

УДК 577.113.5

ПОИСК ОБЩИХ ТАНДЕМНЫХ ДНК ПОВТОРОВ ДЛЯ ВИДОВ РОДА *POPULUS* L. И ИХ ЭВОЛЮЦИОННАЯ РОЛЬ

Александров О.С., к.б.н., старший научный сотрудник. тел. 89150968472, olegsandrov@gmail.com
ФГБНУ ВНИИСБ, лаборатория клеточной инженерии растений. Москва, Россия

Ключевые слова: ДНК повторы, тополя, праймеры, ПЦР, молекулярные маркеры, цитогенетические маркеры.

Работа посвящена поиску фракции общих для рода *Populus* L. тандемных ДНК повторов. Поиск производился с помощью программы Tandem Repeat Finder в геноме тополя волосистоплодного. Праймеры, подобранные на найденные мономеры, использовались для ПЦР с другими видами тополей. На основании результатов предложены рекомендации для цитогенетического изучения эволюции видов данного рода.

Введение. Повторяющаяся тандемная ДНК – одна из наиболее эволюционно активных частей генома. Накопление общих для близких видов повторов ДНК и появление новых способствует дивергенции видов. Изучение фракции высококопийных тандемных повторов в геномах родственных видов часто позволяет получить больше знаний об эволюционных процессах, происшедших при формировании их геномов [1].

Виды рода *Populus* L. относятся к пяти секциям, основными из которых являются *Aigeiros*, *Tasamahaca* и *Populus* (син. *Leuce*) [2]. Геном тополя волосистоплодного из секции *Tasamahaca* был секвенирован [3] ввиду большого интереса его для сельского хозяйства. Массив геномных данных, полученных на этом виде тополя, является ценным источником для поиска повторов ДНК как специфичных для данного вида, так и общих с другими видами тополей.

В настоящее время имеется не очень много сообщений относительно тандемных ДНК повторов у тополей [4, 5], поэтому данное направление является достаточно актуальным для дальнейшего развития.

Цели и задачи. Цель работы – выявить фракцию общих тандемных ДНК повторов для видов рода *Populus* L. Для этого были поставлены следующие задачи: 1. Провести анализ тандемных ДНК повторов в геноме тополя волосистоплодного с помощью программы Tandem Repeat Finder, 2. Подобрать на мономеры найденных повторов праймеры с помощью программы Primer3, 4. Провести ПЦР с подобранными праймерами на матрице ДНК других видов тополей из разных секций, 5. Выделить повторы, которые амплифицируются на матрице ДНК всех изучаемых тополей, и оценить их потенциал в качестве цитогенетических маркеров для изучения эволюции тополей.

Материал и методика. В работе были использованы образцы ДНК следующих видов тополей: *P. nigra* L., *P. deltoides* Bartr. ex Marshall, *P. trichocarpa* Torr. et A. Gray, *P. maximowiczii* Henry, *P. simonii* Can., *P. candicans* Ait., *P. alba* L., *P. tremula* L. Материал был собран автором в г. Москве, Воронежской области, а также ГБС имени Н.В. Цицина, Ботаническом саду ННГУ имени Н.И. Лобачевского.

Для анализа геномных данных и целью поиска tandemных ДНК повторов была использована программа Tandem Repeat Finder, разработанная Benson (1999) [6]. Праймеры подбирались с помощью программы Primer3 [7]. ПЦР проводили на амплификаторе C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad, США), согласно программе программа: 94° С – 5 мин; 30 циклов 94° С – 30 с, 60° С – 30 с, 72° С – 1 мин 30с; 72° С – 10 мин. Продукты ПЦР разделяли в 1,5%-ном агарозном геле при 5 В/см. Фотографировали результаты с помощью системы гель-документации Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США).

Результаты исследования. В ходе выполнения выше описанных задач были получены следующие результаты. Поиск tandemных ДНК повторов в геноме тополя волосистоплодного показал наличие в его геноме более 10000 повторов с различной степенью копийности и длины мономера. Ввиду невозможности использования всех найденных повторов среди них был произведён отбор 10 наиболее перспективных с точки зрения пригодности для использования в качестве цитогенетических маркеров (образуют непрерывные кластеры длиной более 10000 п.о.).

На мономеры выделенных повторов были подобраны праймеры. Оптимизации условий проведения ПЦР была проведена на матрице ДНК тополя волосистоплодного. Для каждого из повторов было показано наличие амплификации, и наблюдался лестницеобразный характер профилей при электрофорезе продуктов ПЦР, характерный для амплификации tandemных повторов. При проведении ПЦР с теми же праймерами при тех же условиях на матрице ДНК других видов тополей было выявлена подобная картина электрофоретических профилей для 4 из 10 изучаемых повторов. ПЦР-продукты в данных вариантах были клонированы и секвенированы. Результаты секвенирования показали высокую степень идентичность (95-99%) мономеров данных повторов между изучаемыми видами. Данный факт дает основание заключить, что данные повторы являются общими для данных видов тополей и – поскольку формируют непрерывные кластеры длиной более 10000 п.о. – могут послужить хорошими цитогенетическими маркерами для изучения коллинеарности хромосом и выявления особенностей эволюционного формирования изучаемых геномов.

Заключение. В результате проделанной работы выявлен пул tandemных ДНК повторов, которые являются общими для видов тополей из разных секций.

Данные повторы являются перспективной платформой для создания цитогенетических маркеров, использование которых может расширить знания об эволюционном формировании геномов разных видов тополей.

Библиографический список:

1. Divashuk M.G., Alexandrov O.S., Razumova O.V., Kirov I.V., Karlov G.I. Molecular cytogenetic characterization of the dioecious *Cannabis sativa* with an XY chromosome sex determination system. // PLoS ONE. – 2014. – №9(1). – e85118.
2. Zsuffa L. A summary review of interspecific breeding in the genus *Populus* L. /In Proceedings 14th meeting of the Canadian Tree Improvement Association, part 2. Dept. Environment, Canadian Forestry Service, Ottawa. – 1975. – P. 107–123.
3. Tuskan G.A., DiFazio S., Jansson S., Bohlmann J., Grigoriev, I., Hellsten U., Putnam N., Ralph S., Rombauts S., Salamov A., et al. 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). // Science. – 2006. – №313. – P. 1596–1604.
4. Rajagopal J., Das S., Khurana D.K., Srivastava P.S., and Lakshmikumaran M. Molecular characterization and distribution of a 145-bp tandem repeat family in the genus *Populus*. // Genome. – 1999. – №42. – P. 909–918.
5. Islam-Faridi M.N., Nelson C.D., DiFazio S.P., Gunter L.E., Tuskan G.A. Cytogenetic analysis of *Populus trichocarpa* – ribosomal DNA, telomere repeat sequence, and marker-selected BACs. // Cytogenet Genome Res. – 2009. – №125. P. 74–80.
6. Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. // Nucleic Acids Research. – 1999. – №27(2). – pp. 573–580.
7. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. Primer3 – new capabilities and interfaces. // Nucleic Acids Research. – 2012. – №40(15). – e115.

THE SEARCH OF THE TANDEM DNA REPEATS IN SPECIES OF THE *POPULUS* L. AND THEIR EVOLUTIONAL ROLE

Alexandrov O.S.

Key words: DNA repeats, poplars, primers, PCR, molecular markers, cytogenetic markers.

*The work is devoted to the search for the fraction of tandem DNA repeats that is common for the *Populus* L. genus. The search was performed using the Tandem Repeat Finder program in the blackwood poplar genome. The primers were designed with the monomers as a basis. They were used for PCR with other poplar species. Based on the results, the recommendations for a cytogenetic study of the poplar evolution are proposed.*