

УДК 577.218:582.951.4

АНАЛИЗ ХРОМОСОМНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ *Ty1*-СОРМ-ПОДОБНЫХ
РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ В ГЕНОМЕ ХМЕЛЯ ЯПОНСКОГО

О.С. АЛЕКСАНДРОВ, Н.А. ЯКОВИН, М.Г. ДИВАШУК, Г.И. КАРЛОВ

(Центр молекулярной биотехнологии РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева)

С помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* была установлена локализация *Ty1*-сорга-подобных ретротранспозонов на хромосомах хмеля японского. Было выявлено разреженное распределение сигналов *Ty1*-сорга-подобных ретротранспозонов на половых хромосомах Y_1 и Y_2 .

Ключевые слова: хмель японский, FISH, половые хромосомы, Y -хромосомы, *Ty1*-сорга-подобные ретротранспозоны.

Хмель японский (*Humulus japonicus* Siebold & Zucc.), семейство *Cannabaceae* — двудомное однолетнее лазящее растение с гетероморфными половыми хромосомами — обладает мультихромосомной половой системой [19]. Женские растения этого вида имеют $2n = 16$ ($14 + XX$), а мужские — $2n = 17$ ($14 + XY_1Y_2$), что свидетельствует о схожести половой системы хмеля японского с половой системой щавеля (*Rumex acetosa*) [8, 17, 18]. Цитогенетические данные об организации генома и особенно структуры половых хромосом для хмеля японского практически отсутствуют в отличие от щавеля, хмеля обыкновенного и конопли посевной, хорошо изученных благодаря их хозяйственному значению.

Большое значение в исследовании межгенных компонентов эукариотических геномов имеет картирование участков *Ty1*-сорга-подобных ретротранспозонов. *Ty1*-сорга-подобные элементы обнаружены во всех изученных геномах растений [21]. Изу-

чение распределения ретротранспозонов по геному растений имеет важное значение для понимания структурно-функциональной организации хромосом, так как формирование структуры хромосом — это процесс, частью которого является транспозиция весьма распространенного семейства *Ty1*-сорга-подобных ретротранспозонов. Одним из наиболее эффективных инструментов физического картирования последовательностей ДНК является флуоресцентная *in situ* гибридизация [2]. *In situ* гибридизация фрагментов семейства *Ty1*-сорга на метафазных хромосомах различных видов растений показала, что обычно они распределены по всей длине хромосомы, за исключением таких функционально важных частей, как теломеры, центромеры и сайты локализации рибосомальных генов [1, 15]. Установлено также, что *Ty1*-сорга-подобные элементы или их части локализуются в регионах, фланкирующих гены у многих растений [23]. Однако существуют и такие

виды, у которых выявлена неоднородность распределения ретротранспозонов вдоль хромосомы. Так, для арабидопсиса, томата, свеклы и нута показана локализация ретротранспозонов в основном в областях прицентромерного гетерохроматина [1, 5] или их отсутствие в блоках конститутивного интеркалярного гетерохроматина у тюльпана [11].

В данной работе впервые представлены результаты изучения хромосомной организации *Tyl-copia*-подобных ретротранспозонов у хмеля японского.

Материалы и методы

В качестве растительного материала в работе использовали мужские и женские растения хмеля японского сорта Самурай (фирма «Гавриш»),

ДНК выделяли из молодых листьев растений согласно методике Bernatsky and Tanksley (1986) [4] с некоторыми модификациями.

Для амплификации пула фрагментов гена обратной транскриптазы *Tyl-copia*-подобных ретротранспозонов размером около 260 п.н. применяли полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с использованием вырожденных праймеров: PR1 5'-ACNGCNTTYTNCAYGG-3' и PR2 5'-CARATGGARGTNAARAC-3' [5]. Праймеры синтезированы ЗАО «Синтол», Москва.

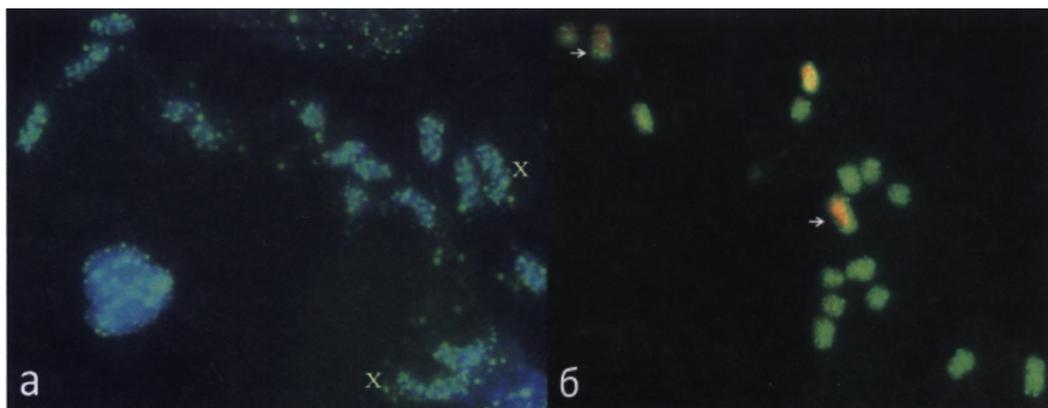
Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH). FISH осуществляли по стандартной методике [12] с некоторыми модификациями. Пробу создавали из очищенного с помощью гель-электрофореза пула ПЦР-фрагментов гена обратной транскриптазы *Tyl-copia*-подобных ретротранспозонов размером около 260 п.н. с последующим мечением биотинилированным (для женских растений) или DIG-dUTP (мужские растения) ПЦР в течение 30 циклов. Хромосомы контрастировали пропидий-йодидом

или DAPI — 1 мг/мл. Визуализацию сигнала осуществляли с использованием флуоресцентного микроскопа AxioZeiss Imager M1 с помощью соответствующего набора фильтров. Результат документировали на фотокамеру AxioCam M1m Zeiss с последующим контрастированием изображения в программе AxioVision.

Результаты и их обсуждение

После проведения ПЦР на ДНК хмеля японского с вырожденными праймерами на фрагмент гена обратной транскриптазы *Tyl-copia*-подобных ретротранспозонов были получены продукты размером около 260 п.н. Флуоресцентную гибридизацию *in situ* *Tyl-copia*-подобных ретротранспозонов проводили с использованием меченого ПЦР-продукта на цитологических препаратах митотических метафазных хромосом как мужских, так и женских растений хмеля японского. Анализ метафазных пластинок женских растений показал, что зонды *Tyl-copia*-подобных ретротранспозонов гибридизуются со всеми шестнадцатью хромосомами хмеля японского (рисунок, а). Данное распределение у хмеля японского не является уникальным, поскольку в большинстве исследований показано, что ретротранспозоны обычно равномерно распределены по всему геному [10].

Анализ метафазных пластинок мужских растений показал, что зонды *Tyl-copia*-подобных ретротранспозонов гибридизуются со всеми хромосомами хмеля японского. Однако характер распределения по хромосомам различен. У 15 хромосом из 17 флуоресцентный сигнал был распределен равномерно по всей протяженности хромосомы. А у двух хромосом из 17 наблюдалась разреженная локализация сигнала с наибольшей интенсивностью в дистальных областях (рисунок, б). Эти хромосомы



Метафазные пластинки женского (а) и мужского (б) растений хмеля японского с сигналами зондов *Tu1-sor1a*-подобных ретротранспозонов (X — половая хромосома X; стрелками обозначены хромосомы Y)

были самыми большими в наборе. Ранее было показано, что три самые длинные хромосомы генома хмеля японского — это половые хромосомы: X, Y₁ и Y₂ [20]. На метафазных пластинках женских растений наблюдалось равномерное распределение сигнала по всем хромосомам, включая две X-хромосомы. Поэтому две хромосомы с разреженным сигналом на мужских растениях были нами идентифицированы как половые: Y₁ и Y₂. Неравномерная интенсивность сигнала на этих хромосомах, возможно, связана с низким количеством копий изучаемого класса ретротранспозонов. При этом нельзя исключить и возможность того, что ДНК Y₁ и Y₂-хромосом доступна для гибридизации ДНК-зондов не на всей протяженности этих хромосом [13], так как они находятся в компактизованном состоянии в течение всего клеточного цикла [9].

Таким образом, нами были выявлены различия в локализации *Tu1-sor1a*-подобных ретротранспозонов между половыми хромосомами у хмеля японского. Данный факт открывает широкое поле для новых дискуссий об эволюции половых хромосом у двудомных растений.

В настоящее время основной теорией возникновения гетероморфизма половых хромосом является вырождение Y-хромосомы. Однако вопрос о том, как происходит данный процесс, является в настоящее время крайне спорным и малоизученным. Так, некоторые авторы предполагают, что основным фактором дегенерации Y-хромосомы может являться накопление повторяющихся последовательностей, включая транспозоны [7]. По мнению многих авторов, подобный факт может иметь место на межгенных участках и интронах. И это может быть ранним шагом эволюции Y-хромосомы (до того, как гены начнут дегенерировать), приводящим к снижению давления отбора против инсерций в нерекombинирующих частях мужских половых хромосом [3, 6, 14]. Другие исследователи выдвигали гипотезы, что основным фактором является эпигенетически регулируемая конденсация Y-хромосом в интерфазных ядрах, в частности у шавеля и хмеля японского, что приводило в дальнейшем к накоплению АТ-богатых последовательностей в Y-хромосомах (специфично для полиморфной системы половых хромосом (XX/X_{Y1}Y₂)) посредством пере-

хода цитозина в тимин путем метилирования, и уже затем — к деградации Y-хромосомы именно благодаря этим процессам [16, 17].

Полученные нами данные о разреженном сигнале *Tyl-copia*-подобных ретротранспозонов на Y-хромосомах могут свидетельствовать о том, что либо в процессе формирования данных хромосом большую роль играли хромосомные перестройки, нежели транспозиции, либо транспозиции осуществлялась другими семействами ретротранспозонов. В то же время при изучении локализации всех се-

мейств ретротранспозонов и возможных транслокаций, за счет которых также могут формироваться половые хромосомы [22], полученные нами данные могут свидетельствовать и в пользу эпигенетической модели деградации Y-хромосом у хмеля японского. Однако эти вопросы останутся дискуссионными и требуют дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России”, ГК № П1164.

Библиографический список

1. Карлов Г.И., Фесенко И.А., Андреева Г.Н., Хрусталева ЛМ. Хромосомная организация *Ty 1-copia*-подобных ретротранспозонов в геноме томата // Генетика, 2010. Т. 46. № 6. 769-773.
2. Хрусталева ЛМ. Молекулярная цитогенетика в селекции растений // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии, 2007. № 1. С. 45-55.
3. Armstrong S.J., Filatov D.A. A cytogenetic view of sex chromosome evolution in plants // Cytogenet Genome Res., 2008. 120, 241-246.
4. Bernatsky R., Tanksley S.D. Toward a saturated linkage map of tomato based on isozymes and random cDNA sequences // Genetics, 1986. 120, 1095-1103.
5. Branders A., Heslop-Harrison J.S., Kamm A. et al. Comparative analysis of the chromosomal and genomic organization of *Ty 2-copia*-like retrotransposons in pteridophytes, gymnosperms and angiosperms // Plant Molec. Biology, 1997. 33, 11-21.
6. Charlesworth D. Plant sex chromosomes, in Volff J-N (ed): Plant Genomes, Genome Dynamics, 2008. 83-94 (Karger, Basel).
7. Grabowska-Joachimiak A., Joachimiak A. C-banded karyotypes of two *Silene* species with heteromorphic sex chromosomes // Genome, 2002. 45, 243—252.
8. Grabowska-Joachimiak A., Sliwinska E., Pigula M., Skomra U., Joachimiak A.J. Genome size in *Humulus lupulus* L. and *H. japonicus* Siebold & Zucc. (Cannabaceae) // Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 2006. 75, 207-214.
9. Grabowska-Joachimiak A., Mosiolek M., Lech A., Gyralski G. C-Banding/DAPI and in situ Hybridization Reflect Karyotype Structure and Sex Chromosome Differentiation in *Humulus japonicus* Siebold & Zucc // Cytogenet Genome Res., 2010, 1-9. DOI: 10.1159/000321584
10. Heslop-Harrison J.S. Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. // Plant Cell., 2000. 12, 617—635.
11. Karlov G.I., Andreeva G.N., Fesenko I.A., Khrustaleva L.I. Characterization and chromosome location of *Tyl-copia* group retrotransposons in some *Alliaceae*, *Liliaceae* and *Iridaceae* species // Cytogenetics and Cell Genetics, 1999. 85, 135.
12. Karlov G.I., Khrustaleva L.I., Lim K.B., Van Tuyl J.M. Homoeologous recombination in 2n-gametes producing interspecific hybrids of *Lilium* (*Liliaceae*) studied by genomic in situ hybridization (GISH) // Genome, 1999. 42, 681.
13. Kazama Y., Sugiyama R., Suto Y., Uchida W., Kawano S. The clustering of four subfamilies of satellite DNA at individual chromosome ends in *Silene latifolia* // Genome, 2006. 49, 520-530.

14. *Kejnovsky E., Hobza R., Cermak T., Kubat Z., Vyskot B.* The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants // *Heredity*, 2009. 102, 533-541.

15. *Kumar A., Pearce S.R., McLean K.* The *Tyl-copia* group of retrotransposons in plants: genomic organisation, evolution, and use as molecular markers // *Genetica*, 1997. 100, 205-217.

16. *Mosiolek M., Pasierbek P., Malarz J., Mos M., Joachimiak A.J.* *Rumex acetosa* Y chromosomes: constitutive or facultative heterochromatin? // *Folia Histochem CytobioL*, 2005. 43, 161-167.

17. *Parker J.S. & Clark M.S.* Dosage sex-chromosome systems in plants. *Plant Science*, 1991. 80, 79-92.

18. *Shephard H.L., Parker J.S., Darby P. & Ainsworth C.C.* Sexual development and sex chromosomes in hop // *New Phytol.*, 2000. 148, 397-411.

19. *Small E.* A numerical and nomenclatural analysis of morpho-geographic taxa of *Humulus*. *Syst Bot.*, 1978. 3, 37-76.

20. *Soo-Young Kim, Chan-Soo Kim, Joongku Lee and Jae-Wook Bang* Karyotype Analysis and Physical Mapping Using Two rRNA Genes in Dioecious Plant, *Humulus japonicus* Siebold & Zucc // *Korean J Genetics*, 2008. 30 (2), 157-161.

21. *Voytas D.F., Cummings M.P., Konieczny A. et al.* Copra-like retrotransposons are ubiquitous among plants // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1992. 89, 7124-7128.

22. *Watanabe K, Yahara T., Denda T., Kosuge K.* Chromosomal evolution in the genus *Brachyscome* (Asteraceae, Astereae): statistical tests regarding correlation between changes in karyotype and habit using phylogenetic information // *J. Plant Res*, 1999. 112, 145-161.

23. *White S.E., Habera L.F., Wessler S.R.* Retrotransposons in the flanking regions of normal plant genes: A role for copra-like elements in the evolution of gene structure and expression // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1994. 91, 11792-11796.

Рецензент — д. б. н. И.Н. Хрусталева

SUMMARY

Japanese Hop (*Humulus japonicus* Siebold & Zucc.), *Cannabaceae* family - a dioecious plant with heteromorphous reproductive chromosomes and having multi-chromosomal system with a number $2n = 16$ ($14 + XX$) for pistillate plants, and $2n = 17$ ($14 + XY1Y2$) for male plants. By means of fluorescent hybridization *in situ* *Tyl-copia-like* retrotransposons localization on Japanese Hop chromosomes is determined. Rarefield distribution of *Tyl-copia-like* retrotransposons signals on reproductive chromosomes Y1 and Y2 has been detected.

Key words: Japanese Hop, FISH, reproductive chromosomes, Y-chromosomes, *Tyl-copia-like* retrotransposons.

Александров Олег Сергеевич — асп. Центра молекулярной биотехнологии РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел. (499) 977-70-06.

Яковин Николай Анатольевич — асп. Центра молекулярной биотехнологии РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева.

Дивашук Михаил Георгиевич — к. б. н.

Карлов Геннадий Ильич — к. б. н. Эл. почта: karlov@timacad.ru