

ОЦЕНКА ПОЛИМОРФИЗМА РАЗЛИЧНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ В КОНТРОЛЕ РАЗНООБРАЗИЯ ГЕНОФОНДОВ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ

В.И. Глазко

Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева,
Москва, Россия, e-mail: vglazko@yahoo.com

Рассмотрен полиморфизм «анонимных» фрагментов ДНК, фланкированных декануклеотидными инвертированными повторами (RAPD-PCR), инвертированными повторами участков микросателлитов (ISSR-PCR), микросателлитом и терминальным участком ретротранспозона (REMAP-PCR), а также инвертированным повтором терминального участка ретротранспозона. Получены данные о неслучайных геномных распределениях исследованных фрагментов ДНК в геномах различных таксонов и зависимости таких распределений от нуклеотидной последовательности флангов. Обсуждается соответствие полученных данных теории «хромосомных полей» А. Лима-де-Фария о тесной связи между нанометровым и микрометровым масштабами организации генетического материала. Подчеркивается необходимость при генофондных исследованиях учитывать принадлежность молекулярно-генетических маркеров к различным семействам геномных элементов, отличающихся своей локализацией, структурно-функциональной организацией, консервативностью/полиморфизмом и эволюцией.

Ключевые слова: культурные растения, генетические элементы, полиморфизм.

По данным организации по пищевым ресурсам и сельскому хозяйству (Food and Agriculture Organization – FAO, www.fao.org) при ООН деградация плодородных почв, водных ресурсов, сокращение биоразнообразия культурных видов растений приобрели угрожающие размеры, фактически несовместимые с устойчивым развитием сельского хозяйства в глобальном масштабе. Одним из основных компонентов сокращения биоразнообразия, по результатам анализа этой организации, является вытеснение стародавних сортов улучшенными или коммерческими вариантами. Причем несмотря на глобальный характер, этот процесс не контролируется.

Выполненные немногочисленные исследования показали, что множество стародавних сортов уже исчезло и не вошло в генбанки. Так, например, подсчитано, что из 7098 сортов яблонь, которые использовались между 1804 и 1904 гг., утрачено около 86%. Не существует 95% сортов, полевых рас и разновидностей капусты, 91% кукурузы, 94% горошка и 81% томатов.

Сокращаются и популяции диких предковых видов, например, земляного ореха и дикого риса в Китае, кукурузы в Мексике. В Перу среди 90 описанных диких видов картофеля 35 уже не удастся найти.

Несмотря на пионерские работы Н.И. Вавилова в создании генетического банка растений, Россия не является лидером в этом направлении. Более того, в 1600 основных мировых генбанках культурных растений (некоторые из них носят имя Н.И. Вавилова) собраны около 3 миллионов образцов, но только 1% из них исследован в отношении их фенотипических характеристик (Жученко, 2004).

Одной из центральных проблем в сохранении биоразнообразия является решение вопроса: что сохранять и как отбирать то, что нуждается в сохранении в первую очередь. Многие годы предпринимаются попытки решить эту проблему. На ранних этапах разработки этого направления проводились с помощью фенотипических признаков, далее – с помощью молекулярно-ге-

нетических маркеров полиморфизма различных участков ДНК. Молекулярно-генетические маркеры можно подразделить на разные поколения. К первому из них относятся электрофоретические варианты белков, полиморфизм которых отражал несинонимичные замены в кодирующих последовательностях, которые приводили к существенному изменению электрического заряда белковой молекулы – продукта конкретного гена. Следующим было выявление мини- и микросателлитных повторов, полиморфизм которых был связан со вставками-делециями элементарной единицы повтора и, как правило, отличался от белкового полиморфизма более широким аллельным разнообразием, а также отсутствием информации о функции. Тем не менее все это были методы анализа полиморфизма отдельных локусов. Далее появились методы оценок полиморфизма полилокусных спектров анонимных фрагментов ДНК, о которых было известно только то, что на флангах локализованы инвертированные повторы.

Развитие методов нанобиотехнологий – работ с последовательностями ДНК в нанометровом масштабе – позволило появиться таким новым направлениям, как геномика. Структурная геномика оценивает, в частности, геномное разнообразие, функциональная – профили экспрессии различных генов.

Геномика предполагает также внутривидовое и внутривидовое сравнение геномов.

Использование ДНК биочипов позволило обнаружить множественные мононуклеотидные сайты полиморфизма (SNP), создать карты их распространения вдоль геномов, выявить сегментные дубликации и выделить наиболее консервативные участки ДНК в некодирующих геномных последовательностях.

В то же время в отличие от точковых мутаций, сегментных дубликаций анализ распределения инвертированных повторов позволяет оценивать особенности взаимного позиционирования нуклеотидных последовательностей, способных к участию в формировании вторичных структур ДНК, необходимых, в частности, для опознавания регуляторных сигналов.

Очевидно, что инвертированные повторы объединяют гетерогенную по структурно-функциональным характеристикам группу нуклео-

тидных последовательностей, для которых, по-видимому, невозможно обнаружить некоторые универсальные черты внутригеномного распределения.

В наших исследованиях полиморфизма фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными декануклеотидами (RAPD-PCR) на геномной ДНК сортов ячменя, а также разных видов млекопитающих были получены следующие данные. Полилокусные спектры RAPD-PCR зависят от нуклеотидной последовательности декануклеотида; распределение инвертированных декануклеотидных повторов для отдельных видов и таксонов имеет выраженные таксон-специфичные черты; спектры продуктов амплификации в основном определяются 6 нуклеотидами на 3'-конце; отмечается широкая изменчивость динамики накопления продуктов амплификации с разных участков генома при одних и тех же условиях ПЦР.

Выполнен анализ распределения потенциальных сайтов отжига декануклеотидов UBC-85 и UBC-126 (RAPD-PCR маркеры, дифференцирующие некоторые виды млекопитающих) в секвенированных последовательностях различных таксонов (Глазко и др., 1997).

Наибольшее количество ампликонов при поисках полного совпадения с UBC-85 выявляется у вирусов (57) и прокариот (75); к UBC-126 – у грибов (19), прокариот (20) и беспозвоночных (15). Наименьшее количество выявлено по UBC-85 у человека (3), грызунов (4), позвоночных (3) и растений (6); по UBC-126 – у человека (5), грызунов (1), позвоночных (2), других (кроме человека и грызунов) млекопитающих (0), растений (6).

Для таких таксонов, как человек, грызуны, другие млекопитающие, позвоночные, растения, некоторые длины ампликонов являются «перепредставленными» по сравнению с другими.

У беспозвоночных, вирусов и прокариот распределение частот встречаемости ампликонов разной длины относительно более равномерно. Тем не менее спектр потенциальных ампликонов у вирусов, полученный с использованием UBC-85 (252 ампликона), существенно отличается от выявляемого при использовании UBC-126 (38 ампликонов).

Полученные данные свидетельствуют о наличии определенной неслучайности распре-

деления сайтов узнавания декануклеотидов – специфичности спектра ампликонов в зависимости от используемого праймера и исследуемого таксона.

В исследованиях на геномах сортов и близкородственных видов сои, сортов пшениц выявлен широкий размах изменчивости в спектрах продуктов амплификации при использовании в качестве праймера фрагментов микросателлитных локусов с различными коровыми последовательностями (ISSR-PCR).

Обращает на себя внимание высокая точность воспроизводства спектров ампликонов, полученных таким образом: обнаруживаются выраженные отличия между спектрами в случае использования в качестве праймера одного и того же корового микросателлитного мотива, но с разными «якорными» нуклеотидами, а также в случае мотива, сдвинутого на один нуклеотид или комплементарного ему. Это свидетельствует о достаточно высокой точности идентификации флангов амплифицируемых фрагментов ДНК (Глазко и др., 1999).

Наибольшее количество продуктов амплификации у разных видов получается при использовании в качестве праймеров фрагментов пурин/ пиримидиновых последовательностей (ди-, тринуклеотидные микросателлиты GA, AG, GAG, CTC). Для участков ДНК, фланкированных такими инвертированными повторами, отмечается и наибольший консерватизм по длинам продуктов амплификации, полученным на геномной ДНК различных видов.

Два динуклеотидных мотива – (GA)₉C и (CA)₉G – в базе данных пг для *Arabidopsis thaliana* отличались тем, что первый встречался с существенно большей частотой, чем второй, при этом 38 % от общего числа сайтов гомологии локализовано в последовательностях dbEST, входящих в состав мРНК.

Иное распределение обнаруживается по сайтам гомологии к микросателлиту (CA)₉G – их частота встречаемости почти в четыре раза ниже в геноме данного вида, чем первого динуклеотида, и только 10 % от общего числа сайтов локализовано в транскрибируемых районах (Глазко и др., 1999).

Накопленные данные свидетельствуют о наличии неслучайности в распределении фрагментов ДНК, фланкированных инвертирован-

ным повтором участка микросателлитного локуса в зависимости от его нуклеотидной последовательности и принадлежности к пурин/пиримидиновым трекам.

Известно, что микросателлитные локусы с относительно повышенной частотой позиционированы в геноме с последовательностями ретротранспозонов. Для выяснения этого вопроса на сортах овса были выполнены сравнения спектров продуктов амплификации, полученных с использованием одного праймера – фрагмента микросателлитного локуса, и двух, когда один праймер был тот же, а второй представлял собой фрагмент терминальной последовательности ретротранспозона (Календарь, Глазко, 2002). Оказалось, что спектры, полученные с использованием двух праймеров, существенно более обогащены продуктами амплификации, чем при амплификации фрагментов ДНК, фланкированных только инвертированным повтором микросателлита.

То есть экспериментально было показано, что близкое расположение микросателлита и ретротранспозона встречается чаще, чем инвертированные микросателлиты.

Анализ распределения длин участков ДНК, фланкированных инвертированными повторами терминальных участков ретротранспозонов у сортов риса, пшеницы, также свидетельствует об отсутствии равновероятного рассеивания таких фрагментов по длине генома.

Накопленные данные позволяют ожидать, что наиболее полиморфным вариантом молекулярно-генетических маркеров, удобных для решения ряда прикладных задач в генофондных исследованиях культурных растений, могут быть маркеры, основанные на оценке полиморфизма участков ДНК, связанных с транспозирующими элементами.

Таким образом, накопленные данные о распределении различных вариантов инвертированных повторов свидетельствуют об их внутригеномной организованности.

Такая организованность согласуется с наблюдениями А. Лима де Фария о неслучайности чередования гетерохроматиновых блоков по длине хромосом у ряда видов растений и позволила ему сформулировать гипотезу о «хромосомных полях», благодаря которым нуклеотидные последовательности и скопление различных

семейств повторов, включая центромерные и теломерные, непосредственно связаны с морфологией хромосом (Lima-de-Faria, 1987).

В последние годы накоплено много данных, свидетельствующих в пользу представлений А. Лима де Фариа о тесной связи между молекулярной структурой материала наследственности и морфологией хромосом, – тем, что Лима де Фариа называл «хромосомным фенотипом».

К таким данным относятся факты неслучайного распределения ретротранспозонов по длине хромосом *Arabidopsis* (Kendal, Suomela, 2005), а также ряда видов грибов; неслучайная локализация семейств ретротранспозонов в центромерных районах некоторых видов растений, в частности кукурузы (Jin *et al.*, 2005), локализация ретротранспозонов в теломерных районах хромосом.

В представления о взаимной детерминированности микро- и наноуровней организации генетического материала хорошо укладываются данные об участии механизмов ретровирусной экспансии в возникновении самой линейной хромосомы эукариот, ее теломерных и центромерных структур.

В этой связи очевидно, что оценки геномных полиморфизмов должны выполняться с учетом принадлежности молекулярно-генетических маркеров к семействам различных геномных элементов, имеющих неслучайное распределе-

ние по длине хромосом, структурно-функциональную организацию, а также закономерности консервативности/полиморфизма и эволюции. Использование для генофондных исследований только определенных типов молекулярно-генетических маркеров может приводить к существенному искажению результатов генофондных сравнений при экстраполяции получаемых данных на геномную изменчивость.

Литература

- Глазко В.И., Дубин А.В., Календарь Р.Н. и др. Генетические взаимоотношения между сортами сои, оцененные с использованием ISSR маркеров // Цитология и генетика. 1999. Т. 33. № 5. С. 47.
- Глазко Г.В., Рогозин И.Б., Глазко В.И. и др. Экспериментальные и расчетные спектры ампликонов UBC-85 и UBC-126 (RAPD-PCR) // Цитология и генетика. 1997. Т. 31. № 5. С. 32–35.
- Жученко А.А. Ресурсный потенциал производства зерна в России. М.: Изд-во Агрорус, 2004. 1109 с.
- Календарь Р.Н., Глазко В.И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиол. и биохим. культ. растений. 2002. № 4. С. 279–296.
- Jin W., Lamb J.C., Vega J.M. *et al.* Molecular and functional dissection of the maize B chromosome centromere // The Plant Cell. 2005. V. 17. P. 1412–1423.
- Kendal W.S., Suomela D.P. Large-scale genomic correlations in *Arabidopsis thaliana* relate to chromosomal structure // BMC Genomics. 2005. V. 6. P. 82.
- Lima-de-Faria A. The Chromosome field theory confirmed by DNA and hybridization // Riv. Biol. Biol. Forum. 1987. V. 80. P. 266–268.

ESTIMATIONS OF POLYMORPHISM OF DIFFERENT GENOME ELEMENTS FOR CONTROLLING GENE POOLS OF CULTIVATED PLANTS

V.I. Glazko

Russian State Agrarian University – K.A. Timiryasev Moscow Agricultural Academy,
Moscow, Russia, e-mail: vglazko@yahoo.com

Summary

Polymorphism of «anonymous» fragments of DNA, flanking by inverted repeats of decanucleotides (RAPD-PCR), inverted repeats of microsatellite loci (ISSR-PCR), microsatellite and a terminal region of retrotransposones

(REMAP – PCR), and also the inverted repeats of terminal regions of retrotransposone was considered. Data about non-random distribution of the investigated DNA fragments in genome DNA of various taxa and the dependence of such distribution of nucleotide sequences on DNA fragment's flanks were observed.

Conformity of the received data to the theory of «chromosomal fields» of A. Lima-de-Faria about the close connections between nanometer and micrometer scales in the genetic material organization was discussed. It has been emphasized that in the course of gene pool investigations it is necessary to take into consideration the molecular-genetic markers belonging to various families of genome elements, differing in their localization, structural-functional organization, conservatism/polymorphism and evolutionary pathway.