

Внутри- и межвидовые вариации длины теломер Мохообразных

Санникова А.В.^{1*}, Шарипова М.Р.¹, Шакиров Е.В.^{1, 2}, Валеева Л.Р.^{1, 2}

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Department of Biological Sciences, College of Science, Marshall University, USA

* anastasya.sannikova@bk.ru; AnVSannikova@stud.kpfu.ru

Ключевые слова: теломеры; мхи; печеночники; *Ceratodon purpureus*; *Marchantia polymorpha*; *Sphagnum*; *Physcomitrium patens*

Мотивация и цель: Теломеры представляют собой нуклеопротеиновые структуры на физических концах линейных хромосом эукариот, участвующие в защите ДНК от повреждений и определяющие жизнеспособность клетки. Строение теломер эволюционно консервативно в разных царствах живых организмов, включая животных, растения и грибы. Так и для большинства видов растений характерна теломерная ДНК, состоящая из повторов (TTTAGGG)_n. Однако средняя длина теломер может быть не только видоспецифична; существенные различия могут наблюдаться даже в пределах популяций одного вида.

Основной модельной системой для изучения биологии теломер растений на протяжении последних десятилетий было небольшое цветковое растение *Arabidopsis thaliana*. Хотя это модельное растение вносит колоссальный вклад в исследование гомеостаза теломер, многие вопросы о биологии теломер растений до сих пор остаются открытыми. В связи с этим использование новых растительных модельных организмов в исследованиях биологии теломер представляет большой интерес. Мохообразные являются одной из перспективных групп для изучения молекулярной генетики и эволюции растений, в частности биологии теломер, поскольку их можно рассматривать и как альтернативную, и как аналогичную ветвь эволюции наземных растений. Кроме того, мохообразные обладают рядом преимуществ, таких как: низкая избыточность генома из-за отсутствия недавних дупликаций, преобладание гаплоидной фазы жизненного цикла, двудомность многих видов бриофитов. Таким образом, мохообразные в силу своего филогенетического положения являются новой модельной системой для изучения биологии теломер растений [1].

Целью данной работы был сравнительный анализ длины теломер у разных видов бриофитов, а также среди популяций одного вида.

Методы и алгоритмы: В работе использовали аксенические культуры мхов: *Physcomitrium patens*, 4 экотипа (Gransden, Великобритания; Reute, Германия; Villersexel, Франция; Kaskaskia, США); культуры *Ceratodon purpureus*: R40 (мужское растение, Нью-Йорк, США), GG1 (женское растение, Австрия), B150 и B190 (женское и мужское растение, Аляска, США), печеночник *Marchantia polymorpha* Takaragaike-1 (мужское растение) и Takaragaike-2 (женское растение; Япония), а также природные изоляты сфагнума: *Sphagnum fallax* MW (Миннесота, США), *Sphagnum girgensohnii* (Свердловская область, Россия) и *Sphagnum* sp. (Республика Марий Эл, Россия). Анализ длины теломер проводили с помощью TRF-анализа (анализ терминальных рестрикционных фрагментов) совместно с

Саузерн-блотом [2]. Среднюю длину теломер рассчитывали с помощью программы TeloTool [3]. Статистический анализ проводили с помощью программы GraphPad Prism v.8.

Результаты: Мы показали, что разные экотипы растений *P. patens* имеют длину теломер в диапазоне от 1.08 ± 0.13 т.п.н. (Kaskaskia) до 1.71 ± 0.19 т.п.н. (Villersexel), длина теломер у экотипа Reute составила 1.29 ± 0.04 т.п.н., у экотипа Gransden – 1.21 ± 0.06 т.п.н. Таким образом, длина теломер *P. patens* оказалась в 1.5–3 раза короче длины теломер модельного покрытосеменного растения *A. thaliana* экотип Col-0 (в среднем 2.5–4.5 т.п.н.) [4]. Согласно полученным результатам, длина теломер мха *P. patens* варьирует между экотипами, при этом теломеры экотипа Kaskaskia являются самыми короткими, а теломеры экотипа Villersexel – самыми длинными. Кроме того, мы показали, что все изученные экотипы имеют специфические теломерные последовательности, предположительно внутрихромосомной локализации, различающиеся внутри экотипов по расположению и длине.

Далее мы проанализировали длину теломер у четырех природных изолятов мха *C. purpureus*. Средние значения длины теломер *C. purpureus* варьировали от самых коротких 0.68 ± 0.04 т.п.н. в линии GG1 до самых длинных 1.15 ± 0.14 т.п.н. в линии B190. Изолят B150 имел более длинные теломеры ($p = 0.03$), чем изолят B190, а также длиннее, чем линия R40 ($p = 0.002$). Однако выводы о корреляции длины теломер с полом растений требуют дальнейшего изучения.

Мы сравнили распределение длин теломер у печеночника *M. polymorpha*. TRF-анализ показал, что среднее значение длины теломер у мужского растения (Так-1) составляет 2.15 ± 0.25 т.п.н., у женского растения (Так-2) длина теломер составляет 2.45 ± 0.25 т.п.н. Женская линия имела более длинные теломеры. Тем самым было показано, что печеночник *M. polymorpha* обладает наиболее длинными теломерами среди изученных бриофитов *P. patens* и *C. purpureus*.

Далее мы определили длины теломер у мхов рода *Sphagnum*. TRF-анализ показал вариабельность в длине теломер у трех изолятов мха *Sphagnum*. Средняя длина теломер у *S. fallax* составила 1.86 ± 0.08 т.п.н.; у вида *S. girgensohnii* – 1.56 ± 0.21 т.п.н., у изолята *Sphagnum* sp. – 1.35 ± 0.11 т.п.н., что также указывает на естественную вариабельность длины теломер между разными видами. Также у *S. fallax* был обнаружен уникальный внутрихромосомный теломерный повтор (ITS) размером ~ 2.1 т.п.н., тогда как в других изолятах ITS размером около 2 т.п.н. практически не выявлялся. Таким образом, для мхов рода *Sphagnum* характерно разнообразие длины теломер и внутрихромосомных теломерных повторов.

Нами была также изучена динамика изменений длины теломер в клетках протонемы *P. patens* (экотип Reute) и *C. purpureus* GG1 и R40, выращенных в течение 14, 28 и 42 дней. В результате было показано, что длина теломер остается неизменной в активно делящихся вегетативных тканях протонемы на протяжении периода культивирования, что позволяет предположить, что множественные деления клеток, связанные с быстрым ростом протонемы, не влияют на длину теломер. Кроме того, такая же длина теломер наблюдалась в гаметофорах растений *P. patens*.

Выводы: Таким образом, мы показали, что все проанализированные мохообразные обладают относительно короткими теломерами, в среднем ниже 2.5 т.п.н., а в некоторых случаях ниже 1.5 т.п.н., что, в свою очередь, нехарактерно для большинства цветковых растений. Длина теломер мохообразных может

варьировать как между видами, так и внутри одного вида. Кроме того, в геномной ДНК всех изученных мохообразных были обнаружены последовательности ITS. Значительная вариабельность длины теломер была показана для четырех проанализированных изолятов мха *C. purpureus*. Также выявлены различия в длине теломер между мужским и женским растениями *M. polymorpha*. Однако для подтверждения корреляции длины теломер с полом у мохообразных необходимо проведение дальнейших исследований. Помимо того, было показано, что длина теломер остается стабильной в течение культивирования на разных стадиях вегетативного роста изученных линий растений. Таким образом, наблюдаемые внутривидовые различия в длине теломер у бриофитов могут стать основанием для их будущего использования в картировании и количественных исследованиях локусов генов, ассоциированных с длиной теломер, и дальнейшего обнаружения новых регуляторных генов биологии теломер растений.

Финансирование: Работа выполнена на технической базе программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

Intra- and interspecific variations in the telomere length of bryophytes

Sannikova A.V.^{1*}, Sharipova M.R.¹, Shakirov E.V.^{1, 2}, Valeeva L.R.^{1, 2}

¹ Kazan Federal University, Kazan, Russia

² Department of Biological Sciences, College of Science, Marshall University, USA

* AnVSannikova@stud.kpfu.ru; anastasya.sannikova@bk.ru

Key words: telomeres; mosses; liverworts; *Ceratodon purpureus*; *Marchantia polymorpha*; *Sphagnum*; *Physcomitrium patens*

Motivation and Aim: Telomeres are nucleoprotein structures at the physical ends of eukaryotic chromosomes playing a crucial role in protecting DNA from damage and in cell fate. Telomere architecture is evolutionarily conserved across different organisms including animals, plants, and fungi. Most plant species have telomeres that consist of TTTAGGG repeats. However, the average length of telomeres is not only species-specific, but its substantial variation could be found within natural populations of species.

Historically, the main model system to study plant telomere biology was the small flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Although this model plant provides a great contribution to numerous studies in the telomere homeostasis, many questions about the biology of plant telomeres remain unanswered. Therefore, the usage of new plant model organisms in the telomere biology studies are of the great interest due to the limited data in this field. Bryophytes are one of the promising plant groups for the studies of molecular genetics and evolution of plants, particularly telomere biology, because they could be considered both as the alternative and as the analogous evolution branch of the land plants. In addition, bryophytes have several advantages, such as: low genetic redundancy due to the absence of recent genome duplications, the predominant phase of lifecycle for all bryophytes is haploid, many bryophyte species are dioecious. Thus, due to their phylogenetic position, bryophytes are a new model system for studying plant telomere biology.

The aim of the current work was the comparative analysis of telomere length both among different bryophyte species and within the same species.

Methods and Algorithms: In the study we used axenic cultures of mosses: *Physcomitrium patens*, 4 ecotypes (Gransden, UK; Reute, Germany; Villersexel, France; Kaskaskia, USA); *Ceratodon purpureus* cultures: R40 (male plant line, New York, USA), GG1 (female plant line, Austria), B150 and B190 (female and male lines, Alaska, USA), a liverwort *Marchantia polymorpha* (cultivars Takaragaike-1 (male) and Takaragaike-2 (female), Japan), and natural isolates of peatmoss *Sphagnum fallax* MW (MN, USA), *Sphagnum girgensohnii* (Sverdlovsk Oblast, Russia) and *Sphagnum* sp. (Republic of Mari-El, Russia). Telomere length analysis was performed by TRF analysis (Terminal Restriction Fragment analysis) coupled with Southern blot [1]. The average telomere length was calculated using the TeloTool software [2]. Statistical analysis was carried out by GraphPad Prism v.8 software.

Results: We have shown that different ecotypes of *P. patens* plants have a telomere length in the range from 1.08 ± 0.13 kb (Kaskaskia) to 1.71 ± 0.19 kb (Villersexel), Telomere length in the ecotypes of Reute being 1.29 ± 0.04 kb. Same as in the Gransden being 1.21 ± 0.06 kb. It was 1.5–3 times shorter than the telomere length of the model angiosperm plant *A. thaliana* Col-0 (2.5–4.5 kb in the average) [3]. Our data indicate that telomere length varies between analyzed *P. patens* ecotypes, with Kaskaskia telomeres being the shortest and Villersexel telomeres being the longest. In addition, we have shown that all the ecotypes studied have specific telomeric sequences (ITS), presumably of intra-chromosomal localization, and differing in their location and length within the ecotypes. We analyzed telomere length in four natural isolates of *C. purpureus*. Mean TRF values in *C. purpureus* accessions varied from the shortest 0.68 ± 0.04 kb in the GG1 ecotype to the longest 1.15 ± 0.14 kb in the B190 accession. B150 had longer telomeres ($p = 0.03$) than the male Alaskan isolate B190, as well as longer than the other male line R40 ($p = 0.002$). We did not find sex-specific correlations in mean TRF values between female and male lines.

We compared telomere lengths distribution in strains of liverwort *M. polymorpha*. TRF analysis of *M. polymorpha* telomeres indicated that mean TRF values in male (Tak-1) 2.15 ± 0.25 kb and female (Tak-2) 2.45 ± 0.25 kb lines were different. The female strain having longer telomeres. We note that telomeres in the liverwort *M. polymorpha* are longer than in all analyzed ecotypes of the model mosses *P. patens* and *C. purpureus*.

We next analyzed telomere lengths of *Sphagnum* species. TRF analysis revealed variable telomere length in the three *Sphagnum* isolates. Mean telomere lengths differed in *S. fallax* $1.86 \text{ kb} \pm 0.08 \text{ kb}$; *S. girgensohnii* $1.56 \pm 0.21 \text{ kb}$ and *Sphagnum* sp. $1.35 \pm 0.11 \text{ kb}$, implying natural variation in telomere length between different. A strong signal of intrachromosomal telomeric repeats was identified in *S. fallax* MW DNA ($\sim 2.1 \text{ kb}$), which was not nearly as strong in the other two isolates. Therefore, it was shown that there are intraspecies variations in telomere length of *Sphagnum* and also differences in the telomeric repeats location on chromosomes.

We evaluated telomere length dynamics of *P. patens* protonema (Reute ecotype) and *C. purpureus* GG1 and R40 protonema tissues grown on plates for 14, 28, and 42 days. We observed no mean TRF changes in vegetatively grown protonema tissue for the entirety of the cultivation suggesting no telomere length change due to multiple cell divisions associated with the rapid growth of protonema. Furthermore, the same telomere length was observed in 2-month-old gametophores (*P. patens*).

Conclusion: Therefore, we have shown that the mean telomere length in all analyzed bryophytes is relatively short, commonly below 2.5 kb and below 1.5 kb in some cases, which is unusual results comparing to the flowering plants. It was also shown that the telomere length of bryophytes can vary both between species and within the same species. Additionally, ITS sequences were detected in genomic DNA of all studied bryophytes. In four analyzed *C. purpureus* isolates, all lines showed substantial variation in the telomere length. Similarly, telomere length differences in the two tested male and female accessions of *M. polymorpha* were also identified. However, the correlation with sex in these bryophytes remains to be studied. We note that telomere length remains relatively stable over time in different tissues of vegetatively growing plants. Thus, the observed substantial intra-species variation in telomere length can serve as a strong foundation for their future use in association mapping and quantitative trait loci studies to discover causal genetic variants.

Funding: The study was carried out thanks to the technical resources of the Strategic Academic Leadership Program of the Kazan Federal University (PRIORITET-2030).

Список литературы/References

1. Valeeva L.R. et al. Telomere length variation in model bryophytes. *Plants (Basel)*. 2024;13(3):387. doi 10.3390/plants13030387
2. Nigmatullina L.R. et al. Non-radioactive TRF assay modifications to improve telomeric DNA detection efficiency in plants. *Bionanoscience*. 2016;6(4):325-328
3. Abdulkina L.R. et al. Comparative application of terminal restriction fragment analysis tools to large-scale genomic assays. *Int J Mol Sci*. 2023;24(24):17194
4. Shakirov E.V., Shippen D.E. Length regulation and dynamics of individual telomere tracts in wild-type *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2004;16(8):1959-1967