

УДК 576.08:58.087

Изменчивость метилирования сателлитной ДНК и мобильных генетических элементов *Rumex acetosa* в культуре *in vitro*

Variability of methylation of satellite DNA and mobile genetic elements of the *Rumex acetosa* in culture *in vitro*

Скапцов М. В., Куцев М. Г., Краснобородкина М. А., Тросничков А. А., Кайгалов И. В., Шмаков А. И.

Skaptsov M. V., Kutsev M. G., Krasnoborodkina M. A., Trosnichkov A. A., Kaygalov I. V., Shmakov A. I.

Алтайский государственный университет, пр. Ленина, 61, 656049, Барнаул

Altai State University, Lenin Ave., 61, 656049, Barnaul

E-mails: mr.skaptsov@mail.ru, m_kucev@mail.ru, mariakholodkova@gmail.com, armeec.96@mail.ru, kaygalov95@mail.ru, ssbgbot@mail.ru

Реферат. В работе методом NGS-секвенирования фрагментов метилчувствительного AFLP исследованы каллусные линии и регенеранты *Rumex acetosa* L. После секвенирования, сборки и удаления повторов было получено 448 последовательностей ДНК. Аннотировано было 333 ДНК последовательности. Выявлено, что значительная часть последовательностей гомологична сателлитной ДНК и ДНК ретротранспозонов различного класса, депонированных в базах данных NCBI. Выявлена изменчивость в метилировании ретротранспозонов различного класса в процессе культивирования. У контрольной линии и на стадии каллуса со сроком культивирования в течение трех месяцев нами отмечено метилирование ретротранспозонов семейств *Gypsy* и *Copia*. На стадии культивирования каллуса со сроком 12 месяцев и стадии регенерации наблюдается метилирование ретротранспозонов семейства *Gypsy*.

Summary. In the work by NGS-sequencing of fragments of methyl sensitive AFLP, callus lines and regenerants of *Rumex acetosa* L. were studied. After sequencing, assembling and removing the repeats, 448 DNA sequences were obtained. There were 333 DNA sequences annotated. We have revealed that a significant part of the sequences are homologous with satellite DNA and various classes of retrotransposons. The variability in methylation of retrotransposons of various classes in the process of cultivation is revealed. At the control line and in the callus stage with a cultivation period of three months, we noted the methylation of *Gypsy* and *Copia* retrotransposons. At the long cultivation stage of callus (12 months) and the regeneration stage, methylation of retrotransposons of the *Gypsy* family is observed.

Введение

Соматоклональная изменчивость – важный генетический фактор развития культур клеток и тканей растений *in vitro*. Данное явление наблюдают практически при любом типе культивирования, особенно при длительной пролиферации каллуса. Согласно Р. Г. Бутенко (1999), генетическая гетерогенность популяций клеток является необходимым условием ее существования, основой адаптационных возможностей популяции и является важным фактором гомеостаза. Зачастую возможности растения к дедифференцировке клеток и стабильное размножение в культуре *in vitro* зависит не только от вида, но и от генотипа растений. Анализ соматоклональной изменчивости заслуживает особого внимания при использовании метода культуры тканей для сохранения биоразнообразия, микроразмножения, культивирования лекарственных растений и селекции.

Генетическая и эпигенетическая изменчивости могут возникать не только в длительно пролиферирующих каллусных культурах, но и при соматическом эмбриогенезе, где внутривидовые вариации и эпигенетические различия обусловлены ответом на стресс. Зачастую уровень изменчивости в культуре *in vitro* зависит от состава регуляторов роста, типа эксплантата или генотипа растительного объекта (Bairu et al., 2011). В различных исследованиях общего метилирования ДНК в культуре *in vitro* полученные закономерности могут противоречить друг другу. В работе L. Villedor et al. (2007) культивирование *in vitro* характеризовалось сниженным уровнем метилирования, тогда как в исследовании S. R. Kitimu et al. (2015) отмечена обратная закономерность, что, видимо, связано с процессами

метиляции и деметиляции различных генов, в то время как общий уровень может изменяться незначительно или варьировать в большую или меньшую сторону. В некоторых других исследованиях показано, что уровни метилирования при культивировании *in vitro* связаны с типом экспланта (Wang, Wang, 2012), длительностью культивирования (Diaz-Sala et al., 1995; Rodríguez-López et al., 2010) и компонентами среды (Arnholdt-Schmitt, 1993). По данным M. Aydin et al. (2016), высокий уровень ауксинов вызывал снижение стабильности генома, в то время как самая высокая нестабильность наблюдалась в каллусах, поддерживаемых на среде с дикамбой и пиклорамом. Гиперметиляция ДНК наблюдалась при высоких концентрациях 2,4-Д и пиклорама, тогда как гипометиляция ДНК наблюдалась в присутствии дикамбы. Таким образом, состав сред и тип культивирования имеет определяющее значение в формировании спонтанных мутаций и изменчивости в уровне метилирования.

Материалы и методы

Для исследования использовали образцы из различных линий культуры *in vitro* *Rumex acetosa* L. – P1 (контрольная линия), P2 (каллусная линия после трех месяцев культивирования), P4 (каллусная линия после 12 месяцев культивирования), P5 (регенеранты после 12 месяцев культивирования каллуса). Для секвенирования метилированных последовательностей ДНК *R. acetosa* использовали модифицированный метод метилчувствительного полиморфизма длин амплифицированных фрагментов – MAFLP (Marconi et al., 2013). Геномную ДНК различных линий культур *R. acetosa in vitro* обрабатывали метилзависимыми эндонуклеазами рестрикции *BisI* (C(5mC)↓NGC) / *KroI* (G↓C(5mC)GGC) и эндонуклеазой *EcoRI* (G↓AATTC) (СибЭнзим, Россия), лигировали с синтетическими адаптерами и амплифицировали со специфичными олигонуклеотидами. Библиотеку ампликонов готовили с использованием набора GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kits (Roche 454, Branford, CT). Эмульсионную ПЦП и пиросеквенирование подготавливали с использованием наборов Roche454 с лигированными концами и осуществляли согласно инструкции производителя. Реакцию секвенирования производили с использованием секвенатора Roche 454 GSJunior. Сборку, нормализацию, поиск ошибок и дублированных последовательностей осуществляли с использованием ПО Geneious, Biomatters Limited с покрытием не менее 40. Поиск гомологичных последовательностей по алгоритмам BLAST осуществляли с использованием ПО Blast2GO со значением *e-value* не менее 1×10^{-3} .

Результаты и обсуждение

После сборки, удаления повторов и нормализации было получено 448 последовательностей ДНК для MAFLP-маркеров. Для анализа метилированных участков ДНК отбирали нуклеотидные последовательности с преобладанием CpG участков с использованием утилиты Geneious CpG Island. В результате после отбора было аннотировано 333 ДНК последовательности. Выявлено, что значительная часть последовательностей гомологична сателлитной ДНК и ДНК ретротранспозонов различного класса, депонированных в базах данных NCBI. У всех исследованных образцов на различных стадиях культивирования *in vitro* отмечена высокая представленность последовательностей сателлитов как аутосом, например, *RAE180*, так и половых хромосом, например, *RAYSI*. Наши результаты подтверждают некоторые выводы и предположения исследователей о метилировании конститутивного гетерохроматина аутосом. Большинство метилированных остатков цитозина сконцентрировано в сателлитных повторах, транспозонах и эндогенных вирусах (Guseinov, Vanyushin, 1975). В некоторых исследованиях на основе данных двумерной флуоресцентной микроскопии предполагалось, что большая часть повторов половых хромосом также метилирована. Например, в работе M. G. Divashuk et al. (2014) у Y-хромосомы *Cannabis sativa* L. отмечено уплотнение ДНК, где авторы предполагают метилирование ДНК и накопление последовательностей ретротранспозонов. Половые хромосомы *Humulus japonicus* Siebold et Zucc. также отчетливо проявляют более сильную флуоресценцию ДАПИ (Grabowska-Joachimciak et al., 2011). Накопление повторяющихся последовательностей на Y-хромосомах было обнаружено в исследованиях Y-хромосом *R. acetosa* ранее, тогда как статус их метилирования описан не был (Navajas-Pérez et al., 2006). Среди последовательностей ДНК значительное количество гомологично мобильным генетическим элементам, а именно ретротранспозонам из различных семейств. Интересным является тот факт, что уровень метилирования изменяется при длительном культивировании каллусов. У контрольной линии *R. acetosa* нами отмечено метилирование ретротранспозонов

семейства *Gypsy* (*Tat/Ogre, Bingo*) и *Copia* (*Maximus/Sire*). Несмотря на ожидания, метилирование наблюдалось и на стадии пролиферации каллуса P2. На стадии длительного культивирования каллуса P4 наблюдаемые ранее метилированные ретроэлементы не обнаружены, кроме гомологичной последовательности к *gtt1-7714-re-5* элемента *Glycine tomentella* Hayata, относящегося к семейству *Gypsy*. На стадии регенерации (P5) отмечено метилирование ретротранспозона *Tat/Ogre* семейства *Gypsy* и транспозона семейства *Mutator*. Таким образом, культуры тканей могут активировать некоторые мобильные генетические элементы, тогда как другие остаются неповрежденными или их уровень активности изменяется. В некоторых работах предполагается, что последующее половое размножение регенерантов стабилизирует активность ретротранспозонов (Orłowska et al., 2016). Тем не менее, частота транспозиции может быть различной у разных типов ретротранспозонов. Подобные явления установлены в различных работах для *Gypsy*, *Copia* и *LINE* транспозонов (Wessler, 1996; Evrensel et al., 2001). Например, уровни транспозиции *BARE1* ретротранспозона (*Copia*) не различаются у соматоклонов. Следовательно, вариации геномов клеток каллусов посредством движения ретротранспозонов могут способствовать диверсификации генотипа и фенотипа растений (Yilmaz, Gozukirmizi, 2013). Как известно, изменчивость в частоте транспозиции может внести значительный вклад в генотип растения и приводить к фенотипическим изменениям. Ранее выявлено, что цвет семян и цветков *Ipomoea purpurea* (L.) Roth., *Brassica rapa* L., изменения междоузлий *Oryza sativa* L. и цвета плодов *Vitis vinifera* L. опосредованы вставками ретроэлементов (Clegg, Durbin, 2000; Kobayashi et al., 2004). В нашем исследовании изменчивость в метилировании ретротранспозонов выявлена именно при длительном культивировании пролиферирующих каллусов, тогда как у каллусных линий трех месяцев культивирования и растений-доноров ретротранспозоны семейств *Gypsy* и *Copia* оставались метилированы или во всяком случае частично метилированы (табл.).

Таблица

Аннотации к последовательностям с максимальными уровнями гомологичности с депонированными в GenBank

P1 (Экспланты)	P2 (Каллус 3 месяца культивирования)	P4 (Каллус 12 месяца культивирования)	P5 (Регенерант)
gi 460768783 gb KC310866.1 Rumex acetosa clone CL11 retrotransposon Tat, complete sequence	gi 41352516 gb AY520575.1 Rumex acetosa male-enriched Y-9 marker sequence	gi 66346850 emb AJ639735.1 Rumex acetosa RAE730 satellite DNA, clone RAE730-7	gi 460768783 gb KC310866.1 Rumex acetosa clone CL11 retrotransposon Tat, complete sequence
gi 460768781 gb KC310864.1 Rumex acetosa clone CL5 retrotransposon Maximus/SIRE, complete sequence	gi 460768788 gb KC310871.1 Rumex acetosa clone CL41 retrotransposon Athila, complete sequence	gi 31335242 gb AY291320.1 Rumex acetosa Y chromosome-specific genomic sequence	gi 8978314 dbj AB032560.1 Rumex acetosa DNA, male-enriched repetitive sequence RAE180-4
gi 262232645 gb GU073318.1 Rumex acetosa isolate FGPR_22 satellite RAYSI sequence	gi 460768781 gb KC310864.1 Rumex acetosa clone CL5 retrotransposon Maximus/SIRE, complete sequence	gi 212278107 gb FJ402918.1 Glycine tomentella retrotransposon gtt1-7714-re-5, complete sequence	gi 66346759 emb AJ634496.1 Rumex acetosa RAE180 satellite, clone RAE180-69b
gi 408362952 gb JX455090.1 Beta vulgaris subsp. vulgaris clone Bingo4 retrotransposon Ty3-gypsy, complete sequence	gi 66346759 emb AJ634496.1 Rumex acetosa RAE180 satellite, clone RAE180-69b	–	gi 460768787 gb KC310870.1 Rumex acetosa clone CL35 transposon Mutator, complete sequence
gi 41352516 gb AY520575.1 Rumex acetosa male-enriched Y-9 marker sequence	gi 460768783 gb KC310866.1 Rumex acetosa clone CL11 retrotransposon Tat, complete sequence	–	gi 460768783 gb KC310866.1 Rumex acetosa clone CL11 retrotransposon Tat, complete sequence

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований. Проект № 16-34-00313.

ЛИТЕРАТУРА

- Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
- Arnholdt-Schmitt B. Rapid changes in amplification and methylation pattern of genomic DNA in cultured carrot root explants (*Daucus carota* L.) // *Theor. Appl. Genet.*, 1993. – Vol. 85. – P. 793–800.
- Aydin M., Arslanb E., Taspinar M. S. et al. Analyses of somaclonal variation in endosperm – supported mature embryo culture of rye (*Secale cereale* L.) // *Biotech. Biotechnol. Equip.*, 2016. – Vol. 30, № 6. – P. 1082–1089.
- Bairu M.W., Aremu A. O., Staden J. V. Somaclonal variation in plants: Causes and detection // *Plant Growth Regul.*, 2011. – Vol. 63. – P. 147–173.
- Clegg M. T., Durbin M. L. Flower color variation: a model for the experimental study of evolution // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2000. – Vol. 97. – P. 7016–7023.
- Diaz-Sala C., Rey M., Boronat A. et al. Variations in the DNA methylation and polypeptide patterns of adult hazel (*Corylus avellana* L.) associated with sequential *in vitro* subcultures // *Plant Cell Rep.*, 1995. – Vol. 15. – P. 218–221.
- Divashuk M. G., Alexandrov O. S., Razumova O. V. et al. Molecular cytogenetic characterization of the dioecious *Cannabis sativa* with an XY chromosome sex determination system // *PLoS ONE*, 2014. – Vol. 9. – № e85118.
- Evrensel C., Yilmaz S., Temel A. et al. Variations in BARE – 1 insertion patterns in barley callus cultures // *Genet. Mol. Res.*, 2011. – Vol. 10, № 2. – P. 980–987.
- Grabowska-Joachimiak A., Mosiolek M., Lech A. C-banding/DAPI and *in situ* hybridization reflect karyotype structure and sex chromosome differentiation in *Humulus japonicus* Siebold & Zucc // *Cytogenet. Genome Res.*, 2011. – Vol. 132. – P. 203–211.
- Guseinov V. A., Vanyushin B. F. Content and localisation of 5-methylcytosine in DNA of healthy and wilt – infected cotton plants // *Biochim. Biophys. Acta*, 1975. – Vol. 395, № 3. – P. 229–238.
- Kitimu S. R., Taylor J., March T. J. et al. Meristem micropropagation of cassava (*Manihot esculenta*) evokes genome-wide changes in DNA methylation // *Front. Plant Sci.*, 2015. – Vol. 6, № 590.
- Kobayashi S., Goto-Yamamoto N., Hirochika H. Retrotransposon – induced mutations in grape skin color // *Science*, 2004. – Vol. 304. – P. 982.
- Marconi G., Pace R., Traini A. et al. Use of MSAP markers to analyse the effects of salt stress on DNA methylation in rapeseed (*Brassica napus* var. *oleifera*) // *PLoS ONE*, 2013. – Vol. 8. – № e75597.
- Navajas-Pérez R., Schwarzacher T., de la Herrán R. et al. The origin and evolution of the variability in a Y-specific satellite-DNA of *Rumex acetosa* and its relatives // *Gene*, 2006. – Vol. 368. – P. 61–71.
- Orłowska R., Machczyńska J., Oleszczuk S. et al. DNA methylation changes and TE activity induced in tissue cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.) // *J. Biol. Res. (Thessalon)*, 2016. – Vol. 23, № 19.
- Rodríguez-López C. M., Wetten A. C., Wilkinson M. J. Progressive erosion of genetic and epigenetic variation in callus-derived cocoa (*Theobroma cacao*) plants // *New Phytol.*, 2010. – Vol. 186. – P. 856–868.
- Valledor L., Hasbún R., Meijón M. et al. Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2007. – Vol. 91. – P. 75–86.
- Wang Q., Wang L. An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection // *Plant Cell Rep.*, 2012. – Vol. 31. – P. 1535–1547.
- Wessler S. R. Turned on by stress. Plant retrotransposons // *Curr. Biol.*, 1996. – Vol. 6, № 8. – P. 959–961.
- Yilmaz S., Gozukirmizi N. Variation of retrotransposon movement in callus culture and regenerated shoots of barley // *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 2013. – Vol. 27, № 6. – P. 4227–4230.