

ГЕНЕТИКА

УДК 575.174

СОЗДАНИЕ ST/J/V-ГЕНОМ-СПЕЦИФИЧНОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО МАРКЕРА НА ОСНОВЕ ПОЛИМОРФИЗМА ЛОКУСОВ 5S-рДНК *THINOPYRUM BESSARABICUM*, *PSEUDOROEGNERIA SPICATA* И *DASYPYRUM VILLOSUM*О.С. Александров^{1,*}, М.Г. Дивашук^{1,2}, Г.И. Карлов^{1,2}¹Центр молекулярной биотехнологии Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева, Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49;²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42

*e-mail: olegsandrov@gmail.com

Нетранскрибируемые спейсеры (non-transcribed spacers, NTS) 5S-рДНК часто являются полиморфными у достаточно близких видов и даже внутри одного генома. У представителей трибы Triticeae – *Thinopyrum bessarabicum*, *Pseudoroegneria spicata* и *Dasyphyrum villosum* – был выявлен полиморфизм по NTS 5S-рДНК между геномами St, J и V. На основе данного полиморфизма была осуществлена разработка молекулярно-генетического маркера, позволяющего идентифицировать эти три генома. Пара праймеров была подобрана к последовательностям консервативных областей NTS 5S-рДНК данных геномов. Длина амплифицируемого фрагмента составила 158 п.о. для V-генома, 171 п.о. для St-генома и 172 п.о. для J-генома. Фрагменту St-генома также свойственно наличие сайта узнавания для эндонуклеазы рестрикции SmlI, что позволяет отличать его от фрагмента J-генома, в котором этот сайт отсутствует. Разработанный маркер показал высокую эффективность при верификации образцов коллекции и изучении аллополиплоидов.

Ключевые слова: 5S-рДНК, нетранскрибируемые спейсеры, St-геном, J-геном, V-геном, молекулярный маркер

Одна из трех молекул, образующих большую субъединицу рибосом растительных и большинства животных организмов, – 5S рРНК – кодируется генами, которые входят в состав tandemно повторяющихся мономеров [1]. Кроме консервативной 120-нуклеотидной кодирующей части в состав мономеров входят нетранскрибируемые спейсеры (non-transcribed spacers, NTS), которым часто свойствен полиморфизм по длине и нуклеотидному составу даже у достаточно близких таксонов. Межвидовой полиморфизм NTS 5S-рДНК эффективно использовался для видовой характеристики в таких семействах, как Brassicaceae, Pinaceae, Poaceae, Solanaceae и др. [2–6]. К тому же был предложен метод PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism), с помощью которого данный полиморфизм эффективно маркировался [7].

Триба Triticeae включает в себя около 500 видов однолетних и многолетних трав, среди которых очень важны такие сельскохозяйственные культуры, как пшеница (*Triticum aestivum* L.), ячмень (*Hordeum vulgare* L.) и рожь (*Secale cereale* L.) [8]. Кроме того, в ней имеются дикорастущие сородичи данных культур, которые все чаще используются в качестве доноров для обогащения генофонда этих культур полезными генами, например, генами устойчивости к болезням [9]. Поэтому большое внимание уделяется изучению таких видов, как *Thinopyrum bessarabicum*

(Savul. & Rayss) A. Love (J-геном, $2n=2x=14$), *Th. intermedium* (Host) Barkworth & D.R. Dewey (J^JV^SSt, $2n=6x=42$), *Th. ponticum* (Podp.) Barkworth & D.R. Dewey (JJJJ^SJ^S, $2n=10x=70$), *Pseudoroegneria spicata* (Pursh) A. Love (St-геном, $2n=2x=14$) и *Dasyphyrum villosum* (L.) P. Candargy (V-геном, $2n=2x=14$) [9–13]. Явная недостаточность различий по морфологическим признакам привела к тому, что при построении классификации представителей трибы Triticeae стали активно использовать цитологические методы, которые достаточно трудоемки и требуют значительных затрат времени. В связи с этим имеется потребность в быстрых и простых методах идентификации геномов Triticeae. В последнее время для этой цели все чаще используют молекулярные маркеры [14–19].

В данной работе предлагается новый, разработанный на основе полиморфизма NTS 5S-рДНК, молекулярный маркер, с помощью которого возможна идентификация St-, J- и V-геномов у представителей трибы Triticeae.

Материалы и методы

В работе использовались образцы представителей трибы Triticeae, выращенные в теплице из семян, предоставленных банком генетических ресурсов USDA: *Th. bessarabicum* (J, номер W6 21717, $2n=2x=14$), *Th. intermedium* (J^JV^SSt, номера PI 401200,

PI 249146, PI 578695, $2n=6x=42$), *Th. ponticum* (JJJJ^sJ^s, номера PI 383583, PI 547313, PI 636523, $2n=10x=70$), *Ps. spicata* (St, номера PI 635993, $2n=2x=14$; PI 537371, $2n=4x=28$), *D. villosum* (V, номера PI 470279, PI 598390, W6 21717, $2n=2x=14$). ДНК выделяли из молодых листьев по методике, описанной ранее [20]. Анализ последовательностей NTS 5S-рДНК проводили с использованием программного обеспечения GenDoc [21] и NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>). Подбор праймеров осуществляли с помощью сервиса Primer3 v. 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на амплификаторе C1000 Touch™ ThermalCycler (Bio-Rad, США) при следующих параметрах: 1) 94°C – 5 мин; 2) 30 циклов (94°C – 30 с, 55°C – 30 с, 72°C – 1 мин 30 с); 3) 72°C – 10 мин. Продукты ПЦР разделяли в 2,5%-ном агарозном геле при 5 В/см и фотографировали с помощью системы гель-документации GelDoc XR+ (Bio-Rad, США). Для гидролиза эндонуклеазой рестрикции SmiM I отбирали 8 мкл ПЦР-продукта каждого образца, добавляли 1 мкл фермента (10 ед.) и 1 мкл 10-кратного буфера W (10 mM Tris-HCl (pH 8,5 при 25°C); 10 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 1 mM DTT (Dithiotreitol, дитиотреитол)). Гидролиз проводили при температуре 37°C в течение 8 ч. Продукты рестрикции разделяли в 2,5%-ном агарозном геле при 2 В/см в течение 1 ч и при 5 В/см в течение 1 ч 30 мин.

Результаты и обсуждение

Для поиска консервативных и полиморфных участков NTS 5S-рДНК были использованы последовательности GenBank: KC188601, KC188604, KC188607, KX235540, KX235542-KX235544 – для *Th. bessarabicum*; AF550698, EU093290-EU093298 – для *Ps. spicata*; KC188405-KC188413, KC188416-KC188432, KC188434-KC188447, KC894632- KC894636, KF483134, KF483135 – для *D. vilosum*. Для каждого вида было проведено выравнивание NTS и получены консенсусные последовательности. Далее проводили их выравнивание (рис. 1, А). Картина выравнивания продемонстрировала значительное сходство между NTS изучаемых геномов: 91% для St- и J-геномов, 80% для St- и V-геномов и 81% для J- и V-геномов. Однако были обнаружены и полиморфные участки длиной от 1 до 15 п.о. Один из таких участков (“259...274” по картине выравнивания, рис. 1, А) отсутствовал в NTS V-генома. Полиморфный участок “317...323” отличался у NTS всех трех геномов. Сравнение рестриционных карт NTS, полученных с помощью программы NEBcutter V2.0, позволило подобрать эндонуклеазу рестрикции для визуального выявления данного полиморфизма (рис. 2). Фермент SmiM I с сайтом узнавания САУNN↑NNRTG производит гидролиз NTS St-генома между нуклеотидами 320 и 321, а NTS J- и V-геномов не гидролизуются данным ферментом.

Чтобы найденный полиморфный локус можно было использовать в практических экспериментах,

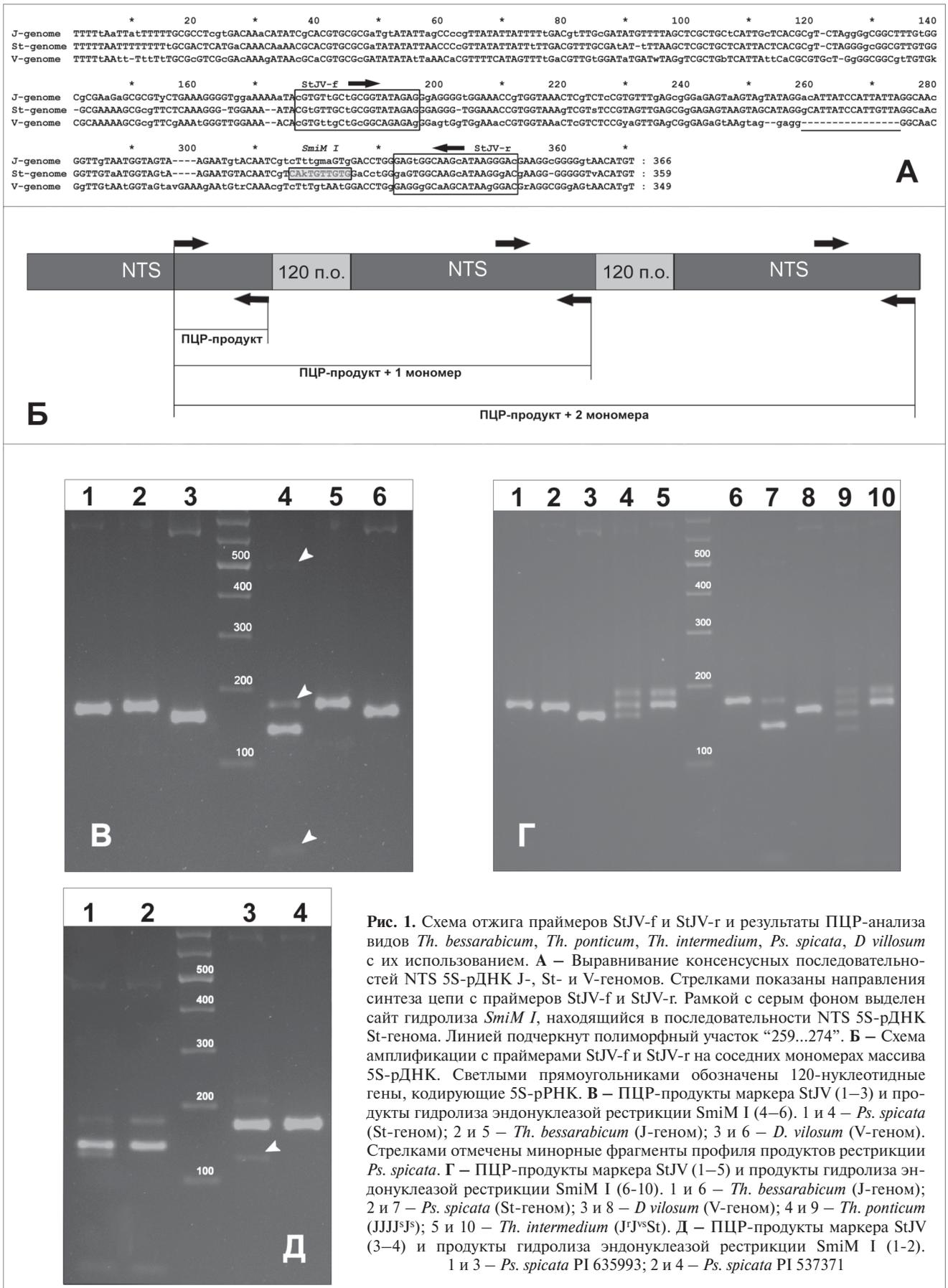
была подобрана пара праймеров к последовательностям консервативных участков NTS изучаемых геномов (StJV-f: 5'-CGTGTTGCTGCGGTATAGAG-3', StJV-r: 5'-GTCCCTTATGCTTGCCACTC-3'), позволяющая амплифицировать фрагмент, включающий данный полиморфный локус (рис. 1, А). ПЦР с подобранными праймерами продемонстрировала амплификацию целевых продуктов ожидаемой длины для всех геномов (таблица) и наглядно показала отличие по длине амплифицируемого фрагмента V-генома от фрагментов St- и J-генома, как и было предсказано по картине выравнивания (рис. 1, А). Помимо целевых фрагментов в качестве минорных компонентов профиля также присутствовали фрагменты, амплифицируемые с соседних мономеров тандемно организованных массивов 5S-рДНК (рис. 1, Б, В). Обработка ПЦР-продуктов эндонуклеазой рестрикции SmiM I показала отсутствие гидролиза внутри фрагментов V- и J-геномов, а также наличие гидролиза целевого фрагмента St-генома на два фрагмента длиной 32 п.о. и 139 п.о. (рис. 1, В). Минорные фрагменты, амплифицируемые с соседних мономеров, более не наблюдались в профиле, так как были гидролизованы SmiM I на фрагменты длиной 32, 139 и 480 п.о. Кроме того, в профиле продуктов рестрикции наблюдалось присутствие фрагмента, соответствующего длине негидролизованного целевого фрагмента. Анализ отдельных NTS 5S-рДНК St-генома (например, NTS из последовательностей EU093290, EU093292 и др.) показал, что среди них имеется небольшая фракция, несущая мутации в сайте рестрикции SmiM I, что и привело к наличию данного фрагмента в профиле продуктов гидролиза. В целом, наличие фрагментов длиной 32, 139 и 480 п.о. в профиле продуктов рестрикции St-генома позволяет достаточно эффективно отличать его от профиля J-генома.

Таблица

Длины фрагментов, амплифицируемых с использованием праймеров StJV-f/StJV-r, и продуктов их гидролиза эндонуклеазой рестрикции SmiM I на трех видах: *Th. bessarabicum*, *Ps. spicata* и *D. villosum*

Вид	Длина ампликона, п.о.	Длина фрагментов после гидролиза SmiM I, п.о.	
<i>Th. bessarabicum</i> (J-геном)	172	172	
<i>Ps. spicata</i> (St-геном)	171	139	32
<i>D. villosum</i> (V-геном)	158	158	

Помимо диплоидных видов *Th. bessarabicum*, *Ps. spicata* и *D. vilosum*, содержащих только один из рассматриваемых геномов, с помощью разработанного маркера были изучены и аллополиплоидные виды *Th. ponticum* ($2n=10x=70$, JJJJ^sJ^s) и *Thinopy-*



rum intermedium ($2n=6x=42$, $J^{vs}J^{st}$). *Th. ponticum* содержит рекомбинантный J^s -геном, возникший при участии St -генома [22]. *Th. intermedium* помимо рекомбинантного J^{vs} -генома, возникшего при участии V - и St -генома, содержит ещё полностью St -геном [23, 24].

Профиль ПЦР-продуктов *Th. ponticum* отличался от профилей *Th. bessarabicum* и *Ps. spicata* тем, что помимо целевого 172-нуклеотидного фрагмента и минорных фрагментов, амплифицируемых с соседних мономеров, содержал фрагмент около 190 п.о. (рис. 1, Г). После гидролиза эндонуклеазой рестрикции $SmiM$ I кроме характерных для J -генома негидролизованых фрагментов ПЦР-продукта в профиле наблюдались минорные фрагменты 32, 139 и 480 п.о., характерные для St -генома. Их появление можно объяснить тем, что в рекомбинантном J^s -геноме *Th. ponticum* присутствуют NTS 5S-рДНК St -генома.

Профиль ПЦР-продуктов *Th. intermedium* помимо целевого 172-нуклеотидного фрагмента и соответствующих J - и St -геномам минорных фрагментов, амплифицируемых с соседних мономеров, содержал еще два разных по длине фрагмента (рис. 1, Г). Один из них – такой же, как и у *Th. ponticum* фрагмент, длиной 190 п.о. А другой – это 158-нуклеотидный целевой фрагмент, характерный для V -генома. Источником этого дополнительного фрагмента являются NTS 5S-рДНК V -генома, присутствующие в рекомбинантном J^{vs} -геноме. После гидролиза эндонуклеазой рестрикции $SmiM$ I кроме описанных фрагментов ПЦР-продуктов J - и V -геномов в профиле появились характерные для рестрикционного профиля St -генома фрагменты длиной 32, 139 и 480 п.о.

Кроме анализа аллополиплоидов разработанный маркер может эффективно применяться и

при верификации образцов представителей трибы Triticeae. Для подтверждения этого утверждения был проведен эксперимент с образцом *Ps. spicata* PI 537371, который изучался в работе Кхуат и соавт. [25]. С помощью методов цитогенетики они показали, что данный образец не является диплоидным видом *Ps. spicata*, а представляет собой аллотетраплоид, содержащий помимо St -генома еще целый геном неизвестного происхождения. Профиль ПЦР-продуктов PI 537371 помимо характерных для St -генома целевого 171-нуклеотидного фрагмента и минорных фрагментов, амплифицируемых с соседних мономеров, содержал еще фрагмент длиной около 120 п.о. (рис 1, Д), то есть отличие от настоящей *Ps. spicata* наблюдалось уже на этапе ПЦР-продукта. Присутствие в PI 537371 St -генома подтвердилось наличием в профиле продуктов рестрикции характерных для него фрагментов длиной 32, 139 и 480 п.о.

Таким образом, на основе полиморфизма NTS 5S-рДНК был создан молекулярный ДНК-маркер, с высокой эффективностью идентифицирующий геномы St , J и V трибы Triticeae. Данный маркер является весьма перспективным инструментом, который может применяться для анализа и верификации образцов создаваемых коллекций видов Triticeae, быстрого скрининга материала для гербариев и депозитариев живых систем (например, депозитарий “Ноев ковчег”, <http://depository.msu.ru>), а также в селекционном улучшении пшеницы с привлечением ее дикорастущих сородичей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (соглашение № 16-16-00097 “Геномный и молекулярно-цитогенетический анализ дикорастущих злаков трибы Triticeae с целью рационального привлечения их генетического потенциала в селекции пшеницы”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Yang Y.W., Tseng P.F., Tai P.Y., Chang Ch.J. Phylogenetic position of *Raphanus* in relation to *Brassica* species based on 5S rRNA spacer sequence data // Bot. Bull. Acad. Sin. 1998. Vol. 39. N 3. P. 153–160.
3. 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.
4. Liu Z.L., Zhang D., Wang X.Q., Ma X.F., Wang X.R. Intragenomic and interspecific 5S rDNA sequence variation in five Asian pines // Am. J. Bot. 2003 Vol. 90. N 1. P. 17–24.
5. Matyáček R., Fulneček J., Lim K.Y., Leitch A.R., Kovarik A. Evolution of 5S rDNA unit arrays in the plant genus *Nicotiana* (Solanaceae) // Genome. 2002. Vol. 45. N 3. P. 556–562.
6. Baum, B.R., Edwards, T., Johnson, D.A. Codependence of repetitive sequence classes in genomes: phylogenetic analysis of 5S rDNA families in *Hordeum* (Triticeae: Poaceae) // Genome. 2010. Vol. 53. N 3. P. 180–202.
7. Berteaux C.M., Gnani G. Restriction fragment length polymorphism of the 5S-rRNA-NTS region: a rapid and precise method for plant identification // Plant DNA fingerprinting and barcoding. Methods in molecular biology. Vol. 862. / Eds. N. Sucher, J. Hennell, and M. Carles. 2012. P. 89–101.
8. Middleton C.P., Senerchia N., Stein N., Akhunov E.D., Keller B., Wicker T., Kilian B. Sequencing of chloroplast genomes from wheat, barley, rye and their relatives provides a detailed insight into the evolution of the Triticeae tribe // PLoS ONE. 2014. Vol. 9. N 3. e85761.
9. Kroupin P.Y., Divashuk M.G., Belov V.I., Glukhova L.I., Aleksandrov O.S., Karlov G.I. Comparative molecular cytogenetic characterization of partial wheat-

wheatgrass hybrids // Russ. J. Genet. 2011. Vol. 47. N 4. P. 432–437.

10. Salina E.A., Adonina I.G., Badaeva E.D., Kroupin P.Y., Stasyuk A.I., Leonova I.N., Shishkina A.A., Divashuk M.G., Starikova E.V., Khuat T.M.L., Syukov V.V., Karlov G.I. A *Thinopyrum intermedium* chromosome in bread wheat cultivars as a source of genes conferring resistance to fungal diseases // Euphytica. 2015. Vol. 204. N 1. P. 91–101.

11. Divashuk M.G., Khuat T.M.L., Kroupin P.Yu., Kirov I.V., Romanov D.V., Kiseleva A.V., Khrustaleva L.I., Alexeev D.G., Zelenin A.S., Klimushina M.V., Razumova O.V., Karlov G.I. Variation in copy number of *Ty3/Gypsy* centromeric retrotransposons in the genomes of *Thinopyrum intermedium* and its diploid progenitors // PLoS ONE. 2016. Vol. 11. N 4. e0154241.

12. Kocheshkova A.A., Kroupin P.Y., Bazhenov M.S., Karlov G.I., Pochtovyy A.A., Upelnik V.P., Belov V.I., Divashuk M.G. Pre-harvest sprouting resistance and haplotype variation of *ThVp-1* gene in the collection of wheat-wheatgrass hybrids // PLoS ONE. 2017. Vol. 12. N 11. e0188049.

13. Sibikeev S.N., Badaeva E.D., Gulyaeva E.I., Druzhin A.E., Shishkina A.A., Dragovich A.Y., Kroupin P.Y., Karlov G.I., Khuat T.M., Divashuk M.G. Comparative analysis of Agropyron intermedium (Host) Beauv 6Agi and 6Agi2 chromosomes in bread wheat cultivars and lines with wheat-wheatgrass substitutions // Russ. J. Genet. 2017. Vol. 53. N 3. P. 314–324.

14. Löve A. Conspectus of the Triticeae // Fedd. Report. 1984. Vol. 95. N 7–8. P. 425–521.

15. Okito P., Mott I.W., Wu Y., Wang R.R.C. A Y genome specific STS marker in *Pseudoroegneria* and *Elymus* species (Triticeae: Gramineae) // Genome. 2009. Vol. 52. N 4. P. 391–400.

16. Wei J.Zh., Wang R.R.C. Genome- and species-specific markers and genome relationships of diploid perennial species in Triticeae based on RAPD analyses // Genome. 1995. Vol. 38. N 6. P. 1230–1236.

17. Li X.M., Lee B.S., Mammadov A.C., Koo B.C., Mott I.W., Wang R.R.C. CAPS markers specific to E^b,

E^e and R genomes in the tribe Triticeae // Genome. 2007. Vol. 50. N 4. P. 400–411.

18. Hu L., Li G., Zhan H., Liu C., Yang Z. New St-chromosome-specific molecular markers for identifying wheat-*Thinopyrum intermedium* derivative lines // J. Genet. 2014. Vol. 93. N 1. P. 69–74.

19. Zhang J., Long H., Pan Z., Liang J., Yu S., Deng G., Yu M. Characterization of a genome-specific Gypsy-like retrotransposon sequence and development of a molecular marker specific for *Dasyphyrum villosum* (L.) // J. Genet. 2013. Vol. 92. N 1. P. 103–108.

20. Doyle J.J., Doyle J.L., Hortorium L.B. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. 1990. Vol. 12. N 1. P. 13–15.

21. GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation [Электронный ресурс]. 1997. URL: <http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/ebinet.htm> (дата обращения: 21.11.2017).

22. Chen Q., Conner R.L., Laroche A., Thomas J.B. Genome analysis of *Thinopyrum intermedium* and *Thinopyrum ponticum* using genomic *in situ* hybridization // Genome. 1998. Vol. 41. N 4. P. 580–586.

23. Mahelka V., Kopecký D., Pařtová L. On the genome constitution and evolution of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*: Poaceae, Triticeae) // BMC Evol. Biol. 2011. Vol. 11. N 1. 127.

24. Deng C.L., Bai L.L., Fu S.L., Yin W.B., Zhang Y.X., Chen Y.H., Wang R.R.C., Zhang X.Q., Han F.P., Hu Z.M. Microdissection and chromosome painting of the alien chromosome in an addition line of wheat-*Thinopyrum intermedium* // PLoS ONE. 2013. Vol. 8. N 8. e72564.

25. Khuat Th.M.L., Divashuk M.G., Kroupin P.Yu., Nguyen P.A., Kiseleva A.V., Karlov G.I. Differences in ploidy level and genome constitution revealed by cytogenetic analysis of *Pseudoroegneria* germplasm accessions: case study // Известия ТСХА. 2015. № 2. С. 29–35.

Поступила в редакцию
23.11.2017

Принята в печать
14.12.2017

GENETICS

DEVELOPMENT OF THE ST/J/V GENOME SPECIFIC MOLECULAR MARKER BASED ON 5S rDNA POLYMORPHISM IN *THINOPYRUM BESSARABICUM*, *PSEUDOROEGNERIA SPICATA* AND *DASYPHYRUM VILLOSUM*

O.S. Alexandrov^{1,*}, M.G. Divashuk^{1,2}, G.I. Karlov^{1,2}

¹Centre for Molecular Biotechnology, Russian State Agrarian University—Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Timiryazevskaya st. 49, Moscow, 127550, Russia;

²All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology
Timiryazevskaya st. 42, Moscow, 12755, Russia

*e-mail: olegandrov@gmail.com

Non-transcribed spacers (NTS) of 5S rDNA are often polymorphic in closely related species and even in the same genome. The polymorphism of 5S rDNA NTS was shown between genomes St, J and V of Triticeae species *Thinopyrum bessarabicum*, *Pseudoroegneria spicata*, and *Dasyphyrum villosum*, respectively. A molecular genetic marker was designed based on the 5S

rDNA NTS polymorphism that allows identification of the St, J and V genomes. We designed a pair of primers that correspond to the conserved regions of 5S rDNA NTS between the genomes studied. The PCR amplicon length is 158 bp for V, 171 bp for St and 172 bp for J genome. The fragment of St genome is characterized by *SmiI* restriction site that enables its differentiation from J genome fragment that lacks this site. The developed marker showed its efficiency for verification of germplasm accessions and the study of allopolyploids.

Keywords: *5S rDNA, non-transcribed spacers, St genome, J genome, V genome, molecular marker*

Сведения об авторах

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

Дивашук Михаил Георгиевич – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Центра молекулярной биотехнологии РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева, зав. лаб. диагностики патогенов растений. Тел.: 8-499-977-72-01; e-mail: divashuk@gmail.com

Карлов Геннадий Ильич – докт. биол. наук, проф., член-корр. РАН, и. о. директора Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии, руководитель Центра молекулярной биотехнологии РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: 8-499-977-72-01; e-mail: karlovg@gmail.ru