

СООБЩЕНИЯ COMMUNICATIONS

УДК 575.11

М.Г. Куцев¹
М.А. Холодкова¹
С.В. Смирнов¹
Н.В. Фризен^{1,2}

M.G. Kutsev
M.A. Kholodkova
S.V. Smirnov
N.V. Friesen

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ РЕТРОТРАНСПОЗОНА TY1-COPIA В СОРТАХ ПШЕНИЦЫ

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE DISTRIBUTION OF TY1-COPIA RETROTRANSPOSON IN KINDS OF WHEAT

Аннотация. В сообщении приводятся сведения о количественном распределении ретротранспозона Ty1-copia в геномах пшениц мягких и твердых сортов сибирской селекции. Показано, что мягкие пшеницы имеют более значительный разброс по содержанию Ty1-copia, чем твердые сорта. Подобраны оригинальные праймеры на ген обратной транскриптазы Ty1-copia.

Ключевые слова: *Triticum*, геном, ДНК, ретротранспозоны.

Summary. The report provides information about the current distribution of retrotransposon Ty1-copia in the genomes of soft and hard wheats of Siberian breeding. It was shown that the soft wheat had higher variation in Ty1-copia content, than the hard type. Original primers matching the Ty1-copia reverse transcriptase gene are selected.

Key words: *Triticum*, genome, DNA, retrotransposons.

Мобильные генетические элементы растений, прежде всего транспозоны и ретротранспозоны, вносят значительный вклад в увеличение размера генома живых существ, являются одним из эндогенных факторов мутагенеза (так называемый инсерционный мутагенез). Одним из наиболее важных факторов увеличения размера генома является амплификация LTR-содержащих транспозонов, уровень и спектр активности которых сильно различаются у разных видов. В ряде случаев количество транспозонов в геноме может возрастать на 20–100 копий (~0,1–1,0 миллионов пар нуклеотидов) за одну генерацию (Патрушев, Минкевич, 2007). При этом основной вклад в экспансию генома разных видов могут вносить разные семейства транспозонов (Aix et al., 2005; Friesen et al., 2001; Heslop-Harrison and Schwarzacher, 2011; Saeidi et al., 2008; Vershinin et al., 2002). На примере диких видов

рода *Helianthus* (Ungerer et al., 2006) показано, что уровень содержания ретротранспозонов Ty3/gypsy значительно возрастает у видов гибридного происхождения, при этом размер генома таких видов увеличивается как минимум на 50%.

Поскольку распределение транспозонов и ретротранспозонов и их состав – признаки в значительной степени варьирующие, возможно их использование для генотипирования сортовых растений. У злаков и, в частности, у пшеницы, содержание ретротранспозонов может составлять до 68% от общего размера генома (Li et al., 2004; Matsuoka, Tsunewaki, 1999). Нами предпринята попытка измерения относительного содержания ретротранспозонов Ty1-copia в сортах мягкой и твердой пшеницы сибирской селекции.

Материал и методы. Материалом для выделения ДНК послужили образцы зерновок четырех сортов твердой яровой пшеницы: «Жем-

¹Алтайский государственный университет, пр-т Ленина, 61; 656049, Барнаул, Россия; e-mail: serg_sm@mail.ru
²Оснабрюкский университет, ботанический сад, Альбрехтштрассе, 29; 49076, Оснабрюк, Германия; e-mail: friesen@biologie.uni-osnabrueck.de

¹Altai State University, Lenina str., 61; 656049, Barnaul, Russia

²Botanical Garden, University of Osnabrück, Albrechtstrasse 29; 49076, Osnabrück, Germany

чужина Сибири», «Памяти Янченко», «Алейская 50», «Омский Изумруд» и пяти сортов мягкой яровой пшеницы: «Сибирский Альянс», «Новосибирская 15», «Алтайская 530», «Тюменская 30» и «Сударушка». Для выделения ДНК из растительного материала использованы наборы реагентов DiamondDNA (ООО «АБТ», Россия). Поскольку существуют данные (Беляев, 2009), что распределение мобильных генетических элементов в вегетативных и генеративных органах одних и тех же растений неодинаково (даже с учетом пloidности эндосперма), для количественного определения Ty1-сориа использовалась ДНК только из зерновок. Размер генома определялся при выделении ядер из мезофилла листьев.

Для анализа использовалось 10 образцов растений каждого сорта. Амплификация осуществлялась на термоциклере BioRad CFX96 Touch Real Time System. Предварительно подбирали концентрации основных компонентов реакционной смеси для достижения количественных показателей ПЦР в серии разведений. Реакционная смесь для полимеразной цепной реакции объемом 25 мкл содержала: 1 единицу Taq-полимеразы, 2,5 мкл стандартного 10x буфера для ПЦР, 25 пМ праймера, 1,5 мМ Mg²⁺, 0,25 мМ dNTP, 1X красителя Syto 9 (флуоресценция на канале FAM); 3 нг геномной ДНК. Объем пробы ДНК каждого образца предварительно определялся флуориметрически на приборе Qubit Invitrogen и стандартизировался разведением. Для амплификации использовалась следующая программа: предварительная денатурация 94°C, 3 мин.; в последующих тридцати пяти циклах 94°C, 5 сек.; 58°C, 10 сек.; 72°C, 5 сек (снятие уровня флуоресценции).

Исследование размера генома и пloidности проводилось на поточном цитометре Cy-Flow Ploidy Analyse (Partec) с использованием стандартных наборов реактивов с окраской DAPI.

Результаты и обсуждение. Для подбора универсальных праймеров было проанализировано свыше 40 последовательностей, подобных Ty-сориа генома высших растений из генбанка.

Выявлены следующие стабильные участки, пригодные для дальнейшей разработки праймеров:

Ty-1 сориа пшениц (род *Triticum*):

3' - GAAGAGTTGTATATGATGCAACCA
GAAGGTTTT

5' - CTGGTGCAAGCCTCTCGGAGTTGGAA

Разработка праймеров и систем ПЦР-РВ для участков Ty-1-сориа пшениц сопряжена с рядом очень серьезных ограничений. Во-первых,

для всех видов ретротранспозонов отсутствуют стабильные внутренние участки генов, что накладывает ограничение на использование систем, подобных TaqMan и Molecular Beacons; таким образом, невозможно создать мультиплексную систему на основе специфичных разрушаемых проб.

Во-вторых, стабильные 5'- и 3'-фланкирующие участки очень коротки и имеют множество повторов, что не дает возможность использования таких систем, как Amplifluor, FRET-зондов и Scorpions. Таким образом, использование интеркалирующих красителей – это наиболее приемлемый подход.

Были сконструированы следующие пары праймеров (приводятся рабочие названия, соответствующие акронимам амплифицированных участков, последовательности праймеров приводятся в направлении 5'-3'):

Ty-1 сориа (род *Triticum*):

TT-F GAAGAGTTGTATATGATGCAA

TT-R AACTCCGAGAGGCTTGCACCAG

После выполнения ПЦР в реальном времени проведен сравнительный количественный анализ продуктов амплификации на основе расчета пороговых циклов (A-Z Quantitative PCR, 2009).

Известно, что мягкие пшеницы являются гексаплоидами (6n=42, 1c = 17,33 пг), а твердые – тетраплоидами (4n=28, 1c=12,66 пг) (Bennett, Smith, 1976; Boyko et al., 1984), и соотношение размеров генома мягких и твердых пшениц составляет ≈1,369 : 1. В нашем эксперименте соотношение размера генома между исследованными твердыми и мягкими сортами пшеницы сибирской селекции оказалось сопоставимым и составило в среднем 1,386±0,018 : 1.

В результате перерасчета размера генома на относительное содержание ретротранспозонов Ty1-сориа составлена диаграмма (рис.), на которой показано, что мягкие пшеницы имеют более значительный разброс по содержанию Ty1-сориа, чем твердые сорта. Возможно, это объясняется более сложным набором изначального генетического материала, который использовался как в становлении *T. aestivum*, так и в сложных селекционных комбинациях. В любом случае, это дает реальную возможность для генотипирования сортов, проверки их на чистоту при включении в селекционный процесс, изучения происхождения и филогении пшениц.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ, проект 14.B37.21.0848.

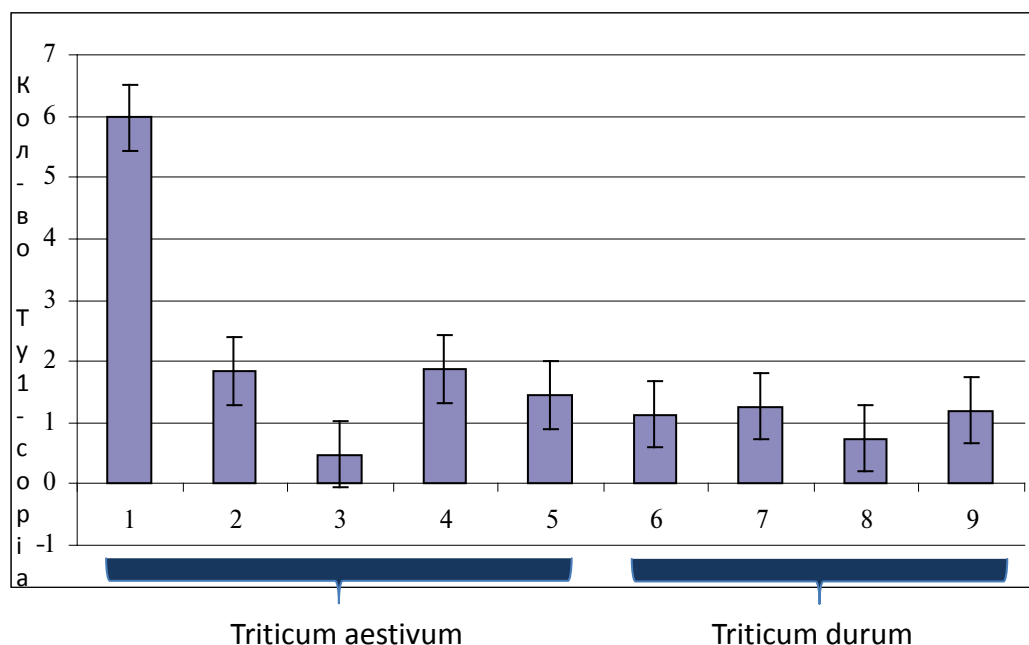


Рис. Относительное количество ретротранспозона Ty1-copia в пересчете на размер генома. Сорта пшеницы мягкие: 1 – «Алтайская 530»; 2 – «Тюменская 30»; 3 – «Сударушка»; 4 – «Новосибирская 15»; 5 – «Сибирский Альянс»; и твердые: 6 – «Омский Изумруд»; 7 – «Алейская 50»; 8 – «Жемчужина Сибири»; 9 – «Памяти Янченко». Подсчитана стандартная погрешность из набора инструментов Microsoft Excel.

ЛИТЕРАТУРА

- Беляев А.А.** Роль мобильных элементов в микроэволюционных процессах у растений на примере *Aegilops speltoides* (*Triticeae*, Poaceae). Молекулярно-цитогенетический и молекулярно-генетический анализ: Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. – СПб., 2009. – 28 с.
- Патрушев Л.И., Минкевич И.Г.** Проблемы размера генома у эукариот // Успехи биорганической химии, 2007. – Т. 47. – С. 293–370.
- Alix K., Ryder C.R., Moore J.M., King G., Heslop-Harrison J.S.** The genomic organization of retrotransposons in *Brassica oleracea* // Plant Molecular Biology, 2005. – Vol. 59, № 6. – P. 839–851.
- A-Z of quantitative PCR (Editor: S.A. Bustin) / Internat. Univ. Line, 2004. – 882 p.
- Bennett M.D., Smith J.B.** Nuclear DNA amounts in angiosperms // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B – Biological Sciences, 1976. – Vol. 274. – P. 227–274.
- Boyko E.V., Badaev N.S., Maximov N.G., Zelenin A.V.** Does DNA content change in the course of *Triticale* breeding // Cereal Research Communications, 1984. – № 12. – P. 99–100.
- Heslop-Harrison J.S., Schwarzacher T.** Organization of the plant genome in chromosomes // Plant Journal, 2011. – Vol. 66. – P. 18–33.
- Friesen N., Brandes A., Heslop-Harrison J.S.** Diversity, origin and distribution of retrotransposons (gypsy and copia) in conifers // Molecular Biology and Evolution, 2001. – Vol. 18. – P. 1176–1188.
- Li W., Zhang P., Fellers J.P., Friebe B., Gill B.S.** Sequence composition, organization, and evolution of the core *Triticeae* genome // Plant Journal, 2004. – Vol. 40, № 4. – P. 500–511.
- Matsuoka Y., Tsunewaki K.** Evolutionary dynamics of Ty1-copia group retrotransposons in grass shown by reverse transcriptase domain analysis // Molecular Biology and Evolution, 1999. – Vol. 16, № 2. – P. 208–217.
- Saeidi H., Rahiminejad M.R., Heslop-Harrison J.S.** Retroelement insertional polymorphisms, diversity and phylogeography within diploid, D-Genome *Aegilops tauschii* (*Triticeae*, Poaceae) sub-taxa in Iran // Annals of Botany, 2008. – Vol. 101, № 6. – P. 855–861.
- Ungerer M.C., Strakosh S.C., Ying Zh.** Genome expansion in three hybrid sunflower species is associated with retrotransposon proliferation // Current Biology, 2006. – Vol. 16, № 20. – P. 872–873.
- Vershinin A.V., Druka A., Alkhimova A.G., Kleinhofs A., Heslop-Harrison J.S.** LINEs and gypsy-like retrotransposons in *Hordeum* species // Plant Molecular Biology, 2002. – Vol. 49. – P. 1–14.