

## LTR-РЕТРОТРАНСПОЗОНЫ В ГЕНОМАХ РАСТЕНИЙ

М.А. ЕЛЬКИНА<sup>1</sup>, В.В. ПЫЛЬНЕВ<sup>1</sup>, И.В. СЕФЕРОВА<sup>2</sup>, В.И. ГЛАЗКО<sup>1</sup>( <sup>1</sup>РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева; <sup>2</sup>ГНУ ВНИИР им. Н.И. Вавилова РАСХН)

В работе представлены данные анализа распределения LTR-ретротранспозонов в геномах представителей родов *Glycine* и *Triticum*. Идентифицирован и оценен полиморфизм фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными терминальными сайтами ретротранспозонов LTR SIRE-1, PawS 5, PawS 6 и BARE-1. Наблюдаемые генетические взаимодействия четко вписываются как в макро- (науровне классов), так и в микроэволюционные (науровне сортов) представления. Обсуждается возможность применения LTR-ретротранспозонов в качестве молекулярно-генетических маркеров для титрования сортов *Triticum*.

Ключевые слова: инвертированные терминальные сайты LTR-ретротранспозонов, LRAP-PCR, полиморфное информационное содержание, доля полиморфных локусов, *Triticum*, *Glycine*.

В ходе эволюции экзогенные ретровирусы прочно укрепились в геномах живых организмов и стали неотъемлемой их частью [1]. Их следы мы находим в виде участков длинных концевых повторов (LTR), LTR-ретротранспозонов, эндогенных ретровирусов (ERV), а также доместичированных генов, таких, например, как SYNCYTIN, PEG10, PEG11 и др. [5]. В геноме растений эти повторы занимают от 50 до 90%, большую часть из которых составляют LTR ретротранспозоны [3]. Ввиду своей мобильности, эти элементы генома могут служить причинами различных мутаций и рекомбинаций, а также делеций и транслокаций как результат транспозиций. Принимая во внимание тот факт, что индукции транспозиций увеличиваются при изменении условий окружающей среды, мобильные элементы являются важным инструментом эволюции [4]. В данной работе авторами была сделана попытка оценить распределение инвертированных участков LTR ретротранспозонов в геномах культурных растений.

## Материалы и методы

В качестве объекта выбрали как представителей класса однодольных (пшеница), так и двудольных (соя). Исследовали два сорта озимой Московская 39 (мягкая озимая,  $n = 28$ ) и Мироновская 808 (мягкая озимая, выведена из яровой,  $n = 42$ ) и один сорт яровой пшеницы Омская 36 (мягкая яровая,  $n = 42$ ), а также 5 популяций сои вида *Glycine soja* Sieb. et Zucc. Приморского края и представителей сорта Полукультурная С 10 вида *Glycine max* Merrill. (Китай). Исследования генетической структуры популяций проводились на основании полиморфизма фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными участками LTR ретротранспозонов LTR SIRE-1 (GCAGT-TATGCAAGTGGGATCAGCA), терминальный повтор ретротранспозона сои, и PawS 5 (AACGAGGGGTTCGAGGCC), PawS 6 (GAGTGTCAAACCCAACGA), BARE-1 (CCAACTAGAGGCTTGCTAGGGAC) — зерновых (LRAP-PCR-Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism). Геномную ДНК выделяли из семян коммерческим набором «ДНК-экстран 1» (фирма «Синтол», Россия). Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе «Терцик» (Россия) с применением смеси ПЦР-РВ (фирма

«Синтол», Россия). Условия и стадии проведения ПЦР: первоначальная денатурация 94 °С — 2 мин, денатурация 94 °С — 30 с, отжиг 55 °С — 30 с, элонгация 72 °С — 2 мин, заключительная элонгация 72 °С — 10 мин, 35 циклов. Анализ результатов амплификации проводили методом электрофореза в 1,5%-м агарозном геле с применением в качестве маркера молекулярных масс ДНК Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, USA) для оценки длины продуктов. Визуализацию продуктов ПЦР-амплификации проводили под УФ-излучением после окрашивания гелей бромистым этидием. Математическая обработка осуществлялась с использованием компьютерной программы TFPGA.

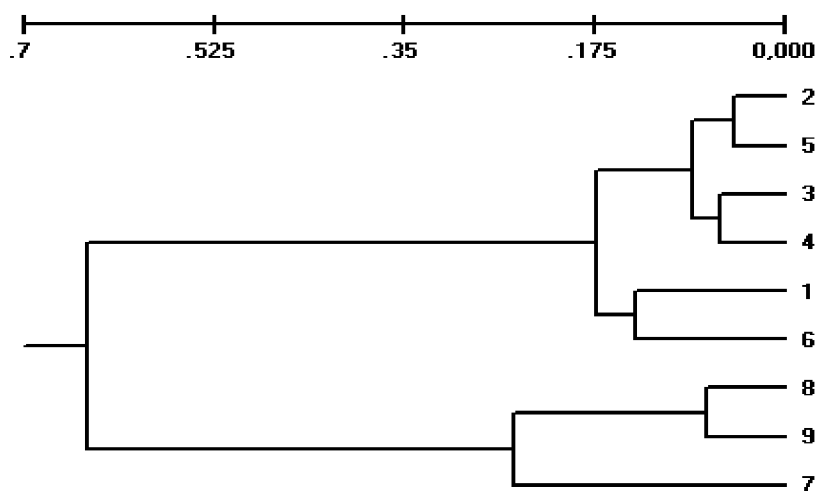
### Результаты и их обсуждение

В результате IRAP-PCR с праймером к терминальному участку ретроэлемента сои LTR SIRE-1 нами были получены отчетливо воспроизводящиеся спектры фрагментов ДНК как у сои, так и у пшеницы, причем фрагменты находятся в одном диапазоне длин (15 локусов, 350-1010 п.о., 26 локусов 220-1450 п.о., соответственно). У сои был обнаружен только один мономорфный локус длиной 700 п.о., в среднем же доля полиморфных локусов по этому праймеру составила 93%, PIC<sub>ср.</sub> = 0,414. Это говорит о генетическом разнообразии как внутри рода *Glycine* так и внутри одного вида *Glycine soja* Sieb. et Zucc. При этом у *Glycine max* Merrill, отсутствовал локус длиной 680 п.о., тогда как при этом тот же локус встречался с разной частотой у представителей *Glycine soja* Sieb. et Zucc.

Значения основных генетических характеристик (Per., PIC<sub>ср.</sub>) различных сортов пшениц значительно ниже, нежели сои (69%, 0,120). Тем не менее, данный ретротранспозон достаточно четко выявляет особенности каждого из сортов. Так, например, уникальный для сорта пшеницы Московская 39 локус (790 п.о.) присутствует у всех исследованных образцов этого сорта, тогда как у Мироновской 808 и Омской 36 фрагментов данной длины не обнаружено. И, наоборот, локус в 550 п.о. не встречается только у Московской 39, у остальных сортов значение PIC по данному локусу равно 1. При этом также стоит отметить наличие большого количества фрагментов и высокую плотность ретротранспозонов в геноме. Интересно отметить, что в геноме сои не было выявлено гомологии к мобильным элементам таких однодольных растений, как рожь (PawS 5 и PawS 6) и ячмень (BARE-1), участки которых авторы использовали в ПЦР в качестве праймеров, при этом у пшеницы получали спектры фрагментов ДНК, фланкированные участками этих ретротранспозонов. Праймеры PawS 5 и PawS 6 каждый в отдельности дает менее полиморфный спектр фрагментов ДНК по сравнению с праймером LTR SIRE-1 (PIC<sub>ср.</sub> = 0,073). Спектр фрагментов, получаемый с использованием в ПЦР праймера PawS 5 смещен в сторону более тяжелых длин (890-1670 п.о.). В результате ПЦР с применением PawS 5 в качестве прямого, а PawS 6 — обратного праймеров, амплифицировались как фрагменты, характерные для спектра праймера PawS 5, так и фрагменты спектра праймера PawS 6. Тем не менее, были и локусы, которые впервые были обнаружены именно в такой постановке реакции, а именно 7 фрагментов длиной от 650 до 150 п.о., из которых один (550 п.о., PIC = 0,48) полиморфный, при этом несложно заметить, что для спектра характерны более легкие фрагменты ДНК.

На основании значений генетических дистанций (DN), рассчитанных по методу Nej (DN, M. Nej, 1972) построена дендрограмма. Она состоит из двух частей. Первая отражает филогенетические взаимоотношения сортов пшениц на основании распределения фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными участками фрагмента ретротранспозона LTR SIRE-1, BARE-1, PawS 5 и PawS 6, вторая — двудольных и однодольных культурных растений различных групп на осно-

вании распределения инсерций ретротранспозона LTR SIRE-1. Пшеница внутри вида кластеризуется идентично, т.е. одну группу образуют сорта Мироновская 808 и Омская 36. Такая кластеризация соотносится с генетическими особенностями сортов. Так, оба этих сорта являются гексаплоидами, и хотя Мироновская 808 — это сорт мягкой озимой пшеницы, выведен он был из яровой. Два отдельных крупных кластера однодольных и двудольных образуются на основании распределения участков ретротранспозона LTR SIRE-1. Это свидетельствует о том, что применяя ретроэлементы для исследования двудольных и однодольных растений, мы получаем картину, четко вписывающуюся как в макро- (на уровне классов), так и в микроэволюционные (на уровне сортов) представления. Здесь нужно отметить некую избирательность мобильных элементов. Как выше было показано, исследованные фрагменты ретроэлементов однодольных не обнаруживают гомологичных участков в геноме двудольных, в частности сои. Проанализировав секвенированные последовательности ГенБанка с помощью алгоритмов BLASTn на наличие участков, гомологичных ретротранспозонам BARE-1, PawS 5 и PawS 6 было обнаружено, что они присутствуют в геноме сои, тогда как в результате ПЦР, где в качестве матрицы выступает ДНК сои, они не амплифицируются. Это можно объяснить тем, что данные участки ретротранспозонов в геноме сои не образуют инвертированных повторов, либо они лежат на расстоянии больше 3 тыс. п.о., и не визуализируются с помощью электрофореза. Также было выявлено, что данные мобильные элементы не являются специфичными для растений: участки гомологий были обнаружены в геномах прокариот, членистоногих, птиц, рыб, а также млекопитающих, включая приматов. В наших предыдущих исследованиях на сельскохозяйственных видах животных было показано, что данные



считанных по частотам встречаемости локусов, полученных в спектрах роддуктов амплификации с использованием в PCR в качестве праймера терминального повтора LTR SIRE-1 между следующими группами растений: 1 — *Glycine max* Merrill. (Китай); 2 — *Glycine soja* Sieb. et Zucc. (Приморский край); 3 — *Glycine soja* Sieb. et Zucc. (Приморский край); 4 — *Glycine soja* Sieb. et Zucc. (Приморский край); 5 — *Glycine soja* Sieb. et Zucc. (Приморский край); 6 — *Glycine soja* Sieb. et Zucc. (Приморский край); 7 — Московская 39; 8 — Мироновская 808; 9 — Омская 36

участки ретротрансозоиов растений (LTR SIRE-1, BARE-1, PawS 5) присутствуют и в их геномах [2].

### Заключение

Являясь одним из инструментов эволюции, МЭ отражают различия в генетической структуре не только крупных таксонов, но и филогенетически близких организмов, таких, например, как сорта, поэтому их удобно использовать в качестве маркеров для полилокусного генотипирования. С их помощью мы можем выявлять генетические особенности популяций, что актуально для селекционной работы.

### Библиографический список.

1. Глазко В.И., Глазко Г.В. Введение в генетику: биоинформатика, ДНК-технология, генная терапия, ДНК-экология, протеомика, метаболика. Киев: КВИЦ, 2003. 640 с.
2. Ельмта М.А. Глазко В.И. IRAP-PCR-маркеры у некоторых пород сельскохозяйственных видов млекопитающих. Известия ТСХА. 2012. № 2. С. 58-65.
3. Bohmdorfer G., Tramontane A., luxa K., Gudrun B. A synthetic biology approach allows inducible retrotransposition in whole plants. Syst SynthBiol (2010) 4:133-138.
4. Elbaidouri M., Panaud o. Comparative Genomic. Paleontology Across Plant Kingdom Reveals The Dynamics Of TE-driven Genome Evolution. Genome Biology and Evolution Advance. 2013. February 20.
5. Tomoko Kaneko-Ishino, Fumitoshi Ishino. The role of genes domesticated from LTR retrotransposons and retroviruses in mammals. Frontiers in Microbiology Virology. 2012. July. Vol. 3. Art. 262.

## LTR - RETROTRANSPOSONS IN GENOMES OF PLANTS

M.A. YELKINA<sup>1</sup>, V.V. PYLNEV<sup>1</sup>, I.V. SEPHEROVA<sup>2</sup>, V.I. GLAZKO<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> RSAU-Timiryazev MAA;<sup>2</sup> N.I. Vavilov Research Institute of Plant Industry)

*The article deals with analysis results of the distribution of ITR-retrotransposons in the genomes of the genera Glycine and Triticum. Polymorphism of DNA fragments flanked by inverted terminal sites of retrotransposons ITR SIRE-1, PawS 5, PawS 6 and BARE-1 was identified and estimated. The observed genetic interactions fit well with macro (at the class level) and microevolution (at the varieties level) views. The possibility of using ITR-retrotransposons as molecular-genetic markers for typing varieties of Triticum was discussed.*

*Key words: inverted terminal sites of ITR-retrotransposons, IRAP-PCR, polymorphic information content, a share of polymorphic loci, Triticum, Glycine.*

**Елькина Мария Александровна**—аспирант ЦентрананобиотехнологийРГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (125550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976-03-75; e-mail: mariyaelkina@yahoo.com).

**Пыльнев Владимир Валентинович** — д. б. н., проф. кафедры селекции и семеноводства полевых культур РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: (499) 976-12-72; e-mail: selctionf/timacad.ru.

**Сеферова Ирина Владимировна** — к. б. н., ведущий научный сотрудник ГНУ ВНИИР им. Н.И. Вавилова РАСХН (190000, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42/44; тел.: 8 (812) 314-22-34).

**Глазко Валерий Иванович** — д. с.-х. н., проф., акад. РАСХН (иностр. член), руководитель Центра нанобиотехнологий РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. E-mail: glazkot@gmail.com).