

ГОМОЛОГИЧНЫЕ НУКЛЕОТИДНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ФЛАНГА РЕТРОТРАНСПОЗОНА RawS5 ИЗ СЕМЕЙСТВА R173 В ГЕНОМАХ ЖИВОТНЫХ И РАСТЕНИЙ

В.И. ГЛАЗКО, М.А. ЕЛЬКИНА, Т.Т. ГЛАЗКО

У пород крупного рогатого скота, овец и домашней лошади, а также сортов риса сравнили спектры продуктов амплификации, получаемые в полимеразной цепной реакции с использованием фланга ретротранспозона RawS5 семейства R173 в качестве праймера. Обнаружено, что спектр ампликонов имеет выраженные породо- и сортоспецифичные характеристики. Обсуждаются возможные причины присутствия в геномах животных и растений гомологичных нуклеотидных последовательностей, ассоциированных с ретротранспозонами, их полиморфизм и эффективность использования в качестве якоря (anchor) для полилокусного геномного генотипирования сельскохозяйственных видов животных и культурных растений.

Ключевые слова: инвертированные терминальные участки ретротранспозонов, IRAP-PCR маркеры (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism), полилокусное генотипирование, полиморфное информационное содержание, доля полиморфных локусов.

Keywords: the inverted terminal retrotransposon repeats, IRAP-PCR markers, polylocus genotyping, polymorphic information contents, share of polymorphic loci.

Применение методов структурной геномики в популяционно-генетических исследованиях позволило перейти от генотипирования отдельных генов к генотипированию геномов, от описания генетической структуры популяций по нескольким генам к их сравнению по полилокусным генотипам (от десятков генов до полного секвенирования) (1). Такое полилокусное генотипирование получило название «геномного сканирования» (2). При полилокусном генотипировании в качестве якорей (anchors) часто служат мобильные генетические элементы (МГЭ) в связи с их широкой представленностью в геномах и высокой степенью полиморфизма (3). Обнаружено также, что некоторые МГЭ очень распространены и гомологичные им фрагменты встречаются у удаленных систематических групп, например разных классов позвоночных (4), растений и животных (5), а также у других таксонов (6).

Геномное сканирование представляет особый интерес для контроля за динамикой генофондов сельскохозяйственных видов не только при решении традиционных селекционных задач, но и в связи с разработкой генетически обоснованных программ по сохранению как исчезающих местных пород сельскохозяйственных животных, так и сортов культурных растений. По данным FAO (Food and Agriculture Organization, <http://www.fao.org>), деградация плодородных почв, водных ресурсов, сокращение биоразнообразия пород и сортов при сельскохозяйственном производстве приобрели угрожающие размеры, фактически не совместимые с его устойчивым развитием (7).

Семейство ретротранспозонов, получившее название R173, впервые описано у ржи: оно включает около 15 тыс. индивидуальных копий на диплоидный геном, рассеянных по всем хромосомам; размер его представителей варьирует от 3 до 6 т.п.н. и две области, фланкирующие R173 элементы, имеют высокую степень гомологии с флангами одного из ретротранспозонов пшеницы (8-10). Оказалось также, что созданная на основе R173 система праймеров позволяет успешно дифференцировать близкородственные дикие и культурные виды растений, сорта картофеля и подсолнечника (11).

Мы попытались оценить возможность подбора универсального якоря для широкого геномного сканирования, выполнив сравнительный анализ полилокусных спектров, получаемых с ДНК основных сельскохозяйственных видов млекопитающих (крупный рогатый скот, овцы, лошади) и однодольных растений (рис) при использовании в этом качестве терминального участка ретротранспозона PawS5 из семейства R173.

Методика. Объектами исследования были сельскохозяйственные животные разных видов и пород — крупный рогатый скот (черно-пестрая порода, красный эстонский и якутский скот), лошади (русская рысистая, карачаевская и алтайская породы), овцы (эдильбаевская, калмыцкая и карачаевская породы) (всего 140 гол.), а также 14 сортов риса (коллекция Всероссийского НИИ риса, г. Краснодар) с неодинаковой продолжительностью вегетационного периода (раннеспелые сорта Дальневосточный, Изумруд, Новатор, Садко, Спринт, Фонтан, Факел; среднеспелые — Виола, Лиман, Приморский, Янтарь; позднеспелые — Лидер, Снежинка).

Для оценки полиморфизма фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными участками ретротранспозона PawS5 (AAC GAG GGG TTC GAG GCC) (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism — IRAP) (8-10), геномную ДНК выделяли из клеток крови животных и проростков растений с использованием коммерческого набора «ДНК-экстран 1» («Синтол», Россия). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на амплификаторе «Терцик» (Россия) с применением смеси ПЦР-РВ («Синтол», Россия). Условия и стадии ПЦР: первоначальная денатурация при 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). Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1,5 % агарозном геле с применением в качестве маркера молекулярных масс ДНК GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus («МБИ Ферментас», США) для определения длины образующихся фрагментов. Для визуализации гели окрашивали бромистым этидием, просматривали под УФ-светом и фотодокументировали.

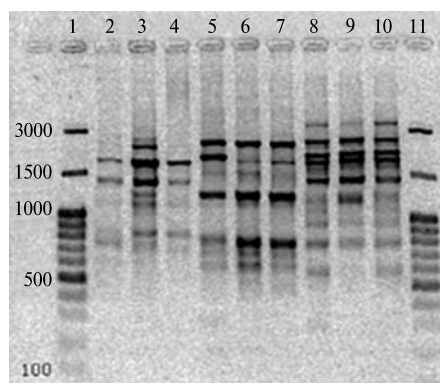


Рис. 1. Электрофоретические спектры ампликонов, полученные в результате IRAP-PCR (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) с использованием терминального участка ретротранспозона PawS5 в качестве праймера, у животных разных видов: 1, 11 — маркер молекулярных масс GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus («МБИ Ферментас», США); 2, 3, 4 — крупный рогатый скот; 5, 6, 7 — овцы; 8, 9, 10 — лошади (по одной особи каждой породы).

Математическую обработку данных осуществляли с применением компьютерной программы TFPGA. Расчет индекса PIC (polymorphic information content) выполняли по формуле для диаллельных локусов: $PIC = 2f(1 - f)$, где f — частота одного из двух аллелей. PIC рассчитывали как среднее значение по всему спектру продуктов амплификации ($PIC_{ср}$). На основании оценок полиморфизма ампликонов вычисляли значения генетического расстояния (D_N , M. Nei, 1978) между исследуемыми группами, и с использованием полученных величин строили дендрограммы. Поиск гомологичных последовательностей для фрагмента PawS5 выполняли в базе данных Gen-Bank NCBI (National Center for Biotechnology Information) с помощью программы BLASTn.

Результаты. При сравнительном анализе генетической структуры у по-

род крупного рогатого скота, овец, лошадей на основании оценок полиморфизма по 25 фрагментам ДНК разной длины (рис. 1) в спектрах продуктов амплификации (ампликонов) выявили фрагменты ДНК размером от 1300 до 480 п.н. Рассчитанные показатели полиморфного информационного содержания ($PIС_{ср.}$) и доля полиморфных локусов (табл. 1) оказались наибольшими у местных пород всех трех видов по сравнению с таковыми в популяциях, в большей степени контролируемых искусственным отбором

1. Характеристика полиморфности спектров ампликонов, полученных у разных видов и пород животных в результате IRAP-PCR (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) с использованием терминального участка ретротранспозона Paws5 в качестве праймера

Порода	Доля полиморфных локусов, %	PIС
Л о ш а д и		
Алтайская	20	0,096
Рысистая	13	0,049
Карачаевская	15	0,108
О в ц ы		
Карачаевская	50	0,195
Эдильбаевская	33	0,110
Калмыцкая	47	0,199
К р у п н ы й р о г а т ы й с к о т		
Черно-пестрый	33	0,108
Якутский	47	0,214
Красный эстонский	47	0,178

П р и м е ч а н и е. PIС — полиморфное информационное содержание.

(черно-пестрый скот, спортивные рысаки, эдильбаевские овцы). Дендрограмма генетических взаимоотношений между исследованными группами, построенная на основании расчета генетических расстояний (D_N) между генотипами по распределению фрагментов ДНК разной длины, фланкированных инвертированным повтором терминального участка Paws5, представлена на рисунке 2.

На дендрограмме выделились два основных кластера: один объединяет два подкластера пород крупного рогатого скота и овец, в другой включены породы лошадей. Полученные

данные свидетельствует о том, что полилокусное генотипирование с использованием в качестве якоря терминального участка ретротранспозона Paws5 отражает реальные события генетической дифференциации между видами, поскольку кластеризация групп исследованных животных соответствует известным таксономическим взаимоотношениям между ними: породы каждого вида формируют общую группу, в один кластер с овцами объединяется крупный рогатый скот (парнокопытные), тогда как породы лошадей образуют автономный кластер (непарнокопытные) (см. рис. 2).

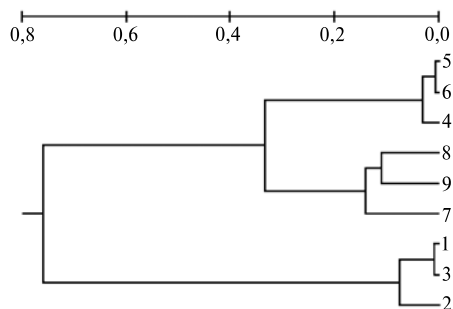


Рис. 2. Дендрограмма, характеризующая генетические расстояния (D_N) между разными видами животных на основании частоты встречаемости 25 локусов, выявляемых в спектрах продуктов IRAP-PCR амплификации (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) с использованием терминального повтора ретротранспозона Paws5 в качестве праймера: 1 — алтайские лошади, 2 — рысаки, 3 — карачаевские лошади, 4 — карачаевские овцы, 5 — эдильбаевские овцы, 6 — калмыцкие овцы, 7 — черно-пестрый скот, 8 — якутские коровы, 9 — красный эстонский скот.

У изученных сортов риса (рис. 3) полученный аналогичный спектр ампликонов включал 13 основных фрагментов длиной от 1000 до 200 п.н., которые отчетливо воспроизводились при повторных амплификациях. Их рассматривали как мажорные ампликоны спектра; фрагменты ДНК, идентификация которых вызывала затруднения (минорные ампликоны) при повторных амплификациях, не учитывали. При ПЦР с указанным праймером у растений не было обнаружено внутрисортных различий по мажор-

ным ампликонам, однако отмечались выраженные межсортовые различия: число ампликонов варьировало от 5 (сорта Садко, Фонтан, Янтарь) до 9 (сорта Дальневосточный, Факел, Снежинка).

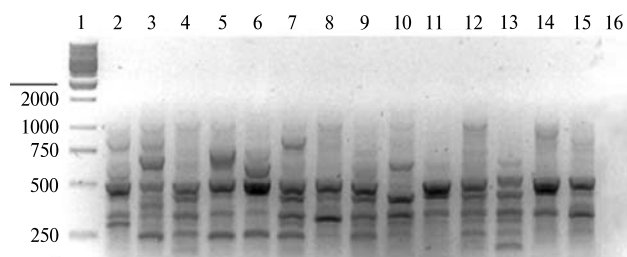


Рис. 3. Электрофоретические спектры ампликонов, полученные у разных сортов риса в результате IRAP-PCR (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) с использованием терминального участка ретротранспозона PawS5 в качестве праймера: 1 — маркер молекулярных масс GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus («MBI Fermentas», США), 2 — Виола, 3 — Дальневосточный, 4 — Изумруд, 5 — Лидер, 6 — Лиман, 7 — Новатор, 8 — Приморский, 9 — Рапан, 10 — Садко, 11 — Спринт, 12 — Снежинка, 13 — Факел, 14 — Фонтан, 15 — Янтарь, 16 — отрицательный контроль.

В спектрах ампликонов почти у всех исследованных сортов регулярно присутствовали фрагменты, имевшие размеры около 500, 450, 350 и 250 п.н. (табл. 2), которые существенно короче самого ретротранспозона (от 3 до 6 т.п.н.) (3, 4). Это позволяет предполагать, что у разных сортов риса в геномах относительно постоянно сохраняется взаимное близкое позиционирование терминальных участков PawS5 на коротких рас-

стояниях (250-500 п.н.) в альтернативных цепочках ДНК.

2. Характеристика основных ампликонов, полученных у разных сортов риса в результате IRAP-PCR (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) с использованием терминального участка ретротранспозона PawS5 в качестве праймера

Сорт	Длина ампликона, п.н.												Число ампликонов	
	1000	950	850	750	700	600	500	450	400	350	300	250		200
Дальневосточный	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	9
Изумруд	+	0	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	7
Новатор	+	0	+	0	0	0	+	+	0	+	+	+	+	8
Садко	+	0	0	0	+	0	0	+	0	+	+	0	0	5
Спринт	0	0	0	0	+	0	+	+	+	+	+	0	0	6
Факел	0	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	9
Фонтан	+	+	0	0	0	0	+	+	0	+	0	0	0	5
Виола	0	0	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	6
Лиман	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	7
Приморский	+	0	+	0	0	0	+	+	0	+	0	+	0	6
Янтарь	0	0	+	0	0	0	+	+	0	+	0	+	0	5
Лидер	+	0	0	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	7
Рапан	0	0	0	0	0	+	+	+	0	+	+	+	0	6
Снежинка	+	0	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	9

Разнообразие изученных сортов риса по продуктам амплификации свидетельствует о том, что у этих сортов инсерции/делеции таких фрагментов происходят достаточно активно. Высокая скорость эволюции генома риса, связанная с транспозирующимися элементами, достаточно подробно описана в литературе (12): показано, что частота делеций и инсерций транспозирующихся элементов в 2 раза выше, чем синонимичных замен в среднем по структурным генам. Повышенная мобильность членов семейства R 173 обнаружена по внутрисортовой изменчивости их присутствия/отсутствия у сорта ржи в связи с продолжительностью хранения семян (13). По-видимому, именно высокая скорость эволюции транспозирующихся последовательностей в геноме риса может объяснять уникальность сочетания продуктов амплификации фрагментов ДНК, фланкированных инвертированным повтором ретротранспозона PawS5, для каждого из 14 исследованных сортов.

Интересно отметить, что по сравнению с растениями риса у млекопитающих в геноме реже встречаются короткие (менее 480 п.н.) мажорные фрагменты ДНК, фланкированные инвертированным повтором RawS5 (см. рис. 1, 2). Возможно, причина заключается в том, что у этой культуры геном примерно в 6 раз меньше, чем у парно- и непарнокопытных.

При поиске гомологичных последовательностей для фрагмента RawS5 в GenBank было обнаружено большое число участков с частичной гомологией. У млекопитающих, как правило, они локализованы в области полигенного семейства P450 и генов, связанных с функцией иммунной системы, факторов регуляции транскрипции. В целом участки гомологии к флангу RawS5 широко представлены таксономически, в том числе у прокариотических видов.

В последние годы накапливаются данные о широком распространении горизонтального переноса различных мобильных элементов, в частности транспозона Гелитрона между грибами, растениями и животными (5), транспозона Гелитрона между удаленными таксонами животных (6), ретротранспозонов между видами культурных растений (14). Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что распространенность геномных связей между представителями различных таксонов благодаря мобильным генетическим элементам может быть гораздо более существенной, чем традиционно принято считать.

Таким образом, наличие в геномах сельскохозяйственных видов животных и культурных растений гомологичных последовательностей делает возможным успешное использование последних в роли якоря при геномном сканировании и полилокусном генотипировании. В частности, применение в этих целях терминального фрагмента RawS5 в качестве праймера в полимеразной цепной реакции позволяет получать полилокусные спектры продуктов амплификации, с помощью которых можно надежно дифференцировать как породы животных (крупного рогатого скота, овец и лошадей), так и сорта сельскохозяйственных культур (например, риса).

ЛИТЕРАТУРА

1. Luikart G., England P.R., Tallmon D. et al. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nat. Rev. Genet.*, 2003, 4: 981-994.
2. Manel S., Schwartz M.K., Luikart G. et al. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends Ecol. Evol.*, 2003, 18: 189-197.
3. Mei L., Ding X., Tsang S.-Y. et al. AluScan: a method for genome-wide scanning of sequence and structure variations in the human genome. *BMC Genomics*, 2011, 12: 564-573.
4. Kordis D., Gubensek F. Unusual horizontal transfer of a long interspersed nuclear element between distant vertebrate classes. *PNAS USA*, 1998, 95: 10704-10709.
5. Yang L., Bennetzen J.L. Structure-based discovery and description of plant and animal Helitrons. *PNAS USA*, 2009, 106: 12832-12837.
6. Thomas J., Schaack S., Pritham E.J. Pervasive horizontal transfer of rolling-circle transposons among animals. *Genome Biol. Evol.*, 2010, 2: 656-664.
7. Состояние всемирных генетических ресурсов животных в сфере продовольствия и сельского хозяйства. Пер. с англ.: *The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture* /B. Rischkowsky, D. Pilling (eds.), (FAO, Rome, 2007). М., ФАО—ВИЖ РАСХН, 2010.
8. Rogowsky P.M., Manning S., Liu J.-Y., Langridge P. The R173 family of rye-specific repetitive DNA sequences: a structural analysis. *Genome*, 1991, 34: 88-95.
9. Rogowsky P.M., Liu J.Y., Manning S., Taylor C., Langridge P. Structural heterogeneity in the R173 family of rye-specific repetitive DNA sequences. *Plant Mol. Biol.*, 1992, 20(1): 95-102.
10. Rogowsky P.M., Shepherd K.W., Langridge P. Polymerase chain reaction based mapping of rye involving repeated DNA sequences. *Genome*, 1992, 35(4): 621-628.
11. Зайцев В.С., Хавкин Э.Е. Идентификация генотипов растений с помощью ПЦР-

- анализа рассеянных повторяющихся последовательностей R173. Доклады РАСХН, 2001, 2: 3-5.
12. Ma J., Bennetzen J.L. Rapid recent growth and divergence of rice nuclear genomes. PNAS USA, 2004, 101(34): 12404-12410.
 13. Chwedorzewska K.J., Bednarek P.T., Puchalski J. Studies on changes in specific rye genome regions due to seed aging and regeneration. Cell Mol. Biol. Lett., 2002, 7(2A): 569-576.
 14. Roulin A., Piegu B., Fortune P.M., Sabot F., D'Hont A., Manicacci D., Panaud O. Whole genome surveys of rice, maize and sorghum reveal multiple horizontal transfers of the LTR-retrotransposon Route66 in *Poaceae*. BMC Evol. Biol., 2009, 9: 58 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2148/9/58>).

ФГБОУ ВПО Российский государственный
аграрный университет—МСХА
им. К.А. Тимирязева,
127550 г. Москва, ул. Тимирязевская, 49,
e-mail: vglazko@yahoo.com

Поступила в редакцию
20 апреля 2012 года

HOMOLOGOUS NUCLEOTIDE SEQUENCES OF THE FLANK OF RETROTRANSPOSON PawS5 OF R173 FAMILY IN ANIMAL AND PLANT GENOMES

V.I. Glazko, M.A. El'kina, T.T. Glazko

S u m m a r y

A comparative analysis was carried out of the amplification product spectra received in polymerase chain reaction with the use of both animal (cattle, sheep and horse breeds) and plant (rice varieties) DNA and the flank of retrotransposon PawS5 of R173 family as a primer. The breed-specific traits in animals and the variety-specific traits in rice were revealed in the amplicons spectra. The possible reasons for presence in genomes of animals and plants of the homologous nucleotide sequences associated with the retrotransposon, their polymorphism and efficiency of use as an anchor for a polylocus genomic genotyping of plants and animals are discussed.

**Редакция журнала «Сельскохозяйственная биология»
выполняет рассылку электронных отписков опубликованных статей**

Для получения электронного отписка Вам необходимо:

- ❖ отослать точное описание заказа (авторы и название статьи, год, номер журнала, страницы) по адресу agrobiol@mail.ru, указав Ваши фамилию, имя, отчество (полностью), город, где проживаете, контактные e-mail и телефон;
- ❖ получить из редакции по своему контактному e-mail подтверждение заказа (с присвоенным ему номером);
- ❖ оплатить услугу, указав в платежном документе в графе «Назначение платежа» присвоенный заказу номер и Ваши фамилию, имя, отчество.

Отписки высылаются на Ваш контактный e-mail после зачисления оплаты на счет редакции.

Банковские реквизиты редакции:

Получатель:

ИНН 7708051012 Редакция журнала «Сельскохозяйственная биология», Марьиноорошинское ОСБ 7981, г. Москва, р/с 40703810638050100603

Банк получателя:

Сбербанк России ОАО г. Москва, БИК 044525225, к/с 30101810400000000225

В назначении платежа укажите номер заказа, Ваши фамилию, имя, отчество.

Стоимость услуги:

- ❖ один отиск — 120 руб.,
- ❖ не более шести отписков (абонемент) — 360 руб.,
- ❖ не более двенадцати отписков (абонемент) — 700 руб.

Цены приведены с учетом НДС 10 %. Абонементное обслуживание предполагает предоставление указанного числа отписков за период не более каждого текущего года по предоплате.

E-mail для заказа электронных отписков — agrobiol@mail.ru

© Электронные отписки являются интеллектуальной собственностью редакции журнала «Сельскохозяйственная биология». Внесение в них каких бы то ни было изменений и дополнений не допускается. Перепечатка, тиражирование, размещение в средствах информации, в том числе электронных и сети Интернет, а также коммерческое распространение возможны только с разрешения редакции.