



УДК 575

© 2007

В. И. Глазко, И. А. Цветков, А. Н. Иванов

## IRAP маркеры в оценках дифференциации сортов риса

(Представлено академиком НАН Украины Д. М. Гродзинским)

*The comparative analysis of amplification product spectra, which were obtained with the use of PawS5, PawS6 and PawS11, the end fragments of retrotransposon-like elements of family R173, as primers in 14 rice varieties, was carried out. The data on the expressive differentiation between rice varieties by the combination of amplification products with different lengths of DNA fragments were obtained. The possibility to use these fragments for the genetic identification of rice varieties is demonstrated.*

Одной из актуальных проблем в селекции культурных растений является подбор молекулярно-генетических маркеров для создания генетического паспорта, выяснения генеалогических взаимоотношений между сортами, а также маркирования главных генов хозяйственно ценных признаков. К настоящему времени сменился целый ряд поколений различных типов молекулярно-генетических маркеров, начиная от моногенных “сигналий” А. С. Серебровского [1], полиморфизма запасных белков [2], ферментов [3], мини- и микросателлитных локусов [4, 5], фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами [6–8], а в последние годы — и метод выявления мононуклеотидного полиморфизма (Single-nucleotide Polymorphisms, SNP) (см. [9]). Каждый из этих методов имеет свои достоинства и сложности, и они, в общем, дополняют друг друга. В то же время одним из наиболее часто встречающихся недостатков таких методов, как правило, является отсутствие достаточно обоснованной информации о возможной биологической значимости наблюдаемого полиморфизма и межсортных отличий. В этом отношении особый интерес представляет новый вариант молекулярно-генетических маркеров, основанный на изучении фрагментов ДНК, фланкированных участком фланга ретротранспозона и его инвертированным повтором, либо участком микросателлитного локуса (IRAP и REMAP) [10, 11], именно потому, что в данном случае хотя бы очевидна роль транспозирующихся элементов в различных геномных реорганизациях. Это особенно важно при поиске молекулярно-генетических маркеров для самоопыляющихся сортов культурных растений.

Для того чтобы оценить эффективность применения оценок полиморфизма IRAP маркеров (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism — полиморфизм фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными терминальными участками ретротранспозона) для

сортовой идентификации, нами выполнен сравнительный анализ спектров таких маркеров у 14 сортов риса при использовании в качестве праймеров (затравок) фрагментов ретро-транспозон-подобных элементов одного и того же семейства R173 [12, 13]. Это семейство исходно было описано у ржи (*Secale cereale*). Показано, что оно включает в себя около 15 тыс. индивидуальных копий на диплоидный геном, рассеянных по всем семи хромосомам; размер индивидуальных элементов его представителей варьирует от 3 до 6 тыс. пар нуклеотидов (т. п. н.) и две области, фланкирующие R173 элементы, несут высокую степень гомологии с флангами одного из ретротранспозонов пшеницы [13]. На базе флангов элементов семейства R173 получен набор молекулярно-генетических маркеров, удобных для работы с геномом ржи [12]. Оказалось также, что созданная система праймеров успешно позволяет дифференцировать близкородственные дикие и культурные виды растений, сорта картофеля и подсолнечника [14].

**Материалы и методы.** В анализ были включены 14 сортов риса, которые отличались по продолжительности вегетационного периода: раннеспелые сорта — Дальневосточный, Изумруд, Новатор, Садко, Спринт, Фонтан, Факел; среднеспелые — Виола, Лиман, Приморский, Рапан, Янтарь, позднеспелые — Лидер, Снежинка.

Препараты ДНК готовили с помощью набора реагентов “Silika” (ООО “Компания Биокон”, Москва). Для этого трехдневные проростки отделяли от зерновки и, объединив их по 10 шт., гомогенизировали в лизирующем буфере из комплекта набора.

ПЦР смесь использовали готовую на основе “сухого ядра” (ООО “Компания Биокон”), праймеры прибавляли в количестве 20 пкмоль на реакцию. Длина праймеров составляла 18 н., температуры отжига варьировали от 50 до 56 °С. Дизайн праймеров осуществлен [12, 13] для амплификации межинсерционных фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами ретроэлементов Paws5, Paws6 и Paws11. Эти праймеры успешно применялись для генотипирования растений (напр., [14]). Продукты ПЦР разделяли путем электрофореза в 1,5%-м агарозном геле с трис-боратным буфером, окрашивали бромистым этидием, визуализировали в ультрафиолетовом свете с помощью гелъдокументирующей системы “Vitran”.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Суммарный спектр продуктов амплификации участков ДНК, фланкированных инвертированным повтором Paws5, полученный на ДНК разных сортов риса, включал 13 основных фрагментов длиной от 1000 до 200 пар оснований (п. о.), которые отчетливо воспроизводились при повторных амплификациях (рис. 1, 2). При таких повторных амплификациях внутрисортные отличия не обнаружены. В то же время наблюдались выраженные межсортные отличия: количество продуктов амплификации (ампликонов) варьировало от 5 (сорта Садко, Фонтан, Янтарь) до 9 (сорта Дальневосточный, Факел, Снежинка). В спектрах ампликонов почти всех исследованных сортов регулярно присутствовали два фрагмента с длинами в районе 500–450 п. о. (табл. 1).

В общем, в продуктах амплификации преобладали относительно короткие фрагменты длиной в 400–200 п. о. (42 ампликона) по сравнению с более длинными в 1000–700 п. о. (23 ампликона). Каждый сорт имел уникальное сочетание ампликонов; наиболее сходными по такому сочетанию оказались сорта Приморский и Янтарь; они отличались только по присутствию у сорта Приморский фрагмента длиной около 1000 п. о., не выявленного у сорта Янтарь (см. табл. 1). Эти фрагменты маркируют последовательности ДНК, расположенные между участком, комплементарным праймеру, и его инвертированным вариантом. Можно ожидать, что их длина указывает на взаимное расположение копий ретротранспозонподобного элемента, локализованных в альтернативных цепях ДНК. Судя по полученным

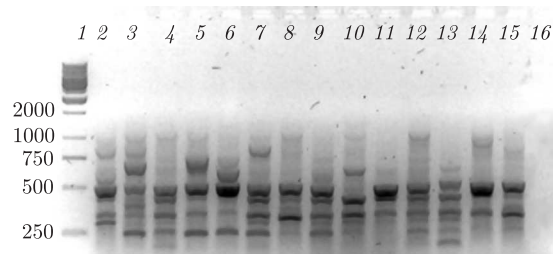


Рис. 1. Спектр продуктов амплификации, полученный с использованием в качестве праймера последовательности PawS5:

1 — маркер молекулярной массы Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (фрагменты 250, 500, 750, 1000, 2000 и более п. н.); 2 — сорт Виола; 3 — Дальневосточный; 4 — Изумруд; 5 — Лидер; 6 — Лиман; 7 — Новатор; 8 — Приморский; 9 — Рапан; 10 — Садко; 11 — Спринт; 12 — Снежинка; 13 — Факел; 14 — Фонтан; 15 — Янтарь; 16 — отрицательный контроль

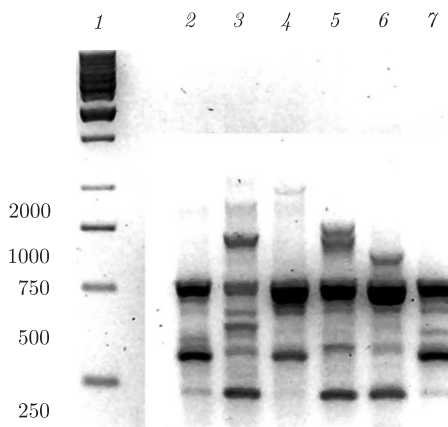


Рис. 2. Спектр продуктов амплификации (повтор образцов), полученный с использованием в качестве праймера последовательности PawS5:

1 — маркер молекулярной массы Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (фрагменты 250, 500, 750, 1000, 2000 и более п. н.); 2 — сорт Янтарь; 3 — Дальневосточный; 4 — Фонтан; 5 — Лидер; 6 — Лиман; 7 — Приморский

данным, расстояние между такими копиями достаточно короткое — от 1000 до 200 п. о., преимущественно в районе 500–200 п. о., что позволяет предполагать кластерную организацию таких повторов в геноме риса. Интересно отметить, что использование того же праймера PawS5 в исследованиях разных таксонов растений позволило получить сходную с рисом картину распределения длин продуктов амплификации у сортов картофеля, но не у подсолнечника, у которых большинство полученных ампликонов оказалось длиннее 1000 п. о. [14].

Сортовое разнообразие продуктов амплификации свидетельствует о том, что инсерции — делеции таких фрагментов достаточно активно происходят в рассмотренных сортах риса.

Высокая скорость эволюции генома риса, связанная с транспозирующими элементами, достаточно подробно описана в литературе [15]. Показано, что скорость делеций и инсерций транспозирующихся элементов у риса в два раза выше, чем средний уровень синонимичных замен по структурным генам. Повышенная мобильность членов семейства R173 обнаружена по внутрисортовой изменчивости их присутствия/отсутствия у сорта ржи в связи с продолжительностью хранения семян.

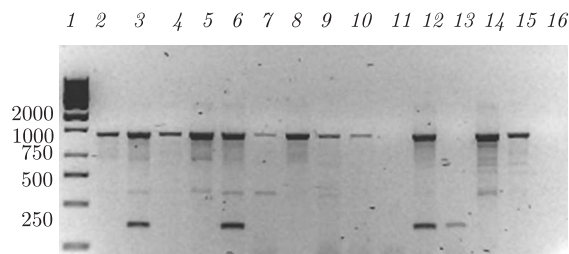


Рис. 3. Спектр продуктов амплификации, полученный с использованием в качестве праймеров последовательностей RawS6 и RawS11:

1 — маркер молекулярной массы Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (фрагменты 250, 500, 750, 1000, 2000 и более п. н.); 2 — сорт Виола; 3 — Дальневосточный; 4 — Изумруд; 5 — Лидер; 6 — Лиман; 7 — Новатор; 8 — Приморский; 9 — Рапан; 10 — Садко; 11 — Спринт; 12 — Снежинка; 13 — Факел; 14 — Фонтан; 15 — Янтарь; 16 — отрицательный контроль

По-видимому, именно высокая скорость эволюции транспозирующихся последовательностей в геноме риса и повышенная мобильность членов семейства R173 и объясняют уникальность сочетания продуктов амплификации фрагментов ДНК, фланкированных инвертированным повтором RawS5 для каждого из 14 исследованных сортов риса.

Выполнен также сравнительный анализ у тех же сортов риса спектров продуктов амплификации, полученный при использовании в качестве праймеров пары RawS6 и RawS11, маркирующих расстояние между инсерциями в альтернативных цепях ДНК двух разных членов семейства R173 (рис. 3, 4; табл. 2). Количество четко выявляемых продуктов ам-

Таблица 1. Длины основных продуктов амплификации, выявленных у сортов риса при использовании в качестве праймера последовательности RawS5

Сорта	Длина ампликонов, п. о.													Кол-во ампликонов
	1000	950	850	750	700	600	500	450	400	350	300	250	200	
Раннеспелые														
Дальневосточный	+	—	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	—	9
Изумруд	+	—	—	+	—	—	+	+	—	+	—	+	+	7
Новатор	+	—	+	—	—	—	+	+	—	+	+	+	+	8
Садко	+	—	—	—	+	—	—	+	—	+	+	—	—	5
Спринт	—	—	—	—	+	—	+	+	+	+	+	—	—	6
Факел	—	—	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	9
Фонтан	+	+	—	—	—	—	+	+	—	+	—	—	—	5
Суммарно 49 ампликонов; в среднем 7 ампликонов на сорт														
Среднеспелые														
Виола	—	—	—	+	—	+	+	+	—	+	+	—	—	6
Лиман	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	+	—	7
Приморский	+	—	+	—	—	—	+	+	—	+	—	+	—	6
Рапан	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+	+	+	—	6
Янтарь	—	—	+	—	—	—	+	+	—	+	—	+	—	5
Суммарно 30 ампликонов; в среднем 6 ампликонов на сорт														
Позднеспелые														
Лидер	+	—	—	—	+	—	+	+	+	+	—	+	—	7
Снежинка	+	—	—	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	9
Суммарно 16 ампликонов; в среднем 8 ампликонов на сорт														
Суммарно 23 ампликона							Суммарно 42 ампликона							
длиной в 1000–700 п. о.							длиной в 400–200 п. о.							

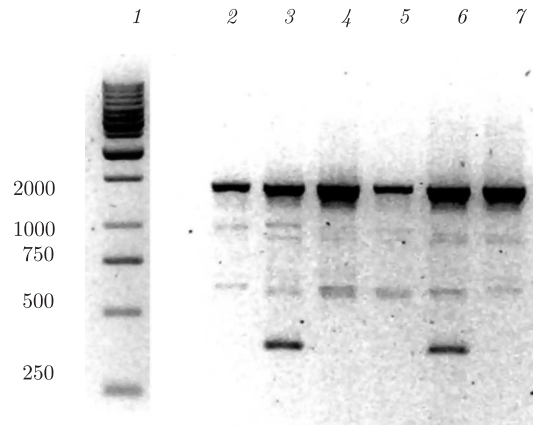


Рис. 4. Спектр продуктов амплификации (повтор образцов), полученный с использованием в качестве праймеров последовательностей Paws6 и Paws11:

1 — маркер молекулярной массы Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (фрагменты 250, 500, 750, 1000, 2000 и более п. н.); 2 — сорт Янтарь; 3 — Дальневосточный; 4 — Фонтан; 5 — Лидер; 6 — Лиман; 7 — Приморский

плификации в этой системе оказалось существенно меньше (7), а длина их заметно больше (от 1900 до 400 п. о.), чем в случае использования в качестве праймера одной последовательности Paws5. У одного сорта, Спринт, продуктов амплификации в этой системе получить не удалось, у пяти сортов выявлены 1–2 ампликона, у остальных — от 3 до 6 ампликонов. В то же время повторные амплификации разных образцов одних и тех же сортов свидетельствовали об отсутствии внутрисортной изменчивости по спектрам ампликонов (см. рис. 3, 4). Каждый сорт и по этим ампликонам имел уникальный, сортоспецифичный спектр, по-

Таблица 2. Длины продуктов амплификации, выявленных у сортов риса при использовании в качестве праймеров последовательностей Paws6 + Paws11

Сорта	Длина ампликонов, п. о.							Кол-во ампликонов
	1900	1000	950	900	650	600	400	
<b>Раннеспелые</b>								
Дальневосточный	+	+	—	+	—	+	+	5
Изумруд	+	—	—	—	—	—	—	1
Новатор	+	—	—	—	—	+	—	2
Садко	+	—	—	—	—	—	—	1
Спринт	—	—	—	—	—	—	—	0
Факел	—	—	—	—	—	—	+	1
Фонтан	+	+	+	+	+	+	—	6
Суммарно 16 ампликонов; в среднем 2,3 ампликона на сорт								
<b>Среднеспелые</b>								
Виола	+	+	—	—	—	—	—	2
Лиман	+	—	+	+	—	+	+	5
Приморский	+	—	+	+	+	—	—	4
Рапан	+	—	—	—	+	+	—	3
Янтарь	+	+	—	—	+	—	—	3
Суммарно 17 ампликонов; в среднем 3,4 ампликона на сорт								
<b>Позднеспелые</b>								
Лидер	+	+	—	+	+	+	—	5
Снежинка	+	+	+	+	—	—	+	5
Суммарно 10 ампликонов; в среднем 5 ампликонов на сорт								

звolyающий отличать один сорт от другого по присутствию/отсутствию отдельных фрагментов ДНК. То есть и распределение сайтов инсерции этих двух элементов семейства R173 свидетельствует о выраженной межсортowej изменчивости.

По спектрам продуктов амплификации, полученным с использованием как одного праймера PаwS5, так и двух — PаwS6 и PаwS11, не удалось обнаружить выраженных отличий между группами сортов, отличающихся по продолжительности вегетационного периода (см. табл. 1, 2).

Можно ожидать, что сортовая специфика спектров ампликонов, их относительно повышенное или пониженное количество по сравнению с другими сортами, может, в определенной степени, отражать потенциальную генетическую стабильность сорта, поскольку она тесно ассоциирована с актами инсерций/делеций элементов семейства R173. В этой связи интересно отметить, что по суммарному количеству выявленных ампликонов (см. табл. 1, 2) наибольшее их количество наблюдается у сортов Дальневосточный и Снежинка (сорт Дальневосточный относительно недавно интродуцирован в Краснодарский край). Однако этот вопрос, очевидно, нуждается в дальнейших исследованиях.

Выполненные исследования свидетельствуют о высокой, сортоспецифичной изменчивости сайтов инсерции элементов семейства R173 в геноме риса. Использование в качестве праймера последовательности PаwS5 позволяет получать относительно простые, хорошо воспроизводимые спектры продуктов амплификации, удобные для их применения при сортовой идентификации исследованных сортов риса. Использование в качестве праймеров двух последовательностей — PаwS6 и PаwS11, относительно менее эффективно в связи с меньшим количеством продуктов амплификации в спектрах и возможностью их отсутствия у отдельных сортов. Тем не менее и в этом случае выявляется сортоспецифичность спектров ампликонов у исследованных сортов риса. В общем, эта система оказывается достаточно удобной для исследований молекулярно-генетической дифференциации между сортами риса и использованием полученных данных в прикладных и теоретических исследованиях.

1. *Серебровский А. С.* Селекция животных и растений. — Москва: Колос, 1969. — 295 с.
2. *Конарев А. В.* Белки растений как генетические маркеры. — Москва: Наука, 1983. — 365 с.
3. *Nevo E.* Genetic variation in natural populations: patterns and theory // *Theor. Pop. Biol.* — 1987. — **13**, No 1. — P. 121–177.
4. *Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L.* Individual-specific “fingerprints” of human DNA // *Nature (London)*. — 1985. — **316**. — P. 76–79.
5. *Caetano-Anolles G.* MAAP: a versatile and universal tool for genome analysis // *Plant Mol. Biol.* — 1994. — **25**. — P. 1011–1026.
6. *Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D.* Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) — anchored polymerase chain reaction amplification // *Genomics*. — 1994. — **20**. — P. 176–183.
7. *Vos P., Hogers R., Bleeker M. et al.* ALFP: a new technouque for DNA fingerprint // *Nucl. Acids. Res.* — 1995. — **23**. — P. 4407–4414.
8. *Khiestkina E. K., Huang X. Q., Quenum F. J.-B. et al.* Genetic diversity in cultivated plants — loss or stability? // *Theor. and Appl. Genet.* — 2004. — **108**. — P. 1466–1472.
9. *Monna L., Ohta R., Masuda H. et al.* Genome-wide Searching of Single-nucleotide Polymorphisms among Eight Distantly and Closely Related Rice Cultivars (*Oryza sativa* L.) and a Wild Accession (*Oryza rufipogon* Griff.) // *DNA Res.* — 2006. — **13**. — P. 43–51.
10. *Flavell A. J., Knox M. R., Pearce S. R., Ellis T. H. N.* Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis // *Plant J.* — 1998. — **16**. — P. 643–650.
11. *Kalendar R., Grob T., Regina M. et al.* IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques // *Theor. and Appl. Genet.* — 1999. — **98**. — P. 704–711.
12. *Rogowsky P. M., Shepherd K. W., Langridge P.* Polymerase chain reaction based mapping of rye involving repeated DNA sequences // *Genome*. — 1992. — **35**, No 4. — P. 621–626.

13. Rogowsky P. M., Liu J. Y., Manning S. et al. Structural heterogeneity in the R173 family of rye-specific repetitive DNA sequences // Plant Mol. Biol. – 1992. – **20**, No 1. – P. 95–102.
14. Зайцев В. С., Хавкин Э. Е. Идентификация генотипов растений с помощью ПЦР-анализа рассеянных повторяющихся последовательностей R173 // Докл. РАСХН. – 2001. – № 2. – С. 3–5.
15. Ma J., Bennetzen J. L. Rapid recent growth and divergence of rice nuclear genomes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2004. – **101**, No 34. – P. 12404–12410.

ВНИИРиса, Краснодар  
Московский государственный  
университет биотехнологий

Поступило в редакцию 30.11.2006

УДК 582.26/.28:546.221.1(262.5)

© 2007

Академик НАН Украины Ю. П. Зайцев, академик НАН Украины  
Г. Г. Поликарпов, член-корреспондент НАН Украины В. Н. Егоров,  
Б. Г. Александров, О. П. Гаркуша, Н. И. Копытина,  
А. В. Курилов, Д. А. Нестерова, Л. М. Нидзвецкая,  
С. Е. Никонова, И. Г. Поликарпов, В. Н. Поповичев, Е. М. Руснак,  
Н. А. Стокозов, Н. Г. Теплинская, Л. М. Теренько

## Средоточие останков оксибионтов и банк живых спор высших грибов и диатомовых в донных отложениях сероводородной батиаля Черного моря

*For the first time, the cultures of aerobic species of fungi and diatoms from spores collected in bottom sediments in the anaerobic hydrogen sulphide zone of the Black Sea at depths from 800 to 2100 m are obtained.*

После открытия сероводорода в толще Черного моря в 1890 г. стало ясно, что оксибионты в ней обитать не могут [1–5]. И действительно, за все время научных исследований представителями разных стран (в течение 135 лет) ни в одной экспедиции не было фактов сбора жизнеспособных организмов-оксибионтов из аноксической глубоководной зоны Черного моря [6]. Вместе с тем учение об анабиозе стало научной основой для поисков живых существ, способных впадать в состояние аноксибиоза [7] и пребывать в нем в различных экстремальных условиях [8, 9]. В. И. Вернадский обращал внимание на то, что “наблюдается латентная жизнь спор, которая сосредоточена и в морских илах и осадках...” [10, с. 156].

Учитывая оба вышеизложенных научных обобщения, можно было ожидать, во-первых, подтверждения отсутствия живых эукариот и, во-вторых, обнаружения их жизнеспособных спор и цист в глубоководных осадках, в пелоконтуре, батиаля Черного моря, если эти покоящиеся стадии благополучно достигают его дна. Выяснению этих вопросов посвящена настоящая работа.

В отличие от ситуации с аноксическими условиями на дне мелководного (15–20 м) эстуария реки, где длительно сохраняются покоящиеся яйца зоопланктона [9], ситуация для покоящихся стадий низших растений и беспозвоночных животных на глубинах в 1000–2000 м Черного моря должна считаться экстремальной. Степень ее экстремальности определяется