

СТРУКТУРА МЕЖГЕННОГО СПЕЙСЕРА IGS1 РИБОСОМНОГО ОПЕРОНА МХОВ РОДА *Schistidium**

© 2015 И.А. Милютин^{1**}, Е.А. Игнатова², М.С. Игнатов³,
Д.В. Горюнов¹, А.В. Троицкий¹

¹ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119991 Москва; факс: +7(495)939-3181,
электронная почта: iramiliutina@yandex.ru, bobr@belozersky.msu.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва;
электронная почта: arctoa@list.ru

³ Главный ботанический сад РАН, 127276 Москва,
ул. Ботаническая, 4; электронная почта: misha_ignatov@list.ru

Поступила в редакцию 08.07.15

Изучена структура межгенового спейсера 1 (IGS1) рибосомного оперона 12 видов мхов рода *Schistidium*. В последовательности IGS1 у этих видов выделены три консервативные области и две области повторов (GC- и A-богатые). На 5'-конце IGS1 находится консервативный пиримидин-богатый мотив, общий с другими исследованными мхами. В консервативных областях найдены видоспецифичные нуклеотидные замены и инсерции. Повторяющиеся единицы повторов имеют единичные нуклеотидные замены, благодаря которым большинство повторяющихся единиц уникальны. Положение таких повторов в IGS1 видоспецифично, но их число может варьировать внутри вида и между оперонами одного образца. Сравнение последовательностей IGS1 видов *Schistidium* и представителей десяти других родов мхов показало наличие общих консервативных мотивов со сходной локализацией. Предположительно, эти мотивы являются элементами терминации транскрипции пре-рРНК и процессинга рРНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рДНК, IGS, межгеновый спейсер, консервативные мотивы, мхи.

У эукариот гены рРНК образуют мультигенные семейства, состоящие из тандемно расположенных повторяющихся единиц, число которых сильно варьирует (от нескольких сотен до нескольких тысяч). Одна повторяющаяся единица включает гены 18S, 5,8S и 26S рРНК, разделенные транскрибируемыми спейсерами ITS1 и 2 и межгеновым спейсером IGS (intergenic spacer). В зависимости от локализации генов 5S рРНК выделяют два типа организации рибосомного оперона [1]. Если гены 5S рРНК формируют отдельные кластеры, то такой тип организации рибосомных генов называется S-типом (separation). Для ранних наземных растений, к кото-

рым относятся мхи, характерен L-тип (linkage) рибосомного оперона, признаком которого является включение гена 5S рРНК в межгеновый спейсер. Ген 5S рРНК разделяет спейсер на две части – IGS1, находящийся между генами 26S и 5S рРНК, и IGS2, который находится между генами 5S и 18S рРНК. IGS1 содержит элементы, необходимые для терминации транскрипции и процессинга. Подавляющая часть работ по изучению IGS растений выполнена для покрытосеменных, имеющих S-тип строения рибосомного оперона [2–7]. В большинстве из них исследована 3'-концевая область IGS, включающая промотор и 5'-ETS (5'-external transcribed spacer). У мхов область IGS изучена мало. Полные последовательности межгенового спейсера получены только для двух видов из семейства Funariaceae. Более полно исследована область IGS1 – в GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) депонированы последовательности десяти видов мхов, хотя структура этих последовательностей детально не описана [1]. Целью данной работы являлось изу-

Принятые сокращения: IGS1 – межгеновый спейсер 1 рибосомного оперона, п.н. – пары нуклеотидов, н.о. – нуклеотидные остатки.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM15-232, 27.09.2015.

** Адресат для корреспонденции.

чение особенностей структуры IGS1 рибосомного оперона верхлодного мха рода *Schistidium*, у которого ранее нами была исследована структура ITS1 и филогения рода по последовательностям ITS1–2 и участкам хлоропластного генома [8, 9]; описание меж- и внутривидового полиморфизма области IGS1 представителей этого рода; проведение сравнительного анализа IGS1 мхов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определены 33 последовательности IGS1 из 12 видов *Schistidium*. Ниже приводится список видов *Schistidium*, числа в скобках обозначают количество изученных популяций: *S. apocarpum* (3), *S. elegantulum* (2), *S. canadense* (2), *S. lancifolium* (1), *S. holmenianum* (1), *S. andreaeopsis* (2), *S. boreale* (3), *S. dupretii* (2), *S. rivulare* (2), *S. pulchrum* (8), *S. frigidum* (3), *S. succulentum* (2).

ДНК выделяли с помощью набора NucleoSpin Plant Extraction Kit («Macherey-Nagel», Германия). Для амплификации использованы праймеры, комплементарные 3'-концевой области гена 26S рРНК и гену 5S рРНК – 26dR2 (прямой) GAGATGAATCCTTTGCAGACG и 5S(r)R2 (обратный) GAGTTCTGATGGGATCYGGTG. Условия амплификации: начальная денатурация 94° – 3 мин; далее 30 циклов: 94° – 20 с, 62° – 20 с, 72° – 1 мин 20 с; заключительная элонгация – 5 мин. Амплификация проводилась с помощью набора Encyclo Plus PCR Kit (ООО «Евроген», Россия). После препаративного электрофореза в 1%-ном агарозном геле фрагменты ДНК были вырезаны и очищены с помощью набора Min Elute Gel Extraction Kit («Qiagen», США). Большая часть ПЦР-продуктов секвенирована без клонирования. Гетерогенные матрицы клонированы в вектор pTZ57R/T с помощью набора Thermo Scientific Ins TAclone PCR Cloning Kit («Thermo Scientific», США). Для секвенирования помимо концевых праймеров использовались внутренние праймеры – 26(F3) ACTCCAGGGTGCCCGCCC, 26S(r) CCTATGTGATCTCATTCCTCAA и 26S(R2) AYANNYAУСТТАТТТ-ТУГААСМСС. Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 («Life Technologies», США) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (США) в ЦКП «Геном» Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта. Полученные последовательности депонированы в GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) под номерами KT246290–246292, 273589–273617.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Структура последовательностей IGS1 *Schistidium*.

На 3'-конце гена 26S рРНК у видов *Schistidium* найдены две трансверсии (А→С и С→А) по сравнению с последовательностями гена 26S рРНК других мхов. IGS1 начинается с пиримидин-богатого мотива TACCTCCCC(C) (рис. 1, представлены только три последовательности из 33).

Длина последовательностей IGS1 у видов *Schistidium* варьирует от 1120 до 1446 п.н. В этих последовательностях можно выделить пять областей – три сравнительно консервативные, мало отличающиеся по длине, и две области повторов (рис. 1).

Первая консервативная область примыкает к 3'-концу гена 26S рРНК (позиции 1–224 выравнивания на рис. 1). Ее длина варьирует незначительно – от 214 до 226 п.н. В этой области есть две точные копии мотива TCCAGGGTGC (позиции 23–31 и 107–115) и вырожденный повтор CTCARCACTTGG (позиции 65–77)/CTC-SSACRC-TTGG (позиции 138–150). После второго повтора следует олиго-А участок из 6 п.н. Различия в размере последовательностей в этой области определяются небольшими вставками и длиной мононуклеотидных мотивов. Последовательность олиго-Т, характерная для участков терминации транскрипции, в этой области отсутствует, но есть два пиримидин-богатых участка: CCCRYCCTCY на расстоянии 105–113 п.н. от начала IGS1 и CTYTCCTTTC на расстоянии 44 п.н. от начала IGS1 в 21 из 33 изученных последовательностей. У остальных образцов в этом участке находится последовательность GTCTS.

За первой консервативной областью находится область GC-богатых повторов. Ее длина варьирует от 104 до 350 п.н., что в значительной степени определяет различие длин IGS1 у разных видов. У одного образца *S. andreaeopsis* область GC-богатых повторов отсутствовала. Содержание GC в этом участке колеблется от 73,58 до 81,25%.

За GC-богатыми повторами находится короткая вторая консервативная область из 40–44 п.н. (позиции 553–598 выравнивания на рис. 1). В этой области найден консервативный мотив CC(G/T)-ATATCGG (позиции 562–572). Этот мотив отсутствует в последовательностях IGS1 трех популяций *S. frigidum* и *S. holmenianum* (образец 137).

За второй консервативной областью следует участок А-богатых повторов. Его длина также существенно различается у разных видов (133–298 п.н.). Содержание аденина в повторах составляет 42,86–51,37%.

Третья консервативная область длиной 544–598 п.н. (начинается с позиции 927 выравнивания на рис. 1) находится между А-богатыми

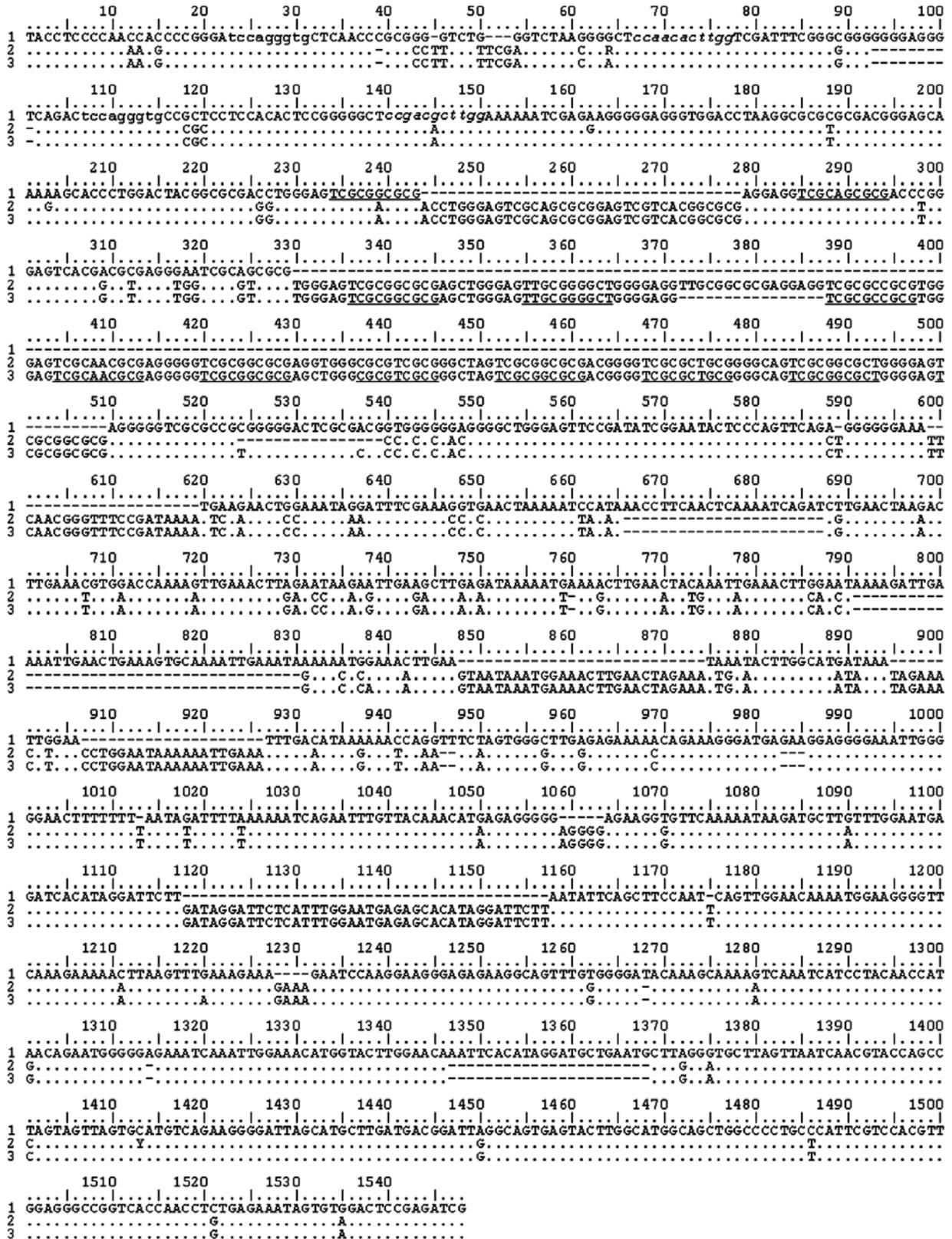


Рис. 1. Последовательности IGS1 двух видов *Schistidium*: 1 – *S. apocarpum* 129, 2 – *S. pulchrum* 322, 3 – *S. pulchrum* 325. Строчными буквами обозначены консервативные мотивы в IGS1 *Schistidium*, найденные также в последовательностях других мхов. Элементы B-повторов подчеркнуты

повторами и геном 5S рРНК. Различия в длине этого участка связаны с наличием дупликаций коротких нуклеотидных мотивов (до 24 п.н.), видоспецифичных коротких инсерций и разным числом мононуклеотидов. В этой области находится единственный в IGS1 поли-Т мотив СТТТТТ-ТТ(Т). У *S. succulentum* он укорочен до СТТ.

Структура области GC-богатых повторов. Среди GC-богатых повторов можно выделить три основных повторяющихся элемента: *A*) 9–10-нуклеотидный мотив ASSYGGG(G)AG, *B*) 10-нуклеотидный мотив TYRYRVSBRBR (в некоторых последовательностях в варианте *B* на 5'-конце добавляется триплет TCG) и *C*) 5–6-нуклеотидный пурин-богатый мотив RGGRRG.

Во всех изученных последовательностях повторяющиеся элементы *B* чередуются с элементами *A* или *C* (или неполными элементами *A* и *C*). Эти короткие повторяющиеся элементы объединяются в более протяженные повторяющиеся единицы. Так, например, IGS1 *S. apocarpum* (рис. 1) содержит два 35-нуклеотидных повтора и один неполный 16-нуклеотидный повтор:

<i>A</i>	<i>B</i>
Повтор 1	ACCTGGGAGTCGCGGCGCGC
Повтор 2	ACCCGGGAGTCACGACGCGC
Повтор 3	-----

<i>C</i>	<i>B</i>
Повтор 1	AGGAGGTCGCAGCGCGC
Повтор 2	AGGGAATCGCAGCGCGC
Повтор 3	AGGGGTCGCGCCGCGC

(Жирным шрифтом выделены замены повторов 2 и 3 относительно повтора 1, подчеркнуты элементы *B*.) Повторы 1 и 2 состоят из чередующихся элементов *A–B–C–B*, в повторе 3 присутствуют элементы *C–B*. Повторяющиеся элементы *B* и *C* имеют многочисленные единичные замены. Эти единичные замены воспроизводятся в последовательностях разных популяций одного вида, в частности у *S. pulchrum* (рис. 1). Последовательность чередования исходных элементов *A*, *B* и *C* может быть различной. Так, у *S. elegantulum* (образец 258) сначала чередуются элементы *A* и *B*, образуя два 41-нуклеотидных повтора, затем следуют два 36-нуклеотидных повтора, образованные элементами *A–B–C–B*, далее два повтора *A–B* и четыре повтора *C–B*.

Для изучения внутривидового полиморфизма определены последовательности IGS1 двух, трех или даже восьми (для *S. pulchrum*) образцов из географически отдаленных популяций. В последовательностях IGS1 трех популяций *S. apocarpum* с Кавказа, из Вологодской и Челябинской областей повторы GC-богатой области

идентичны по числу повторяющихся единиц и последовательности нуклеотидов, как и для видов *S. canadense* и *S. boreale*. Делеция одного нуклеотида в области GC-богатых повторов отличает последовательность IGS1 одной популяции *S. dupretii* (Пермская область) от другой (Австрия). У нескольких видов наблюдались отличия в числе повторяющихся элементов. Так, например, различия были найдены между двумя популяциями *S. frigidum* (образцы 100 и 281) с Анабарского плато и из Таймыра:

281 *AB* - - *CBABCBCBABCBCBCBCBCB*
 100 *ABABCBCB* - - - - - *CBCBCB*

Для *S. pulchrum* также характерно наличие делеций повторов в последовательностях IGS1 из разных популяций:

311 *ABABCBCBABCBCBABCBCBCBCBABCBCBCB*
 321 *ABABCBCBABCBCBABCBCBCBCB* - - - - -
 325 *ABABCBCBABCBCBABC* - - *BCBCBABCBCBCB*

311 *CBCB*
 321 - - - *B*
 325 *CBCB*

Делетируются обычно участки последовательности, находящиеся между точными прямыми повторами. Так, IGS1 образцов *S. rivulare* из двух популяций (Карачаево-Черкессия, 195 и Курильские острова, 197) различаются делецией трех элементов повторов, один из которых фланкирован прямыми повторами с характерными вставками двух нуклеотидов СТ в элемент *A*:

<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
195	ACCTGGGCTAGTCGCGGCGCGAGGGAG	
197	ACCTGGG-----	
	<i>B</i>	<i>A</i> <i>B</i>
195	TCGCGGCGGGGGCTAGTCGCGGCGCGC	
197	-----CTAGTCGCGGCGCGC	

У образца 197 происходит делеция участка последовательности между прямыми повторами GGCTAG.

Реже наблюдались различия в числе повторов в IGS1 между разными оперонами. Так, у *S. succulentum* (образец 106) при клонировании исходно гетерогенного ПЦР-продукта было найдено два варианта IGS1, различающихся количеством GC-богатых повторов:

ABABABABABABABABCBCBABCBCBCBCB
ABABABA - - - *BABABCBCBABCBCBCBCB*

Многочисленные единичные замены в повторяющихся элементах *B* позволяют почти однозначно выравнивать повторы в последовательностях IGS1 разных популяций одного вида. Так, из 17 повторов элементов *B* у *S. pulchrum* в 13 повторах найдены единичные замены. Их наличие делает повторяющиеся элементы *B* и *C* уникальными и позволяет более точно определить, какие элементы повторов отсутствуют.

Во вторичной структуре GC-богатые повторы образуют шпильки, т.к. элементы *B* представляют собой инвертированные повторы.

Область А-богатых повторов. В начале каждого из А-богатых повторов имеется триплет СТТ (реже GTT или CTC). Длина большинства повторов составляет 19 п.н. Из-за многочисленных замен в повторяющихся элементах этой области почти нет точных повторов. Однако в некоторых последовательностях встречаются точные копии А-богатых мотивов. Так, в последовательности IGS1 *S. liliputanum* (образец 286) присутствуют два точных повтора мотива СТТ-СААСТСАААТСАААА. В последовательностях разных видов *Schistidium* есть одинаковые варианты повторов (идентичные или с незначительным числом замен), что облегчает выравнивание.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выборка мхов, для которых изучены последовательности IGS1, невелика – в базе данных NCBI есть последовательности десяти видов – *Anacolia laevisphaera*, *Ancistrodes genuflexa*, *Bartramia rosea*, *Brachythecium rutabulum*, *Dicranella staphylinia*, *Entostodon obtusus*, *Funaria hygrometrica*, *Lembophyllum orbiculatum*, *Rhytidium rugosum* и *Rigodium toxarion*. Эти последовательности сильно различаются по длине – от 254 п.н. у *Brachythecium rutabulum* до ~1,5 кб у *Ancistrodes genuflexa* и видов *Schistidium*. Тем не менее в IGS1 всех видов можно выделить некоторые консервативные мотивы и элементы структуры (рис. 2). Высококонсервативен 5'-конец IGS1 у видов *Schistidium* – ТАССТССС(С). У остальных изученных мхов на 5'-конце IGS1 имеется мотив ТАССУ. Ранее нами были обнаружены высококонсервативные мотивы в последовательностях ITS1 мхов, и один из них находится на 5'-конце ITS1 – САСА [9]. Таким образом, высококонсервативные мотивы фланкируют 3'-концы генов 18S и 26S рРНК у мхов. Функциональные сайты IGS1 мхов неизвестны, но положение этих мотивов и их высокий консерватизм могут быть связаны с процессингом рибосомных генов. Пиримидин-богатый мотив найден на 5'-конце IGS и у других растений [2, 3, 6, 10].

Структура IGS1 *Schistidium* похожа на структуру этого участка других эукариот. Общим признаком являются сравнительно консервативные внутри рода 5'- и 3'-концевые последовательности (у *Schistidium* они содержат два коротких точных повтора на 5'-конце IGS1), прилегающие к генам 26S и 5S рРНК. Уникальные терминальные последовательности IGS1 описаны у редиса [3], *Funaria hygrometrica* [11] и *Brassica* [2]. В последней работе показана также консервативность 5'-концевых IGS-последовательностей в семействе Cruciferae.

Повторы в этой области характерны не для всех мхов. Так, сравнительно протяженная область повторов есть в IGS1 *Anacolia*, *Bartramia*, *Schistidium*, тогда как у *Brachythecium* и *Funaria* повторы отсутствуют. GC-богатых повторов нет и в последовательности IGS1 у *S. andreaeopsis*.

Вероятно, сайты терминации транскрипции и процессинга находятся в консервативных областях спейсера. В то же время единичные замены в повторяющихся элементах области GC-богатых повторов и порядок расположения этих повторяющихся элементов также видоспецифичны в IGS1 у *Schistidium*, что может быть полезным для филогенетического анализа наряду с видоспецифичными заменами и инсерциями консервативных областей.

Нами были проанализированы последовательности IGS1 мхов из базы данных NCBI и обнаружено, что во всех последовательностях на расстоянии 20–23 п.н. от 5'-конца IGS1 находится высококонсервативный мотив YCCMGGGT (рис. 2). У видов *Schistidium* в IGS1 выявлено два таких мотива. Два мотива были найдены также в последовательностях *Ancistrodes*, *Funaria* и *Dicranella*, три мотива – в IGS1 *Entostodon*. У *Rigodium toxarion*, *Rhytidium rugosum* и *Brachythecium rutabulum* в IGS1 имеется по одному мотиву.

Еще одна короткая консервативная последовательность в IGS1 у видов *Schistidium* – ССРАСРСТТGG с небольшими заменами встречается в IGS1 различных мхов 1–4 раза (рис. 1, 2). У *Schistidium* имеются два таких субповтора на расстоянии 67–77 и 141–150 п.н. от 5'-конца спейсера. Три вырожденных повтора есть у *Anacolia laevisphaera* – ССААССТТGG, ССААССТТCG и GАССТТGG. По одному мотиву обнаружено в последовательностях *Rigodium toxarion* и *Rhytidium rugosum*. Два мотива найдены в последовательностях *Brachythecium rutabulum* и *Dicranella staphylinia*. Потенциальная вторичная структура этих мотивов представляет собой небольшие шпильки.

В большинстве случаев мотив ССААССТТGG находится на расстоянии 30–40 п.н. от мотива YCCMGGGTR. Таким образом, консерва-

26S рДНК	
1	CCCACAGATTTGT TACCTCCCCAACCCACCCCGGGA-TCCAGGGT (32) CCAACACTTGG (29) TCCAG
2	...AC... ..CG.ACT..TCA..-..... (25)..... (12)-----
3	...AC... ..CGGACT...CA..-..... (25)..... (12)-----
4	...AC... ..C...T.C-ACT.A.CAAG-..... (31).....A. (93)-----
5	...AC... ..C.TTTCC-ACA...AC--..... (20).AGG.....AA(185).....
6	...AC... ..C..TTC..GCT.AAAA---C..... (21)..G..... (74)-----
7	...AC... ..C..TTTCAGCG.G.C.AG-..... (26)..... (149)-----
8	...AC... ..TT.TTT.TG...ACA.G...C.... (28).....A.(427).....
9	...AC... ..T.TTC..GG.T.CCA.C...C.... (32)T.GGG..... (73)-----
10	...AC... ..ATCC.G...T..C.AC-...C.... (39)..GG..... (20)...C.
1	GGT (25) CCGACGCTTGG (194) -----TTCCGATATCGG (849) -----
2	-----..A..A...C.(748) -----C..... (4)TCCCAGGGT (27)
3	-----..AG..A...C.(645) -----C..... (4)TCCCAGGGT (67)
4	-----C..... (87)-----
5	... (20).A.G.A...C.(113)CAGGCACTTCG (317) ...A...C-(543)-----
6	-----..A..A...A.(85)-----
7	-----
8	... (24)..A..A...A.(434)-----
9	-----..CG..A..... (24)-----TCCAGGGT (41)
10	... (30)G...A..... (17)-----TCCAGGGT (283)
5S рДНК	
1	-----TGCCCG TGATG
2	CTCCGATATCG (85)--GACACTTGG (49) TTGACG
3	CTCCGATATCG (85)--GACACTTGG (49) TGCCCA
4	CT -----TGCCCG
5	-----CCGTCACTTGG (202) TGGTCG
6	-----GGGCCG
7	-----TTGCCG
8	-----TGAATG
9	-----CCAGCACTTGG (228) TGGACG
10	---GATAT-- (266)-----TTGATG

Рис. 2. Последовательности IGS1 десяти видов мхов: 1 – *Schistidium apocarpum* 129, 2 – *Anacolia laevisphaera* FR694294, 3 – *Bartramia rosea* FR694278, 4 – *Rigodium toxarion* FR694310, 5 – *Ancistrodes genuflexa* FR694319, 6 – *Brachythecium rutabulum* FR695698, 7 – *Rhytidium rugosum* FR694324, 8 – *Dicranella staphylina* FR694295, 9 – *Funaria hygrometrica* JQ736823, 10 – *Entosthodon obtusus* JQ736824. В рамки обведены 3'-конец гена 26S рРНК и 5'-конец гена 5S рРНК. Показаны общие для всех видов мхов консервативные мотивы IGS1. Числа указывают количество п.н. между ними

тивным признаком является наличие мотива YCCMGGGTR на расстоянии 23–25 п.н. от 5'-конца межгенного спейсера и нахождение второго мотива CCAACACTTGG на расстоянии 30–40 п.н. от первого. Для *Schistidium*, *Entostodon*, *Funaria*, *Dicranella* характерны две такие «пары», тогда как у видов порядка Hupnales (*Rigodium toxarion*, *Rhytidium rugosum*, *Brachythecium rutabulum*) – по одной. Возможно, эти консервативные мотивы имеют отношение к терминации транскрипции. Повторяющиеся структурные элементы области терминации транскрипции описаны у мыши [12]. Единственный участок

олиго-Т, который является элементом терминации транскрипции, у *Schistidium* находится на расстоянии ~700–1100 п.н. от 3'-конца гена 26S рРНК (позиции 1006–1012 на рис. 1). У других мхов поли-Т также находится ближе к 3'-концу IGS1. В то же время в последовательности IGS1 *Brachythecium rutabulum* не найдены участки поли-Т длинее 4 п.н.

Для эукариот показано, что терминация транскрипции РНК-полимеразы I удалена от 3'-конца гена 26S рРНК. Так, у мыши транскрибируются еще 565 н.о. спейсерной области, а конец гена образуется в результате процессинга

[12]. Три сайта терминации найдено в IGS *Leishmania* – один соответствует концу зрелой 28S рРНК, а два других образуют транскрипт на 185 и 576 н.о. длиннее первого [13].

Для мха *Funaria hygrometrica*, у которого секвенирована вся область IGS, показано, что два сайта инициации транскрипции находятся в IGS2 [11]. Для покрытосеменных растений также известно, что промотор находится на 3'-конце IGS. Тем не менее у видов *Schistidium* во второй консервативной области IGS1 найден мотив, похожий на последовательность области инициации транскрипции многих покрытосеменных растений. Это уникальный мотив в IGS1 *Schistidium* (G/T)ATATCGG (позиции 564–571 на рис. 1). Во втором межгенном спейсере у *Funaria hygrometrica* обнаружены похожие мотивы GATAGGGGG и TATGTGGGGG, расположенные на значительном расстоянии друг от друга (~1700 п.н.) [11], последовательность TATATAGGG характерна для арабидопсиса [4], TATATAAGGG – для *Brassica rapa* [2]. Мотив GATATCGG присутствует в IGS1 *Ancistrodes*,

Rhigodium, *Anacolia*, *Bartramia* (у двух последних мхов этот мотив дублирован) и с одной заменой у *Entostodon*. У других изученных в этом отношении мхов он не найден.

Сравнение последовательностей IGS1 *Schistidium* и других мхов показывает, что более консервативен 5'-конец, на котором присутствуют олигопиримидиновая последовательность и нуклеотидный мотив YCCMGGGTR, а также второй консервативный мотив CCRACRCTTGG. 3'-Конец консервативен в пределах рода *Schistidium*, последовательностей IGS1 разных видов одного рода других мхов в базе данных NCBI нет.

Консервативные области IGS1 разных видов *Schistidium* хорошо выравниваются и имеют видоспецифичные замены и инсерции, что может быть полезным для филогенетического анализа.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 15-04-06027, экспериментальная часть) и РНФ (грант 14-50-00029, теоретический анализ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wicke, S., Costa, A., Munoz, J., and Quandt, D. (2010) Restless 5S: the re-arrangement(s) and evolution of the nuclear ribosomal DNA in land plants, *Mol. Phylogenet. Evol.*, **61**, 321–332.
2. Rocha, P.S., and Bertrand, H. (1995) Structure and comparative analysis of the rDNA intergenic spacer of *Brassica rapa*, *Eur. J. Biochem.*, **229**, 550–557.
3. Delcasso-Tremousaygue, D., Grellet, F., Panabieres, F., Ananiev, E.D., and Delseny, M. (1988) Structural and transcriptional characterization of the external spacer of a ribosomal RNA nuclear gene from a higher plant, *Eur. J. Biochem.*, **172**, 767–776.
4. Doelling, J.H., and Pikaard, C.S. (1995) The minimal ribosomal RNA gene promoter of *Arabidopsis thaliana* includes a critical element at the transcription initiation site, *Plant J.*, **8**, 683–692.
5. Doelling, J.H., Gaudino, R.J., and Pikaard, C.S. (1993) Functional analysis of *Arabidopsis thaliana* rRNA gene and spacer promoters *in vivo* and by transient expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7528–7532.
6. Castiglione, M.R., Gelati, M.T., Cremonini, R., and Frediani, M. (2013) The intergenic spacer region of the rDNA in *Haploappus gracilis* (Nutt.) Gray, *Protoplasma*, **250**, 683–689.
7. Garcia, S., Panero, J.L., Siroky, J., and Kovarik, A. (2010) Repeated reunions and splits feature the highly dynamic evolution of 5S and 35S ribosomal RNA genes (rDNA) in the Asteraceae family, *BMC Plant Biol.*, **10**, 176.
8. Милютин И.А., Горюнов Д.В., Игнатов М.С., Игнатова Е.А., Троицкий А.В. (2010) Филогения мхов рода *Schistidium* (Bryophyta, Grimmiaceae) по нуклеотидным последовательностям и вторичной структуре внутренних транскрибируемых спейсеров ядерной рДНК, *Мол. биол.*, **44**, 1–16.
9. Милютин И.А., Игнатов М.С. (2015) Консервативные мотивы в первичных и вторичных структурах ITS1 мхов, *Мол. биол.*, **49**, 394–404.
10. Fukunaga, K., Ichitani, K., Taura, S., Sato, M., and Kawase, M. (2005) Ribosomal DNA intergenic spacer sequence in foxtail millet, *Setaria italica* (L.) P. Beauv. and its characterization and application to typing of foxtail millet landraces, *Hereditas*, **142**, 38–44.
11. Capesius, I. (1997) Analysis of the ribosomal RNA gene repeat from the moss *Funaria hygrometrica*, *Plant Mol. Biol.*, **33**, 559–564.
12. Grummt, I., Maier, U., Ohrlein, A., Hassouna, N., and Bachellerie, J.P. (1985) Transcription of mouse rDNA terminates downstream of the 3' end of 28S RNA and involves interaction of factors with repeated sequences in the 3' spacer, *Cell*, **43**, 801–810.
13. Abreu-Blanco, M.T., Ramirez, J.L., Pinto-Santini, D.M., Papadopoulou, B., and Guevara, P. (2010) Analysis of ribosomal RNA transcription termination and 3' end processing in *Leishmania amazonensis*, *Gene*, **451**, 15–22.

STRUCTURE OF INTERGENIC SPACER IGS1 OF RIBOSOMAL OPERON FROM *Schistidium* MOSSES

I. A. Milyutina^{1*}, E. A. Ignatova², M. S. Ignatov³,
D. V. Goryunov¹, A. V. Troitsky¹

¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov
Moscow State University, Moscow 119991, Russia;
fax: +7(495)939-3181, E-mail: iramilyutina@yandex.ru,
bobr@belozersky.msu.ru*

² *Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty,
Moscow 119991, Russia; E-mail: arctoa@list.ru*

³ *Main Botanical garden, Russian Academy of Sciences,
ul. Botanicheskaya 4, Moscow 127276, Russia;
E-mail: misha_ignatov@list.ru*

Received July 8, 2015

The structure of rDNA intergenic spacer (IGS1) from 12 species of *Schistidium* mosses was studied. Three conservative regions and two areas of GC- and A-rich repeats were identified. All the studied mosses have a conservative pyrimidine-rich motif at the 5'-end of IGS1. Species-specific nucleotide substitutions and insertions were found in conservative areas. The repeating units contain individual nucleotide substitutions due to which most units are unique. The positions of such repeats in IGS1 are species-specific, but their number may vary between operons of the same specimen. IGS1 sequence comparison from *Schistidium* species and representatives of ten other moss genera showed the presence of common conserved motifs with similar localization. Presumably, these motifs are elements of termination of pre-rRNA transcription and processing of rRNA.

Key words: rDNA, IGS1, intergenic spacer, conservative motifs, mosses