

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 575.174

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НЕТРАНСКРИБИРУЕМОГО СПЕЙСЕРА 5S-рДНК У *HIPPORHAE RHAMNOIDES* L.

О.С. Александров\*, А.В. Евтухов, И.И. Киселёв, Г.И. Карлов

Центр молекулярной биотехнологии, Российский государственный аграрный университет — Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева; Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49  
\*e-mail: olegsandrov@gmail.com

Амплификация нетранскрибируемого спейсера 5S-рДНК облепихи крушиновидной (*Hipporhae rhamnoides* L.) с помощью праймеров, подобранных на фланги соседних кодирующих областей, показала наличие единичного фрагмента. Данный фрагмент был клонирован и секвенирован. Было обнаружено, что длина нетранскрибируемого спейсера облепихи составляет 807 п.о. Анализ последовательности показал высокий уровень гомологии с ранее описанными микросателлитными локусами облепихи, лоха серебристого (*Elaeagnus angustifolia* L.) и джугуна (*Calligonum mongolicum* Turcz.), включающими мотив (GA)<sub>n</sub>. Полученные результаты могут быть полезны для дальнейшего изучения организации генов рибосомной РНК.

**Ключевые слова:** 5S-рДНК, нетранскрибируемый спейсер, микросателлитный локус, *Hipporhae rhamnoides* L., *Elaeagnus angustifolia* L., *Calligonum mongolicum* Turcz.

У большинства животных и семенных растений гены, кодирующие рибосомную РНК 5S-субъединицы, организованы в виде кластеров, состоящих из мономеров, располагающихся тандемно по принципу “голова-хвост” [1–3]. Каждый мономер включает в себя консервативную 120-нуклеотидную кодирующую область и нетранскрибируемый спейсер (NTS), длина и нуклеотидный состав которого, как правило, различаются у разных видов [4–6]. Полиморфизм NTS 5S-рДНК используют для филогенетических исследований, анализа гибридов и разработки видоспецифичных маркеров [7, 8]. Благодаря тому, что кодирующие участки кластеров 5S-рДНК консервативны, можно провести амплификацию NTS у широкого круга видов с помощью одной и той же пары праймеров, подобранной на фланги генов (рисунок). Часто используют системы праймеров, разработанные Пендасом и др. (1995); Брауном и Карлсоном (1997); Шмидтом (1994) [4, 9, 10].

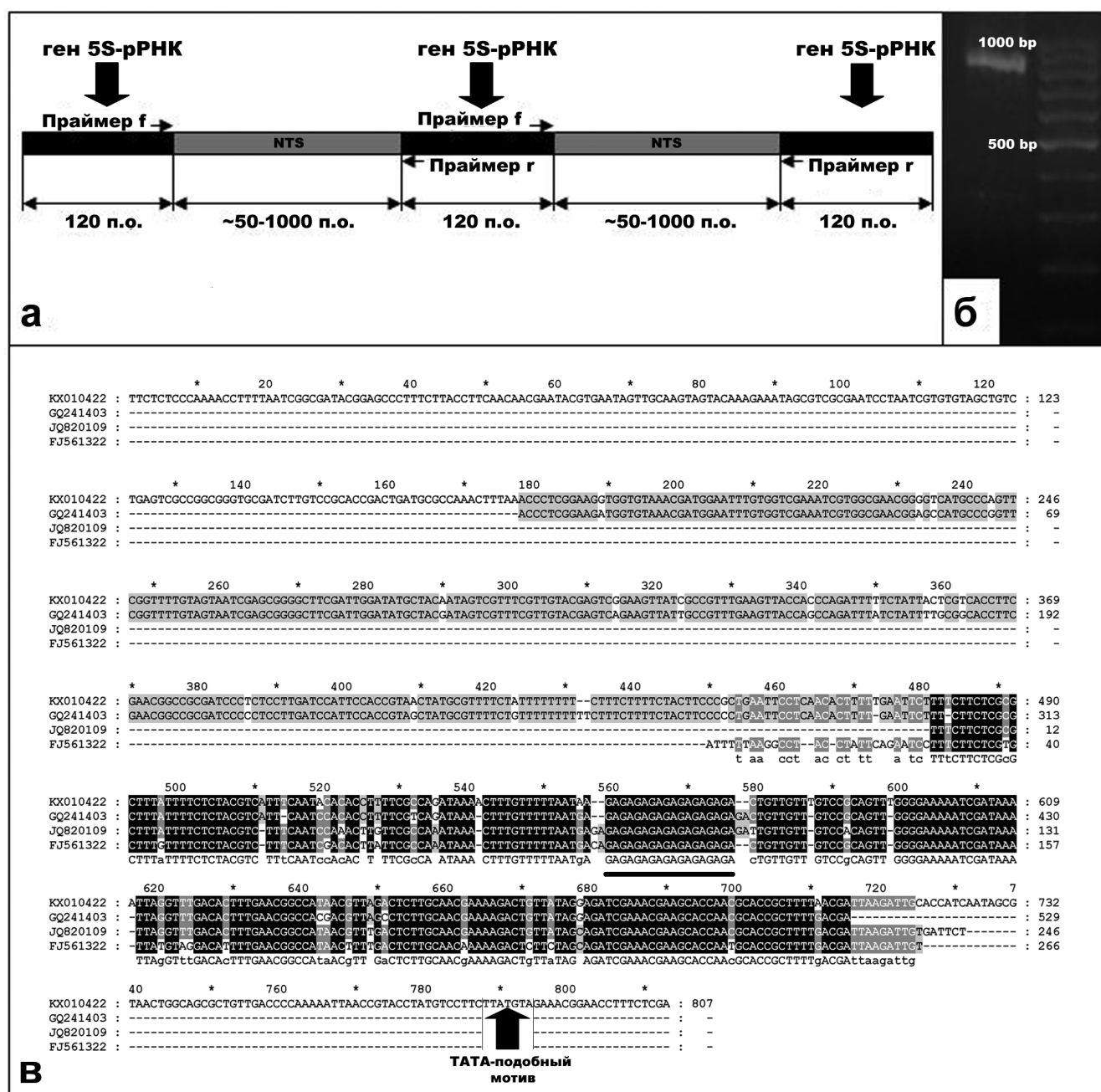
Облепиха крушиновидная (*Hipporhae rhamnoides* L., 2n = 24) — двудомный многоствольный кустарник (реже дерево) семейства Elaeagnaceae, имеющий обширный ареал преимущественно в северном полушарии Евразии и использующийся в качестве плодовой и лекарственной культуры [11]. Для биологической науки это растение интересно тем, что в его кариотипе имеются половые хромосомы. Было показано, что обычно в паре половых хромосом Y-хромосома короче X-хромосомы. Однако среди генотипов *H. rhamnoides*, произрастающих на территории Румынии, встречаются такие, у которых Y-хромосома значительно длиннее X-хромосомы [12]. Молекулярно-генетическому и цитогенетическому изучению облепихи крушиновидной посвящено не так много работ. Известно, что размер ее

генома составляет  $\sim 2,55 \times 10^9$  п.о./2C [13]. Для идентификации пола растений облепихи были предложены только маркеры на основе случайно амплифицируемой полиморфной ДНК (RAPD-маркеры). Также предпринимались попытки использования RAPD и других видов молекулярных маркеров для изучения полиморфизма облепихи [11].

Локусы 5S-рДНК у облепихи ещё не изучены. Данная работа является первым сообщением о последовательности NTS 5S-рДНК облепихи.

## Материалы и методы

В работе использовались образцы облепихи крушиновидной сорта Ломоносовская, любезно предоставленные сектором дендрологии Ботанического сада МГУ. ДНК выделяли из молодых листьев облепихи согласно методике Дойл и Дойл 1990 [14]. Амплификацию NTS 5S-рДНК проводили на амплификаторе C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad, США), используя систему праймеров 5S1/5S2 [8] и программу: 1) 94°C — 5 мин; 2) 30 циклов (94°C — 20 с, 60°C — 20 с, 72°C — 20 с.); 3) 72°C — 10 мин. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации осуществляли в 1,5%-ном агарозном геле при 5 В/см и фотографировали с помощью системы гель-документации Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США). Продукт полимеразной цепной реакции (ПЦР) очищали с помощью набора GenJet™ PCR Purification Kit (Fermentas, Латвия) и клонировали в векторе pGEM-T Vector Easy (Promega, США) согласно инструкциям производителей. Отбор клонов со вставками осуществляли с помощью белой голубой селекции, размер вставок определяли с помощью ПЦР со стандартными праймерами M13. Из отобранных клонов выделяли плазмидную ДНК



**Рисунок.** Организация локусов 5S-рДНК и система праймеров для амплификации NTS (а); электрофоретическая детекция продуктов ПЦР с праймерами 5S1/5S2 на матрице тотальной ДНК *H. rhamnoides* L., маркер молекулярного веса (100 bp DNA Ladder Jena Bioscience GmbH, Германия) (б); выравнивание последовательности NTS 5S-рДНК *H. rhamnoides* L. (KX010422) и гомологичных микросателлитных локусов *H. rhamnoides* L. (GQ241403), *Elaeagnus angustifolia* (JQ820109) и *Calligonum mongolicum* Turcz. (FJ561322), жирной линией выделен мотив (GA)<sub>9</sub> (в)

с помощью GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Латвия) и секвенировали на секвенаторе ABI 3139xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Секвенирование проводили по 3 раза с каждого из M13-праймеров. Анализ последовательностей проводили с помощью программного обеспечения GenDoc [15] и BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### Результаты и обсуждение

Амплификация с праймерами 5S1/5S2 на матрице тотальной геномной ДНК *Hippophae rhamnoides* L. показала наличие единичного фрагмента

длиной около 900 п.о. (рисунок). После клонирования ПЦР-продукта вставки 10 отобранных клонов были секвенированы. Идентичность полученных последовательностей составляла 97–98%, что характерно для эволюционно зрелых видов, у которых давно произошла гомогенизация нетранскрибируемых спейсеров 5S-рДНК. Консенсусная 807-нуклеотидная последовательность NTS 5S-рДНК *Hippophae rhamnoides* L. была размещена в базе данных Genbank (KX010422).

Анализ полученной последовательности NTS 5S-рДНК *Hippophae rhamnoides* L. показал наличие восьминуклеотидного ТАТА-подобного мотива,

расположенного на расстоянии 26 п.о. до начала гена 5S-рРНК (рисунок). Наличие таких мотивов, схожих с классической последовательностью ТАТА-бокса, распространённого промотора архей и эукариот, является структурно-функциональной особенностью многих ранее описанных NTS 5S-рДНК.

Ещё одной особенностью NTS 5S-рДНК *Hippophae rhamnoides* L. является присутствие микросателлитного локуса (GA)<sub>9</sub> в позиции –252/–235 от начала гена 5S-рРНК. Среди растений подобное явление (но с другими микросателлитными мотивами) описано лишь у *Populus deltoides* (мотив (GAA)<sub>10–13</sub>) и ещё у нескольких видов тополей, а также у *Lens culinaris* (мотив (TA)<sub>6–21</sub>) [9, 16, 17]. Поэтому можно заключить, что NTS 5S-рДНК с микросателлитным мотивом (GA)<sub>9</sub> у растений найден впервые. Наличие микросателлитного мотива в последовательности NTS 5S-рДНК, однако, часто встречается у рыб: (GCT)<sub>10</sub> у *Potamotrygon motoro* [18], (CA)<sub>13</sub> у *Merluccius albus* [19], (GCT)<sub>8–11</sub> у *Micropterus salmoides* [20], (CA)<sub>48</sub> у *Molva molva* [21], (CA)<sub>14</sub> у *Aulopus japonicus* [22], (TTTG)<sub>5</sub> у *Danio rerio* [23] и др. Широко известно, что NTS 5S-рДНК, как и многие другие спейсерные последовательности генома, являются эволюционно пластичными регионами. Эта пластичность обусловлена тем, что мутационные изменения в этих регионах не оказывают существенного влияния на функцию синтеза 5S-рРНК и, закрепляясь, достаточно быстро накапливаются. Появление микросателлитных повторов в NTS 5S-рДНК у облепихи, так же, как и у рассмотренных выше рыб и растений — это один из частных случаев данного процесса.

BLAST-анализ NTS 5S-рДНК *Hippophae rhamnoides* L. выявил высокий уровень гомологии достаточно протяженных участков изучаемой последовательности с ранее секвенированными микро-

сателлитными локусами *Hippophae rhamnoides* L. (Elaeagnaceae) [11], *Elaeagnus angustifolia* (Elaeagnaceae) [24] и *Calligonum mongolicum* Turcz. (Polygonaceae) [25] (рисунок; таблица). Во всех этих последовательностях также присутствует тандемный мотив (GA)<sub>9</sub>.

Таблица

Идентичность участков NTS 5S-рДНК *H. rhamnoides* L. и гомологичных микросателлитных локусов

Название локуса	Вид	Длина участка, гомологичного NTS 5S-рДНК <i>H. rhamnoides</i> L., п.о.	Идентичность, %
GQ241403	<i>Hippophae rhamnoides</i> L.	529	93
JQ820109	<i>Elaeagnus angustifolia</i>	238	92
FJ561322	<i>Calligonum mongolicum</i> Turcz.	239	89

Данная работа является первым шагом в изучении локусов 5S-рДНК у облепихи и её сородичей и может быть востребована при установлении молекулярно-филогенетических отношений между видами Elaeagnaceae, а также внести вклад в понимание организации генов 5S-рРНК у растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке ведущих научных школ Российской Федерации (Грант Президента № НШ-8315.2016.11) и с использованием уникальной научной установки “Комплекс для проведения междисциплинарных исследований в области сравнительной и функциональной геномики растений”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Martins C., Wasko A.P. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome // Focus on Genome Research / Eds. C.R. Williams. Hauppauge: Nova Science Publishers, 2004. P. 289–319.
2. Wicke S., Costa A., Muñoz J., Quandt D. Restless 5S: the re-arrangement(s) and evolution of the nuclear ribosomal DNA in land plants // Mol. Phylogenet. Evol. 2011. Vol. 61. N 2. P. 321–332.
3. Vierna J., Wehner S., Höner zu Siederdissen C., Martínez-Lage A., Marz M. Systematic analysis and evolution of 5S ribosomal DNA in metazoans // Heredity. 2013. Vol. 111. N 5. P. 410–421.
4. Pendas A.M., Moran P., Martinez J.L., Garcia-Vasquez E. Applications of 5S rDNA in Atlantic salmon, brown trout, and in Atlantic salmon × brown trout hybrid identification // Mol. Ecol. 1995. Vol. 4. N 2. P. 275–276.
5. Liu Z.L., Zhang D., Wang X.Q., Ma X.F. Intragenomic and interspecific 5S rDNA sequence variation in five asian pines // Am. J. Bot. 2003. Vol. 90. N 1. P. 17–24.
6. Mythili Avadhani M.N., Immanuel Selvaraj C., Tharashand C., Rajasekharan P.E. Molecular characterization of medicinal and aromatic plants by 5S rRNA NTS and PCR

RFLP — A mini review // Res. Biotechnol. 2012. Vol. 3. N 2. P. 41–48.

7. Brown G.R., Carlson J.E. Molecular cytogenetics of the genes encoding 18s–5.8s–26s rRNA and 5s rRNA in two species of spruce (*Picea*) // Theor. Appl. Genet. 1997. Vol. 95. N 1–2. P. 1–9.

8. Schmidt T., Schwarzacher T., Heslop-Harrison J.S. Physical mapping of rRNA genes by fluorescent in situ hybridization and structural analysis of 5S rRNA genes and intergenic spacer sequences in sugar beet (*Beta vulgaris*) // Theor. Appl. Genet. 1994. Vol. 88. N 6. P. 629–636.

9. Wilson N. Genome analysis of *Populus* species: assessment of genetic diversity of *P. deltoides*, characterization of wide hybrids and phylogenetic analysis using molecular markers. New Delhi: Teri University, 2013. 177 p.

10. Александров О.С., Карлов Г.И., Сорокин А.Н., Потапенко Н.Х. Создание системы молекулярных маркеров для видовой идентификации представителей рода Тополь и анализа гибридов // Материалы III Всероссийской молодежной конференции с участием иностранных учёных “Перспективы развития и проблемы современной ботаники” (Новосибирск, 10–14 ноября 2014 г.). Новосибирск: Академиздат, 2014. С. 123–124.

11. Islam A., Sinha P., Sharma S.S., Negi M.S., Tripathi S.B. Isolation and characterization of novel polymorphic microsatellite loci in *Hippophae rhamnoides* // Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B. Biol. Sci. 2015. DOI: 10.1007/s40011-015-0646-2.
12. Truta E., Capraru G., Rosu C.M., Zamfirache M.M., Olteanu Z., Manzu C. Morphometric pattern of somatic chromosomes in three Romanian seabuckthorn genotypes // Caryologia. 2011. Vol. 64. N 2. P. 189–196.
13. Zhou X., Ma J., Wang W., Gong N., Liu J. Genome size of the diploid hybrid species *Hippophae goniocarpa* and its parental species, *H. rhamnoides* ssp. *sinensis* and *H. neurocarpa* ssp. *neurocarpa* (Elaeagnaceae) // Acta Biol. Cracoviensis Ser. Bot. 2010 Vol. 52. N 2. P. 12–16.
14. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. 1990. Vol. 12. N 1. P. 13–15.
15. GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation [Электронный ресурс]. 1997. URL: <http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/ebinet.htm> (дата обращения: 10.08.2016).
16. Negi M.S., Rajagopal J., Chauhan N., Cronn R., Lakshmikumaran M. Length and sequence heterogeneity in 5S rDNA of *Populus deltoides* // Genome. 2002. Vol. 45. N 6. P. 1181–1188.
17. Fernández M., Ruiz M.L., Linares C., Fominaya A., Pérez de la Vega M. 5S rDNA genome regions of *Lens* species // Genome. 2005. Vol. 48. N 5. P. 937–942.
18. Cruz V.P., Oliveira C., Foresti F. An intriguing model for 5S rDNA sequences dispersion in the genome of freshwater stingray *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) // Mol. Biol. 2015. Vol. 49. N 3. P. 466–469.
19. Campo D., Machado-Schiaffino G., Horreo J.L., Garcia-Vazquez E. Molecular organization and evolution of 5S rDNA in the genus *Merluccius* and their phylogenetic implications // J. Mol. Evol. 2009. Vol. 68. N 3. P. 208–216.
20. Deiana A.M., Cau A., Salvadori S., Coluccia E., Cannas R., Milia A. Tagliavini J. Major and 5S ribosomal sequences of the largemouth bass *Micropterus salmoides* (Perciformes, Centrarchidae) are localized in GC-rich regions of the genome // Chromosome Res. 2000. Vol. 8. N 3. P. 213–218.
21. Moran P., Garcia-Vazquez E. Identification of highly prized commercial fish using a PCR-based methodology // Biochem. Mol. Biol. Educ. 2006. Vol. 34. N 2. P. 121–124.
22. Ota K., Tateno Y., Gojobori T. Highly differentiated and conserved sex chromosome in fish species (*Aulopus japonicus*: Teleostei, Aulopidae) // Gene. 2003. Vol. 317. N 1–2. P. 187–193.
23. Gornung E., De Innocentilis S., Annesi F., Sola L. Zebrafish 5S rRNA genes map to the long arms of chromosome 3 // Chromosome Res. 2000. Vol. 8. N 4. P. 362.
24. Gaskin J.F., Hufbauer R.A., Bogdanowicz S.M. Microsatellite markers for Russian olive (*Elaeagnus angustifolia*; Elaeagnaceae) // Appl. Plant Sci. 2013. Vol. 1. N 9. P. 1300013.
25. Zhang Q., Zhu X.T. Microsatellite DNA loci from the drought desert plant *Calligonum mongolicum* Turcz. (Polygonaceae) // Con. Gen. 2009. Vol. 10. N 6. P. 1891–1893.

Поступила в редакцию 11.08.2016

Принята в печать 09.09.2016

## MOLECULAR BIOLOGY

### MOLECULAR GENETIC FEATURES OF 5S rDNA NON-TRANSCRIBED SPACER IN *HIPPOPHAE RHAMNOIDES* L.

O.S. Alexandrov\*, A.V. Evtukhov, I.I. Kiselev, G.I. Karlov

Centre for Molecular Biotechnology, Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy; Timiryazevskaya ul. 49, Moscow, 127550, Russia  
\*e-mail: olegsandrov@gmail.com

Amplification of sea buckthorn *Hippophae rhamnoides* L. 5S rDNA non-transcribed spacer with coding border anneal primers showed existence of single fragment. The fragment was cloned and sequenced. It was shown that length of the *Hippophae rhamnoides* L. 5S rDNA non-transcribed spacer is 807 bp. Analysis of the sequence allowed to detect a high homology with early described microsatellite locuses of *Hippophae rhamnoides* L., russian olive *Elaeagnus angustifolia* L. and *Calligonum mongolicum* Turcz., that include a (GA)<sub>9</sub> motif. These results may be useful to study a ribosomal RNA gene organization.

**Keywords:** 5S rDNA, non-transcribed spacer, microsatellite locus, *Hippophae rhamnoides* L., *Elaeagnus angustifolia* L., *Calligonum mongolicum* Turcz.

#### Сведения об авторах

Александров Олег Сергеевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Центра молекулярной биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ — МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: 8-499-977-72-01; e-mail: olegsandrov@gmail.com

Евтухов Алексей Владимирович — лаборант-исследователь Центра молекулярной биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ — МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: 8-499-977-72-01; e-mail: a\_evtukhov@mail.ru

Киселёв Илья Игоревич — аспирант Центра молекулярной биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ — МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: 8-499-977-72-01; e-mail: der\_dietrich@mail.ru

Карлов Геннадий Ильич — докт. наук, руководитель Центра молекулярной биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ — МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: 8-499-977-72-01; e-mail: karlovg@gmail.ru