

Copyright © 2015 by Academic Publishing House *Researcher*



Published in the Russian Federation
Biogeosystem Technique
Has been issued since 2014.
ISSN: 2409-3386
E-ISSN: 2413-7316
Vol. 6, Is. 4, pp. 363-373, 2015

DOI: 10.13187/bgt.2015.6.363
www.ejournal19.com



UDC 575.224.42 + 575.28

Genomic Scanning Using the Retrotransposon Fragments as "Anchors", in Animals and Plants

¹Valery I. Glazko

²Maria A. Elkina

³Tatiana T. Glazko

^{1,3} Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev, Russian Federation

127550 Timiryazevskaya Str., 49, Moscow, Russian Federation

^{1,3} Center of Experimental Embryology and Reproductive Biotechnologies, Russian Federation
Russian Academy of Agricultural Science, 127422, Kostyakow st., 12, Bl. 4, Moscow

¹ Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Academician of Russian Academy of Science (foreign participator)

E-mail: vglazko@yahoo.com

² Researcher, Center for Nanobiotechnology

E-mail: E-mariyaelkina@yahoo.com

³ Dr. of Agricultural Sciences, Professor, Senior Researcher

E-mail: tglazko@rambler.ru

Abstract

Possibilities of using the terminal fragments of mobile elements of plants and animals for polyloci genotyping (genome scan) of agricultural species of animals and plants were discussed. The results of using as primers in polymerase chain reaction the terminal fragments of endogenous retroviruses dicotyledons and monocotyledons as "anchors" for polyloci genotyping allowed to assert the high representation of mobile elements, typical of plants, in the genomes of cattle, sheep, horses. The identified polymorphism of IRAP-markers (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) estimated by the polymorphism of DNA fragments flanked by terminal portions of plant endogenous retroviruses in genomes of farm animals, enabled to offer their using to detect the species and intraspecies differentiation of farm animal groups. Polymorphism of IRAP-markers evaluated when used as primers the fragments of endogenous retroviruses of plants and animals, allowed to choose the locus combinations to establish membership to the particular animal (species, breed, interbreed) groups. The results of genotyping the dicotyledons (*G. soja*, *G. max*) and monocots (*T. aestivum*) with the use as primer of the long terminal repeat of retrotransposon, first identified in soybean, testify the presence in genomes of monocots a large number of fragments, homologous to the inverted terminal repeats of endogenous retroviruses of dicotyledons. High level of IRAP-marker polymorphism allowed the targeted search the genomic sites, polymorphism of which could be associated with the influence of factors of natural and artificial selections. The presence of the long terminal repeats of the same endogenous retroviruses in plant and animal genomes, revealed in the genome sequences of the wheat and *G. max*, cattle,

sheep and horses, belonging to different kingdom, reflected the existence of common pool of mobile elements in general.

Keywords: mobile genetic elements, genomic scan, IRAP-PCR markers, polymorphic information content (PIC), sheep, horse, cattle, *T. aestivum*, *G. max*, *G. soja*.

Введение

Уменьшение скорости сокращения биоразнообразия и его сохранение необходимо для жизнеобеспечения и продовольственной безопасности людей во всем мире [9, 13]. В этой связи, особое значение имеют программы по сохранению биоразнообразия сельскохозяйственных видов [5, 10]. Для исключения ошибок происхождения, оценок филогенетических взаимоотношений между исследуемыми группами, находящимися под давлением естественного и искусственного отборов, выявления геномных элементов, ассоциированных с изменчивостью хозяйственно ценных признаков, используются различные поколения молекулярно-генетических маркеров полиморфизма геномных элементов [3–4, 6–8]. Так, например, в целях выявления геномных мишеней искусственного отбора, ассоциированных с желательными проявлениями признаков продуктивности у мясных и молочных пород крупного рогатого скота, созданы геномные карты распределения мононуклеотидных полиморфизмов (Single Number Polymorphisms – SNP), включающие 705243 таких сайтов, распределенных по всем аутосомам [19]. Оказалось, однако, что такие связи породоспецифичны и характеризуются высокой внутривидовой изменчивостью. Для увеличения эффективности маркирования геномных доменов, полиморфизм которых можно было бы использовать для решения задач геномной селекции, к SNP привлекается новое поколение маркеров, основанное на изучении полиморфизма по копиям коротких (менее 400 пар нуклеотидов – п.н.) участков ДНК (Copy Number Variability – CNV) и их геномного распределения [18]. Выяснилось, что эти два подхода (SNP и CNV) к полилокусному генотипированию геномов крупного рогатого скота также не приводят к однозначным результатам. Так, у голштинской породы с использованием оценок полиморфизма микросателлитных локусов и SNP ранее выявлены хромосомные домены локализации генов количественных признаков (Quantitative Trait Loci – QTL). Из 82 таких доменов, в которых обнаруживались CNV, только 17 перекрывались с SNP. В 20 хромосомных доменах локализации QTL присутствовали CNV, но не SNP. На основании выполненных исследований авторы делают вывод о необходимости совместного использования SNP и CNV для решения задач включения геномной селекции в традиционные селекционные методы.

В то же время такое полилокусное генотипирование (геномное сканирование) — затратная и достаточно сложная процедура, а ее результаты трудно интерпретировать. В этой связи особый интерес вызывают геномные элементы с высоким уровнем полиморфизма, к которым относятся, в частности, микросателлитные локусы. На основании оценок полиморфизма той части микросателлитов, которые формируют на коротких участках геномной ДНК инвертированные повторы, разработан метод полилокусного геномного генотипирования ISSR-PCR (Inter-Simple Sequence Repeats) [20]. Это поколение маркеров в связи с относительной дешевизной получения полилокусных спектров продуктов амплификации и простотой их интерпретации широко использовалось и используется для решения популяционно-генетических задач большого количества видов растений и животных.

Однако этот тип маркеров имеет ряд недостатков, в частности, «анонимность» участков ДНК, фланкированных инвертированным повтором микросателлита. Секвенирование таких фрагментов геномной ДНК позволило обнаружить, что они содержат участки гомологии к мобильным генетическим элементам или продуктам их рекомбинации [1–2]. В литературе накоплено большое количество экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что распространение микросателлитов, и в частности, их инвертированных повторов, тесно связано с транспозициями ретротранспозонов [11–12, 14, 16]. Обнаружено также, что участки локализации ретротранспозонов с высокой частотой вовлекаются в рекомбинации и ассоциированы с полиморфизмом по CNV маркерам [17]. Поколение молекулярно-генетических маркеров, созданных на основании оценок полиморфизма фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами участков гомологии к ретротранспозонам, получило название IRAP-маркеров (Inter-Retrotransposon

Amplified Polymorphism). Широкая представленность рероранспозонов в геномах животных и растений, высокая частота их транспозиций [15], связь с полиморфизмом микросателлитных локусов, а также CNV позволяет предполагать особую перспективность IRAP-маркеров для выявления специфических особенностей внутривидовых групп организмов сельскохозяйственных видов, поисках молекулярно-генетических маркеров действия факторов искусственного и естественного отборов. Для выяснения возможностей использования этого поколения маркеров в настоящей работе выполнен анализ генофондов некоторых местных пород сельскохозяйственных видов животных и сортов культурных и дикорастущих растений по IRAP-маркерам.

Материалы и методы

В работе были исследованы следующие породы сельскохозяйственных видов животных крупного рогатого скота: черно-пестрый голштинизированный скот (23 гол., виварий РГАУ МСХА имени К.А. Тимирязева; 10 гол. животноводческая ферма «Степаньково», Московская обл.), айширский скот (24 гол., МКЗ №1 Московской обл.), якутский скот (10 гол., респ. Саха), красный эстонский скот (29 гол., Псковская обл.), зебувидный скот (овец: эдильбаевские овцы (35 гол., Волгоградская обл.), карачаевские (20 гол., Ставропольский кр.); лошадей: алтайская порода (23 гол., хозяйство «Джумбаев», 39 гол., хозяйство «Энчи», 31 гол., хозяйство «Чингиз», респ. Алтай), карачаевская порода (16 гол., Ставропольский кр.), рысистая порода (36 гол., Московская обл.). В работе также были использованы образцы мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*): Московская 39, Мироновская 808, Омская 36 (всего 60 образцов, РГАУ МСХА имени К.А. Тимирязева), сои дикорастущей уссурийской вида *G. Soja* (50 образцов, Приморский кр.) сорнополевой сои Полукультурной С 10 вида *G. max* (10 образцов, Китай).

Геномную ДНК выделяли из периферической крови исследуемых сельскохозяйственных животных с помощью коммерческого набора реагентов «ДНК-Экстран-1», из образцов семян *Triticum aestivum*, *Glycine soja*, *Glycine max* – с помощью коммерческого набора реагентов «ДНК-Экстран-4» («Синтол», Россия) согласно рекомендациям производителя к наборам.

IRAP-PCR проводили по модифицированной методике Зеткевича и др. (Zeitkiewicz E. et al., 1994). В качестве праймеров использовали олигонуклеотидные последовательности, гомологичные терминальным инвертированным фрагментам мобильных элементов: LTR SIRE-1 (GCAGTTATGCAAGTGGGATGAGCA, праймер LTR SIRE-1), мобильных элементов семейства R173 (AACGAGGGGTTTCGAGGCC, праймер PawS 5; GAGTGTCAAACCCAACGA, праймер PawS 6), BARE-1 (ССААСТАГАГГСТТГСТАГГГАС, праймер BARE-1), эндогенных ретровирусов крупного рогатого скота BERV K1 и BERV β-3 (TATCAGGCCTCTCCGCATG, праймер BERV k-1; GGACSTTCTCSTTCAAGGC, праймер BERV β-3) («Синтол», Россия). Программа амплификации: первоначальная денатурация 94°C – 2 мин, денатурация 94°C – 30 с, отжиг 55°C – 30 с, элонгация 72°C – 2 мин, заключительная элонгация 72°C – 10 мин, 35 циклов (амплификатор «Терцик», «ДНК-технологии», Россия). Разделение продуктов амплификации проводили в 1,5 % агарозном геле с добавлением бромистого этидия (0,5 мкг/мл). Сила тока – 50 мА, напряжение 100 В. Визуализацию результатов электрофореза проводили в УФ (λ = 312 нм) (трансиллюминатор УВТ-1, «Биоком», Россия).

Каждый фрагмент в полученных спектрах ДНК рассматривали как отдельный локус. Оценивали присутствие/отсутствие фрагмента определенной длины в спектрах. Математическая обработка (расчеты частот встречаемости аллелей) осуществлялась с использованием Microsoft Excel, филогенетические расчеты выполняли в компьютерной программе TFPGA, имеющейся в открытом доступе. Расчет индекса PIC (Polymorphic Information Content) выполнялся по формуле для диаллельных локусов исходя из закона о равновесных популяциях Харди-Вайнберга, для которых $PIC = 2f(1-f)$, где f – частота одного из двух аллелей.

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Генетическая дифференциация пород крупного рогатого скота

В результате генотипирования групп крупного рогатого скота по праймеру LTR SIRE-1 были получены следующие данные. Локусы длиной 1200, 1100, 580 и 520 п.о. встречались у

всех исследованных групп животных. Самые полиморфные локусы приходились на фрагменты длиной 1470, 1300 и 820 п.о. ($PIС > 0,450$). Наиболее гетерогенной оказалась группа айширского скота ($PIС_{cp.} = 0,214$, $P = 43$ %). Остальные исследованные группы существенно не отличались друг от друга. Фрагмент длиной 790 п.о. не встречался в спектрах черно-пестрого скота («РГАУ-МСХА»), красного эстонского и зебувидного скота, у последних двух отсутствовал также локус 760 п.о. Фрагменты 440 и 330 п.о. не были детектированы у якутских коров, тогда как у других пород они встречались с высокой частотой (1,00, 0,96). Только айширские коровы были гетерогенны по локусу длиной 950 п.о. ($PIС_{локуса} = 0,325$).

Спектр фрагментов праймера Paws 5 более полиморфный по сравнению со спектром праймера LTR SIRE-1. Только два локуса длиной 840 и 610 п.о. были мономорфны и встречались у всех исследованных животных.

Значения генетических характеристик ($P_{пр.}$ и $PIС_{пр.}$) спектра праймера BARE-1 близки к таковым у спектра праймера LTR SIRE-1, что свидетельствует о схожем уровне полиморфизма терминальных повторов этих двух мобильных элементов однодольных в геномах крупного рогатого скота. В спектрах присутствовали четыре мономорфных фрагмента 1000, 910, 560 и 280 п.о. По значениям P и $PIС$ наиболее близки оказались айширские и якутские коровы, несколько большее число полиморфных локусов наблюдалось у группы черно-пестрого скота РГАУ-МСХА, при этом животные этой породы из другого хозяйства оказались высоко консолидированы. Интересно отметить большое количество полиморфных участков (73 %) с одновременно низким значением полиморфизма локусов ($PIС = 0,090$) в спектре казахских белоголовых коров.

При сравнении спектров праймеров, гомологичным терминальным участкам эндогенных ретровирусов крупного рогатого скота, наибольшим полиморфизмом обладают спектры праймера BERV k-1. Фрагмент 540 п.о., а также фрагменты меньше 400 п.о. встречались у всех исследованных животных. Наибольшие отличия между двумя группами черно-пестрого скота наблюдались в зоне тяжелых длин фрагментов (более 1000 п.о.). Высокие значения полиморфизма спектра ДНК якутских коров по праймеру BERV k-1, в основном, обусловлены полиморфизмом фрагментов средней длины ($PIС = 0,342$), а в случае праймера BERV β -3 – тяжелых фрагментов ($PIС = 0,314$), в то время как спектры фрагментов этого праймера у других исследованных пород животных мономорфны.

Группа зебувидного скота отличалась пониженными значениями P и $PIС$ по всем праймерам, за исключением BERV k-1, где значения этих генетических характеристик были близки к таковым у местного якутского скота, разводимого на краю ареала, и несколько выше, чем у других групп крупного рогатого скота.

Исходя из значений полиморфизма фрагментов спектров используемых праймеров, были построены дендрограммы и рассчитаны генетические расстояния по методу М. Нею. На дендрограммах, построенных по значениям полиморфизма, полученных с применением в качестве праймеров участков мобильных элементов растений, присутствовали два крупных кластера (рис.).

Эти кластеры наиболее удалены друг от друга на дендрограммах спектров праймеров, гомологичных участкам эндогенных ретровирусов однодольных (Paws 5 и BARE-1, и в полтора раза ближе они находятся на дендрограмме спектра праймера эндогенного ретровируса двудольных (LTR SIRE-1). На дендрограмме, построенной на основании значений полиморфизма спектров праймеров к терминальным участкам эндогенных ретровирусов полорогих, местные якутские коровы обособляются в отдельный кластер, генетическое расстояние с другими группами КРС составило от 0,130 до 0,146.

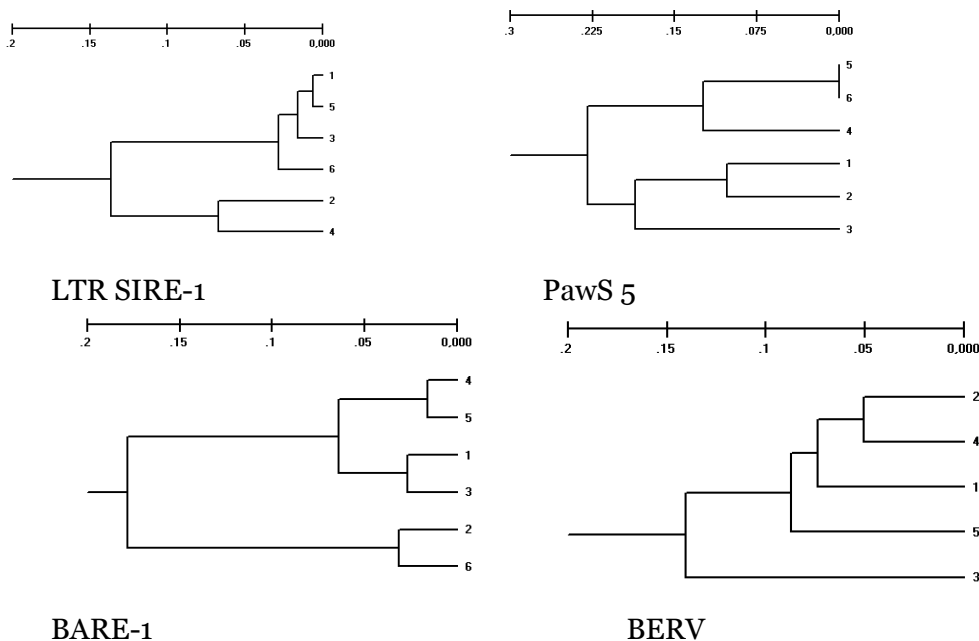


Рис. 1. Дендрограммы построенные на основании генетических дистанций, рассчитанных по значениям полиморфизма спектров праймеров LTR растений (LTR SIRE-1, PawS 5, BARE-1) и LTR животных (BERV β -3 и k-1 вместе) у крупного рогатого скота. Обозначения групп животных: 1 – черно-пестрый (виварий), 2 – черно-пестрый «Степаньково», 3 – якутский скот, 4 – айширский скот, 5 – красный эстонский скот, 6 – зебувидный скот.

Генетическая дифференциация местных курдючных пород овец

Для исследования были выбраны три породы овец (всего 80 голов): карачаевская, калмыцкая, эдильбаевская (два внутрипородных типа – бирликский и суюндукский).

Спектры фрагментов ДНК, полученные в результате генотипирования групп местных родственных между собой пород овец, калмыцких и эдильбаевских, с применением в качестве праймера терминального участка ретротранспозона LTR SIRE-1 отличались относительно одинаковыми значениями полиморфизма ($PI_{ср.}=(0,081; 0,112)$, $P=(19; 31)$ %). При этом карачаевские овцы оказались более однородными. Фрагмент длиной 1080 п.о. был полиморфен только в спектрах ДНК эдильбаевских овец ($PI_{лок.}=0,488$), тогда как фрагменты 650 и 380 п.о. – в спектрах ДНК карачаевских и калмыцких овец ($PI_{650}=(0,494; 0,483)$, $PI_{380}=(0,189; 0,469)$). Фрагменты длиной 760 и 430 п.о. были полиморфными только у калмыцких овец: первый оказался одним из самых редких и встречался только у представителей данной породы, второй встречался с частотой 0,44, тогда как у других пород – у всех животных.

Спектры фрагментов ДНК всех исследованных групп овец, полученных с использованием праймера PawS 5, отличались высоким уровнем полиморфизма. Фрагмент 910 п.о. был полиморфен только в спектрах карачаевских (0,494), 720 п.о. – в спектрах ДНК калмыцких овец (0,295). Полиморфизм локуса 760 п.о. был характерен для обеих пород, тогда как у эдильбаевских овец он встречался у всех животных.

Полиморфизм спектров по праймеру BARE-1 у калмыцких и эдильбаевских овец сходен с таковым по праймеру PawS 5, тогда как группа карачаевских овец оказалась однородной. Фрагмент длиной 1320 п.о. отсутствовал у представителей карачаевской породы, тогда как у овец других пород встречался с высокой частотой ($\geq 0,8$). Спектр ДНК карачаевских овец отличался низкой по сравнению с другими группами частотой встречаемости фрагмента длиной 700 п.о. (0,2). Фрагменты 520 и 590 п.о. были полиморфны только у калмыцких и эдильбаевских овец.

Полиморфизм спектров, полученных с использованием фрагментов эндогенных ретровирусов, отличался в зависимости от используемого праймера. Так, спектры праймера

BERV k-1 были более полиморфными по сравнению со спектрами праймера BERV β-3. При этом праймер BERV k-1 не отличает группы овец, где треть всех локусов были полиморфными и $PI_{cp}(0,099; 0,130)$. Стоит отметить относительно низкие значения полиморфизма спектров ДНК калмыцких овец по сравнению с эдильбаевскими.

Генетическая дифференциация пород лошадей

Исследования выполнены на 88 образцах крови лошадей различной породной принадлежности и происхождения. В анализ включены результаты исследований образцов крови лошадей карачаевской породы, вошедших в ГПК, алтайской породы из трех хозяйств («Джумбаев», «Энчи», «Чингиз»), группы рысистых пород (орловские рысаки, русские рысаки, американские стандартбредные).

В результате выполненных исследований получены следующие данные. Спектры ампликонов, полученных с применением в ПЦР разных праймеров, существенно не отличались между собой по пределам длин выявляемых фрагментов ДНК у всех пород лошадей. Несколько отличается только спектр фрагментов праймера Paws 5, где четко визуализируются и локусы более 1500 п.о.

Каждый из полученных в результате полимеразной цепной реакции спектров фрагментов ДНК уникален для каждого из праймеров и отличается долей полиморфных локусов и их распределением. Наиболее полиморфными оказались спектры фрагментов геномной ДНК алтайских лошадей хозяйства «Джумбаев», полученные в результате IRAP-PCR с использованием праймеров LTR SIRE-1 и Paws 5. В результате использования праймера β-3 около половины всех локусов в спектрах лошадей хозяйства «Энчи» и несколько меньшее количество полиморфных локусов в спектрах алтайских лошадей третьей группы представлены фрагментами от 500 до 1000 п.о., в свою очередь, полиморфизм фрагментов более 1000 п.о. наблюдался только у первых (18 %). Карачаевские лошади по IRAP-маркерам отличались единообразием в полиморфизме локусов в спектре и охватывали диапазон как средних, так и тяжелых длин фрагментов (от 5 до 10 %). Спектры фрагментов праймера k-1 были одинаковы у всех исследованных пород лошадей: на долю фрагментов средних длин приходилось 14 % полиморфных локусов, на тяжелые фрагменты – 7 %.

На общем фоне низких значений PI и P локусов, полученных в спектре праймера k-1 у всех пород лошадей, несколько более высокими оказываются показатели этих характеристик у рысистых лошадей. Это может быть связано с неоднородностью самой исследуемой группы рысаков, которую составляют представители орловских, русских и американских стандартбредных рысистых пород. В спектрах праймера β-3 как минимум треть всех локусов были полиморфны у исследованных пород. Внутрипородные отличия групп алтайских лошадей по спектрам праймера β-3 выражены менее явно, за исключением несколько более консолидированных лошадей из хозяйства «Чингиз», чьи характеристики спектров близки к карачаевским лошадям. Промежуточное положение занимают рысистые лошади.

При генотипировании групп лошадей с использованием IRAP-маркеров, представляющих собой терминальные участки эндогенных ретровирусов, дифференциация их выглядит следующим образом: алтайские лошади хозяйств «Энчи» и «Чингиз» объединены в один кластер, в другом кластере формируются две самостоятельные группы. Одну формируют американские и русские рысаки, другую – карачаевские, алтайские лошади (хозяйство «Джумбаев») и орловские рысаки, при этом обособленно располагаются последние.

Генетическая дифференциация сортов мягкой пшеницы и групп сои

Исследования выполняли на однодольных растениях *Triticum aestivum* и двудольных растениях (*Glycine soja* и *Glycine max*). Пшеница была представлена двумя озимыми сортами (Московская 39 — мягкая озимая, Мироновская 808 — мягкая озимая, выведена из яровой) и одним яровым (Омская 36 — мягкая яровая), соя — пятью популяциями вида дикорастущая уссурийская (*G. soja*, Приморский край) и сорнополевой формой сои (*G. max*, Китай).

В результате использования праймера к терминальному участку ретроэлемента сои LTR SIRE-1 получены отчетливо воспроизводимые спектры фрагментов ДНК как у сои, так и у пшеницы, причем такие фрагменты находились в одном диапазоне длин: суммарно до 22 локусов длиной 350–1240 п.н., 26 локусов — 220–1450 п.н.. Анализируемые группы

Glucine обладали высоким полиморфизмом ($PI_{cp.}=0,414$, $P=91\%$) по сравнению с *T. aestivum* ($PI_{cp.}=0,120$, $P=65\%$). С использованием баз данных GenBank был выполнен поиск участков гомологии к фрагменту LTR SIRE-1, послужившему праймером, в секвенированных последовательностях геномов *T. aestivum* и *G. max* и выявлены соответственно 122 и 102 таких участка. У *Glucine* наиболее полиморфными оказались фрагменты длиной от 350 до 490 п.н. и от 1010 до 1240 п.н. Значения $PI_{cp.}$ для этих фрагментов составили соответственно 0,449 и 0,364. У *T. aestivum*, наоборот, высокий полиморфизм наблюдался в зоне средних длин (от 520 до 720 п.н. и от 760 до 990 п.н., $PI_{cp.}=0,196$ и 0,155, соответственно). Все тяжелые фрагменты были мономорфными и встречались у 100 % исследованных образцов пшеницы.

У *Glucine* был обнаружен только один мономорфный локус длиной 700 п.н., в среднем же доля полиморфных локусов по спектру составила 93 %, $PI_{cp.}=0,414$. Это свидетельствует об относительно высоком генетическом разнообразии исследованных групп как внутри рода *Glucine*, так и внутри одного вида *G. soja*. При этом у *G. max* отсутствовал локус длиной 680 п.н., тогда как тот же локус встречался у представителей *G. soja*.

С использованием фрагмента ретротранспозона LTR SIRE-1 в качестве праймера были получены уникальные для каждого из сортов пшеницы спектры фрагментов ДНК. Так, у сорта пшеницы Московская 39 фрагмент ДНК длиной 790 п.н. присутствовал у всех исследованных образцов этого сорта, тогда как у сортов Мироновской 808 и Омской 36 фрагментов такой длины не обнаружили. И наоборот, локус, соответствующий фрагменту размером 550 п.н., не встречался только у сорта Московская 39, у остальных сортов по этому локусу $PI_{cp.}$ был равен 1.

В связи с неодинаковой представленностью у разных сортов, наибольший интерес в случае пшеницы представляют локусы, соответствующие фрагментам 790 и 550 п.н., сои – локусы 790, 680 и 550 п.н.

На основании значений генетических дистанций (DN), рассчитанных по методу M. Nei (1972) исходя из частоты ампликонов разной длины в полученных спектрах фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными участками фрагмента ретротранспозона LTR SIRE-1, обнаружена кластеризация исследованных образцов: по генетическим расстояниям отдельно объединялись однодольные и двудольные растения; среди однодольных наибольшая близость обнаружена между сортами пшеницы Мироновская 808 и Омская 36.

Интересно отметить, что в геноме сои не было выявлено гомологии к мобильным элементам таких однодольных растений, как рожь (PawS 5 и PawS 6) и ячмень (BARE-1), участки которых использовались в качестве праймеров, при этом у пшеницы мы получали спектры фрагментов ДНК, фланкированные участками этих ретротранспозонов. Праймеры PawS 5 и PawS 6 каждый в отдельности дает менее полиморфный спектр фрагментов ДНК по сравнению с праймером LTR SIRE-1 ($PI_{cp.}=0,073$). В результате применения PawS 5 в качестве прямого, а PawS 6 – обратного праймеров, амплифицировались как фрагменты, характерные для спектра праймера PawS 5, так и фрагменты спектра праймера PawS 6. Тем не менее, были и локусы, которые впервые были обнаружены именно в такой постановке реакции, а именно 7 фрагментов длиной от 650 до 150 п.о., из которых один (550 п.о., $PI_{cp.}=0,48$) полиморфный.

Проанализировав секвенированные последовательности ГенБанка с помощью алгоритмов BLASTn на наличие участков, гомологичных ретротранспозонам BARE-1, PawS 5 и PawS 6 было обнаружено, что они присутствуют в геноме сои, тогда как в результате полимеразной цепной реакции, где в качестве матрицы используется ДНК сои, они не амплифицируются. Аналогичная картина просматривается и в случае использования в качестве праймеров участков эндогенных ретровирусов млекопитающих, BERV β -3 и k-1. Это можно объяснить тем, что данные участки ретротранспозонов в геноме сои и пшеницы не образуют инвертированных повторов, либо они лежат на расстоянии больше 3 тыс. п.о., что недоступно для амплификации в выбранном режиме проведения полимеразной цепной реакции.

Заключение

Полученные данные позволяют сделать следующее заключение.

Данные полилокусного сканирования геномов сельскохозяйственных животных с использованием терминальных фрагментов эндогенных ретровирусов в качестве «якорей» для полилокусного генотипирования двудольных и однодольных растений в качестве молекулярно-генетических маркеров позволяют утверждать о высокой представленности участков мобильных элементов, типичных для растений, в геномах животных. Результаты генотипирования с использованием IRAP-маркеров на основе инвертированных терминальных фрагментов эндогенных ретровирусов отражают популяционно-генетические взаимоотношения между группами сельскохозяйственных животных (крупный рогатый скот, лошади, овцы) на видовом, внутривидовом и внутривидовом уровнях. Полиморфизм IRAP-маркеров на основе терминальных участков эндогенных ретровирусов растений в геномах сельскохозяйственных животных обуславливает возможность использования этого поколения маркеров для выявления внутривидовой и внутривидовой дифференциации групп животных. Полиморфизм фрагментов ДНК, полученных в результате использования IRAP-маркеров на основе инвертированных терминальных участков эндогенных ретровирусов растений и животных, позволяет подбирать сочетания локусов для установления принадлежности животного к конкретной (видовой, породной, внутривидовой) группе. Результаты генотипирования двудольных (*G. soja*, *G. max*) и однодольных растений (*T. aestivum*) с применением в качестве праймера длинного концевого участка ретротранспозона, впервые выявленного у сои, свидетельствуют о присутствии в геномах однодольных большого количества фрагментов, гомологичных инвертированным терминальным участкам эндогенных ретровирусов двудольных. Высокий уровень полиморфизма IRAP-маркеров позволяет проводить целенаправленный поиск геновых участков, полиморфизм которых может быть ассоциирован с влиянием факторов естественного и искусственного отборов.

Примечания:

1. Глазко В.И., Косовский Г.Ю., Ковальчук С.Н., Архипов А.В., Петрова И.О., Дедович Г.О., Глазко Т.Т. Инвертированный повтор микросателлита (AGC)₆G фланкирует районы ДНК с участками гомологии к ретротранспозонам в геноме крупного рогатого скота // Инновационные технологии в медицине. 2014. 2(03). С. 63–79.
2. Глазко В.И., Феофилов А.В., Бардуков Н.В., Глазко Т.Т. Видоспецифичные ISSR-PCR маркеры и пути их формирования // Известия ТСХА. 2012. №1. С. 118–125.
3. Калашникова Л.А., Дудин И.М., Глазко В.И. и др. ДНК-технологии оценки сельскохозяйственных животных. Лесные Поляны (Моск. обл.), 1999. 148 с.
4. Календарь Р.В., Глазко В.И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиология и биохимия культурных растений. 2002. Т. 34. №4. С. 279–296.
5. Состояние всемирных генетических ресурсов животных в сфере продовольствия и сельского хозяйства / FAO, 2010. М.: ВИЖ РАСХН, 2010.
6. Сулимова Г.Е. Молекулярно-генетический анализ генома животных и человека с использованием ДНК-маркеров. Автореф. дисс. д-ра биол. наук: 03.00.15. ИОГен имени Н.И. Вавилова. Москва, 1998. 38 с.
7. Сулимова Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения // Успехи современной биологии. 2004. Т. 124. № 3. С. 260–271.
8. Храброва Л.А. Теоретические и практические аспекты генетического мониторинга в коневодстве. Автореф. дисс. д-ра с.-х. наук: 06.02.07. Дивово: ГНУ ВНИИ коневодства, 2011. 38 с.
9. Эрнст Л.К., Дмитриев Н.Г., Паронян И.А. Генетические ресурсы сельскохозяйственных животных в России и сопредельных странах. СПб.: ВНИИГРЖ, 1994. 472 с.
10. Эрнст Л.К., Зиновьева Н.А. Биологические проблемы животноводства в XXI веке. М., 2008. 508 с.
11. Adelson D. L., Raison J.M., Garber M., Edgar R. C. Interspersed repeats in the horse (*Equus caballus*); spatial correlations highlight conserved chromosomal domains . *Animal Genetics*, 2010, 41 (Suppl. 2): 91–99;

12. Grandi F.C., An W. Non-LTR retrotransposons and microsatellites. Partners in genomic variation. *Mobile Genetic Elements*, 2013, 3: e25674 (<http://dx.doi.org/10.4161/mge.25674>)
13. Marton-Lefèvre J. Biodiversity Is Our Life // *Science*, 2010, V.327, pp. 1179.
14. McInerney C.E., Allcock A.L., Johnson M.P., Bailie D.A., Prodohl P.A. Comparative genomic analysis reveals species dependent complexities that explain difficulties with microsatellite marker development in mollusks. *Heredity*, 2011, 106: 78–87.
15. Miousse I.R., Chalbot M.C., Lumen A., Ferguson A., Kavouras I.G., Koturbash I. Response of transposable elements to environmental stressors. // *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2015. Vol. 765. pp.19–39.
16. Smyka P., Kalendar R., Ford R., Macas J., Griga M. Evolutionary conserved lineage of Angela-family retrotransposons as a genome-wide microsatellite repeat dispersal agent. *Heredity*, 2009, 103: 157–167.
17. Startek M., Szafranski P., Gambin T., Campbell I.M., Hixson P., Shaw C.A., Stankiewicz P., Gambin A. Genome-wide analyses of LINE-LINE-mediated nonallelic homologous recombination. *Nucleic Acids Res*. 2015. 43 (4): 2188–2198. doi: 10.1093/nar/gku1394
18. Xu L., Cole J.B., Bickhart D.M., Hou Y., Song J., VanRaden P.M., Sonstegard T.S., Van Tassell C.P., Liu G.E. Genome wide CNV analysis reveals additional variants associated with milk production traits in Holsteins. *BMC Genomics*. 2014. 15:683 <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/683>
19. Zhao F., McParland S., Kearney F., Du L., Berry D.P. Detection of selection signatures in dairy and beef cattle using high-density genomic information. *Genetics Selection Evolution*, 2015, 47:49. DOI 10.1186/s12711-015-0127-3)
20. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome Fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. // *Genomics*. 1994. V. 20. №2. pp. 176–183.

References:

1. Glazko VI, Kosovskiy GY, Kovalchuk S., Arkhipov AV, Petrova IO Dedovich GO, Glazko TT The inverted repeat of microsatellite (AGC)₆G flanking the DNA regions of homology to the retrotransposon into the genome of cattle // *Innovative technologies in medicine*. 2014 2 (03). pp. 63–79.
2. Glazko VI, Feofilov AV Bardukov NV, Glazko TT Species-specific ISSR-PCR markers and the ways of their formation // *Bulletin of the TAA*. 2012. №1. pp. 118–125.
3. Kalashnikov L.A, IM Dudin, VI Glazko et al. DNA technology of farm animals assessment. *Forest Glade (Mosk. obl.)*, 1999. 148 p.
4. Kalendar RV, Glazko VI Types of molecular genetic markers and their application // *Physiology and biochemistry of cultivated plants*. 2002. T. 34. №4. pp 279–296.
5. The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture, edited by Barbara Rischkowsky & Dafydd Pilling. Rome, 520 p.
6. Sulimova GE Molecular genetic analysis of the animal's genome and humans using DNA markers. Author. diss. Dr. biol. Sciences: 03.00.15. IOGen named after NI Vavilov. Moscow, 1998. 38 p.
7. Sulimova GE DNA markers in genetic research: marker types, their properties and applications // *Advances of modern biology*. 2004. T. 124. № 3. pp. 260–271.
8. Khrabrova LA Theoretical and practical aspects of genetic monitoring in horse breeding. Author. diss. Dr of Agricultural Sciences: 06.02.07. Divov: State Research Institute of Horse Breeding, 2011. 38 p.
9. Ernst LK, NG Dmitriev, IA Paronyan Farm animal genetic resources in Russia and neighboring countries. SPb.: VNIIGRZH, 1994. 472 p.
10. Ernst LK, Zinovieva NA Biological problems of livestock in the XXI century. Moscow, 2008. 508 p.
11. Adelson D. L., Raison J. M., Garber M., Edgar R. C. Interspersed repeats in the horse (*Equus caballus*); spatial correlations highlight conserved chromosomal domains. *Animal Genetics*, 2010, 41 (Suppl. 2): 91–99;
12. Grandi F.C. , An W. Non-LTR retrotransposons and microsatellites. Partners in genomic variation. *Mobile Genetic Elements*, 2013, 3: e25674 (<http://dx.doi.org/10.4161/mge.25674>)
13. Marton-Lefèvre J. Biodiversity Is Our Life//*Science*, 2010, V.327, pp. 1179.

14. McInerney C.E., Allcock A.L., Johnson M.P., Bailie D.A., Prodohl P.A. Comparative genomic analysis reveals species dependent complexities that explain difficulties with microsatellite marker development in mollusks. *Heredity*, 2011, 106: 78–87.
15. Miousse I.R., Chalbot M.C., Lumen A., Ferguson A., Kavouras I.G., Koturbash I. Response of transposable elements to environmental stressors. // *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2015. Vol. 765. pp. 19–39.
16. Smyka P., Kalendar R., Ford R., Macas J., Griga M. Evolutionary conserved lineage of Angela-family retrotransposons as a genome-wide microsatellite repeat dispersal agent. *Heredity*, 2009, 103: 157–167.
17. Startek M., Szafranski P., Gambin T., Campbell I.M., Hixson P., Shaw C.A., Stankiewicz P., Gambin A. Genome-wide analyses of LINE-LINE-mediated nonallelic homologous recombination. *Nucleic Acids Res*. 2015. 43 (4): 2188-2198. doi: 10.1093/nar/gku1394
18. Xu L., Cole J.B., Bickhart D.M., Hou Y., Song J., VanRaden P.M., Sonstegard T.S., Van Tassell C.P., Liu G.E. Genome wide CNV analysis reveals additional variants associated with milk production traits in Holsteins. *BMC Genomics*. 2014. 15:683 <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/683>
19. Zhao F., McParland S., Kearney F., Du L., Berry D.P. Detection of selection signatures in dairy and beef cattle using high-density genomic information. *Genetics Selection Evolution*, 2015, 47:49. DOI 10.1186/s12711-015-0127-3
20. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome Fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. // *Genomics*. 1994. V. 20. №2. pp. 176–183.

УДК 575.224.42 + 575.28

Геномное сканирование с использованием участков ретротранспозонов у животных и растений

¹ Валерий Иванович Глазко

² Мария Александровна Елькина

³ Татьяна Теодоровна Глазко

¹⁻³ Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Российская Федерация

^{1,3} Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий, Российская академия наук, Российская Федерация

¹ Доктор сельскохозяйственных наук, профессор, академик РАН (иностраный член)

E-mail: vglazko@yahoo.com

² Научный сотрудник Центра нанобиотехнологий

E-mail: E-mariyaelkina@yahoo.com

³ Доктор сельскохозяйственных наук, главный научный сотрудник

E-mail: tglazko@rambler.ru

Аннотация. Рассмотрены возможности применения терминальных фрагментов мобильных элементов растений и животных для полилокусного генотипирования (геномного сканирования) сельскохозяйственных видов животных и растений. Результаты использования в качестве праймеров в полимеразной цепной реакции терминальных участков эндогенных ретровирусов двудольных и однодольных растений в качестве «якорей» для полилокусного генотипирования позволяют утверждать о высокой представленности участков мобильных элементов, типичных для растений, в геномах крупного рогатого скота, овец, лошадей. Выявленный полиморфизм IRAP-маркеров (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) оцениваемый по полиморфизму фрагментов ДНК, фланкированных терминальными участками эндогенных ретровирусов растений в геномах сельскохозяйственных животных, позволяет предлагать их использование для выявления внутривидовой и внутрипородной дифференциации групп животных. Полиморфизм IRAP-

маркеров оцененный при использовании в качестве праймеров участков эндогенных ретровирусов растений и животных, позволяет подбирать сочетания локусов для установления принадлежности животного к конкретной (видовой, породной, внутривидовой) группе. Результаты генотипирования двудольных (*G. soja*, *G. max*) и однодольных растений (*T. aestivum*) с применением в качестве праймера длинного концевой участка ретротранспозона, впервые выявленного у сои, свидетельствуют о присутствии в геномах однодольных большого количества фрагментов, гомологичных инвертированным терминальным участкам эндогенных ретровирусов двудольных. Высокий уровень полиморфизма IRAP-маркеров позволяет проводить целенаправленный поиск геномных участков, полиморфизм которых может быть ассоциирован с влиянием факторов естественного и искусственного отборов. Проведен поиск терминальных участков гомологичных последовательностей мобильных элементов растений в геномах овец и лошадей, а также участков, гомологичных сайтам эндогенных ретровирусов млекопитающих, в секвенированных последовательностях пшеницы и генома *G. max*. Результаты присутствия участков ретротранспозонов, классически принадлежащих одному из царств, одновременно у представителей растений и животных, свидетельствуют об общности пула мобильных элементов в целом.

Ключевые слова: мобильные генетические элементы, геномное сканирование, IRAP-PCR маркеры, полиморфное информационное содержание (PIC), овцы, лошади, крупный рогатый скот, *T. aestivum*, *G. max*, *G. soja*.