

НАВАЛІХІНА А. Г.[✉], АНТОНЮК М. З., ТЕРНОВСЬКА Т. К.

Національний Університет «Києво-Могилянська Академія»,

Україна, 04655, м. Київ, вул. Сковороди, 2, e-mail: a.navalihina@gmail.com

[✉] a.navalihina@gmail.com

РОЛЬ кІРНК У РЕГУЛЯЦІЇ СТАБІЛЬНОСТІ ГЕНОМІВ ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ

Мета. Відмінність рівнів кІРНК від батьківських у рослин із гібридними геномами є причиною деметилування та активації регульованих цими молекулами транспозонів. Переміщення активних транспозонів – причина подальших перебудов у геномі. Інтрогресивні лінії *Triticum aestivum/Amblyopyrum muticum* є цитологічно стабільними, але в їхніх геномах відбуваються процеси генетичної та (чи) епігенетичної реструктуризації. Молекулярна природа цих процесів становить об'єкт нашого дослідження.

Методи. Рівні кІРНК у транскриптомах визначали методом small RNA-seq. Послідовності прочитувань вирівнювали до послідовностей повторюваних елементів для виявлення кІРНК.

Результати. Інтрогресивні лінії та амфідиплоїд, який використовували під час їхнього створення, мають варіабельний, порівняно із рекуррентним генотипом пшениці, вміст кІРНК; вони регулюють транспозони родин МІТЕ та САСТА. Для дванадцяти повторюваних послідовностей, переважно транспозонів САСТА, зниження рівня регуляторних кІРНК у інтрогресивних ліній є статистично значущим. Зниження рівня кІРНК у інтрогресивних ліній могло призвести до активації регульованих ними мобільних генетичних елементів. **Висновки.** Виявлена мінливість у рівнях кІРНК може бути ключовим фактором, що спричиняє зміни у геномі інтрогресивних ліній та амфідиплоїда – активацію транспозонів, зміни в рівнях метилування ДНК та зміни експресії генів. Зміни у рівнях кІРНК мають обов'язково досліджуватися в рослинах із геномом гібридного походження, які демонструють нестабільність на фенотипному рівні за ознаками, що вивчаються.

Ключові слова: кІРНК, транспозони, амфідиплоїд, інтрогресивні лінії.

Міжвидова гібридизація є чинником, який викликає низку змін у геномі новоствореного гібриду: геномні перебудови, видалення послідовностей, зміни профілів метилування, акти-

вацію транспозонів, зміну рівнів кІРНК та диференційну експресію генів [1–11]. Мінливість рівнів кІРНК у гібридів, порівняно із батьківськими видами, є основною причиною дестабілізації гібридного геному через зміни рівня метилування повторюваних послідовностей, зокрема МГЕ, які призводять до активації їхньої експресії [12–14]. Транспозиція активних МГЕ спричиняє подальші перебудови гібридного геному [15, 16].

Інтрогресивні лінії, що походять від схрещування пшениці м'якої сорту Аврора (рекуррентний генотип) та амфідиплоїда Авротіка (*Triticum aestivum/Amblyopyrum muticum*) є цитологічно стабільними [17]. Втім, у їхньому геномі відбуваються генетичні та епігенетичні зміни, наслідки яких відображені у змінах їхнього фенотипу, зокрема таких ознак морфології колоса як колір та опушення луски. Одним із факторів, які можуть спричинити зміни у геномі, є мінливість рівнів кІРНК, котрі є регуляторами експресії мобільних генетичних елементів (МГЕ). У цій роботі ми показуємо, що в інтрогресивних ліній та в амфідиплоїда Авротіка рівні кІРНК, що регулюють 12 повторюваних елементів, є нижчими, ніж у Аврори. Виявлені нами кІРНК могли викликати активацію регульованих ними МГЕ та спричинити генетичні та епігенетичні зміни у геномах амфідиплоїда та ліній.

Матеріали і методи

У роботі було використано такий рослинний матеріал: озима пшениця м'яка *T. aestivum* ($2n=6x=42$, AABBDD), сорт Аврора, геномно-заміщений амфідиплоїд Авротіка ($2n=6x=42$, AABBTT), який об'єднує тетраплоїдний компонент пшениці м'якої сорту Аврора (AABB) та геном TT *Amblyopyrum muticum*. Інтрогресивні лінії, отримані від схрещування Авротіки та Аврори: лінія Тіса 40.2/1, лінія Тіса 14.4/1 та лінія Тіса 8.2/1 (надалі Т40, Т14 та Т8 відповідно) [17].

Бібліотеки малих РНК створювали із загальної РНК, виділеної із лусок досліджуваних генотипів методом, описаним у [18]. Використовували набір NEXTFlex Small RNA-seq Kit v3 (Bioo Scientific, США), синтез проводили згідно з інструкціями виробника [19]. Секвенування бібліотек було здійснено на HiSeq2000 (Illumina, USA) компанією Genomed (Варшава, Польща). Для ідентифікації кіРНК прочитування, отримані після секвенування, вирівнювали до послідовностей повторюваних елементів із бази даних TREP

(<http://wheat.pw.usda.gov/ITMI/Repeats/flatfile.tot>) із використанням інструменту bowtie2 [20, 21]. Статистичний аналіз щодо порівняння кількості кіРНК у бібліотеках виконували із використанням алгоритму limma/voom [22].

Результати та обговорення

Бібліотеки малих РНК було створено із загальної РНК, виділеної із лусок п'яти зразків: пшениця м'яка (сорт Аврора), амфідиплоїд Авротіка та три рослини із інтрогресивних ліній, отриманих від схрещування Аврора х Авротіка (Т40, Т14 та Т8). У результаті секвенування створених бібліотек отримали 100,5 М прочитувань для п'яти генотипів (табл. 1). Розмір бібліотек, тобто кількість прочитувань у кожній із них, був різним для кожного із генотипів, варіювання розмірів було у межах 66,5 %. У результаті вирівнювання прочитувань бібліотек малих РНК до повторюваних послідовностей бази даних TREP було отримано 561 924 вирівнювань до 1319 повторів. Вирівняні до повторів послідовності вважають послідовностями кіРНК, оскільки саме цей тип малих РНК походить від

повторюваних послідовностей [23]. Частка виявлених кіРНК від загальної кількості прочитуваних у бібліотеках була невеликою і становила 0,55 %.

Для того, щоб порівнювати вміст кіРНК між бібліотеками, їхню кількість нормалізували до розмірів кожної із бібліотек до одиниць RPM (reads per million, прочитувань на мільйон). Нормалізована кількість кіРНК дуже відрізнялася для п'яти генотипів і варіювала у межах 115 %. Так, для Аврори було знайдено 1621 RPM кіРНК, а для Авротіки їхня кількість була вп'ятеро меншою. Рівень кіРНК у трьох рослин інтрогресивних ліній, порівняно із Аворою, був різним: у Т40 втричі менше кіРНК, ніж у Аврори, а у Т14 та Т8 їх більше, ніж у Аврори, в п'ять та в сім разів відповідно (табл. 1). Важливо, що при цьому кількість повторів, до яких вирівняні кіРНК, є майже однаковою для всіх генотипів і варіює у межах лише 13 %. Це означає, що в Авротіки та у ліній змінювалася кількість кіРНК на повторювану послідовність, а не загальна кількість регульованих послідовностей. Тож, певні повторювані послідовності мали меншу кількість регуляторних кіРНК у амфідиплоїда та в інтрогресивних ліній, що могло стати причиною їхнього деметилування, переведення в еухроматин та активації експресії.

Із 1319 повторюваних елементів із бази даних TREP, до яких було знайдено кіРНК, 1253 є мобільними генетичними елементами, із них 585 ретроелементів і 668 ДНК-транспозонів. Більшість транспозонів, до яких було знайдено кіРНК у бібліотеках малих РНК досліджуваних генотипів, належали до родин LTR, MITE та SACTA (рис. А).

Таблиця 1. Кількісна характеристика бібліотек за обсягом та вмістом кіРНК

Характеристики бібліотеки	Бібліотеки малих РНК				
	Аврора	Авротіка	Т40	Т14	Т8
Розмір бібліотеки, прочитувань	15 527 612	27 659 632	11 171 074	6 628 492	39 515 855
Кількість кіРНК, прочитувань	25176	8439	6948	52956	468405
Кількість кіРНК, RPM	1621	305	622	7989	11854
Кількість повторів, до яких вирівняно кіРНК	1113	931	871	1231	1038

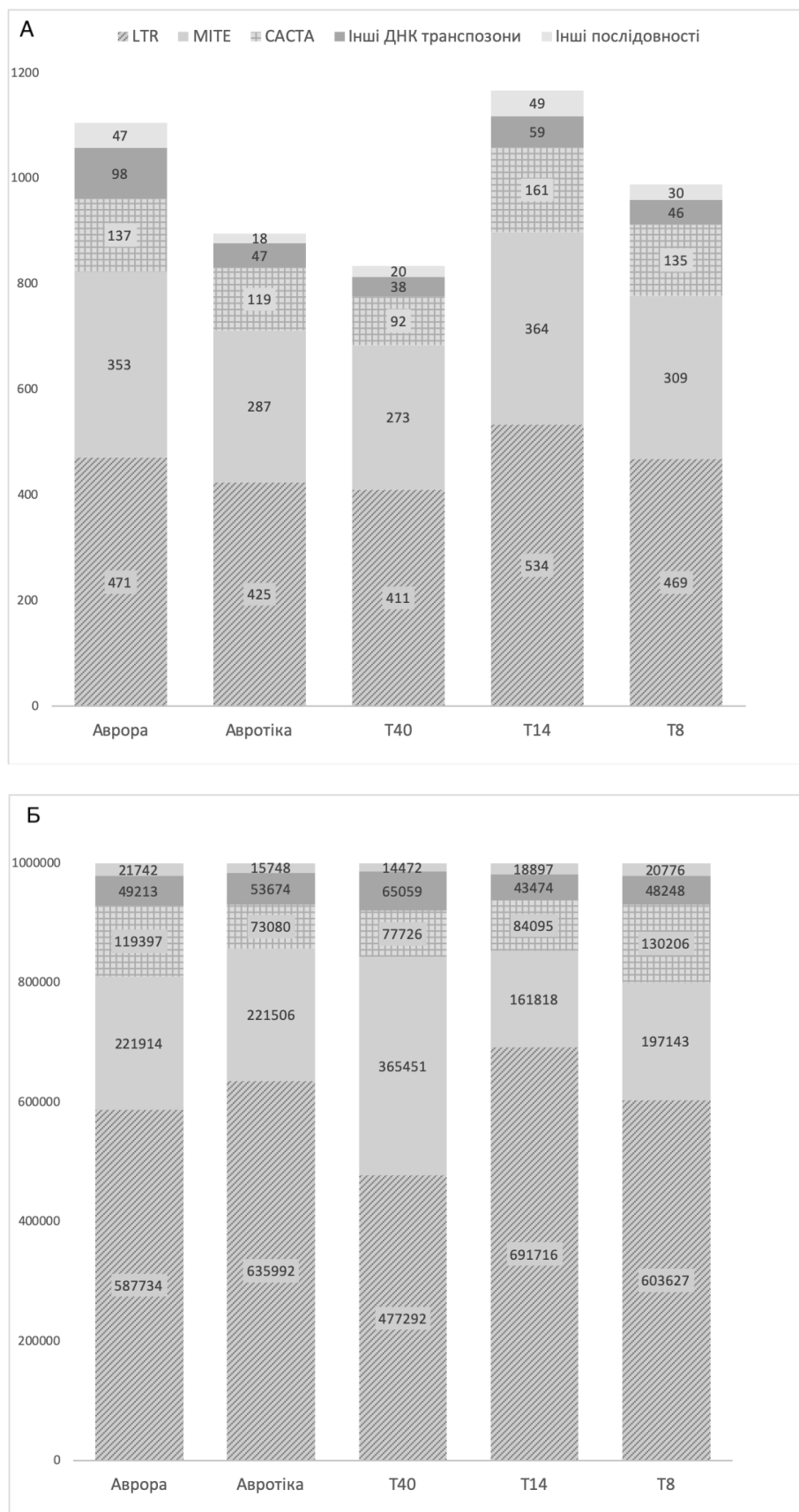


Рис. Поширеність різних класів МТЕ серед послідовностей, до яких було знайдено кіРНК у досліджених генотипів (А), та поширеність послідовностей кіРНК, що вирівняні до цих МТЕ, у бібліотеках малих РНК (Б).

Два типи транспозонів, LTR та MITE, склали до 80 % від усіх послідовностей до яких було знайдено кіРНК у бібліотеках досліджуваних генотипів. Якщо розглядати розподіл прочитувань, вирівняних до кожного із класів МГЕ, то кількість кіРНК, що належать транспозонам LTR та MITE, є навіть більшою і становить 80–85 % від усіх послідовностей кіРНК у кожного із п'яти генотипів (рис. Б). Такий розподіл та поширеність кіРНК від різних класів МГЕ відображає вміст цих послідовностей у геномі пшениці м'якої. Транспозони родини LTR, зокрема Gypsy та Sorja, складають приблизно 60 % від усіх послідовностей геному пшениці. Мобільні генетичні елементи MITE мають на два порядки менший відсоток вмісту від розміру геному пшениці, ніж ретротранспозони, що пов'язують із їхнім малим розміром. Утім, кількість копій цих транспозонів є великою, і це відображається на кількості кіРНК, що задіяні у їхній регуляції [24, 25].

Найбільша мінливість у рівнях кіРНК між генотипами спостерігається для послідовностей, що походять від MITE. Варіація кількостей цих кіРНК у п'яти досліджуваних генотипів досягає 33 % (рис. Б). Кількість кіРНК, що походять від MITE, у Аврори та Авротіки є однаковою, а у трьох інтрогресивних ліній вони відмінні від батьківських. Порівняно із Аворою, у T40 на 64 % більше кіРНК, що регулюють MITE, а у T14 та T8 – на 27 % та 11 % менше відповідно. Досить мінливими є також кількості кіРНК, що походять від транспозонів класу САСТА: у Авротіки та отриманих за її участю ліній T40 і T14 на 30–39 % менше цих послідовностей, ніж у Аврори.

Із метою виявлення повторюваних послідовностей, для яких є статистично значуща різниця у рівнях регуляторних кіРНК, кількості кіРНК у п'яти бібліотеках порівнювали із використанням алгоритму limma/voom [22]. Проводили два порівняння: кожен із батьківських генотипів ініціального схрещування (Авруру або Авротіку) порівнювали із групою з трьох похідних інтрогресивних ліній. Було з'ясовано, що між Авротікою та інтрогресивними лініями немає достовірної різниці між рівнями виявлених кіРНК. А за порівняння Аврори та інтрогресив-

них ліній було виявлено 12 повторюваних послідовностей, для яких різниця в рівнях кіРНК була статистично значущою (табл. 2). Із цих повторюваних послідовностей вісім належали до родини МГЕ САСТА, дві до LTR ретроелементів Cassandra, і були ще дві невідомі повторювані послідовності. Всі кіРНК, для яких було виявлено різницю в поширеності між Аворою та лініями, мають вищий рівень у Аврори. В Авротіки ці ж кіРНК також мали меншу поширеність порівняно із Аворою, хоча цей генотип знаходився поза розрахунками показників FDR та P-value за порівняння Аврори та ліній, для яких і було знайдено різницю.

Аналогічний приклад мінливості в експресії кіРНК вже було описано раніше на інтрогресивних лініях томата. При цьому було з'ясовано, що у лінії зміни рівнів цих малих регуляторних молекул призвели до зміни спектрів метилювання ДНК порівняно із батьками [11]. Можливо, що в інтрогресивних ліній та Авротіки також відбулося зниження рівня метилювання послідовностей транспозонів, які регулюються виявленими нами кіРНК. Зниження рівня метилювання могло призвести до активації цих транспозонів.

Висновки

Поширеність кіРНК, що регулюють активність різних класів МГЕ, у бібліотеках малих РНК пшениці м'якої сорту Аврора, амфідиплоїда Авротіка та інтрогресивних ліній корелює із поширеністю відповідних МГЕ у геномі пшениці м'якої. Найбільш поширеними є кіРНК, що походять від послідовностей MITE та LTR.

Для амфідиплоїда Авротіка та інтрогресивних ліній характерна мінливість рівнів кіРНК, що регулюють активність МГЕ родин САСТА та MITE (порівняно із Аворою). Зокрема, статистично значущим є зниження рівнів кіРНК, що регулюють вісім МГЕ родини САСТА та два – родини LTR. Зниження рівнів кіРНК може бути пов'язаним із деметилюванням регульованих МГЕ та їхньою активацією. У свою чергу активація МГЕ призводить до дестабілізації геномів, що реєструється нами як на молекулярному рівні, так і на рівні фенотипу.

Таблиця 2. Повторювані послідовності, для яких було виявлено різницю в поширенні регуляторних кіРНК у бібліотеках досліджуваних генотипів

Повторювана послідовність		Кількість прочитувань, RPM					FDR**	P value
Ідентифікатор із бази TREP	Анотація	Аврора	T40	T14	T8	Авротіка*		
gnl TREP TREP1801	ДНК транспозон, САСТА	11479	1151	1548	1979	1066	0,01	0,00003
gnl TREP TREP60	Тандемний повтор, ГАА	4449	0	359	128	0	0,01	0,00003
gnl TREP TREP1706	Неанотований тандемний повтор	1986	0	76	4	0	0,01	0,00003
gnl TREP TREP3433	ДНК транспозон, САСТА	1192	0	57	0	355	0,02	0,00008
gnl TREP TREP1543	ДНК транспозон, САСТА	1152	0	57	0	355	0,02	0,00008
gnl TREP TREP1542	ДНК транспозон, САСТА	1112	0	113	0	0	0,02	0,00009
gnl TREP TREP1400	Ретротранспозон, LTR	993	0	132	0	237	0,02	0,00012
gnl TREP TREP1541	ДНК транспозон, САСТА	953	0	57	0	237	0,02	0,00013
gnl TREP TREP3032	ДНК транспозон, САСТА	874	0	132	0	118	0,02	0,00017
gnl TREP TREP1650	Ретротранспозон, LTR	874	0	94	0	237	0,02	0,00016
gnl TREP TREP1544	ДНК транспозон, САСТА	874	0	57	0	237	0,02	0,00016
gnl TREP TREP2350	ДНК транспозон, САСТА	4369	0	510	421	0	0,03	0,00026

Примітки: *наведені значення P-value та FDR зазначені для порівняння Аврори та групи інтрогресивних ліній (T40, T14, T8). Авротіка не була охоплена цим порівнянням, значення експресії кіРНК у цього генотипу наводяться для приблизної оцінки; ** FDR – False Discovery Rate, показник, який використовується для корекції P-value за множинних порівнянь. Прийнятними вважаються значення $FDR \leq 0,05$.

References

- Liu B., Vega J. M., Segal G. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of Triticum and Aegilops. I. Changes in low-copy noncoding DNA sequences. *Genome*. 1998. Vol. 277. P. 272–277.
- Ozkan H., Levy A., Feldman M. Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *The Plant Cell*. 2001. Vol. 13, No. 8. P. 1735–1747.
- Shaked H., Kashkush K., Ozkan H. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. *The Plant Cell*. 2001. Vol. 13, No. 8. P. 1749–1759.
- Wang Y., Dong Z., Zhang Z. Extensive de Novo Genomic Variation in Rice Induced by Introgression From Wild Rice (*Zizania latifolia* Griseb.). *Genetics*. 2005. Vol. 170. P. 1945–1956.
- Wang G., Lv J., Zhang J. Genetic and Epigenetic Alterations of Brassica nigra Introgression Lines from Somatic Hybridization: A Resource for Cauliflower Improvement. *Front Plant Sci*. 2016. Vol. 7. P. 1–12.
- Liu B., Wendel J.F. Retrotransposon activation followed by rapid repression in introgressed rice plants. *Genome*. 2000. Vol. 880. P. 874–880.

7. Shan X., Liu Z., Dong Z. Mobilization of the active MITE transposons mPing and Pong in rice by introgression from wild rice (*Zizania latifolia* Griseb.). *Molecular biology and evolution*. 2005. Vol. 22, No. 4. P. 976–990.
8. Wang N., Wang H., Wang H. Transpositional reactivation of the Dart transposon family in rice lines derived from introgressive hybridization with *Zizania latifolia*. *BMC Plant Biology*. 2010. Vol. 10, No. 190. P. 1–15.
9. Liu Z., Wang Y., Shen Y. Extensive alterations in DNA methylation and transcription in rice caused by introgression from *Zizania latifolia*. *Plant Molecular Biology*. 2004. P. 571–582.
10. Shuwei L., Fei L., Kong L. Genetic and Epigenetic Changes in Somatic Hybrid Introgression Lines Between Wheat and Tall Wheatgrass. *Genetics*. 2015. Vol. 199. P. 1035–1045.
11. Shivaprasad P.V., Dunn R.M., Santos B.A. Extraordinary transgressive phenotypes of hybrid tomato are influenced by epigenetics and small silencing RNAs. *The EMBO Journal*. 2012. Vol. 31. P. 257–266.
12. Chen Z.J., Ni Z. Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *Bioessays*. 2006. Vol. 28, No. 3. P. 240–252.
13. Chen Z.J. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2007. Vol. 58. P. 377–406.
14. Jackson S., Chen Z.J. Genomic and expression plasticity of polyploidy. *Current opinion in plant biology*. 2010. Vol. 13, No. 2. P. 153–159.
15. Michalak P. Epigenetic, transposon and small RNA determinants of hybrid dysfunctions. *Heredity*. 2009. Vol. 102. P. 45–50.
16. Erdmann V., Barciszewski J. Non Coding RNAs in Plants. Berlin: Springer, 2011.
17. Iefimenko T.S., Antonyuk M.Z., Martynenko V.S. et al. Introgression of *Aegilops mutica* Genes into Common Wheat Genome. *Tsitologiya i Genetika*. 2018. Vol. 52, No. 1. P. 21–30.
18. Peng J., Xia Z., Chen L. Rapid and Efficient Isolation of High-Quality Small RNAs from Recalcitrant Plant Species Rich in Polyphenols and Polysaccharides. *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, No. 5. P. 12–14.
19. Bioo Scientific Corp. NEXTflex Small RNA-Seq Kit v3 / Bioo Scientific Corporation, 2016.
20. Wicker T., Matthews D.E., Keller B. TREP: a database for Triticeae repetitive elements. *Trends in Plant Science*. 2002. Vol. 7, No. 12. P. 561–562.
21. Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*. 2012. Vol. 9, No. 4. P. 357–359.
22. Law C.W., Chen Y., Shi W. voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome biology*. 2014. Vol. 15. P. 1–17.
23. Borges F., Martienssen R.A. The expanding world of small RNAs in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015. Vol. 16, No. 12. P. 727–741.
24. Wicker T., Gundlach H., Spannagl M. Impact of transposable elements on genome structure and evolution in bread wheat. *Genome biology*. 2018. Vol. 19, No. 1. P. 103.
25. Daron J., Glover N., Pingault L. Organization and evolution of transposable elements along the bread wheat chromosome 3B. *Genome biology*. 2014. Vol. 15, No. 12. P. 546.

NAVALIKHINA A.G., ANTONYUK M.Z., TERNOVSKA T.K.

National University of “Kyiv-Mohyla Academy”,

Ukraine, 04655, Kyiv, Skovorody str., 2, e-mail: a.navalihina@gmail.com

THE ROLE OF siRNAs IN GENOME STABILITY MAINTAINING IN THE BREAD WHEAT INTROGRESSION LINES

Aim. Deviations of the siRNAs levels from the parental ones in the plants with hybrid genomes are associated with the activation of transposable elements (TE). This, in turn, lead to the further genome rearrangements. Introgression lines *Triticum aestivum* / *Amblyopyrum muticum* are cytologically stable, however, there are visible signs of genetic and (or) epigenetic restructuring that are still going on. Molecular mechanisms of these processes are the subject of our study.

Methods. The levels of siRNAs in the plant lemmas were determined by small RNA-seq. Reads of the small RNA libraries were aligned to the repeats to find siRNA sequences. **Results.** Introgression lines (ILs) and parental amphidiploid have variable levels of siRNAs regulating MITE and CACTA transposable elements, compared with the parental bread wheat variety. For twelve TE sequences, majority of which are CACTA elements, decrease in the levels of siRNAs in ILs and amphidiploid, compared to the wheat, is statistically significant. Decreased siRNAs levels could lead to the activation of corresponding TE classes. **Conclusions.** Variation of siRNA levels in ILs and amphidiploid can be the key factor that cause rearrangements in their genomes. These include activation of TEs, changes in DNA methylation patterns, and gene expression variation. Therefore, detected changes in siRNA levels can be the molecular mechanisms of the processes that occur in studied hybrid genomes.

Keywords: siRNA, transposable elements, amphidiploid, introgression lines.