аллель (аллели) фактора (факторов) несовместимости от WL1238, будут давать потомство с типичными признаками ядерно-цитоплазматического конфликта в виде хлорофилльной недостаточности, а также с сильной редукцией листочков и прилистников. Далее в тексте подобный фенотип обозначен как "абберрантный". Те же линии РИЛ, которые унаследовали аллель (аллели) фактора (факторов) несовместимости от ВИР320, должны давать потомство без явных признаков ядерно-цитоплазматического конфликта (Рис. 2).

Из 95 проанализированных РИЛ 32 давали абберрантное потомство, 57 – неабберрантное (Рис. 9) и 6 давали оба типа потомков. Последние считались гетерозиготами и были исключены из дальнейшего анализа.



Рис. 9. Фенотип растения F_1 от скрещивания ВИР320 с линиями из популяции РИЛ. Растение без явно выраженных проявлений ядерно-цитоплазматического конфликта, сочетающее бледно-зеленые и темно-зеленые участки, несущие "незаконно" унаследованные отцовские пластиды.

Фактор, ответственный за ядерно-цитоплазматическую несовместимость, был обозначен как *Scs*, по аналогии с геном пшеницы (*scs*), имеющим сходный эффект (Маан, 1992, а). Использованная тестерная линия WL1238 несет ряд фенотипических маркеров в группах сцепления LGII, III, V, VI. Оценки генетического расстояния между *Scs* и видимыми маркерами, сегрегирующими в популяции РИЛ, приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Число линий РИЛ с указанными генотипами среди линий, дающих потомство имеющее ("d" класс) и не имеющее ("r" класс) явные признаки ядерно-цитоплазматического конфликта, и расстояния между *Scs* и видимыми маркерами, рассчитанные по формуле Холдейна (Haldane, Waddington, 1931).

Маркер	Группа сцепления	"d" класс		"r" класс		Генетическое расстояние (сМ)
		Аллель указанного маркера, унаследованный от WL1238	Аллель указанного маркера, унаследованный от ВИР320	Аллель указанного маркера, унаследованный от ВИР320	Аллель указанного маркера, унаследованный от WL1238	
<i>wb</i>	II	14	18	21	36	39,0
<i>k</i>	II	11	21	22	35	84,8
<i>le</i>	III	13	19	35	22	42,7
<i>b</i>	III	22	10	34	23	29,5
<i>m</i>	III	21	11	30	26	36,3
<i>tl</i>	V	16	15	26	26	48,8
<i>gp</i>	V	32	0	26	31	26,7
<i>fl</i>	VI	13	19	31	26	51,1
<i>pl</i>	VI	18	14	27	29	47,8

Были проанализированы молекулярные маркеры группы сцепления III: *aatC*, *uni*, *Rnp33*, *PhlC*, *Cbl*, *Gsn*, *Gpt*, *Vc-3*. С помощью программы Mapmaker 3.0 ген *Scs* был картирован между *PhlC* и *Cbl* (Рис. 10).

Генетические дистанции, определенные по формуле Холдейна, составили: 16,2 сМ между *Scs* и *PhlC* и 22,0 сМ между *Scs* и *Cbl*, тем самым определив *PhlC* как ближайший маркер к *Scs*. Далее в тексте аллели, происходящие от линии WL1238 или ВИР320, обозначаются как символ гена с подчеркиванием и номером родительской линии, например, *PhlC_1238* и *PhlC_320*.

Полученные оценки генетических расстояний были противоречивыми. Во-первых, их сумма сильно превосходила расстояние между окаймляющими маркерами *PhlC* и *Cbl* (22,5 сМ). Во-вторых, расстояние между *Scs* и *PhlC*, подсчитанное отдельно для линий класса "d", составило 1,6 сМ, что разительно

отличалось от того же расстояния, подсчитанного для класса "r" (32,4 сМ). Линии, несущие аллель *PhlC_320*, в своем большинстве не давали типичных признаков ядерно-цитоплазматического конфликта, тогда как среди линий, несущих аллель *PhlC_1238* было значительное число представителей как класса "r", так и класса "d". Таким образом, был сделан вывод, что (1) генетический фактор *Scs* тесно сцеплен с геном *PhlC* и (2) в популяции РИЛ сегрегирует дополнительный фактор, который, в сочетании с *Scs*, необходим для развития типичного синдрома ядерно-цитоплазматической несовместимости. Среди линий гомозиготных по *PhlC_1238*, была обнаружена сильная корреляция между принадлежностью линии к классу "d" или "r" и вариабельностью в локусе *gp* (Табл. 2). Генетические расстояния между маркерами LGV, подсчитанные по формуле Холдейна, показаны на Рис. 10, б.

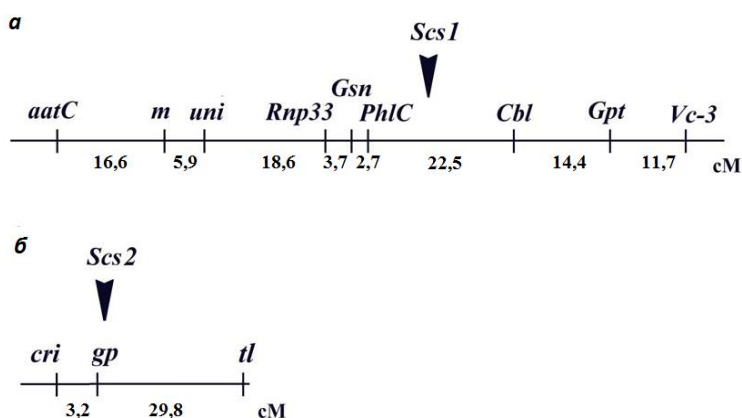


Рис. 10. Изученные генетические маркеры на рекомбинационной карте группы сцепления LGIII (а) и LGV (б).

Таблица 2. Число линий РИЛ, дающих и не дающих синдром ядерно-цитоплазматической несовместимости при скрещивании с ВИР320 и гомозиготных по указанному аллелю генов *PhlC* и *gp*.

Аллель <i>PhlC</i> (LGIII), унаследованный от указанного родителя	Аллель <i>gp</i> (LGV), унаследованный от указанного родителя	Число линий, совместимых с цитоплазмой ВИР320, класс "r"	Число линий, несовместимых с цитоплазмой ВИР320, класс "d"
1238	1238	2	31
1238	320	20	0
320	1238	29	1
320	320	6	0

Из данных Таблицы 2 был сделан вывод, что типичный синдром ядерно-цитоплазматической несовместимости обусловлен двумя ядерными генами, один из которых сцеплен с геном *PhlC* группы сцепления III, и второй сцеплен с геном *gp* группы сцепления V. Первый из этих генов был обозначен *Scs1* (вместо использованного ранее временного обозначения *Scs*), и второй – *Scs2*. Ядерно-цитоплазматический конфликт, в виде сильной хлорофилльной недостаточности с окраской, варьирующей от бледно-зеленой до желтоватой и беловатой, часто мозаичной, и редукции листовых органов, развивается при условии, что цитоплазма унаследована от дикорастущего родителя, ВИР320, а аллели обоих генов *Scs1* и *Scs2*, происходящие от WL1238 находятся в гетерозиготе, то есть *Scs1_1238* и *Scs2_1238* являются доминантными. Если только один из *Scs* локусов гетерозиготен, а второй гомозиготен по аллелю от дикого родителя, ядерно-цитоплазматический конфликт в его типичной форме не развивается, так что растения F₁ имеют светло-зеленую окраску и нормальную морфологию листовых органов, хотя может наблюдаться редукция прилистников на верхних узлах (Рис. 11).



Рис. 11. Фенотип растения F₁ от скрещивания ВИР320 с линиями из популяции РИЛ. Растение без явно выраженных проявлений ядерно-цитоплазматического конфликта, имеющее редуцированные прилистники на верхних узлах.

4.2. Особенности наследования генов *Scs1* и *Scs2*.

В F₂ от скрещивания ВИР320 с некоторыми РИЛ анализировали наследование аллелей локусов *PhlC* и *cri*, сцепленных с *Scs1* и *Scs2*, соответственно. У 45 потомков F₂ от скрещивания ВИР320 × РИЛ-52, где линия РИЛ-52 несла аллели *PhlC_1238* и *Gp_320*, проанализировали расщепление аллелей *PhlC*. Из 45 растений 17 были гетерозиготны по *PhlC*, и 28 были гомозиготами по аллелю *PhlC_320*. Гомозиготы по аллелю *PhlC_1238* отсутствовали. На этом основании было

выдвинуто предположение, что на фоне цитоплазмы, происходящей от ВИР320, аллель *Scs1_1238* является гаметофитной и/или рецессивной спорофитной леталью.

В F₂ от скрещивания ВИР320 x РИЛ-116 было проанализировано расщепление по аллелям локуса *cri*, сцепленного с *Scs2* (Рис. 10, б). Линия РИЛ-116 была гомозиготна по *cri_1238* и *PhlC_320*. Среди 50 проанализированных растений 26 оказались гетерозиготами по гену *cri*, и 24 были гомозиготны по аллелю *cri_320*. Вероятной причиной отсутствия гомозигот *cri_1238* считали гаметофитную и/или спорофитную летальность гена *Scs2* на фоне цитоплазмы от образца ВИР320, также как и в случае гена *Scs1*.

4.3. Фенотипическое проявление генов *Scs1* и *Scs2*.

Была изучена фертильность пыльцы у гибридов F₁, полученных от скрещивания ВИР320 в качестве донора цитоплазмы с 60 линиями картирующей популяции РИЛ. Аллельное состояние локусов *Scs1* и *Scs2* определяли, исходя из аллельного состояния тесно сцепленных маркеров в группах сцепления LGIII и LGV, *PhlC* и *gp*, соответственно.

Таблица 3. Фертильность пыльцы в F₁ от скрещивания ВИР320 с линиями из популяции РИЛ, имеющими указанное аллельное состояние локусов *Scs1* и *Scs2*.

<i>Scs1</i>	<i>Scs2</i>	Число линий	диапазон значений фертильности пыльцы	среднее значение со стандартной ошибкой	стандартное отклонение
320	320	5	0,94 – 0,96	0,950 ± 0,003	0,007
1238	320	20	0,42 – 0,59	0,509 ± 0,010	0,043
320	1238	28	0,44 – 0,91	0,691 ± 0,022	0,115
1238	1238	7	0,21 – 0,41	0,329 ± 0,033	0,087

Потомки F₁, гомозиготные по аллелям *scs1_320* и *scs2_320* (строка 1) имели высокофертильную пыльцу. Растения F₁, гомозиготные по одному из генов совместимости и гетерозиготные по второму (строки 2 и 3 в Табл. 3), имели сниженную фертильность пыльцы, хотя сами растения выглядели вполне нормально (Рис. 9, 11). Гетерозиготы по локусу *Scs1* (строка 2 в Табл. 3), как правило, имели более низкую фертильность пыльцы (в среднем 0,509), чем гетерозиготы по локусу *Scs2* (строка 3 в Табл. 3) со средним значением 0,691.

Числовое значение фертильности пыльцы у двойных гетерозигот, 0,329, приблизительно равно произведению средних значений фертильности пыльцы в классах гетерозигот по одному гену совместимости ($0,691 \cdot 0,509 \approx 0,352$).

Раздел 4.4. описывает маркеры и линии, использованные для генетического анализа.

4.5. Влияние аллельного состояния *Scs1* на жизнеспособность мужских гаметофитов.

Жизнеспособность мужских гаметофитов, несущих аллель *Scs1* от культурного гороха, на фоне цитоплазмы дикого гороха линии ВИР320 проверяли в анализирующем скрещивании. В качестве тестерной линии использовали *st320*, маркированную аллелем *st* (редуцированные прилистники) группы сцепления III, которую опыляли пыльцой растений, гетерозиготных по локусу *Scs1*. При таком скрещивании, если все мужские гаметофиты жизнеспособны, ожидаемое расщепление составит 1 *St* : 1 *st* (Рис. 12).

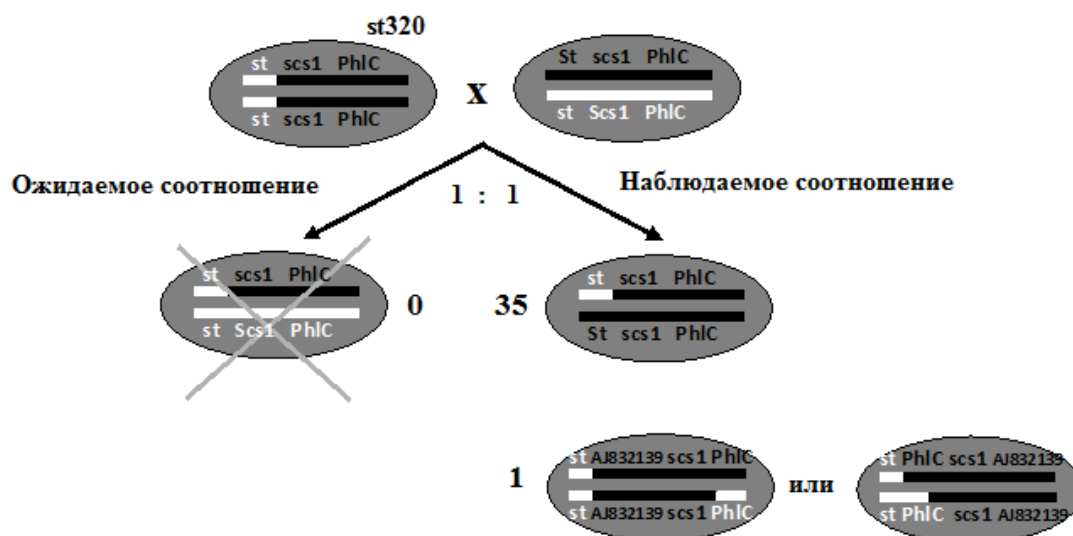


Рис. 12. Схема анализирующего скрещивания для оценки жизнеспособности мужских гаметофитов, несущих аллель *Scs1* культурного гороха на фоне цитоплазмы дикого гороха. Маркеры, обозначенные черным цветом, происходят от дикого гороха ВИР320, обозначенные белым цветом – от культурного гороха WL1072. Перекрышенные линии символизируют гибель мужских гаметофитов.

Из 36 полученных растений 35 имели нормальные прилистники, и одно растение имело редуцированные прилистники. Высокая фертильность пыльцы у

этого растения (>90%) предполагала, что оно, вероятно, было гомозиготой по аллелю *scs1_320*. CAPS-анализ показал, что указанное растение было гетерозиготным по *PhlC* и гомозиготным по аллелю *AJ832139_320*. Таким образом, не было зарегистрировано ни одного растения, которое возникло бы за счет вклада гаметофита, несущего аллели культурного гороха одновременно обоих окаймляющих маркеров, *PhlC* и *AJ832139*. На основании полученных данных был сделан вывод, что аллель *Scs1* культурного гороха является леталью для мужских гаметофитов на фоне цитоплазмы дикого гороха линии ВИР320.

4.6. Влияние аллельного состояния *Scs1* на жизнеспособность спорофитов.

Жизнеспособность спорофитов, гомозиготных по *Scs1_1238*, проверяли в анализирующем скрещивании. Сначала были получены гетерозиготы по маркерам LGIII, включая *Scs1* и *st*, при этом гомозиготные по аллелю *scs2_320*. Их опыляли пыльцой тестерных линий WL1072 и WL851, гомозиготных по аллелю *st*. Ожидаемое расщепление в потомстве от анализирующего скрещивания 1 *St* : 1 *st*. Если же гомозиготы *st/st* погибают, все потомки будут иметь нормальные, нередуцированные прилистники (Рис. 13).

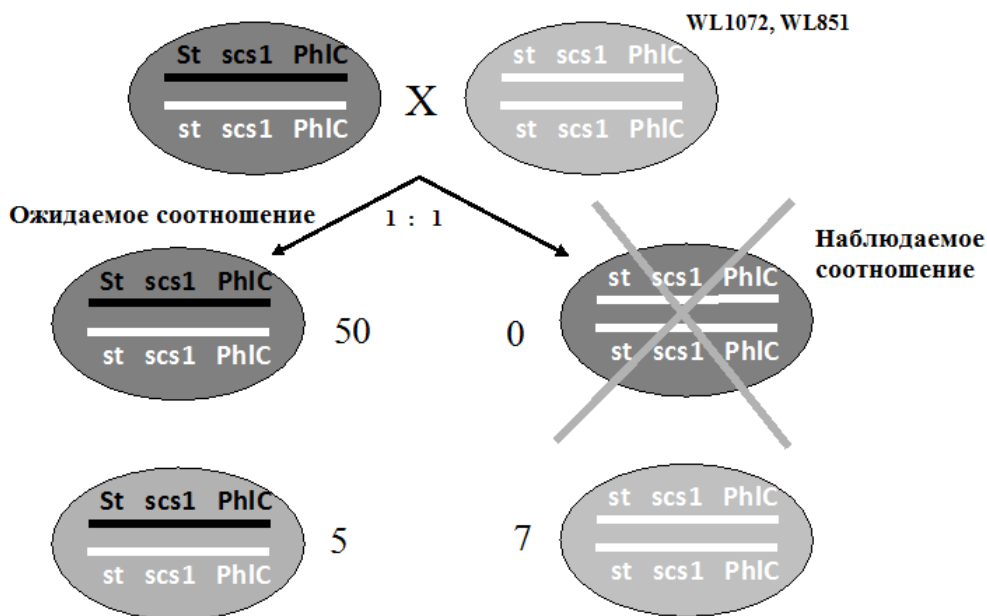


Рис. 13. Схема анализирующего скрещивания для оценки жизнеспособности спорофитов, гомозиготных по аллелю *Scs1* культурного гороха на фоне цитоплазмы дикого гороха. Светло-серым цветом показана цитоплазма, происходящая от культурного гороха, темно-серым цветом – от дикого гороха. Маркеры, обозначенные черным цветом, происходят от дикого гороха ВИР320,

обозначенные белым цветом – от культурного гороха WL1072 или WL851. Перекрещенные линии символизируют гибель спорофитов.

Из 62 полученных растений 50 имели нормальные прилистники (St), у них наблюдался ядерно-цитоплазматический конфликт из-за того, что тестерные линии WL1072, WL851 привносили аллель *Scs2*, несовместимый с цитоплазмой ВИР320. Остальные 12 растений (5 St и 7 st) имели ярко-зеленую окраску. CAPS-анализ гена *rbcL* показал, что у них присутствовала отцовская пластидная ДНК. Был сделан вывод, что аллель *Scs1* от культурного гороха является рецессивной спорофитной леталью на фоне цитоплазмы от дикого гороха линии ВИР320.

4.7. Влияние аллельного состояния *Scs2* на жизнеспособность мужских гаметофитов.

Для определения летальности аллеля *Scs2* культурного гороха для мужских гаметофитов, изучали наследование сцепленного видимого маркера *gp* в анализирующем скрещивании. Тестерную линию опыляли пыльцой растений F₁, гетерозиготных по генам *gp* и *Scs2*, полученных от скрещивания ВИР320 x РИЛ-65 (Рис. 14).

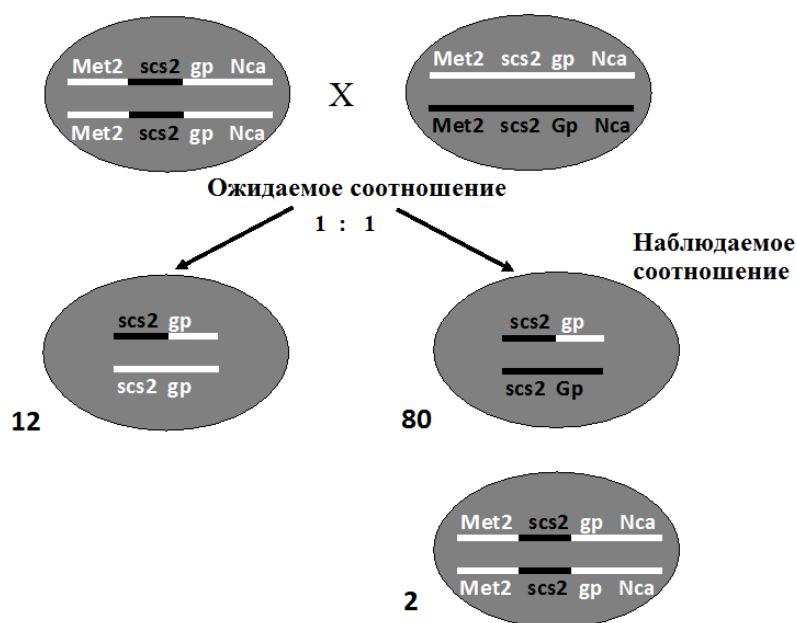


Рис. 14. Схема анализирующего скрещивания для оценки жизнеспособности мужских гаметофитов, несущих аллель *Scs2* культурного гороха на фоне цитоплазмы дикого гороха. Маркеры, обозначенные черным цветом, происходят от дикого гороха ВИР320, обозначенные белым цветом – от культурного гороха.

Свидетельством жизнеспособности мужских гаметофитов, несущих аллель *Scs2_1238*, является появление в потомстве растений с желтыми бобами (*gp*), возникших за счет вклада гаметофитов *gp_1238 Scs2_1238*. Из 94 полученных растений 14 были *gp*. Из них 2 растения имели полностью фертильную пыльцу, то есть согласно принятым критериям, они были гомозиготами по аллелю *scs2_320*. Вероятно, они возникли за счет кроссинговера между *gp* и *scs2*. Был сделан вывод, что мужские гаметофиты, несущие аллель *Scs2_1238* на фоне цитоплазмы дикого гороха ВИР320, являются жизнеспособными. Доля гаметофитов, несущих данный аллель, вместо ожидаемой 1/2 составляет 12/94, или около 1/8.

4.8. Влияние аллельного состояния *Scs2* на жизнеспособность спорофитов.

Чтобы определить, связан ли локус *Scs2* со спорофитной летальностью, было проведено анализирующее скрещивание, в котором гетерозиготы по *Scs2* опыляли пыльцой тестерной линии, гомозиготной по *Scs2_1238*. В случае летальности спорофитов в потомстве будут отсутствовать гомозиготы по сцепленным маркерам LGV, в том числе *gp*. Если спорофиты, гомозиготные по *Scs2_1238*, жизнеспособны, то ожидается расщепление по маркерам LGV в соотношении 1:1. Было получено 82 растения, 45 из них были *Gp* и 37 – *gp*, что хорошо соответствует 1:1. Был сделан вывод, что гомозиготы по аллелю *Scs2_1238* на фоне цитоплазмы ВИР320 жизнеспособны. Они имели редуцированные листовые органы, слабую хлорофилльную пигментацию, фертильность пыльцы составляла около 20-30%.

4.9. Картирование локуса *Scs1*.

В потомстве F₂ от скрещиваний ВИР320 x РИЛ-52, 46 (где РИЛ 52 и 46 были гомозиготны по аллелям *Scs1_1238* и *scs2_320*) определяли аллельное состояние маркеров *PhlC* и *AJ832139* CAPS-анализом, аллельное состояние *scs1* оценивали по фертильности пыльцы (Рис. 15). Из 103 растений 48 имели полустерильную пыльцу и были отнесены к классу гетерозигот по *Scs1*, и 55 растений имели фертильную пыльцу и были отнесены к классу гомозигот по *scs1_320*. Соотношение генотипических классов близкое к 1:1 свидетельствует о гибели гаметофитов, несущих аллель *Scs1_1238*.

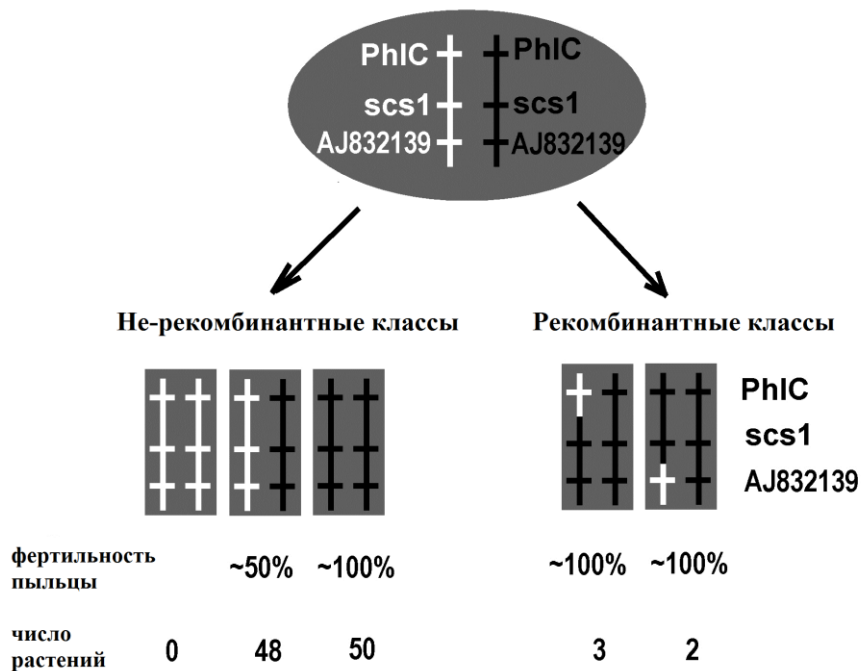


Рис. 15. Схема картирования локуса *Scs1* по отношению к маркерам LGIII. Маркеры, обозначенные черным цветом, происходят от дикого гороха ВР320, обозначенные белым цветом – от культурного гороха WL1238.

Генетическая карта участка LGIII, содержащего проанализированные гены приведена на Рис. 16. В соответствии с этой картой локус *Scs1* попадает в интервал размером около 2,5 сМ между маркерами *PhlC* и *AJ832139* (Рис. 17).

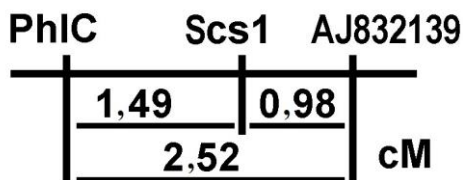


Рис. 16. Генетическая карта фрагмента LGIII, содержащего локус *Scs1*.

4.10. Картирование локуса *Scs2*.

Было проведено анализирующее скрещивание, в котором гетерозиготы по ряду маркеров группы сцепления LGV, включая *Scs2*, опыляли гомозиготной тестерной линией *gr37*. Было получено 102 потомка, у которых определяли аллельное состояние молекулярных маркеров CAPS-анализом. Аллельное состояние *Scs2* определяли подсчетом фертильности пыльцы. Растения с фертильностью пыльцы 60-80% считали гетерозиготами по *Scs2* и с фертильностью пыльцы 90-100% – гомозиготами по *scs2_320*. На основании полученных данных была построена генетическая карта участка LGV (Рис. 17, А).

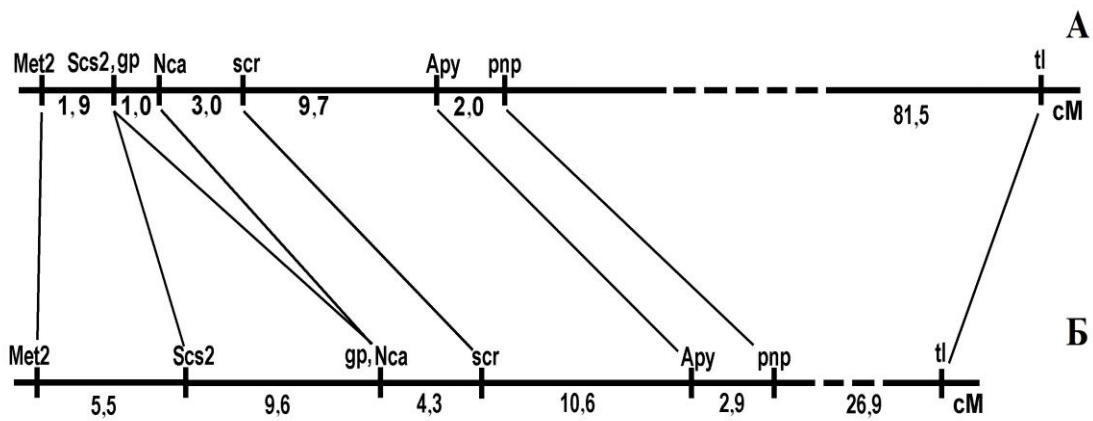


Рис. 17. Генетическая карта сегмента LGV, включающего локус *Scs2*, построенная при помощи программы Mapmaker 3.0, в двух экспериментах. А, карта, полученная в эксперименте по картированию *Scs2*; Б – карта, полученная в эксперименте по изучению жизнеспособности спорофитов, гомозиготных по *Scs2_1238*.

Описанный выше эксперимент по определению жизнеспособности спорофитов, гомозиготных по *Scs2_1238*, проводился с использованием анализирующего скрещивания, по его данным была построена генетическая карта участка LGV (Рис. 17, Б). Две полученные карты существенно различаются.

4.11. Существование генов, взаимодействующих с *Scs2*.

Частота появления в F_2 гомозигот по аллелю *Scs2_1238*, определяемая по характерному фенотипу, как правило, в сочетании с *gp*, варьировала в скрещиваниях ВИР320 с 9 разными РИЛ от 1/4 до 1/100. В 7 случаях доля растений, гомозиготных по *Scs2_1238*, не отличалась статистически от 1/16 (χ^2 варьировало от 1,30 до 3,67, $0,05 < p < 0,3$). Это выглядит логичным, поскольку в эксперименте по определению жизнеспособности мужских гаметофитов доля носителей *Scs2_1238* составила приблизительно 1/8, а в эксперименте по определению жизнеспособности спорофитов доля женских гаметофитов, несущих этот аллель, составила около 1/2. Сделан вывод, что жизнеспособность носителей аллеля *Scs2_1238* на фоне цитоплазмы ВИР320 зависит от аллельного состояния других локусов, которое варьирует от линии к линии.

Глава 5. Гены-кандидаты на роль участников ядерно-цитоплазматического конфликта у гороха.

Для определения участника (или участников) ядерно-цитоплазматического конфликта со стороны пластид при помощи высокопроизводительного

секвенирования были определены последовательности пластидных геномов пяти образцов, WL1238 представлял культурный горох, и четыре образца, ВИР320, L100, Л1794, 721 представляли линии дикорастущего гороха, относящегося к подвиду *Pisum sativum* subsp. *elatius*. При этом пластидные геномы двух линий, L100 и ВИР320 несовместимы, и двух, Л1794 и 721, совместимы с ядерным геном *Scs1* культурной линии WL1238 (Bogdanova et al., 2014).

В разделе 5.1. дается общая характеристика реконструированных пластидных геномов.

5.2. Поиск пластидных генов-кандидатов, вовлеченных в ядерно-цитоплазматический конфликт.

Особенности первичной структуры, которые отличали несовместимые пластидные геномы L100 и ВИР320 от пластидных геномов трех остальных линий, считали кандидатами, ответственными за несовместимость с ядром. Было выявлено 37 таких кандидатов, в 14 некодирующих районах и 7 белок-кодирующих локусах. Для начала было принято, что наиболее вероятной причиной несовместимости является изменение первичной структуры белка. Круг кандидатов сузился до четырех локусов, *accD* с 8 аминокислотными заменами и 3 инсерциями/делециями, *groB* с 1 аминокислотной заменой, *ycf1* с 3 аминокислотными заменами и *ycf2* с 2 аминокислотными заменами в белковых продуктах указанных генов.

5.3. Поиск ядерных генов, функционально связанных с пластидными генами-кандидатами.

Ядерно-цитоплазматический конфликт вероятен, если полипептиды, входящие в состав мультимерных комплексов, кодируются в ядре и пластидах и при этом плохо подходят друг к другу (Burton et al., 2013). Тогда пластидный ген-кандидат будет иметь ядерный ген-партнер, расположенный на генетической карте в районе, где локализован ген несовместимости *Scs1*.

Исходя из синтении между геномами бобовых растений (Kalo et al., 2004), среди аннотированных последовательностей модельного объекта *Medicago truncatula* искали такие, которые кодируют белки, участвующие в работе мультимерных комплексов с участием продуктов пластидных генов-кандидатов. Ген *Scs1* гороха локализован в интервале около 2,5 сМ между локусами,

кодирующими фосфолипазу С и белок семейства GRAS (Рис. 16, 18, А, Б). Гомологи данных маркеров у *M. truncatula* ограничивают отрезок ДНК последовательности NC_016409.1 (*Medicago truncatula* chromosome 3) длиной 1 146 982 п.о. (Рис. 18, В), содержащий 166 аннотированных генов продуктов, среди которых обнаружился "белок-носитель биотина и карбоксила ацетил-коА карбоксилазы" (GeneID:11410363), который указывает на *accD* как ген с комплиментарной функцией. Наиболее вероятным кандидатом на роль участника ядерно-цитоплазматического конфликта становится пластидный ген *accD*, и впервые в мировой практике номинируется кандидат на роль ядерного участника конфликта. Данный ген был обозначен *Vccp3* (по номеру хромосомы *M. truncatula*). Предполагается идентичность *Vccp3* с ранее изученным генетически *Scs1*.

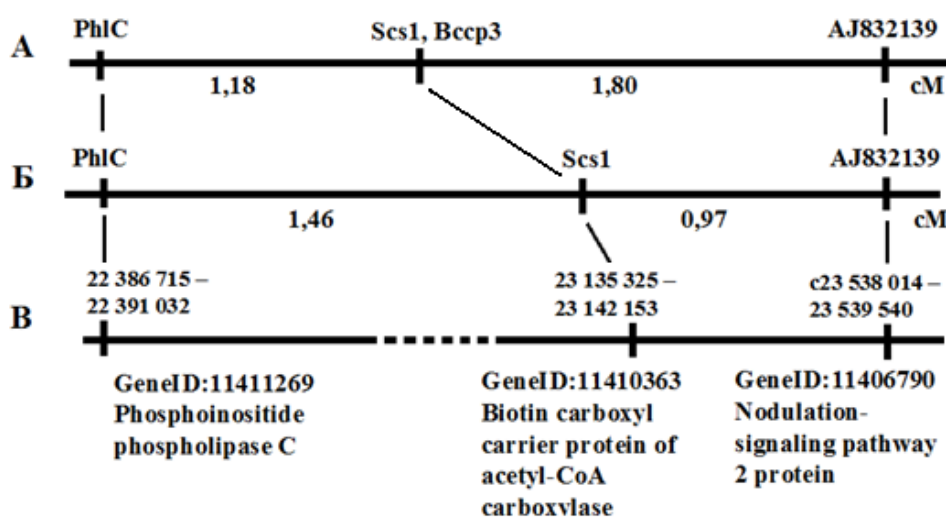


Рис. 18. Сравнение генетической карты фрагмента LGIII гороха и физической карты хромосомы 3 *M. truncatula* (NC_016409.1). А. Генетическая карта, построенная по результатам анализа популяции РИЛ на фоне цитоплазмы от WL1238. Б. Генетическая карта, построенная по результатам скрещивания на фоне цитоплазмы от ВИР320 (Рис. 16). В. Физическая карта хромосомы 3 *M. truncatula*. Пунктирная линия обозначает нерасшифрованный участок неизвестной длины.

5.4. Структура аллелей *accD*.

Все изученные образцы дикого гороха имели разные теоретические аминокислотные последовательности, соответствующие аллелям *accD*. В то же время аллели *accD* линий культурного подвида *P. s. subsp. sativum*, WL1238 и сорта Feltham First (NC_014057) имели идентичную нуклеотидную последовательность. Общая длина выравнивания составила 610 аминокислот. Было выявлено 19 переменных аминокислотных позиций и ряд делеций/инсерций. Отличия, наблюдаемые у образцов, имеющих несовместимую цитоплазму, ВИР320 и L100,

которые могли бы быть ответственны за несовместимость с ядерным геном *Scs1* образца WL1238, сводятся к 7 аминокислотным заменам и 3 делециям.

5.6. Структура аллелей *Vccp3*.

Была определена нуклеотидная последовательность кДНК, соответствующей локусу *Vccp3*. Отличия в теоретических аминокислотных последовательностях, наблюдаемые у образцов, имеющих несовместимую цитоплазму, ВИР320 и L100, сводятся к 4 аминокислотным заменам, все они приурочены к отрезку в С-концевой области, аннотированному как биотиниловый домен, ответственный за связывание биотина и присутствующий у всех биотин-зависимых ферментов.

5.7. Потенциальные взаимодействия генов-кандидатов.

Логично предположить, что ядерный локус *Scs2* кодирует одну из субъединиц ацетил-коА карбоксилазы и потому комплементарен локусу *Scs1*. Весьма вероятно, что *Scs2* кодирует альфа субъединицу карбоксилтрансферазы, то есть, согласно (Sasaki, Nagano, 2004), представляет собой локус *AccA*. По результатам CAPS-анализа 87 линий из картирующей популяции РИЛ *AccA* оказался тесно сцеплен с маркерами группы сцепления LGV и на материале изученных 87 линий неотделим кроссинговером от *Scs2*. Мультимерная природа АСС может также объяснить феномен существенно сниженной частоты (около 1/100) гомозигот по аллелю *Scs2* от линии WL1238 на фоне цитоплазмы ВИР320 в расщеплении F₂ от некоторых скрещиваний. Вероятно, процент появления гомозигот по аллелю *Scs2_1238* зависит от расщепления в этих скрещиваниях других ядерных генов, которые вполне могут кодировать субъединицы ацетил-коА карбоксилазы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые описан ядерно-цитоплазматический конфликт, возникающий между ядерным геномом культурного гороха и пластидным геномом дикорастущего гороха при скрещивании образца ВИР320, принадлежащего дикому подвиду *Pisum sativum* subsp. *elatius*. Конфликт проявляется в виде хлорофилльной недостаточности, уменьшении размеров листовых органов и корней, снижении фертильности пыльцы, нарушении ультратрунктуры хлоропластов и течения мейоза. Впервые проведен генетический анализ ядерно-цитоплазматического конфликта и показано, что в нем участвуют минимум два ядерных гена. Один из ядерных генов, обозначенный *Scs1*, был картирован в интервале около 2,5 сМ между маркерами

PhlC (AF280748) и *AJ832139* (AJ832139) в группе сцепления III, и второй ген несовместимости, обозначенный *Scs2*, картирован между *Met2* (AB176565) и *Nca* (FG533805) в V группе сцепления. В последнем случае размер интервала сильно варьирует в разных скрещиваниях и составляет от 3 до 20 сМ.

Впервые в настоящей работе номинированы гены-кандидаты на роль участников ядерно-цитоплазматического конфликта, возникающего при скрещивании представителей рода *Pisum*. Со стороны пластидного генома – *accD*, кодирующий бета субъединицу пластидной гетеромерной ацетил-коА-карбоксилазы, и со стороны ядерного генома – *Vccp3*, кодирующий белок-носитель биотина и карбоксила, входящий в тот же мультимерный ферментный комплекс.

На основании полученного в данной работе знания можно предсказать совместимость двух форм гороха за счет ядерно-цитоплазматического конфликта, связанного с действием гена *Scs1*, исходя из структуры пластидного локуса *accD*.

ВЫВОДЫ.

1. Впервые показано, что при гибридизации культурного гороха с дикорастущей формой, представляющей подвид *Pisum sativum* subsp. *elatius*, имеет место конфликт ядерного генома культурного гороха и пластидного генома дикого гороха, что проявляется в виде хлорофилльной недостаточности, уменьшении размера листовых органов и корней, снижении фертильности пыльцы.
2. Впервые показано, что в ядерно-цитоплазматическом конфликте у гороха участвуют как минимум два ядерных гена, обозначенные *Scs1* и *Scs2*.
3. Впервые локализованы на генетической карте гены ядерно-цитоплазматической несовместимости; локус *Scs1* картирован в группе сцепления III между маркерами *PhlC* (AF280748) и *AJ832139* (AJ832139), *Scs2* заключен в интервал между маркерами *Met2* (AB176565) и *Nca* (FG533805) в группе сцепления V.
4. Впервые установлено, что на фоне цитоплазмы дикого гороха аллели каждого из локусов, *Scs1* и *Scs2*, происходящие от культурного гороха, в гетерозиготе приводят к снижению фертильности пыльцы на 50-60%, при гетерозиготности обоих генов формируется аномальный фенотип, включающий хлорофилльную недостаточность, редукцию листовых органов и боковых корней.
5. Установлено, что аллель локуса *Scs1*, происходящий от культурного гороха, на фоне цитоплазмы дикорастущего гороха является спорофитной леталью и

леталью для мужских гаметофитов. Аллель локуса *Scs2*, происходящий от культурного гороха, на фоне цитоплазмы дикорастущего родителя снижает жизнеспособность несущих его мужских гаметофитов.

6. Определены и проаннотированы нуклеотидные последовательности пяти пластидных геномов, совместимых и несовместимых с ядерным геном *Scs1* культурного гороха, на основании чего выдвинуты гены-кандидаты на роль участников ядерно-цитоплазматического конфликта со стороны пластид.
7. Впервые в качестве генов-кандидатов на роль участников ядерно-цитоплазматического конфликта номинированы как ядерный, так и пластидный локусы, кодирующие субъединицы ферментного комплекса ацетил-коА-карбоксилазы.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в печатных изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК РФ

1. **Богданова В.С.**, Костерин О.Э. Случай аномального наследования хлоропластов в скрещиваниях посевного гороха с участием одной из диких форм. // Докл. Акад. Наук – 2006. – Т.406. – 256–259.
2. **Bogdanova V.S.** Inheritance of organelle DNA markers in a pea cross associated with nuclear-cytoplasmic incompatibility. // *Theor. Appl. Genet.* – 2007. – V.114. – P.333–339.
3. Kosterin O.E., **Bogdanova V.S.** Relationship of wild and cultivated forms of *Pisum L.* as inferred from an analysis of three markers, of the plastid, mitochondrial and nuclear genomes. // *Genet. Resour. Crop Evol.* – 2008. – V.55. – P.735–755.
4. **Богданова В.С.**, Галиева Э.Р. Нарушения мейоза как проявление ядерно-цитоплазматической несовместимости при скрещивании подвидов посевного гороха. // *Генетика.* – 2009. – Т. 45. – С.711–716.
5. **Bogdanova V.S.**, Galieva E.R., Kosterin O.E.. Genetic analysis of nuclear-cytoplasmic incompatibility in pea associated with cytoplasm of an accession of wild subspecies *Pisum sativum* subsp. *elatius* (Bieb.) Schmahl. // *Theor. Appl. Genet.* – 2009. – V.118. – P.801–809.
6. Kosterin O.E., Zaytseva O.O., **Bogdanova V.S.**, Ambrose M. New data on three molecular markers from different cellular genomes in Mediterranean accessions reveal

new insights into phylogeography of *Pisum sativum* L. subsp. *elatuis* (Beib.) Schmahl. // Genet. Resour. Crop Evol. – 2010. – V.57. – P.733–739.

7. Ядрихинский А.К., **Богданова В.С.** Ядерно-цитоплазматический конфликт при скрещивании подвидов гороха контролируется аллелями ядерного гена третьей группы сцепления. // Докл. Акад. Наук. – 2011. – Т. 441. – С.426–429.

8. **Bogdanova V.S.**, Galieva E.R., Yadrikhinskiy A.K., Kosterin O.E. Inheritance and genetic mapping of two nuclear genes involved in nuclear-cytoplasmic incompatibility in peas (*Pisum sativum* L.). // Theor. Appl. Genet. – 2012. – V.124. – 1503–1512.

9. Zaytseva O.O., **Bogdanova V.S.**, Kosterin O.E. Phylogenetic reconstruction at the species and intraspecies levels in the genus *Pisum* (L.) (peas) using a histone H1 gene. // Gene. – 2012. – V.504. – P.192–202.

10. **Bogdanova V.S.**, Kosterin O.E., Yadrikhinskiy A.K. Wild peas vary in their cross-compatibility with cultivated pea (*Pisum sativum* subsp. *sativum* L.) depending on alleles of a nuclear-cytoplasmic incompatibility locus. // Theor. Appl. Genet. – 2014. – V.127. – P.1163–1172.

11. Kosterin O.E., **Bogdanova V.S.** Efficiency of hand pollination in different pea (*Pisum*) species and subspecies. // Ind. J. Genet. Plant Breed. – 2014. – V.74. – P.50–55.

12. Костерин О.Э., **Богданова В.С.** Стадия развития цветка, оптимальная для искусственного опыления, варьирует в роде Горох (*Pisum* L.). // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2014. – Т. 18 – С. 478–485.

13. Kosterin O.E., **Bogdanova V.S.** Reciprocal compatibility within the genus *Pisum* L. as studied in F₁ hybrids: 1. Crosses involving *P. sativum* L. subsp. *sativum*. // Genet. Resour. Crop Evol. – 2015. – V. 62. – P. 691–709.

14. **Bogdanova V.S.**, Zaytseva O.O., Mglinets A.V., Shatskaya N.V., Kosterin O.E., Vasiliev G.V. Nuclear-cytoplasmic conflict in pea (*Pisum sativum* L.) is associated with nuclear and plastidic candidate genes encoding acetyl-CoA carboxylase subunits. // PLoS One. – 2015. – 10(3):e0119835.

15. Zaytseva O.O., **Bogdanova V.S.**, Mglinets A.V., Kosterin O.E. Refinement of the collection of wild peas (*Pisum* L.) and search for the area of pea domestication with a deletion in the plastidic psbA-trnH spacer. // Genet. Resour. Crop Evol. - 2016. - doi:10.1007/s10722-016-0446-4.