

Markery DNA oparte na retrotranspozonach

Wojciech BIENIEK

BIENIEK W. 2006. Retrotransposon-based DNA markers. *Wiadomości Botaniczne* 50(3/4): 15–24.

Retrotransposons – Class I mobile genetic elements, are the main group of dispersed repeated sequences in eukaryotic genomes. They transpose via RNA intermediate with the use of reverse transcriptase. Retrotransposition leads to an increase of the retrotransposon copy number in the host genome. Thus it generates genetic variation that may be revealed by retrotransposon-based DNA markers systems. The range of available techniques include S-SAP – a modification of the AFLP method that shows fragments length polymorphisms between restriction sites and retrotransposon terminal sequences, IRAP and REMAP – two similar methods revealing length polymorphisms of fragments lying between retrotransposons and between retrotransposon and SSR loci, respectively. These three techniques provide dominant markers, while RBIP codominant markers show whether the retrotransposon is present or absent in the particular locus. Main applications and problems related to use of these markers are also described.

KEY WORDS: DNA markers, genetic diversity, retrotransposons, S-SAP, IRAP, REMAP, RBIP.

Wojciech Bieniek, Instytut Botaniki im. W. Szafera, Polska Akademia Nauk, ul. Lubicz 46, 31-512 Kraków, e-mail: wbieniek@interia.pl

WSTĘP

Retrotranspozony to sekwencje w genomie zdolne do tworzenia własnych kopii w procesie odwrotnej transkrypcji i wstawiania ich w nowe loci. Każdy w pełni funkcjonalny retrotranspozon zawiera sekwencje kodujące białka oraz domeny niekodujące. Zarówno pierwsze, jak i drugie, niezbędne są do jego prawidłowej aktywności.

Retrotranspozony wraz z transpozonomi DNA i retrowirusami zaliczane są do ruchomych elementów genetycznych, czyli grupy sekwencji zdolnych do zmiany swego położenia w genomie. Mobilność ta jest cechą wyjątkową na tle pozostałych, z reguły statycznych, elementów genomu. Dzięki możliwości włączania swych kopii w różne loci retrotranspozony stały się

główną grupą rozproszonych sekwencji powtarzalnych.

Aktywność retrotranspozycyjna jest stymulowana przez rozmaite czynniki stresowe, a mutacje będące wynikiem wstawiania kopii retrotranspozonu w nowe miejsca w genomie mogą prowadzić do powstania genotypu odpornego na dany stres. Należy podkreślić, że w populacji mogą być utrwalone tylko mutacje, które zaszły w komórkach dających gamety i przekazane zostały potomstwu. Oprócz zmienności generowanej przez retrotranspozony można też mówić o wewnętrznym zróżnicowaniu samych retrotranspozonów. Jest ono wyrażone podziałem ich na grupy, tzw. rodziny. Podstawowym narzędziem badania zróżnicowania retrotranspozonów jest ich sekwencjonowanie. Natomiast techniki prezentowane w niniejszym artykule pozwalają

analizować zmienność genetyczną, która powstała w wyniku aktywności retrotranspozonów. Markery DNA generowane w oparciu o retrotranspozony są bardziej polimorficzne od markerów uzyskiwanych „tradycyjnymi” metodami (np.: RFLP, RAPD, AFLP) i w przeciwieństwie do nich prezentują zmienność wynikającą przede wszystkim z jednego, konkretnego procesu (retrotranspozycji). Metody badania zmienności w oparciu o retrotranspozony umożliwiają też badanie dynamiki aktywności tych elementów i jej wpływu na genom.

KLASYFIKACJA RETROTRANSPOZONÓW

Ruchome elementy genetyczne dzieli się na dwie klasy ze względu na rodzaj cząsteczek biorących udział w ich przemieszczaniu (transpozycji). Do Klasy I zalicza się tzw. retroelementy, czyli retrowirusy i retrotranspozony. Tworzą one stadium pośrednie w formie cząsteczki RNA i dopiero na jej matrycy syntetyzowana jest „potomna” cząsteczka DNA. Elementy zaliczane do Klasy II to transpozony DNA – w procesie ich transpozycji uczestniczy tylko cząsteczka DNA.

W obrębie retrotranspozonów wydzielone zostały dwie główne grupy ze względu na strukturę:

- retrotranspozony LTR – posiadają na swych końcach domeny zwane długimi powtórzeniami terminalnymi (ang. *long terminal repeats* = LTR);
- retrotranspozony non-LTR – pozbawione LTR.

Zróznicowanie sekwencji domen LTR jest kryterium klasyfikacji retrotranspozonów LTR w grupy zwane rodzinami. W obrębie rodzin retrotranspozonów sekwencje te cechują się dużą konserwatywnością.

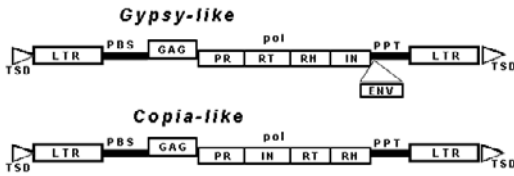
Podczas analizy zmienności genetycznej technikami opartymi na retrotranspozonach najczęściej wykorzystuje się sekwencje domen LTR. Istotą tych metod jest ukazanie polimorfizmu długości fragmentów DNA zawartych pomiędzy dwoma retrotranspozonami LTR, bądź też między retrotranspozonami LTR

a innymi sekwencjami w genomie. Wszystkie omówione poniżej metody wykorzystują PCR (*polymerase chain reaction*), która pozwala powielać fragmenty DNA o długości do kilku tysięcy nukleotydów przez syntezę nici DNA komplementarnej do nici matrycowej. Wykorzystywana w tym procesie polimeraza DNA jest w stanie kopiować DNA, dołączając nukleotydy do istniejącej już krótkiej sekwencji DNA. Takie fragmenty, które równocześnie wyznaczają miejsce początku amplifikacji w PCR, zwane są starterami. Aby w oparciu o retrotranspozon amplifikować przy użyciu PCR fragmenty reprezentujące sekwencje z jego bezpośredniego sąsiedztwa, należy zaprojektować startery komplementarne do terminalnych odcinków tego elementu. Najbardziej przydatne są konserwatywne sekwencje leżące jak najbliżej końców retrotranspozonu. Domeny LTR spełniają oba te warunki. Dzięki temu retrotranspozony LTR wykorzystywane są głównie do badania zmienności genetycznej przy użyciu technik opartych o PCR i ich właśnie dotyczą omawiane tutaj zagadnienia. W dalszej części artykułu retrotranspozony LTR zwane są retrotranspozonami, a skrót LTR oznacza tylko domeny (domenę) takiego retrotranspozonu.

STRUKTURA RETROTRANSPOZONÓW

Jak już zostało powiedziane, LTR są położone na końcach retrotranspozonu (Ryc. 1.). Biorą one udział we włączaniu kopii retrotranspozonu w nowe loci, ponieważ zawierają specyficzne sekwencje, z którymi łączy się enzym prowadzący ten proces (integraza). Ponadto LTR zawierając sekwencje promotorowe i terminatorowe, wyznaczają miejsca początku i końca transkrypcji retrotranspozonu. [Kolejne domeny to, patrząc ku środkowi retrotranspozonu, stykające się z LTR, sekwencje PBS (primer binding site) z jednej strony oraz PPT (polypurine tract) z drugiej, które są odpowiedzialne za rozpoczęcie syntezy nici cDNA na bazie mRNA (patrz Retrotranspozycja).]

Centralna część retrotranspozonu składa się z genów kodujących:



Ryc. 1. Struktura retrotranspozonów LTR z uwzględnieniem różnic pomiędzy grupami *copia-like* i *gypsy-like*. TSD – target site duplications, LTR – long terminal repeats, PBS – primer binding site, PPT polypurine tract, ENV – domena envelope, GAG – gen gag, pol – gen poliproteiny, zawierający sekwencje: proteazy (PR), odwrotnej transkryptazy (RT), RNazyH (RH), intergrazy (IN).

Fig. 1. Structure of LTR retrotransposons and differences between groups: the *copia-like* and the *gypsy-like*. TSD – target site duplications, LTR – long terminal repeats, PBS – primer binding site, PPT polypurine tract, ENV – envelope domain, GAG – gag gene, pol – gene of the polypeptide, including sequences of: the protease (PR), the reverse transcriptase (RT), the RNaseH (RH), the integrase (IN).

- proteazę (PR), enzym, który tnie powstałą w wyniku translacji poliproteinę na funkcjonalne jednostki;
- odwrotną transkryptazę (RT), która tworzy cDNA na matrycy RNA;
- RNazę H (RH), degradującą RNA po utworzeniu komplementarnej do niego nici cDNA w procesie odwrotnej transkrypcji;
- integrację (IN), która bierze udział w insercji kopii retrotranspozonu w nowym miejscu w genomie;
- białko GAG tworzące cząsteczkę „wirusopodobną” (ang. *virus-like particle*, VLP).

Produktem ekspresji wszystkich genów jest poliproteina gag-pol lub też powstają dwa oddzielne białka: gag i pol.

Retrotranspozony otoczone są sekwencjami TSD (*target site duplication*) o długości kilku par zasad (pz), które powstają w czasie insercji w nowym loci. Przedstawione na Ryc. 1 dwa podstawowe typy retrotranspozonów LTR: *gypsy-like* i *copia-like* różnią się kolejnością genów w pol oraz obecnością u *gypsy-like* domeny ENV kodującej białko wirusowe (Schulman et al. 2004, Saariaho 2006). Sprawia to, że retrotranspozony *gypsy-like* są strukturalnie bardzo podobne do retrowirusów. Świadczyć to

może o tym, iż retrotranspozony i retrowirusy pochodzą od wspólnego przodka.

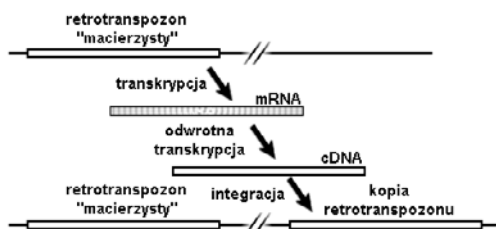
Mimo że retrotranspozony składają się z tych samych domen, to pomiędzy rodzinami retrotranspozonów istnieją często różnice długości elementów. Fakt ten wynika z obecności intronów, nie scharakteryzowanych jeszcze dodatkowych domen kodujących, czy też z różnicy w długości LTR. Elementy *BARE-1* (*barley retrotransposon 1*), jedna z najlepiej poznanych rodzin retrotranspozonów, opisana po raz pierwszy u *Hordeum vulgare*, mają długość 8,9 tys. pz, w tym każdy LTR 1,8 do 1,9 tys. pz (Vicient et al. 1999b). Przykładem dużego retrotranspozonu jest *Grande* opisany w rodzaju *Zea*. Jego długość wynosi 13,8 tys. pz, przy czym posiada stosunkowo krótkie sekwencje LTR (ok. 0,6 tys. pz) (Garcia-Martinez, Martinez-Izquierdo 2003). Inny bardzo duży retrotranspozon – *Ogre* – wykryty w genomie *Pisum sativum* wyróżnia się nie tylko długością (ok. 22 tys. pz, razem z wyjątkowo długimi LTR – po ok. 5 tys. pz), ale i nieco odmienną budową domeny kodującej (Neumann et al. 2003). Oprócz w pełni „samowystarczalnych” retrotranspozonów, w genomach mogą występować także elementy nieautonomiczne, jak na przykład LARDs (*large retrotransposon derivatives*) lub TRIM (*terminal-repeat retrotransposon in miniature*), które nie posiadają funkcjonalnej części kodującej (Antonius-Klemola et al. 2006, Kalendar et al. 2004).

RETROTRANSPOZYCJA

Proces powielania retrotranspozonu za pośrednictwem mRNA to retrotranspozycja. Składają się na nią następujące etapy (Ryc. 2):

- transkrypcja, czyli synteza RNA na matrycy retrotranspozonu;
- odwrotna transkrypcja, czyli przepisanie transkrypty RNA na cDNA;
- insercja (wstawienie) powstałej kopii retrotranspozonu w nowe locus.

Transkrypcja zachodzi w jądrach komórkowych z udziałem polimerazy RNA II. Następnie transkrypty są transportowane poza jądro, do cytoplazmy. Tam dochodzi do translacji,



Ryc. 2. Mechanizm retrotranspozycji prowadzi do zwiększenia ilości kopii retrotranspozonu w genomie.

Fig. 2. Mechanism of retrotransposition leads to increase of the retrotransposons' copy number in genome.

a z powstałych białek Gag formowane są cząsteczki „wiruso-podobne”. Do tych cząsteczek trafia transkrypt retrotranspozonu oraz enzymy odpowiedzialne za odwrotną transkrypcję i integrację. Proces odwrotnej transkrypcji zachodzi w cząsteczkach „wiruso-podobnych”. Gotowa kopia cDNA jest wprowadzana do jądra i tam przy pomocy integrazy włączana do genomu (Saarioho 2006). Każda kopia retrotranspozonu jest potencjalnym źródłem dalszych kopii. Przy dużej aktywności retrotranspozycji staje się ona głównym czynnikiem powiększania genomu. Retrotranspozycja może prowadzić do zmiany ekspresji genów, najczęściej ich wyłączenia, gdy kopia retrotranspozonu zostanie wstawiona w obrębie genu lub sekwencji regulatorowej.

Jeśli retrotranspozycja ma miejsce w komórkach dających gamety, to powstała zmiana w genomie może być przekazana potomstwu i utrwalona w populacji. Polimorfizm opisywanych tu markerów wynika z tych właśnie zmian. Retrotranspozony aktywowane są głównie różnymi czynnikami stresowymi, zarówno biotycznymi, jak i abiotycznymi, a ich działanie może sprzyjać powstaniu genotypu odpornego na dany stres na drodze przypadkowych mutacji (Wessler 1996, Melayah et al. 2001).

RETROTRANSPOZONY A GENOM

Retrotranspozony występują powszechnie we wszystkich genomach eukariotycznych i są tu główną grupą rozproszonych sekwencji powtarzalnych. Brak ich natomiast u prokaryota.

Na chromosomach rozmieszczone są równomiernie, z wyjątkiem centromerów, telomerów i organizatorów jąder (Vicent et al. 1999a, Waugh et al. 1997). W centromerach obecne są na ogół tylko określone rodziny retrotranspozonów i to w mniejszej proporcji niż inne rodziny w pozostałych regionach chromosomu (Jiang et al. 2003). Szczegółowe badania chromosomów wskazują, że dana rodzina retrotranspozonów wśród *Poaceae* może cechować się specyficznością dla centromerów, podczas gdy u *Arabidopsis thaliana* ta sama rodzina nie wykazuje tej własności (Langdon et al. 2000). Retrotranspozony i sekwencje z nich pochodzące w niektórych rodzajach stanowią nawet między 10% a 60% materiału genetycznego (*Vicia*, *Zea*, wielu przedstawicieli *Triticeae*). Można zaobserwować, że im większy genom tym większy udział posiadają w nim retrotranspozony (Pearce et al. 1996, Vicent et al. 2001, Schulman et al. 2004, Wendel, Wessler 2000). W genomie jęczmienia występuje kilkanaście tysięcy kopii retrotranspozonu *BARE-1*, u różnych przedstawicieli *Hordeum* stanowią one mogą od 0,8% do 5,7% genomu. Nawet u osobników w obrębie jednej populacji liczba kopii danego elementu może wykazywać zróżnicowanie. Obserwuje się silny polimorfizm liczby kopii retrotranspozonu w zależności od warunków środowiskowych (Vicent et al. 1999a, Wendel, Wessler 2000).

Każdy retrotranspozon zawiera dwie domeny LTR. Spodziewana proporcja liczby LTR do pełnych kopii elementu wynosi zatem 2:1. Vicent et al. (1999a) wykazali, że u przedstawicieli *Hordeum* proporcja LTR specyficznych dla *BARE-1* jest nawet kilkanaście razy większa. Świadczy to o tym, że istotną frakcją w genomach są często wolne fragmenty LTR (*solo LTR*). Powstają one w wyniku rozerwania retrotranspozonu w czasie rekombinacji lub insercji jednego ruchomego elementu w obrębie innego. W związku z użyciem w analizie zmienności genetycznej starterów PCR komplementarnych do LTR obecność dużej ilości *solo LTR* w genomie pozwala uzyskać wyższą liczbę produktów (markerów). Powielane są nie tylko fragmenty z bezpośred-

niego sąsiedztwa całych retrotranspozonów, ale i te, które przylegają do *solo LTR*.

MARKERY DNA

Markery DNA obok izoenzymów, białek strukturalnych i zapasowych zaliczane są do markerów molekularnych. Na potrzeby niniejszego opracowania najbardziej przydatna jest definicja markerów molekularnych wg Masojcia (2001) zawężona do markerów DNA, która określa je jako rozdzielane w polu elektrycznym fragmenty DNA, wykazujące polimorfizm genetyczny.

Pierwszą techniką analizy zmienności genetycznej z zastosowaniem markerów DNA jest opracowana w latach '70 XX w. RFLP (*restriction fragment length polymorphism*). Ukazuje ona zróżnicowanie wynikające z mutacji w obrębie sekwencji ciętych przez enzymy restrykcyjne oraz mutacji fragmentów zawartych pomiędzy tymi miejscami. Wprowadzenie techniki PCR pozwalającej na powielanie fragmentów DNA przyczyniło się do rozwoju kolejnych technik analizy zmienności genetycznej. Spośród nich do najszerzej stosowanych należą obecnie RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) (Williams et al. 1990) oraz AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) (Vos et al. 1995). RAPD polega na powielaniu fragmentów DNA zawartych pomiędzy dwoma przypadkowymi, identycznymi sekwencjami o długości 10 nukleo-

tydów. Polimorfizm markerów RAPD jest spowodowany mutacjami w obrębie tych sekwencji flankujących oraz różnicami w długości powielanych odcinków. Technika AFLP wykorzystująca enzymy restrykcyjne i PCR, łączy w sobie cechy dwóch wyżej wymienionych metod.

Dobre markery to markery, które są jednocześnie wysoce informatywne, wiarygodne i ekonomiczne. Powinny zatem cechować się silnym polimorfizmem, kodominującym charakterem dziedziczenia, wysoką frekwencją i równomiernym rozłożeniem w genomie, dużą powtarzalnością oraz prostą i szybką metodą wykrywania (Masojć 2001). Sam fakt, że retrotranspozony są zarówno elementami genomu, jak i jednym ze źródeł jego zróżnicowania, czyni je atrakcyjnym narzędziem badania zmienności genetycznej. Zróżnicowanie ukazane z ich użyciem wynika głównie z aktywności retrotranspozycyjnej, podczas gdy większość obecnie stosowanych technik ukazuje sumę zmienności powstałej na skutek retrotranspozycji i wielu innych procesów, takich jak mutacje punktowe, insercje, delecje, rekombinacja, itp. Zaletami retrotranspozonów są również duża frekwencja i równomierne rozłożenie w genomie. Ponadto prawie wszystkie insercje tych elementów są nieodwracalne, co oznacza, że retrotranspozon raz wstawiony w dane locus nie może być całkowicie z niego usunięty. Fakt ten daje markerom opartym na retrotranspozonach przewagę nad analizą polimorfizmów stanowiących zmiany

Tabela 1. Porównanie istotnych cech prezentowanych markerów. ¹ – zależy od liczby kopii retrotranspozonu w genomie, ² – w przypadku opracowania starterów dla konkretnego locus, ³ – w przypadku analizy opisanego locus.

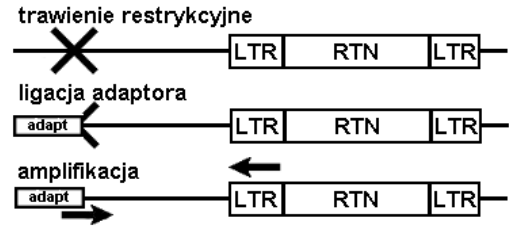
Table 1. Comparison of important characteristics of the presented marker systems. ¹ – depends on the copy number of retrotransposon in genome, ² – when nucleotide sequence of the analysed locus is not described, ³ – when the analysed locus has been sequenced.

Markery Marker system	Charakter dziedziczenia Inheritance	Specyficzność Specificity	Liczba obserwowanych loci Number of observed loci	Wydajność analizy w obrębie różnych gatunków ¹ Efficiency of analysis within different species	Wymagania techniczne i koszty analizy Technical requirements and costs of analysis
S-SAP	dominujące	wysoka	bardzo duża	duża	duże
IRAP	dominujące	średnia	do kilkudziesięciu	ograniczona	małe
REMAP	dominujące	średnia	duża	średnia	małe
RBIP	kodominujące	bardzo wysoka	1	duża	duże ² małe ³

odwracalne (do takich należą np. SNP – *single nucleotide polymorphism*, SSR – *simple sequence repeats*). Dzięki nieodwracalności retrotranspozycji wyniki otrzymane z analizy markerów wykorzystujących retrotranspozony są bardziej wiarygodne, zwłaszcza w badaniach filogenetycznych (Kumar, Hirochika 2001, Schulman et al. 2004). Pozostałe cechy poszczególnych technik zostały opisane poniżej oraz w Tab. 1.

PRZEGLĄD TECHNIK

S-SAP (*Sequence-Specific Amplified Polymorphism*) to technika będąca pochodną AFLP. Pozwala ona obserwować polimorfizm długości fragmentów zawartych między retrotranspozonom a miejscem restrykcyjnym. W oryginalnej procedurze DNA jest trawiona dwoma różnymi enzymami restrykcyjnymi, a w miejscach trawienia przyłączane są cząsteczki adaptorowe (proces przyłączania zwany jest ligacją), dla których zaprojektowane są startery. Podobnie jak w AFLP pierwsza seria PCR służy ograniczeniu puli produktów i amplifikowane są tu fragmenty zawarte pomiędzy cząsteczkami adaptorowymi. Druga seria PCR polega na powielaniu fragmentów zawartych między cząsteczką adaptorową a LTR wybranej rodziny retrotranspozonów (Ryc. 3). Gdy spodziewana liczba produktów jest duża stosuje się startery z tzw. nukleotydami selekcyjnymi, które ograniczą pulę produktów PCR. Zbyt duża liczba uzyskanych markerów sprawia, że niemożliwe jest ich wiarygodne odczytanie (Waugh et al. 1997). W przypadku niewielkiej liczby kopii retrotranspozonu w genomie lub gdy do trawienia stosuje się enzym rzadko-tnący, co owocuje mniejszą liczbą markerów, możliwe jest zastosowanie starterów bez nukleotydów selekcyjnych (Schulman et al. 2004). Rozdział produktów PCR odbywa się w żelach poliakrylamidowych. S-SAP jest obecnie najczęściej stosowaną techniką generowania markerów DNA, bazującą na retrotranspozonach. Wyniki badań przeprowadzonych na różnych gatunkach roślin i różnych rodzinach retrotranspozonów świadczą o tym, że cechuje ją wysoki polimorfizm markerów, wyższy niż w przypadku AFLP czy RAPD



Ryc. 3. Uproszczony schemat techniki S-SAP (*Sequence Specific Amplified Polymorphism*). Pominięto preamplifikację. Strzałki oznaczają startery PCR, krzyżyk – miejsce restrykcyjne, adapt – cząsteczka adaptorowa.

Fig. 3. Simplified description of S-SAP (*Sequence Specific Amplified Polymorphism*) analysis. Preamplification is omitted. Arrows represent primers, cross – restriction site, adapt – adaptor.

(Berenyi et al. 2002, Porceddu et al. 2002, Syed et al. 2005, Tam et al. 2005). Waugh et al. (1997) porównując techniką S-SAP na bazie *BARE-1* odmianę i linię hodowlaną jęczmienia, otrzymali średnio 36 markerów z każdej kombinacji starterów, uzyskując 26% polimorficznych produktów. Analiza tych samych obiektów techniką AFLP dała 19% markerów polimorficznych. Podobnie jak w AFLP wysoka powtarzalność i wydajność okupiona jest bardziej skomplikowaną metodyką i wyższymi kosztami analizy niż w przypadku pozostałych opisanych technik. Spowodowane jest to koniecznością prowadzenia trawienia restrykcyjnego, ligacji i dwóch etapów amplifikacji. Przed rozpoczęciem właściwej analizy konieczne jest też wykonanie testu starterów z różnymi nukleotydami selekcyjnymi, gdyż mają one duży wpływ na nasycenie profili prążkowych (Leigh et al. 2003).

Powstają modyfikacje S-SAP wykorzystujące retroelementy *non-LTR* (Prieto et al. 2005, Nagy et al. 2006). Do analizy zmienności sekwencji wewnątrz retrotranspozonu opracowano inną modyfikację S-SAP: jeden ze starterów projektowany jest dla genu *gag* w taki sposób, żeby powielone zostały fragmenty zawarte pomiędzy tym genem a miejscami restrykcyjnymi w obrębie domeny kodującej. Metodę tą nazwano RIVP (*Retrotransposon Internal Variation Polymorphisms*) (Vershinin, Ellis 1997).

IRAP (*Inter Retrotransposon Amplified Po-*

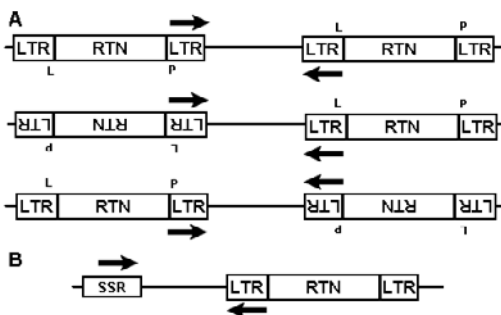
lymorphism) polega na powielaniu sekwencji zawartych pomiędzy dwoma retrotranspozonomi reprezentującymi tę samą rodzinę, leżącymi w odległości od kilkudziesięciu pz do kilku tysięcy pz. Dla każdej rodziny retrotranspozono- nów możliwe są tylko trzy kombinacje starterów odzwierciedlające trzy możliwe ustawienia frag- mentów względem siebie (Ryc. 4A): pomiędzy lewym i prawym LTR, pomiędzy dwoma lewymi LTR oraz między dwoma prawymi LTR. Każda z trzech amplifikacji dostarcza od kilku do kil- kunastu markerów. IRAP nie wymaga trawienia restrykcyjnego ani ligacji. Ogranicza się do prze- prowadzenia PCR, a rozdział produktów może odbywać się w żelach agarozowych (Kalendar et al. 1999).

Technika ta została opracowana z wyko- rzystaniem *BARE-1* dla *Hordeum vulgare*, w którego genomie oprócz licznych aktywnych kopii tych elementów występuje wiele sekwencji *solo LTR* (Kalendar et al. 1999, Vicient et al. 1999a). Metoda ta musi wykorzystywać rodziny retrotranspozono- nów występujące w dużej liczbie kopii, w przeciwnym razie jest ona mało wydaj- na. Oprócz jęczmienia IRAP ma zastosowanie dla innych traw oraz dla organizmów o podobnej strukturze genomów (Schulman et al. 2004). Ze

względem na wysoki polimorfizm markerów IRAP nie zaleca się jej stosowania do analiz na pozio- mie wyższym niż wewnątrzgatunkowy.

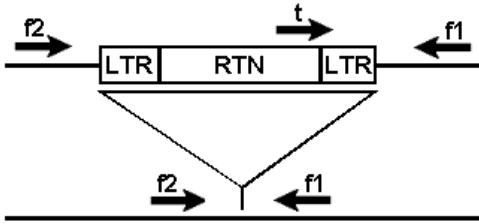
REMAP (*Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*) jest techniką polega- jącą na powielaniu fragmentów DNA zawartych pomiędzy LTR a sekwencjami mikrosatelitar- nymi (Ryc. 4B). Dzięki możliwości użycia róż- nych starterów mikrosatelitarnych pozwala ona uzyskać wiele profili prążkowych. Podobnie jak IRAP, REMAP została opracowana w oparciu o *BARE-1* dla jęczmienia (Kalendar et al. 1999). Obie techniki na ogół stosowane są równolegle, gdyż wykorzystują one te same startery kom- plementarne do LTR. Wymagania techniczne są identyczne jak przy IRAP. Podczas analizy profilu REMAP wskazane jest porównanie go z profilem ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) otrzymanym na bazie wykorzystanego startera mikrosatelitarnego. Markery ISSR uzyskuje się w wyniku PCR z użyciem jednego startera specyficznego dla sekwencji mikrosatelitarnych. Reprezentują one fragmenty DNA zawarte po- między loci mikrosatelitarnymi. Porównanie profilu REMAP i ISSR pozwala wyeliminować ewentualne markery ISSR powstałe podczas amplifikacji REMAP. Wysoki polimorfizm markerów REMAP ogranicza ich zastosowanie do poziomu wewnątrzgatunkowego, podobnie jak w przypadku IRAP.

RBIP (*Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism*) to technika, która pozwala na wykrywanie insercji retrotranspozono- w w konkretnym locus. Wykorzystywane są tu startery komplementarne do sekwencji otaczających locus, w które może być wstawiony retrotran- spon. Konieczność uzyskania sekwencji tych rejonów stanowi jej największą niedogodność. W mieszaninie reakcyjnej PCR muszą znaleźć się trzy startery (Ryc. 5): jeden specyficzny dla sekwencji retrotranspozono- w (t) i dwa kom- plementarne do sekwencji w jego otoczeniu (f1, f2). Jeśli w danym loci doszło do insercji retrotran- spozono- w zachodzi amplifikacja fragmentu między starterami t i f1, gdy brak insercji – powielany jest odcinek zawarty między starterami f1 i f2. Sekwencje starterów powinny być tak dobrane,



Ryc. 4. Trzy warianty IRAP (*Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism*) (A), REMAP (*Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*) (B). Strzałki oznaczają startery PCR; L i P – odpowiednio lewą i prawą sekwencję LTR; SSR – sekwencję mikrosatelitarną.

Fig. 4. Three variants of IRAP (*Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism*) (B), REMAP (*Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*) (C). Arrows represent primers; L and P – left and right LTR, respectively; SSR – microsatellite locus.



Ryc. 5. Schemat metody RBIP (*Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism*). RTN – retrotranspozon z długimi powtórzeniami terminalnymi (LTR), strzałki oznaczają startery: specyficzny dla retrotranspozonu (t) i komplementarne do sekwencji flankujących badane loci (f1 i f2).

Fig. 5. RBIP (*Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism*) method. RTN – retrotranspozon with long terminal repeats (LTR), arrows represent primers: specific to retrotransposon (t) and complementary to the flanks of the loci (f1 i f2).

żeby produkty amplifikacji pary t/f1 miały różną długość od produktów f1/f2. Dzięki temu po elektroforezie w żelu agarozowym prążki reprezentujące fragmenty powstałe na bazie starterów t/f1 leżą na innej wysokości niż prążki utworzone z produktów pary f1/f2. Charakter techniki RBIP jest porównywalny z analizą SSR (Flavell et al. 1998, Schulman et al. 2004).

ZASTOSOWANIA

Opisane techniki znajdują takie same zastosowania jak inne markery DNA. Są więc stosowane do analizy zmienności oraz zależności filogenetycznych w obrębie i między liniami hodowlanymi, odmianami i gatunkami (np. Antonius-Klemola et al. 2006, Nagy et al. 2006, Pearce et al. 2000, Pereira et al. 2006, Porceddu et al. 2002, Queen et al. 2004, Smykal 2006, Syed et al. 2005, Tam et al. 2005); do analizy przepływu genów (Prieto et al. 2005); w mapowaniu genów (Maninen et al. 2000). Specyfika markerów opartych na retrotranspozonach pozwala wykorzystać je w badaniu procesu retrotranspozycji i jego wpływu na genom gospodarza (np. Berenyi et al. 2002, Garcia-Martinez, Martinez-Izquierdo 2003, Kalendar et al. 2000, Waugh et al. 1997). Należy zwrócić uwagę, że zdecydowana

większość materiału objętego cytowanymi badaniami to gatunki uprawne lub pokrewne im gatunki dzikie.

PROBLEMY

KONIECZNOŚĆ IZOLACJI SEKWENCJI RETROTRANSPOZONOWYCH

Powszechnie stosowane metody RAPD i AFLP umożliwiają prowadzenie analiz bez konieczności izolacji sekwencji genomowych. Omówione wyżej techniki wymagają poznania sekwencji LTR, rzadziej innych fragmentów retrotranspozonu, specyficznych dla rodzin retrotranspozonów występujących w genomie danego gatunku, w celu projektowania starterów PCR. Stosunkowo prostą metodykę pozyskiwania sekwencji LTR w oparciu o znane, konserwatywne sekwencje regionu kodującego retrotranspozonów przedstawili Pearce et al. (1999). Należy się spodziewać, że rodziny retrotranspozonów na ogół nie wykazują specyficzności tylko dla gatunków czy rodzajów. Wspominana wielokrotnie rodzina *BARE-1* została zlokalizowana w genomach wielu przedstawicieli *Triticeae*, a także u *Avena* i *Oryza* (Vicent et al. 1999a, Vicent et al. 2001). U *Solanaceae* Tam et al. (2005) z powodzeniem przeprowadzili analizę zróżnicowania S-SAP hodowlanych linii dwóch różnych gatunków, wykorzystując tą samą rodzinę retrotranspozonów. Badania nad dystrybucją rodzin retrotranspozonów u różnych taksonów powinny z czasem ułatwić wykorzystywanie sekwencji pozyskanych z jednego gatunku do analiz w obrębie innych gatunków. Warto zauważyć, że potrzebnych sekwencji retrotranspozonowych można też szukać w bazach danych, np.: Repbase (<http://www.girinst.org/repbase/>) lub TIGR (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/plant.repeats/>).

AKTYWNOŚĆ RETROTRANSPOZONU A JEGO PRZYDATNOŚĆ DO BADAŃ

Obecnie obserwuje się w genomach zarówno elementy aktywne retrotranspozycyjnie, jak i nieaktywne. Vicent et al. (2001) wykazali obecność retrotranspozonów w genomach roślin

jednoliściennych i dwuliściennych, podkreślając ich wysoką frekwencję i aktywność u traw na przykładzie *BARE-1*. Aktywne retrotranspozony są przydatnym narzędziem do badania różnicowania populacji pod wpływem warunków środowiskowych (Kalendar et al. 2000). W badaniach filogenetycznych istotne jest, kiedy w trakcie ewolucji badanego taksonu wykorzystywana rodzina retrotranspozonów wykazywała aktywność. Jeśli analizy takie zostaną oparte na rodzinie retrotranspozonów, która była aktywna tylko po rozdzieleniu taksonów, nie przyniosą one informatywnych wyników. Kolejność, w jakiej rodziny retrotranspozonów były aktywne, może być prześledzona na podstawie insercji jednych elementów w obrębie innych retrotranspozonów. Rodzina retrotranspozonów, które są rozerwane przez insercje przedstawicieli innej rodziny, była aktywna wcześniej niż retrotranspozony wstawiane. Dobór odpowiedniej rodziny retrotranspozonów do charakteru badań wiąże się z koniecznością porównania wyników uzyskanych na bazie różnych rodzin w rozważanym kontekście. Leigh et al. (2003) porównywali profile S-SAP, IRAP i REMAP uzyskane w oparciu o sześć różnych rodzin retrotranspozonów *Hordeum vulgare*, natomiast Pearce et al. (2000) analizowali zmienność S-SAP pomiędzy gatunkami *Pisum* w oparciu o pięć różnych rodzin retrotranspozonów.

PODZIĘKOWANIA. Składam serdeczne podziękowanie dr Dariuszowi Grzebelusowi za konsultacje dotyczące tematyki poruszonej w niniejszym artykule.

LITERATURA

- ANTONIUS-KLEMOLA K., KALENDAR R., SCHULMAN A. H. 2006. TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports. *Theor. Appl. Genet.* **112**(6): 999–1008.
- BERENYI M., GICHUKI T., SCHMIDT J., BURG K. 2002. Ty1-copia retrotransposon-based S-SAP (sequence-specific amplified polymorphism) for genetic analysis of sweet potato. *Theor. Appl. Genet.* **105**(6–7): 862–869.
- FLAVELL A. J., KNOX M. R., PEARCE S. R., ELLIS T. H. 1998. Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis. *Plant J.* **16**(5): 643–650.
- GARCIA-MARTINEZ J., MARTINEZ-IZQUIERDO J. A. 2003. Study on the evolution of the *Grande* retrotransposon in the *Zea* genus. *Mol. Biol. Evol.* **20**(5): 831–841.
- JIANG J., BIRCHLER J. A., PARROTT W. A., DAWE R. K. 2003. A molecular view of plant centromeres. *Trends in Plant Science* **8**(12): 570–575.
- KALENDAR R., GROB T., REGINA M., SUONIEMI A., SCHULMAN A. H. 1999. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theor. Appl. Genet.* **98**: 704–711.
- KALENDAR R., TANSKANEN J., IMMONEN S., NEVO E., SCHULMAN A. H. 2000. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by *BARE-1* retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**(12): 6603–6607.
- KALENDAR R., VICIENT C. M., PELEG O., ANAMTHAWAT-JONSSON K., BOLSHOY A., SCHULMAN A. H. 2004. Large retrotransposon derivatives: abundant, conserved but nonautonomous retroelements of barley and related genomes. *Genetics* **166**: 1437–1450.
- KUMAR A., HIROCHIKA H. 2001. Applications of retrotransposons as genetic tools in plant biology. *Trends in Plant Sc.* **6**(3): 127–134.
- LANGDON T., SEAGO C., MENDE M., LEGGETT M., THOMAS H., FORSTER J. W., THOMAS H., JONES R. N., JENKINS G. 2000. Retrotransposon Evolution in Diverse Plant Genomes. *Genetics* **156**: 313–325.
- LEIGH F., KALENDAR R., LEA V., LEE D., DONINI P., SCHULMAN A. H. 2003. Comparison of the utility of barley retrotransposon families for genetic analysis by molecular marker techniques. *Mol. Genet. Genomics* **269**(4): 464–474.
- MANINEN O., KALENDAR R., ROBINSON J., SCHULMAN A. H. 2000. Application of *BARE-1* retrotransposon markers to the mapping of major resistance gene for net blotch in barley. *Mol. Gen. Genet.* **264**: 325–334.
- MASOJC P. 2001. Ustalanie tożsamości genetycznej. W: S. MALEPSZY (red.), *Biotechnologia Roślin*. PWN, Warszawa, s. 485–519.
- MELAYAH D., BONNIVARD E., CHALHOUB B., AUDEON C. LE GRANDBASTIEN M.-A. 2001. The mobility of the tobacco Tnt1 retrotransposon correlates with its transcriptional activation by fungal factors. *Plant J.* **28**(2): 159–168.
- NAGY E. D., MOLNAR I., SCHNEIDER A., KOVACS G., MOLNAR-LANG M. 2006. Characterization of chromosome-specific S-SAP markers and their use in studying genetic diversity in *Aegilops* species. *Genome* **49**(4): 289–296.
- NEUMANN P., POZARKOVA D., MACAS J. 2003. Highly abundant pea LTR retrotransposon *Ogre* is constitutively transcribed and partially spliced. *Plant Mol. Biol.* **53**: 399–410.

- PEARCE S. R., HARRISON G., LI D., HESLOP-HARRISON J. S., KUMAR A., FLAVELL A. J. 1996. The Ty1-copia group retrotransposons in *Vicia* species: copy number, sequence heterogeneity and chromosomal localization. *Mol. Gen. Genet.* **250**: 305–315.
- PEARCE S. R., STUART-ROGERS C., KNOX M. R., KUMAR A., ELLIS T. H., FLAVELL A. J. 1999. Rapid isolation of plant TY1-copia group retrotransposon LTR sequences for molecular marker studies. *Plant J.* **19**(6): 711–717.
- PEARCE S. R., KNOX M. R., ELLIS T. H., FLAVELL A. J., KUMAR A. 2000. Pea Ty1-copia group retrotransposons: transpositional activity and use as markers to study genetic diversity in *Pisum*. *Mol. Gen. Genet.* **263**(6): 898–907.
- PEREIRA H. S., BARAO A., DELGADO M., MORAIS-CECILIO L., VIEGAS W. 2006. Genomic analysis of Grapevine Retrotransposon 1 (Gret 1) in *Vitis vinifera*. *Theor. Appl. Genet.* **111**(5): 871–878.
- PORCEDDU A., ALBERTINI E., BARCACCIA G., MARCONI G., BERTOLI F. B., VERONESI F. 2002. Development of S-SAP markers based on an LTR-like sequence from *Medicago sativa* L. *Mol. Genet. Genomics* **267**(1): 107–114.
- PRIETO J. L., POUILLY N., JENCZEWSKI E., DERAGON J. M., CHEVRE A. M. 2005. Development of crop-specific transposable element (SINE) markers for studying gene flow from oilseed rape to wild radish. *Theor. Appl. Genet.* **111**(3): 446–455.
- QUEEN R. A., GRIBBON B. M., JAMES C., JACK P., FLAVELL A. J. 2004. Retrotransposon-based molecular markers for linkage and genetic diversity analysis in wheat. *Mol. Genet. Genomics* **271**(1): 91–97.
- SAARIAHO M.-H. 2006. Characterization of the molecular components and function of the BARE-1, Hin-Mu and Mu transposition machineries. Dissertationes bioscientiarum molecularium Universitatis Helsingiensis in Viikki. 14/2006.
- SCHULMAN A. H., FLAVELL A. J., ELLIS T. H. 2004. The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants. W: W. J. MILLER, P. CAPY (red.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 260: Mobile Genetic Elements. Humana Press, Totowa, New Jersey, s. 145–171.
- SMYKAL P. 2006. Development of an efficient retrotransposon-based fingerprinting method for rapid pea variety identification. *J. Appl. Genetic.* **47**(3): 221–230.
- SYED N. H., SURESHSUNDAR S., WILKINSON M. J., BHABH S., CAVALCANTI J. J., FLAVELL A. J. 2005. Ty1-copia retrotransposon-based S-SAP marker development in cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Theor. Appl. Genet.* **110**(7): 1195–202.
- TAM S. M., MHIRI C., VOGELAAR A., KERKVELD M., PEARCE S. R., GRANDBASTIEN M. A. 2005. Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based S-SAP, AFLP and SSR. *Theor. Appl. Genet.* **110**(5): 819–831.
- VERSHININ A.V., ELLIS T. H. 1997. Heterogeneity of the internal structure of *PDR1* a family of Ty1-copia-like retrotransposons. *Mol. Gen. Genet.* **262**: 703–713.
- VICIENT C. M., SUONIEMI A., ANAMTHAWAT-JONSSON K., TANSKANEN J., BEHARAV A., NEVO E., SCHULMAN A. H. 1999a. Retrotransposon BARE-1 and its role in genome evolution in the genus *Hordeum*. *The Plant Cell* **11**: 1769–1784.
- VICIENT C. M., KALENDAR R., ANAMTHAWAT-JONSSON K., SUONIEMI A., SCHULMAN A. H. 1999b. Structure, functionality, and evolution of the BARE-1 retrotransposon of barley. *Genetica* **107**: 53–63.
- VICIENT C. M., JAASKELAINEN M. J., KALENDAR R., SCHULMAN A. H. 2001. Active retrotransposons are a common feature of grass genomes. *Plant Physiol.* **125**: 1283–1292.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN-DE-LEE T., HORNES M., FRITERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M., ZABEAU M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* **23**: 4407–4414.
- WAUGH R., MCLEAN K., FLAVELL A. J., PEARCE S. R., KUMAR A., THOMAS B. B. T., POWELL W. 1997. Genetic distribution of BARE-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Mol. Gen. Genet.* **253**: 687–694.
- WILLIAMS J. G. K., KUBELIK A. R., LIVAK K. J., RAFALSKI J. A., TINGEY S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* **18**: 6531–6535.
- WENDEL J. F., WESSLER S. R. 2000. Retrotransposon-mediated genome evolution on a local ecological scale. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**(12): 6250–6252.
- WESSLER S. R. 1996. Plant retrotransposons: Turned on by stress. *Current Biology* **6**(8): 959–961.