

МОЛЕКУЛЯРНА СТРУКТУРА ТА ОРГАНІЗАЦІЯ ГЕНОМІВ

БОРХЕРТ Е.В.¹, КУДРЯВЦЕВ А.М.¹, ОКУНЕВА И.Б.², РЕБРИКОВ Д.В.¹

¹Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова Российской академии наук

²Главный ботанический сад им. Н.В.Цицина Российской академии наук

TY1-COPIA-LIKE РЕТРОТРАНСПОЗОНЫ СИРЕНИ ОБЫКНОВЕННОЙ (*SYRINGA VULGARIS* L.)

К настоящему моменту существует огромное разнообразие сортов сирени, в мире насчитывается несколько тысяч различных сортов сирени, среди которых особенно многочисленны и распространены сорта сирени обыкновенной (*Syringa vulgaris* L.), что связано с их высокими декоративными качествами. Сорта сирени обыкновенной сильно варьируют по форме, окраске цветков и по размерам соцветий. Однако, за исключением относительно короткого периода цветения сорта сирени обыкновенной фенотипически практически неотличимы друг от друга (исключение составляют сорта с пестроокрашенными листьями), что делает трудным идентификацию сортов. Поэтому в настоящее время наиболее точным является определение сортовой принадлежности того или иного растения в период цветения. Так же представляется весьма затруднительной идентификация сортов сирени обыкновенной на ранних этапах онтогенеза и при микроклональном размножении.

Решить данную проблему можно используя молекулярно-генетические методы идентификации. Однако генетика сирени является малоизученной областью, поэтому для создания маркеров необходимо выборочное изучение и определение последовательности отдельных участков генома сирени, с тем, чтобы на основе полученных данных, разработать надежные молекулярно-генетические маркеры, позволяющие определять сортовую принадлежность того или иного растения сирени на любом этапе его развития.

Однако, сирень является генетически малоизученным объектом, что затрудняет создание молекулярно-генетических маркеров. Поэтому необходимым этапом в создании таких маркеров является изучение молекулярной структуры генома сирени в частности обнаружение ретроэлементов сирени обыкновенной. С тем чтобы в дальнейшем использовать полученные данные при разработке молекулярно-генетического подхода к маркированию сортов сирени обыкновенной. Целью данной работы является обнаружение у сирени обыкновенной ретроэлементов и секвенирование отдельных участков этих мобильных генетических элементов с возможной последующей перспективой использования полученных данных для создания генетических маркеров направленных именно на выявление межсортовых различий у сирени обыкновенной.

Известно, что у различных видов растений генетические мобильные элементы имеют сходную структуру и обладают высококонсервативными участками. При этом места встраивания мобильных генетических элементов у различных видов растений варьируют весьма сильно, что связано со случайностью встройки данных элементов в геном. При анализе имеющихся доступных данных сиквенсов мобильных элементов у отдельных представителей семейств, относительно близких роду сирень. Анализу были подвергнуты ретроэлементы табака (*Nicotiana tabacum*), батата (*Ipomoea batatas*), винограда (*Vitis vinifera*), томата (*Solanum lycopersicum*) и апельсина (*Citrus sinensis*). В результате анализа было установлено наличие нескольких идентичных участков внутри мобильных элементов, что позволило выдвинуть гипотезу о существовании и у сирени подобных участков, поскольку необходимых данных о строении ретроэлементов у сирени не было обнаружено.

На основе обнаруженных участков было создано 6 праймеров. Их предполагаемое взаимное расположение с указанием предполагаемых длин амплифицируемых фрагментов показано на рисунке 1.

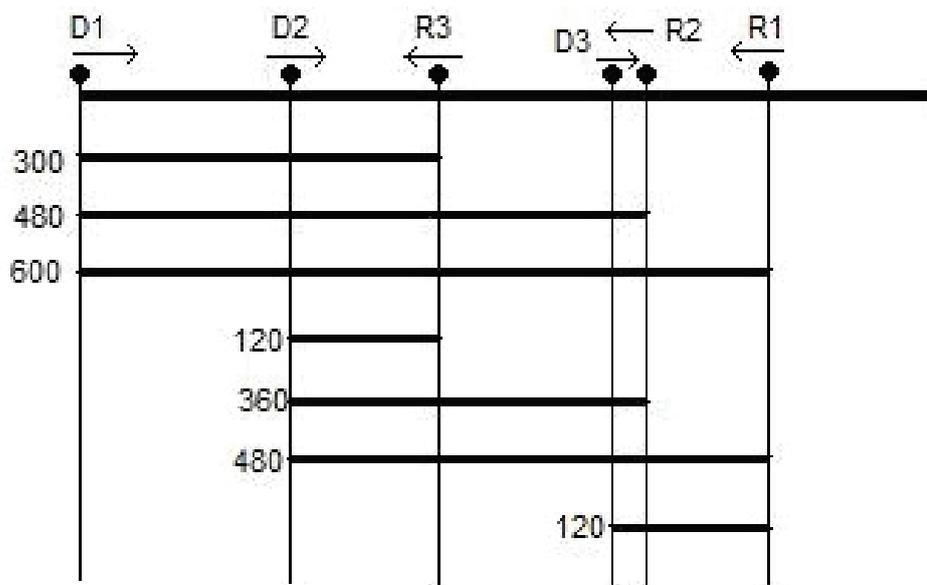


Рисунок 1. Взаимное расположение праймеров с указанием длин фрагментов.

В схеме стрелками указано направление амплификации, буквами обозначены праймеры с указанием их условного номера. Горизонтальными линиями показаны фрагменты, получаемые с той или парой праймеров, слева указана предполагаемая длина полученного фрагмента на основании имеющихся теоретических данных.

По результатам работы с 7 возможными комбинациями праймеров были получены фрагменты, которые соответствовали теоретически ожидаемым длинам. Эти фрагменты были в дальнейшем подвергнуты клонированию и секвенированию. Результатом стало получение 2-х достаточно длинных сиквенсов фрагментов 273 и 489 п.н. соответственно. Анализ данных показал, что имеющиеся фрагменты, являющиеся частью ретроэлемента, относятся к двум различным транспозонам. В результате последующих работ по genome walking длины полученных сиквенсов были увеличены и составили 613 п.н. и 1011 п.н. соответственно. К дальнейшим перспективам работы следует отнести genome walking, с тем, чтобы получить данные о месте интеграции ретроэлемента в геном сирени обыкновенной. И на основе сиквенсов полученных данных разработать молекулярные маркеры сирени обыкновенной.

Литература

1. Лунова З.С., Михайлов Е.А., Судакова Е.А. Сирень // Москва: Агропромиздат, 1989.- 256 с.
2. Мельникова Н.В., Борхерт Е.В., Мартынов С.П., Окунева И.Б., Молканова О.И., Упельник В.П., Кудрявцев А.М. Использование молекулярно-генетических маркеров для верификации коллекций in vitro сирени обыкновенной (*Syringa vulgaris* L.)// Москва: Генетика, 2009, том 45, №1, с. 97–103.
3. Shagin D.A., Lukyanov K.A., Vagner L.L., Matz M.V. Regulation of average length of complex PCR product // Nucleic Acids Research, 1999, Vol. 27, № 18.
4. Matz M., Shagin D., Bogdanova E., Britanova O., Lukyanov S., Diatchenko L., Chenchik A. Amplification of DNA ends based on template-switching effect and step-out PCR// Nucleic Acids Research, 1999, Vol. 27, №6, p. 1558-1560.

Резюме

Разработан подход в обнаружении ретротранспозонов на сирени обыкновенной. При использовании данного подхода обнаружены два различных ретротранспозона у сирени. Получены последовательности части каждого транспозона.

Розроблено підхід у виявленні ретротранспозонів у бузку звичайному. При використанні даного підходу виявлено два різних ретротранспозона у бузку. Отримані послідовності частини кожного транспозона.

An approach to the detection of retrotransposons of common lilac was proposed. Two different retrotransposons of the lilac were found with using of this approach. Partial sequences of each retrotransposon were obtained.

ВИНИЧЕНКО Н.А., КИРИКОВИЧ С.С., ЛЕВИТЕС Е.В.

Институт цитологии и генетики СО РАН,

Россия, 630090, Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 10, e-mail: levites@bionet.nsc.ru

ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ ЭПИМУТАГЕНОМ «ТРИТОН X-100» НА ОРГАНИЗАЦИЮ ЛОКУСА *Adh1* САХАРНОЙ СВЕКЛЫ,

Ранее нами была предложена модификация метода ISSR-амплификации (inter-simple sequence repeat, «между повторяющихся простых последовательностей») [1-3]. В отличие от базового метода, основанного на применении в индивидуальном эксперименте одиночного микросателлитного праймера для ПЦР [1], модифицированный метод предполагает использование микросателлитного праймера в паре с праймером, специфичным к целевому локусу. Это позволяет увеличить специфичность и упростить структуру получаемых ПЦР-профилей [2, 3].

Используя модифицированный метод ISSR-амплификации при изучении ДНК листьев агамоспермных потомков гетерозиготных растений сахарной свеклы, мы обнаружили полиморфизм ПЦР-профилей локуса *Adh1*, контролирующего фермент алкогольдегидрогеназа (ADH). Родительское растение, имеющее в геноме один *F* и один *S* аллель локуса *Adh1*, дало потомство, в котором обнаружилось четыре типа ПЦР-профилей *F*-аллеля и два типа ПЦР-профилей *S*-аллеля. Изоферментные спектры гетерозигот различались между собой по относительной активности аллельных изоформ и, следовательно, по уровню экспрессии аллелей *Adh1-F* и *Adh1-S* [2-4].

В ходе последующих исследований нами были выявлены тканевые различия ПЦР-профилей локуса *Adh1* у сахарной свеклы. Обнаружилось отсутствие разнообразия ПЦР-профилей, полученных на корневой ДНК родственных растений, тогда как соответствующие ПЦР-профили, полученные на ДНК листьев, отличались [5]. Выявленные различия ПЦР-профилей локуса *Adh1* разных тканей свидетельствует о тканевых различиях организации хромосом. Выявление этих различий говорит в пользу гипотезы о многомерности кодирования наследственной информации у растений [6, 7]. В основе этой гипотезы лежит предположение о дифференциальной эндоредупликации различных районов хромосомы. Известно, что дифференцировка тканей растения сопровождается эндоредупликацией хромосом [8]. Можно предположить, что полиморфизм ПЦР-профилей обусловлен разной степенью эндоредупликации района хромосомы, несущего локус *Adh1*, у исследуемых растений. Поскольку важную роль в структурно-функциональной организации генома играет взаимодействие хромосом с ядерной мембраной и ядерным матриксом, не исключено, что степень эндоредупликации хромосом или их отдельных участков может, так или иначе, зависеть от контакта с ядерной мембраной. Поэтому нарушение такого взаимодействия может сказаться как на степени эндоредупликации, так и на характере получаемых ПЦР-профилей исследуемого района хромосомы. Проверке этого предположения посвящена данная работа. Для нарушения связи хромосом с ядерной мембраной взят детергент Тритон X-100. В связи с этим проведено сравнение ПЦР-профилей, получаемых на матрице ДНК контрольных и обработанных Тритоном X-100 растений.