

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOĻĢIJAS FAKULTĀTE  
MOLEKULĀRĀS BIOĻĢIJAS KATEDRA



# Retrotranspozonu struktūra parastās priedes (*Pinus sylvestris* L.) genomā un to ekspresija

Promocijas darbs  
bioloģijas doktora zinātniskā grāda iegūšanai  
molekulārās bioloģijas apakšnozarē

**Darba autors:** Angelika Voronova  
**Darba vadītāji:** *Dr.biol.* Dainis Ruņģis  
*Dr.biol.* Nils Rostoks

Rīga, 2014

## Kopsavilkums

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Valsts mežzinātnes institūtā „Silava”. Pētījuma mērķis bija identificēt aktīvos retrotranspozonus parastās priedes (*Pinus sylvestris* L.) genomā un raksturot retrotranspozoniem-līdzīgo sekvenču transkripcijas līmeni dažādu stresa veidu ietekmē kontrolētos apstākļos. Pētījumā izmantoti uz augsti konservatīvām tRNS piesaistes vietām balstīti nespecifiskie retrotranspozonu marķieri, kas ļauj pētīt retrotranspozonu sekvenču bez iepriekšējām zināšanām par organisma genoma sekvenci. Inovatīvi šos marķierus izmantoja pētot transkriptomu starp viena klona priedes rametiem, kas praktiski izslēdza genotipu variāciju starp dažādiem indivīdiem. Rametus pakļāva dabā izplatītam karstuma stresam, kukaiņu invāzijai (priežu hermess, (*Pineus pini* L.)), kā arī mākslīgi izraisītai augu hormonu (abscizskābes un salicilskābes) ietekmei. Atšķirīgi ekspresētie fragmenti sekvenēti ar Sangerā sekvences noteikšanas metodi, kas šobrīd ir visprecīzākā zināmā nukleotīdu sekvences noteikšanas metode. Darba rezultāti sakrīt ar jaunākajām atziņām publicētajām citos pētījumos par mobilajiem ģenētiskajiem elementiem un ar tiem saistīto sekvenču transkripciju, kā arī ar kailsēkļu genomu strukturālajiem pētījumiem.

Darba rezultātā identificēti pārsvarā I klases transponējamo elementu jeb LTR retrotranspozonu pārstāvji (LTR *Gypsy* un *Copia*), kā arī tos saturošie himēriskie transkripti, kas norāda uz to, ka retrotranspozonu sekvenču ir izplatītas priedes genomā un, atbildot uz stresu, tiek ekspresēti. Noskaidrota arī atrasto sekvenču homoloģija ar iepriekš aprakstīto citu augu sugu transponējamo elementu sekvencēm. Dažādu ietekmju rezultātā identificēja atšķirīgo elementu ģimeņu pārstāvjus, starp eksperimentiem pārklājās tikai daži fragmenti. Fragmenti atšķīrās savā starpā arī pēc konstrukcijas (TE *pol*, LTR, LTR-LTR, TE *pol*-hloroplasts), kā arī TE domēnu reprezentācijas (AP, RT, gag). Identificēto retrotranspozoniem-līdzīgo fragmentu ekspresijas līmeni noteica ar reālā laika PQR metodi. Ievērojamu ekspresijas pieaugumu novēroja ar hloroplastu sekvencēm līdzīgajiem himēriskajiem fragmentiem, kas skaidrojams ar šīs sekvences daļas reprezentāciju arī hloroplastu genomā un/vai šo fragmentu homoloģiju ar citām sekvencēm kompleksajā parastās priedes genomā. Identificēja četrus diferencīali ekspresētus fragmentus, kas satur gan transponējamiem elementiem homologas sekvenču, gan hloroplastu sekvencēm līdzīgas daļas. Kukaiņu invāzijas rezultātā B153TE LTR *Gypsy Cereba*-līdzīgā fragmenta ekspresija paaugstinās 45-73 reizes un pēc karstuma stresa 5,62 reizes, salīdzinot ar normāliem apstākļiem. Savukārt hloroplastam-līdzīgā B153C fragmenta ekspresija paaugstinās 6888-9373 reizes pēc kukaiņu uzbrukuma un 255 reizes pēc karstuma stresa. Vairākām noteiktām šī fragmenta sekvencēm, un īpaši retrotranspozona daļai, ir novēroti polimorfismi, kas liecina par hloroplastam-līdzīgā lokusa

vairākām kopijām nukleārajā priedes genomā, neskaitot hloroplastu genomu. Šī veida transkripti varētu piedalīties regulatīvajos procesos ar RNS interferences mehānisma starpniecību.

No cDNS ieguva pilna izmēra 5796 bp elementu ar *Gypsy* LTR retrotranspozonom raksturīgiem struktūrelementiem, to sekvenēja un raksturoja (psTE283). Tāpat, dažiem no priedes transkriptoma identificētiem retrotranspozonu homologiem izdevās iegūt retrotranspozonu iekšējo domēnu sekvences. Tas liecina par to, ka diferenciāli ekspresēto fragmentu vidū atrodami ne tikai himērisko un izjaukto retrotranspozonu sekvenču transkripti. Turpmāk ir jānoskaidro, vai mūsu pētījumā identificētās sekvences ir lokalizētas gēnu rajonos (intronos vai UTR), vai arī tie ir autonomi transkribēti elementi.

Šī darba gaitā ir izveidoti priedes retrotranspozoniem specifiskie DNS marķieri, kuri ir izmantoti vairāku eksperimentu veikšanai. Izmantojot IRAP metodi, ir pētīti dažādos apstākļos augoši dabīgās *P.sylvestris* audzes indivīdi. Novērota augsta ģenētiskā daudzveidība, kas ir salīdzināma ar neitrālo SSR marķieru datiem. Galveno koordināšu analīze ar retrotranspozonu marķieru datiem nodalīja atšķirīgos apstākļos augošus indivīdus. Noskaidrots, ka paugurā augošām priedēm ir statistiski būtisks amplificēto fragmentu skaita palielinājums, salīdzinot ar pārpusojumā augošajiem kokiem. Izmantojot IRAP metodi analizēja 26 gadus vecus priedes rametus no Latvijas austrumu un rietumu pusēs atšķirīgos klimatiskajos apstākļos esošām plantācijām. Tikai viens marķieris no desmit uzrādīja polimorfismu rametu vidū, kas norāda uz iespējamu nesēnu notikušu transpozīciju šiem indivīdiem. Polimorfu fragmentu sekvenēšana atrada homoloģiju ar līdz šim priedē neaprašītu *Copia-17-Pta-I* LTR sekvenci diviem atšķirīgiem fragmentiem. Trešais eksperiments veltīts identificēto retrotranspozoniem-līdzīgo fragmentu izplatības pētījumiem, kas ir veikts gan ar specifiskiem fragmentu praimeriem, gan ar IRAP praimeriem. Pētījumā iekļāva dažādas skujkoku (*Pinales*) sugas: 16 priedes, 14 egles, 7 baltegles, kā arī citus attālāku kailsēkļu taksonu pārstāvjus. Izmantojot retrotranspozonu marķierus, veikta kailsēkļu filoģenētiskā analīze. Ar specifisku retrotranspozonu amplifikāciju, kā arī ar nespecifisku retrotranspozonu amplifikāciju pēc IRAP metodes iegūtie dati, varēja nodalīt priedes apakšģintis *Pinus* un *Strobus*. IRAP dati identificēja priežu, egļu un balteglu sugu klāsterus, lai gan zarojumu varbūtības parametri nebija augsti.

**Atslēgvārdi:** Transponējamie elementi, retrotranspozoni, parastā priede (*Pinus sylvestris* L.), kailsēkļi, diferenciāla ekspresija.

## Summary

The research contained in this doctoral thesis was carried out in the Latvian State Forest Research Institute "Silava". The study aimed to identify active retrotransposons in the Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) genome and to characterize transcription of retrotransposon like sequences under various controlled stress conditions. In the study non-specific primers complementary to conservative retrotransposon tRNA binding sites were used, that enable investigation of retrotransposons without previous sequence knowledge. In a novel utilisation, these markers were applied to the analysis of expressed sequences in ramets of one Scots pine clone, which minimised genotypic variation between different individuals. Pine ramets were subjected to naturally occurring heat stress, insect infestation (pine woolly aphid (*Pineus pini* L.)) as well as to plant hormone treatment (abscisic acid and salicylic acid). Differently expressed fragments were sequenced by Sanger sequencing, which is currently the standard for the nucleotide sequence determination. The results are consistent with other published studies on mobile genetic elements and related transcribed sequences as well as with gymnosperm structural genomic studies. Mostly Class I transposable elements, or LTR retrotransposon sequences (LTR *Gypsy* and *Copia*) were identified in the differentially expressed fragments, as well as chimeric transcripts, which indicates that retrotransposon sequences are common in the Scots pine genome and retrotransposon-like transcripts are expressed in response to stress. Homology of detected sequences with previously described transposable elements from other plant species was established. Representatives of various transposable element families were identified after differing stress conditions, but only a few common fragments were identified between the experiments. Fragments differed from each other in structure (TE *pol*, LTR, LTR-LTR, TE *pol*-chloroplast) and in domain representation (HR, RT, GAG). Identified retrotransposon-like fragment expression levels were determined by real-time PCR. A significant increase in expression was observed for chimeric fragments containing chloroplast-like sequences, which can be explained by the homology of parts of the sequence to the chloroplast genome or/and representation of highly similar regions of homology in multiple copies in the *P.sylvestris* genome. Four differentially expressed transcript groups containing both TE homologous sequences and chloroplast-like sequences were identified. For one of these transcripts (B153TE), expression of the *Cereba* retrotransposon-like part increased 45-73 fold after insect infestation and 5.62 fold after heat stress when compared to normal conditions. Expression of the chloroplast-like part of the B153 fragment increased by 6888-9373 fold after insect attack and 255 fold after heat stress. Many sequence polymorphisms were observed in several identified transcripts of this chimeric fragment, suggesting that besides the chloroplast genome, the chloroplast-like locus is present in

multiple copies in the nuclear genome of Scots pine. These type of transcripts could take part in regulatory processes involving RNA interference mechanisms.

A full-length 5796 bp element with structural elements characteristic to *Gypsy* LTR retrotransposons was sequenced and characterized from cDNA (psTE283). Utilising hypothetical retrotransposon sequences identified after similarity searches between *P.taeda* BAC sequences and sequenced retrotransposon-like sequences, internal domains of these hypothetical retrotransposons were sequenced from cDNA isolated from stressed *P.sylvestris* clones, indicating that putatively functional retrotransposons were expressed in addition to chimeric or disrupted retrotransposon-like sequences. Subsequent research is necessary to establish whether sequences identified in this study are localized in gene regions (introns or UTR), or if they are autonomous transcribed elements.

Using the identified retrotransposon sequences, specific *P. sylvestris* retrotransposon markers were developed and utilised in several differing analyses. Using the IRAP technique, individuals from natural *P. sylvestris* stands growing in differing conditions were analysed. High genetic diversity was identified among individuals, which is comparable to data obtained from neutral SSR markers. Principal coordinate analysis of the IRAP data differentially clustered subpopulations growing in different topographic conditions. Pine trees growing on the hill (dry conditions) have a statistically significant increase in mean amplified fragment number when compared to the trees growing in the swamp (moist conditions). In a second experiment utilising the IRAP technique, 26-year-old ramets of a single pine clone, growing in two separate plantations in the east and west of Latvia, were analysed. One out of nine analysed IRAP markers showed polymorphism among ramets of one clone, which indicates that the *P. sylvestris* genome could contain transpositionally active elements. Polymorphic bands were sequenced and two separate fragment groups were homologous to a *Copia-17-Pab-I* LTR previously not described in *P. sylvestris*. This suggests recent transposition event in these individuals, and further studies are necessary for description of the full-length elements. In the last experiment, the distribution of identified retrotransposon-like fragments in various conifer species (*Pinales*) was analysed. In study were included 16 pine species, 14 spruce, 7 firs as well as representatives of other more distant gymnosperm taxa. Both specific retrotransposon amplification as well as non-specific retrotransposon primer amplification using the IRAP technique were able to distinguish the pine subgenus *Pinus* from *Strobus*. IRAP data were also able to distinguish clusters of spruces, pines and firs, but bootstrap values were low.

**Keywords:** Transposable elements, retrotransposons, Scots pine (*Pinus sylvestris* L.), gymnosperms, differential expression.

## Darbā izmantotie saīsinājumi:

aa – aminoskābju atliekas

ABA - abscizskābe

bp - bāžu pāri

cDNS - komplementārais DNS

DIRS - *Dictyostelium*-tipa starpposma atkārtojuma sekvenca (*Dictyostelium intermediate repeat sequence*)

env- apvalka proteīns (*envelope*)

ERV – endogēnais retrovīruss

EST - īsas ekspresētas sekvences (*Expressed Sequence Tags*)

gag- retrotranspozonu domēns, gag poliproteīna prekursors, kurš kodē retrovīrusu matricas proteīnus (matricas, kapsīda, nukleokapsīda).

gDNS - genomiskais DNS

int- integrāzes domēns

iPBS - polimorfisma noteikšana ar amplifikāciju starp retrotranspozonu PBS saitiem (*inter Primer Binding Site*).

IRAP - polimorfisma noteikšana ar amplifikāciju starp retrotranspozonu sekvencēm (*Inter Retrotransposon Amplificational Polymorphism*)

IS – insercijas sekvenca (*Insertion Sequence*)

kb- kilo bāžu pāri

LINE - garie izkaisītie hromosomālie elementi (*Long Interspersed Nuclear Elements*)

LTR - garie terminālie atkārtojumi (*Long Terminal Repeats*)

miRNS - mikro RNS (*micro RNA*)

MITE - miniatūrie transponējamie elementi ar invertētiem atkārtojumiem (*Miniature Inverted-repeat Transposable Elements*)

ORF - atklātā translācijas fāze (*Open Reading Frame*)

PBS - retrotranspozonā lokalizēta tRNS piesaistes vieta (*Primer Binding Site*).

PCA - galveno komponentu analīze (*Principal Component Analysis*)

PCoA- galveno koordināšu analīze (*Principal Coordinates Analysis*)

PĶR - polimerāzes ķēdes reakcija

pol- poliproteīns

PR - proteāzes domēns

RBIP - polimorfisma noteikšana ar retrotranspozonu insercijas amplifikāciju (*Retrotransposon Based Insertional Polymorphism*)

REMAP - polimorfisma noteikšana ar amplifikāciju starp retrotranspozonu un vienkāršo atkārtojumu (*Retrotransposon Microsatellite Amplificational Polymorphism*)

RH- ribonukleāze H (EC 3.1.26.13)

RT - reversā transkriptāze

SA - salicilskābe

SINE - īsie izkaisītie hromosomālie elementi (*Short Interspersed Nuclear Element*)

siRNS - mazie interferences RNS (*small interfering RNA*)

sRNS - mazie RNS (*small RNA*)

SSAP - sekvenču specifiskais amplifikācijas polimorfisms (*Sequence-Specific Amplification Polymorphism*)

SSR - vienkāršo atkārtojumu polimorfisms (*Simple Sequence Repeat*)

TE - transponējamais elements

TIR - terminālie invertētie atkārtojumi (*Terminal Inverted Repeats*)

tRNS - transporta RNS (*transfer RNA*)

TSD - integrācijas vietas duplikācijas (*Target Site Duplications*).

U3/U5 - 5' vai 3' retrotranspozona unikālais rajons (*Unique Region*)

UTR - gēna netranslētais rajons (*Untranslated Region*)

VLP - vīrusveidīgā daļiņa (*Virus Like Particle*)

## Satura rādītājs:

Kopsavilkums .....	2
Summary .....	4
Darbā izmantotie saīsinājumi:.....	6
Satura rādītājs: .....	8
Ievads .....	11
1. Literatūras apskats .....	13
1.1. Mobilo ģenētisko elementu klasifikācija .....	13
1.1.1. I klases (retrotranspozonu) TE klasifikācija un struktūra .....	14
1.1.2. II klases (DNS transpozonu) TE klasifikācija un struktūra .....	16
1.2. Retrotranspozonu struktūra un transpozīcijas mehānismi .....	17
1.2.1. LTR retrotranspozoni .....	17
1.2.2. LINE un SINE retrotranspozoni .....	20
1.2.3. DNS transpozonu struktūra un transpozīcijas mehānisms .....	22
1.3. TE izplatība augu genomos.....	24
1.3.1. TE izvietojums hromosomās (topoloģija).....	25
1.3.2. TE klāsterizācija un individuālas struktūrīpašības.....	26
1.3.3. Genoma izmēra evolucionārā loma .....	28
1.3.4. Genoma izmēra saistība ar TE proliferāciju .....	30
1.4. TE aktivēšanās stresoru ietekmē .....	31
1.4.1. Retrotranspozonu aktivēšanās.....	32
1.4.2. DNS transpozonu aktivēšanās.....	34
1.5. Retrotranspozonu regulatīvā nozīme .....	35
1.5.1. Retrotranspozonu ietekme uz gēnu darbību.....	36
1.5.2. Nekodējošo RNS producēšana.....	38
1.5.3. Nozīme heterohromatīna struktūras uzturēšanā.....	38
1.5.4. Reversās transkriptāzes loma augu genomā .....	40
1.6. Transpozīciju evolucionārā loma .....	40
1.7. Retrotranspozonu sekvenču izmantošana molekulāro marķieru izstrādei .....	42
1.8. Parastās priedes raksturojums .....	45
1.8.1. Skujkoku genoma raksturojums.....	45



1.8.2. Mobilo elementu saturs un raksturojums skujkoku genomos.....	46
1.8.3. Priedes genoma izmēra variācijas .....	48
1.8.4. Skujkoku molekulārā evolūcija un adaptācijas iespējas .....	49
2. Materiāli un metodes.....	51
2.1. TE-līdzīgo fragmentu diferenciālās ekspresijas identificēšana.....	51
2.1.1. Vispārējā eksperimentu struktūra .....	51
2.1.2. Stresa sensitīvo gēnu marķieru konstruēšana .....	52
2.1.3. Priedes rametu ģenētiskās vienveidības pārbaude ar SSR marķieriem.....	54
2.1.4. Stresa apstākļu inducēšana.....	55
2.1.5. Diferenciāli ekspresēto fragmentu identificēšana.....	56
2.1.6. Sekvenču analīze.....	59
2.1.7. TE-līdzīgo fragmentu ekspresijas kvantitēšana un salīdzināšana starp eksperimentiem...	61
2.2. Pilnizmēra retrotranspozonu izolēšana .....	64
2.2.1. Garās distances PĶR.....	64
2.2.2. Retrotranspozonu domēnu sekvenēšana .....	67
2.3. Priedes klonālās un dabīgās daudzveidības analīzes .....	69
2.3.1. Atšķirīgos topogrāfiskos apstākļos augošas priežu populācijas genotipēšana .....	69
2.3.2. Identificēto retrotranspozonu izplatība un daudzveidība kailsēkļos .....	72
3. Rezultāti .....	75
3.1. TE-līdzīgo fragmentu diferenciālās ekspresijas identificēšana.....	75
3.1.1. Karstuma stresa iniciācija .....	75
3.1.2. Priežu hermesa invāzija .....	78
3.1.3. Augu hormonu ietekme.....	81
3.2. Diferenciāli ekspresēto fragmentu analīze.....	85
3.2.1. Visu fragmentu salīdzinošā analīze .....	85
3.2.2. Identificēto TE-līdzīgo transkriptu struktūra .....	87
3.2.3. TE-līdzīgo transkriptu salīdzināšana.....	90
3.2.4. Himērisko transkriptu analīze .....	91
3.2.5. Hipotētisko proteīnu kodējošo gēnu identificēšana .....	94
3.3. TE-līdzīgo fragmentu ekspresijas analīze .....	95
3.3.1. TE specifisko fragmentu amplifikācija.....	95
3.3.2. Reālā laika PĶR .....	97

3.4. Pilnizmēra retrotranspozonu izolēšana .....	99
3.4.1. Garās distances PĶR rezultāti .....	100
3.4.2. Homologo TE izolēšana.....	102
3.4.3. TE izolēšana izmantojot BAC sekvenču analīzi .....	103
3.5. Priedes klonālās un dabīgās daudzveidības analīzes .....	109
3.5.1. Atšķirīgos apstākļos augošanas priekšu populācijas genotipēšana .....	109
3.5.2. Somaklonālās variācijas novērtēšana.....	116
3.6. Identificēto retrotranspozonu izplatība un daudzveidība kailsēkļos .....	119
3.6.1. Kailsēkļu filoģenētiskā analīze ar IRAP .....	119
3.6.2. Identificēto fragmentu izplatība kailsēkļu genomos .....	123
4. Diskusija .....	129
4.1. TE-līdzīgo transkriptu identificēšana.....	129
4.2. Stresa izsaukta TE-saistīto sekvenču ekspresija .....	130
4.3. Identificēto priekšu TE izplatība kailsēkļiem .....	134
4.4. Retrotranspozonu transkripcionālā un transpozicionālā aktivitāte .....	136
4.5. Kailsēkļu filoģenētiskā analīze .....	138
5. Secinājumi.....	140
6. Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes.....	142
7. Pateicības .....	143
Literatūras saraksts.....	144
1. Pielikums .....	177
2. Pielikums .....	198

## Ievads

Kopš mobilo ģenētisko elementu atklāšanas tie ilgus gadus tika uzskatīti par funkcionālās slodzes nenesošām sekvencēm, par parazītiem, kas savtīgos nolūkos pavairojas genomā izjaucot kodējošas gēnu sekvenses (Orgel, Crick 1980; Doolittle, Sapienza 1980; Kidwell, Lisch 2001). Taču šis uzskats mainījās līdz ar vairāku genomu sekvenēšanu un to detalizētiem pētījumiem. Tagad ir zināms, ka mobilo elementu sekvenses ir plaši izplatītas visu eikariotu, baktēriju un arheju genomos un, atšķirībā no konservatīviem gēniem, ievērojami variē gan pēc skaita, gan sastāva (Kazazian 2004, 2011). Mobilo ģenētisko elementu dalība gēnu regulācijā, hromosomu struktūru uzturēšanā un organismu evolūcijā pašlaik ir nepārprotama (Wessler 1996; Kumar, Bennetzen 1999; Kazazian 2004, Madlung, Comai 2004; Kazazian 2011; Rebollo 2012). Ar transponējamiem elementiem ir saistīti vairāki apvērsumi zinātnē. Atklājot mobilos elementus, mainījās uzskats par ģenētiskās informācijas stabilitāti (McClintock 1954). Reversās transkriptāzes atklāšana lika pārskatīt molekulārās ģenētikas centrālo dogmu par ģenētiskās informācijas vienvirziena plūsmu no DNS uz RNS (Baltimore 1995; Temin 1976). Nesen, līdz ar visa genoma transkriptoma pētījumiem atklājās, ka 80% no cilvēka genoma tiek transkribēts, lai gan tikai 1% no tā sastāda gēni (Ball 2013). Savukārt, transponējamie elementi (TE) sastāda 50% no cilvēka genoma un 31,4% no visām transkripcijas iniciācijas vietām lokalizējas TE (Rebollo 2012). Augu genomi satur ievērojami vairāk transponējamo elementu, to sekvenses var sastādīt līdz pat 90% no visa genoma dažiem liliju dzimtas pārstāvjiem (Feschotte *et al.* 2002).

Kailsēkļu grupas pārstāvju genomi atšķiras no vairākuma eikariotu ar genoma kompleksumu. Tāpēc pirmā kailsēkļu - parastās egles (*Picea abies*) - sekvence tika publicēta tikai 2013. gada pavasarī (Nystedt *et al.* 2013). Egles genoms satur daudzkopiju gēnu ģimenes, pseidogēnus, tam ir lieli starpgēnu un intronu rajoni. Visiem skujkokiem ir raksturīgs lēns evolūcijas process un tāpēc, atšķirībā no segsēkļiem, starp attāliem taksoniem novērots augsts genoma kolinearitātes līmenis. Priežu dzimtas pārstāvjiem ir raksturīgs stabili diploīds genoms ( $2n=24$ ), ap 50 pg liels, kur 70-75% no visa ģenētiskā materiāla ir atkārtotas sekvenses (Plomion *et al.* 2007). Svešappute, ilggadīgs dzīves cikls, liels nepārtraukts areāls, putekšņu migrācija lielos attālumos atstāj iespaidu uz priedes genoma ģenētisko daudzveidību un heterozigotāti. Atkārtoto sekvenču pamatā ir daudzveidīga mobilo ģenētisko elementu frakcija.

I klases TE jeb retrotranspozoni ir visplašāk pārstāvētā TE grupa augu genomos. Balstoties uz retrotranspozonu sekvencēm izveidotas vairākas molekulāro marķieru sistēmas. Retrotranspozoni

augu genomos parasti ir izplatīti, plaši sastopami, reprezentēti visās hromosomās, to insercijas ir neatgriezeniskas un raksturojas ar augstu polimorfisma līmeni. Šīs īpašības padara retrotranspozonus par vērtīgu izpētes objektu ar plašu praktiskās izmantošanas potenciālu. Pierādīts, ka rekombinācijas frekvence (Lucht *et al.* 2002) un mobilo elementu izsaukto mutāciju biežums genomā paaugstinās stresa apstākļos (McClintock 1984; Wessler 1996; Rebollo 2012). Tāpēc transpozīcija ir viens no ievērojamākajiem genoma nestabilitātes mehānismiem, kas iniciē pārkārtojumus un līdz ar to arī jaunu genotipu veidošanos, ļaujot pielāgoties mainīgajiem vides apstākļiem. Transpozoni var ietekmēt gēnu aktivitāti tiešā veidā transponējoties netālu no kodējošiem rajoniem un izjaucot tos, vai arī ietekmēt gēnu darbību ar savām regulatīvajām sekvencēm. Turklāt, retrotranspozoni var piedalīties regulatīvajos procesos ar RNS interferences mehānisma starpniecību, producējot dažāda tipa regulatīvās RNS molekulas. Transpozīcijas aktivitāte parasti genomā tiek nomākta izmantojot hromatīna modifikācijas, un abu mobilo elementu klašu aktīvie pārstāvji transponējas tikai stresoru ietekmē vai noteiktos attīstības posmos un specifiskos organisma audos. Pašlaik nav skaidrs, cik lielā mērā transpozīcijas izsauktā mutāģenēze ietekmē augus stresa apstākļos un atjaunošanas stadijā. Priedes genomā atrasti visu galveno TE ģimeņu pārstāvji, taču transkripcionāli vai transpozicionāli aktīvie TE nav aprakstīti. Tāpēc promocijas darba mērķis bija identificēt aktīvos retrotranspozonus parastās priedes (*Pinus sylvestris* L.) genomā un raksturot retrotranspozoniem-līdzīgo sekvenču transkripcijas līmeni dažādu stresa veidu ietekmē kontrolētos apstākļos. Mērķa sasniegšanai izvirīja darba uzdevumus:

1. Identificēt un raksturot ar retrotranspozoniem saistītus transkriptus ekspresētus karstuma ietekmē, priežu hermesa (*Pineus pini* L.) invāzijas ietekmē un pēc apstrādes ar abszcizskābi un salicilskābi.
2. Salīdzināt identificēto fragmentu ekspresiju pētamo stresoru ietekmē, kā arī noteikt to ekspresijas līmeni.
3. Noskaidrot identificēto fragmentu piederību himēriskiem transkriptiem vai pilna izmēra retrotranspozoniem. Izolēt pilna izmēra retrotranspozonu sekvences un raksturot to transkripcijas un transpozīcijas iespējas.
4. Izveidot *P.sylvestris* retrotranspozonu molekulāros marķierus un ar tiem raksturot dabīgas *P.sylvestris* audzes daudzveidību, kā arī analizēt priedes rametu somaklonālās variācijas iespējas.
5. Raksturot identificēto fragmentu un retrotranspozonu izplatību kailsēkļu genomos, kā arī analizēt retrotranspozonu izsaukto daudzveidību citu kailsēkļu genomos.

# 1. Literatūras apskats

## 1.1. Mobilo ģenētisko elementu klasifikācija

Transponējamie elementi (TE) vai arī mobilie ģenētiskie elementi ir DNS sekvenču, kas spēj mainīt savu lokalizāciju genomā (transponēties) vienas šūnas robežās. Dažādu ģimeņu TE ir plaši izplatīti eikariotu genomos un ir iesaistīti genoma restrukturizācijā, gēnu veidošanā, nevienādās homologās rekombinācijas un nerekiprokās krustmijas inducēšanā, un tādēļ uzskata, ka TE piedalās genoma evolūcijā (Wessler 1996; Kumar, Bennetzen 1999; Kazazian 2004). TE klasifikācija veikta pēc to transpozīcijas mehānismiem, TE struktūras īpašībām, proteīnu filoģenētiskajām analīzēm un ir dinamiska, jo līdz ar jauno transponējamo elementu raksturošanu tiek pārskatīta arī kopīgā klasifikācija (Finnegan 1989; Curcio, Derbyshire 2003; Capy 2005; Wicker *et al.* 2007). Pašlaik aprakstītas piecas proteīnu ģimenes, kas spēj vadīt transpozīcijas procesu: DDE transpozāzes, Y2 transpozāzes (t.s., ritošā cikla), tirozīna (Y) transpozāzes, S transpozāzes un reversās transkriptāzes un endonukleāzes kombinēta aktivitāte (Curcio, Derbyshire 2003). Lai īstenotu transpozīciju, šiem proteīniem DNS pārrāvumu un savienojumu veidošanai raksturīgi dažādi katalītiskie mehānismi. Atkarībā no šīm īpašībām, daži TE no donora lokusa tiek izgriezti DNS veidā, bet citi tiek kopēti (transkribēti) un pārnesti ar RNS molekulas starpniecību. Tādējādi sākotnējā mobilo elementu klasifikācijas sistēma sadalīja TE atkarībā no RNS vai DNS molekulu iesaistīšanas transpozīcijā, izšķirot divas mobilo ģenētisko elementu klases (Finnegan 1989). Šī sistēma joprojām tiek plaši lietota, taču, līdz ar liela apjoma dažādu organismu genomu sekvenēšanas projektiem, katrā no šīm klasēm atklājas daudz lielāka daudzveidība, sadalot tās kārtās, virsģimenēs un ģimenēs (Wicker *et al.* 2007). Patreiz abu klašu pārstāvju vidū ir atrasti autonomie TE, kas kodē transpozīcijai nepieciešamos proteīnus, un neautonomie TE, kas nesatur proteīnus kodējošas sekvenču, taču to sastāvā esošās regulatīvās sekvenču dod iespēju transponēties izmantojot autonomo TE proteīnus (Berg, Howe 1989; Flavell *et al.* 1994; Feschotte *et al.* 2002; Dewannieux *et al.* 2003). Gandrīz visi TE insercijas vietā veido integrācijas vietas duplikācijas (TSD). Pārsvarā mobilie ģenētiskie elementi ir zaudējuši savu spēju transponēties un tikai daži sugas specifiskie ģimeņu pārstāvji ir aktīvi, taču šī aktivitāte izpaužas organismam nelabvēlīgos apstākļos vai arī specifiskos audos un attīstības stadijās (McClintock 1984; Wessler 1996; Grandbastien *et al.* 1997; Kumar, Bennetzen, 1999; Capy *et al.* 2000).

### 1.1.1. I klases (retrotranspozonu) TE klasifikācija un struktūra

I klases mobilie ģenētiskie elementi vai retrotranspozoni (retropozoni\*) pēc savas struktūras un integrēšanās mehānisma ir līdzīgi retrovīrusiem, taču retrotranspozoni nespēj inficēt citas šūnas. Visi šīs klases pārstāvji izmanto RNS molekulas starpniecību ar sekojošu reverso transkripciju un komplementārās DNS integrāciju jaunajā genoma vietā. Tādēļ līdz ar retrotranspozonu pārvietošanos citā homosomas pozīcijā genomā notiek arī kopiju skaita palielināšanās. Eikariotu genomā ir atrodami provīrusi un hromosomālie retrotranspozoni, kā arī to sekvenču paliekas.

KLASIFIKĀCIJA		STRUKTŪRA	TSD	KODS	SATUR
KĀRTA	VIRSGIMENE				
I klase (retrotranspozoni)					
LTR	<i>Copia</i>	→ GAG AP INT RT RH →	4-6	RLC	P, M, F, O
	<i>Gypsy</i>	→ GAG AP RT RH INT →	4-6	RLG	P, M, F, O
	<i>Bel-Pao</i>	→ GAG AP RT RH INT →	4-6	RLB	M
	<i>Retrovirus</i>	→ GAG AP RT RH INT ENV →	4-6	RLR	M
	<i>ERV</i>	→ GAG AP RT RH INT ENV →	4-6	RLE	M
DIRS	<i>DIRS</i>	→ GAG AP RT RH YR ←	0	RYD	P, M, F, O
	<i>Ngaro</i>	→ GAG AP RT RH YR → → →	0	RYN	M, F
	<i>VIFER</i>	→ GAG AP RT RH YR → → →	0	RYV	O
PLE	<i>Penelope</i>	← RT EN →	V	RPP	P, M, F, O
LINE	<i>R2</i>	— RT EN —	V	RIR	M
	<i>RTE</i>	— APE RT —	V	RIT	M
	<i>Jockey</i>	— ORF1 — APE RT —	V	RIJ	M
	<i>L1</i>	— ORF1 — APE RT —	V	RIL	P, M, F, O
	<i>I</i>	— ORF1 — APE RT RH —	V	RII	P, M, F
SINE	<i>tRNA</i>	— — —	V	RST	P, M, F
	<i>7SL</i>	— — —	V	RSL	P, M, F
	<i>5S</i>	— — —	V	RSS	M, O

→ LTR

← TIR

— Kodējošs rajons

— Nekodējošs rajons

— Diagnostiska iezīme nekodējošā daļā

AP- aspartāzes proteīnāze, APE- apurīna endonukleāze, GAG- kapsīda domēns, RH- RNaze H, EN- endonukleāze, ENV- nukleokapsīda domēns, RT- reversā transkriptāze, ORF- atklātās translācijas fāze, YR- tirozīna rekombināze; Satur: P- augi, M- dzīvnieki, F- sēnes, O- citi

1. attēls. Retrotranspozonu klasifikācija (pēc Wicker et al. 2007).

\* Termins „Retropozons”, kuru sākotnēji definēja Rogers (1983), ir sinonīms plašāk lietotam „retrotranspozons”, taču dažreiz ar šo terminu apzīmē neautonomos retrotranspozonus vai arī retrotranspozonus bez LTR

Pēc vienotās TE klasifikācijas (Wicker *et al.* 2007) retrotranspozonus iedala kārtās, virsgimenēs un ģimenēs. Retrotranspozoni, kuri satur tiešos garos terminālos atkārtojumus, ietilpst LTR retrotranspozonu kārtā, elementi bez šī tipa atkārtojumiem tiek iedalīti autonomās LINE vai neautonomās SINE kārtās. Retāk sastopami elementi veido DIRS kārtu, kuras pārstāvjiem nav LTR un int vietā ir tirozīna rekombināzes gēns (Y-tipa transpozāze (Cursio, Debyshire 2003), kas veido cirkulāro cDNS), tādēļ šie elementi neveido tipiskos TSD integrācijas vietā un šo elementu transpozīcijas mehānisms ir atšķirīgs no LTR un LINE retrotranspozoniem (Cappello *et al.* 1985). Savukārt *Drosophila virilis* aprakstītajiem elementiem, kuri tiek pieskaitīti PLE jeb *Penelopes*-tipa elementu kārtai, elementu RT ir līdzīga telomerāzei, bet endonukleāze ir līdzīga bakteriālajam DNS labošanas sistēmas proteīnam *UvrC* (Evgen'ev *et al.* 1997; Piednoël *et al.* 2011).

Family: Metaviridae (3 Genera)	Family: Pseudoviridae (3 Genera)
<b>Genus: Errantivirus (10 Species)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Species: <i>Ceratitis capitata</i> Yoyo virus</li> <li>Species: <i>Drosophila ananassae</i> Tom virus</li> <li>Species: <i>Drosophila melanogaster</i> 17.6 virus</li> <li>Species: <i>Drosophila melanogaster</i> 297 virus</li> <li>Species: <i>Drosophila melanogaster</i> Gypsy virus</li> <li>Species: <i>Drosophila melanogaster</i> Idefix virus</li> <li>Species: <i>Drosophila melanogaster</i> Tirant virus</li> <li>Species: <i>Drosophila melanogaster</i> Zam virus</li> <li>Species: <i>Drosophila virilis</i> Tv1 virus</li> <li>Species: <i>Trichoplusia ni</i> TED virus</li> </ul>	<b>Genus: Hemivirus (8 Species)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Species: <i>Aedes aegypti</i> Moscopia virus</li> <li>Species: <i>Candida albicans</i> Tca2 virus</li> <li>Species: <i>Candida albicans</i> Tca5 virus</li> <li>Species: <i>Drosophila melanogaster</i> 1731 virus</li> <li>Species: <i>Drosophila melanogaster</i> copia virus</li> <li>Species: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ty5 virus</li> <li>Species: <i>Volvox carteri</i> Lueckenbuesser virus</li> <li>Species: <i>Volvox carteri</i> Osser virus</li> </ul>
<b>Genus: Metavirus (21 Species)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Species: <i>Arabidopsis thaliana</i> Athila virus</li> <li>Species: <i>Arabidopsis thaliana</i> Tat4 virus</li> <li>Species: <i>Bombyx mori</i> Mag virus</li> <li>Species: <i>Caenorhabditis elegans</i> Cer1 virus</li> <li>Species: <i>Cladosporium fulvum</i> T-1 virus</li> <li>Species: <i>Dictyostelium discoideum</i> Skipper virus</li> <li>Species: <i>Drosophila buzzatii</i> Osvaldo virus</li> <li>Species: <i>Drosophila melanogaster</i> 412 virus</li> <li>Species: <i>Drosophila melanogaster</i> Blastopia virus</li> <li>Species: <i>Drosophila melanogaster</i> Mdq1 virus</li> <li>Species: <i>Drosophila melanogaster</i> Mdq3 virus</li> <li>Species: <i>Drosophila melanogaster</i> Micropia virus</li> <li>Species: <i>Drosophila virilis</i> Ulysses virus</li> <li>Species: <i>Fusarium oxysporum</i> Skippy virus</li> <li>Species: <i>Lilium henryi</i> Del1 virus</li> <li>Species: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ty3 virus</li> <li>Species: <i>Schizosaccharomyces pombe</i> Tf1 virus</li> <li>Species: <i>Schizosaccharomyces pombe</i> Tf2 virus</li> <li>Species: <i>Takifugu rubripes</i> Sushi virus</li> <li>Species: <i>Tribolium castaneum</i> Woot virus</li> <li>Species: <i>Tripneustes gratilla</i> SURL virus</li> </ul>	<b>Genus: Pseudovirus (20 Species)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Species: <i>Arabidopsis thaliana</i> Art1 virus</li> <li>Species: <i>Arabidopsis thaliana</i> ATR1 virus</li> <li>Species: <i>Arabidopsis thaliana</i> Evelknievel virus</li> <li>Species: <i>Arabidopsis thaliana</i> Ta1 virus</li> <li>Species: <i>Brassica oleracea</i> Melmoth virus</li> <li>Species: <i>Cajanus cajan</i> Panzee virus</li> <li>Species: <i>Glycine max</i> Tgmr virus</li> <li>Species: <i>Hordeum vulgare</i> BARE-1 virus</li> <li>Species: <i>Nicotiana tabacum</i> Tnt1 virus</li> <li>Species: <i>Nicotiana tabacum</i> Tto1 virus</li> <li>Species: <i>Oryza australiensis</i> RIRE1 virus</li> <li>Species: <i>Oryza longistaminata</i> Retrofit virus</li> <li>Species: <i>Physarum polycephalum</i> Tp1 virus</li> <li>Species: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ty1 virus</li> <li>Species: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ty2 virus</li> <li>Species: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ty4 virus</li> <li>Species: <i>Solanum tuberosum</i> Tst1 virus</li> <li>Species: <i>Triticum aestivum</i> WIS-2 virus</li> <li>Species: <i>Zea mays</i> Hopscotch virus</li> <li>Species: <i>Zea mays</i> Sto-4 virus</li> </ul>
<b>Genus: Semotivirus (8 Species)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Species: <i>Anopheles gambiae</i> Moose virus</li> <li>Species: <i>Ascaris lumbricoides</i> Tas virus</li> <li>Species: <i>Bombyx mori</i> Pao virus</li> <li>Species: <i>Caenorhabditis elegans</i> Cer13 virus</li> <li>Species: <i>Drosophila melanogaster</i> Bel virus</li> <li>Species: <i>Drosophila melanogaster</i> Roo virus</li> <li>Species: <i>Drosophila simulans</i> Ninja virus</li> <li>Species: <i>Fugu rubripes</i> Suzu virus</li> </ul>	<b>Genus: Sirevirus (5 Species)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Species: <i>Arabidopsis thaliana</i> Endovir virus</li> <li>Species: <i>Glycine max</i> SIRE1 virus</li> <li>Species: <i>Lycopersicon esculentum</i> ToRTL1 virus</li> <li>Species: <i>Zea mays</i> Opie-2 virus</li> <li>Species: <i>Zea mays</i> Prem-2 virus</li> </ul>
	<b>Genus: Unassigned (1 Species)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Species: <i>Phaseolus vulgaris</i> Tpv2-6 virus</li> </ul>

2. attēls. *Pseudoviridae* un *Metaviridae* klasifikācija pēc Vīrusu taksonomijas 2012. gada izdevuma sagatavota ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses).

Pamatojoties uz augstu līdzības pakāpi hromosomālos LTR retrotranspozonus iekļāva kopīgā vīrusu klasifikācijas sistēmā (Boeke *et al.* 1998; Hull 2001). Pašlaik retrotranspozoni tiek klasificēti *Pseudoviridae* (*Ty1*, *Copia* tipa) un *Metaviridae* (*Ty3*, *Gypsy* tipa) vīrusu dzimtās, kas nav

pieskaitāmi nevienai no vīrusu kārtām (Boeke *et al.* 2006). *Hepadnaviridae*, *Metaviridae* un *Pseudoviridae* dzimtu pārstāvji ir radniecīgi *Retroviridae* dzimtas vīrusiem (retrovīrusiem), jo visi izmanto reverso transkripciju un vīrusa kapsīdu veido no gag-prekursora. *Pseudoviridae* (*Copia* virsgimene) atšķiras no pārējiem ar to, ka tiem nav env-līdzīga gēna un ir atšķirīga domēnu secība poliproteīnā (1. attēls). *Pseudoviridae*, *Metaviridae*, un *Retroviridae* dzimtu pārstāvjiem raksturīgi provīrusa formu saturoši garie terminālie atkārtojumi (LTR), proteāze, Rnāze H, int, kā arī gēnu ekspresija vienotā poliproteīna formā izmantojot tRNS praimerus. Taču, lai gan *Pseudoviridae* un *Metaviridae* dzimtu pārstāvji ir radniecīgi retrovīrusiem, to struktūra ir vienkāršāka. Tādēļ hromosomālo retrotranspozonu ģimenes pārstāv primitīvāku vīrusu formu un *Retroviridae* dzimtas pārstāvji, iespējams, ir radušies no *Metaviridae*, iegūstot ligandus kodējošos gēnus. Šī hipotēze saskan arī ar augsto daudzveidības pakāpi, kas novērojama hromosomālo retrotranspozonu vidū (Boeke *et al.* 2006). *Metaviridae* dzimtā ir trīs ģintis: *Errantivirus*, *Metavirus*, *Semotivirus*. Arī *Pseudoviridae* dzimtā ir trīs ģintis: *Hemivirus*, *Pseudovirus*, *Sirevirus* (2. attēls).

### 1.1.2. II klases (DNS transpozonu) TE klasifikācija un struktūra

II klases mobilajiem ģenētiskajiem elementiem pieskaita, t.s., DNS transpozonus. Šajā klasē ietilpst pirmie atklātie TE. 1954. gadā ASV zinātniece Barbara McClintock publicēja rakstu par kontrolējošiem elementiem kukurūzas genomā, jo tie izsauca ar Mendēļa likumiem nesaistītu fenotipisku (grauda iekrāsojuma) variāciju. DNS transpozoni tiek izgriezti no vienas vietas genomā un ievietoti citā neizmantojot RNS starpniecību. DNS transpozonus iedala atkarībā no tā, cik DNS pavedienu donora lokusā sašķeļ ar nukleāzi.

Pirmā apakšklase satur elementus, kas pilnībā izgriežas (tiek šķelti DNS dubultspirāles abi pavedieni). Šajā grupā ietilpst plaša TIR elementu kārta ar deviņām virsgimenēm, kas satur dažāda garuma TSD un TIR (Wicker *et al.* 2007). Šīs grupas elementu kopiju skaits genomā palielinās, ja transpozīcija notiek hromosomu replikācijas laikā no pozīcijas, kas jau tika replicēta uz citu, kurā replikācija vēl nav notikusi (Greenblat, Brink, 1962), vai arī iesaistoties DNS dubultspirāles pārrāvumu reparācijā (Nassif *et al.* 1994). Otrā DNS transpozonu apakšklasē ir iekļauti daudzveidīgi elementi, kas transponējoties sašķeļ tikai vienu DNS pavedienu. Helitronu kārtas TE (satur Y2-tipa transpozāzi) transponējas izmantojot ritošā cikla mehānismu un neveido TSD. Turklāt šie elementi iekļauj sevī dažādu gēnu daļas, kas dažos gadījumos transkribējoties var veidot himēriskas molekulas (Morgante *et al.* 2005; Du *et al.* 2009; Yang *et al.* 2009). Maverick kārtas TE augiem nav atrasti (3. attēls).



II klases (DNS transpozoni)- 1. apakšklase		STRUKTŪRA	TSD	KODS	SASTOP
TIR	<i>Tc1-Mariner</i>		TA	DTT	P,M,F,O
	<i>hAT</i>		8	DTA	P,M,F,O
	<i>Mutator</i>		9-11	DTM	P,M,F,O
	<i>Merlin</i>		8-9	DTE	M,O
	<i>Transib</i>		5	DTR	M,F
	<i>P</i>		8	DTP	P,M
	<i>PiggyBac</i>		TAA	DTB	M,O
	<i>PF-Harbinger</i>		3	DTH	P,M,F,O
	<i>CACTA</i>		2-3	DTC	P,M,F
Crypton	<i>Crypton</i>		0	DYC	F
II klases (DNS transpozoni)- 2. apakšklase					
Helitron	<i>Helitron</i>		0	DHH	P,M,F
Maverick	<i>Maverick</i>		6	DMM	M,F,O



TIR



Kodējošs rajons



Nekodējošs rajons



Rajons, kas satur papildus ORF

Tase- transpozāze (\*ar DDE motīvu), ORF- atklātās translācijas fāze, YR- tirozīna rekombināze, RPA- replikācijas proteīns A (tikai augiem), HEL-helikāze, ATP- iepakojšanā iesaistīts ATPāzes vieta, CYP- cisteīna proteāze, POL B- DNS polimerāze B, Y2- tirozīna rekombināze ar YY motīvu. Sastop: P-augi, M-dzīvnieki, F-sēnes, O-citi

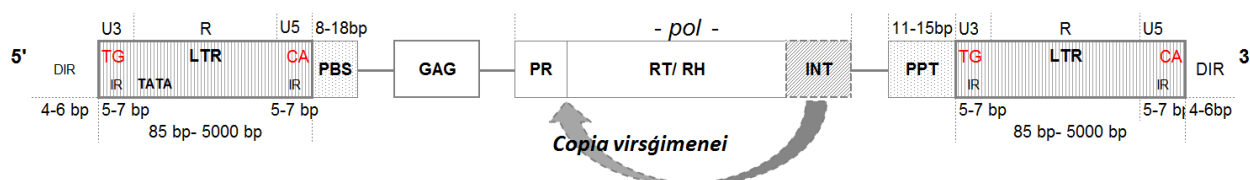
3. attēls. DNS transpozonu klasifikācija (pēc Wicker et al. 2007).

## 1.2. Retrotranspozonu struktūra un transpozīcijas mehānismi

### 1.2.1. LTR retrotranspozoni

Pašlaik ir aprakstīti ļoti dažādi LTR retrotranspozonu kārtas pārstāvji. Tie satur tiešos atkārtojumus no abām pusēm (LTR), kuru garums var sastādīt no 85 bp visīsākajam elementam, kura kopējais garums sastāda 292 bp (*FRetro129* rīsu genomā, Gao et al. 2012), līdz pat piecām kilobāzēm visgarākajam elementam ar kopējo garumu virs 22 kb (*Ogre* zirņu genomā, Neumann et al. 2003). LTR ir proteīnus nekodējoša sekvence, kas satur iekšējo domēnu transkripciju regulējošas sekvenses. LTR ir specifisks katrai retrotranspozonu ģimenei, bet pat vienas ģimenes robežās LTR var saturēt mutācijas, kuru daudzums ir saistīts ar elementa evolucionāro vecumu. Tikko transponētiem elementiem flankējošie LTR ir identiski. Taču salīdzinot dažādu ģimeņu pārstāvju LTR ir iespējams atrast konservatīvas sekvenses, kas atbild par noteiktu funkciju izpildi. Nesen veiktā pētījumā apstiprināja LTR konservatīvo sekvenču saturu izmantojot statistisku Markova modeli (*Hidden Markov model*) un salīdzināja to *Pseudoviridae*, *Metaviridae* un *Retroviridae*

dzimtām (Benachenhou *et al.* 2013). 4. attēlā ir parādīti LTR retrotranspozonu struktūrelementi. Ir izšķiramas šādas viskonservatīvākās LTR sekvenču: aptuveni 7 bp gari invertētie atkārtējumi (IR) ar īpaši konservatīviem 5' TG un 3' CA nukleotīdiem (int piesaistes vieta), TATATA motīvs, kurš pilda polimerāzes II promotera funkciju un ir īpaši konservatīvs augu retrotranspozoniem (Vicient *et al.* 2005; Benachenhou *et al.* 2013). Dažas no LTR TE grupām, LTR satur arī poliadenilēšanas signālu. GT-saturošs rajons, kurš atrodas LTR U5 rajonā un ir īpaši konservatīvs dzīvnieku retrotranspozoniem no *Metaviridae* (Benachenhou *et al.* 2013). U3 rajons vairāk variē dažādās TE grupās, kas ir skaidrojams ar to, ka šajā rajonā atrodas specifiskas transkripciju regulējošas sekvenču (nodrošina ekspresiju noteiktos audos/ apstākļos/ attīstības stadijā). Atkārtējuma LTR rajons ir ļoti variējošs.



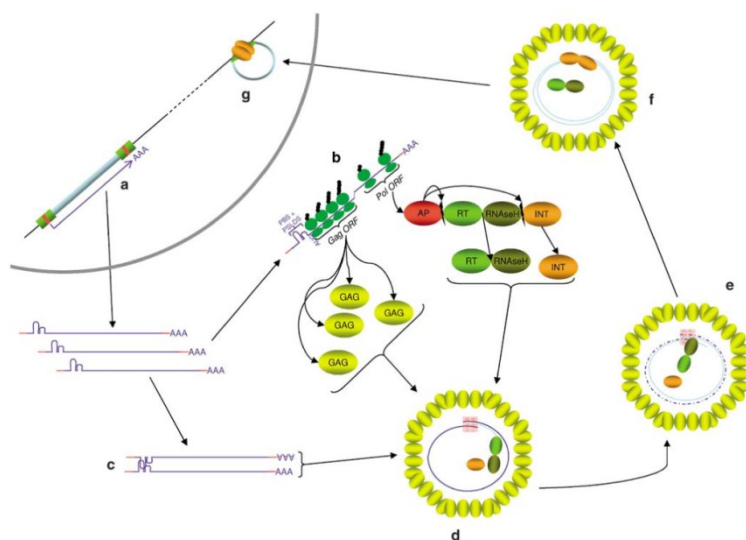
#### 4. attēls. Tipiska LTR retrotranspozona struktūra ar norādītām konservatīvām daļām.

5' LTR uzsākas TE transkripcija, bet beidzas 3' LTR atkārtojumā (Kumar, Bennetzen, 1999). Tā kā 5' un 3' LTR ir vienādi, tad 3' LTR var iniciēt blakus novietoto sekvenču transkripciju. Šis jautājums ir pētīts dažādu vīrusu un to provīrusu gadījumā, tika noskaidrots, ka vīrusiem 3'LTR promotera aktivitāte parasti ir nomākta, bet var tikt aktivēta 5' LTR regulatīvo sekvenču izjaukšanas gadījumā (Boerkoel, Kung 1992; Gama Sosa *et al.* 1994; Klaver, Berkhout 1994).

Transkripcijas rezultātā veidojas TE mRNS molekula, kurā ir: 5'-R-U5-PBS- kodējošais rajons - PPT-U3-R-3', kur R ir atkārtējums, PBS - praimeru piesaistes vieta, kodējošais rajons var saturēt poliproteīnu (pol) ar gag, PR, RT/RH, int, env domēniem, PPT - polipurīna sekvenču, U5 un U3 (unikālās 5' un 3' sekvenču) (Kumar, Bennetzen 1999). Transkripts tiek transportēts no kodola uz citoplazmu, kur, ja transkriptam ir introns, var notikt arī daļēja RNS nobriešana (splaisings) (Neumann *et al.* 2003; Steinbauerová *et al.* 2008). TE mRNS var notikt arī kodējošo domēnu splaisings, veidojot īsākus transkriptus tikai ar gag vai env domēniem, kas veicina intensīvāku šo proteīnu ekspresiju salīdzinājumā ar transpozīcijai mazākā daudzumā nepieciešamajiem poliproteīniem (Brierley, Flavell 1990; Vicient *et al.* 2001). Autonomie elementi parasti satur divus gēnus *gag* un *pol*; *gag* gēns kodē kapsīdam-līdzīgus proteīnus, bet *pol* gēns kodē poliproteīnu, kurš

turpmāk tiek sašķelts ar paša kodētu proteāzi (PR), veidojot reverso transkriptāzi ar RNāzes H aktivitāti (RT/RH) un integrāzi (int). Env-līdzīgu domēnu var saturēt gan *Pseudoviridae*, gan *Metaviridae* pārstāvji (Eickbush, Malik 2002). Šī proteīna funkcija retrotranspozoniem līdz galam nav skaidra, jo sekvenču ievērojami variē un tikai dažos gadījumos ir līdzīga retrovīrusu env domēnam (Havecker *et al.* 2004). Vairāki env-līdzīgi proteīni pilda transmembrānas proteīna funkcijas (līdzīgi kā retrovīrusiem); iespējams, retrotranspozoniem šis proteīns nodrošina transportu starp dažādiem viena organisma audiem vai transportu starp kodolu un citoplazmu, vai arī pilda čaperona proteīna funkciju, veicinot replikāciju. Retrotranspozoni var saturēt papildus ORF. Piemēram, rīsu *RIRE2* pirms gag domēna satur papildus ORF ar nezināmu funkciju (Kumekawa *et al.* 1999). Retrotranspozoni var saturēt ORF, kas var būt transkribēti abos virzienos. Ir aprakstīti gadījumi, kad retrotranspozons iegūst gēna daļas, kas, iespējams, neietekmē retrotranspozona dzīves ciklu. Piemēram, kukurūzas *Bs1* retrotranspozons satur ATPāzes gēna daļu (Jin, Bennetzen 1994).

Citoplazmā mRNS transkripti tiek izmantoti gan par matricu proteīnu veidošanai, gan reversajai transkripcijai dubultspirāles cDNS sintēzei, kas tiek transportēta atpakaļ uz kodolu un integrēta citā vietā tajā pašā vai citā hromosomā.



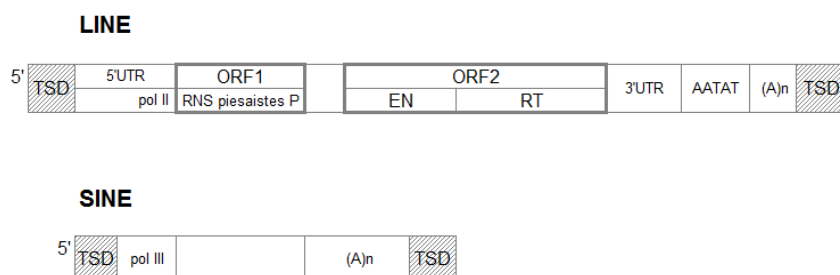
5. attēls. Teorētisks VLP veidojoša LTR retrotranspozona dzīves cikls (Sabot, Schulman 2006) a) mRNS transkripcija; b) gag un pol proteīnu translācija; c) RNS dimerizācija pirms iepakojšanas; d) RNS iepakojšana un vienpavediena DNS sintēze, izmantojot reversās transkripcijas mehānismu; e) RNS matricas degradācija un otrā DNS pavediena sintēzes uzsākšana; f) dubultspirāles DNS sintēzes beigas, int piesaiste pie LTR; g) hromosomālās DNS šķelšana ar EN un izveidotās TE DNS integrācija jaunajā pozīcijā.

Daži LTR retrotranspozonu pārstāvji šūnas citoplazmā spēj veidot vīrusiem līdzīgas daļiņas, kurās līdzīgi kā vīrusiem notiek reversā transkripcija (Yoshioka *et al.* 1990; Jääskeläinen *et al.* 1999; Beliakova-Bethell *et al.* 2006) (5. attēls). LTR retrotranspozonu gag prekursors satur retrovīrusiem līdzīgus kapsīda un nukleokapsīda domēnus, taču vīrusu matricas domēnam ir salīdzinoši zema līdzība (Jääskeläinen *et al.* 1999). gag polimerizācijas rezultātā veidojas vīrusiem-līdzīgās daļiņas, kur tiek iepakots specifiskais retrotranspozona mRNS, kurš, iespējams, līdzīgi retrovīrusiem tiek atpazīts pēc specifiska signāla (PSI), kas atrodas pēc PBS un pirms pirmā ORF (Sabot, Schulman 2006). PBS ir praimera piesaistes vieta uz mRNS molekulas, kura parasti ir komplementāra šūnas tRNS molekulas 3' galam. Vīrusu un retrotranspozonu reversās transkripcijas iniciācijai tiek izmantotas dažāda tipa tRNS un komplementaritātes PBS rajons ir īsāks (8-12 bp) (Mak, Kleiman 1997). Retrotranspozoniem parasti tie ir: tRNA<sup>met</sup>, tRNA<sup>asn</sup>, tRNA<sup>ser</sup>, tRNA<sup>lys</sup>. Salīdzinot ar citiem regulatīvajiem motīviem, PBS vairāku retrotranspozonu ģimeņu vidū ir ļoti konservatīvs (Kalendar *et al.* 2010). Starp PBS un tRNS notiek hibridizācija, veidojot īsu dubultpavediena RNS rajonu ar brīvu 3' hidroksilgrupu, kuru RT var izmantot par iniciācijas praimeri uzsākot DNS sintēzi. RT RH aktivitāte sašķēļ RNS molekulu jebkurā RNS:DNS hibridā, atbrīvojot uzsintezēto vienpavediena DNS ar atkārtojuma sekvenci, kas ir atrodama abos transkripta galos. Hibridizācija starp šīm komplementārajām atkārtojuma sekvencēm veido cirkulāro DNS molekulu, kas ļauj RT pārlēkt un turpināt otra DNS pavediena sintēzi no PPT saita, par praimeri izmantojot degradētās RNS paliekas (Wilhelm, Wilhelm 2001). Reversās transkripcijas laikā var notikt RT pārlēkšana arī uz citu RNS matricu (parasti starp šī paša elementa, vai tās pašas ģimenes neautonomā elementa, bet ir iespējama nesaistītā mRNS iepakšana ar līdzīgiem PSI signāliem), kā rezultātā var veidoties himēriskas molekulas, kas satur vairākus LTR un kodējošas sekvences, bet flankētas ar vienu TSD (Vicient *et al.* 2005; Sabot *et al.* 2005; Sabot, Schulman 2007). Pēc dubultspirāles DNS sintēzes, pie TE LTR piesaistās integrāze. VLP piesaistās pie kodola un atbrīvo DNS-int kompleksu, kurš piesaistās un integrējas hromosomālās DNS pārrāvumā, ko izveido EN. Šūnas DNS reparācijas sistēma liģē integrēto TE kopiju jaunajā hromosomas vietā (5. attēls).

### 1.2.2. LINE un SINE retrotranspozoni

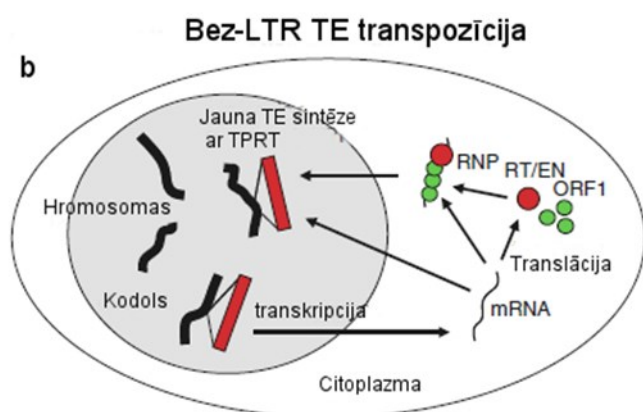
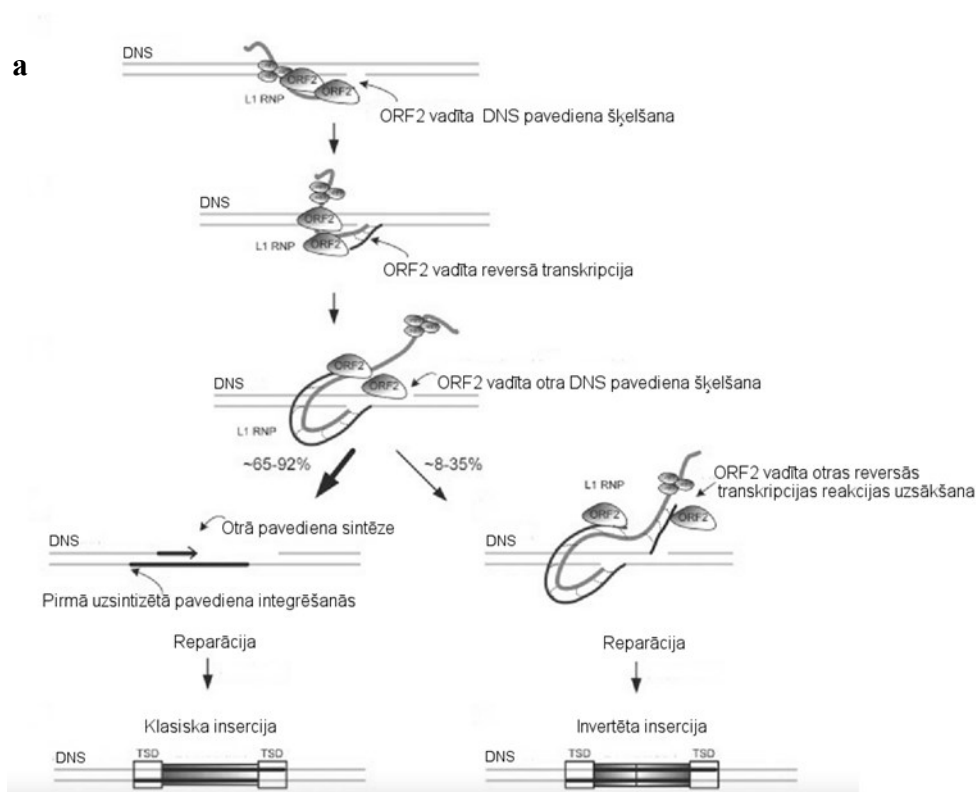
Bez LTR LINE un SINE elementi dominē zīdītāju genomos, kur tie nosaka ievērojamu daļu no indivīdu specifiskajām atšķirībām (Xing *et al.* 2009; 1000 Genomes Project Consortium 2012). SINE elementi pārsvarā ir īsi (90 bp - 300 bp) un, iespējams, ir cēlušies no dažādiem tRNS vai 7SL RNS (signāla atpazīšanas RNS) gēniem, zaudējot iekšējo kodējošo sekvenci, piemēram, kā *Alu* elementi cilvēka genomā (Ullu, Tschudi 1984). Atšķirībā no citiem retrotranspozoniem, SINE

elementi raksturojas ar iekšējo polimerāzes III promoteri netālu no 5' gala. Autonomie LINE ir gari, aptuveni 1-8 kb elementi, kas satur divus ORF, kas tiek transkribēti bicistroniskā mRNS molekulā ar poli(A) asti (6. attēls). ORF1 kodē RNS piesaistes proteīnu, bet ORF2 - endonukleāzi un RT. LINE transkripcijas polimerāzes II promoteris atrodas elementu 5' UTR galā.



#### 6. attēls. LINE un SINE struktūra.

LINE un SINE transponējas izmantojot mērķa piesaistes reverso transkripcijas TPRT mehānismu (*Target Primed Reverse Transcription*) (Luan *et al.* 1993). Sākumā elements tiek transkribēts un mRNS tiek transportēts uz citoplazmu, kur notiek turpmākā proteīnu translācija. Retrotranspozona RNS transkripts citoplazmā izveido ribonukleoproteīna kompleksu (RNP) ar ORF1 un ORF2 proteīniem (7. attēls). Šis komplekss ir cieši saistīts ar stresa granulām, kuru funkcija pašlaik nav skaidra (Goodier *et al.* 2007). Endonukleāzes domēns šķel hromosomu un rezultātā veidojas brīva 3' hidroksilgrupa, kura ar RT tiek izmantota par praimeru turpmākai cDNS polimerizācijai no TE RNS kopijas jaunajā vietā (Cost *et al.* 2002). Tad ORF2 EN šķel otro DNS pavedienu. Vairumā gadījumu sākumā insertējas pirmais uzsintezētais vienpavediena TE DNS izveidotajās šķelšanas vietās un pēc tam notiek otrā DNS pavediena sintēze (7. attēls a). Rezultātā veidojas klasiska LINE insercija ar TSD galos un bieži nepabeigtu 5' galu. Aptuveni 35% gadījumos (cilvēku *L1* gadījumā) pēc otrā DNS pavediena šķelšanas, otra ORF2 molekula uzsāk vēl vienu reversās transkripcijas reakciju, kā rezultātā veidojas invertēta LINE insercija (7. attēls a) (George *et al.* 1996). Daži neautonomie SINE elementi var insertēties LINE producētajās šķelšanas vietās. Papildus, izmantojot šo mehānismu, šķelšanas vietās var insertēties gēnu mRNS transkripti, veidojot t.s. producētos pseidogēnus (Esnault *et al.* 2000; Maestre *et al.* 1995). Otrā DNS pavediena šķelšanās, RNS degradācija, komplementārā DNS pavediena sintēze vēl nav līdz galam izpētīti un demonstrēti *in vivo* (Babushok, Kazazian 2007). Šķelšanas vietu reparācija notiek izmantojot šūnas proteīnus (Luan *et al.* 1993; Babushok, Kazazian 2007).

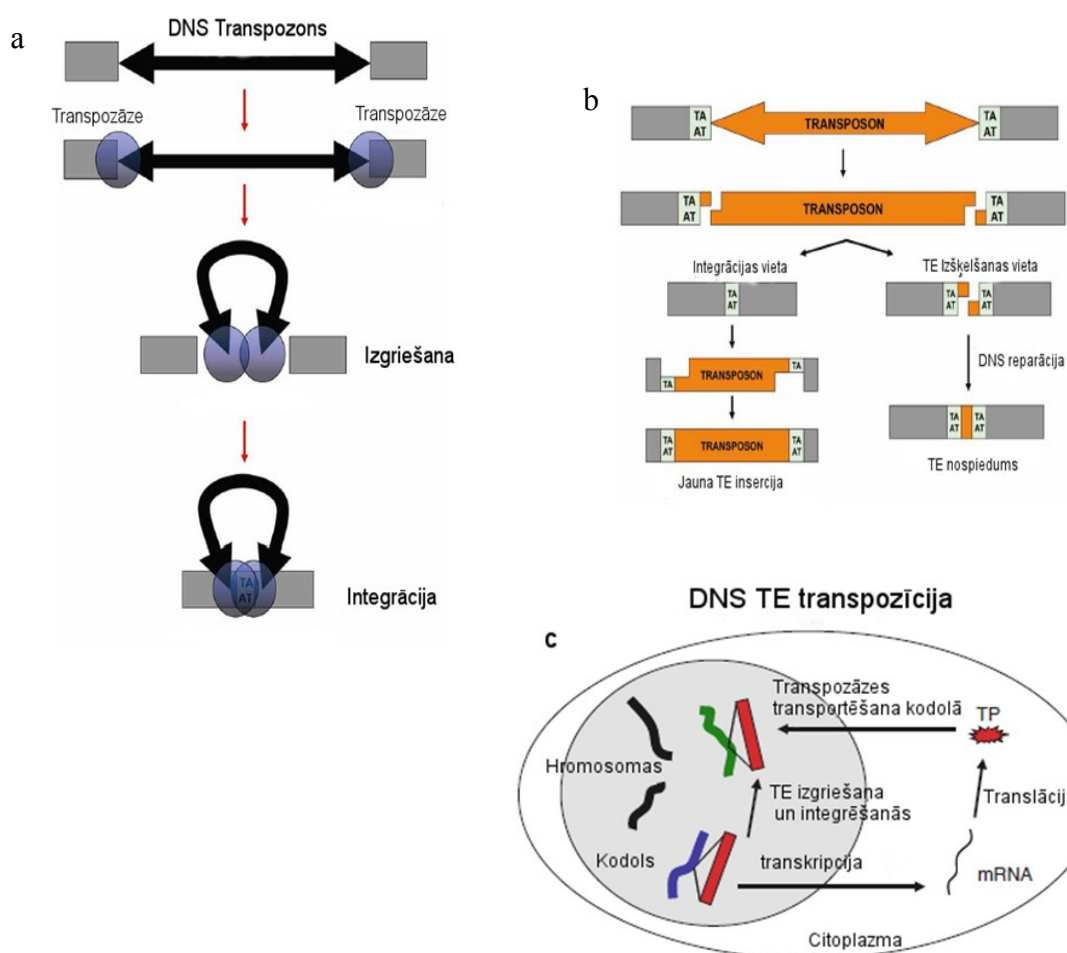


7. attēls. L1 LINE transpozīcijas mehānisms (a) mērķa piesaistes reversās transkripcijas mehānisms, TPRT (pēc Babushok, Kazasian 2007), (b) bez-LTR retrotranspozonu dzīves cikls (pēc Kejnovsky et al. 2012).

### 1.2.3. DNS transpozonu struktūra un transpozīcijas mehānisms

Kā tika minēts iepriekš, DNS transpozoniem ir raksturīgs kardināli atšķirīgs transpozīcijas veids, kurā TE DNS tiek izgriezts no donora lokusa un pārvietots citā. Pēc savas struktūras šie elementi ir samērā vienkārši, tie ir sastopami arī baktēriju genomos (piemēram, IS elementi).

Autonomie DNS transpozoni satur dažāda tipa transpozāzes gēnu (1-5 kb), kurš ir norobežots ar termināliem invertētiem atkātojumiem 17-1100 bp (TIR). TIR kalpo par transpozāzes atpazīšanas signāliem, kas ļauj precīzi izgriezt transpozona sekvenci. Neautonomie DNS transpozoni, piemēram, īsi 80-500 bp MITE elementi, satur TIR un insercijas vietas TSD, taču tiem nav kodējošo sekvencu (Bureau, Wessler 1992).



8. attēls. DNS transpozīcijas mehānisms (a) transpozāzes mediēta DNS TE izgriešana un integrācija, (b) DNS TE nospiedumu un TIR veidošanās (modificēts no Munoz-Lopez, Garcia-Perez 2009), (c) DNS TE dzīves cikls (modificēts no Kejnovsky et al. 2012).

Transpozāze sastāv no diviem domēniem: aminoterminālā domēna ar HTH motīvu (*helix-turn-helix*), kurš nepieciešams TIR piesaistei, un karboksilterminālā domēna ar katalītisko DDD vai DDE motīvu. Papildus, transpozāze satur NLS (*Nuclear Localization Signal*) signālu, kas nepieciešams transportam kodolā (Brillet et al. 2007). Transpozīcijai nepieciešamie proteīni tiek ekspressēti un transportēti kodolā. Divas transpozāzes molekulas atpazīst transpozona TIR uz hromosomas DNS un piesaistās pie šīm sekvencēm ar HTH motīvu. Abas transpozāzes sašķeļ 5' TIR

galus hidrolizējot DNS fosfodiesterasites. Transpozāzes molekulas savienojas veidojot dimēru, šajā mirklī notiek 3' galu fosfodiesterasaišu hidrolīze, veidojot TE brīvas 3' hidroksilgrupas. Komplekss atbrīvojas no donora vietas un piesaistās integrācijas vietai, kas ir specifiska transpozāzei, piemēram, TA dinukleotīds. 5' integrācijas vietas DNS pakļaujas transpozona 3' OH grupas nukleofilai piesaistei. Plaisu aizpilda šūnas reparācijas proteīni, veidojot TSD, kas norobežo jaunu integrācijas vietu (8. attēls).

Izņemot transpozīcijas pārrāvumu reparāciju, DNS transpozonu transpozīcija ir neatkarīga no saimniekorganisma šūnas proteīniem vai kofaktoriem, un šo elementu transpozīciju veic *in vitro* (Lampe *et al.* 1996; Tosi, Beverley 2000). Ir izdevies rekonstruēt dažu neaktīvo DNS transpozonu aktivitāti, piemēram, *Sleeping Beauty (SB)* no zivs genoma (Ivics *et al.* 1997). *SB* preferenciāli transponējas heterohromatīna rajonos vai intronu sekvencēs TA dinukleotīdos (Ikeda *et al.* 2007). *SB* elementu plaši izmanto zīdītāju gēnu funkciju pētījumos, jo ar *SB* inserciju ir iespējams izjaukt gēna sekvenci, to inaktivējot (Izsvák, Ivics 2004; Carlson, Largaespada 2005; Dupuy 2010). *SB* izmanto arī transgēnu integrēšanai dzīvniekos (ģenētiski modificēto organismu veidošanā), vai arī cilvēka gēnu terapijā dažu slimību apkarošanai, lai novērstu imūnās sistēmas reakcijas problēmas, kas rodas izmantojot vīrusu tipa vektorus (Izsvák, Ivics 2004; Hackett *et al.* 2005; Aronovich *et al.* 2011).

### 1.3. TE izplatība augu genomos

Mobilu ģenētisko elementu saturs dažādu eikariotu genomos ievērojami variē gan pēc izplatītāko TE pārstāvniecības un satura noteiktas sugas genomā, gan pēc to pārstāvju aktivitātes (Wessler 2006a). Rauga (*Saccharomyces cerevisiae*) genoms satur tikai LTR retrotranspozonus, kamēr zīdītāju genomā ir izplatīti bez-LTR retrotranspozonu virsgimenes pārstāvji. Augu genomi (gan vairāk izpētīto segsēkļu, gan kailsēkļu), satur TE elementus no abām klasēm ar LTR retrotranspozonu virsgimenes pārstāvju ievērojamu pārsvaru (Kumar, Bennetzen 1999). Sugas specifiska un ļoti atšķirīga var būt arī TE aktivitāte. Kukurūzas (*Zea mays*), augļu mušas (*Drosophila melanogaster*), nematodes (*Caenorhabditis elegans*) genomi satur vairākas evolucionāri jaunas un joprojām aktīvas TE ģimenes. Vairāku segsēkļu genomi (rīsi, kukurūza, mieži un kvieši) ir t.s. TE vadītā genoma dažādošanas stadijā, kurā piedalās gan I, gan II klases TE (Wessler 2006b). Savukārt, zīdītāju genomi satur ievērojami mazāk aktīvo TE ģimeņu, tomēr šī aktivitāte starp sugām variē.

Augu genomiem retrotranspozonu sekvences un to izplatība variē un var sastādīt no 15% (*Arabidopsis thaliana*) līdz pat 90% (*Liliacea*) no visa genoma lieluma (Sabot, Schulman 2006; Morgante *et al.* 2007). Kompleksie augu genomi raksturojas ar t.s. kodējošo gēnu salām atkārtojumu jūrā (SanMiguel *et al.* 1996; Panstruga *et al.* 1998; Shirasu *et al.* 2000; Rostoks *et al.* 2002;



Kejnovsky *et al.* 2012). Augu sugām ar mazu genomu gēnu rajoni ir gari, bet atkārtējumi pārsvarā aizpilda hromosomu pericentromēru rajonus. Pretēji, augos ar lielu genomu, viens gēnu rajons satur ap diviem gēniem un aizņem mazāk par 10 kb, taču starpgēnu rajoni ir no 20 līdz 100 kb gari (Bennetzen *et al.* 1994; Wicker *et al.* 2001; Schnable *et al.* 2009). Piemēram, kukurūzas genoms (2.3 gbp) satur aptuveni 85% TE, no kuriem 75% pieder LTR retrotranspozoniem (Schnable *et al.* 2009). Aptuveni 40 000 gēnu atrodas starp vairāk kā 1 miljona TE sekvencēm, piederošām aptuveni 1300 dažādām ģimenēm. Līdzīga genoma organizācija ir atrasta visiem līdz šim sekvenētajiem kompleksajiem augu genomiem.

### 1.3.1. TE izvietojums hromosomās (topoloģija)

Augiem starpgēnu rajoni pārsvarā sastāv no LTR retrotranspozonu sekvenču klāsteriem, bet gēnu tuvumā vai arī intronos biežāk ir sastopami II klases TE, piemēram, MITE (Bureau, Wessler 1992; Jiang, Wessler 2001; Yang *et al.* 2007), *Mutator* (Dietrich *et al.* 2002; Liu *et al.* 2009), vai arī īsie neautonomie retroelementi, tādi kā SINE (Wei *et al.* 2009), TRIM (Witte *et al.* 2001). Īpaši augsts retrotranspozonu sekvenču blīvums ir hromosomas pericentromēru, subtelomēru, kā arī konstitutīvā heterohromatīna rajonos (Miller *et al.* 1998; Lippman *et al.* 2004; Kejnovsky *et al.* 2012). Tomēr, katra TE izplatība genomā ir specifiska un tiek pētīta atsevišķi izmantojot TE elementu sekvenču *in situ* hibridizāciju hromosomām metafāzes stadijā. *Copia Ty1* retrotranspozonu RT izplatība dažādu augu sugu vidū ar reti izņēmumiem ir vienmērīga visu hromosomu garumā (Heslop-Harrison *et al.* 1997). Viena no kopīgām iezīmēm, kas ir raksturīga arī *Arabidopsis* genomam, ir, ka *Copia* kārtas retrotranspozoni biežāk ir vienmērīgi izkaisīti pa visu hromosomu, kamēr *Gypsy* kārtas elementi biežāk lokalizējas pericentromēru un subtelomēru rajonos (Pereira 2004). Kukurūzas genomā daudzās kopijās esošie LTR kārtas elementi ir atrodami starpgēnu rajonos, kamēr bez-LTR kārtas pārstāvji ar zemāku kopiju skaitu lokalizējas gēnu rajonos (Baucom *et al.* 2009a).

TE izvietojums hromosomās ir atkarīgs no vairākiem faktoriem, tādiem kā TE preferenciālā integrēšanās noteiktajās sekvencēs, rekombināciju biežums, gēnu blīvums utt. Arī dabiskās izlases rezultātā genomā paliek neitrālas vai jebkādas priekšrocības sniežošanas insercijas, kamēr destruktīvas insercijas tiek ātri likvidētas. Tāpēc vairums aktīvo TE preferenciāli insertējas heterohromatīna rajonos ar zemu gēnu blīvumu vai arī gēnu UTR daļās, neizjaucot kodējošo gēnu sekvenci un tādējādi nekaitē organisma funkciju izpildei. TE preferenciālas insercijas efekts ir izteikts jauniem un joprojām aktīviem elementiem, turpretim rekombinācijas procesi ietekmē evolucionāri vecus TE. Interesanti, ka pastāv konservatīvi gēnu rajoni, kur nav TE inserciju, piemēram, augiem tādi ir

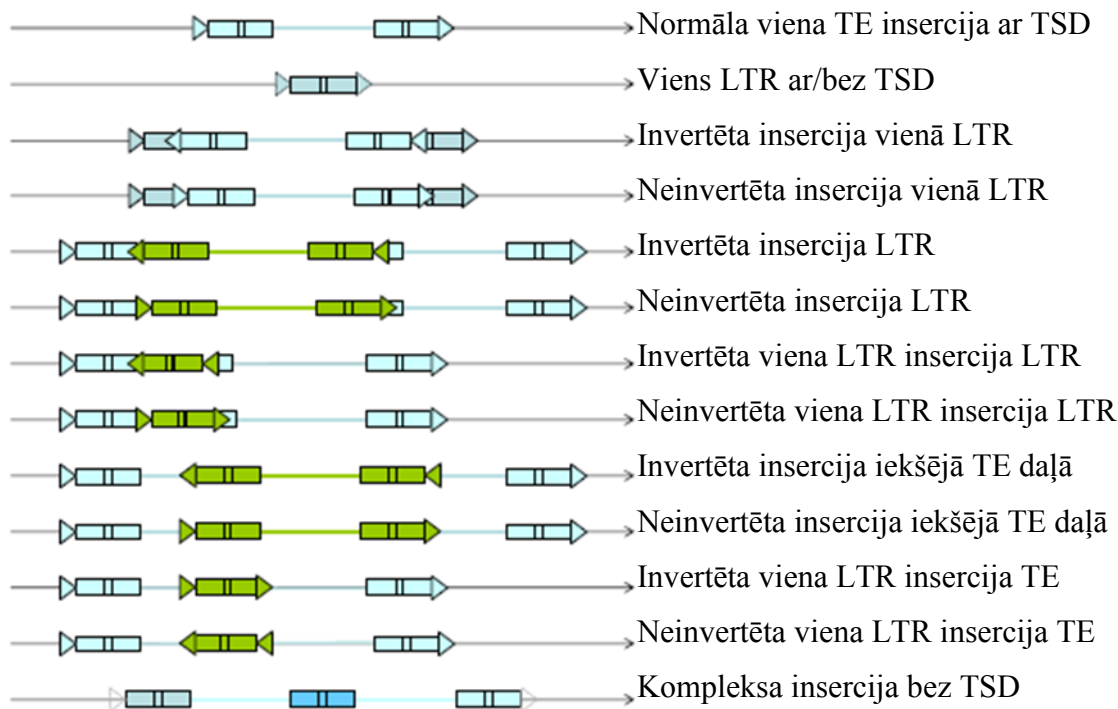
ribosomālo DNS gēnu rajoni (Heslop-Harrison *et al.* 1997). Netieši TE izplatību ietekmē tādi faktori, kā nukleotīdu aizvietošanas, delēciju un rekombinācijas frekvence, kuri ievērojami variē dažādos hromosomu tipos, hromosomu struktūrās un arī ir sugas specifiski. Tā, rekombinācija pericentromēru rajonos ir ļoti zema, kā arī netipiskais TE saturs ir novērots hromosomām, kurām nav rekombinācijas partnera (Y, B hromosomas). Piemēram, *Silene latifolia* Y hromosoma, atšķirībā no citām, ir izteikti palielināta vienas *Copia TE* ģimenes izplatīšanās rezultātā, kā arī hloroplastu inserciju un citu atkārtojumu uzkrāšanās rezultātā. Interesanti, ka šī hromosoma nesatur *Gypsy Ogre* ģimenes elementus, kas ir izplatīti šī auga pārējās hromosomās. Tas liek domāt, ka *Ogre* elementiem pastāv no rekombinācijas proteīniem atkarīga transpozīcija (Cermak *et al.* 2008). Alternatīvi, tas var būt izskaidrojams arī ar dzimumu saistītu transpozīciju u.c.

### 1.3.2. TE klāsterizācija un individuālas struktūrīpašības

Kā minēts iepriekš, retrotranspozonu transpozīcijas mehānismā ir iesaistīta reversā transkriptāze, kuras precizitāte, salīdzinot ar citām šūnas polimerāzēm, ir zemāka (Preston 1996; Gabriel, Mules 1999). Gan RNS polimerāze, gan RT nesatur labošanas aktivitāti nepareizi pievienotiem nukleotīdiem, kā rezultātā rodas nukleotīdu substitūcijas. Turklāt, RT spēj nomainīt RNS matricu un rezultātā veidot himērisku cDNS. Tā var saturēt atšķirīgo retrotranspozonu ģimeņu vai vienas ģimenes pārstāvju vairākas LTR vai kodējošo domēnu atkārtotās daļas, bet viss himēriskais konstrukts ir ierobežots ar vienu TSD. Lielākas mutācijas un pārkārtējumi LTR TE rodas nevienādās homologās rekombinācijas procesā, pateicoties to kopiju daudzumam un šo sekvenču homologijai (Vicent *et al.* 2005; Hawkins *et al.* 2009). LTR-LTR nevienādā homologā rekombinācija var veidot genomā vienu LTR bez elementa, vai arī vairākus LTR, vai arī vairākas iekšējo domēnu sekvenču pēc kārtas (Mieczkowski *et al.* 2006). Rezultātā retrotranspozonu sekvenču mutāciju uzkrāšanās ātrums salīdzinot ar kodējošajām sekvencēm ir lielāks (Preston 1996; Boutabout *et al.* 2001). Turklāt, bieži vien retrotranspozoni preferenciāli ievietojas atkārtojumu rajonos izjaucot iepriekš ievietotos retrotranspozonus. Rezultātā veidojas genoma rajons, kas sastāv no sadrumstaloto retrotranspozonu sekvenču daļām un neaktīvo elementu klāsteriem (Kumar, Bennetzen 1999).

LTR TE ir bieži sastopami neparastas konstrukcijas kompleksajos augu genomos (*9. attēls*). Labi izpētītā miežu retrotranspozona *BARE-1* gadījumā viens LTR miežu genomā ir sastopams 7 līdz 42 reizes biežāk salīdzinot ar pilna garuma elementiem un sastāda,  $13,7 \times 10^3$  kopijas haploīdā genomā (Vicent *et al.* 1999). Struktūra ar diviem iekšējiem domēniem flankētu ar vienu rekombinantu LTR tika atrasta miežu haploīdā genomā  $4,6 \times 10^3$  kopijās (Vicent *et al.* 2005).

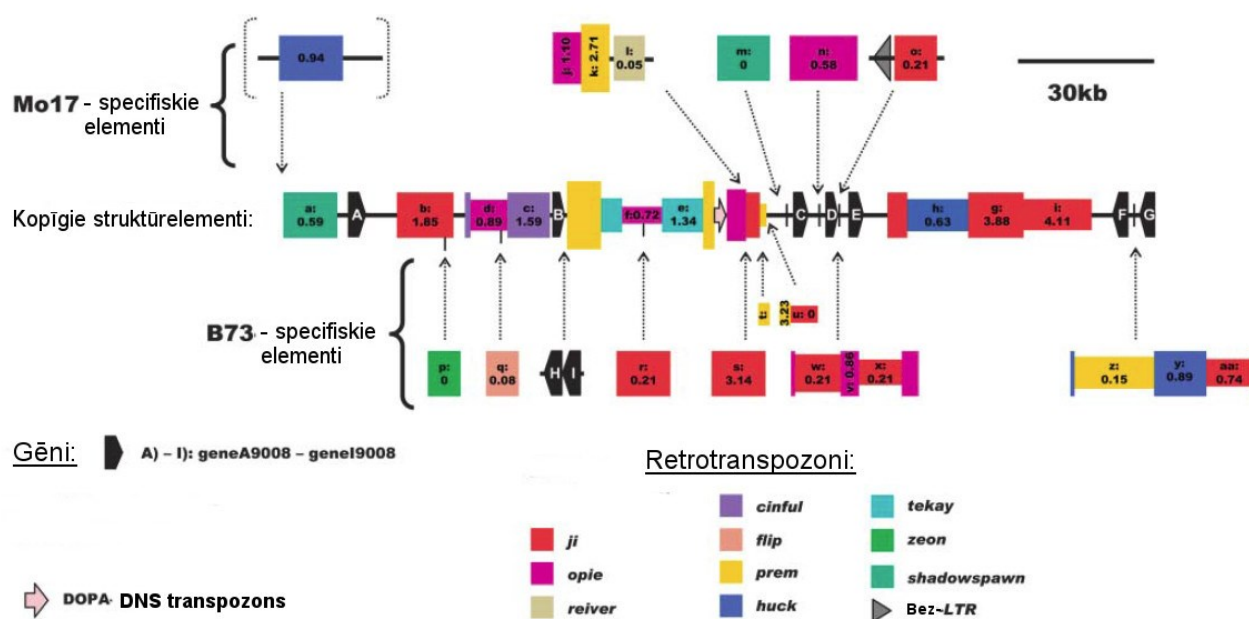
Matricas nomaiņa ar RT paver iespējas jauno rekombinanto elementu veidošanai (Sabot, Schulman 2007). Iespējams, ar šī mehānisma palīdzību veidojas miežu genomā aprakstītie *BARE2* un *VejuL* rekombinantie elementi (Vicient *et al.* 2005; Sabot *et al.* 2005).



9. attēls. Retrotranspozonu insercijas un klāsterizācijas iespējas (no Sabot, Schulman 2007).

Ar taisnstūriem apzīmēti LTR, ar trīsstūriem – TSD. Krāsainās līnijas apzīmē TE iekšējo sekvenci.

Salīdzinoša vairāku graudaugu genomu sekvenēšana atklāja augstu variācijas pakāpi starpgēnu un gēnus kodējošajos rajonos, kas atkarīga no abu klašu TE. Šī variācija inbrīdām līnijām ir liela pat vienas sugas ietvaros (Morgante *et al.* 2007). Tāpēc viena individuālā genoma pabeigta sekvenca nevar atspoguļot visas pastāvošās variācijas populācijā. Parādīts, ka tikai aptuveni 50% no vienas sugas divu indivīdu genomiskā rajona ir līdzīgi un šī frakcija varētu sastādīt sugas bazālo genomu. Variējošajā daļā ietilpst gan TE, gan pseidogēni, gan arī individuālie gēni (10. attēls). Pēdējo gadu pētījumi rāda, ka līdzīga genoma organizācija ir raksturīga visiem augstākajiem augiem (Brunner *et al.* 2005; Piegu *et al.* 2006; Hawkins *et al.* 2006; Neumann *et al.* 2006). Līdz ar sekvenēšanas tehnoloģijas attīstību un vairāku augu sugu individuālo sekvenču salīdzināšanu, noskaidrojies, ka LTR retrotranspozoni spēj neatkarīgi pavairoties noteiktajā augu populācijā daudz īsākā laika posmā, nekā uzskatīja iepriekš. Turklāt tieši retroelementi pirms konservatīvajiem gēnu blokiem rada atšķirīgu vidi (Brunner *et al.* 2005) (10. attēls).



10. attēls. Kukurūzas (*Zea mays*) 2S hromosomas fragmenta salīdzinošā struktūrelementu shēma starp divām kukurūzas inbrīdām līnijām Mo17 un B73 (modificēts no Brunner *et al.* 2005).

### 1.3.3. Genoma izmēra evolucionārā loma

Fakts, ka kodējošo gēnu skaits, kas varētu atspoguļot organismu komplicētību, un kopējais genoma lielums nav saistīti savā starpā, izraisīja plašu diskusiju un to nosauca par C-vērtības paradoksu (Thomas 1971). Turklāt, struktūrelementi, kas tieši neietekmē genoma lielumu, var korelēt ar kopējo DNS saturu, piemēram, intronu garums (Vinogradov 1999) vai rDNS gēnu kopiju skaits (Prokopowich *et al.* 2003). Pašlaik uzskata, ka eikariotu genoma lieluma variācijā var tikt iesaistīti vairāki mehānismi: neregulāra hromosomu krustmija (Smith 1976), DNS replikācijas kļūdas (Kunkel 1990; Lovett 2004), poliploidizācija (Soltis, Soltis 1999), TE izplatīšanās un arī to delēcijas neregulāras krustmijas un nevienādās homologās rekombinācijas rezultātā (Devos *et al.* 2002; Kazazian 2004).

Genoma lielums arī individuāli var variēt un pašlaik tā variāciju saista ar dažādu nekodējošo sekvenču satura atšķirībām, tādām kā pseidogēni, TE un citiem atkārtojumiem, kā arī hloroplastu insercijām kodola DNS. Novērots, ka viengadīgajiem pašapputes augiem ir mazāka izmēra genomi nekā daudzgadīgajiem svešapputes augiem (Leitch, Bennet 2007). Segsēkļu filoģenētiskā analīze parādīja, ka to genoms palielinājies evolūcijas gaitā (Leitch 1998). Ir novērota DNS satura korelācija

ar ģeogrāfisko izplatību, temperatūru un sausumu (Bennet 1972, Rayburn, Auger 1990; Torrel, Valles 2001; Kalendar *et al.* 2000; Knight *et al.* 2002). Tādēļ, genoma izmēram varētu būt ekoloģiska un evolucionāra nozīme, jo, piemēram, lielam genomam DNS replikācija aizņem ilgāku laiku, līdz ar to atšķiras šūnu dalīšanās ilgums (Bennetzen, Kellogg 1997). Savukārt, palielinoties šūnas apjomam, aug nepieciešamība uzturēt konstantu ribosomu koncentrāciju citoplazmā, kas, savukārt, ir iespējams palielinot rDNA gēnu kopiju skaitu (Prokopowich *et al.* 2003). Šūnas izmērs ir saistīts ar genoma lielumu, kā arī no tā atkarīgajiem rādītājiem, piemēram, ar lapas masu pret platības vienību (lapas blīvuma rādītāju) (Grotkopp *et al.* 2004; Beaulieu *et al.* 2007). Tāpat pierādīts, ka metabolisma ātrums zīdītājiem un putniem korelē ar genoma lielumu (Kozłowski *et al.* 2003), bet augiem šī saistība līdz galam vēl nav pierādīta (Beaulieu *et al.* 2007). Nenoliedzami, liekais DNS mijiedarbojas ar apkārtējo vidi un ir netiešs izlases objekts, jo ietekmē organisma fenotipiskās īpašības (piemēram, palēnina šūnu dalīšanās laiku un patērē enerģētiskos resursus). Tāpēc lielāks genoms ir saistīts ar ilgākiem šūnas dzīves cikliem (Bennet 1998). Lēnāka attīstība, kas ir saistīta ar genoma palielinājumu, nevarētu būt adaptīva, ja vien tā nav saistīta ar citām noderīgām īpašībām, piemēram, metabolisma ātruma palēninājumu, DNS mutāciju buferizāciju, vai DNS reparācijas papildus iespējām.

Nozīmīgs augu genoma palielināšanas mehānisms ir poliploidizācija. Hromosomu komplektu palielinājuma rezultātā kopējais genoma lielums ievērojami pieaug, taču, ja saskaita vidējo DNS daudzumu diviem hromosomu komplektiem, līdz ar ploiditātes līmeni DNS daudzums samazinās (Leitch, Bennett 2004). Tādā veidā, evolucionāri, pēc poliploidizācijas notiek viena hromosomu komplekta DNS daudzuma samazināšanās. Uz to norāda diploīdā *A.thaliana* visa genoma sekvenēšana un turpmāka gēnu kolinearitātes salīdzinošā analīze ar citiem segsēkļiem, kas parāda, ka to genoms senatnē ir piedzīvojis poliploidizāciju, turpmāku DNS zudumu un diploidizāciju (Bowers *et al.* 2003).

Genomā notiek arī liekās DNS zudums, kura mehānisms līdz galam nav izprasts. DNS zudums var notikt nevienādās homologās rekombinācijas rezultātā (viena LTR veidošanās) (Leitch, Bennett 2004; Mieczkowski *et al.* 2006), kā arī nreciprokās krustmijas rezultātā, kā rezultātā var tikt deletēti veseli retrotranspozoni (Devos *et al.* 2002). Rīsu (*O.sativa*) genoma pētījums norāda, ka vairums no LTR retrotranspozoniem ir pavairojušies pēdējo 2-5 miljonu gadu laikā, kamēr retrotranspozonu pussabrukšanas periods ar nevienādās homologās rekombinācijas starpniecību ir noteikts 3 miljoni gadu vai 19 miljoni gadu ar delēciju uzkrāšanos (Vitte *et al.* 2007). Degradēšanas laiks ir TE ģimenes specifisks, un katrai ģimenei ir raksturīga sava pavairošanas vēsture (Vitte, Bennetzen 2006). Šis rezultāts norāda uz dinamisku LTR retrotranspozonu apgrozījumu un ātru

starpģēnu rajonu diferenciāciju. Tāpat DNS zuduma apjoms atšķiras sugu līmenī, par ko liecina viena LTR attiecība pret pilna izmēra retrotranspozonu skaitu. Piemēram, šī attiecība rīsu genomam ir lielāka salīdzinot ar *Arabidopsis* genomu (Ma *et al.* 2004). Tomēr atšķirības retrotranspozonu eliminācijā ar nevienādo homologo rekombināciju vai nreciproku krustmiju nekorelē ar genoma lielumu, kas norāda uz to, ka šo mehānismu efektivitāte var mainīties evolūcijas gaitā un tas nav galvenais iemesls genoma lieluma variācijā (Vitte, Bennetzen 2006).

### 1.3.4. Genoma izmēra saistība ar TE proliferāciju

Lai gan galvenās TE grupas ir sastopamas visu augu genomos, relatīvais TE sastāvs un TE klašu un kārtu proporcijas ievērojami variē (Kejnovsky *et al.* 2012). Viendīgļlapju genomi satur vairāk TE, nekā divdīgļlapju, kas ir skaidrojams ar nesenu LTR retrotranspozonu ekspansiju šajos genomos (SanMiguel *et al.* 1998; Vitte, Bennetzen 2006). Turpretī kailsēkļiem, kuriem ir raksturīgs daudz lielāks genoma izmērs, LTR retrotranspozoni ir sakrājuši vairāk mutāciju un ir atšķirīgāki no segsēkļu TE, kas ir skaidrojams ar to senāku izcelsmi un ilgāku degradāciju (Kovach *et al.* 2010).

Vairāki pētījumi veltīti dažādu augu genomu TE sekvenču satura, sastāva un saistības ar genoma lielumu noskaidrošanai (Bennet, Smith 1976; Wicker *et al.* 2009; Paterson *et al.* 2009; Kovach *et al.* 2010; Schmutz *et al.* 2010; Tuskan *et al.* 2006; Wang, Liu 2008). Piemēram, *A.thaliana* genoms ir 120 Mbp un TE saturs ir 14%; rīsiem no 420 Mbp 35% ir TE (Paterson *et al.* 2009), papeles genoms ar 485 Mbp satur 42% TE (Tuskan *et al.* 2006), sojas genoms 1100 Mbp - 59% (Schmutz *et al.* 2010); kukurūzas genoms - 2045 Mbp un 76% sastāda TE (Paterson *et al.* 2009), miežu genoms ir 5439 Mbp un 80% sastāda TE (Wicker *et al.* 2009), terpentīna priedes (*P.taeda*) genoms ir 21516 Mbp un tas satur 80% TE (Kovach *et al.* 2010). Noskaidrots, ka kompleksajos genomos TE aizņem nozīmīgu daļu un to saturs ir lielāks sugām ar lielu genoma izmēru, tāpēc, atskaitot poliploidizāciju, TE sekvenču proliferācija ir nozīmīgs faktors genoma palielināšanā (Zhang, Wessler 2004; Vitte, Bennetzen 2006; Wicker *et al.* 2009). Piemēram, kukurūzas genoms, pateicoties TE aktīvai izplatībai, pēdējo 3 miljonu gadu laikā ir kļuvis garāks par 1200 Mbp, t.i., dubultojies (SanMiguel *et al.* 1998). Rīsu sugai *O.australiensis* trīs LTR retrotranspozonu ģimeņu izplatīšanās rezultātā genoma lielums palielinājās 2 reizes salīdzinot ar *O.sativa* (Piegu *et al.* 2006). Divu radniecīgo genomu *Arabidopsis thaliana* un *Brassica oleracea* salīdzināšana atklāja vienādu TE ģimeņu pārstāvniecību abos genomos, bet ar vienmērīgi visu TE klašu palielinātu kopiju skaitu lielākajam *Brassica oleracea* genomam (Zhang, Wessler 2004).

Viens no pirmajiem pētījumiem, kas pierādīja izplatītākās retrotranspozonu ģimenes pārstāvju kopiju daudzuma korelāciju ar genoma lielumu, bija aktīva *BARE-1* retrotranspozona pētījums savvaļas miežu genomā (Vicent *et al.* 1999). Novēroja, ka *BARE-1* pilna izmēra kopijas sastāda 3% no miežu genoma. Vēlāk tika arī parādīta *BARE-1* ekspansija savvaļas miežiem atkarībā no to augšanas vietas mitruma pakāpes (Kalendar *et al.* 2000). Datu analīze rādīja arī genoma lieluma saistību ar ģeogrāfisko stāvokli: dienvidu nogāzes augiem genoms bija lielāks, ar vairāk pilna izmēra *BARE-1* elementiem nekā ziemeļu nogāzes augiem (Kalendar *et al.* 2000). Iespējams, pastāvīgā stresa rezultātā TE delēciju skaits ir zemāks, kas noved pie pilna garuma elementu uzturēšanas un genoma palielinājuma (Nevo 2001). Šis *BARE-1* kopiju skaits, iespējams, atspoguļo adaptīvu atlasīti lielākiem genomiem ar augstāku retrotranspozonu aktivitāti (Kalendar *et al.* 2000; Nevo 2001; Wessler 2001). Turklāt, retrotranspozonu transpozīcija var radīt jaunas funkcionālas mutācijas un līdz ar to arī jaunus pielāgojumus stresa apstākļu pārvarēšanai (Madlung, Comai 2004).

#### 1.4. TE aktivēšanās stresoru ietekmē

Apkārtējās vides apstākļi, kas izsauc bioloģiskās sistēmas izmaiņas un ir potenciāli kaitīgi šai sistēmai, tiek definēti kā stresa apstākļi (Hoffman, Parsons 1997). Atbilstoši organisma atbildēm uz stresa apstākļiem, izšķir fizioloģiskās reakcijas izraisošus stresa apstākļus un ģenētiskās izmaiņas izraisošus stresa apstākļus (Bijlsma, Loeschcke 1997). Stresa apstākļi populācijā izraisa daudzu kvantitatīvo pazīmju ģenētisko variāciju (Hoffman, Parsons 1997; Imasheva *et al.* 1998). Šīm izmaiņām var būt dažādi iemesli: gan atšķirīga gēnu ekspresija stresa apstākļos, gan dažādo proteīnu reakcija uz stresa apstākļiem, kas var neizpausties normālos apstākļos. Tāpat, mutagēni mehānismi var tikt aktivizēti stresa apstākļos, piemēram, t.s., SOS atbildes vai antimutagēnās sistēmas MRS (*Mismatch Repair System*) inaktivēšana (Taddei *et al.* 1997), šo mehānismu rezultātā notiek arī TE aktivēšanās (*11. attēls*) (Capy *et al.* 1997).

TE aktivējas stresa apstākļos (McClintock 1984; Wessler 1996; Grandbastien *et al.* 1997; Kumar, Bennetzen, 1999; Capy *et al.* 2000). Regulatori, kurus satur retrotranspozonu LTR, bieži vien darbojas *in cis* atbildot uz augu hormonu signāliem, kā arī apkārtējās vides faktoriem (Vernhettes *et al.* 1998; Takeda *et al.* 1999; Butelli *et al.* 2012). Aktivēties spējīgo TE transkripcija normālajos apstākļos ir bloķēta ar DNS metilēšanas mehānismu un histonu ķīmisku pēctranslācijas modifikāciju, kā arī tiek kontrolēta ar siRNS (Ichiyanagi 2013). TE transpozīcija tiek inaktivēta ar to promotera metilēšanu, kas var tikt noņemta stresa apstākļu ietekmē. Mutācija kādā no DNS metiltransferāzēm, hromatīnu veidojošajiem faktoriem un proteīniem izraisa TE transkripciju (Kato *et al.* 2003; Hirochika *et al.* 2000; Zhang, Rong 2012). Otra sistēma, kas pasargā genomu no

pārmērīgas transpozīcijas, ir siRNS. Mutantā ar siRNS producēšanas ierobežojumu aktīvā *ONSEN* elementa ekspresija palielinājās, kā arī to pēctečiem tika atrastas jaunas insercijas, kas norāda uz siRNS transkripcionālu un transpozicionālu regulatīvo darbību (Ito *et al.* 2011).

TE aktivitāte (transkripcionālā un transpozicionālā) parasti ir saistīta ar atbildēm uz stresa apstākļiem, noteiktām attīstības stadijām un meristēmātiskajiem audiem. TE transkripcijas nozīme stresa apstākļos joprojām nav skaidra. Zināms, ka stresa granulās atrodas liels daudzums ar nekodējošām RNS un ribonukleoproteīniem (zīdītājiem starp nekodējošiem RNS ir bieži bez-LTR retrotranspozoni), to funkcija nav skaidra (Han 2010). Tomēr raugam stresa granulū komponentu zudums samazināja LTR retrotranspozonu aktivitāti, kas liecina par to, ka šīm granulām ir nozīme retrotranspozonu dzīves ciklā (Griffith *et al.* 2003; Aye *et al.* 2004). Tāpat, stresam pakļautajās *A.thaliana* un tabakas lapās un kallusā no gag proteīniem veidotajās vīrusiem līdzīgajās daļiņās tika atrasti *Tto1* lineāru DNS molekulu starpprodukti (Takeda *et al.* 2001).

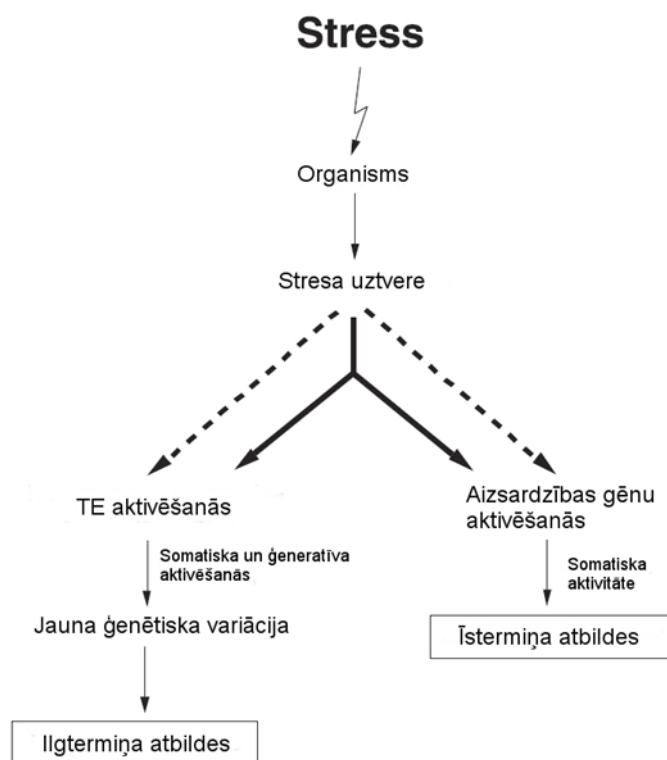
Retrotranspozona integrēšanas preference var mainīties stresoru iespaidā, kas parādīts ar rauga *Ty5* retrotranspozonu (Dai *et al.* 2007). Normālos apstākļos *Ty5* heterohromatīna piesaistes domēns ir fosforilēts, kas ir nepieciešams mijiedarbībai ar heterohromatīna proteīnu Sir4. Stresa apstākļos šī saita fosforilācija zūd, īpaši barības vielu trūkuma rezultātā, kas veicina *Ty5* integrēšanos gēnu rajonos un līdz ar to mutāciju skaita palielinājumu (Dai *et al.* 2007). Šis piemērs demonstrē mehānismu, ar kura palīdzību TE mobilizēšanās var sniegt evolucionāru priekšrocību, palielinot ģenētisko daudzveidību un ļaujot adaptēties jauniem vides apstākļiem nākamajās paaudzēs.

### 1.4.1. Retrotranspozonu aktivēšanās

Nelabvēlīgu vides apstākļu ietekmē pieaug miežu *BARE-1* kopiju skaits (Kalendar *et al.* 2000). Līdzīgi, *Drosophila simulans* genomā 412 retrotranspozona kopiju skaits pieauga līdz ar ģeogrāfiskā platuma grādiem (Vieira, Biémont 1996). Retrotranspozonu aktivēšanās rezultātā izsauktais mutaģenēzes process varētu dot priekšroku augu genomiem, sniedzot iespēju nelabvēlīgos vides apstākļos ātri palielināt genotipu variāciju (Wessler 1996; Murray 1998; Murray 2005). Turklāt, eksperimentāli pierādīts, ka retrotranspozoni augu genomā var radīt jaunus stresa atbildē iesaistītus gēnu tīklus (Ito *et al.* 2011). Arī rauga genomā *Tfl* elements, kurš preferenciāli integrējas pirms polimerāzes II promoteru saturošajiem gēniem, pēc karstuma šoka tiek aktivēts un ar savu integrāciju ietekmē stresa atbildē jau iesaistīto gēnu, padarot tā transkripciju vēl efektīvāku (Feng *et al.* 2012). Detalizēts tabakas *Tnt1* aktīvo retrotranspozonu ģimenes pētījums apliecina, ka atšķirības TE 3' UTR sekvencē nosaka elementu transkripcionālu aktivēšanos noteikto stresa asociēto



signālmolekulu ietekmē (Beguiristain *et al.* 2001). Piemēram, metiljasmonāts inducē *Tnt1A* apakšģimenes transkripciju, bet *Tnt1C* apakšģimenes pārstāvji tiek ekspresēti salicilskābes un augsīnu iespaidā. Lai gan arī *Tnt1C* pārstāvju lokā ir novērojama lielāka daudzveidības pakāpe, regulatīvie 3'UTR motīvi ir augsti konservatīvi (Beguiristain *et al.* 2001). Tāpat zināms, ka retrotranspozons *Olsen* tiek ekspresēts karstuma stresam pakļauto *Arabidopsis* augu pēcnācējiem (Ito *et al.* 2011). Savukārt, retrotranspozonu *Tam3* no lielās lauvmutītes (*Antirrhinum majus*) genoma (Hashida *et al.* 2003) un *Tcs1* no apelsīnu genoma (Butelli *et al.* 2012) ekspresija pieaug pēc zemo temperatūru iedarbības. *Ty1 Copia TLCl* ģimene no tomātu genoma tiek ekspresēta vairāku stresa apstākļu ietekmē: ievainojums, protoplastu izveide, augsta sāļu koncentrācija; bet divi 57 bp gari atkārtojumi, kas sastāv no 8 bp motīva ATTTCAA U3 rajonā, padara *TLCl.1* elementus inducējamus ar etilēnu (Tapia *et al.* 2005). Melones *Copia* retrotranspozons *Reme1* tika atrasts UV starojumam pakļautajās lapās (Ramallo *et al.* 2008).



11. attēls. TE aktivēšanās stresa ietekmē. Ir parādīti neatkarīgie (pārtraukta līnija) un kopīgie (nepārtraukta līnija) efekti uz organisma aizsardzības gēniem un TE (pēc Capy *et al.* 2000).

Arī biotiskie stresori iniciē virkni retrotranspozonu ekspresiju: *Oare-1*, vīrusu infekcijas kartupeļos; *Tto1*, tabakas mozaīkas vīruss (Hirochika 1993); *Tnt1*, tabakas sēnīšu infekcijas (Melayah *et al.* 2001). Korķa ozola (*Quercus suber*) genomā retrotranspozons *Corky* ir ekspresēts

dažādās attīstības stadijās, kā arī pēc lapu ievainošanas (Rocheta *et al.* 2012). Zirņu *Psr* retrotranspozonu apakšģimenes pārstāvji transkribējas atšķirīgos apstākļos: *PsrA* aktivējas atbildot uz protoplastu izveidi un uz apstrādi ar sēnīšu elicitoriem; *PsrC* aktivējas galvenokārt tikai atbildot uz sēnīšu elicitoriem, bet *PsrB*, otrādi, galvenokārt aktivējas atbildot uz protoplastu izveidi (Kato *et al.* 1999). LINE bez-LTR TE *Karma* tiek ekspresēts reģenerēto augu audos un kultivētajās šūnās, taču transpozīcija atrasta tikai reģenerētajos augos, kas norāda uz regulāciju pēc transkripcijas (Komatsu *et al.* 2003). Retāk tiek aprakstīti TE, kas ekspresējas arī normālos apstākļos, piemēram miežu *BARE-1* (Suoniemi *et al.* 1996) un *Gypsy Ogre* zirņos (Neumann *et al.* 2003). Dažiem organismiem transpozīcija tika izsaukta ar DNS bojājošām vielām, piemēram *Ty* raugā (Rolfe *et al.* 1986), *Copia Drozophila melongaster* (Strand, McDonald 1985). Arī šūnapvalka hidrolāžu iespaidā aktivējas tabakas *Tnt1* ekspresija (Pouteau *et al.* 1991).

Retrotranspozonu ekspresija bieži vien ir arī audu specifiska, piemēram, sakņu audiem specifiska ekspresija ir *Tnt1* (Grandbastien *et al.* 1994) un *TLC1* (Tapia *et al.* 2005); *BARE-1* ekspresējas lapās (Suoniemi *et al.* 1996), bet kviešu *PREM-2* ekspresējas mikrosporās, bet nobriedušos putekšņos tā transkripti vairs nav atrodami (Turcich *et al.* 1996).

### 1.4.2. DNS transpozonu aktivēšanās

Vienkāršākais un plaši pētītais *E.coli* baktēriju DNS elements *IS* tiek aktivēts atbildot uz apkārtējās vides signāliem (Hall 1998). Baktērijām barības vielu trūkums izsauc transpozīciju frekvences paaugstināšanos (Shapiro, Higgins 1989). Baktēriju populācijās stresa apstākļos transpozīcijas rezultātā palielinās ģenētiskā daudzveidība (Shapiro 1997; Aertsen, Michiels 2005; Foster 2007; Schneider, Lenski 2004). Lai gan daudzas *IS* elementa izsauktās mutācijas ir destruktīvas, ir identificētas arī priekšrocības sniedzošas mutācijas, tāpēc adaptīvai evolūcijai ir nepieciešama transpozicionāla variācija (Schneider, Lenski 2004). Praktiski tas pierādīts vairākos pētījumos. Piemēram, *IS1* elementa izsaukta mutāģenēze pārbaudīta *E.coli* šūnu līnijā MDS42 (kas nesatur nevienu TE). Vienā šūnu līnijā mākslīgi integrēja aktīvu *IS1* elementu, bet otru atstāja brīvu no TE. Novēroja populāciju evolūciju salicīnu (beta-glukozīds) saturošās barotnēs, kas aizvieto oglekļa avotu (Fehér *et al.* 2012). Jau pēc divām nedēļām 90% no izdzīvojušajām *E.coli IS1*-saturošajām šūnām notika šī elementa insercija pirms neaktīvā *bgl* operona, kas atbild par salicīna izmantošanu, padarot šo operonu aktīvu (Fehér *et al.* 2012). Pētījumā, kurā noteica *E.coli* baktēriju pielāgošanos pēc 20000 paaudžu nomaiņas ierobežotā barotnē, atrada, ka, salīdzinot ar priekštečiem, baktēriju pielāgošanās spējas eksperimenta gaitā paaugstinājās par 70% (Lenski 2004). Izsekotas ar *IS* elementu saistītās insercijas pēc 10 000 paaudzēm un atklājās, ka visas pielāgošanās spēju

izveidotajiem apstākļiem uzlabojošās mutācijas ir saistītas ar šī elementa transpozīciju (Schneider *et al.* 2000; Schneider, Lenski 2004). Ir atrastas insercijas, delēcijas, inversijas. Ievērojami palielinājusies *E.coli* daudzveidība, ir noskaidrots, ka katrā populācijā mutācijas notiek individuāli (Papadopoulos *et al.* 1999). Pie kam, ģenētiskā daudzveidība vienmērīgi palielinājās visa eksperimenta gaitā, kamēr fenotipiskas šūnu izmaiņas bija straujākas eksperimenta sākumā, bet pēc tam tās kļuva minimālas (Papadopoulos *et al.* 1999).

UV starojums *E.coli* šūnām stimulē *IS10* transpozīciju DNS bojājošo aģentu ietekmē un pierāda saistību ar SOS atbildi (Eichenbaum, Livneh 1998). Daļa no SOS atbildēm iniciē mutāģenēzi, kas ir atkarīga no *umuD* un *umuC* gēnu darbības, kas tiek inducēti ar DNS bojājošām vielām (Walker 1985). *Tn5* elementa izgriešanās un transpozīcija tiek inducēta *recA* mutantos, kas ir būtiski SOS reakcijas darbībai. Sekvence, kas ir homologa *LexA* piesaistes saitam (SOS represors), tika identificēta *IS50* elementa transpozāzes gēna rajonā. *Tn10* un *IS1* transpozīcija inducē SOS atbildi (Roberts, Kleckner 1988; Lane *et al.* 1994), kas skaidrojams ar transpozona mediētu DNS šķelšanu un DNS bojājuma signāla SOS atbildes iniciāciju. Transpozona *Tn3 Pseudomonas putida* transpozīcija notiek stacionārajā augšanas fāzē (Kasak *et al.* 1997) un tiek inducēta ar stresam specifisko faktoru IHF un stacionārās fāzes faktoru RpoS (Ilves *et al.* 2001). Šie dati parāda vismaz dažu elementu transpozīcijas regulāciju, un tā var būt ne tikai reparācijas mehānismu darbības traucējumu rezultāts (Kivisaar 2003).

Arī augļu mušīņas DNS transpozonom *Mariner* somatiska izgriešana korelē ar ģeogrāfisku izcelsmi un tātad temperatūru (Giraud, Capy 1996). Rīsu aktīvais transpozons *mPing* preferenciāli proliferējas šķirnēs, kuras ir labāk adaptētas ekstremāliem vides apstākļiem (Jiang *et al.* 2003 (a)). *mPing* transpozīcija tiek aktivēta šūnu kultūrās (Jiang *et al.* 2003a), starojuma ietekmē (Nakazaki *et al.* 2003), hidrostatiska spiediena ietekmē (Lin *et al.* 2006). Kukurūzas genomā ir pazīstams mazkopiju *Mutator* elements *Jit*, kurš atrasts ar miežu mozaīkas vīrusu inficēto augu pēcnācējos (Xu *et al.* 2004).

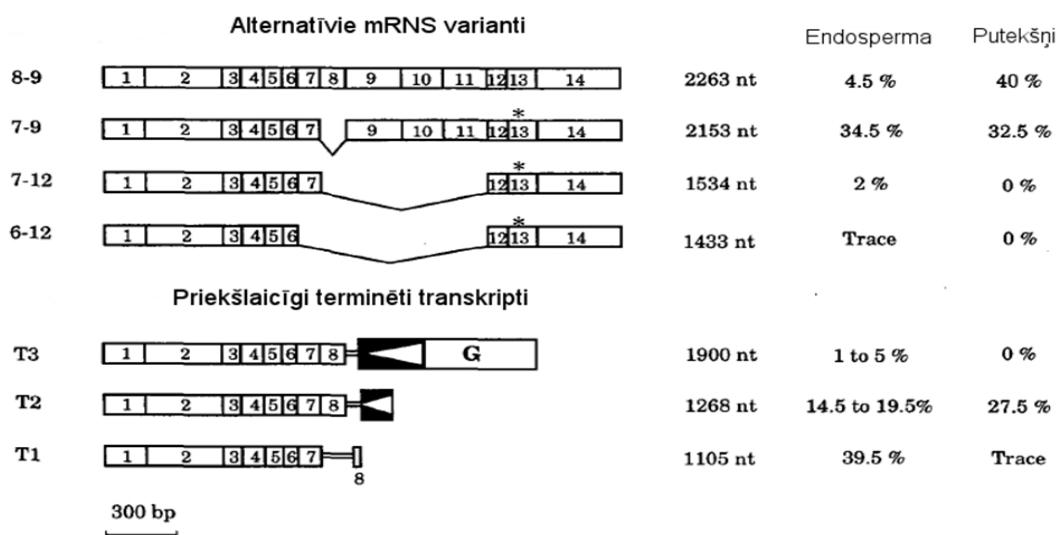
## 1.5. Retrotranspozonu regulatīvā nozīme

Retrotranspozonu insercija gēnu rajonā var ietekmēt gēnu transkripciju vairākos veidos (Johns *et al.* 1985; Masson *et al.* 1987; Grandbastien *et al.* 1989; Varagona *et al.* 1992; Vignols *et al.* 1995; Marillonnet, Wessler 1997; Leprince *et al.* 2001; Kashkush *et al.* 2003; Takano *et al.* 2001; Rebollo *et al.* 2012). Retrotranspozonu LTR var saturēt promoterus, kas darbojas abos virzienos, transkripcijas faktorus piesaistes saitus, terminācijas saitus, insulatorus, splaisingu regulējošas

sekvences. Cilvēka un peles genomos 31,4% un 18,1% no visiem transkripcijas iniciācijas saitiem ir lokalizēti TE un ir audu specifiski (Rebollo *et al.* 2012).

### 1.5.1. Retrotranspozonu ietekme uz gēnu darbību

Retrotranspozonu transpozīcijas augu genomos veido daudz mutāciju. Pirmais augu retrotranspozons *Bs1* kukurūzas genomā pēc vīrusa infekcijas sākotnēji tika atrasts insertēts *Adh1* (alkohola dehidrogenāzes) gēnā (Johns *et al.* 1985). Līdzīgi, *Tnt1* tika identificēts tabakas nitrāta reduktāzes gēnā (Grandbastien *et al.* 1989), *Tos17* insertēts rīsu *PHYA* (fitohroma A) gēnā (Takano *et al.* 2001). Kukurūzas *COMT* gēnā (O-metiltransferāze), kurš ir svarīgs lignīna biosintēzes dalībnieks, *B5*-līdzīga retrotranspozona insercija producē īsāku himērisku cDNS, kas sastāv no gēnam identiskiem 592 bp un stop-kodonu un poliadenilēšanas saitu producējošu LTR. Atbilstošais proteīns ir arī īsāks (209 aminoskābes 364 aminoskābju vietā) un tādēļ nesatur dažus konservatīvus šī proteīna domēnus (Vignols *et al.* 1995). Kukurūzas *waxy* gēna alternatīvās alēles dažādos intronos satur retrotranspozonu insercijas, kas gan neizslēdz parasta mRNS veidošanos, bet ar alternatīvā splaisinga mehānismu tiek veidoti dažādi mRNS transkripti (*12. attēls*), kuros nav ap retrotranspozonu insercijām lokalizētu eksonu (Varagona *et al.* 1992).



*12. attēls.* *wxG* alēles kodētie transkriptu varianti un to sastopamība kukurūzas endospermā un putekšņos (pēc Marillonnet, Wessler 1997). Eksoni apzīmēti ar numurētiem taisnstūriem, ar zvaigznīti apzīmēti stop-kodoni. Tumši trīsstūri apzīmē retrotranspozona LTR, ar G apzīmēts elementa iekšējais domēns.

Turklāt, alternatīvā mRNS ekspresija endospermā ir palielināta, salīdzinot ar putekšņiem, kur pilna mRNS transkripti prevalē un arī to kodējošā proteīna enzimatiskā aktivitāte ir paaugstināta (Marillonnet, Wessler 1997). Autori uzskata, ka šo atšķirību pamatā ir audu specifiskas pre-mRNS splaisinga un 3' gala veidošanas atšķirības.

TE-gēnu himērisko transkriptu bioinformātiskās analīzes parāda, ka vairāku gēnu promoteri un alternatīvie promoteri ir cēlušies no TE (Rebollo *et al.* 2012). Pat viens LTR var regulēt blakusesošo gēnu transkripciju, kā bija parādīts *Myb* transkripcijas faktora gēna gadījumā, pirms kura notika *Copia* LTR TE *Tsc1* un *Tsc2* insercija apelsīnu genomā (Butelli *et al.* 2012). Tāpat, retrotranspozona insercija var inhibēt gēna transkripciju, piemēram, gadījumā ar *Gypsy* elementu *Gret1* vīnogu (*Vitis vinifera*) genomā (Kobayashi *et al.* 2004). Divi multigēnu ģimeņu pārstāvji *PSPAL2* (*Pisum sativum* fenilalanīna amonija liāzes gēns 2) un *PSCHS1* (*Pisum sativum* 1,3-difenil-2-propēn-1-ona sintetāzes gēns) ekspresējās atbildot uz patogēnu invāziju, un aktivē auga aizsardzības mehānismus. Abi gēni savos 5' reģionos satur vienas apakšģimenes *Copia* TE *PsrC* insercijas, kuru transkriptus identificēja arī pēc sēnīšu infekcijas (Kato *et al.* 1999). Transformēšanas analīze ar himēru konstruktiem, kuri saturēja *PSCHS1*-CAT-Nos ar retrotranspozona delēciju 5' gēna promotera reģionā, rezultējas CAT (hloramfenikola acetiltransferāzes reportera gēna) aktivitātes samazinājumā vismaz divas reizes, kamēr LTR sekvences pievienošana 5' reģionā neietekmēja CAT aktivitāti (Kato *et al.* 1999). *Wis 2-1A* retrotranspozona transkripti tika salīdzināti amfiploīdiem un diploīdiem kviešiem, kuriem pirms tam netika atrastas atšķirības *Wis 2-1A* inserciju reprezentācijā (Kashkush *et al.* 2003). No 360 analizētajiem *Wis* saturošajiem transkriptiem tika atrasti 26 atšķirīgi ekspresēti himēriskie transkripti, 8 no tiem bija nezināmi, viens transkripts saturēja *PsaD* (fotosistēmas I gēns), 6 transkripti tika atrasti kviešu vai miežu EST datubāzēs bez homologijas ar zināmiem gēniem, 6 bija homologu zināmajiem gēniem, viens transkripts saturēja tikai retroelementu. Amfiploīdos kviešos atrastie atšķirīgie himēriskie transkripti saturēja *Wis* LTR, visbiežāk lokalizētu gēnu 3' UTR sekvencē. Analizējot gēnus, kuru aktivitāte strauji samazinājās amfiploīdiem kviešiem, tika atrasti LTR-atkarīgie transkripti ar pretēji orientētu transkripciju. Lai gan šie transkripti tika atrasti gan diploīdiem kviešiem, gan amfiploīdiem, to ekspresijas līmenis amfiploīdiem palielinājās 156 reizes, kas korelēja ar gēna aktivitātes zudumu. Tādā veidā šo gēnu darbība tiek regulēta pēc transkripcijas ar RNS interferences mehānisma starpniecību. Savukārt, transkriptiem ar palielinātu ekspresiju amfiploīdos, *Wis* LTR bija novietots vienādā orientācijā ar blakusesošo gēnu. Autori norāda, ka šādā veidā no *Wis* elementa var būt atkarīgi aptuveni 208 gēni kviešu genomā (Kashkush *et al.* 2003).

Ar insertēšanos gēnu rajonā retrotranspozoni var daļēji vai pilnīgi izjaukt gēna secību. Tomēr augos vairumā gadījumu retrotranspozoni preferenciāli insertējas starpgēnu rajonā. Uzskata, ka šī īpašība ir veidojusies dabiskās izlases rezultātā, eliminējoties genotipiem ar vitalitāti samazinošām mutācijām kodējošās sekvencēs.

### 1.5.2. Nekodējošo RNS producēšana

Pretēji agrākiem uzskatiem, ka transkribēti tiek tikai gēni, līdz ar sekvenēšanas tehnoloģiju attīstību atklāts, ka lielākā daļa no genoma, kā, piemēram, zīdītāju genoma, var tikt transkribēta, veidojot nekodējošas RNS molekulas ar nezināmu funkciju (Mattick, Makunin 2006; Ponting *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2012). Šī transkripcija nav tik intensīva, kā gēnu transkripcija, tomēr uzskata, ka šīm molekulām varētu būt kompleksa regulatīva ietekme uz kvantitatīvo pazīmju variāciju, attīstības atšķirībām un kompleksām slimībām. TE fragmenti parasti ir atrodami vairāku augu sugu EST datubāzēs un tātad to transkripcija ir plaši sastopama. Bieži datubāzē iekļauj tikai transkriptus ar poli-A asti, tāpēc TE reālais transkriptu skaits varētu būt daudz lielāks, tomēr arī parastas bioinformātikas analīzes atklāj lielu TE transkriptu daudzveidību graudaugiem (Vicient *et al.* 2001; Echenique *et al.* 2002), kukurūzai (Vicient 2010), saulespuķei (Vukich *et al.* 2009), kartupeļiem (Yadav, Singh 2013) cukurniedrēm (Domingues *et al.* 2012). Transkriptomu analīžu veikšanai TE transkriptus parasti neiekļauj, jo tie satur atkārtojumus un ir pārstāvēti daudzās kopijās, līdz ar to, tie ir grūti analizējami (Mourier, Willerslev 2009). Retrotranspozoni var piedalīties regulatīvajos procesos netieši producējot garās nekodējošās RNS molekulas ar pagaidām nezināmām funkcijām, vai arī tās var tikt šķeltas ar RNS interferences mehānisma starpniecību, veidojot miRNS molekulas. Piemēram, cilvēka genomā atrasti 55 miRNS gēni, kas ir cēlušies no TE (Piriyapongsa *et al.* 2007).

### 1.5.3. Nozīme heterohromatīna struktūras uzturēšanā

LTR atkārtojumu klāsteri piedalās heterohromatīna veidošanā, kas ir ļoti dinamisks un svarīgs process dažādās auga attīstības stadijās (Finnegan *et al.* 1998). Vairāki TE preferenciāli insertējas heterohromatīna rajonos (Levin, Moran 2011). Bioķīmiskie eksperimenti parādīja, ka rauga *Ty5* elementam šī preference ir atkarīga no deviņu aminoskābju domēna, kas lokalizēts C-terminālajā elementa daļā (int domēnā) un tieši piesaistās heterohromatīna strukturālajiem komponentiem - Sir4 proteīnam (Gai, Voytas 1998). *Arabidopsis* genoma mikročipu analīze parādīja, ka heterohromatīna struktūra ir noteikta ar TE un saistītiem tandēmiem atkārtojumiem un tiek kontrolēta ar ATPāzes DDM1 proteīnu (Lippman *et al.* 2004). Vairāki autori norāda uz to, ka transkribējoties TE

sekvencēm, var veidoties siRNS molekulas, kas mijiedarbojas ar DNS un histonu metilēšanas gēniem (Volpe *et al.* 2002; Lippman *et al.* 2004; Neumann *et al.* 2007).

Vairāku augu hromosomu centromēras satur centromēriskus satelītu atkārtojumus pamīšus ar specifiskiem *Ty3 Gypsy* retrotranspozoniem (*Metaviridae*), kurus sauc par centromēru retrotranspozoniem (*CR*). *CR* retrotranspozoni satur hromodomēnu, kas ir līdzīgs 1. heterohromatīna proteīnam no *Drosophila melongaster* (Gorinsek *et al.* 2005). Iespējams, ka šis domēns ir saistīts ar *CR* preferenciālo insertēšanos centromēru tuvumā. Kukurūzas genomā atrasti *CRM* elementi (Zhong *et al.* 2002; Nagaki *et al.* 2003), rīsiem - *CRR* un *RIRE7* (Kumekawa *et al.* 2001; Cheng *et al.* 2002; Nagaki *et al.* 2005), *Cereba* miežiem (Presting *et al.* 1998), *CRW* kviešiem (Liu *et al.* 2008), *CRS* cukurniedrēm (Nagaki *et al.* 2005). Šie elementi pārstāv vienu izcelsmes atzaru un ir radniecīgi, tomēr ir arī izņēmumi, kad citas izcelsmes pārstāvji ir atrodami centromērās, piemēram rīsu (*Oryza brachyantha*) *Gypsy FRetro3* (Gao *et al.* 2009) vai rudziem *Ty1 copia Bilby* (Francki 2001). Zināms, ka augos *CR* un centromēru satelīti tiek transkribēti zemā līmenī (Jiang *et al.* 2003 (b); Topp *et al.* 2004; Neumann *et al.* 2007). Iespējams, ka *CR* kalpo par promoteru avotu satelītu transkripcijai, kas, savukārt, ir nepieciešami centromēras atpazīšanai un/vai hromosomu segregācijai (May *et al.* 2005). Iespējams, ka no *CRR* transkriptiem ar interferences RNS mehānisma palīdzību tiek veidots siRNS, kas ir iesaistīts heterohromatīna veidošanā vai uzturēšanā (Neumann *et al.* 2007). Līdzīgi notiek raugiem, kur pericentromēru heterohromatīna veidošana sākas ar TE transkripciju un siRNS veidošanos (Volpe *et al.* 2002). Kukurūzas *CRM* DNS un arī to transkripti mijiedarbojas ar centromērām specifisku histonu CENH3 (Zhong *et al.* 2002; Topp *et al.* 2004). Vienai no *CR* apakšģimenēm - *CRM2* - parādīta cieša saistība ar CENH3 saturošām nukleosomām (Gent *et al.* 2011).

Viens no specifiskiem piemēriem, ka retrotranspozoni pilda saimniekorganismam nozīmīgu funkciju, ir *Het-A* telomēru retrotranspozoni augļu mušiņas genomā (Zhang, Rong 2012). Telomēru DNS *Drosophila melongaster* genomā sastāv no bez-LTR retrotranspozonu atkārtojumiem, kas ir novietoti ar 5' elementa galu tuvāk telomēras galam (HeT-A, TART, TAHRE). HeT-A elementa transkripcija tiek uzsākta no blakusesošā (tuvāk telomēras galam) elementa 3'UTR reģiona (Danilevskaya *et al.* 1997). Elementa transpozīcija notiek telomēru galos ar tādu frekvenci, ka tā kompensē regulāru telomēru saīsināšanos DNS replikācijas laikā (Biessmann *et al.* 1992). Citiem eikariotiem (arī augiem) telomēru uzturēšanas funkciju veic telomerāze, īpaša tipa reversā transkriptāze, kas mijiedarbībā ar specifisku proteīnu kompleksu (CST) pievieno vienpavediena pārkares telomēru galos (Surovtseva *et al.* 2009).

### 1.5.4. Reversās transkriptāzes loma augu genomā

Reversās transkriptāzes, kuras vienīgais avots genomā ir retrotranspozoni un telomerāzes, aktivitātes rezultātā var veidoties pseidogēni vai transkribēti retrogēni, kuri ir plaši sastopami kompleksajos augu genomos (Zhang *et al.* 2005, Wang *et al.* 2006). Pseidogēni veidojas ar jebkura gēna mRNS reverso transkripciju un integrēšanu jaunajā genoma pozīcijā. Tie raksturojas ar poli-A asti, intronu trūkumu un TSD abos to galos. Bieži vien šīs sekvences nav transkribētas, jo tām nav tam nepieciešamo regulatīvo sekvenču (Brosius 1999). Tomēr, ja nejauši šī sekvenca iegūst transkripcijai nepieciešamas sekvences, var rasties molekula ar jaunām īpašībām, piemēram, proteīnus nekodējoša RNS (Wang *et al.* 2002) vai pat jauni proteīni (Betran *et al.* 2002; Sayah *et al.* 2004). Šādu retrogēnu struktūra parasti ir himēriska, tā satur pseidogēna sekvenci kombinētu ar citu regulatoro sekvenci (Betran *et al.* 2002; Wang *et al.* 2002), vai var būt kombinēta struktūra ar citiem eksoniem, ja insercija ir notikusi cita gēna sekvencē (Sayah *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2004). Šis mehānisms ir nozīmīgs organismu adaptācijā un evolūcijā, jo ir atrasti funkcionāli gēni, kuri ir radušies pateicoties pseidogēnu diferenciacijai (Betran *et al.* 2002; Emerson *et al.* 2004).

### 1.6. Transpozīciju evolucionārā loma

Lieli augu genomi satur daudz LTR retrotranspozonu ģimenes, kas var sasniegt vairāk kā 10000 kopiju haploīdā genomā, kamēr mazi genomi satur tikai dažas ģimenes ar mazāk kā 1000 kopijām, kas norāda, ka genoma lieluma variācijas ir atkarīgas no noteiktas ģimenes TE proliferācijas. TE uzkrāšanās dažādu augu genomos varētu atspoguļot preferenciālu atlasītiem lielākiem genomiem (Murray 1998, 2005). Tādi rādītāji, kā tranzīciju/transversiju SNP starp-LTR vidējās proporcijas, SNP/delēciju attiecība, nevienādās homologās rekombinācijas un neregulāras krustmijas relatīvā efektivitāte, ievērojami variē dažādu augu vidū, kas norāda uz atšķirīgiem evolucionāriem procesiem (Vitte, Bennetzen 2006). TE sastāvs un variācija radniecīgām augu sugām atspoguļo evolūcijas gaitu, jo TE ģimenes mutāciju daudzums norāda uz to vecumu, bet relatīvi jauni elementi neatkarīgi izplatās noteiktas sugas genomā. Tādā veidā, pat radniecīgas sugas ievērojami var atšķirties pēc jauno TE sastāva, un tajā pašā laikā saturēt kopīgus TE ar uzkrātām mutācijām, kas ir saglabājušies genomos, kopš tie ir evolucionāri nodalījušies atsevišķos taksonos. Pēc mutāciju skaita elementiem ar TSD var uzzināt aptuvenu laiku, kad notika elementa insercija (SanMiguel *et al.* 1998). Vairākums LTR retrotranspozonu transpozīciju laiks augu genomos ir noteikts 0-4 miljonu gadu (Bennetzen *et al.* 2005), vecāki elementi parasti ir uzkrājuši daudz mutāciju un zaudējuši otro LTR, tāpēc noteikt to vecumu parasti vairs nav iespējams.



Ilgu laiku tika uzskatīts, ka TE sekvences ir „atkritumi”, kas savtīgi parazitē genomā (Orgel, Crick 1980; Doolittle, Sapienza 1980; Kidwell, Lisch 2001). Tā kā neparastas fenotipiskas izpausmes ir vieglāk pamanāmas, visbiežāk destruktīvās TE mutācijas tiek aprakstītas un uzsvērtas pētījumos genomiem ar augstu TE aktivitāti, kā piemēram, augļu mušiņas genomam *Drosophila melanogaster* (Nuzhdin 1999; Hudson *et al.* 2003; Pasyukova *et al.* 2004; Cordaux *et al.* 2006). Parazītiska dzīves cikla gadījumā no fenotipa neatkarīgā izlase ietekmētu TE diverģenci. Vairāki faktori liecina par neatkarīgu TE evolūciju genomos. Piemēram, salīdzinot dažādus genomus, evolucionāri atšķirīgo TE klašu un kārtu sastāvu proporcija variē pat radniecīgiem taksoniem (Kejnovsky *et al.* 2012). Vairākām TE ģimenēm ir raksturīga preferenciāla nedestruktīva transpozīcija, kas liecina par šo elementu iespējamu adaptīvu izlasi (Finnegan 1992; Baucom *et al.* 2009b). Pat evolucionāri attāliem LTR retrotranspozonu taksoniem ir raksturīgs ļoti konservatīvs RT domēns (Xiong, Eickbush 1990). Tomēr nav skaidrs, kādēļ visu eikariotu genomos TE turpina transponēties un izlases spiediens joprojām nav apturējis TE proliferāciju. Iespējams, līdzīgi parazītiem, TE ir adaptējušies organisma eliminējošai darbībai, šinī gadījumā genomā vajadzētu būt pārstāvētiem TE ar īpašām adaptīvām mutācijām un zemu ģenētisko daudzveidību (Baucom *et al.* 2009b). Tomēr, TE aktivitāte tad būtu konstanta, līdz saimniekorganisms sāktu atpazīt aktīvos elementus un eliminētu tos. Taču, TE aktivitāti stingri kontrolē mehānismi saimniekorganismā, un tā raksturojas ar transpozīciju sprādzieniem. TE un genomu dinamiskas koevolūcijas modelēšana parasti apliecina, ka TE kopiju skaits pieaug līdz noteikta līdzsvara sasniegšanai, kad replikatīvā transpozīcija tiek sabalansēta ar dabiskās izlases darbību pret destruktīvām insercijām (Capy *et al.* 1994). Taču matemātiskie modeļi nespēj iekļaut sevī visus dzīvo organismu iespējas un mehānismus, kas ir sarežģīts uzdevums TE daudzveidības un dzīves cikla gadījumā. Piemēram, pašapputes augu genomos modelētā parazītisko TE dinamika norāda, ka teorētiski tie ātri tiktu eliminēti, taču arī dažu pašapputes augu genomi (piemēram, kvieši) joprojām satur vairāku TE ģimeņu kopijas (Boutin *et al.* 2012). Tas var būt skaidrojams ar reti notiekošo svešapputi arī pamatā pašapputes augiem, ar iespējamu horizontālu TE pārnesi, homozigoto TE kopiju neitralitāti (rekombinācijas iespēju mazināšanās) (Charlesworth, Charlesworth 1995; Morgan 2001), kā arī ar ģenētisko dreifu (Le Rouzic *et al.* 2007; Boutin *et al.* 2012). Ir zināmi gadījumi, kad tiešām pašapputes *Arabidopsis thaliana* genoms satur ievērojami mazāk TE kopiju, nekā radniecīgais svešapputes *Arabidopsis lyrata*. Tomēr, arī šiem genomiem teorētiskā prognoze ir daudz nelabvēlīgāka TE sekvencēm un nesakrīt ar reālo situāciju (Lockton *et al.* 2010; Hollister *et al.* 2011).

Ja pieņem, ka retrotranspozoniem nav funkciju genomā, sagaidāms, ka retrotranspozonu sekvences nav pakļautas ģenētiskās izlases spiedienam un tās uzkrāj mutācijas neitrālā ātrumā.

Analizējot vairākus segsēkļu genomus, LTR retrotranspozoniem ir atrasts lielāks inserciju/delēciju polimorfismu daudzums salīdzinot ar SNP daudzumu. Tāpat LTR retrotranspozoniem ir augstāks tranzīciju skaits. Tas norāda uz šo sekvenču relatīvi neitrālu evolūcijas gaitu (Vitte, Bennetzen 2006). Tomēr, ja pieņemtu, ka replikācijas kļūdas un ģenētiskais dreifs ir vienīgi mehānismi, kas ietekmē retrotranspozonu sekvenču, mutācijas būtu vienmērīgi izkaisītas visas TE sekvenču garumā. Taču aktīvo elementu ģimeņu analīze norāda, ka pat daudzveidīgie retrotranspozoni satur augsti konservatīvas sekvenču, kas nodrošina to aktivitāti, un, tātad, šīs sekvenču ietekmē pozitīvās izlases spiediens (Vicent *et al.* 2005). Parādās arī vien vairāk piemēru ar genomā fiksētām TE kopijām, kas dažreiz uzrāda tipiskas pozitīvās izlases darbības pazīmes (Schlenke, Begun 2004). Izskatās, ka vairākas TE kopijas ir zaudējušas parazitisko elementu iezīmes un tās genomā tiek uzturētas (Miller *et al.* 1999; Casacuberta, Pardue 2003; Jordan *et al.* 2003; Quesneville *et al.* 2005; Volff 2006; Sinzelle *et al.* 2009).

Pašlaik TE vairs netiek uzskatīti par nenozīmīgiem parazitiskiem elementiem un atklājot milzīgo pārstāvniecību, daudzveidību un dažādās īpašības, domājams, ka genomos ir notikusi TE specifikācija (Biémont 2010). Kā tika aprakstīts iepriekš, aktīvie TE piedalās genoma pārkārtojumu iniciācijā un līdz ar to jaunu genotipu veidošanā nelabvēlīgos vides apstākļos, spēj vairākos veidos ietekmēt gēnu darbību un uzturēt centromēru darbību. TE ir plaši sastopami un ir eikariotu genomu neatņemama sastāvdaļa. Ir atrasti vairāki gēni, kas ir cēlušies no TE un ieguvuši jaunu funkciju: no DNS transpozoniem (Hudson *et al.* 2003; Kapitonov, Jurka 2005; Cordaux *et al.* 2006; Lin *et al.* 2007) un no retrotranspozoniem (Pardue, DeBaryshe 2003; Biessmann, Mason 2003; Mason *et al.* 2008). Neskatoties uz to, ka genomā nepārtraukti notiek retrotranspozonu zudums un transpozīcijas mehānisms nosaka ātrāku mutāciju uzkrāšanos šīm sekvenču, genomos joprojām pastāv retrotranspozonu kopijas un to fragmenti ar noteiktos apstākļos saglabātām ekspresijas iespējām, darbojošos transpozīcijas mehānismu un preferenci insertēties nekodējošos genoma rajonos, kas norāda uz izlases darbību šādu funkcionālo elementu labā (Eickbush, Jamburuthugoda 2008).

### **1.7. Retrotranspozonu sekvenču izmantošana molekulāro marķieru izstrādei**

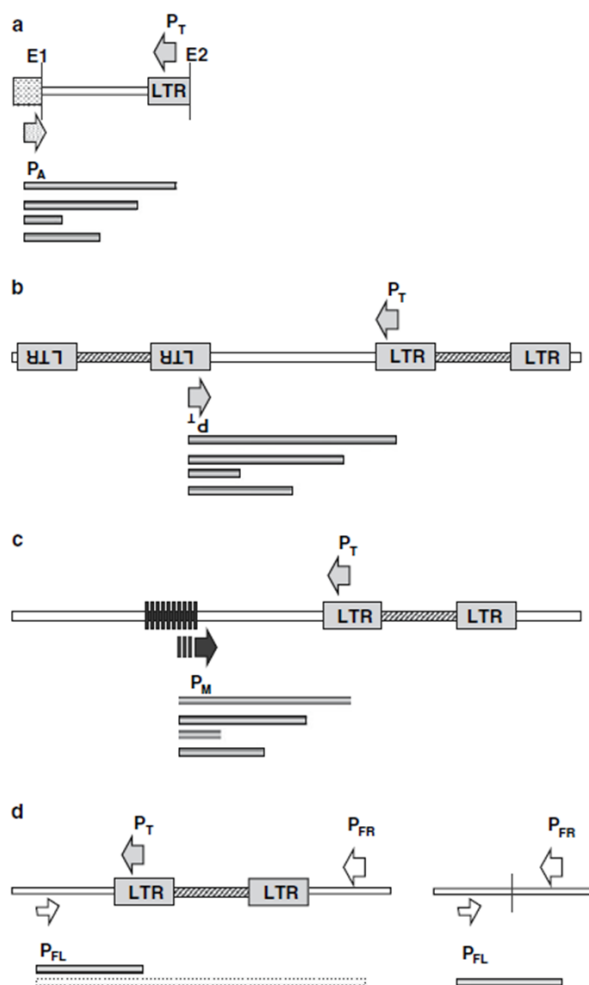
Kopš retrotranspozonu atklāšanas augu genomos, tie tiek aktīvi izmantoti par molekulārās bioloģijas rīku augu genomu daudzveidības izpētei (Kumar *et al.* 1997; Kumar, Hirochika 2001; Schulman *et al.* 2004; Schulman 2006; Kalendar *et al.* 2011; Schulman *et al.* 2012). Šīs sekvenču ir ļoti ērtas DNS molekulāro marķieru izstrādei, jo retrotranspozoni augu genomos parasti ir izplatīti, plaši sastopami, reprezentēti visās hromosomās, kā arī raksturojas ar augstu polimorfisma līmeni. Retrotranspozonu marķieru polimorfisms atspoguļo salīdzinoši lielus pārkārtojumus no dažiem

simtiem bp līdz pat dažām kb. Turklāt ar retrotranspozoniem izsauktās mutācijas ir neatgriezeniskas turpmākajās paaudzēs, kamēr SNP un mikrosatelītu polimorfismi var atgriezties sākotnējā variantā, kas limitē to izmantošanu filoģenētisko saistību noskaidrošanā. Uz retrotranspozoniem balstītas marķieru sistēmas spēj pildīt uzdevumus, ko nespēj atrisināt citas marķieru sistēmas. Piemēram, atšķirt selekcijas līnijas, klonus, ar mutāģenēzi iegūtas šķirnes, kuras ir vienādas analizējot augsti variējošus mikrosatelītu lokusus ar SSR metodi (Tam *et al.* 2005; D'Onofrio *et al.* 2010; Carvalho *et al.* 2012; Castro *et al.* 2012; Baranek *et al.* 2012; Subudhi *et al.* 2013). Viena no retrotranspozonu marķieru iezīmēm ir, ka izmantojot salīdzinoši nelielu sekvenču informācijas apjomu, ir iespējams iegūt lielu datu apjomu.

SSAP (*Sequence-Specific Amplification Polymorphism*) metode ir līdzīga klasiskajai AFLP metodei, taču analizē retrotranspozonu polimorfismus un ir precīzāka, jo viens no praimeriem ir komplementārs specifiskai retrotranspozonu ģimenei (Waugh *et al.* 1997). SSAP metode tika pielietota dažādu augu genomu analizēm (pārskatam sk. Kumar, Hirochika 2001). RIVP (*Retrotransposon Internal Variation Polymorphism*) metode analīzei izmanto iekšējos retrotranspozonu domēnus (Purugganan, Wessler 1995; Vershinin, Ellis 1999).

Virksne metožu ir izstrādātas uz vienkāršas PĶR metodes pamata, piemēram, IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*), kurā tiek amplificēts genomiskais rajons starp atšķirīgās orientācijās lokalizētām divu vienas ģimenes retrotranspozonu insercijām (Kalendar *et al.* 1999; Kalendar, Schulman 2007). IRAP tiek izmantota retrotranspozonu īpašība bieži veidot klāsterus augu genomos un integrēties gan tiešā, gan invertētā veidā. Amplifikācijas produkts radīsies, ja insercijas būs pietiekami tuvu viena otrai, lai tās varētu amplificēt ar PĶR. Polimorfisma līmenis atspoguļo noteiktas retrotranspozonu ģimenes kopiju skaitu genomā (Kalendar, Schulman 2007). Ar REMAP (*Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*) tiek amplificēts genomiskais rajons starp vienas ģimenes retrotranspozoniem un mikrosatelīta sekvenci (Kalendar *et al.* 1999; Kalendar, Schulman 2007). REMAP tehnika ir pielietota miežu šķirņu atšķiršanai, kā arī miežu ģenētiskās kartes veidošanai (Provan *et al.* 1999). Abas metodes izmanto konservatīvu vienas LTR retrotranspozonu ģimenes sekvenci, kurai tiek piemeklēts no retrotranspozona iekšējā domēna prom orientēts praimeris (*13. attēls*). IRAP un REMAP trūkums ir tas, ka tie pieder dominantajai marķieru sistēmai un amplificē anonīmos lokusus (ir mazāk specifiskas). Tomēr liels pluss ir augsts polimorfisma līmenis, automatizēšanas iespēja, salīdzinoši nelielas izmaksas. Lai ieviestu IRAP vai REMAP metodiku jaunā genoma analīzei, ir jābūt pieejamai retrotranspozonu sekvenču informācijai, kas visbiežāk ir sugas specifiska. Kodominanta marķieru sistēma prasa lielāku darbu un līdzekļu ieguldījumu, tomēr ir izstrādāti un tiek pielietoti arī tādi marķieri, piemēram, RBIP

(Retrotransposon-Based Insertional Polymorphism) amplificē viena retrotranspozona genomisko inserciju (Flavell *et al.* 1998).



13. attēls. Uz retrotranspozonu sekvencēm balstītas molekulāro marķieru sistēmas (pēc Schulman 2006).

(a) SSAP metode: DNS tiek šķelts ar divām restriktāzēm (E1, E2), fragmenti liģēti pie adaptera un amplificēti ar retrotranspozonu LTR un adaptera praimeriem.

(b) IRAP metode: amplifikācija starp blakus lokalizēto divu retrotranspozonu LTR.

(c) REMAP metode: amplifikācija starp mikrosatelīta atkārtojumu un LTR.

(d) RBIP: amplifikācija starp retrotranspozonu insercijas flankējošām genomiskām sekvencēm izšķir lokusus ar un bez insercijas.

RBIP ir daudz precīzāka metode un ļauj izpētīt filoģenētiskās saistības, kā arī šī metode ir automatizējama. iPBS metode ir izveidota, lai amplificētu genomiskus rajonus starp augsti konservatīviem PBS saitiem no diviem pretējā orientācijā novietotiem retrotranspozoniem (Kalendar *et al.* 2010). Šīs metodes pamatprincips ir līdzīgs IRAP metodei, taču tā amplificē nespecifiski vairākas retrotranspozonu ģimenes. iPBS var tikt pielietota reto augu daudzveidības pētījumiem, bez informācijas par retrotranspozonu sastāvu un sekvenču informāciju, kā arī ļauj no jauna identificēt dažādu kārtu retrotranspozonus, bez iepriekšējām sugas specifisko TE sekvenču zināšanām.

Kombinācijā ar jaunām sekvenēšanas metodēm, TE sekvenču tiek pielietotas gēnu funkciju noskaidrošanā (Vandenbussche *et al.* 2008; Williams-Carrier *et al.* 2010; Urbański *et al.* 2012). Parasti šiem nolūkiem izmanto retrotranspozonus ar insercijas preferenci gēnu rajonos. Tos,

piemēram, izmantoja rīsu *Tos17* (Miyao *et al.* 2003), lucernas un sojas *Tnt1* (Tadege *et al.* 2008; Cui *et al.* 2013), lotosa *LORE1* (Fukai *et al.* 2011; Urbański *et al.* 2012) mutaģenēzei. Retrotranspozonu marķieri tika un tiek lietoti ģenētiskās daudzveidības pētījumos, filoģenētiskās radniecības noskaidrošanai, transpozīciju evolucionārajos pētījumos, stresa inducētu jaunu transpozīciju identificēšanai, noderīgo pazīmju kartēšanai un QTL selekcijai, funkcionālai gēnu izpētei, pašu TE izplatības un daudzveidības noskaidrošanai (pārskatam sk. Kumar, Hirochika 2001; Kalendar *et al.* 2011).

## 1.8. Parastās priedes raksturojums

Parastā priede (*Pinus sylvestris* L.) pieder pie kailsēkļiem (*Pinophyta*), kas ir viena no senākajām augu grupām. Priede ir ziemeļu puslodei raksturīga suga un plaši sastopama Eiropā no Norvēģijas līdz Spānijai un Āzijā līdz Austrumsibīrijai un Ķīnai. Tā spēj pielāgoties dažādiem augšanas apstākļiem un aug gan ļoti sausos (kāpu smiltāji), gan mitros (augstie purvi) apstākļos. Lielākos platuma grādos augošajiem kokiem ikgadējais koksnes pieaugums galvenokārt ir atkarīgs no veģetācijas perioda klimatiskajām īpašībām, kā arī no mikroklimata, iepriekšējā gada augšanas intensitātes, koka vecuma, augšanas slīpuma un augsnes īpašībām. Vairāki pētījumi rāda, ka lielākais priedes ikgadējo koksnes pieaugumu limitējošais faktors ir temperatūra vasaras periodā (īpaši jūlijā) (Linderholm, Linderholm 2004). Zināms arī, ka priedei minerālā barošanās notiek pa jaunākajiem stumbra audiem, ar laiku veidojot kodolkoksni, un vides izmaiņas var krasi ietekmēt koksnes pieaugumu. Kokapstrādes rūpniecībā parasti izmanto 80-120 gadus vecus kokus. Parastā priede ir viena no valdošajām koku sugām Latvijā un tai ir liela nozīme Latvijas tautsaimniecībā. Klimata izmaiņas var ietekmēt skujkokus gan pozitīvi, pieaugot vidējām temperatūrām janvārī, februārī un martā, gan negatīvi, pieaugot temperatūrai un samazinoties nokrišņu daudzumam jūnijā, kas var ievērojami ietekmēt dabisko atjaunošanos (Baumanis *et al.* 2012; Jansons *et al.* 2011). Tāpat, maigākas ziemas var sekmēt jaunu patogēnu un kaitēkļu savairošanos, kas īpaši var ietekmēt jaunaudzes.

### 1.8.1. Skujkoku genoma raksturojums

Priežu dzimtas pārstāvjiem pārsvarā ir liels (27,5/ 1C (Valkonen *et al.* 1994), 21,25/ 1C (Bogunic *et al.* 2003), 25 pg/ 1C (Plomion *et al.* 2007); 23,01/ 1C (Fuchs *et al.* 2008) vai 20-30 Gbp), stabili diploīds genoms ( $2n=24$ ), bet 70-75% no tā sastāda atkārtotumu sekvenses (Plomion *et al.* 2007). Skujkoki raksturojas ar augstu ģenētisko kolinearitāti starp sugām, kas attiecas gan uz neitrāliem lokusiem, gan gēnu lokalizāciju (Devey *et al.* 1999; Brown *et al.* 2001; Komulainen *et al.*

2003). Skujkoku genomi satur daudzkopiju gēnu ģimenes (Perry, Furnier 1996; Kinlaw, Neale 1997), kā arī lielu skaitu pseidogēnu (Komulainen *et al.* 2003; Kovach *et al.* 2010; Nystedt *et al.* 2013). Skujkokiem nav nelīdzsvarotas saistības pat starp tuvi novietotiem lokusiem (Dvornyk *et al.* 2002) vai tā ir tikai dažus simtus bp (Heuertz *et al.* 2006), to genomu ir raksturīgs augsts heterozigotātes līmenis, lai gan nukleotīdu aizvietošanas temps ir zemāks kā segsēkļiem, kas, iespējams, ir saistīts ar ilgu paaudžu nomaiņas laiku un DNS reparācijas mehānismu atšķirībām (Buschiazzo *et al.* 2012).

Pirmā kailsēkļa - parastās egles (*Picea abies*) - sekvenca tika publicēta 2013. gada pavasarī (Nystedt *et al.* 2013). Egles genoms satur daudzkopiju gēnu ģimenes, pseidogēnus, pie kam neparasti lieli ir starpgēnu un intronu rajoni. Garākais introns gēnam ir 68 kb, bet 2880 intronu ir garāki par 5 kb un 2679 no tiem liels izmērs ir noteikts ar TE inserciju (Nystedt *et al.* 2013). 72 Mb aizņem gēnu kodējošas sekvences, bet 524 Mb gēniem-līdzīgie rajoni uzrāda zemāku līdzību, kuri, iespējams, reprezentē pseidogēnu sekvences. Tika identificēti 13031 eglei specifisko un 9686 konservatīvo starpgēnu lncRNS, 24 bp sRNS līmenis ir zemāks kā segsēkļiem, tie ir specifiski reproduktīviem audiem un ir saistīti ar atkārtojumiem. Egles genomā tika identificēti 2716 21 bp sRNS lokusi, no tiem zināmas 20 miRNS ģimenes. Visa genoma duplikācijas pēdas *P.abies* genomam tā arī netika atrastas, uzskata, ka genoma izmērs palielinājās LTR retrotranspozonu ekspansijas rezultātā (Nystedt *et al.* 2013). Interesanti, ka epiģenētiskās histonu metilēšanas iezīme H3K9me1, kas specifiska tikai heterohromatīnam segsēkļiem, kailsēkļiem atrodas eihromatīnā (Fuchs *et al.* 2008).

### 1.8.2. Mobilo elementu saturs un raksturojums skujkoku genomos

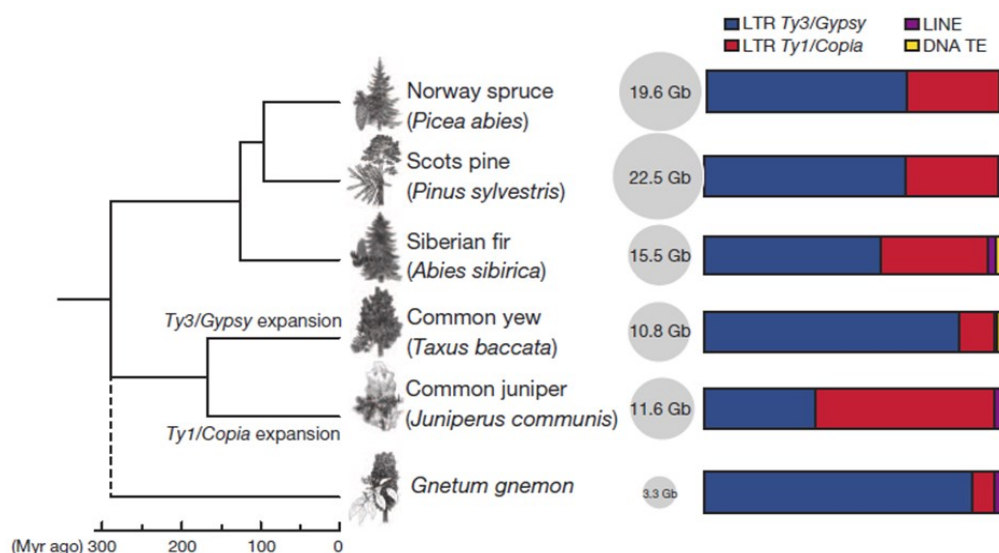
Retrotranspozonu sekvenču pētījumi kailsēkļiem aizsākās pirms to genomu sekvenēšanas mēģinājumiem. *Ty-Copia TPE1* TE tika izolēts no *Pinus elliottii* (Kamm *et al.* 1996). Konstatētais *TPE1* kopiju skaits *P.elliottii* bija liels, bet hibridizācija ar *Ty-Copia* RT gēna sekvenci atklāja izplatību visu hromosomu garumā ar samazinātu hibridizāciju centromēru rajonos (Brandes *et al.* 1997). *TPE1* transpozīcijas iespējas tika novērtētas kā ierobežotas, jo sekvenēšana atklāja mutācijas proteīnu kodējošajās sekvencēs (Brandes *et al.* 1997). No *P.radiata* izolēja un raksturoja skujkokos izplatīto *Gypsy* IFG retrotranspozonu, kuram tika atrasts viens stop-kodons starp gag un AP domēniem (Kossack, Kinlaw 1999). *Copia Spcl* un *Gypsy Spdl* tika izolēti no Kanādas egles (*Picea glauca*) genoma (L'Homme *et al.* 2000). *Spcl* satur dažus ORF neizjaucošus polimorfismus un tikai vienu stop-kodonu pirms int domēna, kas liecina par šī elementa neseno izcelsmi (L'Homme *et al.* 2000). Mazkopiju *Gypsy PpRT1* elements tika izolēts no *P.pinaster* genoma, tā sekvenca bija homologa iepriekš aprakstītajam *IFG* (Rocheta *et al.* 2007). *PpRT1* transkripts tika atrasts EST

datubazē, kas norāda uz tā ekspresiju. *P.pinaster* arī tika aprakstīti env domēnu saturoši retrotranspozoni *PpRT2*, *PpRT3* un *PpRT4* (Miguel *et al.* 2008). Env domēni uzrāda vāju līdzību starp retrotranspozoniem, taču *PpRT2* aminoskābju secības līmenī uzrādīja 30% identitātes vērtības ar *Sire-1* no *Glycine max* genoma, kas ir salīdzināmi ar citu retroelementu pētījumiem.

*Pinus taeda* BAC sekvenēšana atklāja augstu TE sekvenču saturu un dažas priedei specifiskas TE ģimenes (Morse *et al.* 2009). *Gymny* retrotranspozons ir izolēts no *P.taeda* un atrasts arī citās *Pinus* sugās, bet netika atrasts *Picea*, *Abies*, *Tsuga* un *Ginkgo*, kas norāda uz *Gymny* ekspansiju pēc šo taksonu nodalīšanās (Morse *et al.* 2009). *Gymny* ir līdzīgs *Athila* elementam no *A.thaliana* (Morse *et al.* 2009). Līdzīgs pētījums *P.taeda* genomā atklāja gan I klases TE, gan II klases TE visu kārtu pārstāvjus, bet zinātnieki secināja, ka vairums elementu varētu tikt klasificēti jaunās TE ģimenēs (Kovach *et al.* 2010). Aptuveni 9% no analizētajām sekvencēm līdzinājās zināmiem priežu specifiskajiem TE (*PtIGF7*, *PtGypsyX1*, *PtCopiaX1*), 12% sastādīja retrotranspozonu paliekas. 30% no TE saturēja tiešos atkārtojumus garākus par 100 bp (hipotētiskus LTR), norādot šo sekvenču piederību pilna izmēra retrotranspozoniem. TE sekvences arī bija augsti konservatīvas ar agrāk atrastajiem *PtGypsyX1*, *PtCopiaX1*, *IFG7* elementiem, kas norāda uz šo elementu nelielu vecumu un iespējamu aktivitāti. Tomēr, kopumā TE elementu daudzveidība ir daudz lielāka, ja salīdzina ar segsēkļu genomiem (Kovach *et al.* 2010). Citā līdzīgā pētījumā augsts TE saturs atrasts arī *P.taeda*, īpaši daudz atrada *Gypsy* virsģimenes pārstāvju (Magbanua *et al.* 2011). Monofilētiska *Copia*, *Gypsy* un *LINE* elementu izcelsme konstatēta arī kailsēkļiem (Friesen *et al.* 2001). Nukleotīdu līmenī starp segsēkļu un kailsēkļu sugām atrasta no 37,7% līdz 99,4% TE līdzība un līdzīgie rādītāji ir starp viena genoma TE ģimenēm. Hibridizācija ar dažādiem elementiem neuzrādīja krāsas atšķirības genoma organizācijā starp attāliem taksoniem, piemēram *Picea abies* un *Picea omorika*, stipra hibridizācija ar TE kloniem no *P.abies* tika novērota *Ginkgo biloba* DNS un otrādi. Taču, piemēram, starp *Pinus sibirica* un *Pinus pinaster* atrastas nelielas atšķirības (Friesen *et al.* 2001). Pārsvārā visi TE bija vienmērīgi izkaisīti pa visu hromosomas garumu, tomēr bija arī izņēmums - *Gypsy Ppgyl* elements klāsterizējās centromēru rajonā (Friesen *et al.* 2001). Līdzīgo TE ģimeņu un atkārtojumu genomiskais izvietojums starp segsēkļiem un kailsēkļiem atšķiras (Kamm *et al.* 1996; Kossack, Kinlaw 1999; Schmidt *et al.* 2000; Morse *et al.* 2009).

Parastās egles genomā tika atrastas 1773 atkārtojumu sekvences, puse no tām līdzinās zināmām TE ģimenēm. LTR retrotranspozoni ir visizplatītākā TE kārta, bet *Gypsy* virsģimene ir prevalējoša. Tika analizēti TE arī citos kailsēkļos, iekļaujot arī *P.sylvestris*, un visiem LTR retrotranspozonu kārta bija visizplatītākā (Nystedt *et al.* 2013). *P.abies* genoma analīze neatrada nesen notikušā transpozīciju sprādziena pēdas un vairāku inserciju vecums ir ap 5 miljonu gadu.

Viena LTR attiecība pret pilna izmēra retotranspozoniem ir 1:9, kas liecina par zemu TE izgriešanas intensitāti salīdzinot ar segsēkļu genomiem. Tika identificētas dažas skujkokiem raksturīgas TE ģimenes, kā arī mazkopiju TE ģimenes.



14. attēls. Dažādu TE kārtu pārstāvju izplatība sešu kailsēkļu genomos. Genoma izmērs katrai sugai ir parādīts apļos, filoģenētiskās saistības starp taksoniem ir parādītas norādot aptuvenu nodalīšanas laiku (x-ass).

### 1.8.3. Priedes genoma izmēra variācijas

Salīdzinot ar lieliem segsēkļu genomiem, kur poliploidizācija mijas ar retrotranspozonu ekspansiju, skujkokiem genoma ekspansija notiek TE izplatīšanās rezultātā (Morse *et al.* 2009; Kovach *et al.* 2010; Nystedt *et al.* 2013). Parastās priedes genoma lielums dažādos pētījumos variē no 42,5 (Bogunic *et al.* 2003) līdz 55,6 pg (Valkonen *et al.* 1994). Nesen veiktais pētījums, kas maksimāli izslēdza ar metodiku saistītās kļūdas, tika veltīts *Pinus nigra* populācijām, kur visaugstākā genoma lieluma variācija starp populācijām ir atrasta 0,64 pg jeb 2,6% (Bogunic *et al.* 2007). Autori arī neatrada nozīmīgu genoma lieluma korelāciju grupējot *P.nigra* pasugās, tomēr atrasta pozitīva korelācija ar ģeogrāfiskajiem garuma grādiem (genoma lielums samazinās virzienā no DR Āzijas uz Eiropu, kas, iespējams, ir saistīts ar *P.nigra* evolucionāro izplatīšanos). Atrastā genoma lieluma variācija vairākās augu sugās korelē gan ar to augšanas vietu, gan ar morfoloģiskajām pazīmēm un vecumu. Ziemeļamerikas priedes pētījumi atklāj korelācijas starp lielāku genoma izmēru un mazāku lūmena rādiusu un biežāku sūnapvalku (Walkamiya *et al.* 1993). Ir atrasta arī pozitīva korelācija starp sēklas masu un genoma lielumu (Walkamiya *et al.* 1993; Grotkopp *et al.* 2004). Pieņem, ka sugu un populāciju ietvaros genoma lieluma variācija ir nosacīta ar mikrosatelītu atkārtojumu



variācijām un retrotranspozonu izplatīšanās atšķirībām (Kalendar *et al.* 2000; Karhu *et al.* 2000; Bennett, Leitch 2005; Bogunic *et al.* 2007). Pašreiz genoma lieluma variācijas tiek saistītas ar pielāgošanos apkārtējās vides apstākļiem, ģeogrāfisku pozīciju, augšanas parametriem, morfoloģiju un tām var būt adaptīva un evolucionāra loma (Murray 1998, 2005).

#### 1.8.4. Skujkoku molekulārā evolūcija un adaptācijas iespējas

Kokaugi raksturojas ar ilgu paaudžu nomaiņas laiku, taču tiem piemīt arī citu svešapputes augu populāciju īpašības, ar augstu gēnu plūsmas līmeni un lielu efektīvo populāciju (Petit, Hampe 2006). Skujkoki ir ļoti ražīgi un spēj ātri palielināt savas populācijas izmēru, tie pārsvarā ir toleranti un fenotipiski plastiski. Skujkokiem raksturīgs nepārtraukts, plašs izplatības areāls. Izplatības kapacitāte spējē nozīmīgu lomu sugas spējā pielāgoties dažādiem apstākļiem. Skujkoku populācijām piemīt augsta ģenētiskā daudzveidība un lēna neitrālo genoma lokusu molekulārā evolūcija, ko varētu skaidrot ar ilggadību, svešapputi, lielu un nepārtrauktu izplatīšanās areālu (Savolainen, Pyhäjärvi 2007). Pašapputeksnēšanās ierobežošanas mehānismi (Williams, Savolainen 1996), plaši putekšņu izplatīšanās apmēri (Koski 1970) arī ir efektīvi daudzveidības palielināšanā. Genoma neitrālās evolūcijas ātrumu ir iespējams novērtēt, nosakot SNP skaitu sinonīmajos gēna saitēs starp divām sugām, un, zinot šo taksonu aptuvenu evolucionāro atdalīšanās laiku. Šis mutāciju ātrums *A.thaliana* ir noteikts  $1,5 \times 10^{-8}$  mutāciju vienā saitē gadā (Koch *et al.* 2000), bet fosilo priežu analīze atklāja  $0,7 \times 10^{-9}$  (Willyard *et al.* 2007), kas ir daudz zemāks ātruma rādītājs. Tāpēc priežu sugas, kas ir nodalījušās pirms 10 miljoniem gadu, pēc neitrālajiem saitēm atšķirsies tikai par 5% (Savolainen, Pyhäjärvi 2007). Taksonu un populāciju līmenī skujkoki raksturojas ar zemāku nukleotīdu daudzveidību, kas nozīmē, ka tie laika posmā akumulē mazāk mutāciju un paaudzes nomaiņas laiks tikai daļēji spēj izskaidrot šo starpību (Heuertz *et al.* 2006; Pyhäjärvi *et al.* 2007; Chen *et al.* 2010). Šo starpību varētu izskaidrot ar zemāku metabolisma un pazeminātu rekombināciju līmeni (Buschiazzo *et al.* 2012). Tāpat, lielas populācijas un intensīva gēnu plūsma ierobežo jaunu mutāciju fiksāciju populācijā (Savolainen, Pyhäjärvi 2007). Tāpēc skujkoki atšķiras ar augstu ģenētisko daudzveidību populācijās un zemu nukleotīdu aizvietošanas līmeni, kā arī zemu fenotipisko variāciju starp sugām. Šīs īpašības piemīt arī lapu kokiem, tomēr skujkokiem šīs atšķirības ir vēl izteiktākas.

Nesinonīmo substitūciju skaita attiecība pret sinonīmo substitūciju skaitu skujkokiem (0,3137) ir trīs reizes lielāka, nekā segsēkļiem (0,0924), kas parāda, ka skujkokiem ir zemāks kopējo un sinonīmo mutāciju līmenis (Buschiazzo *et al.* 2012). Interesanti, ka vairākums gēnu ar augstākiem šīs attiecības rādītājiem ir iesaistīti atbildes veidošanā pret abiotisko un biotisko stresu, kā arī šūnu signālu pārnesē, attīstības un augšanas regulācijā, vezikulu pārnesē un DNS/RNS piesaistē

(Buschiazzo *et al.* 2012). Šo gēnu stingrāku adaptīvo selekciju daudzgadīgajiem augiem izskaidro ar plasticitātes paaugstināšanās iespējām izmantojot efektīvāku transkripcijas regulēšanu un DNS/RNS piesaistes proteīnu darbību. Kopumā, molekulārā evolūcija skujkokiem raksturojas ar nesinonīmo mutāciju fiksāciju, ko veicina ekoloģiskās un demogrāfiskās īpašības, kā arī genoma stabilitāte; taču kaitīgo mutāciju fiksācija ir samazināta ar lielu efektīvās populācijas skaitu un svešapputi.

Kokaugu vidū lokālā adaptācija ir daudz izteiktāka (Savolainen *et al.* 2011). Kokaugi ir pielāgojušies lokālam klimatam un tāpēc ir potenciāli apdraudēti ātru klimatisko apstākļu izmaiņu rezultātā (Savolainen, Pyhäjärvi 2007). Tā kā klimatiskos apstākļus ir grūti prognozēt, ir nepieciešams virzīt selekciju uz augšanas laika paātrināšanu un reprodukcijas spēju uzlabošanu (Rohd, Bhalerao 2007; Hannien, Tanino 2011), kā arī uz aukstuma un sausuma toleranci (Niinemets 2010). Grūtāk prognozēt adaptatīvās atbildes veidošanos selekcijas populācijās, jo dažādība reakcijā uz stresu labvēlīgos apstākļos var būt slēpta (Ritland 1996; Sillanpaa 2011). Kvantitatīvo pazīmju pētījumi kokaugiem rāda, ka, salīdzinot ar kultūraugiem, liels lokusu skaits iesaistīts pazīmes vai atbildes veidošanā, un katrs lokuss ir ar salīdzinoši nelielu efektu (Howe *et al.* 2003; Quesada *et al.* 2010). Tāpēc vairāku lokusu kombinācija būs noteicoša pazīmes vai atbildes veidošanā. Tāpat, liela nozīme plasticitātes veidošanā varētu būt epigēnētiskiem efektiem, kas vēl ir maz pētīti un to molekulārie mehānismi vēl nav zināmi. Epigēnētiskie efekti daļēji ir ģenētiski nosacīti, bet tie saglabā reakciju uz noteiktajiem vides apstākļiem (Richards *et al.* 2010). Retrotranspozonu iezīmes padara tos par potenciāliem epigēnētisko atbilžu aģentiem.

## 2. Materiāli un metodes

### 2.1. TE-līdzīgo fragmentu diferenciālās ekspresijas identificēšana

#### 2.1.1. Vispārējā eksperimentu struktūra

Darbā aprakstītais pētījums sastāvēja no vairākiem posmiem. Pētījuma mērķis bija identificēt aktīvus retrotranspozonus parastās priedes genomā ekspresētus dažādu stresoru ietekmē. Lai noskaidrotu transponējamo elementu transkriptu esamību stresam pakļautajos priežu stādos, izmantoja nespecifiskus iPBS praimerus, jo kailsēkļu retrotranspozonu sekvenču var atšķirties no publiski pieejamajām segsēkļu sekvenču un neaktīvajiem retrotranspozonu homoloģiem, kas līdz šim ir aprakstīti kailsēkļiem. Lai izvairītos no genotipa izraisīto atšķirību identificēšanas, izmantoja ierobežotas pieejamības priežu rametu materiālu. Bet pēc TE-līdzīgo sekvenču identificēšanas, to reprezentāciju un ekspresiju pārbaudīja ar izveidotiem specifiskiem praimeriem citiem genotipiem un citu stresoru skartajiem paraugiem. Kopumā veica četrus eksperimentus karstuma, priežu hermesa invāzijas, ABA (abscīzskābes) un SA (salicilskābes) apstrādes stresu atbildes izpētei, pēc sekojošas vienotas shēmas.

- ▶ Priedes rametus pakļauj pētāmā stresora ietekmei.
- ▶ Ievāc pa 4 skujām no katra stāda, ieliek iezīmētajos 2 ml stobriņos un nekavējoties sasaldē šķidrā slāpekļī. Šos paraugus izmanto RNS izdalīšanai vēlāk.
- ▶ Pēc eksperimenta beigām, ievāc vēl pa 2 skujām. Šos paraugus izmanto DNS izolēšanai, ģenētiskās vienveidības pārbaudei ar SSR marķieriem u.c.
- ▶ Veic DNS izdalīšanu, ģenētiskās vienveidības pārbaudi ar SSR marķieriem.
- ▶ Veic RNS izdalīšanu, RNS attīrīšanu no DNS piemaisījumiem un kontaminācijas pārbaudi ar RNS PQR.
- ▶ cDNS sintēze un analīze ar kontroles marķieriem.
- ▶ iPBS reakcija, fragmentu analīze un atšķirīgo fragmentu izolēšana un attīrīšana.
- ▶ Fragmentu klonēšana vektorā, šūnu transformācija.
- ▶ Transformēto šūnu pavairošana, atlase, vektoru izdalīšana, ieklonēto fragmentu garuma pārbaude, plazmīdu atlase sekvenēšanai.
- ▶ Sekvenēšana, hromatogrammu analīze un sekvenču salikšana.
- ▶ Sekvenču līdzības meklējumi datubāzēs, retrotranspozonu un to strukturālo elementu identificēšana, datu apkopošana.

Pēc identificēto TE-līdzīgo sekvenču analīzēm un specifiskas amplifikācijas citiem parastās priedes paraugiem, radās jautājums, vai kāds no identificētajiem TE-līdzīgiem fragmentiem atspoguļo pilna izmēra retrotranspozonu transkripciju stresoru ietekmē, vai arī visi šie fragmenti ir himēru transkriptu sastāvdaļas. Tādēļ nākamais pētījuma posms veltīts pilna izmēra retrotranspozonu izolēšanai, raksturošanai un retrotranspozonu iekšējo sekvenču daļu iegūšanai no eksperimentālā cDNS.

Trešais pētījuma posms veltīts praktiskai fragmentu polimorfisma un izplatības noteikšanai. Lai saprastu, cik lielā mērā TE-līdzīgās sekvences ir sastopamas citu genotipu parastās priedes genomos, izveidoja specifiskus praimerus, kurus pārbaudīja dabiskā priežu audzē ar IRAP metodi (Kalendar *et al.* 1999). Šos marķierus izmēģināja arī klonālās daudzveidības noteikšanai, par materiālu izvēloties atšķirīgās plantācijās augošus parastās priedes rametus. Lai saprastu, cik lielā mērā atrastie fragmenti ir konservatīvi un izplatīti citu kailsēkļu sugās, veica specifisku amplifikāciju ar dažādu kailsēkļu dzimtu sugu pārstāvjiem. Informācija par līdzīgu fragmentu sastopamību attāliem taksoniem, var sniegt zināšanas par iespējamā elementa vai saistītā lokusa izcelsmi, sastopamību, polimorfismu un tml.

### 2.1.2. Stresa sensitīvo gēnu marķieru konstruēšana

Ir sarežģīti vizuāli novērtēt, vai organismu neietekmē kāds no nelabvēlīgiem vides vai biogēniem faktoriem, īpaši, ja šī ietekme ir sākuma stadijā. Izanalizējot vairākus literatūras avotus, atlasīja četrus gēnus, kuru ekspresija mainās plaša spektra stresa apstākļos (īpaši karstuma un sausuma ietekmē). Tie ir *dhn3* (dehidrīna III) gēns, *abaH* gēns (abscizskābes inducējamais), *lea* gēns (vēlā embriogēnēzē dominējošs), *P5CS2* gēns (*delta 1-pirolīna-5-karboksilāta sintetāze 2*). Visu šo parastās priedes gēnu sekvences ir publiski pieejamas, izņemot *P5CS2*, kuram praimerus veidoja balstoties uz *Arabidopsis thaliana* (X89414) un *Populus euphratica* (EF412967.1) gēna konservatīvajām daļām. RNS kvalitātes kontrolei izmantoja gēnus, kas ekspresējas normālos apstākļos: *GAPDH* (glicerāldehīda-3-fosfāta dehidrogenāze) un *act* (aktīns), kuriem praimeru konstruēti iepriekš (Jaakola *et al.* 2004).

Jaunizveidoto praimeru amplifikācijas kvalitāti pārbaudīja izmantojot PĶR reakciju ar priedes gDNS, cDNS un sekojošu elektroforēzi agarozes gēlā (*1. tabula*). Katram praimerim optimizēja reakcijas apstākļus. Nespecifiska reakcija jebkuros apstākļos bija aktīva praimeriem ar gDNS, bet ar cDNS ar tiem neieguva sagaidāmā lieluma fragmentus (436 bp), tādēļ tos izslēdza no turpmākiem eksperimentiem.

1. tabula. Stresa inducēšanas kontroles marķieru raksturojums

Nosaukums		Praimera sekvence 5'→3'	Sagaidāmais produkta garums	gDNS	cDNS
<i>GAPDH</i>	F	ACGGTTTTGGTCGAATTG	75 bp	75 bp	75 bp
<i>GAPDH</i>	R	CCCCACGAGCTCGATATCAT			
<i>ACT</i>	F	GCTTGCTTATGTAGCCCT	436-570 bp	nespec.	nespec.
<i>ACT</i>	R	GGTCTTGGCAATCCACATCT			
<i>P5CS2</i>	F	TGATCCCAAGAGGTCAGCA	-	250 bp	190 bp
<i>P5CS2</i>	R	GAATCCTGCTTGTGCTTATTC			
<i>abaH</i>	F	AGGACAACGTTAATTCTGGCTC	120 bp	120 bp	120 bp
<i>abaH</i>	R	AATCGGCCTTATAACCAGTGTGCG			
<i>lea</i>	F	TCCGCAGAGGTTACAGACATCG	140 bp	280 bp	280 bp
<i>lea</i>	R	CTATTTGCGCTCAGGAGTCGAA			
<i>dhn3</i>	F	CGCGGTATGTTTCGGCAAAAAG	399 bp	400 bp	400 bp
<i>dhn3</i>	R	TCGATACATCGGACAGACGCTC			

*GapC1*, *abaH*, *dhn3* praimeru amplificētie fragmenti bija sagaidāmajā lielumā. *P5CS2* un *lea* fragmenti atšķīrās (1. tabula). Lai pārliecinātos, ka ir amplificēti mērķa gēnu fragmenti, tos sekvenēja (divus paraugus no katra), pēc reakcijas izgriežot tos un attīrot no agarozes gēla ar *QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)*. *AbaH*, *dhn3*, *GapC1* sekvences pilnībā sakrita ar datubāzē pieejamo informāciju. *lea* amplificēto fragmentu sekvences par 40-50% līdzinās datubāzes sekvencēm, līdz ar to var secināt, ka amplificējas cits fragments vai arī cits *lea* gēnu ģimenes pārstāvis.

*P5CS2* fragmenta sekvenca sakrita fragmentāri, lai gan sekvences kvalitāte bija augsta. Meklēšana NCBI datubāzēs ar augstu precizitāti nedeja rezultātus. Izvēloties aptuvenu meklēšanu, nukleotīdu datubāzē atrada *Arabidopsis* un *Populus* *P5CS* sekvences fragmentu līdzību 40-50% apmērā. Meklējot EST datubāzēs ar tiem pašiem parametriem, atrada līdzību (maksimāli 80%) ar *Pinus pinaster* EST sekvenci (BX677319), kura ekspresējas ūdens deficīta rezultātā. Iespējams, ka priedei ir šī gēna homologs, kurš ekspresējas stresa apstākļos, taču gēna sekvenca vēl nav pieejama. Izmantojot sekvenču salīdzināšanu ar *P5CS* proteīnu sekvencēm no dažādiem organismiem (*A. thaliana*, *Populus euphratica*, *Zea mays*, *Glycine max*, *Oryza sativa*) līdzība bija ap 40% .

### 2.1.3. Priedes rametu ģenētiskās vienveidības pārbaude ar SSR marķieriem

Parastās priedes divgadīgos stādus, potētos viena klona rametus, nodrošināja AS „Latvijas valsts meži” Kalsnavas kokaudzētava (Jaunkalsnava, Latvija). Visi stādi pirms eksperimenta uzsākšanas bija vizuāli veseli. Priedes stādus vienu mēnesi aklimatizēja laboratorijā ierīkotajā plauktā ar *Sylvania GroLux T8* un *Cool White Deluxe (Sylvania)* augiem piemēroto fluorescento lampu apgaismojumu un elektrisko taimeru fotoperioda regulēšanai, kurš bija uzstādīts atbilstoši sezonai ar 10 stundu fotoperiodu. Katram eksperimentam izmantoja cita klona rametus, viena eksperimenta ietvaros visi rameti bija no viena klona.

Priedes DNS izdalīja no skujām pēc CTAB izdalīšanas metodes augiem ar augstu polisaharīdu un polifenolu saturu (Porebski *et al.* 1997) ar sekojošu attīrīšanu no RNS piemaisījumiem ar 100 µg/ml *RNase A (Fermentas)*. DNS koncentrāciju noteica ar spektrofotometru *Lambda 25 UV/VIS (PerkinElmer)* un pielīdzināja 50 ng/µl. Visus rametus pārbaudīja ar SSR marķieriem PTTX3107, PTTX4001 un PTTX4011 (Soranzo *et al.* 1998), kuri Latvijas priedes populāciju analizē iepriekš uzrādīja augstu izšķirtspēju (2. tabula). Pēc triju marķieru datiem rameti bija ģenētiski vienveidīgi (3. tabula), kas novērsa paraugu sajaukšanas kļūdu un indivīdu ar ģenētiski atšķirīgu materiālu izmantošanu eksperimentā. Šie dati ir pietiekami, lai secinātu, ka paraugi ir viena indivīda kloni.

2. tabula. Parastās priedes Latvijas populācijas ģenētiskās daudzveidības analīžu SSR marķieru rādītāji (iegūti ar statistisko analīzes programmu *GenALEX 6.41*), (Ruņģis D., nepublicēti dati)

Rādītājs	PTT4011	PTT3107	PTT4001
N (indivīdu skaits)	135	132	128
Na (alēļu skaits)	15	24	22
Ne (efektīvo alēļu skaits)	4,175	7,418	5,044
I (informācijas indekss)	1,797	2,429	2,121
Ho (novērotā heterozigotāte)	0,556	0,811	0,734
He (sagaidāmā heterozigotāte)	0,760	0,865	0,802
UHe (objektīvā heterozigotāte)	0,763	0,868	0,805
F(fiksācijas indekss)	0,269	0,063	0,084
DI (daudzveidības indekss)	0,872	0,850	0,860

3. tabula. SSR marķieru dati priedes rametiem.

Rametu Nr.	PTTX3107		PTTX4001		PTTX4011	
	alēle 1	alēle 2	alēle 1	alēle 2	alēle 1	alēle 2
ja3_1	156	172	216	219	262	262
ja3_3	156	172	216	219	262	262
ja3_4	156	172	216	219	262	262
ja3_5	156	172	216	219	262	262
ja3_6	156	172	216	219	262	262
ja3_7	156	172	216	219	262	262

Rametu Nr.	PTTX3107		PTTX4001		PTTX4011	
	alēle 1	alēle 2	alēle 1	alēle 2	alēle 1	alēle 2
ja3_8	156	172	216	219	262	262
ja3_9	156	172	216	219	262	262
ja3_10	156	172	216	219	262	262
ja3_11	156	172	216	219	262	262
TU28-1	150	156	210	216	262	262
TU28-2	150	156	210	216	262	262
TU28-3	150	156	210	216	262	262
TU28-4	150	156	210	216	262	262
TU28-5	150	156	210	216	262	262
TU28-6	150	156	210	216	262	262
TU28-7	150	156	210	216	262	262
TU28-8	150	156	210	216	262	262
TU28-9	150	156	210	216	262	262
TU28-10	150	156	210	216	262	262
TU28-11	150	156	210	216	262	262
TU28-12	150	156	210	216	262	262
TU28-13	150	156	210	216	262	262
TU28-14	150	156	210	216	262	262
TU28-15	150	156	210	216	262	262
TU28-16	150	156	210	216	262	262
pop21-1	170	170	206	216	266	284
pop21-2	170	170	206	216	266	284
pop21-3	170	170	206	216	266	284
pop12-4	158	158	218	218	266	266
pop12-5	158	158	218	218	266	266
pop12-6	158	158	218	218	266	266

### 2.1.4. Stresa apstākļu inducēšana

#### *Karstuma stresa iniciācija*

Karstuma ietekmes eksperimentu veica kontrolētos apstākļos izmantojot klimata kameras ar gaisa, temperatūras un mitruma kontroli HOTCOLD-GL (*SELECTA*). Divus JA003 rametus ievietoja klimata kamerā, kur temperatūra astoņu stundu laikā pakāpeniski paaugstinājās līdz 40 °C, un tad šo temperatūru uzturēja vēl 16 stundas. Uzstādīja 10 stundu fotoperiodu. Divus JA003 rametus ievietoja citā klimata kamerā ar identisku režīmu, atskaitot temperatūru, kuru uzstādīja 22 °C dienā un 14 °C naktī. Viens ramets palika ierastajos apstākļos laboratorijā. Pēc eksperimenta ievāca skujas no visiem rametiem un nekavējoties sasaldēja šķidrā slāpekļī.

#### *Priežu hermesa invāzija*

TU28 rametus izmantoja priežu hermesa (*Pineus pini* L.) invāzijas pētījumā. Invāziju konstatēja pēc vairākām pazīmēm (sveķošana, balti vaska plankumi, dzeltējošas skujas un zaru kalšana). Tāpat ārējo barošanas apstiprināja pēc baltā tinuma mikroskopēšanas. Četriem rametiem

(B1-B4) skujas ievāca nekavējoties, 14 rametiem (B1-B16, izņemot nokaltušus B5 un B7) skujas ievāca pēc divām invāzijas nedēļām, kad visiem rametiem konstatēja hermesa invāziju atšķirīgās izplatīšanās pakāpēs. Tikai viens ramets (B4) pēc stresa iniciācijas molekulāro marķieru datiem nebija hermesa invāzijas skarts, to turpmāk lietoja par kontroles paraugu.

#### *Augu hormonu ietekme*

Trīs POP12 rametus izmantoja ABA ietekmes pētījumā. Pagatavoja 1 mM ABA (*Sigma*) šķīdumu dejonizētā destilētā ūdenī ar 1,92% etilspirta un eksperimenta laikā to uzglabāja 4 °C. No 1mM ABA katru dienu pirms apsmidzināšanas pagatavoja 10 μM ABA darba šķīdumu, ar kuru apstrādāja stādus. Ūdens šķīdumu ar ekvivalentu etanola daudzumu pagatavoja kontroles rameta apstrādei. Divus POP12 rametus vienu nedēļu katru dienu apsmidzināja un aplaistīja (10 ml uz stādu) ar 10 μM ABA šķīdumu. Vienu kontroles POP12 rametu apsmidzināja un aplaistīja ar etanola-ūdens šķīdumu. Skujas ievāca pirms eksperimenta (k4-ABA, k6-ABA, k5-ABA), 24 stundas pēc pirmās apstrādes (24-4-ABA, 24-6-ABA, 24-k5-ABA), 64 stundas pēc pirmās apstrādes (64-4-ABA, 64-6-ABA, 64-k5-ABA), 72 stundas pēc apstrādes un nedēļu pēc apstrādes.

POP21 rametus izmantoja SA ietekmes pētījumā, kur divus rametus vienu nedēļu apsmidzināja un aplaistīja ar 5 mM SA (*Sigma*) ūdens šķīdumu, kuru no jauna pagatavoja katru dienu. Kontroles rametu apsmidzināja un aplaistīja ar ūdeni. Skujas ievāca pēc iepriekšējā eksperimenta shēmas: no visiem rametiem pirms apstrādes, pēc 24, 64, 72 stundām un nedēļu pēc pirmās apstrādes (k1-SA, k2-SA, k3-SA; 24-1-SA, 24-k2-SA, 24-3-SA u. tml).

### **2.1.5. Diferenciāli ekspresēto fragmentu identificēšana**

#### *RNS paraugu sagatavošana*

RNS izdalīja ar CTAB-metodi (Chang *et al.* 1993). RNāzes un DNS kontaminācijas novēršanai pirms darba ar RNS galda virsma tika apstrādāta ar *RNase Zap* salvetēm (*Ambion*) un *DNA Zap* (*Ambion*) šķīdumiem. Izmantotie plastmasas materiāli tika apstrādāti ar 0,5 M NaOH, skaloti un autoklavēti. Visās metodēs izmantotais DEPC ūdens tika pagatavots no dejonizēta autoklavēta ūdens, tam pievienojot 0,01% DEPC, inkubējot pa nakti un atkārtoti autoklavējot. Reversās transkripcijas un reālā laika PĶR reakcijas veica 30 min ar UV stariem apstarotajā boksā. Lai RNS paraugam novērstu DNS kontamināciju, to vairākas reizes attīrīja ar *Turbo DNA-free* kitu (*Ambion*) ar sekojošu fenola:hloroforma:izoamilspirta (24:24:1) ekstrakciju, līdz standarta PĶR amplifikācija ar genomiskajiem praimeriem pēc elektroforēzes vizualizējot tos 1,7% agarozes gēlā



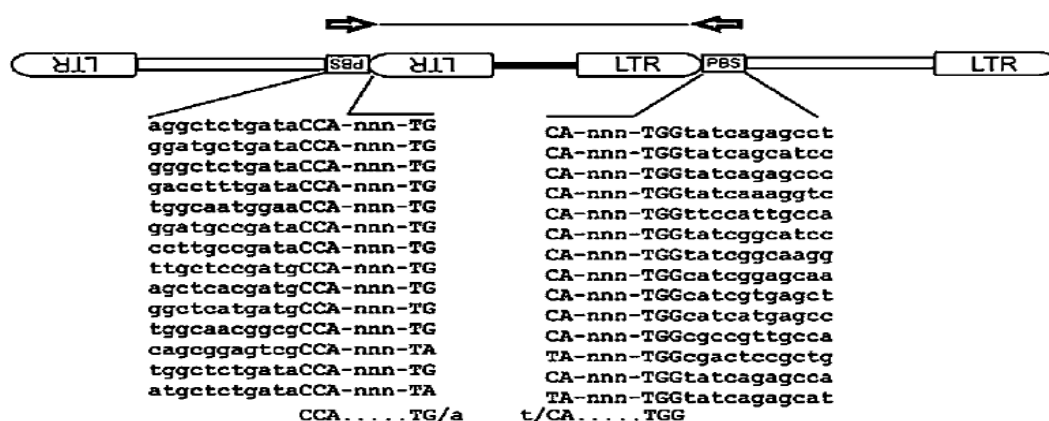
neuzrādīja produktu esamību. RNS koncentrāciju mērīja ar *Quibit* fluorimetru (*Invitrogen*) pēc ražotāja protokola un RNS paraugus atšķaidīja ar DEPC apstrādātu ūdeni līdz 50 ng/μl. Paraugiem no stresam pakļautajiem ramiem stresa iniciāciju apstiprināja ar stresa kontroles marķieru amplifikāciju. Stresam nepakļauto stādu RNS paraugu kvalitāti novērtēja pēc endogēnās kontroles gēna GAPDH amplifikācijas.

### *Reversā transkripcija*

Reverso transkripciju veica ar *TaqMan* reversās transkripcijas kitu (*Applied Biosystems*) pēc ražotāja protokola ar 1 μg RNS izmantojot heksamēru praimerus. Reversās transkripcijas reakcijas produktu atšķaidīja 1:2 (v:v) ar DEPC apstrādātu ūdeni un turpmākajās reakcijās izmantoja 2 μl cDNS parauga. Ekvivalentu RNS atšķaidījumu lietoja kā negatīvo kontroli. PĶR ar cDNS optimizēja atkarībā no izmantoto praimeru īpašībām un reakcijas uzdevuma. Tipiska PĶR reakcija ar cDNS veikta 20 μl kopējā reakcijas tilpumā ar sekojošu sastāvu: 1x *Taq* buferis (*Fermentas*), 1,5-2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP mix, 0,1 μM no katra praimera, 0,7 U *Taq* polimerāze (*Fermentas*). Programma sastāvēja no denaturēšanas posma 94 °C 3 min, tai sekoja 38 cikli ar denaturāciju 94 °C 30 sek, praimeru pielipšanu 50-62 °C 30 sek, sintēzi 72 °C 40 sek, un beigu elongācijas posms 72 °C 10 min. Kontroles gēnu produktus vizualizēja ar elektroforēzes metodi 1xTAE buferī, ar etīdija bromīda šķīdumu (*Merck*) iekrāsotā 1-1,5% agarozes gēlā, 1,5-2 stundas 70-94 V. Visus elektroforēzes attēlus vizualizēja izmantojot UV-staru transiluminatoru ar fotosistēmu *AlphaDigiDocRT* (*JH BIO Innovations*) un fotoaparātu *Olympus sp-500uz*. Attēlus apstrādāja ar *AlphaEaseFC v. 4.0.0* programmu.

### *iPBS reakcija un fragmentu izolēšana*

Nespecifisko iPBS praimeru PĶR reakcija ar nelielām modifikācijām veikta pēc Kalendar *et al.* (2010). Reakcijas shēma redzama 15. attēlā. Izmantoja 15 PBS praimerus: 2001, 2009, 2010, 2076, 2080, 2081, 2083, 2095, 2220, 2239, 2271, 2380, 2097, 2384, 2242. Deviņi iPBS praimeri veidoja amplifikācijas produktus ar parastās priedes gDNS: 2076, 2010, 2001, 2009, 2080, 2220, 2242, 2239, un 2384. iPBS produktus sadalīja ar elektroforēzes palīdzību 5 stundas 120 V izmantojot 1,7% *TopVision Low Melting Point Agarose* (*Thermo Scientific*). Elektroforēzes kameru dzesēja ar ledu, neļaujot gēlam sakarst virs 50 °C. Pēc fragmentu analīzes un izgriešanas no agarozes gēla, tos attīrīja izmantojot ražotāja protokolu ar *Qiaquick Gel Extraction Kit* (*Qiagene*). Fragmentus pāramplificēja ar specifisku PĶR, kur praimeru hibridizācijas temperatūra pakāpeniski pazeminājās no 60 līdz 47 °C, bet beigu elongācijas posms ilga 30 min, lai notiktu *Taq* polimerāzes vadītā nespecifiskā adenozinu pievienošana ligēšanas efektivitātes paaugstināšanai.



15. attēls. iPBS reakcijas shēma (pēc Kalendar et al. 2010).

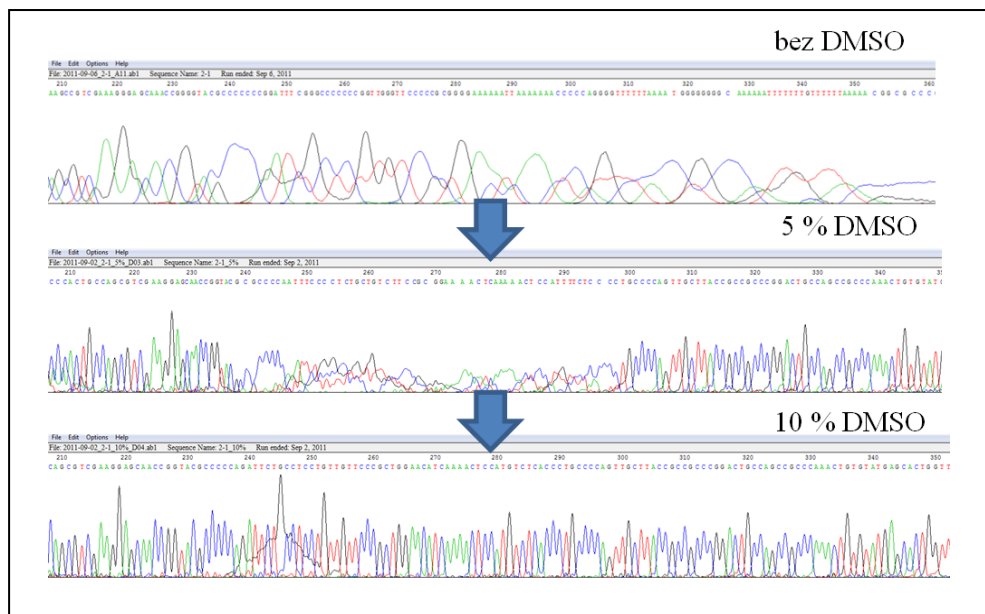
Pāramplificētos fragmentus pārbaudīja elektroforētiski. PĶR produktus attīrīja ar pagatavotām kolonām no *Sefadex-G50* (*Sigma*) izmantojot *MultiScreen* filtru plates (*Millipore*) un *Multiscreen Assay system* (*Millipore*). Attīrītus produktus liģēja ar plazmīdu pTZ57R/T izmantojot *InsTAclone PCR Cloning Kit* (*Fermentas*) atbilstoši ražotāja protokolam.

#### Fragmentu liģēšana un transformēšana

Kompetentās *E.coli* šūnas sagatavoja pēc Inoue et al. (1990). *E.coli* šūnas transformēja ar izveidotiem vektori ar karstuma šoka palīdzību pēc Inoue et al. (1990), un uzsēja uz LB-agara (*Roth*) barotnēm ar 0,1 mM IPTG (*Fermentas*), 40 µg/ml X-gal (*Fermentas*) un 200 mg/L ampicilīna, insertu saturošo *E.coli* selektīvai koloniju audzēšanai un atlasei. Plates inkubēja 37 °C 20 stundas. No katras plates atlasīja pa 5-10 *E.coli* šūnu balto koloniju un pavairoja inkubējot 37 °C vēl 20 stundas šķidrā SOB barotnē ar 200 mg/L ampicilīna. Plazmīdas izdalīja izmantojot alkalīna lizēšanas metodi (Birnboim, Doly 1979) ar sekojošām modifikācijām: lizēšanas buferis saturēja 100 mM NaOH, veica arī papildus ekstrakciju ar hloroforma:izoamilspirta maisījumu (24:1). Plazmīdu insertu garuma atbilstību pārbaudīja ar *EcoRI* un *SaII* (*Thermo Scientific*) restrikcijas enzīmu dubulto šķelšanas reakciju atbilstoši ražotāja protokolam.

#### Sekvenēšanas reakcija

Insertu sekvenēšanai izmantoja M13 praimerus un *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (*Applied Biosystems*). Sekvenēšanas reakciju veica 10-20 µl kopējā tilpumā, *Ready Reaction Premix v.3.1* lietoja 1:4 atšķaidījumā. Sekvenēšanas reakcijas attīrīja ar *Sefadex G-50* (*Sigma*), liofilizēja 80 °C 20 min, šķīdināja Hi-Di formamīdā (*Applied Biosystems*), denaturēja 92 °C 2 min un sadalīja *ABI-Prism 3130x Avant Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*) izmantojot POP7 polimēru (*Applied Biosystems*).



16. attēls. Sekvenēšanas reakcijas optimizācija fragmentiem ar augstu GC nukleotīdu saturu.

Dažos gadījumos sekvenēšanas reakcija aprāvās, tad to pielāgoja sekvenču polimerizācijai ar augstu GC nukleotīdu saturu, izmēģinot 5% un 10% DMSO pievienošanu reakcijai (pēc Seto *et al.* 1995), pēc kā hromatogrammu kvalitāte ievērojami uzlabojās (16. attēls).

### 2.1.6. Sekvenču analīze

#### Sekvenču hromatogrammu sagatavošana

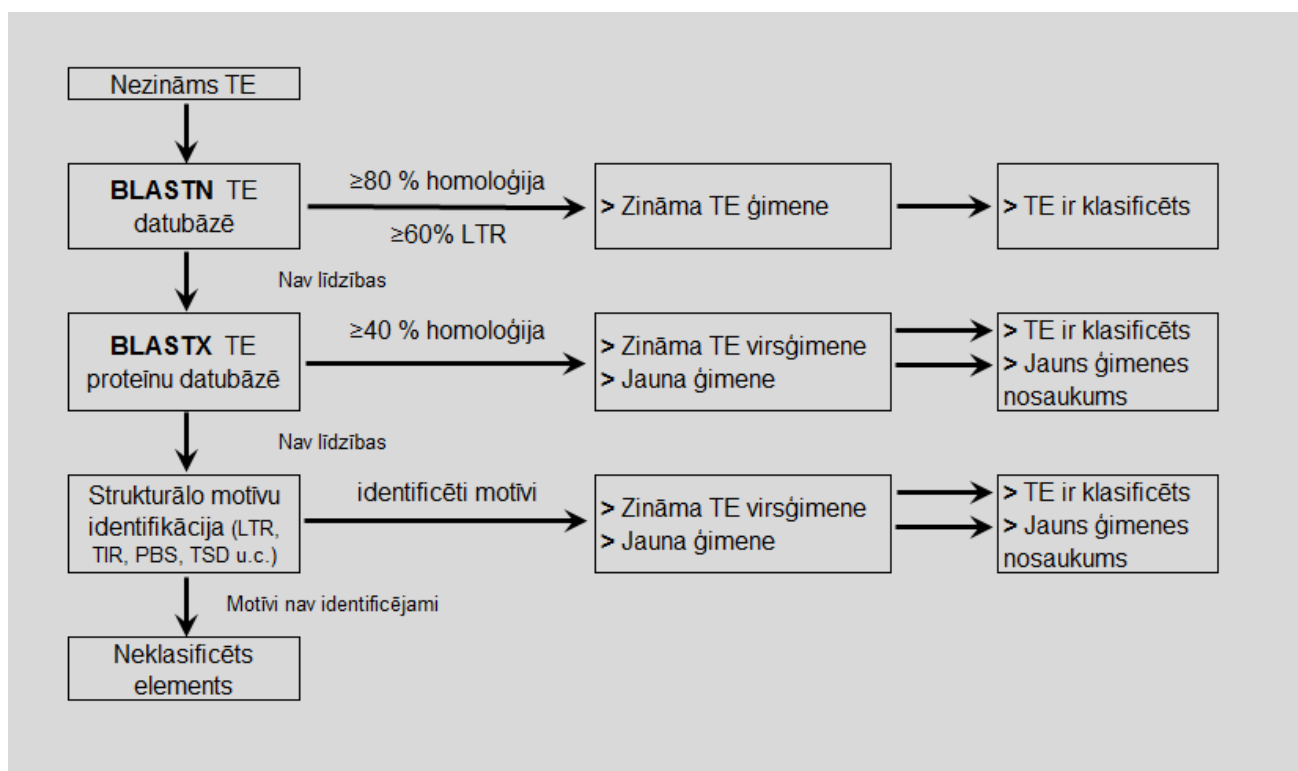
Sekvenču hromatogrammas analizēja ar programmu *Sequencing Analysis v5.1* (Applied Biosystems). Ar katru M13 praimeru ieguva labas kvalitātes 500-600 bp garas sekvences. Visos gadījumos plazmīdu sekvences identificēja un izgriezta manuāli vai izmantojot rīku VecScreen ([www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/)). Gandrīz visos gadījumos no abām fragmenta pusēm tiešā un invertētā orientācijā atrada izmantoto PBS praimeru sekvences. Sekvences formatēja FASTA formātā ar internetā brīvi pieejamo rīku READSEQ v. 2.1.2. (<http://www-bimas.cit.nih.gov/>). Sekvenču salīdzināšanu un līdzības dendrogrammu veidošanu veica ar brīvi pieejamu CLUSTALW v.1.83. rīku (Thompson *et al.* 1994). Dendrogrammas vizualizēja ar programmu MEGA v.5. (Tamura *et al.* 2011).

Katrā eksperimentā identificētās sekvences savstarpēji salīdzināja. Viens izgrieztais fragments saturēja sagaidāmā garuma (aptuveni  $\pm 30$  bp) sekvenču grupu ar dažādu savstarpējās līdzības pakāpi. 5-6 plazmīdu atlase bija pietiekama pamata variācijas noskaidrošanai. Sekvences pieskaitīja pie vienas grupas, ja līdzība bija vienāda vai augstāka par 90%. Sekvences ar līdzību 70-

89% iekļāva visu eksperimentu salīdzināšanas analīzē. No katras sekvenču grupas izvēlējās vienu reprezentatīvu sekvenci. Ja viena eksperimenta ietvaros vairāki fragmenti saturēja vienādas sekvences, izveidoja konsensus sekvenci ar *Multalin* servisu (Corpet 1988, Schneider 2002), kuru izmantoja par reprezentatīvo sekvenci turpmākajām analīzēm. Katram eksperimentam izveidoja reprezentatīvo unikālo sekvenču grupu. Pēc tam šīs grupas salīdzināja savā starpā. Visas identificētās diferenciāli ekspressētās sekvences tika publicētas NCBI EST datu bāzē ar gēnu bankas numuriem JZ389987-JZ390112.

### Fragmentu homoloģijas analīze

Analizēja sekvenēto fragmentu līdzību ar publicētām gēnu, TE, neidentificētām ekspressētām vai genomiskām sekvencēm. Šim mērķim izmantoja NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) sekvenču datubāzes: nukleotīdu, EST, references RNS un references genomisko sekvenču datubāzes; kā arī mobilo transponējamo elementu sekvenču datubāzes: *GrainGenes Triticeae Repeat Sequence Database* (<http://wheat.pw.usda.gov>), *Gypsy Database 2.0*. (<http://gydb.org/>, Llorens *et al.* 2011), *Rebase* (<http://www.girinst.org/>, Kohany *et al.* 2006).



17. attēls. TE klasificēšanas shēma pēc Wicker *et al.* (2007).

Meklēšanai izmantoja megablast, blastn un blastx rīkus (Altschul *et al.* 1990). Sakritības ar datubāzes ierakstiem analizēja pēc sekojošiem parametriem: līdzības pārklājuma procents, ticamības sliekšņa rādītājs ( $e$ -vērtība,  $E=mn \cdot 2^{-S}$ ), kas dod priekšstatu par sakritības ticamību (jo mazāka

vērtība, jo ticamāks rezultāts) un atspoguļo izmantotās datubāzes izmēru un nukleotīdu sakritības vērtību ( $S'$ ); nukleotīdu sakritību vērtība  $S'$  ( $S' = \lambda S - \ln K / \ln 2$ ), kur  $S$  ir vienādu nukleotīdu skaits, bet  $K$  un  $\lambda$  ir salīdzināšanas algoritma statistiskie parametri. EST sakritību skaitu aprēķināja izmantojot *NCBI blastn* meklēšanu starp datubāzes ierakstiem, kas attiecas uz zaļajiem augiem (*Viridiplantae*), un ņēma vērā ierakstus ar ticamības sliekšņa rādītāju vienādu vai mazāku par 0,01. TE identifikāciju diferenciāli ekspresētajos fragmentos noteica kā aprakstīts Wicker *et al.* (2007) (17. attēls). Homoloģiju ar TE sekvenci uzskaitīja, ja nukleotīdu sekvences līmenī fragments uzrādīja līdzību vienādu vai augstāku par 80% ar iekšējo TE sekvenci, vienādu vai augstāku par 60% ar TE LTR, ja translētās fragmenta sekvences aminoskābju secība līdzinājās TE proteīnam vairāk par 40%. Līdzības pārklājuma procentu fragmentā aprēķināja attiecinot kopējo nukleotīdu skaitu rajonam ar augstu homoloģiju pret identificētā fragmenta kopējo garumu.

Retrotranspozonu struktūrelementus noteica izmantojot vairākas sekvenču analīzes programmas un rīkus: NCBI BLAST rīks (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), augu promoteru identificēšanas programma *TSSP* (Solovyev, Shahmuradov 2003), augu regulatīvo motīvu identificēšanas programma *NSITE-PL* V.2.2004 (Solovyev, 2002), regulatīvu RNS motīvu un elementu identificēšanas rīks *RegRNA* (Mignone *et al.*, 2005), TSD motīvu identificēšanas rīks *TSDA V. 1.0* (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de>), atklātās translācijas fazes analīzes rīks *StarOrf* (<http://star.mit.edu/>). RNS sekundārās struktūras modelēšanai izmantoja *RNAfold* (Lorenz *et al.* 2011). miRNS identificēšanai izmantoja rīku *FindMiRNA* (<http://linux1.softberry.com/>).

### 2.1.7. TE-līdzīgo fragmentu ekspresijas kvantitēšana un salīdzināšana starp eksperimentiem

#### *Reālā laika PĶR*

Lai salīdzinātu identificēto TE-līdzīgo fragmentu ekspresiju starp pētījumiem, izmantojot Primer-BLAST programmu (Ye *et al.* 2012) izveidoja 27 specifiskus praimeru pārus (4. tabula). Praimerus pārbaudīja uz priedes gDNS un visos paraugos ieguva vienādus amplifikācijas produktus. Pārsvārā praimerus piemeklēja komplimentārus augsti homologajam TE rajonam, taču, gadījumā ja fragments saturēja LTR atkārtotumu, praimerus nevarēja konstruēt. RNS koncentrācijas noteikšanu un reverso transkripciju veica atkārtoti, kā aprakstīts šī darba 2.1.5. nodaļā. No 20  $\mu$ L reakcijas produkta pagatavoja piecus atšķaidījumus 1:5 ar DEPC apstrādātu ūdeni. 5  $\mu$ L no katra cDNS atšķaidījuma izmantoja reālā laika PĶR reakcijām veiktām ar *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (Thermo Scientific) izmantojot ražotāja protokolu. Reakciju veica *StepOnePlus™ Real-*

*Time PCR System (Applied Biosystems)* un amplikonu uzkrāšanas dinamiku analizēja ar *StepOne v.2.2.2.* programmu (*Applied Biosystems*). Analīzei izmantoja relatīvās kvantitēšanas  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metodi, normalizējot paraugus pret endogēnās kontroles GAPDH amplifikācijas rādītājiem (Schmittgen, Livak 2008). PĶR efektivitāti katram praimerim un arī endogēnajai kontrolei salīdzināja izmantojot standartlīkņu analīzi.

#### Salīdzinošā PĶR

Eksperimentālos cDNS kontroles paraugus un stresam pakļautos paraugus izmantoja amplifikācijai ar TE identificēto fragmentu specifiskajiem praimeriem. Karstuma stresa rezultātā identificētiem fragmentiem praimeru tika konstruēti divas reizes (4. tabula). Reverso transkripciju un cDNS paraugu atšķaidījumus veica kā aprakstīts iepriekš šī darba 2.1.5. nodaļā ar sekojošām modifikācijām. Viena reakcija saturēja 0,7 U *Dream Taq* un 0,2 U *Pfu (Thermo Scientific)* polimerāžu (*Thermo Scientific*), PĶR programmas sintēzes posms ilga 1 min. PĶR amplifikācijas produktus vizualizēja pēc elektroforētiskas atdalīšanas 1,5% agarozes gēlā 2 stundas 90 V. Dažus no fragmentiem, kas nesakrita pēc garuma ar sagaidāmo, izgriezta, ligēja un sekvenēja pēc iepriekš aprakstītā protokola.

4. tabula. Specifiskie praimeru, izmantoti salīdzinošā PĶR un reālā laika PĶR.

Nosaukums		Praimera sekvenca 5'→3'	Sagaidāmais produkta garums, bp
<i>pT49</i>	F	AGGTGCAGAACTTGGTTCTAT	562
	R	CTATGATGTCATCCACAGGGT	
<i>pT49-2F</i>	F	TTAGCCAGGAAAGGGGGTCT	150
<i>pT30</i>	F	TCAGATGTTGTACTIONTCGACTC	491
	R	GCTGAGAAATCTACCATGTAC	
<i>pB104</i>	F	GGATGCACTAATCACATGACTGG	200
	R	CTAGGCTCGGATGCCAGAGC	
<i>pT10-1</i>	F	TGTATTTGCACATATCGAGCA	400
	R	TAAAAGTGTCGCTAGCATCCA	
<i>pT10-2</i>	F	GTGCTTCCATTGAGCCTTGGCAG	118
	R	CGGTAGCCACCGCGTGACAT	
<i>pT31-1</i>	F	TCTTGAGTAACCGAGATACCG	500
	R	TGATCATCGGGAAAGGAAACA	
<i>pT31-2</i>	F	CGAAAGCCGTGCCCGCAGTT	126
	R	TCCGCCGAGAAGAGACCATCAC	
<i>pT73-1</i>	F	GACAAAAGATGTCACGCAAGT	562

Nosaukums		Praimera sekvence 5'→3'	Sagaidāmais produkta garums, bp
	R	TGCTATAAAAGGAAACCCCTCT	
<i>pT73-2</i>	F	CTGTGATACTAAATACTTTGCTGC	153
	R	ATCGCAACAGTTTTTCGAGGG	
<i>pT92-1</i>	F	ACGAAGTTTTGGCAAGACAGA	214
	R	GCCAAGTAAAAACCATGTCTGA	
<i>pT12-1</i>	F	TCACACAGACGTGTGTGGACC	400
	R	TGAGGACAACGGTTCTGCACA	
<i>pT12-2</i>	F	ACAGAACGATTGTGGGTGCT	112
<i>pT28-1</i>	F	GTTTCAACAGGTGTACCAGGG	440
	R	ACCAGTCAATGTCCTCTGGAA	
<i>pT28-2</i>	F	CGGGCGAAGACCCGTCGAATC	110
<i>pT51-1</i>	F	ACCTGAAGATGTGGATCATCC	570
	R	AAGAAAGCAGCCTTTGTCCTC	
<i>pT51-2</i>	F	AGGTCACGAACAGGTGTCTGCT	137
	R	ATCGGCCGGTCTCGCAGTGA	
<i>pB54</i>	F	AGCGGCACCAAAGGAATCGC	155
	R	TGCGATCAACCTTGTACCAGC	
<i>pB125</i>	F	CTCGTACCCACGTGCAGGCT	111
	R	ACCAGTCCAAAGAAGCCCCAG	
<i>pB193</i>	F	CGACTGCGGGTGTGGTGTAGT	150
	R	CAGAGGAGGGGAGCGCCTT	
<i>pB166</i>	F	GCCCCGACATACCTGCCGA	109
	R	CCGGGTGCGCACAAGTGAGG	
<i>pB103, SA24</i>	F	TGGTTTCTTTGTCTCCCGTT	104
	R	TGATGCCAGACAAGGAGTGAG	
<i>pB211</i>	F	TCACCGCGATGAGCTGGGAA	103
	R	TCGTTGGTTTCGACACTCTGTG	
<i>pB4, B123</i>	F	AGCATTATTGAAGTTATTCCAGCG	124
	R	TCAATGCCCTTCTCACTGAC	
<i>pB74</i>	F	GGTGCCAGCCTCGTGAATCC	149
	R	TCGATGGGTGCGGTAAGACCG	
<i>pB301</i>	F	GCCATGCGCGAGCTCTGTCT	143
	R	TGGAGCCCCTACTGACGACCC	
<i>pB153TE</i>	F	AGGGGATAACCCTTTAGGCT	110
	R	TAAGAGGCAAGGCACCCCTA	
<i>pB153C</i>	F	GTGGAGGTCCGAACCGACTGA	120

Nosaukums		Praimera sekvence 5'→3'	Sagaidāmais produkta garums, bp
	R	AACTGCTGCGCCTCAACGCA	
<i>pSA12</i>	F	GGCTAGACACAAACGAGAGAGA	128
	R	CCACTTACCAGAGAGCTGGG	
<i>pSA07, ABA10</i>	F	GGACTAAGCGATCTGCCGAA	131
	R	TGCGTACTCAAGCCGACAT	
<i>pSA16-1</i>	F	CGACGATCGAATCTCAGGCA	127
<i>pSA16-2</i>	R	TAGCAGAACCTGGATGCTCA	
<i>pSA03-2</i>	F	ACATACATCGTGTGGGCTGG	146
	R	ACAGTACCCACGAGATCCGA	
<i>pABA18</i>	F	AGCGCCGTCCTTCGATAAAT	146
	R	TCCCAAAGGAGCCCCAGATA	

## 2.2. Pilnizmēra retrotranspozonu izolēšana

### 2.2.1. Garās distances PĶR

Optimizēja Kalendar *et al.* (2010) retrotranspozonu izolēšanas metodi. Izmantojot identificētās sekvences, konstruēja 25-30 bp garus, komplementārus iespējamajam LTR apgabalam praimerus ar augstu kušanas temperatūru (5. tabula). Ievēroja, ka parasti zināmiem augu retrotranspozoniem LTR satur CA (retāk TA) savā 3' galā, bet, ja sekvence ir reversā orientācijā, tad TG nukleotīdus. Šie nukleotīdi atrodas 0-4 bp no PBS segmenta. Lai praimeri neveidotu dimērus paši ar sevi, to sekvences analizēja izmantojot brīvi pieejamo programmu *FastPCR professional* v. 6.1 (Kalendar *et al.* 2011).

5. tabula. Garās distances PĶR izmantotie praimeri

Nosaukums	Sekvence 5'-3'	Garums, bp	T <sub>m</sub>
pT28_L1	TACACACCGGCAACAGACGAACTTTAACCA	30	76,3
pT28_L2	AGCTACGGACAACATACAGTTGGGGTTCAA	30	64
pT10_L	TTTCCAAAGTTTTGGGGCCAAGTTCGGGTT	30	65
pT31_L	GGTTAGTGGGGGTTACCCGTGGTGATGA	29	67
pT73_L	GGGTTGTCAATTTGTATATTGCCGTGATA	29	58

Tāpat, reakcijai tika pievienots 3% DMSO, kurš samazina dimēru veidošanās iespējamību. Reakciju veica ar *Phusion High-Fidelity DNA* polimerāzi (*Thermo Scientific*), kura ir piemērota garu

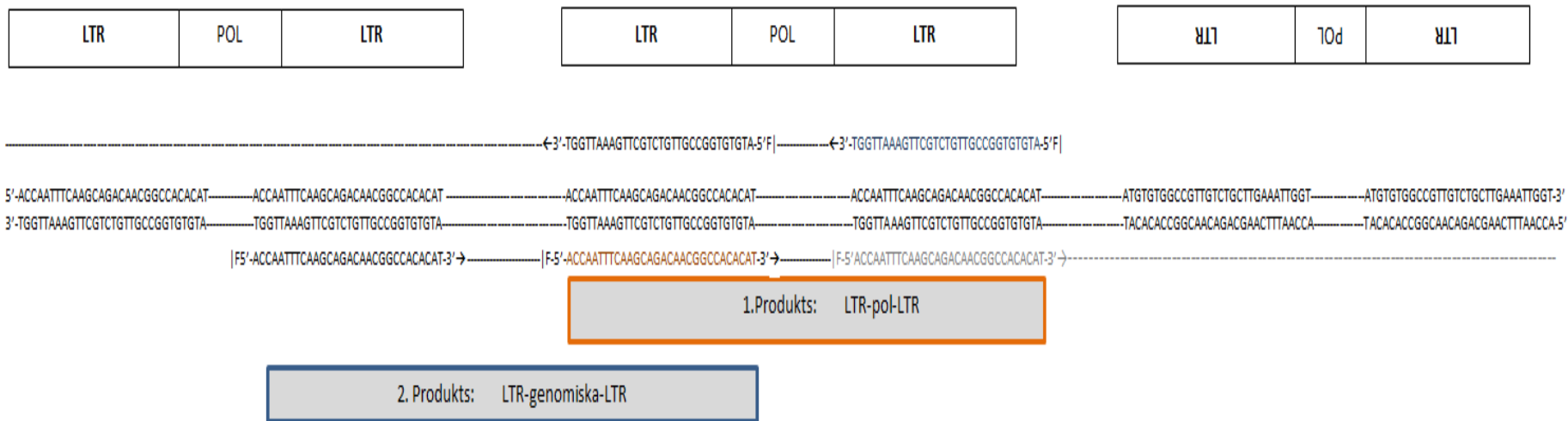


fragmentu sintēzei ar augstu precizitāti un ātrumu. Taču, tā veido strupus galus un klonēšanai TA-vektorā veica papildus adenoziņa nukleotīdu pievienošanu ar *Taq* polimerāzi. Garās distances PĶR veica 50 µL ar 100 ng gDNS; 1x *Phusion HF* buferi; 0,2 mM dNTP; 0,3 µM praimeru; 0,5 U *Phusion HF* polimerāzi; 3% DMSO. Vispārējā reakcijas shēma ar vienu amplifikācijas praimeru komplementāru LTR ir redzama 18. attēlā. Garās distances PĶR programma sākas ar denaturāciju 98 °C 30 sek; 25 cikliem, sastāvošiem no denaturācijas 98 °C 10 sek; praimeru hibridizācija 65 °C 1 min; sintēzes 72 °C 200 sek; beigu elongācijas 72 °C 10 min; reakcija beidzās ar inkubāciju 4 °C līdz izmantošanai. Pēc amplifikācijas visu produktu uznesa uz 1,5% *TopVisionvision Low Melting Point* agarozes (*Thermo Scientific*) gēla elektroforēzei 5 stundas 120 V. Vizualizācijai izmantoja Sybergreen I (*Invitrogen*) krāsvielas atšķaidījumu ar DMSO (1:200), gēlam pievienojot 5 µL no tā. Sagaidāmā garuma produktu (virs 5 kb) izgriezta no agarozes gēla.

Lai maksimāli palielinātu attīrītā produkta koncentrāciju, fragmentus attīrīja ar agarāzi (*Fermentas*), pēc sekojoša protokola:

1. Izgriež fragmentu no agarozes un nosaka gēla svaru.
2. Inkubē 70 °C 10 min līdz agaroze izšķīst.
3. Inkubē 42 °C 5 min.
4. Uz 100 µL gēla pievieno 1 U agarāzes. Inkubē 42 °C 30 min.
5. Pievieno 10 M amonija acetāta līdz 2,5 M gala koncentrācijai, apmaisa un ieliek saldētavā vai uz ledu 5-10 min.
6. Centrifugē 10 min 10 000 rpm.
7. Supernatantu pārnes jaunus stobriņos.
8. Pievieno 2,5 tilpumu etanola (96%), inkubē pa nakti.
9. Centrifugē 13 000 rpm 25 min, nolej supernatantu, nogulsnes šķīdina 20 µL TE bufera (pH8).

Pēc attīrīšanas fragmentus šķēla ar dažādiem restrikcijas enzīmiem, ar mērķi iegūt klonēšanai un sekvenēšanai piemērotus mazāka izmēra fragmentus. Piemeklēja sekojošus restrikcijas enzīmus: *Vsp*, *CaiI*, *MspI* un *AdeI* (*Fermentas*). Šķelšanas produkti tika apstrādāti ar Klenow fragmentu (*Fermentas*), kurš aizpilda šķelšanas procesā veidojošās pārkares. Fragmentus attīrīja ar hloroforma ekstrakciju un izgulsnēja ar izopropanolu. Tam sekoja adenoziņa nukleotīdu pievienošana, inkubējot fragmentus 68 °C 30 min ar 0,2 µM dATP (*Fermentas*) un 1 U *Dream Taq* polimerāzi (*Fermentas*); un klonēšana TA-vektorā pēc 2.1.5. nodaļā aprakstītās metodes. Sekvenēšanas reakciju veica kā aprakstīts iepriekš 2.1.5. nodaļā. Sekvences analizēja kā aprakstīts 2.1.6. nodaļā.



18. attēls. LTR retrotranspozona izolēšanas shēma ar specifiskiem praimeriem piemeklētiem hipotētiskam LTR specifiskam rajonam.

## 2.2.2. Retrotranspozonu domēnu sekvenēšana

### *Specifisko praimeru izmantošana domēnu izolēšanai*

Izmantoja pieejamo priežu NCBI BAC sekvenču datubāzi. Padziļināti analizēja identificētos fragmentus (gan stresa pētījumos, gan pēc fragmentu izolēšanas ar garās distances PĶR) ar augstu TE homologiju un sakritību ar BAC sekvencēm. Identificēja LTR saturošus konstruktus ar CLUSTALW v.1.83 rīku (Thompson *et al.* 1994). NCBI BLASTX programmu izmantoja hipotētisko proteīnu meklēšanai un homologijas meklēšanai ar dažādiem TE domēniem. Nodaļā 2.1.6. uzskaitītās datubāzes lietoja homologijas analīzē. Praimeru hipotētiskiem domēniem un retrotranspozonu daļām tika piemeklēti ar Primer-BLAST programmu (Ye *et al.* 2012) (6. tabula). Izmantoja dažādas praimeru konstruēšanas stratēģijas:

1. Praimerus piemeklēja radniecīgo sugu BAC sekvencēs identificētiem hipotētiskiem konstruktiem;

2. Praimerus piemeklēja homoloģiem retrotranspozonu domēniem;

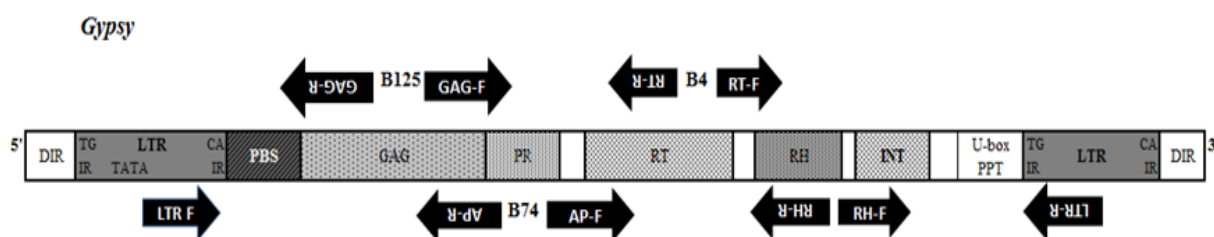
3. Viens no praimeriem bija komplementārs priedei identificētam retrotranspozonom-līdzīgam fragmentam, bet otrs homologā retrotranspozona domēnam, tādā veidā teorētiski amplifikācijas produkts saturētu trūkstošu retrotranspozona rajonu (19. attēls). Šo stratēģiju lietoja *Ogre* elementa homologa izolēšanai, izmantoja priedei identificētus trīs *Ogre* domēnu homologus (B125, B74, B4), bet *Ogre* RH un LTR praimeru tika konstruēti izmantojot homologā *Ogre* sekvenci no zirņiem (AY299398.1).

6. tabula. Homologo retrotranspozonu domēnu vai hipotētisko retrotranspozonu izolēšanai no *P.sylvestris* genoma izmantotie praimeru. Sagaidāmais produkta garums atšķiras atkarībā no praimeru kombinācijas.

Nosaukums	Praimera sekvenca 5'→3'
LTR101-1	GCATCTACCTATGCTACAACCCA
5i	ACGGTTGCCCTTACACAAAG
s5i_R	AGCAATGGCGGCGGTCAACA
s5i_1F	AGCTTCGCGTAAGCAGATGT
s5i_2F	TCCAGTAAGTCCCTCCGCT
s5iRT-1F	CCATAGCTAGCCCTTCGTGC

Nosaukums	Praimera sekvence 5'→3'
s5iRT-2F	ACCGCAATCTTCACTGGCTC
s5iRT-1R	ACTCCGCATTTTGTGGTCGT
s5iRT-2R	CCCAAGGGTAGTTTTGGGGC
W-1R	CGACACAAGGGGAGCCAAAG
W-1F	TTCCCTCTGCGAAGGGCCTA
W-2F	TTTGCGGTCTCAGAAAGGGC
sW-1F	TTGGCTCCCCTTGTGTGCGAA
sW-1R	TGGGGACTACGCACACAACC
sW-2R	CGTTTGCAACCACAACAGGCA
283_8_1F	GGCCTTCCTTCCACTAAGCA
283_8_1R	ATGTGTGGGCTACATGCCTC
283_8_2R	TGAGCTCCCCCATGAGATGA
283_8_2F	CTATCGGGCGCTGAACAAGA
283_8_3R	ACCCTCCAAGAGTGTCTGGT
283_8_3F	GACATCTTGCGGCCATTAC
SA4_Ang_F	CGACGATCGAATCTCAGGCA
SA4_Ang_R	GATCAAATAGAGCTTCGAGG
SA5_Gy3_F	GGTCGATCTCTGGCTACACG
SA5_Gy3_R	AAAAGTGGTCACGTA ACTCA
copia18_F	TGTACGTGCATCAACCTGCT
copia18_R	AAGCGAGAATGTCGGCTTGA
LTR126_F	ATGGTGCATGTGTCCGGATT
LTR126_R	CTGTGCAGATTTGGAACCGC
ltr121-3_F	TATGAGGGCATCTAGCAGCG
ltr121-3_R	ACTCTGGGTCTCTGGTTTGGG
283-4F	CACCGATCATGGCCTAACCA
283-4R	TTGGTGTCCAGCATTGACCA
283-5F	CGCCTTACTGGAGCCTATCG
283-6R	TGATCCGGATTTAAACAGGAAC
283-7F	AATGATCCAGGTGGATATTGG
283-7R	CGAGCGAGGGGATGTTTAGG
283-8F	TACTCAAATACCGGGGCTGC
283-8R	TTGCCCCCTTTAGTTGGTC
283_9F	GGATCAGTGGTATCAGAGCGG
283_9R	CCAGTTCAAGCCCTAACTCC
co18_1F	GTTCGATCCAACCTGCCACA

Nosaukums	Praimera sekvence 5'→3'
co18_1R	CATAGCGTCCGGTGAAAAAG
co18_2F	GGTGAAGTTCGGCGATGGAT
co18_2R	TGCATGCCGAGGATGTAGAC
co18_3F	CGGACGGCCTCGATCAATTC
co18_3R	CCTCAATGCCCAGATAGTAGC
LogreF1	TTGAAGAAGGGCCAGAACCTAGTTCCCG
Ogre_gagF	ATCTGGGGCTTCTTTGGACT
Ogre_gagR	TCTCAAACCTTCCACCAACC
Ogre_AP_F	AACCAGGAGAGCCCTTTCTC
Ogre_AP_R	TGATGCTAAACTGGCCATTG
Ogre_RT_F	CTGTGTGCGCCTATATTCCA
Ogre_RT_R	TTTGGGATTCTAGCGGAGTTT
OgreRH_F	CATTGGCTTGGGCTGATAAG
Ogre_RH_R	TCAAAGGTCTTCCCCTCAAA
LogreR2	ATCTTAGAGAGAAGTTAAGGTACATGGTCAG



19. attēls. Praimeru konstruēšanas stratēģija Ogre elementa homologa izolēšanai.

## 2.3. Priedes klonālās un dabīgās daudzveidības analīzes

### 2.3.1. Atšķirīgos topogrāfiskos apstākļos augošas priežu populācijas genotipēšana

#### *IRAP* praimeru konstruēšana

Pamatojoties uz priedē atrastajām retrotranspozoniem līdzīgajām sekvencēm, tika veidoti priedes retrotranspozoniem specifiskie praimeri (7. tabula) starp retrotranspozoniem variējošo sekvenču amplifikācijai ar IRAP (pēc Kalendar *et al.* 1999). IRAP reakcijai ar

priedes gDNS izmantoja *Dream Taq* reaģentus (*Fermentas*). Reakcijas maisījums saturēja gDNS līdz 100 ng uz reakciju; 1x buferis; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 μM praimeris; 0,2 mM dNTP mix; 0,7 U *dreamTaq* polimerāze (*Fermentas*); 0,2 U *Pfu* polimerāze (*Fermentas*). PĶR programma: denaturācija 94 °C 3 min; 38 x (94 °C - 40 sek; 50 °C - 40 sek; 68 °C - 1 min); 72 °C - 10 min.

7. tabula. IRAP metodē izmantojamo praimeru secība un amplifikācijas joslu skaits

Nr.	Nosaukums	Sekvence 5'-3'
1	IR_1	CTTGGGGTTGACATAACAACAG
2	IR_2	GGGTTGTCAATTTGTATATTG
3	IR_3	GTTCAAAATCCCTTGTGGCT
4	IR_4	TTGAGAGAAAACGTCCTTC
5	IR_5	TGAAGAAGGGCCAGAACCTA
6	IR_6	GACTGGTACATGGAATTGAAG
7	IR_7	CTGTGTGCGCCTATATTCCA
8	IR_8	TCCATCTGTGGTGTTCGTCG
9	IR_9	ATCTGGGGCTTCTTTGGACT

Amplifikācijas produktus sadalīja 1,5% *TopVision* (*Thermo Scientific*) agarozes gēlā ar cietību >2000 g/cm<sup>2</sup>. Analīzei izmantoja tikai skaidri redzamas polimorfās un nepolimorfās joslas. Joslas salīdzināja ar garuma standartu *GeneRuler DNA Ladder Mix* (*Thermo Scientific*) un savā starpā. Katra garuma joslu analizēja, atzīmējot amplificētu fragmentu dotajam paraugam ar 1, bet neamplificētu lokusu šajā garumā ar 0 (1. Pielikums), bet amplifikācijas defektus atzīmēja ar ? vai -1.

#### *IRAP analīzei izmantotais materiāls*

Ķeguma lauku teritorijā (GPRS koordinātes: 56° 46' 8''N, 24° 33' 27'' E) ievāca un ar izveidotajiem praimeriem analizēja 150 paraugus no aptuveni 36 gadu vecām priedēm augošām vietā ar atšķirīgu reljefu (50 koki augoši paugurā (30,4 metrus virs jūras līmeņa); 50 koki - nogāzē; 50 koki - pārpurvojumā). DNS no skujām izdalīja pēc 2.1.3. nodaļā aprakstītās metodes. Paraugus analizēja izmantojot IRAP metodi. Visiem paraugiem veica SSR lokusu analīzi ar PTTX3107, PTTX4001 un PTTX4011 (Soranzo *et al.* 1998), kā aprakstīts metodikas 2.1.3. nodaļā.

gDNS paraugus ievāca no 14 parastās priedes kokiem, kas reprezentē četrus klonu rametus augošus dažādās klimatiskajās zonās ierīkotajās plantācijās. 1986. gadā ierīkotā

priežu plantācija „Dravas” atrodas Latvijas rietumu daļā, bet tai pašā gadā ierīkotā plantācija „Sāviena” austrumu daļā. Paraugu vienveidības pārbaudei izmantoja SSR analīzi kā aprakstīts iepriekš.

#### *Datu statistiska analīze*

Biometrisko mērījumu un ģenētisko analīžu datu kopu atšķirību novērtēšanai izmantoja vidējo vērtību salīdzināšanu, to standartnovirzes noteikšanu, rezultātu ticamības koeficientu un F-kritērija salīdzināšanu. Populācijas koku diametra un augstuma rādītāju novērtēšanai izmantoja šos aprēķinus atskaitot F-kritērija novērtēšanu. Statistiskie rādītāji aprēķināti un novērtēti lietojot sekojošas formulas (1-8) (Rokickij 1973). Lielu datu kopu vidējo vērtību atšķirības ir būtiskas, pat ja atšķirība ir neliela. Tomēr, mazākām rādītāju kopām nosaka rezultātu ticamības koeficientu (t). Ja t pārsniedz savu kļūdu trīs reizes, tad tā ir būtiska ar varbūtību 0,99, tomēr tik augstas t vērtības nav nepieciešamas un, ja kopa pārsniedz  $n=30$ ,  $t=2,58$ , garantē atšķirību būtiskumu ar varbūtību 0,99. F-kritērijs sniedz precīzāku grupu atšķirību novērtējumu. F-kritēriju salīdzina ar tabulārām vērtībām, atkarīgām no datu kopas izmēra.

(1) Vidējais aritmētiskais ( $X_{vid}$ ):

$$X_{vid} = \frac{\sum X_i}{n}$$

(2) Standartnovirze, jeb vidējā kvadrātiskā novirze ( $\delta$ ):

$$\delta = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_{vid})^2}{n}}$$

(3) Variācijas koeficients (V):

$$V = \frac{\delta * 100}{X_{vid}}$$

(4) Vidējā kvadrātiskā kļūda ( $S_x$ ):

$$S_x = \frac{\delta}{\sqrt{n}}$$

(5) Vidējo starpība (d):

$$d = X_{vid}^1 - X_{vid}^2$$

(6) Vidējā starpības kļūda ( $S_d$ ):

$$S_d = \sqrt{\frac{\Sigma(X1_i - X1_{vid})^2 + \Sigma(X2_i - X2_{vid})^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1)} * \left(\frac{n_1 + n_2}{n_1 * n_2}\right)}$$

(7) Rezultātu ticamības koeficients (t):

$$t = \frac{d}{S_d}$$

(8) F-kritērijs (F):

$$F = \frac{\delta 1^2}{\delta 2^2}$$

Lai novērtētu un salīdzinātu daudzveidības rādītājus, bināros SSR un IRAP datus analizēja ar GenAlEx v.6 (Peakall, Smouse 2006). GenAlEx programu izmantoja molekulārās daudzveidības (AMOVA) analīzēm, alēļu frekvenču un sastāva noteikšanai, heterozigotātes noteikšanai. PcoA testam izmantoja ģenētiskās distances matricu bināriem datiem, ko izrēķināja pēc sekojošas formulas ar GenAlEx v.6.

(9) Ģenētiskā distance (D):  $D = n \left[ 1 - \frac{2n_{xy}}{2n} \right]$ , kur  $2n_{xy}$ - līdzīgo bināro zīmju skaits un  $n$  ir visu bināro zīmju skaits.

FAMD (Schlüter, Harris 2006) programmu v.1.30 izmantoja retrotranspozonu marķieru bināro datu analīzei, kā arī amplificēto lokusu pamata statistiskai analīzei (vidējais lokusu skaits indivīdam, variācija, standartnovirze u.c.). Tāpat FAMD lietoja šo datu AMOVA un PCA (Orloci 1978) analīžu veikšanai. Filoģenētisko koku vizualizēšanai izmantoja MEGA v.5.2 (Tamura *et al.* 2011).

### 2.3.2. Identificēto retrotranspozonu izplatība un daudzveidība kailsēkļos

Sadarbībā ar Latvijas Universitātes Botāniskā dārza un Nacionālā botāniskā dārza personālu iegūti 60 Latvijas florai eksotisko un reti sastopamo kailsēkļu sugu paraugi (8. tabula). Par ārējās grupas paraugiem filoģenijas salīdzināšanai izvēlējās vairākus pieejamus paraugus no kailsēkļu *Cycadales* klases un *Gingkoales* klases. Piecām sugām paraugus ņēma atkārtoti (*Pinus nigra* (cits indivīds), *Picea abies*(cits indivīds), *Zamia integrifolia* (tas pats indivīds), *Ceratozamia mexicana* (tas pats indivīds), *Cupressus sempervirens*(cits indivīds)). Analizēja diferenciāli ekspresēto TE-līdzīgo fragmentu izplatību, kā arī dažu priedei specifisko retrotranspozonu izplatību izmantojot PĶR amplifikāciju ar specifiskiem



praimeriem, kas ir uzskaitīti 4. tabulā, un retrotranspozonu domēniem specifiskiem praimeriem (6. tabula). Pēc 2.3.1. nodaļā aprakstītās metodikas veiktas IRAP reakcijas ar praimeriem, kas ir uzskaitīti 7. tabulā.

8. tabula. Kailsēkļu saraksts. LUBD - Latvijas Universitātes Botāniskais dārzs; NBD - Nacionālais botāniskais dārzs.

Nosaukums	Nosaukums (latīniski)	LUBD/ NBD	Apakšklase	Rinda
Meksikas ceratozāmija	<i>Ceratozamia mexicana</i>	LUBD	<i>Cycadidae</i>	<i>Cycadales</i>
Atritinātā cīka	<i>Cycas revoluta</i>	LUBD	<i>Cycadidae</i>	<i>Cycadales</i>
Villainā stangērija	<i>Stangeria eriopus</i>	LUBD	<i>Cycadidae</i>	<i>Cycadales</i>
Jamaikas sago	<i>Zamia integrifolia</i>	LUBD	<i>Cycadidae</i>	<i>Cycadales</i>
Ginks	<i>Ginkgo biloba</i>	NBD	<i>Ginkgoidae</i>	<i>Ginkgoales</i>
Bidvila araukārija	<i>Araucaria bidwillii</i>	LUBD	<i>Pinidae</i>	<i>Araucariales</i>
Dažādlapu araukārija	<i>Araucaria heterophylla</i>	LUBD	<i>Pinidae</i>	<i>Araucariales</i>
Liellapu podokarps	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	LUBD	<i>Pinidae</i>	<i>Araucariales</i>
Dižā volemija	<i>Wollemia nobilis</i>	LUBD	<i>Pinidae</i>	<i>Araucariales</i>
Mūžzaļā ciprese	<i>Cupressus sempervirens</i>	LUBD	<i>Pinidae</i>	<i>Cupressales</i>
Mūžzaļā sekvoja	<i>Sequoia sempervirens</i>	LUBD	<i>Pinidae</i>	<i>Cupressales</i>
Kanādas īve	<i>Taxus canadensis</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Cupressales</i>
Japānas īve	<i>Taxus cuspidata</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Cupressales</i>
Rietumu tūja	<i>Thuja occidentalis</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Cupressales</i>
Sarkanais ciedrs	<i>Thuja plicata</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Cupressales</i>
Japānas muskatriekstu īve	<i>Torreya nucifera</i>	LUBD	<i>Pinidae</i>	<i>Cupressales</i>
Eiropas baltegle	<i>Abies alba</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Balzāma baltegle	<i>Abies balsamea</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Vienkrāsas baltegle	<i>Abies concolor</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Piejūras baltegle	<i>Abies holophylla</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Korejas baltegle	<i>Abies koreana</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Veiča baltegle	<i>Abies veitchii</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Garzvīņu baltegle	<i>Abies xphanerolepis</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Himalaju ciedrs	<i>Cedrus deodara</i>	LUBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Japānas lapegle	<i>Larix kaemferi</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Kamčatkas lapegle	<i>Larix kamschatica</i> var. <i>japonika</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Kanādas lapegle	<i>Larix laricina</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Piejūras lapegle	<i>Larix maritima</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Engelmaņa egle	<i>Picea Engelmannii</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Kanādas egle	<i>Picea glauca</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>

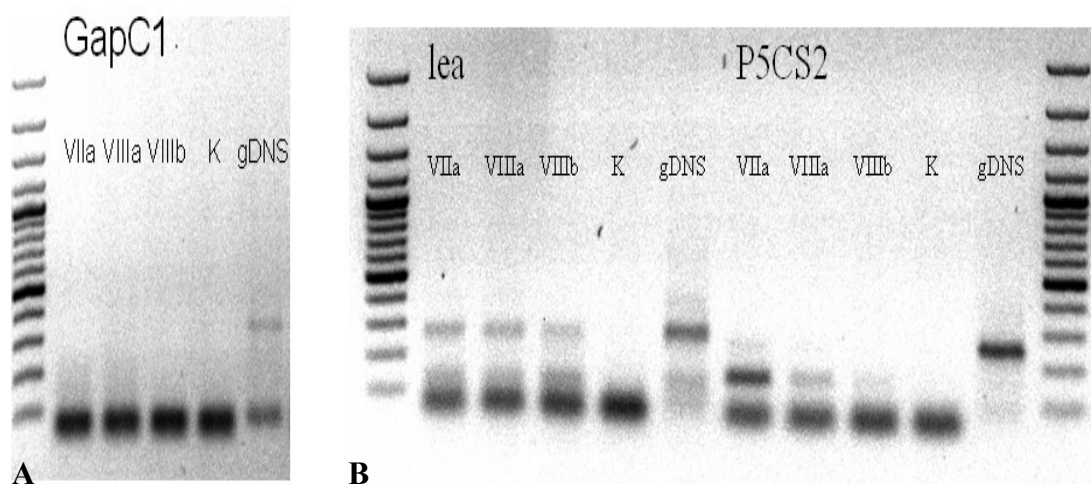
Nosaukums	Nosaukums (latīniski)	LUBD/ NBD	Apakšklase	Rinda
Glēna egle	<i>Picea glehnii</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Hokaido egle	<i>Picea jezoensis</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Kejama egle	<i>Picea koyamae</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Melnā egle	<i>Picea mariana</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Maksimoviča egle	<i>Picea maximowiczii</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Kalnu egle	<i>Picea montigena</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Sibīrijas egle	<i>Picea obovata</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Serbijas egle	<i>Picea omorika</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Zilganā egle	<i>Picea pungens</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Sarkanā egle	<i>Picea rubens</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Sitka egle	<i>Picea sitchensis</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Benksa priede	<i>Pinus banksiana</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Kanāriju salu priede	<i>Pinus canariensis</i>	LUBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Eiropas ciedrupriede	<i>Pinus cembra</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Greizā priede	<i>Pinus contorta</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Korejas ciedrupriede	<i>Pinus koraiensis</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Klinškalna priede	<i>Pinus latifolia</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Kalnu priede	<i>Pinus mugo</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Melnā priede	<i>Pinus nigra</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Melnā priede	<i>Pinus nigra var. banatica</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Rumēlijas priede	<i>Pinus peuce</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Itālijas priede	<i>Pinus pinea</i>	LUBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Kalnu dzeltenā priede	<i>Pinus ponderosa</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Klājeniskā ciedrupriede	<i>Pinus pumila</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Sibīrijas ciedrupriede	<i>Pinus sibirica</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Veimuta priede	<i>Pinus strobus</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Zaļā duglāzija	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Zilganā duglāzija	<i>Pseudotsuga menziesii var. glauca</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Kanādas hemlokegle	<i>Tsuga canadensis</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>
Rietumu hemlokegle	<i>Tsuga heterophylla</i>	NBD	<i>Pinidae</i>	<i>Pinales</i>

## 3. Rezultāti

### 3.1. TE-līdzīgo fragmentu diferenciālās ekspresijas identificēšana

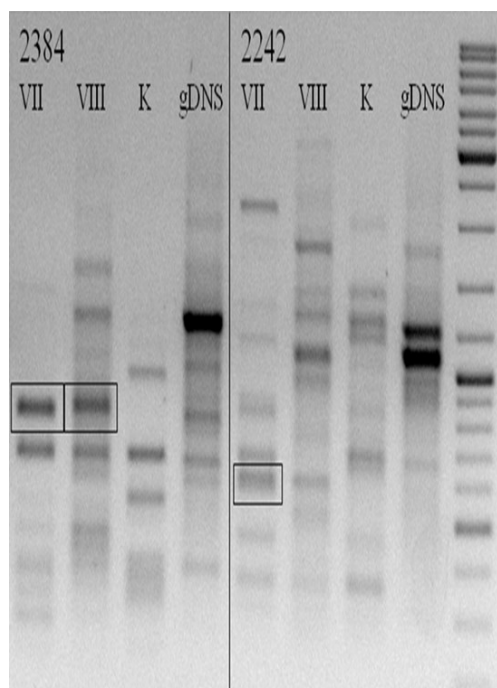
#### 3.1.1. Karstuma stresa iniciācija

Divus priedes JA003 klonu rametus 24 stundas pakļāva ilgstošam nepārtrauktam karstuma stresam (40°C), no katra stāda izolēja RNS paraugus divos atkārtojumos (VIIa, VIIb, VIIIa, VIIIb). Vienam no stresam pakļautiem paraugiem RNS pēc attīrīšanas bija nepietiekošā koncentrācijā. Sešus RNS paraugus izolēja no trim stresam nepakļautiem rametiem. PQR amplifikācijas produkti ar stresam sensitīviem marķieriem *P5CS2*, *lea*, *dhn3* novēroti karstuma stresam pakļauto rametu paraugos (20. attēls), kā arī klimata kamerā ievietotajiem kontroles stādiem, kuru paraugi tādēļ turpmākajās analīzēs netika izmantoti. Tikai no ierastajos apstākļos augošā stāda ņemtajam paraugam nebija stresa marķieru amplifikācijas, tāpēc turpmākajās analīzēs šo paraugu izmantoja par kontroli. Endogēnās kontroles *GAPDH* marķiera amplifikācijas produkts apstiprināja kontroles parauga kvalitāti (20. attēls). *abaH* marķieris neamplificēja produktu nevienam cDNS paraugam.



20. attēls. Kontroles gēnu amplifikācija ar cDNS no karstuma stresam pakļautajiem (VIIa, VIIIa,b) kontroles (K) rametiem un gDNS paraugiem. (A) endogēnās kontroles *GAPDH* amplifikācija ar sagaidāmo produkta garumu 75 bp. (B) Stresa sensitīvo marķieru amplifikācija, produkti *lea* (280 bp) un *P5CS2* (190 bp). Sākumā un beigās ir garuma standarts GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas).

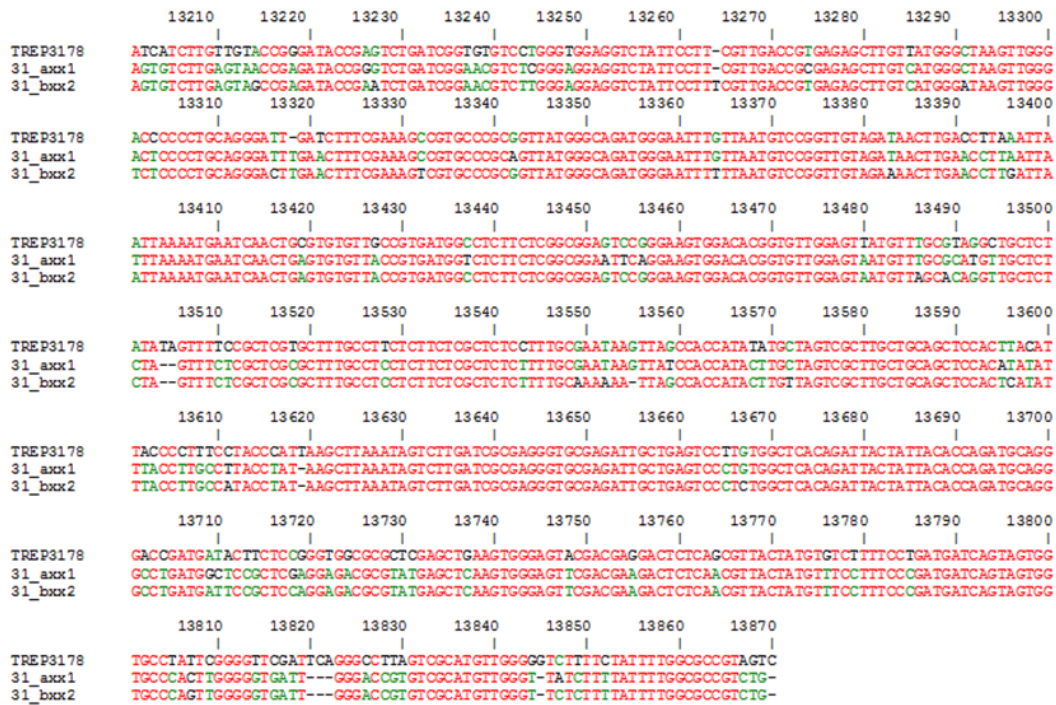
Pieci iPBS praimeru (2009, 2076, 2080, 2384, 2242) uzrādīja polimorfus fragmentus starp kontroles un stresam pakļautiem cDNS paraugiem, pārējiem marķieriem amplifikācijas produktu garumi bija vienādi. Izolēja tikai skaidri atšķiramus fragmentus, kas bija stresam pakļautajā paraugā, bet nebija kontroles paraugā (21. attēls). Karstuma stresa eksperimenta rezultātā izolēja desmit diferenciāli ekspresētus fragmentus. Viena garuma fragmenti, kas bija izgriezti no abiem stresam pakļautajiem ramiem, vai atradās citā iPBS reakcijas atkārtojumā, saturēja līdzīgas sekvences.



21. attēls. iPBS amplifikācijas piemērs ar eksperimentālo cDNS paraugiem izmantojot praimerus 2384 un 2242. VII un VIII ir karstuma stresam pakļauto rametu paraugi, K ir paraugs no kontroles rameta, gDNS ir rameta genomiskais DNS, pēdējais ir garuma standarts GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas). Izgrieztie fragmenti ir norādīti ar taisnstūri.

Katram fragmentam atlasīja desmit transformēto šūnu kolonijas. Pārbaudīja izolēto plazmīdu insertu garumu. Ne visas plazmīdas saturēja insertu sagaidāmajā lielumā. Kopumā sekvenēja 72 plazmīdas, kurām bija sagaidamā garuma inserti. Iegūtās sekvences salīdzināja vispirms savā starpā, un sagrupēja fragmentus ar līdzību  $\geq$  par 80%. Visbiežāk, grupas fragmentu savstarpējā nukleotīdu sekvenču līdzība bija lielāka par 90%. Vienu reprezentatīvu sekvenci no katras grupas izmantoja homologijas meklēšanai ar datubāzes ierakstiem. Kopumā, karstuma stresa pētījumā analizēja 24 unikālo sekvenču grupas (10. tabula). 11 fragmenti līdzinājās dažādiem anotētiem transponējamiem elementiem (TE) ar nukleotīdu sakritību vērtību lielāku par 50 un līdzību lielāku par 40%. Pieci fragmenti daļēji vai pilnīgi bija homologu ar TE proteīnus kodējošajiem domēniem, bet divi fragmenti uzrādīja vērā ņemamu līdzību tikai translēto aminoskābju līmenī (14. tabula). Seši fragmenti uzrādīja stipru homologijas līmeni ar vairāk par 78% nukleotīdu līdzību (22. attēls). No tiem divi

fragmenti līdzinājas LTR rajoniem *Gypsy* TE (*Erica*, *Laura*), kas visi aprakstīti *Triticeae* genomam, bet viens fragments saturēja divus LTR no abām pusēm - *Wham* un *Gypsy-1*, kuri viens pret otru bija pretēji orientēti. Četri fragmenti nebija homologi nevienam datubāzes ierakstam, bet trīs fragmenti līdzinājas tikai EST datubāzes ierakstiem. Deviņiem fragmentiem, kas līdzinājas TE sekvencēm, ir atrasta homoloģija arī ar ierakstiem EST (10. tabula).



22. attēls. Izolētu fragmentu T31 nukleotīdu sekvencu salīdzināšana ar LTR *Gypsy*, *Erika* TE (TREP3178, 14077 bp). Ar cipariem norādīts *Erica* retrotranspozona nukleotīdu skaits. Atrasta homoloģija ar *Erica* retrotranspozona LTR 3' rajonu.

Kopumā 16 fragmenti uzrādīja homoloģiju ar zaļo augu (*Viridiplantae*) EST datubāzes ierakstiem ar nukleotīdu sakritību vērtību lielāku par 50 un e-vērtības robežu  $\leq 0,01$ , kas parāda, ka šie fragmenti tiek ekspresēti un tie atrasti arī pētījumos, kuri nav saistīti ar retrotranspozonu izpēti. Tikai divas sekvenču uzrādīja homoloģiju ar hloroplastu (T51) un mitohondriju (T61) genomu sekvencēm. T61 līdzinājās mitohondrija sekvencei no *Sorghum bicolor* (NC\_008360.1) ar pārklājumu 83% un nukleotīdu līdžību 94%, taču starp *Pinaceae* ierakstiem tas līdzinājās *Abies bracteata* mazās subvienības RNS gēnam (EU497794.1) tikai ar 11% pārklājumu. T51 uzrādīja līdžību *P.taeda* hloroplasta genomam ar pārklājumu 16% un 92% identisko nukleotīdu, savukārt citu augu hloroplastiem T51 līdzinājās ar 48%

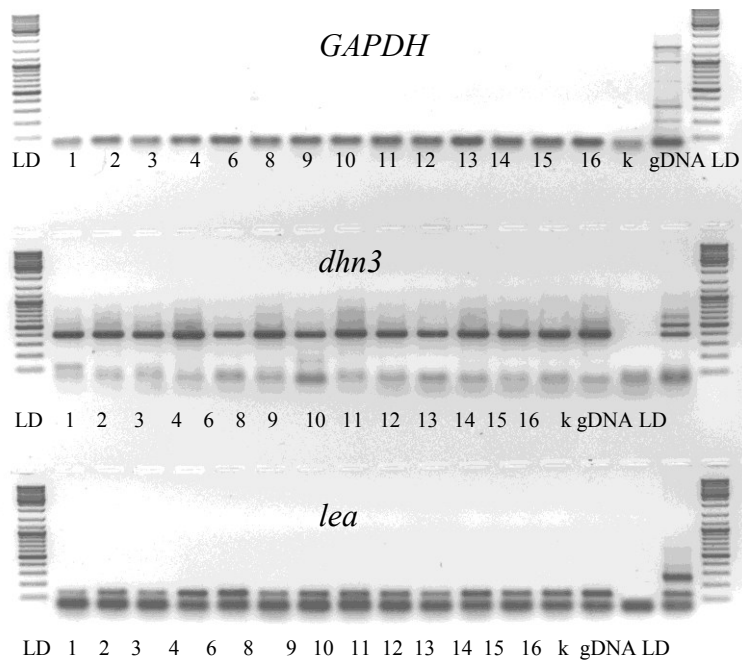
pārklājumu un 100% nukleotīdu līdzību. No otras puses T51 līdzinājās LINE retrotranspozonom *Karin* no *T.aestivum* ar 49% pārklājumu.

10. tabula *Karstuma stresa eksperimentā izolēto diferenciāli ekspresēto fragmentu sekvenču analīze NCBI, TREP un GyDB datubāzēs.*

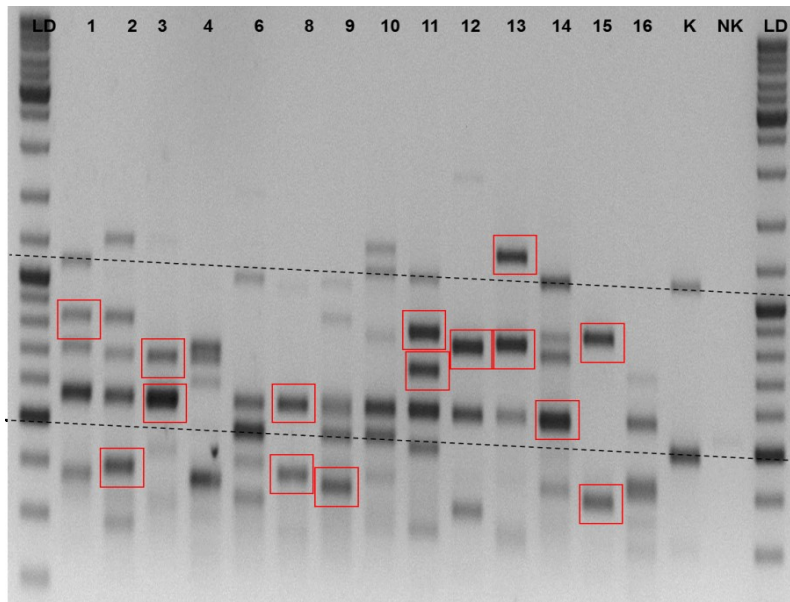
Nr.	LTR TE		Bez-LTR TE	DNS TE	Neklasif. TE	EST	Ref. gen. hlor./mit.	BAC	Nav līdzības
	Gypsy	Copia	LINE	CACTA					
T11									X
T12		X				X		X	
T13									X
T14								X	
T15									X
T16								X	
T17								X	
T18						X		X	
T19						X		X	
T28	X				X	X			
T20						X			
T31	X					X		X	
T49				X		X			
T51			X			X	X		
T50						X		X	
T62									X
T61						X	X		
T71						X			
T72	X					X			
T73	X					X			
T91						X		X	
T92	X					X		X	
T10	X					X		X	
T30		X						X	

### 3.1.2. Priežu hermesa invāzija

Priežu klonu TU28 rametus izmantoja priežu hermesa invāzijas pārbaudē. Invāziju konstatēja pēc vairākām pazīmēm (sveķošana, balti vaska plankumi, dzeltējošas skuju un zaru kalšana). Tāpat ārējo barošanas apstiprināja pēc baltā tinuma mikroskopēšanas. Četriem rametiem (B1-B4) skuju ievāca nekavējoties, 14 rametiem (B1-B16, izņemot nokaltušus B5 un B7) skuju ievāca pēc divām invāzijas nedēļām, kad visiem rametiem konstatēja hermesa invāziju atšķirīgās izplatīšanās pakāpēs. Reakcija ar kontroles marķieriem uzrādīja nevienmērīgu stresa iniciāciju invāzijas rezultātā. Lai gan vairākiem rametiem neatrada invāzijas pazīmes, *GAPDH*, *dhn3*, *lea* marķieru amplifikācijas produkti novēroti visiem paraugiem (23. attēls), bet *abaH*, *P5CS2* marķieru produkti bija polimorfī starp rametiem.



23. attēls. Kontroles gēnu amplifikācija ar cDNS no priežu hermesa invāzijai pakļautajiem (1-16), kontroles (k) rametiem un gDNS parauga. GAPDH amplifikācija ar sagaidāmo produkta garumu 75 bp. Stresa sensitīvo marķieru amplifikācija, produkti *dhn3* (400 bp) un *lea* (280 bp). Sākumā un beigās ir garuma standarts GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas).



24. attēls. iPBS reakcija ar 2076. praimeru un cDNS no priežu hermesa invāzijai pakļautajiem (1-16), kontroles (K) rametiem un negatīvo kontroli (NK).

Pēc divām nedēļām TU28-6. un TU28-7. rameti pilnīgi nokalta, bet pārējiem rametiem parādījās invāzijas pazīmes. Konstatēja, ka kontroles paraugam nav stresa iniciācijas, jo netika amplificēti stresa PĶR marķieri. Diferenciāli ekspresētus fragmentus ieguva ar četriem PBS praimeriem (2076, 2010, 2001, 2009), kuru amplifikācijas produkti bija augsti polimorfi (24. attēls). Kopumā izolēja un ar plazmīdām liģēja 52 fragmentus, bet 211 insertu sekvenēja kaut vai ar vienu M13 praimeru. Identificēja 57 unikālās sekvences, kuras analizēja meklējot homologiju ar datubāžu ierakstiem (11. tabula).

11. tabula. Priežu hermesa invāzijas rezultātā identificēto fragmentu sekvenču analīze NCBI, TREP un GyDB datubāzēs.

Nr.	LTR TE			Hipotētiski prot.	EST	Ref_genom/ refRNA	BAC	Nav līdzības
	Gypsy	Copia	Neklasif.					
B1					X			
B2	X			X	X	X	X	
B3					X		X	
B31					X		X	
B4	X			X			X	
B42								X
B54		X		X		X	X	
B53					X	X		
B62								X
B74	X							
B82								X
B105					X		X	
B102						X		
B114		X					X	
B115								X
B123	X	X						
B125	X							
B153	X			X		X		
B166			X					
B165					X			
B172								X
B183								X
B184					X		X	
B193	X				X		X	
B195					X		X	
B211	X					X		
B233								X
B242								X
B251							X	
B255								X
B265					X			
B273								X
B283						X		
B293							X	
B303								X
B306		X		X	X		X	
B10								X



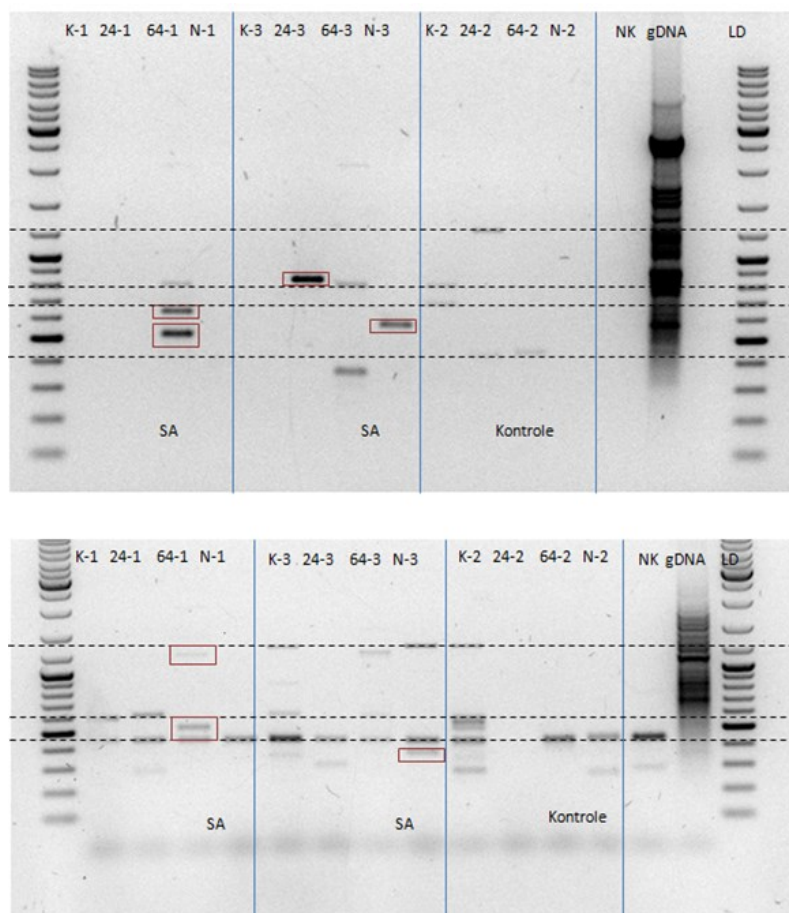
Nr.	LTR TE			Hipotētiski prot.	EST	Ref_genom/ refRNA	BAC	Nav līdzības
	<i>Gypsy</i>	<i>Copia</i>	Neklasif.					
B301	X			X	X		X	
B402					X		X	
B51								X
B61					X			
B72				X	X			
B81					X			
B83				X	X	X	X	
B94								X
B111					X		X	
B113					X		X	
B104					X		X	
B121							X	
B103								X
B120								X
B131				X	X			
B132				X	X			
B141					X			
B152					X			
B192								X
B181								X

Deviņi fragmenti uzrādīja līdzību ar *Gypsy* klases mobilajiem elementiem, četri ar *Copia* klases elementiem, viens fragments uzrādīja līdzību ar vēl neklasificētu elementu. Visbiežāk fragmenti *Gypsy* kārtā uzrādīja līdzību ar *Pisum sativum* (zirņu) *Ogre* mobilo elementu, bet *Copia* kārtā ar *Sire* elementu no *Glycine max* (sojas) un *Copia-2-TA* elementu no *Triticeae*. 18 fragmenti uzrādīja zemu līdzības pakāpi vai neuzrādīja līdzību ar datubāžu ierakstiem. Desmit fragmenti ir uzrādījuši līdzību hipotētiskiem proteīniem, no kuriem daži sakrita ar citu augu sugu ribosomālajiem gēniem. 25 ir atrodami augu ekspresēto sekvenču datubāzē (EST).

### 3.1.3. Augu hormonu ietekme

Priežu klona POP12 trīs rametus izmantoja ABA eksperimentā, trīs POP21 rametus izmantoja SA eksperimentā. Divus rametus apsmidzināja un aplaistīja ar 10  $\mu$ M ABA un divus ar 5 mM SA šķīdumu, bet vienu rametu izmantoja par kontroli katrā eksperimentā. Atšķirībā no iepriekšējiem eksperimentiem, ABA un SA hormonu ietekmes eksperimentā ievāca paraugus no katra rameta pirms apstrādes un šos paraugus izmantoja arī par kontroli. Par otru kontroli izmantoja paraugus, ņemtus no rametiem, kurus apstrādāja līdzīgi pārējiem, tikai hormonu šķīdumu vietā izmantoja attiecīgo šķīdumu bez hormona, tādā veidā hormonu ietekmes eksperimentos izmantoja vairākas kontroles. Lai salīdzinātu paraugus ar iepriekšējiem eksperimentiem, veica reakcijas arī ar stresa iniciācijas kontroles marķieriem.

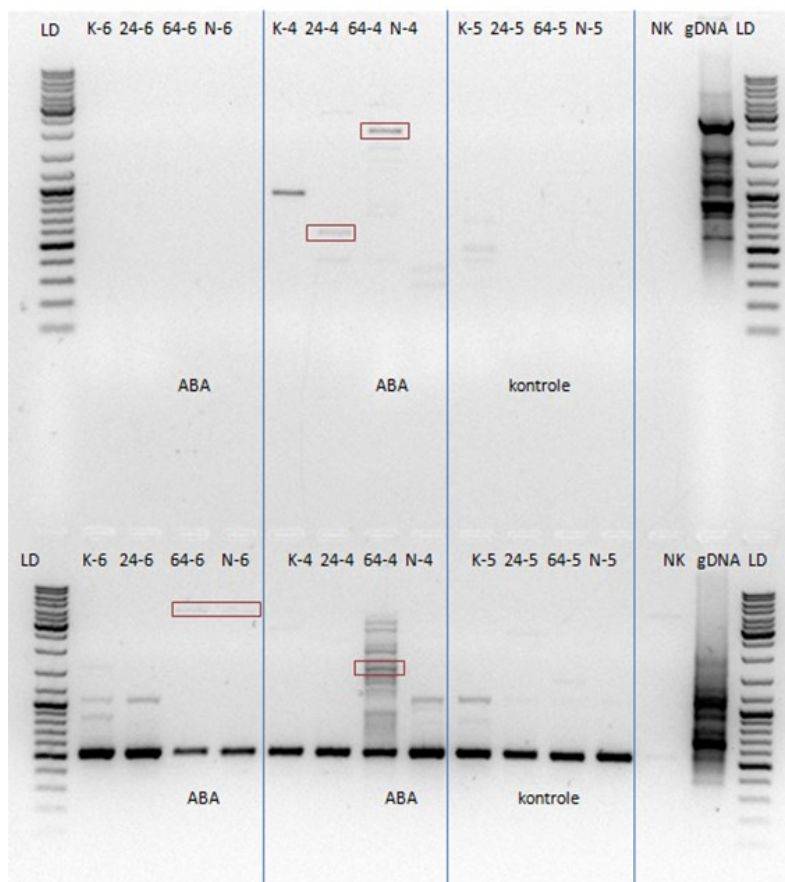
Izmantojot *P5CS2*, *lea*, *abaH* un *dhn3* gēnu praimerus tika detektēti diferenciāli amplificēti produkti.



25. attēls. Nespecifisko iPBS praimeru (2001 un 2076) amplifikācijas produkti ar *cDNS* no ar 5mM SA šķīdumu apsmidzināto un kontroles rametu paraugiem.

Ar visiem praimeriem nebija novēroti produkti tikai paraugam SAK-1 un ABAk-6. Tomēr, produktu joslas bija vājākas kontroles paraugiem, un pēc spilgtuma atšķīrās paraugiem no dažādos laika posmos apstrādei pakļautajiem rametiem. Veicot PĶR izdalītiem RNS paraugiem ar praimeriem *dhn3* un PBS 2080, netika atrasti amplifikācijas produkti, kas izslēdza DNS kontaminācijas iespējas. Paraugos, kuri ievākti pēc 72 stundām un nedēļas, *P5CS2* un *dhn3* visiem paraugiem stresa marķieru amplifikācijas joslas kļuva ievērojami vājākas. *GAPDH* marķieru amplifikācijas produktu novēroja visiem paraugiem. iPBS reakcijām izmantoja visu rametu paraugus pirms apstrādes, pēc 24 stundām, pēc 64 stundām un pēc nedēļas apstrādes ar attiecīgo hormonu. Izolēja fragmentus, kas bija skaidri atšķirami ar hormoniem apstrādātajos paraugos un neuzrādījās nevienā kontrolē. Pēc apstrādes ar hormoniem iPBS amplifikācijas polimorfisms bija ievērojami zemāks, nekā iepriekšējos

eksperimentos (25., 26. attēli). cDNS sintēzi un iPBS reakciju atkārtēja, tomēr rezultāts sakrita ar iepriekšējo un ar iPBS iegūtais amplifikācijas joslu skaits nepieauga.



26. attēls. Nespecifisko iPBS praimeru (2001 un 2010) amplifikācijas produkti ar cDNS no ar 10  $\mu$ M ABA šķīdumu apsmidzināto un kontroles rametu paraugiem.

Kopumā izolēja 50 fragmentus un sekvenēja 52 fragmentus saturošas plazmīdas, noteica 45 unikālās sekvences, no tām dažas uzrādīja līdzību 60-80% grupās, kā arī uzrādīja līdzīgu homoloģiju ar datubāzes ierakstiem (12. tabula). Septiņi fragmenti līdzinājās dažādu TE sekvencēm. Trīs fragmenti uzrādīja līdzību *Gypsy* TE, divi no kuriem līdzinājās *Ogre* proteīnu domēniem, bet viens *Gypsy-3* LTR. Divi fragmenti līdzinājās *Copia-18\_BD-I* elementam un hloroplasta sekvencei. Viens fragments līdzinājās neklasificētiem elementiem vai arī MSTA ģimenes LTR, ERV (endogēnam retrovirusam). Viens fragments līdzinājās gan *Copia* LTR *Angela*, gan *Gypsy* LTR *Fatima* elementiem. 11 fragmenti līdzinājās hipotētiskiem proteīniem, 18 neuzrādīja līdzību ne ar vienu sekvenci datubāzēs.

12. tabula. Hormonu apstrādes ietekmē identificēto fragmentu sekvenču analīze NCBI, TREP un GyDB datubāzēs.

Nr.	LTR retrotranspozoni			Hipotētisk i prot.	EST	Refgeno m/ refRNS	BAC KLONI	Nav līdzības
	Gypsy	Copia	neklasif.					
SA01					X	X		
SA02								X
SA03	X				X		X	
SA04					X		X	
SA05					X	X		
SA06					X		X	
SA07		X		X	X	X		
SA08								X
SA09								X
SA10								X
SA11								X
SA12	X			X				
SA13								X
SA14					X			
SA15								X
SA16		X			X		X	
SA17								X
SA18					X			
SA19								X
SA20								X
SA21								X
SA22								X
SA23					X	X	X	
SA24			X		X			
ABA01					X	X		
ABA02					X	X		
ABA03					X	X		
ABA04								X
ABA05					X	X		
ABA06								X
ABA07					X		X	
ABA08					X			
ABA09					X	X	X	
ABA10		X			X	X	X	
ABA11								X
ABA12								X
ABA13					X			
ABA14					X			
ABA15					X		X	
ABA16					X		X	
ABA17					X			
ABA18	X			X				
ABA19					X	X	X	
ABA20								X
ABA21								X

## 3.2. Diferenciāli ekspresēto fragmentu analīze

### 3.2.1. Visu fragmentu salīdzinošā analīze

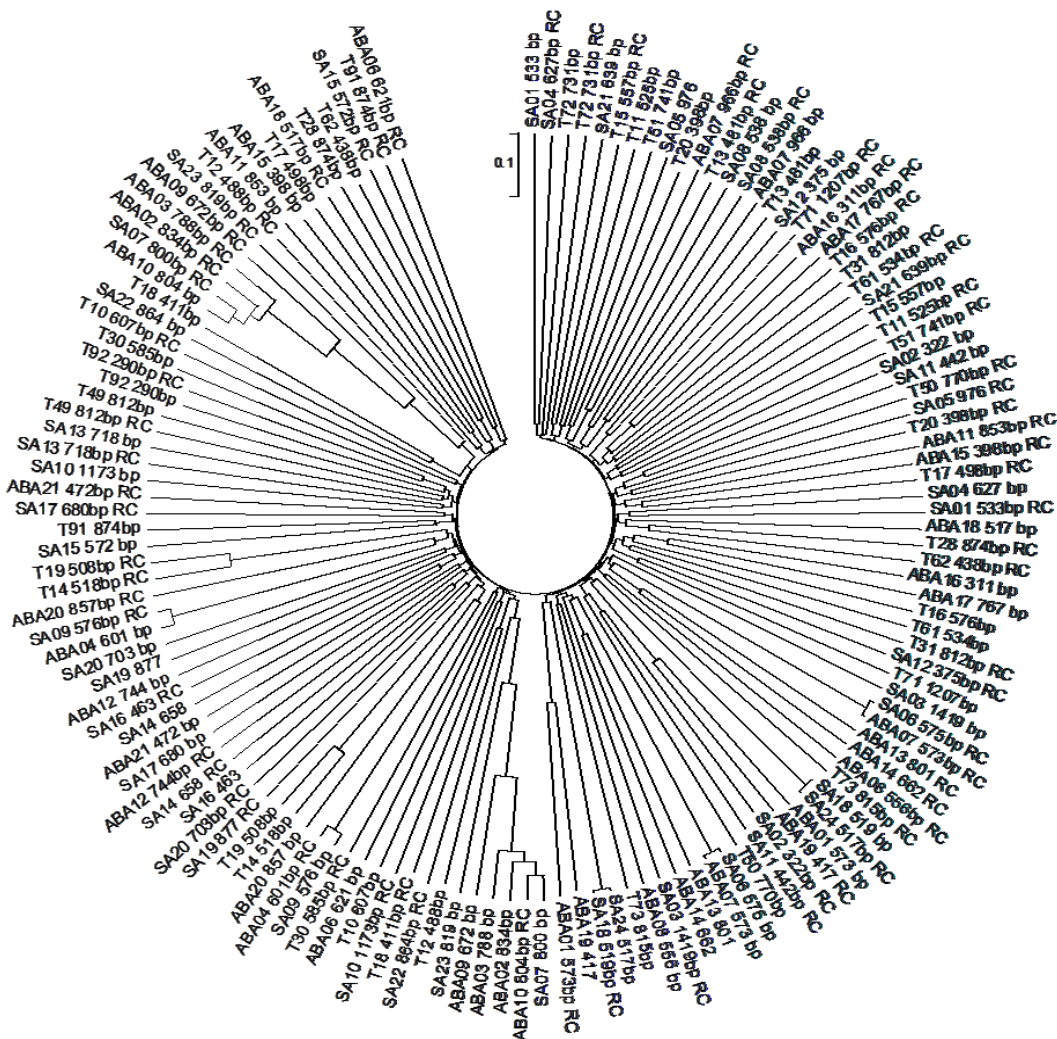
Visu eksperimentu rezultātā identificēja 126 fragmentus, kas reprezentē katra stresora izsaukto retrotranspozoniem-līdzīgo sekvenču ekspresiju. Kopumā izolēja 112 diferenciāli ekspresētus fragmentus, sekvenēja 335 plazmīdu insertus (*13. tabula*). 40 sekvences neuzrādīja līdzību ne ar vienu ierakstu izmantotajās datubāzēs. 28 identificētie fragmenti saturēja augsti homologus TE rajonus, vai līdzinājās TE visā fragmenta garumā. Pārējie 98 fragmenti neuzrādīja līdzību TE sekvencēm, vai arī līdzība bija zem pieļaujamā sliekšņa. Kopumā, no 98 sakritībām datubāzēs, neviena nebija homologa anotētai gēnu sekvencei kādai no *Pinaceae* sugām. Pārsvārā sekvences sakrita ar EST ierakstiem, BAC sekvencēm vai hipotētiskiem proteīniem, vai arī gēnu sekvencēm no citām augu sugām. 46 no 98 fragmentiem sakrita ar no 1 līdz 31 sekvencēm zaļo augu (*Viridiplantae*) EST datubāzē (e-vērtība  $\leq 0.01$ ), bet 12 fragmenti līdzinājas lielam EST ierakstu skaitam (no 108 līdz 8734 sakritību). No šīm 12 sekvencēm četras bija līdzīgas hloroplastu un mitohondriju sekvencēm, bet astoņas - kodola DNS sekvencēm bez anotācijas.

*13. tabula. Fragmentu skaita salīdzināšana starp eksperimentiem.*

Stress	Izolēti	Sekvenēti	Unikālie	Nukleotīdu sekv. TE homologi	Aminoskābju sekv. TE homologi	Kopā TE
Karstums	10	72	24	5	4	9
Invāzija	52	211	57	7	5	12
SA	31	26	24	4	1	5
ABA	19	26	21	2	0	2

Sekvences salīdzināja savā starpā, kā arī starp eksperimentiem. ABA un SA pētījumos identificētais unikālo sekvenču skaits ir salīdzināms ar identificētām sekvencēm karstuma un priežu hermesa invāzijas pētījumā, taču TE homologu skaits ir ievērojami zemāks (*13. tabula*). Pēc apstrādes ar SA identificēti pieci TE-līdzīgi fragmenti, bet pēc apstrādes ar ABA identificēja tikai divus TE-līdzīgus fragmentus, abi no kuriem līdzinājās fragmentiem identificētiem arī SA un hermesa invāzijas gadījumā (*14. tabula*). Visu fragmentu salīdzināšana parādīja, ka tikai daži fragmenti starp pētījumiem pārklājās un ekspresējās pēc dažādu stresoru ietekmes. Analizējot visus identificētos fragmentus (arī anonīmos), neatrada

nevienu līdzīgu fragmentu pēc karstuma un hormonu stresa. 27. attēlā redzama sekvenču salīdzināšanas dendrograma (ClustalW), kur klāsterizācija notika tikai starp SA un ABA līdzīgām fragmentu grupām, bet, tā kā analizē izmantoja karstuma stresa un augu hormonu apstrādes rezultātā iegūtas sekvences tiešā un apgriezti komplementārā orientācijā, tad šie klāsteri atkārtojas. Līdzīgu sekvenču salīdzināšanu veica starp katra stresa rezultātā identificētām fragmentu grupām. Priežu hermesa invāzijas rezultātā un karstuma stresa rezultātā identificēja *Copia-2 TA-I* līdzīgās retrotranspozona sekvences (B104 un T30).



27. attēls. Salīdzinošā dendrogramma identificētajām unikālajām sekvencēm pēc karstuma ietekmes un pēc apstrādes ar augu hormoniem (ABA un SA). Iekļautas sekvences tiešā un apgriezti komplementārā (RC) orientācijā.

ERV-līdzīga sekvenca atrasta gan kukaiņu invāzijas rezultātā, gan pēc apstrādes ar SA, tāpat šajās grupās bija līdzīgi divi neanotēti fragmenti (B103 un SA24). ERV transkripts, kuru identificēja pēc kukaiņu uzbrukuma bija īsāks, bet abi transkripti bija ar 97% nukleotīdu

homoloģiju. Lai gan ERV transkripts bija homologs zīdītāju elementam, viens līdzīgs transkripts ir arī miežiem, kur tas tika identificēts pēc patogēnas sēnes infekcijas. Divus līdzīgus anonīmus transkriptus, kā arī vienu *Ogre*-līdzīgu transriptu (ABA18 un B125) atrada gan pēc priežu hermesa invāzijas, gan pēc apstrādes ar ABA. Pēc SA un ABA apstrādes atrasta liela *Copia 18-BD*-līdzīgo transkriptu grupa un trīs anonīmie transkripti. Dažādos eksperimentos identificētie līdzīgie fragmenti bija līdzīgi arī pēc garuma (izņemot iepriekš minēto ERV transkriptu), bet nukleotīdu sekvences līdzība bija lielāka par 90%.

### 3.2.2. Identificēto TE-līdzīgo transkriptu struktūra

Visus TE-līdzīgos fragmentus apkopoja *14. tabulā*, norādot homologā TE nosaukumu, sekvences gēnu bankas numuru, klasifikāciju un izcelsmes organismu, izolētā fragmenta garumu un tam proporcionālo homoloģijas pārklājumu, homologā rajona struktūrelementus (ar slīpsvītru nodala dažādas homoloģijas daļas, bez slīpsvītras viena rajona līdzību dažādiem TE), kā arī minēto rajonu homoloģijas parametrus un sakritību skaitu ar augu EST datubāzes ierakstiem. Visbiežāk, fragmentu abos galos detektēja amplifikācijā izmantoto PBS praimeru komplementārās sekvences, tomēr dažreiz tās saturēja SNP un delēcijas. Vienā fragmentā PBS praimera sekvenci nevarēja identificēt, jo tās vietā bija atkārtojums. iPBS metodē izmantojot genomisko DNS, parasti tiek amplificētas genomiskās sekvences un divas LTR sekvences no TE, kas genomā lokalizējas blakus viena otrai pretējās orientācijās (Kalendar *et al.* 2010). Šajā pētījumā no cDNS izolētās 28 TE-līdzīgās sekvences pēc savas struktūras ir daudzveidīgas (*14. tabula*). Identificētie fragmenti saturēja:

1. sekvences, pilnīgi vai daļēji homologas TE ORF, poliproteīna rajonam vai UTR;
2. viena elementa LTR ar fragmentu pārklājumu tuvu 100%;
3. sekvences ar augsti homologu LTR rajonu kombinācijā ar nezināmu sekvenci;
4. divus LTR abos galos orientētus pretējos virzienos.

Lielākā TE-līdzīgo sekvenču grupa (17) saturēja tieši kodējošo domēnu rajonus, kas varētu būt sagaidāms, jo tās ir viskonservatīvākās TE sekvences, un tādēļ tiek biežāk identificētas datubāzēs. Astoņas sekvences saturēja LTR un trīs TE nekodējošās daļas. Identificēja divas himēriskās sekvences, kur viena daļa fragmenta līdzinājās TE, bet otra daļa līdzinājās hloroplasta sekvencei.

14. tabula. Diferenciāli ekspresēto TE-līdzīgo fragmentu salīdzināšana. Norādīta homoloģija ar NCBI, Rebase, TREP un GyDB datubāzu ierakstiem.

Fragmenti	Homologa TE kārta, virsgimene	References nosaukums	TE	TE gēnu bankas Nr.	Fr. garums, bp	Homoloģijas pārklājums, %	Fragmenta struktūra	Sakrītības/e-vērtība/identiski/ un/vai līdzīgi (aminoskābēm)	Homologa organisms	TE	EST
T49	DNS, CACTA, TIR	EnSpm, Caspar		TREP3415	825	99	ORF2	N: 609/e-174/ 95%	Triticeae		2
T30 <sup>1</sup>	LTR, Copia	Copia-2_TA-I		AC232261	585	98	Pol	N: 387/2e-110/84%	Triticeae		4
T10	LTR, Gypsy	Laura		TREP1419	607	94	LTR	N: 686/0,0/90%	Triticeae		19
T31	LTR, Gypsy	Erika		TREP1305	812	99	LTR	N: 676/ 0,0/ 89%	Triticeae		75
T73	LTR, Gypsy	Wham/ Gypsy-1-LTR TA		TREP1243/-	815	60/ 15	LTR/ LTR	N: 722/ 0,0/ 93%/ N: 84,2/1e-19/80%	Triticeae		63/ 0
T92	LTR, Gypsy	Gypsy-6_TA-I, Carmilla		DQ767629, TREP3169	290	97 92	INT Pol	N: 212/4e-58/78% X: 89/1e-20/52%/64%	Triticeae		4
T12	LTR, copia	HORPIA, TYI PE		PTREP36, Z50750	490	97 44	Pol	X: 135/3e-34/41%/61%, N: 93,3/1E-22/70%	H. vulgare P. elliottii		13
T28	LTR, Gypsy	Geneva		PTREP246	874	41	GAG	X: 54,7/ 2e-09/ 29%/43%	H. vulgare		6
T51*	LINE	Karin_TA/ Ch		AF325197(1)/ NC_004677.2(2,3)	741	49(1)/16(2) / 24(3)	Pol(1)/Ch(2)/ Ch(3)	N1: 122/4e-31/72% X1: 455/3e-47/67%/77% N2: 176/2e-45/ 92%/ N3: 80,6/ 2e-16/70%	H. vulgare(1) / P. koraiensis(2,3)		5/ 891
B54	LTR, Copia	Copia-2_TA-I		AC232261	477	98	Pol	N: 636/0,0/90%	Triticeae		57
B125 <sup>3</sup>	LTR, Gypsy	Ogre		AY299395.1	495	99	Pol	N: 821/0,0/97%	P. sativum		0
B104 <sup>1</sup>	LTR, Copia	Copia-2_TA-I		AC232261	585	98	Pol	N: 392/4e-112/84%	Triticeae		4
B193	LTR, Gypsy	CRM, PtAppalachian I		AY129008.1, AC241263	591	38 99	AP Pol	X: 60.5/3e-11/36%/58% N: 527/3e-153/80%	Z. mays P. taeda		13
B166	LTR, TRIM	Cassandra		TREP1400	417	34	LTR/U	N: 184/5e-47/90%	H. vulgare		48
B103 <sup>2</sup>	LTR, ERV	MSTA		-	249	36	LTR/U	N: 102/2e-26/86%	Mammalia		1
B211	LTR, Gypsy	BAGY-2		TREP2003	504	21	U/G/U	N: 60/3e-09/82%	H. vulgare		22
B4	LTR, Gypsy	Ogre		AY299398.1	1222	99 44	Pol RT	N: 803/0,0/75% X:221/4e-59/61%/74%	M. truncatula P. Sativum		26



Fragmenti	Homologa TE kārta, virsgimene	References nosaukums	TE TE gēnu bankas Nr.	Fr. garums, bp	Homologi jaš pārklāju ms,%	Fragmenta struktūra	Sakritības/e-vērtība/ identiski/ un/vai līdzīgi (aminoskābēm)	Homologa organisms	TE EST
B123	LTR, Gypsy	Ogre	AY299398.1	1114	97 29	Pol RT	N: 304/2e-112/78% X: 183/4e-81/84%/89%	<i>M. truncatula</i> <i>P. sativum</i>	56
B74	LTR, Gypsy	Ogre, Gypsy-133 GM-I	AY299398.1, -	571	44 73	AP pol	X: 107/2e-25/58%/74% N: 210/3e-57/71%	<i>P. sativum</i> <i>G. max</i>	7
B301	LTR, Gypsy	PIGY-LTR_PS, Athila4-1	AY299398, AC007209.6	731	98 67,5	LTR GAG	N: 383/6e-110/75% X: 381/2e-38/43%/63%	<i>P. sativum</i> <i>A. thaliana</i>	9
B153*	LTR, Gypsy	Cereba/ Ch	PTREP64/ XM_002863257.1	1059	20/48,6	Pol/Ch	X: 50/4e-08/38%/58%/ N: 723/ 0,0/92%	<i>H. vulgare</i> / <i>A. lyrata</i>	1/ 2465
ABA18 <sup>3</sup>	LTR, Gypsy	Ogre	AY299398.1	517	85	Pol	N: 718/0,0/90%	<i>P. sativum</i>	0
SA12	LTR, Gypsy	Ogre	AY299398.1	375	64	RT	X: 74/1e-16/46%/68%	<i>P. sativum</i>	0
ABA10 <sup>4</sup>	LTR, Copia	Copia-18_BD-I / Ch	ADDN01000980	804	33	G/Ch	N: 351/7e-100/89%	<i>Brachypodium</i>	1930
SA07 <sup>4</sup>	LTR, Copia	Copia-18_BD-I / Ch	ADDN01000980	800	33	G/Ch	N: 318/4e-90/87%	<i>Brachypodium</i>	1930
SA16	LTR, Copia/ Gypsy	Angela/ Fatima	TREP1602/ TREP3198	463	64,5/ 12,5	LTR/LTR	N: 210/1e-54/84%/ N: 58/9e-09/90%	<i>T. monococcum</i>	66/ 0
SA24 <sup>2</sup>	LTR, ERV	MSTA	-	517	68	LTR	N: 396/1e-114/85%	<i>Mammalia</i>	1
SA03	LTR, Gypsy	Gypsy-3_HV-LTR	BACC01008480	1419	87	LTR	N: 740/0,0/ 75%	<i>H. vulgare</i>	7

Izmantotie saīsinājumi: G - genomiskā sekvenca; Pol - TE poliproteīns; LTR - TE garie terminālie atkārtojumi; AP - proteināzes domēns; integrāzes domēns; GAG - gag prekursors; ORF2 - otrā atklātās translācijas fāze; RT - reversās transkriptāzes domēns; Ch - hloroplasta genoma sekvenca; N - līdzība nukleotīdu sekvences līmenī; X - līdzība translētā proteīna aminoskābju secības līmenī; kolona EST: meklēšana NCBI zaļo augu (*Viridiplantae*) EST datubāzē ar parametriem: sakritību vērtība  $\geq 80$ , e-vērtība  $\leq 0,01$ ; \* - himēriskais transkripts; <sup>1-4</sup> - līdzīgi transkripti identificēti dažādu stresoru ietekmē ar līdzību  $\geq 90\%$ .

### 3.2.3. TE-līdzīgo transkriptu salīdzināšana

Kopumā, dažādu stresoru ietekmē, atrasti četri *Gypsy* virsgimenes homologi (*Gypsy-6*, *Ogre*, *Appalachian*, *PIGY-1*) un divi *Copia* virsgimenes homologi (*Copia-2-TA\_I*, *HORPIA*). Pie potenciāliem homoloģiem pieskaitīja sekvences, kas ir pilnībā pārklātas ar publicēta retrotranspozona sekvenci nukleotīdu līmenī, jo LTR sekvences ar lielāku iespējamību var būt izkaisītas genomā pa vienai un reprezentēt sena elementa paliekas. Lai gan karstuma ietekmes rezultātā izolēto fragmentu skaits bija neliels, identificēja homologās retrotranspozonu pārstāvju sekvences no dažādām kārtām (LINE un LTR) un no deviņām ģimenēm. Papildus dažādām retrotranspozoniem-līdzīgām sekvencēm, pēc karstuma stresa identificēja dažus transkriptus no DNS transpozona *EnSPM* (T49) ar augstu līdzību TE proteāzes domēnam nukleotīdu sekvences līmenī. Fragments T12 līdzinās *HORPIA-2* poliproteīnam visā fragmenta garumā, bet vidusdaļa līdzinās arī *Ty1\_PE* (*Pinus elliotti*) *Copia* TE poliproteīna 3' daļai (70% nukleotīdu līdzība). T12 ir atrodams arī *P.taeda* BAC sekvenču datubāzē. Fragments T28 ir ar līdzību 43% *Gypsy Geneva* poliproteīnam translēto aminoskābju secības līmenī, kā arī šī sekvenca ir atrodama piecās *P.taeda* BAC sekvencēs ar 98% pārklājumu un 24 BAC sekvencēs ar daļēju pārklājumu, tāpat atrasti seši augsti līdzīgi EST transkripti no dažādām priežu sugām. Šīs sekvences potenciāli var saturēt skujkokiem specifiskus TE.

Priežu hermesa invāzijas eksperimentā izolēja ievērojami vairāk diferenciāli ekspresēto fragmentu, taču identificēja salīdzināmu retrotranspozoniem-līdzīgu transkriptu skaitu: retrotranspozoniem tie ir trīs virsgimeņu pārstāvji (*Gypsy*, *Copia*, *TRIM*) un astoņu ģimeņu pārstāvji, kā arī atrada attālu provīrusam līdzīgu elementu (ERV). Liela fragmentu grupa bija līdzīga *Ogre* TE dažādiem domēniem. Piemēram, B4 līdzinājās *Ogre* elementa RT un RH domēniem nukleotīdu līmenī no *Pisum sativum* šķirnes 'Carrera' (GQ267464.1) un *Ogre-MT3\_I* no *Medicago truncatula*. B123 transkripts arī līdzinājās šiem elementiem, bet saturēja 137 bp delēciju. *Ogre* sekvenču varianti ar šādu delēciju datubāzēs netika atrasti. Pēc ABA ietekmes identificēja ABA18 transkriptu ar nukleotīdu līdzību *Ogre* ORF2 no *Pisum sativum* (AY299389.1). Vienu RT no *Ogre* TE līdzīgu transkriptu identificēja arī pēc apstrādes ar SA (SA12), taču tas līdzinājās šim elementam tikai translēto proteīnu līmenī ar 68% līdzību. Tāpat, B74 līdzinājās *Ogre* TE AP domēnam, bet nukleotīdu līmenī tas līdzinājās arī par 71% *Gypsy-133* TE no *Glycine max*. Tā kā RT domēns ir viskonservatīvākais TE vidū, šī varētu būt vienīgā homologā daļa starp šiem elementiem.

Transkriptā B166 atrada augsti līdzīgu sekvenci TRIM *Cassandra* LTR elementam. TRIM ir īsi transkripcionāli aktīvi neautonomie elementi, izplatīti augu vidū. Šo elementu insercijas bieži ir atrodamas gēnu intronos un promoteru rajonos (Witte *et al.* 2001). Tomēr, līdz šim šie elementi skujkoku genomam nav aprakstīti. *Cassandra* elements satur konservatīvu 5S RNS sekvenci, ir izplatīts vairāku augu dzimtu vidū, tāpēc uzskata, ka šis elements ir evolucionāri sens (Kalendar *et al.* 2008). Blakus LTR sekvencei ir identificēta arī 5S RNS sekvences daļa.

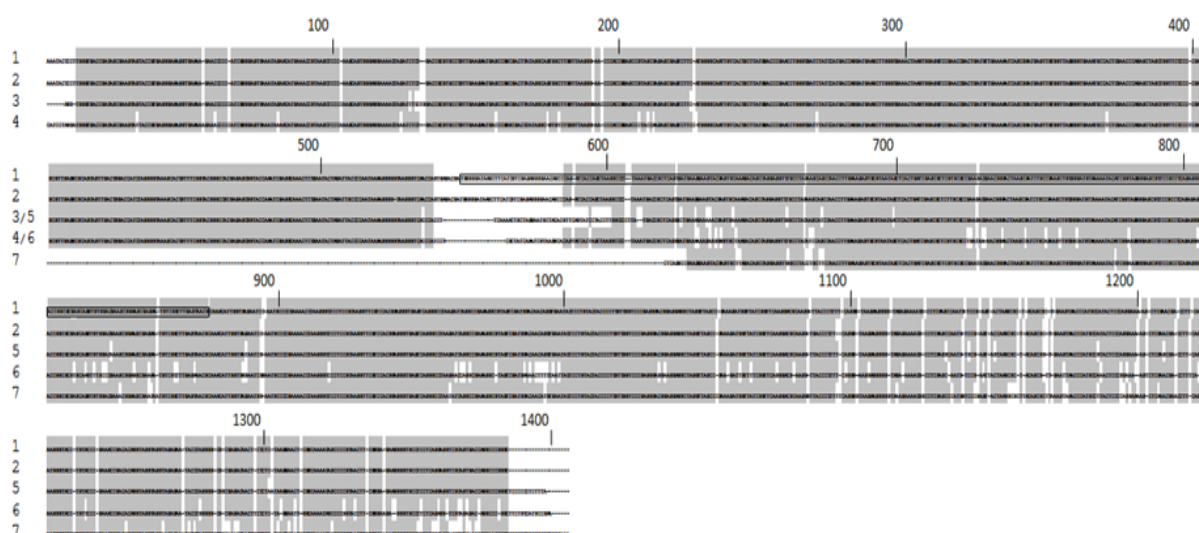
Augu hormonu ietekmē diferenciāli ekspresēto fragmentu skaits bija ievērojami zemāks, tāpēc izolēto fragmentu skaits bija neliels. Tomēr kopumā identificēja piecām retrotranspozonu ģimenēm (*Gypsy* un *Copia* virsgimenes) līdzīgus transkriptus, kā arī vienu provīrusam līdzīgu fragmentu. Identificēti vairāki transkripti ar *Copia-18-BD* retrotranspozonom līdzīgu sekvenci.

### 3.2.4. Himērisko transkriptu analīze

Tika identificēti tikai divi transkripti ar dažādu TE LTR sekvencēm no abām pusēm. T73 fragments satur *Gypsy* virsgimenes LTR TE *Wham* (ar 60% pārklājumu) un *Gypsy-1* (ar 15% pārklājumu), kas ir orientēti pretējos virzienos viens pret otru. Fragmenti SA16 satur *Copia Angela*-līdzīgu LTR (ar 64% pārklājumu) un *Gypsy Fatima*-līdzīgu LTR sekvenci (ar 12% pārklājumu). Fragmenti B166, B103, SA24 un B211 satur vienu identificētu LTR sekvenci un nezināmu sekvenci. Četri transkripti (T31, SA03, T10, B301) visā fragmenta garumā saturēja vienu LTR sekvenci. Astoņi transkripti (T12, T92, T28, B74, B4, B123, B301, SA12) līdzinājās dažādu TE poliproteīniem aminoskābju secības līmenī, bet seši no tiem (T12, T92, B4, B123, B301 un B74) ar līdzību zem 80% nukleotīdu līmenī sakrita ar TE. Vairākas LTR sekvences nebija iespējams identificēt, jo vairums ierakstu datubāzēs attiecas uz segsēkļu genomu TE, bet LTR ir vismazāk konservatīvie retrotranspozonu struktūrelementi.

Detektēja divus transkriptus, kas satur gan TE daļu, gan hloroplasta genoma sekvences daļu (T51 un B153). 49% no T51 fragmenta līdzinājās bez LTR *LINE Karin\_TA* poliproteīnam, bet otra fragmenta daļa bija augsti homologa priedes hloroplasta genoma divām dažādām daļām (ar 16% un 24% pārklājumu). Otrs himēriskais transkripts B153 bija līdzīgs *Gypsy Cereba* poliproteīnam, kā arī nepārtrauktai priedes hloroplasta sekvencei. B153C hloroplastam homologā daļa līdzinās lielam skaitam ierakstu no augu EST datubāzēs (2465 sakritību), bet retrotranspozonom līdzīgā daļa B153TE sakrita tikai ar vienu ierakstu no

EST datuāzes (14. tabula). Šo hloroplastam-līdzīgo sekvenci atrada starp citām diferenciāli ekspresētām sekvencēm, tikai bez *Cereba*-līdzīgas daļas (SA01). Pie kam, šīs sekvences (B153C un SA01) hloroplasta genomā ir novietotas blakus ar citu transkriptu grupu (SA07, ABA03, ABA02). 33% no katras no šo transkriptu sekvencēm satur augsti homologu rajonu no retrotranspozona *Copia-18\_BD* 3' rajona ar 98% līdzību, tāpēc šīs sekvences iekļāva TE-līdzīgo sekvenču analizē. Četri līdzīgie fragmenti bija identificēti pēc ABA apstrādes un viens pēc SA. Savstarpēji šiem transkriptiem novērota līdzība 83-94% un garuma variācija 788-836 bp. BLAST meklēšana ar *Copia 18\_BD\_I* elementu atrada, ka 313-315 bp garš fragments 3' nekodējošā retrotranspozona daļā pirms LTR ir ļoti līdzīgs vairāku augu sugu hloroplastu genomiskajai sekvencei, ieskaitot *Arabidopsis lyrata* (ORF64c). Pie kam, hloroplastam homologā *Copia 18-BD* sekvence atrodas apgrieztā orientācijā. Identificētais fragments sakrīt ar 1930 sekvencēm EST, bet *Copia 18\_BD-I* TE sekvence sakrīt ar 2500 EST sekvencēm.



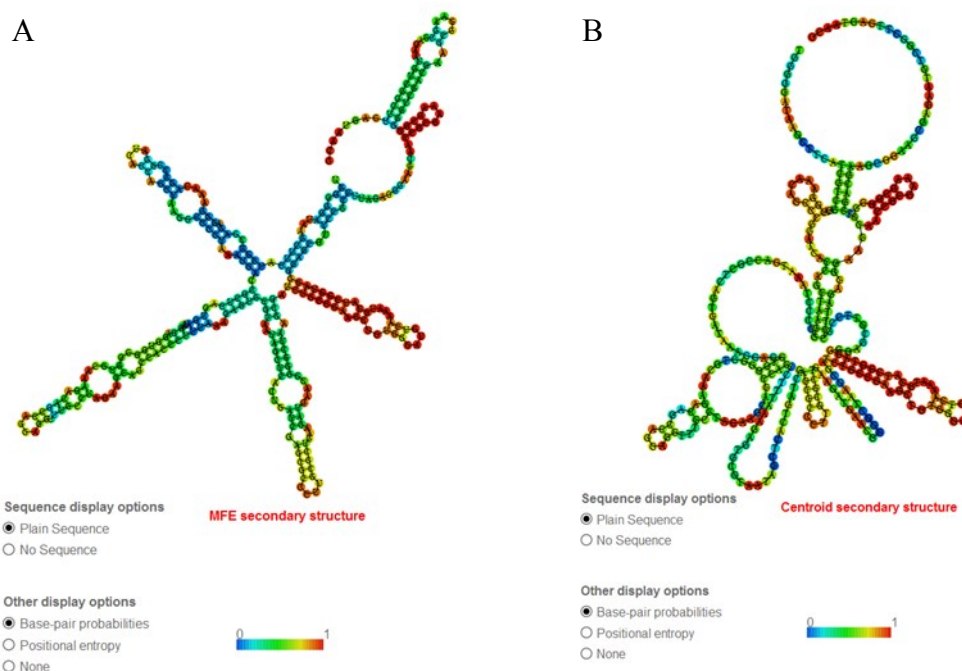
28. attēls. Identificēto transkriptu salīdzināšana ar hloroplasta genoma sekvencēm: (1) *Pinus thunbergii* (gi|7524593|, 1325bp) un (2) *Pinus koraiensis* (gi|145408420|, 1323 bp). Identificētie transkripti: (3) SA01 (533 bp), (4) B153C (527 bp), (5) SA07 (800 bp), (6) ABA03 (788 bp), (7) ABA02 (834 bp). Nukleotīdu skaits norādīts no salīdzināšanas sākuma, pozīcijā 548-866 bp atrodas *Copia-18-BD* homologais rajons.

Interesanti, ka ir atrasti dažāda garuma un struktūras transkripti, kas varētu lokalizēties dažādos genoma lokusus, bet identificētie fragmenti var būt arī viena TE atkarīgās struktūras ekspresijas rezultāts. 28. attēlā ir parādīts visu identificēto transkriptu

salīdzinājums ar divām priēžu hloroplasta sekvencēm. Abas identificētās transkriptu grupas atrodas 45 bp attālumā viena no otras, ko var izskaidrot ar PBS praimeru komplementaritāti šim hloroplasta sekvences rajonam. B153TE *Cereba*-līdzīgā daļa, kas atrodas 5' daļā un nav homologa hloroplasta sekvencei, nav parādīta attēlā. SNP bija iezīmēts tikai tad, ja nukleotīda nomaiņa ir notikusi salīdzinājumā ar abām hloroplasta sekvencēm un identificētiem fragmentiem. Ir atzīmēts *Copia-18-BD* elementa homologais rajons. Hipotētisko ORF analīze SA07 transkriptam parāda, ka pēc TE-līdzīgā fragmenta varētu atrasties *Medicago truncatula* metalokarboksipeptidāzes inhibitora domēns ar 97% līdzību aminoskābju secības līmenī, vai arī ar šūnapvalku saistītā hidrolāze.

Hloroplasta sekvencei homologo *Copia-18BD* 315 bp rajonu analizēja sīkāk, jo šis konservatīvais rajons varētu saturēt nozīmīgus regulatīvus motīvus. Sekvenci analizēja tādā orientācijā, kādā tā ir reprezentēta hloroplastu genomā (t.i., apgriezti komplementāra *Copia-18-BD* elementā). Izmantojot RegRNA rīku v.1.0 (Mignone *et al.* 2005), šajā sekvencē atrada divus 75 bp un 99 bp uORF (*upstream ORF*) motīvus, kas eikariotiem parasti lokalizējas gēna 5'UTR rajonā un piedalās translācijas regulācijā (Meijer, Thomas 2002). Meklējot augu regulatīvo motīvu datubāzē (REGSITE DB) ar programmu *NSITE* (Solovyev, 2002), atrada septiņu regulatīvo elementu motīvus ar homologiju  $\geq 80\%$ . Viens no tiem (TTTAAAG, BPBF no *Hordeum vulgare*) bija palindroms (atrodas abās DNS ķēdēs), abās orientācijās nesatur nevienu SNP. Tāpat, bez SNP atrada divus nezināmus kodola faktoru saistīšanas motīvus: 5'-CCCGGATC-3' no kviešu un 5'-AAACCTCC-3' no spinātu genoma.

Sekvences analīze ar miRNS meklēšanas programmu *FindMiRNA* prognozēja šim rajonam sešu pre-miRNS gēnus tiešā orientācijā un piecus komplementārajai ķēdei, kas veido cilpveida struktūru ar brīvo enerģiju mazāk par -17 kcal/mol. Lai noskaidrotu, vai *Copia-18-BD* konservatīvais rajons veido cilpveida struktūras, un kāda brīvā enerģija tam ir nepieciešama, rajonu analizēja ar *RNAfold* (Lorenz *et al.* 2011). 29. attēlā var redzēt divas prognozētās struktūras, kas satur vienu cilpveida struktūru, kuras veidošanās iespējamība ir ļoti augsta.



29. attēls. *Copia-18-BD* mRNS sekundārā struktūra un rajoni, kuri varētu veidot cilpveida struktūras ar iespējamību tuvu 1 (sarkans). A- minimālās brīvās enerģijas sekundārā struktūra, ar minimālo brīvo enerģiju  $-99,20$  kcal/mol; B- centroīda sekundārā struktūra, ar minimālo brīvo enerģiju  $-55,80$  kcal/mol.

### 3.2.5. Hipotētisko proteīnu kodējošo gēnu identificēšana

TE identificēšanai izmantoja nespecifiskus praimerus, tie amplificēja arī gēnu transkriptus, īpaši ribosomālo gēnu mRNS. Šie transkripti bija pilnīgi pārklāti ar gēna homologiju, sīkāki strukturālie pētījumi netika veikti. Visos gadījumos identificēja līdzību ar segskēļu gēnu sekvenču transkriptiem un hipotētisko proteīnu transkriptiem no skujkokiem. Karstuma stresa rezultātā detektēja: ribosomālā proteīna S10 mRNS no *Medicago truncatula* (gb.nr.: MTR\_1g006120), ATP sintēzes alfa subvienības mRNS no *Medicago truncatula* (gb.nr.: MTR\_1g006010), fotosistēmas Q(B) proteīnam līdzīgu mRNS (gb.nr.: XM\_002277124.2), salicilāta o-metiltransferāzei līdzīgu mRNS (gb.nr.: XM\_003563861.1). Priežu hermesa invāzijas rezultātā detektēja: 17S ribosomālās RNS gēnu (gb.nr.: K02202.1), ar šūnas sienīgu asociēto hidrolāzi (gb.nr.: NW\_003763361.1), alfa-amy2/53 gēna 5' rajonu (gb.nr.: X13577.1), ribosomālā proteīna S10 mRNS no *Medicago truncatula* (MTR\_1g006120), 17S ribosomālās RNS gēnu (gb.nr.: K02202.1), 18S ribosomālās RNS gēnu (gb.nr.: EF673731.1), 26S ribosomālās RNS gēnu no *Zea mays* (NR\_028022.2).

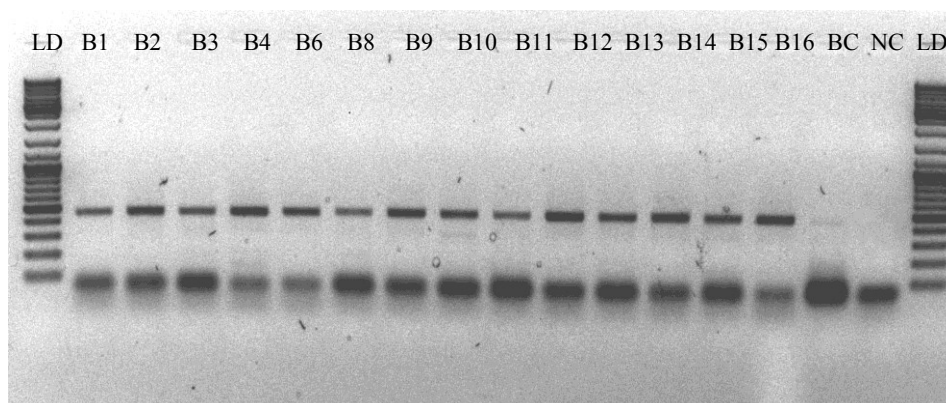
Apstrādē ar hormoniem: 17S ribosomālās RNS gēnu (LOC100502571, NR\_036655.1), ar šūnas sienīņu asociēto hidrolāzi (gb.nr.: NW\_003763361.1), īsās ķēdes alkohola dehidrogenāzi (gb.nr.: XM\_002513046.1), citoplazmas glicerāldehīda-3-fosfāta dehidrogenāzes gēnu *GAPC2* (gb.nr.: NM\_001112230.2).

### 3.3. TE-līdzīgo fragmentu ekspresijas analīze

#### 3.3.1. TE specifisko fragmentu amplifikācija

Lai salīdzinātu identificēto TE-līdzīgo fragmentu amplifikāciju dažādu stresoru ietekmē, konstruēja specifiskus PĶR praimerus. Praimeri veidoti, lai amplificētu identificēto TE rajonu. Ja fragmenti saturēja tikai LTR atkārtojumu, specifiskus praimerus nebija iespējams piemeklēt. Praimerus izmantoja amplifikācijai gan ar gDNS, gan ar cDNS. Vairumā gadījumu, ar gDNS amplifikācijas produkti bija nespecifiski, bet visos paraugos amplificēja vienāda garuma fragmentus.

Desmit praimeru pārus izmantoja karstuma stresā identificēto transkriptu amplifikēšanai. Pieciem praimeriem (pT28, pT51, pT73, pT12 un pT31) amplifikācijas produktu garums atbilst sagaidāmajam un atrodas tikai karstuma stresam pakļautajos paraugos. pT28 amplifikācijas produkts parādās arī visiem paraugiem no kukaiņu invāzijas (30. attēls), pT51 - 12 paraugiem, pT12 - 10 paraugiem, pT31 - sešiem paraugiem.



30. attēls. T28 Geneva-līdzīgā fragmenta amplifikācija paraugiem no priežu hermesa invadētiem ramiem (B1-B16), kontrolei (BC) un negatīvajai kontrolei (NC).

Fragmentiem, kas bija identificēti kukaiņu invāzijas rezultātā un augu hormonu apstrādes rezultātā, piemeklēja praimerus ar īsiem amplifikācijas produktiem reālā laika PĶR analīzei. Sākumā šos praimerus izmantoja arī vizuālai amplifikācijas produktu novērtēšanai sadalot tos

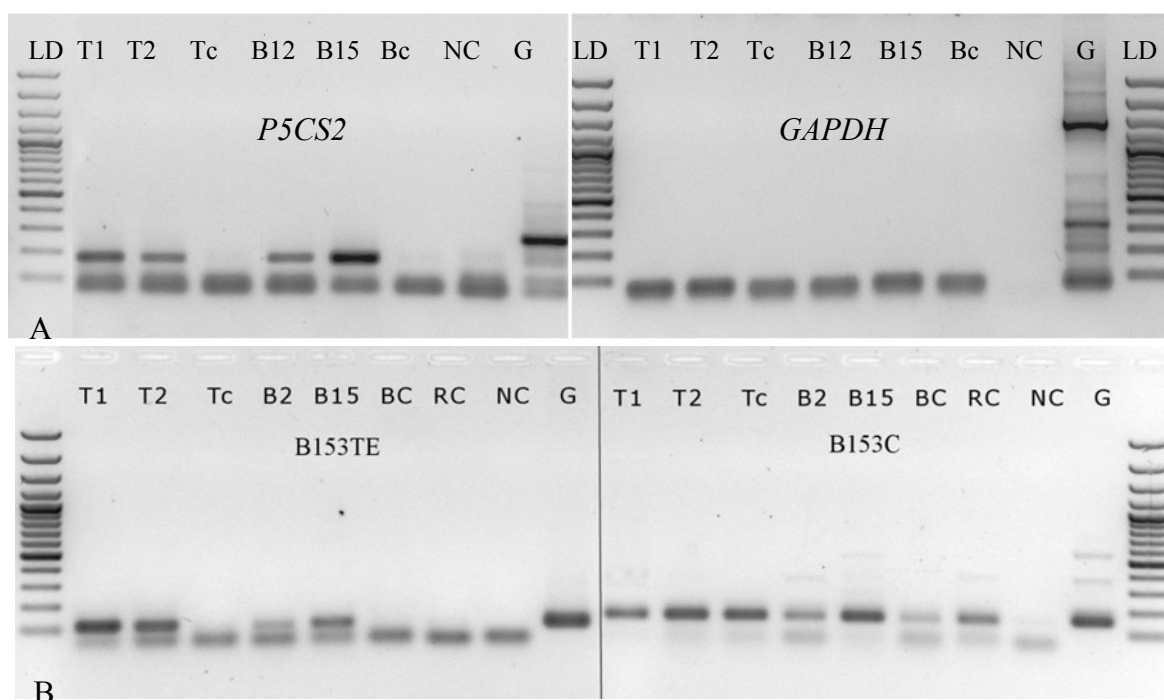
ar elektroforēzes metodi. Eksperimenta gaitā atkārtoti veikta amplifikācija ar kontroles gēniem (31. attēls A). Neskatoties uz kontroles gēnu labo amplifikācijas kvalitāti, amplifikācija ar retrotranspozonu marķieriem bieži bija nespecifiska, vai sagaidāmā produkta garumā novēroja „mākoni”, kas norāda uz to, ka tiek amplificēti daudzi līdzīga garuma produkti, tomēr tie nav identiski. Amplifikācijas rezultāti katram marķierim ir apkopoti 15. tabulā. Piecu praimeru amplifikācijas produktu joslas bija spilgtākas stresam pakļautajos paraugos, salīdzinot ar kontroli (pB211, pSA12 SA paraugos, pSA12 un pT50 karstuma stresam pakļautajos paraugos, pB54 un pB301 kukaiņu bojātajos paraugos). Divi praimeru pāri (pB193 un pB166) amplificēja nespecifiskus produktus visos PQR apstākļos. pSA07 amplifikācijas produkti atrasti visiem paraugiem (arī kontrolēs). Vāja amplifikācija novērota septiņiem marķieriem (15. tabula). Vienam no himēriskajiem fragmentiem (pB153) piemeklēja divus praimeru pārus katrai no sastāvdaļām *Cereba*-līdzīgai daļai (pB153TE) un hloroplasta sekvencei līdzīgai daļai (pB153C). B153TE amplifikācijas produkti novēroti stresam pakļauto rāmetu cDNS paraugos, bet nebija kontroles paraugiem (31. attēls). Visiem paraugiem novēroja B153C amplifikācijas produktus.

15. tabula. TE-līdzīgu fragmentu specifisko praimeru amplifikācija eksperimentālajos cDNS paraugos: (T) karstuma ietekmē; (B) priežu hermesa invāzija; (SA-24 un SA-64) attiecīgajos paraugos pēc apstrādes ar SA; (ABA-24 un ABA-64) - attiecīgajos paraugos pēc apstrādes ar ABA. (-) - nav amplifikācijas produktu; (+) - ir amplifikācijas produkts.

Fragmenti	Stresa veids					
	T	B	SA-24	SA-64	ABA-24	ABA-64
T92	+	-	-	-	-	-
T10	+	-	-	-	-	-
T51	+	+	+	+	+	+
T49	+	+	+	+	-	-
T31	+	+	-	-	-	-
T73	+	+	+	+	-	-
T30	-	-	-	-	-	-
T12	+	+	-	-	-	-
T28	+	+	-	-	-	-
T50	+	-	-	-	-	-
B54	-	+	+	-	-	-
B123	+	-	+	-	-	-
B125	+	-	-	-	-	-
B166	+	+	+	-	+	-
B211	+	+	+	-	+	-
B104	-	-	-	-	-	-
B301	-	+	-	-	-	-
B74	+	+	-	-	-	-



Fragmenti	Stresa veids					
	T	B	SA-24	SA-64	ABA-24	ABA-64
B153C	+	+	+	+	+	+
B153TE	+	+	-	-	-	-
B193	+	+	+	+	+	+
SA16	+	+	+	+	-	+
SA03	+	+	-	+	-	-
SA24	+	+	+	+	+	+
SA07	+	+	+	+	+	+
ABA18	-	+	-	+	-	-
SA12	+	+	+	+	+	+



31. attēls. Salīdzinoša amplifikācija ar cDNS karstuma stresam (T1, T2), priežu hermesa invāzijai (B12, B15) pakļautiem un kontroles rāmetu paraugiem (Tc, Bc), negatīvā kontrole (NC) un gDNA (G). (A) - P5CS2-līdzīgā gēna produkti (190 bp and 250bp) un endogēnā kontrole GAPDH (70 bp). (B) - B153TE (110 bp) un B153C (120 bp).

### 3.3.2. Reālā laika PĶR

Papildus standarta PĶR reakcijām veica relatīvā ekspresijas līmeņa noteikšanu ar reālā laika PĶR metodi. Vairāku praimeru pāru amplifikācijas produktu kušanas līkne bija nespecifiska, tādēļ to ekspresijas līmeni nevarēja noteikt. Dažiem praimeru pāriem (piemēram, pT10) relatīvais transkriptu skaits stresam pakļautajos paraugos bija palielināts, taču Ct vērtības bija augstas (piemēram, 32 stresam pakļautajos paraugos pret 36 kontrolēs),

kas norāda uz šo fragmentu zemu ekspresijas līmeni. Dažos gadījumos, amplifikācija kontroles paraugos vispār netika detektēta, tāpēc, relatīvo ekspresijas pieaugumu nevarēja noteikt. Standartizācijai visos gadījumos izmantoja endogēnās kontroles gēnu GAPDH.

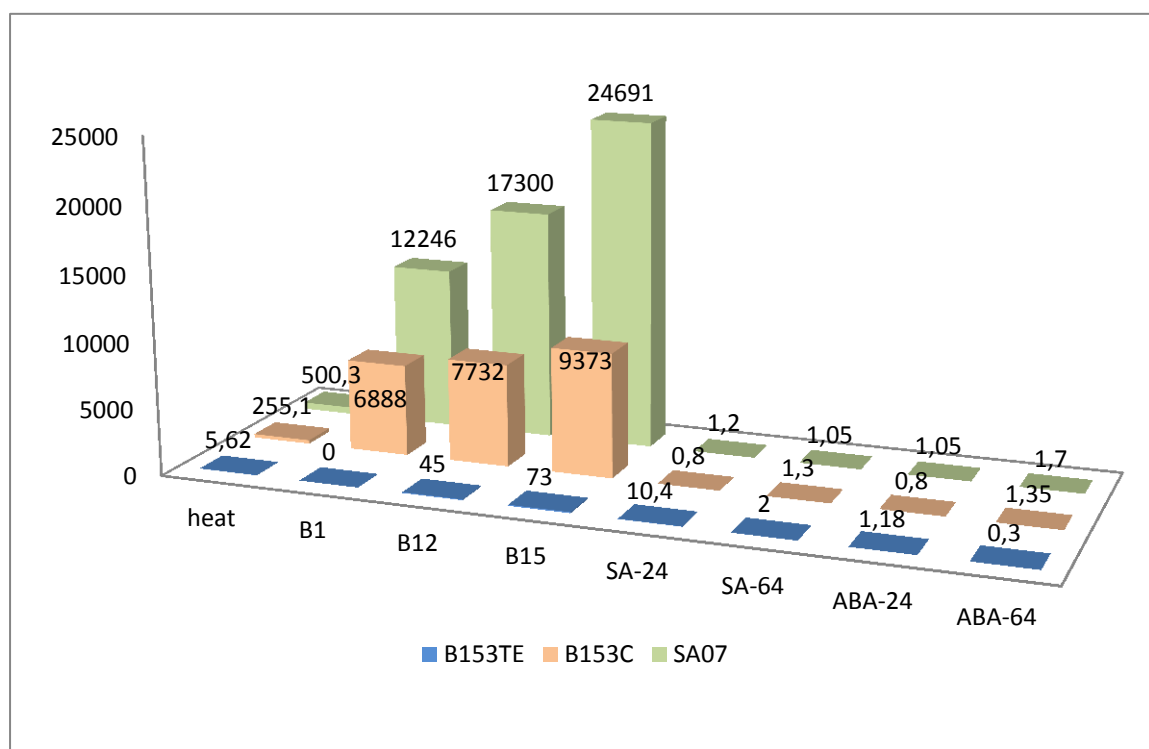
Tomēr, ar dažiem praimeriem reakcijas rādītāji bija pieņemami un ekspresijas paaugstinājums tika noteikts. Dažiem retrotranspozoniem-līdzīgiem transkriptiem amplifikācijas pieaugums tika konstatēts atsevišķiem paraugiem. Piemēram, T12 transkriptu skaits pieauga karstuma stresam pakļautajam paraugam (Ct 22; 26,7 reizes). T12 relatīvais ekspresijas līmenis paaugstinājās 24 stundas pēc apstrādes ar SA (1,8 reizes) un 3,24 reizes 64 stundas pēc apstrādes ar ABA. T28 tikai vienam paraugam no kukaiņu bojātā parauga noteikts palielināts relatīvais ekspresijas līmenis (6,62 reizes), 64 stundas pēc apstrādes ar SA (2,16 reizes) un 64 stundas pēc apstrādes ar ABA (3,88 reizes). T73 paaugstinātais relatīvais ekspresijas līmenis detektēts SA-24 (2,4 reizes) un SA-64 (2,7 reizes), bet ABA-24 (1,2 reizes) un ABA-64 (92 reizes).

Ievērojams transkriptu pieaugums konstatēts trijos tehniskajos atkārtojumos trijiem pārbaudītiem priežu hermesa invāzijai pakļautajiem paraugiem un diviem karstuma stresam pakļautajiem paraugiem ar praimeriem, kuri tika piemeklēti SA07 fragmentam (līdzīgs *Copia-18-BD* un hloroplasta sekvencēm). Pēc karstuma stresa konstatēts 500 reižu palielinājums, bet pēc priežu hermesa bojājumiem 12246 – 24691 reižu palielinājums, taču relatīvo pieaugumu pēc SA un ABA apstrādes nevarēja detektēt nevienam paraugam (32. attēls). SA07 amplifikācijas produktu kušanas līknes bija labas kvalitātes ar vienu izteiktu pīķi (aptuvena  $T_m=84^\circ\text{C}$ ), standartlīknes slīpums bija no -2,9 līdz -3,68,  $R^2=0,65-0,90$ , efektivitāte=86,8-117%.

Ekspresijas līmeņa izmaiņas izdevies noteikt arī himēriska transkripta divām daļām (B153TE un B153C). B153C amplifikācijas produktu kušanas līknes bija aptuveni vienādas ( $T_m=82^\circ\text{C}$ ) un standartlīkne raksturojās ar kvalitatīviem rādītājiem: slīpumu no -2,2 līdz -3,7;  $R^2=0,94-1$  un efektivitāti 85-121%. B153TE amplifikācijas produktu kušanas līknes nebija tik precīzas (aptuvena  $T_m=78^\circ\text{C}$ ), standartlīkne raksturojās ar slīpumu -1,8,  $R^2=0,92$ , efektivitāti 241%. B153TE (*Cereba*-līdzīga) transkriptu relatīvais daudzums palielinājās hermesa invāzijas rezultātā 45-73 reizes, karstuma stresa rezultātā novērots 5,6 reižu palielinājums, 10 reižu palielinājums novērots paraugam, kas ņemts 24 stundas pēc apstrādes ar SA, bet 64 stundas pēc apstrādes novēroja tikai 2 reižu palielinājumu. Hloroplastam-līdzīgās daļas (B153C) ekspresijas līmenis pieauga 6888-9373 reizes pēc kukaiņu uzbrukuma

un 255 reizes pēc karstuma stresa, pēc apstrādes ar augu hormoniem relatīvais ekspresijas līmenis nepalielinājās (32. attēls).

Relatīvais ekspresijas pieaugums līdzīgi mainījās fragmentiem SA07 un B153C, kas ir līdzīgi blakus novietotām hloroplasta sekvencēm. Vidēji, SA07 relatīvais ekspresijas līmenis bija divas reizes augstāks, salīdzinot ar B153C ekspresijas līmeni tiem pašiem paraugiem (bio15=2,6, bio12=2,2, bio1=1,7, T=1,96). Ekspresijas līmeņa atšķirības norāda uz atšķirīgu transkripcijas vienību skaitu priedes genomā, kas ir inducējami ar priežu hermesa invāziju un karstuma stresu.



32. attēls. Relatīvā ekspresija *Copia-18-BD*-līdzīgam transkriptam SA07, hloroplastam līdzīgam transkriptam B153C un *Cereba*-līdzīgam transkriptam B153TE.

### 3.4. Pilnizmēra retrotranspozonu izolēšana

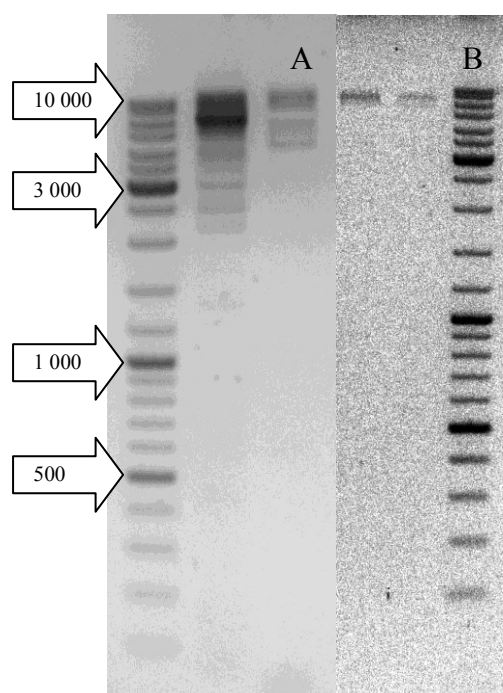
Identificētie diferenciāli ekspresētie fragmenti vairākiem TE strukturālajiem elementiem uzrādīja dažādu līdzības pakāpi. Tomēr, šo transkriptu identificēšana nesniedz pārliecinošu atbildi par priedē identificētā TE homologa pilna izmēra transkripciju. Zināms, ka TE fragmentētās daļas var palikt kodējošo gēnu UTR un intronu rajonos un transkribēties ar gēna funkcionālo sekvenču palīdzību vienkārši kā blakusprodukts. Tāpat, TE var uzkrāt mutācijas, bet tā daļas vēl transkribēties; nevienādās homologās rekombinācijas procesā TE var zaudēt iekšējo sekveni un veidoties viens LTR, kurš satur transkripcijas iniciācijas

sekvences. Tādā gadījumā, nevar spriest par homologā pilnizmēra retrotranspozona transkripciju un, tātad, arī transpozīciju. Lai TE būtu aktīvs elements, tam jāraksturojas ar noteiktu struktūru un regulatīvo motīvu sastāvu, kas nosaka TE iespēju veiksmīgi transkribēties, translēties un integrēties jaunā vietā genomā. Šo īpašību noskaidrošanai no cDNS jāiegūst pilna izmēra TE sekvenca, taču šis ir sarežģīts uzdevums, jo pilnizmēra TE varētu būt vairāku kb garš. Pilna izmēra aktīvā TE elementa identificēšana un tā sekvences raksturošana varētu būt ļoti informatīva, jo šo elementu sastāvs un aktivitāte parasti ir sugas specifiska. Tāpat, var būt noderīga TE-atkarīgā funkcionālā lokusa raksturošana. Saistītā elementa kodējošā domēna izolēšana var netieši norādīt uz pilna izmēra TE atrašanos cDNS. Amplifikācijas produktu polimorfisms var sniegt ieskatu par sekvences kopiju skaitu, izplatību vai viendabīgumu. Savukārt, TE amplifikācijas joslu polimorfisms starp viena auga ramiem var netieši norādīt uz nesenas TE insercijas/delēcijas gadījumu. Pilnizmēra retrotranspozona izolēšanai tika izmantotas trīs dažādes pieejas: garās distances PĶR, homologo TE izolēšana un TE izolēšana izmantojot BAC sekvenču analīzi.

### 3.4.1. Garās distances PĶR rezultāti

Ar mērķi iegūt pilna izmēra TE, sākumā pielietoja garās distances PĶR metodi. No gDNS nolēma izolēt pilna garuma TE, izmantojot praimeru konstruēšanu no identificētiem parastās priedes retrotranspozoniem līdzīgo sekvenču hipotētiskiem LTR. Ņemot vērā visus aspektus (izolēšanu, attīrīšanu, glabāšanu un mērķa sekvences kopiju skaitu), manipulācijas ar DNS ir vienkāršākas nekā ar RNS. RNS paraugus ir grūti attīrīt no DNS piemaisījuma, RNS un vienpavediena cDNS darba gaitā ātri degradējas, mērķa sekvences saturs var būt niecīgs, salīdzinājumā ar augsti ekspresētiem ribosomāliem gēniem. Tāpat, RNS konvertēšanai nepieciešamie papildus soļi, ievieš papildus kļūdas iespēju. Pieņemot, ka atrastie PBS praimeri sakrīt ar retrotranspozona PBS vietu, netālu no tās jābūt CA (TE tiešā orientācijā) vai TG (TE invertētā pozīcijā) nukleotīdiem, kas norobežo LTR 3' daļu. Netālu no PBS saita LTR atrodas 3'UR, kuram ir iespējams piemeklēt TE specifisku praimeri. Transkriptiem izveidoja garus praimerus, kas līdzinājās retrotranspozonu LTR sekvencēm: pT31\_L (*Erica*), pT10\_L (*Laura*), pT73\_L (*Gypsy-1*). Tāpat praimeri konstruēti fragmentam T28, kas vāji līdzinājās gag poliproteīnam vienā galā, jo gag ir pirmais iekšējās sekvences domēns, kurš lokalizējas netālu no PBS. T28 fragmentam blakus praimerim komplementāram rajonam (hipotētiskam PBS saitam) tika atrasts CA motīvs, kas var liecināt par LTR. Tā kā LTR ir tiešie atkārtojumi, kas lokalizējas abos TE galos, tad viens praimeris, vērsts uz TE

iekšu, var amplificēt iekšējo domēnu, vai arī, ja elementi atrodas tuvu viens otram, arī LTR un genomisko sekvenci starp tiem (18. attēls). Ja praimeris ir komplementārs pol domēnam, tad amplifikācija notiks starp diviem tuvu lokalizētiem elementiem. Ar GD-PĶR metodi no genomiskās DNS izdevās izolēt ap 10 kb garus fragmentus (33. attēls). Taču tik garus fragmentus nevar sekvenēt ar pieejamām metodēm, ja nav pietiekami lielas produkta koncentrācijas. Pirmkārt, no gDNS tiek iegūtas vairāku retrotranspozonu elementu kopiju sekvences, kas raksturojas ar augstu daudzveidības pakāpi un, tāpat, ar tiešo sekvenēšanu nav iespējams iegūt specifisku sekvenēšanas hromatogrammu. Abas šīs problēmas (gan koncentrācijas, gan specifiskuma) var risināt ar klonēšanu, taču klonēšanas efektivitāte strauji krīt izmantojot plazmīdas vektoru fragmentiem garākiem ar 5 kb, bet 10 kb fragmentu klonēšana ir sarežģīta. Tāpēc fragmentus sašķēla ar vairākiem restrikcijas enzīmiem pirms liģēšanas, kā ir aprakstīts metodēs, un šķelšanas produktus liģēja ar plazmīdu ar sekojošu kompetento *E.coli* šūnu transformēšanu un transformēto koloniju atlasī.



33. attēls. (A) - GD-PĶR amplifikācijas produkti no gDNS

(B) - GD-PĶR fragmentu elektroforēze pēc attīrīšanas.

Izmantotais garuma marķieris: GeneRulerDNA Ladder Mix (Fermentas).

Pēc aprakstītās metodikas tika iegūtas 136 transformētas kolonijas, no kurām izdalīja plazmīdu DNS. Plazmīdām ar PĶR reakciju izmantojot M13 praimerus un vizualizējot produktus elektroforētiski tika pārbaudīts inserta garums. Izmantojot četrus izolēto retrotranspozonu sekvences, tikai 32 plazmīdas bija ar insertiem. Insertus sekvenēja un analizēja. Iegūtās sekvences bieži vien saturēja klonēšanas vektoru, kas nozīmē, ka inserta vietā liģējās sašķeltās plazmīdas fragments. Pārējās sekvences neuzrādīja līdzību ar datubāzes

ierakstiem, kā arī nepārklājās savā starpā. Pieci fragmenti uzrādīja vāju līdzību ar TE proteīnus kodējošiem domēniem, kas norāda, ka izolētie fragmenti tomēr saturēja retrotranspozonu sekvences. Dažas sekvences uzrādīja līdzību ar skujkoku BAC sekvencēm, kuru analīzes rezultātā identificēja retrotranspozoniem līdzīgas struktūras. Šķelto un attīrīto fragmentu koncentrācija bija pārāk zema, lai visus iegūtos fragmentus varētu ieklonēt un pavairot un iegūtu sekvenču salikšanai nepieciešamo fragmentu pārklājumu. Izolējot fragmentus no gDNS var iegūt ne tikai mērķa sekvenci, bet arī līdzīga garuma nesaistītas sekvences, īpaši ja analizē sugu ar lielu genomu kā priedei. Tāpēc, ļoti iespējams, ka iegūtie fragmenti saturēja ne tikai pilna garuma retrotranspozona sekvenci, bet arī genomisku sekvenci starp dažādiem elementiem, vai arī starp vienu LTR un elementu, vai diviem izkaisītiem LTR. Tāpat, daži no identificētiem retrotranspozoniem varētu būt pārāk gari, lai tos izolētu ar garās distances PĶR metodi. Lai gan ar šo metodi neizdevās sekvenēt pilna izmēra retrotranspozonu sekvences, kā bija plānots, identificēja sekvences, kas uzrādīja līdzību ar skujkoku BAC sekvencēm, kas veicināja turpmāku TE-konstruktu identificēšanu un homologu izolēšanu no *P.sylvestris* genoma.

### 3.4.2. Homologo TE izolēšana

Paraugiem no kukaiņu invāzijas ietekmes un hormonu apstrādes nespecifiskas iPBS amplifikācijas rezultātā ieguva vairākus transkriptus, kas nukleotīdu līmenī līdzinājās *Ogre* elementa dažādiem domēniem. No literatūras avotiem ir zināms, ka zirņu genomā *Ogre* elements ir transkripcionāli aktīvs un ir 22 kb garš (Neumann *et al.* 2003). Lai pārbaudīt, vai *Ogre* RE homologs ir arī *P.sylvestris* genomā, nolēma izolēt šī RE homologa daļas no *P.sylvestris* gDNS. Šīm mērķim izveidoja specifiskus praimerus katram no izolētiem domēniem, pieņemot, ka transkripti veidojās no pilna izmēra retrotranspozona. Pielietojot 3. stratēģiju, kas aprakstīta Materiālu un metožu sadaļā 2.2.2., ar specifiskiem praimeriem no gDNS izolēja 11 sagaidāmā lieluma fragmentus, taču šie fragmenti neuzrādīja līdzību ar *Pisum sativum* vai *Medicago truncatula* *Ogre* elementu daļām vai sekvenēto transkriptu daļām no *P.sylvestris*, kā bija sagaidāms. Arī datubāzēs šie fragmenti nav anotēti un nav sastopami arī starp BAC sekvencēm. Savā starpā fragmenti nepārklājas. Iespējams, ka, lai gan priežu hermesa invāzijas rezultātā un hormonu apstrādē izolētie fragmenti līdzinās viena TE *Ogre* dažādiem domēniem, šie fragmenti reprezentē dažādus elementus priedes genomā un nejauši katrs no tiem līdzinās kādam no *Ogre* domēniem. Tāpat, iespējams, ka nefunkcionālā elementa daļas atrodas ekspresēto gēnu nekodējošos reģionos (UTR vai

intronu sastāvā). Ar reālā laika PQR reakciju neizdevās detektēt šo fragmentu ekspresiju. Ekspresijas līmenis stresam pakļautajos augos *Ogre*-līdzīgiem transkriptiem bija detektēts kā ļoti zems, bet kontrolē ekspresija nebija detektējama, tādēļ ekspresijas līmeni nevarēja salīdzināt un standartizēt. Tāpat, praimeru ir konstruēti RE homologam rajonam un var būt komplementāri vairāku TE ģimenēm, bet pat vienas ģimenes TE bieži vien satur polimorfismus. Tādēļ amplificēto fragmentu kušanas līkne saturēja vairākus pīkus. Priežu hermesa invāzijas rezultātā visi pētāmie stādi gāja bojā, tādēļ, lai palielinātu metodes jutīgumu, nevarēja atkārtoti izolēt pietiekamu daudzumu RNS parauga. *Ogre* transkripcionāli aktīvā homologa esamība parastās priedes genomā paliek nezināma, taču šajā pētījumā iegūtie dati norāda uz nefunkcionālu elementu daļu nejaušu transkripciju himēru molēkulu sastāvā.

Zinot, ka vairākiem TE ir monofilētiska izcelsme, praimerus piemeklēja triju identificēto homologu (*Angela*, *Copia-18\_BD-I*, *Gypsy-3\_HV*) TE sekvencēm (2. stratēģija). Taču tādā veidā arī neizdevās iegūt TE sekvences daļas, kas liek secināt, ka parastās priedes TE ir atšķirīgi. Bet transkripti, kas uzrāda augstu līdzību nukleotīdu sekvencu līmenī segsēkļu TE, nereprezentē homologa TE transkripciju. Augsti homologu transkripti ar līdzību LTR var būt evolucionāri veci elementi, kuriem saglabājās ekspresijas iespēja un nozīme šādām sekvencēm var būt tikai vienā konkrētā lokusā. Piemēram, SA16 uzrādīja augstu līdzību ar *Angela* (TREP1602) LTR. Analizējot *Angela* struktūru un priedes homologā rajona atrašanās vietu tajā, piemeklēja vienu praimeru *Angela* RT-RH domēnā, bet otru priedei identificētajā sekvencē, kas līdzinās šim retrotranspozonomam. No priedes gDNS izolēja sagaidāmā garuma amplifikācijas produktu (857 bp). Taču tā sekvenca nesakrīt ne ar *Angela* elementu (pat daļēji, jo praimeriem bija jāamplificē arī nelielu priedei homologu fragmentu), ne ar kādu no datubāžu sekvencēm. Līdzīgi rezultāti novēroti ar *Copia-18-BD* un *Gypsy-3\_HV* amplifikācijas produktiem.

### 3.4.3. TE izolēšana izmantojot BAC sekvencu analīzi

Tikai izmantojot 1. stratēģiju izdevās noskaidrot atrasto diferenciāli ekspresēto fragmentu avotu un atrast homologu RE *P.sylvestris* genomā. Analizējot diferenciāli ekspresētus fragmentus pamanīja, ka daži no tiem uzrāda augstu līdzības pakāpi skujkoku BAC sekvencēm, arī ja netika atrasta līdzība citās TE sekvencu datubāzēs. Piemēram, fragments T50 līdzinājās *Pinus taeda* BAC sekvencei PT\_7Ba4363K13 (AC241358.1), taču fragments T50 ir pārāk īss (770 bp), lai konstatēt jauna elementa LTR sekvences. Kā arī T50

var neatrasties poliproteīnu kodējošā retrotranspozona daļā, tāpēc nav iespējams konstatēt to līdzību ar retrotranspozonu. Taču, analizējot sīkāk garāku BAC sekveni, gadījumā, ja transkripts reprezentē retrotranspozona daļu, tai var atrast retrotranspozonom konservatīvus struktūrelementus. BAC sekvenšu analīze ir vispārzināma metode jaunu retrotranspozonu identificēšanā. Ņemot vērā, ka skujkoku genomi raksturojas ar augstu kolinearitātes pakāpi kā gēnu, tā arī nekodējošo lokusu gadījumā, ir iespējams identificēt jaunus elementus. Tā, T50 līdzīgai *Pinus taeda* BAC sekvencai identificēja LTR, bet iekšējā sekvence līdzinājās TE sekvenču datubāzēs ar dažādu elementu domēniem translēto nukleotīdu līmenī. Tas nozīmē, ka nukleotīdu sekvence dotajam elementam nav līdzīga nevienam no datubāzē aprakstītam elementam, taču translētās nukleotīdu sekvences polipeptīds satur konservatīvus domēnus, kas ir raksturīgs aprakstītu retrotranspozonu kodētiem proteīniem. Šāda veida transponējamo elementu detektēšana, kas ir balstīta uz strukturālo motīvu identificēšanas, ir aprakstīta Wicker et al. (2007) publikācijā un šīs metodes shēma ir sniegta šī darba 2.1.6. nodaļā (17. att.).

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
RScxxx0  AGCTTGGGTAAGCAGATGTTCTTACTTGGGTTCACTTAACTAATAACAATTATACATATGGGGATCAATTAAGGATTAAGTGAATTCATATCCAA
Ssl_2n_pilna_rc  AGGCTGGGTAGCAGATGTTCTTACTTGGGTTCACTTAACTAATAACAATTATACATATGGGGATCAATTAAGGATTAAGTGAATTCATATCCAA
Consensus  AGGCTGGGTAGCAGATGTTCTTACTTGGGTTCACTTAACTAATAACAATTATACATATGGGGATCAATTAAGGATTAAGTGAATTCATATCCAA
110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
RScxxx0  ACATAACCGATGCTATAAAGCGAATATAAGCGAAGATGAGAAATCTCTCTTTATATGTAATTCGGATTAATACAGACTCGAAGCCCTCTGG
Ssl_2n_pilna_rc  TATAAT--AGATGCATAAATAGGAATAAATAGCGAAGATGAGAAACATCTCTTTATATGTAATTCGGATTAATACAGACTCGAAGCCCTCTGG
Consensus  AAAAAA--AGATGCATAAAGCGAATAAATAGCGAAGATGAGAAAAATCTCTTTATATGTAATTCGGATTAATACAGACTCGAAGCCCTCTGA
210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
RScxxx0  CACTCACTTCAAGGGTCTGCACACTCTGCTGTGACTTCTAGGCTCTGTGCACTCAGCTGTAGGGGTCTGGCACTTACTGTGGACTTTAGGCTC
Ssl_2n_pilna_rc  CACTCACTTCAAGGGTCTGCACACTCTGCTGTGACTTCTAGGCTCTGTGCACTCAGCTGTAGGGGTCTGGCACTTACTGTGGACTTTAGGCTC
Consensus  CACTCACTTCAAGGGTCTGCACACTCTGCTGTGACTTCTAGGCTCTGTGCACTCAGCTGTAGGGGTCTGGCACTTACTGTGGACTTTAGGCTC
310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
RScxxx0  TTGGACTCAGCTGAGAGCTTACTTACTGACTGAGCTAAGAACTAGACTTACTTCTGAGACTTATCTGATACATCTTGGACTTCTCTCTTCTT
Ssl_2n_pilna_rc  TTGGACTCAGCTGAGAGCTTACTTACTGACTGAGCTAAGAACTAGACTTACTTCTGAGACTTATCTGATACATCTTGGACTTCTCTCTTCTT
Consensus  TTGGACTCAGCTGAGAGCTTACTTACTGACTGAGCTAAGAACTAGACTTACTTCTGAGACTTATCTGATACATCTTGGACTTCTCTCTTCTT
410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
RScxxx0  TGAATTCCTTCTCTTAACTAGACTTAGAGCTTAGCTCTATTTAGAAATTCAGAGCTTGGCT--AGCATGGGTAGATGTTTATCAACTGACATTCACAT
Ssl_2n_pilna_rc  TGAATTCCTTCTCTTAACTAGACTTAGAGCTTAGCTCTATTTAGAAATTCAGAGCTTGGCT--AGCATGGGTAGATGTTTATCAACTGACATTCACAT
Consensus  TGAATTCCTTCTCTTAACTAGACTTAGAGCTTAGCTCTATTTAGAAATTCAGAGCTTGGCT--AGCATGGGTAGATGTTTATCAACTGACATTCACAT
510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
RScxxx0  TTCAAATAAGGGTGCAC--CGTATGCTTTTACAGGATGCGCCCTCCCGCAC--AAATCCGGG
Ssl_2n_pilna_rc  ATGAAAATAGGGTGCAC--CGTATGCTTTTACAGGATGCGCCCTCCCGCAC--AAATCCGGG
Consensus  ATGAAAATAGGGTGCAC--CGTATGCTTTTACAGGATGCGCCCTCCCGCAC--AAATCCGGG
610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
RScxxx0  GCTTTACTTTTGA--TACAAATTGAC--AGTATGGTTTCTAAAG--CCCAAACCTGCTGGGGATCCCGCCCAACAGGGCCCCCAACATTAACA
Ssl_2n_pilna_rc  GCTTTACTTTTGA--TACAAATTGAC--AGTATGGTTTCTAAAG--CCCAAACCTGCTGGGGATCCCGCCCAACAGGGCCCCCAACATTAACA
Consensus  GCTTTACTTTTGA--TACAAATTGAC--AGTATGGTTTCTAAAG--CCCAAACCTGCTGGGGATCCCGCCCAACAGGGCCCCCAACATTAACA
710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
RScxxx0  TTG--GACTCCGCTCGAGTCACTTTCCAGGTGTGAGATCTTAGGCGAGAGACTTCCCACTCGCTTTGATCAGCCGACATTTGACAGCCATTTGAGGG
Ssl_2n_pilna_rc  TTG--GACTCCGCTCGAGTCACTTTCCAGGTGTGAGATCTTAGGCGAGAGACTTCCCACTCGCTTTGATCAGCCGACATTTGACAGCCATTTGAGGG
Consensus  TTG--GACTCCGCTCGAGTCACTTTCCAGGTGTGAGATCTTAGGCGAGAGACTTCCCACTCGCTTTGATCAGCCGACATTTGACAGCCATTTGAGGG
810      820      830      840      850      860      870      880      890      900
RScxxx0  GGGGCTTGTGGACTTATGCACTTCTGGTGGTGGAGCG---TGTGAACTGCTATTTGAAATATCTGCGAGCTGCTGAGCTTTGGAGCTTTT
Ssl_2n_pilna_rc  GGGGCTTGTGGACTTATGCACTTCTGGTGGTGGAGCG---TGTGAACTGCTATTTGAAATATCTGCGAGCTGCTGAGCTTTGGAGCTTTT
Consensus  GGGGCTTGTGGACTTATGCACTTCTGGTGGTGGAGCG---TGTGAACTGCTATTTGAAATATCTGCGAGCTGCTGAGCTTTGGAGCTTTT
910      920      930      940      950      960      970      980      990      1000
RScxxx0  CTTTAAAGAGGCTATGATGCGGTAAAGCTGTGATGCACTGCTTATGAGCTGCTTTTAAAGCTGCTTCTTATGCGAGGCTATCCCACTTCTCTCT
Ssl_2n_pilna_rc  CTTTAAAGAGGCTATGATGCGGTAAAGCTGTGATGCACTGCTTATGAGCTGCTTTTAAAGCTGCTTCTTATGCGAGGCTATCCCACTTCTCTCT
Consensus  CTTTAAAGAGGCTATGATGCGGTAAAGCTGTGATGCACTGCTTATGAGCTGCTTTTAAAGCTGCTTCTTATGCGAGGCTATCCCACTTCTCTCT
1010     1020     1030     1040
RScxxx0  TAGGCGCTTGGCTCTTGGAGCTGCTGAGCTTTGTGAAAGGCAACCGTA
Ssl_2n_pilna_rc  TAGGCGCTTGGCTCTTGGAGCTGCTGAGCTTTGTGAAAGGCAACCGTA
Consensus  TAGGCGCTTGGCTCTTGGAGCTGCTGAGCTTTGTGAAAGGCAACCGTA

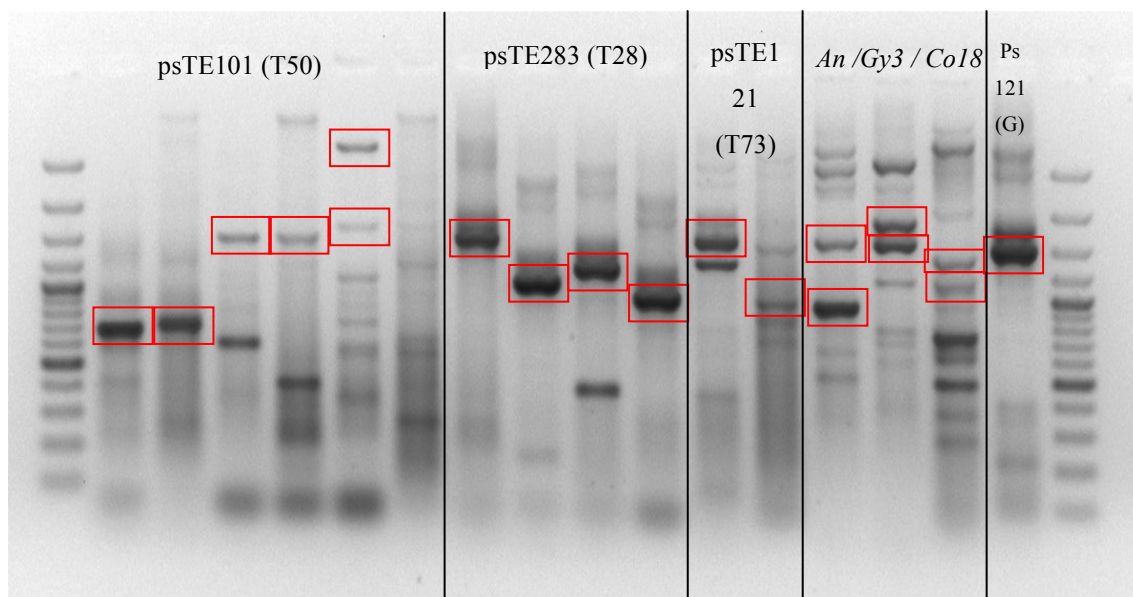
```

34. attēls. *P.taeda* un *P.sylvestris* hipotētiska *ptTE101* retroelementa sekvenču salīdzināšana.

Tādā veidā no skujkoku BAC sekvencēm tika identificētas triju hipotētisku pilna izmēra LTR TE struktūras, kuras tika analizētas un šo elementu homologi arī ir sekvenēti no *P.sylvestris* genoma. Izveidotie praimeru rezultējās ar sagaidāmā garuma produktu izolēšanu un homologās sekvences iegūšanu no gDNS. Izmantojot tos pašus praimerus, izdevās arī

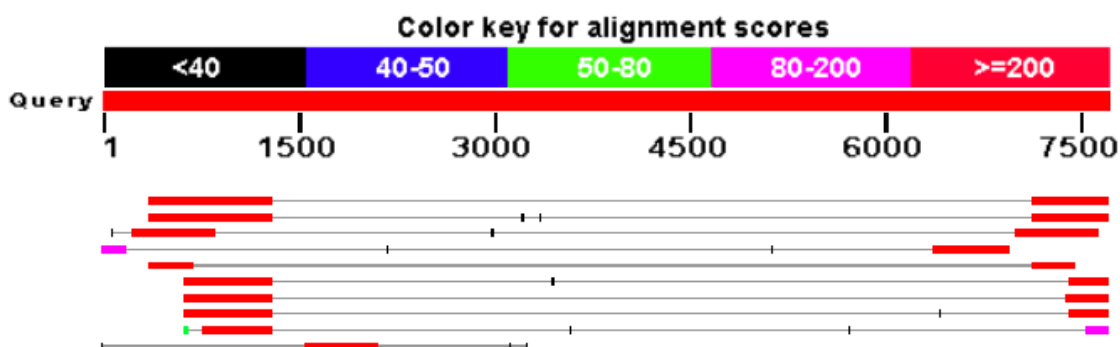


amplificēt un nosekvenēt sagaidāmā garuma fragmentus no cDNS (34., 35. attēli). Visi fragmenti bija sagaidāmajā lielumā. 35. attēlā redzami izolēti fragmenti ar TE sekvencēm specifiskiem praimeriem. TE101 (T50), TE283 (T28) un TE121 (T73) gadījumā domēni saturēja homologu TE sekvenci, bet *Angela*, *Gypsy-3* un *Copia-18-BD* gadījumā saturēja anonīmās sekvences.



35. attēls. Retrotranspozonu domēnu izolēšana no karstuma stresam pakļautā rameta eksperimentālā cDNS. (*An*)- *Angela*, (*Gy3*)-*Gypsy-3*; (*Co18*)- *Copia-18-BD*.

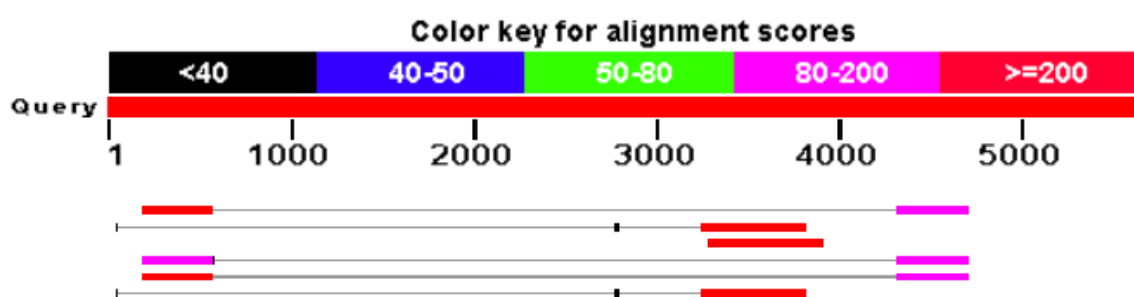
LTR TE līdzīgu struktūru ptTE101 (ar līdzību T50) ir identificēts *Pinus taeda* BAC sekvencē PT\_7Ba4363K13 (AC241358.1). ptTE101 *P.taeda* genomā ir 7697 bp garš, ar 949 bp gariem LTR ar 87% savstarpēji identiskiem nukleotīdiem un 5'-TG/ 3'CA LTR galos. Identificēts TSD, kas ir 7 bp 5'-CATCATTT-3'. Šīs struktūras pilna izmēra anotēti homologi nav starp TE datubāzes ierakstiem, bet EST datubāžu analīze parāda, ka *P.taeda*, *P.contorta* un *Picea glauca* ir atrodami transkripti līdzīgi TE iekšējai sekvencei.



36. attēls. *P.sylvestris* sekvenēto daļu pārklājums ar ptTE101 struktūru.

No gDNS un cDNS izolētas desmit LTR sekvences, kas bija homologas TE101 par 74-81% (34., 36. attēli). Analīze *Repbase* atrada līdzību ar dažādu TE daļām, kā arī vāju RT/RH domēna līdzību nukleotīdu līmenī ar *Gypsy-18\_SMo-I* no *Selaginella moellendorffii*, kas ir senākais vaskulāro augu pārstāvis. BLASTX TREP datubāzē atrasta līdzība ar *BAGY-2* poliproteīnu (PTREP241), 36% identisku aminoskābju un 58% vienlīdzīgu aminoskābju, 183 nukleotīdu sakrītību vērtību un e-vērtību  $2e-47$ . 4699-5481 pozīcijā pirms RT domēna atrodas int homologs rajons, kurš līdzinās *BAGY-2* un *Calypso-5* int domēniem proteīnu līmenī, kas norāda, ka šis elements pieder *Copia* virsgimenei.

Līdzīgi kā ar iepriekš aprakstīto retrotranspozona identificēšanu, ptTE121 (T73) retrotranspozonom līdzīgs konstrukts ir identificēts *P.taeda* PT\_7Ba3500G20 (AC241315) sekvencē, kas bija līdzīga no cDNS izolētam fragmentam *pT73*. TE121 ir 5631 bp garš ar 1536 bp LTR, un 2558 bp iekšējo sekvenci. LTR ir homologu viens otram par 89%, tie ir norobežoti ar 5'TG/3'CA sekvencēm, TE ir 5 bp TSD 5'- AACCC-3'. LTR satur interesantu poli-G mikrosatelītu (14bp) 5' rajonā. Identificēšanas laikā tam netika atrastas homologas sekvences TE sekvenču datubāzēs, taču 2013. gada 22. aprīlī publicētā sekvence *PtCumberland\_I* (Wegrzyn, *Repbase*) ar 72% pārklājuma rajonos līdzinās ptTE121, kā arī *PtCumberland\_I* satur vairākas lielas delēcijas. ptTE121 satur visas transkripcijai un translācijai nepieciešamās regulatīvās sekvences (uORF, IRES (*Internal Ribosome Entry Site*), TATA, poliadenilēšanas motīvu). ptTE121 komplementārajā ķēdē atrodas četri ORF, kuri līdzinās dažādiem TE poliproteīniem. Izdevās iegūt no cDNS psTE121 LTR un 3' iekšējās daļas sekvenci (37. attēls).

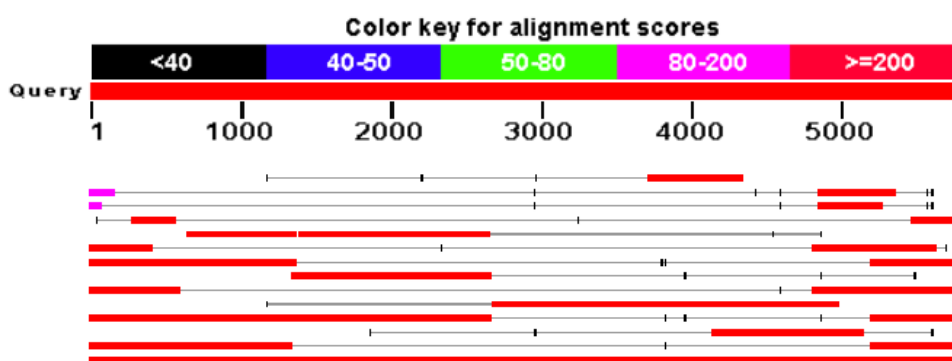


37. attēls. *P.sylvestris* sekvenēto daļu pārklājums ar *ptTE121* struktūru.

Tāpat retrotranspozoniem-līdzīga struktūra atrasta analizējot fragmentus, iegūtos pēc pilna izmēra TE izolēšanas ar garās distances PĶR. Piemēram, analizējot identificētās sekvences psTE283 fragments darba izstādāšanas gaitā neuzrādīja līdzību ne ar vienu retrotranspozonu datubāzēs, bet līdzinājās ar 77% nukleotīdu identitāti *Picea glauca* BAC

sekvencai, kuru analizējot atrada LTR retrotranspozonomu līdzīgu struktūru. Izdevās identificēt kodējošos domēnus tikai ar EST datubāzes palīdzību kombinācijā ar ORF meklēšanas rīku, kas norāda, ka šis elements ir specifisks skujkokiem. Piemeklēja praimerus kodējošiem domēniem un no cDNS ieguva šī retrotranspozona daļas (35. attēls), kas sakrīt ar homologu *P.glauca* struktūru. Katrai retrotranspozona daļai amplificētie fragmenti bija polimorfi, kas liecina par vairāku elementu transkribēšanos no dažādiem parastās priedes genoma lokusiem. Šī elementa sekvenca līdzinās gan karstuma stresa rezultātā izolētajam T28 fragmentam, gan ar garās distances PĶR izolētajam fragmentam. T28 ir tikai 43% līdzīga LTR *Gypsy Geneva* gag domēnam, kas liecina, ka sekvences ar zemu līdzības pakāpi, identificētas pielietojot iPBS metodi, tomēr var norādīt uz transkripcionāli aktīviem elementiem. 2013. gada 18. martā šī TE homologa sekvenca tika publicēta *Pinus taeda* genomam ar nosaukumu *PtAppalachian\_I* (Wegrzyn, *Repubase*).

No *P.sylvestris* karstumam pakļautā eksperimentālā cDNS pa daļām izolēja pilna izmēra psTE283 retrotranspozonu (38. attēls). Tas ir 5796 bp garš ar 615 bp gariem LTR, kuri ir 80% līdzīgi viens otram. Šī homologija līdz galam nav skaidra, jo izolējot sekvences no cDNS iegūst dažādu transkriptu daļas un nav iespējams noteikt katra atsevišķā elementa struktūru. Parasti TE tiek veidota konsensus sekvenca, kas atspoguļo biežāk sastopamos nukleotīdus dažādos sekvenču variantos. Izolētam psTE283 LTR tiek norobežoti ar 5'-TG/CA-3'. 5'LTR ir uORF, IRES, TATA-motīvs (5'-AATAATAAATA-3'), kā arī ir atrasta *P.sylvestris* regulatīvā sekvenca PtMYB4 5'-ACCACCC-3' (e-vērtība=0,007) un četri nezināmi kodola faktoru saistīšanas motīvi. 3'LTR 391 pozīcijā ir poliadenilēšanas motīvs.



38. attēls. *P.sylvestris* sekvenēto daļu pārklājums ar psTE283 struktūru.

psTE283 iekšējās sekvences 3' daļā atrodas polipurīnu motīvs (5'-AAGGGGGGAGGAA-3'). TSSP programma augu polimerāzes II promoteru noteikšanai (Solovyeve, Shakhmuradov 2003) psTE283 prognozē promoteru tikai uz komplementārās ķēdes 5574. pozīcijā (3'LTR).

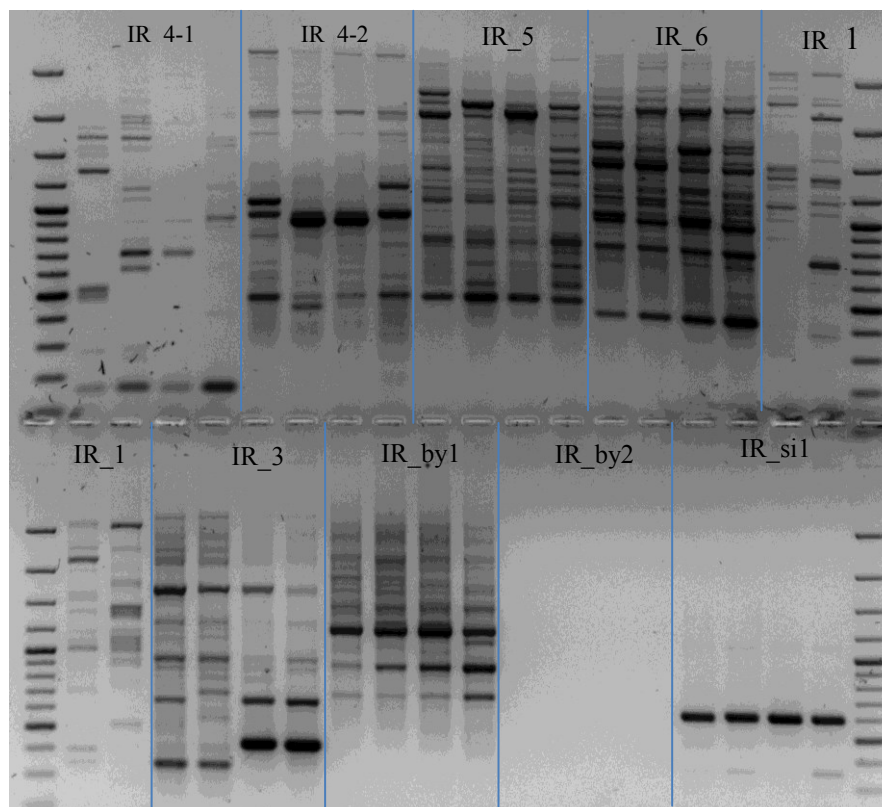


nepārtraukts 584 aa ORF, kas līdzinās TE poliproteīniem, bet otrs ORF ar 375 aa līdzinās gag domēniem. Visticamāk *P.sylvestris* psTE283 ir zaudējis transpozīcijas iespējas, jo tam nav pilna poliproteīna ORF un atrastais RT ORF ir īsāks par *PtAppalachian*. Taču transkripcijas funkcijas, iespējams, ir palikušas vairākām kopijām.

### 3.5. Priedes klonālās un dabīgās daudzveidības analīzes

#### 3.5.1. Atšķirīgos apstākļos augošas priežu populācijas genotipēšana

Izveidoto IRAP retrotranspozoniem-līdzīgo marķieru amplifikāciju pārbaudīja uz priežu gDNS paraugiem (40. attēls), tika atlasīti deviņi marķieri ar augstāko polimorfo lokusu skaitu un labāko amplifikācijas kvalitāti. Deviņu retrotranspozonu marķieru (16. tabula) fragmentu amplifikācija tika salīdzināta starp 150 indivīdiem, novērtējot to sadalījumu pēc elektroforēzes agarozes gēlā ar garuma marķiera sadalījumu.



40. attēls. Retrotranspozoniem specifisko praimeru pārbaudes piemērs izmantojot parastās priedes gDNS paraugus.

Piecus praimerus izveidoja pamatojoties uz karstuma ietekmē identificētiem TE-līdzīgiem fragmentiem (IR\_1, IR\_2, IR\_8, IR\_3, IR\_4), bet četrus uz biotiskā stresa ietekmē

identificētiem TE-līdzīgiem fragmentiem (IR\_5, IR\_6, IR\_9, IR\_7). Izveidojot retrotranspozonu marķierus, tika sagaidīts, ka amplifikācijas fragmentu sadalījums, frekvence vai skaits varētu atšķirties dažādos apstākļos augošajiem indivīdiem. Taču nav zināms, kādi apstākļi priedei ilgtermiņā ietekmē retrotranspozonu aktivēšanos un ekspansiju. Tāpēc tika izvēlēta viena priēžu audze, kur vienas izcelsmes indivīdi aug paugurā, nogāzē un pārpuvojumā.

16. tabula. Konstruēto IRAP marķieru amplifikācijas raksturojums.

Praimeris	Izmantotās sekvenses numurs	Vidējais joslu skaits indivīdam	Polimorfo joslu skaits	Nepolimorfo joslu skaits
IR_1	JZ389987.1	11,60±1,90	12	4
IR_2	JZ390004.1	13,72±9,12	28	0
IR_3	JZ390006.1	8,4±2,56	13	0
IR_4	JZ390009.1	11,26± 3,68	19	1
IR_5	JZ390015.1	13,18±4,18	19	0
IR_6	JZ390027.1	22,20±12,86	37	0
IR_7	JZ390015.1	7,72±1,99	14	0
IR_8	JZ389987.1	9,83±1,13	13	3
IR_9	JZ390027.1	13,07±2,65	19	2

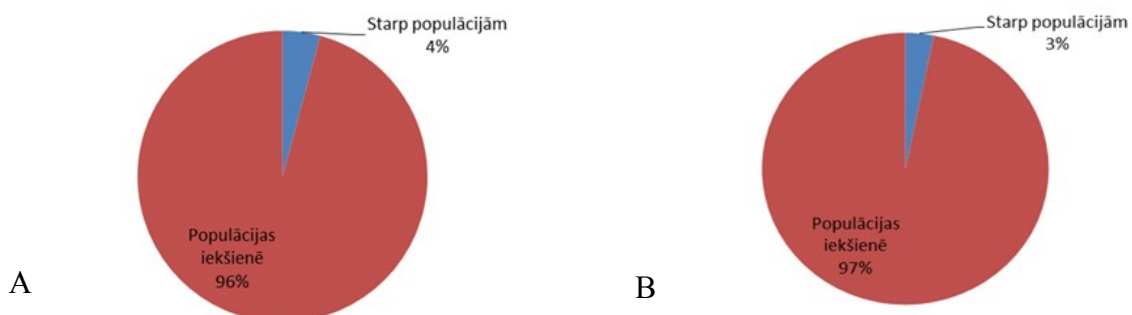
150 priēžu paraugus ieguva no dabiski atjaunojušās populācijas, 50 paraugus ievāca no paugurā augošajiem kokiem, 50- nogāzē augošajiem kokiem un 50- pārpuvojumā augošajiem kokiem. Pamanīja, ka vizuāli pārpuvojumā augošie indivīdi bija tievāki, nekā paugurā un nogāzē augošie, bet citādi koku veselības stāvoklis un attālums starp indivīdiem neatšķīrās. Lai noskaidrotu, vai šī parametru atšķirība ir būtiska starp populācijām, kokiem nomērīja augstumu un diametru (dati nav norādīti), un veica šo mērījumu atšķirību novērtējumu statistisko analīzi (17. tabula). Kā redzams no 17. tabulas, pārpuvojumā augoša populācija būtiski atšķiras gan pēc augstuma, gan pēc diametra rādītājiem no paugura populācijas, gan no nogāzes populācijas. Vai šīs atšķirības ir radušās koku atšķirīgā vecuma dēļ, vai augšanas apstākļu ietekmē nevar spriest, jo nav dokumentācijas par šīs populācijas izcelsmes laiku (nav datu par priedes stādīšanu šajā apgabalā). Koku vecuma noteikšana netika veikta.

DNS ģenētisko analīžu rezultātā ieguva 184 lokusus amplificētus ar deviņiem retrotranspozonu marķieriem (ar IRAP metodi), 1. pielikums; un 33 lokusus ar trijiem SSR marķieriem, 2. pielikums. SSR datus pārkodēja bināro datu veidā. SSR lokusu amplifikācijas

mērķis bija salīdzināt ar retrotranspozonu marķieriem iegūto polimorfismu ar SSR datu rezultātiem, kā vispārpieņemtās metodes daudzveidības pētījumos.

17. tabula. Augstuma (h) un diametra(d) mērījumu statistiskā analīze un salīdzinājums starp trim priedes populācijām. Izmantoti 50 indivīdu mērījumi katrā populācijā augošā paugurā, nogāzē un pārpurvojumā.

Populācija, d (diametrs, cm); h (augstums, cm)	Vidējais aritmētiskais	Vidējā kvadrātiskā novirze	vidējā kvadrātiskā kļūda	Starpība	Vidējā starpības kļūda	Ticamības koeficients
	X <sub>vid</sub>	δ	S <sub>x</sub>	d	S <sub>d</sub>	t>3, būtiska atšķirība
Paugurs-d	247,58	63,3	8,86	12,38 (k-n)	11,53 (k-n)	1,07 (k-p)
Paugurs-h	219,68	26,06	3,65	8,3 (k-n)	5,1 (k-n)	1,62 (k-p)
Nogāze-d	235,2	50,1	7,02	65,56 (n-p)	9,21 (n-p)	<b>7,11 (n-p)</b>
Nogāze-h	211,38	24,45	3,42	51,52 (n-p)	4,83 (n-p)	<b>10,65 (n-p)</b>
pārpurv.-d	169,64	40,58	5,68	77,94 (k-p)	10,74 (k-p)	<b>7,25 (k-p)</b>
pārpurv.-h	159,86	23,4	3,27	59,82 (k-p)	5,00 (k-p)	<b>11,94 (k-p)</b>

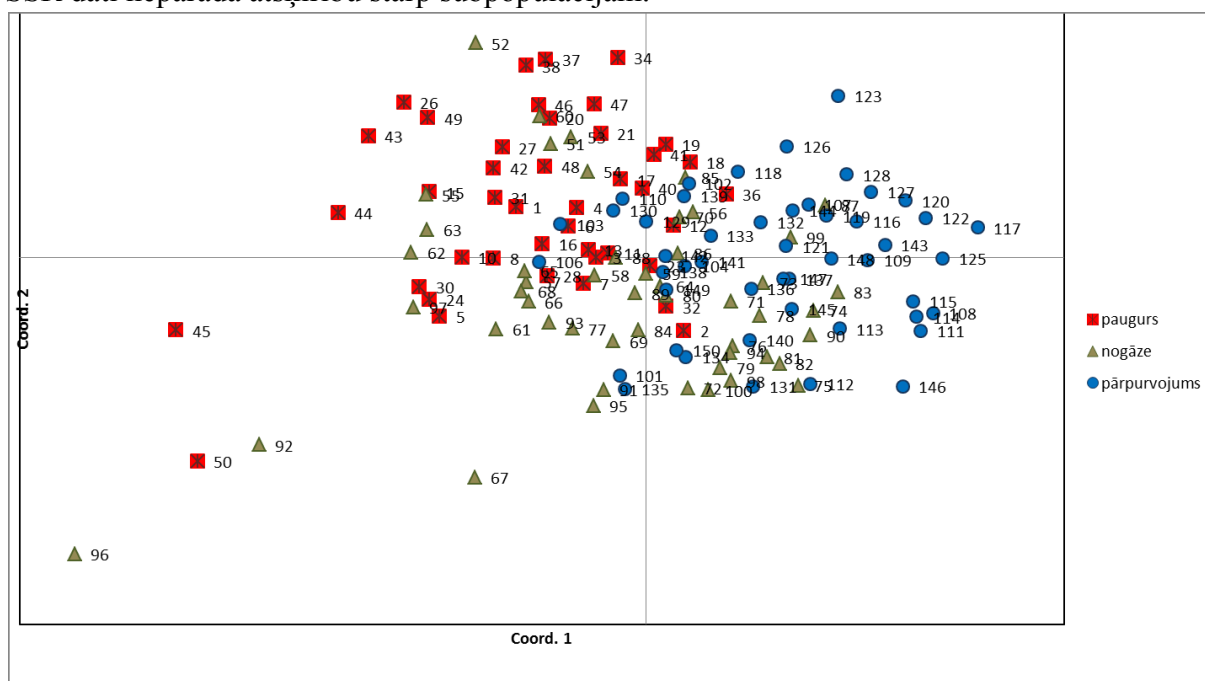


41. attēls. Molekulārās variācijas procentuālā daļa (AMOVA, GenALEx) izmantojot SSR marķieru datus (A) un retrotranspozonu marķieru datus (B).

Vispirms retrotranspozonu marķieru datus šai pašai populācijai salīdzināja ar SSR marķieru datiem. Datu kopu (150) sadalīja atkarībā no analizēto paraugu augšanas vietas trijās populācijās (pa 50 paraugiem): paugurs, nogāze, pārpurvojums. Molekulārās daudzveidības analīze (AMOVA) neatrada būtisku ģenētiskās daudzveidības atšķirību starp populācijām. Salīdzinot ar SSR marķieru datiem, atrastā daudzveidība starp populācijām ar IRAP marķieriem bija nedaudz lielāka, bet šis rezultāts ir sagaidāms, jo marķieru tips, skaits un analizēto lokusu skaits atšķirās (41. attēls). Tāpat, izmantojot IRAP marķierus, paugura

populācijai vidējā sagaidītā heterozigotāte (He) bija nedaudz palielināta (0,344) salīdzinot ar nogāzes (0,304) un pārpurvojuma (0,301) populācijām, bet pēc SSR datiem He variēja minimāli (0,126, 0,117, 0,135). Šie dati liecina, ka pārpurvojumā augoša populācija ir tikpat daudzveidīga un neatšķiras no pārējām.

IRAP datu paraugkopu sadalīja un analizēja pēc izmantotajiem retrotranspozonu praimeriem, pēc praimeru izcelsmes veida (karstums vai biotiskais stress) un pēc augšanas vietas (paugurs, nogāze, pārpurvojums). Visos gadījumos statistiskie rādītāji līdzinājās iepriekš minētajiem, nenozīmīgi palielinājās tikai heterozigotāte (He) paugura populācijai. Izmantojot indivīdu bināro datu ģenētiskās distancēs matricu, veica PCoA testu, kas retrotranspozonu marķieru gadījumā nodalīja paugura augošu populāciju no nogāzes un pārpurvojuma populācijām (42., 43. attēli). PCoA tests veidots uz ģenētisko distancu matricas daudzfaktoru analīzes pamata, norādot būtiskākās variācijas koordinātēs. Pirmās trīs koordinātes izskaidro 56,46% no variācijas starp IRAP datiem, un 61,15% SSR datiem. Taču SSR dati neparāda atšķirību starp subpopulācijām.

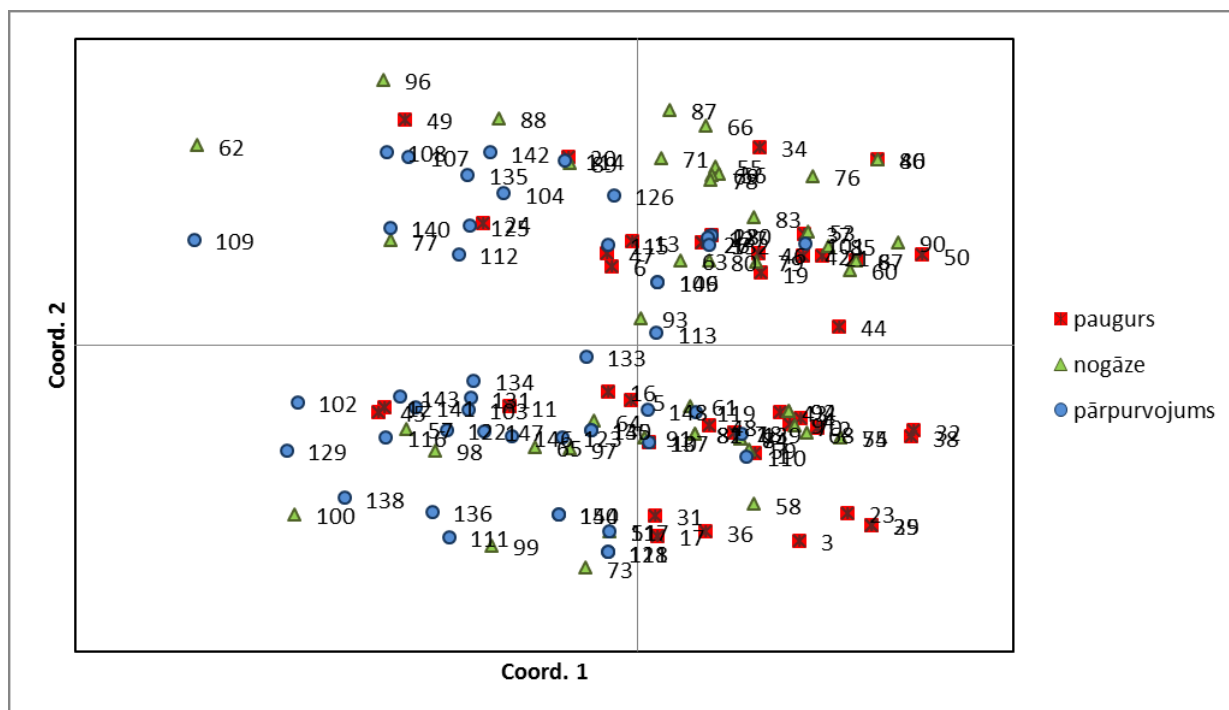


42. attēls. Nespecifisko retrotranspozonu IRAP amplifikācijas datu PCoA tests dabīgi atjaunojušās priedes audzei.

Tika saskaitīts amplificēto fragmentu skaits. Analīzi veica novērtējot noteiktajā populācijā amplificēto fragmentu skaita vidējās aritmētiskās vērtības. Retrotranspozonu marķieru amplifikācijas fragmentu analīzei izmantoja tikai paraugus ar augstas kvalitātes amplifikāciju, tāpēc indivīdu skaits (n) bija atšķirīgs katrai populācijai. Paugurā augošajai



populācijai pētīja 38 paraugus, nogāzē – 44 un pārpurvojumā - 45. Katrai no datu kopām aprēķināja vidējo kvadrātisko novirzi ( $\delta$ ) un vidējo kvadrātisko kļūdu ( $S_x$ ) (18. tabula). Paugura populācijai ievērojami atšķirās gan amplificēto lokusu skaita vidējā aritmētiskā vērtība, gan standartnovirze.

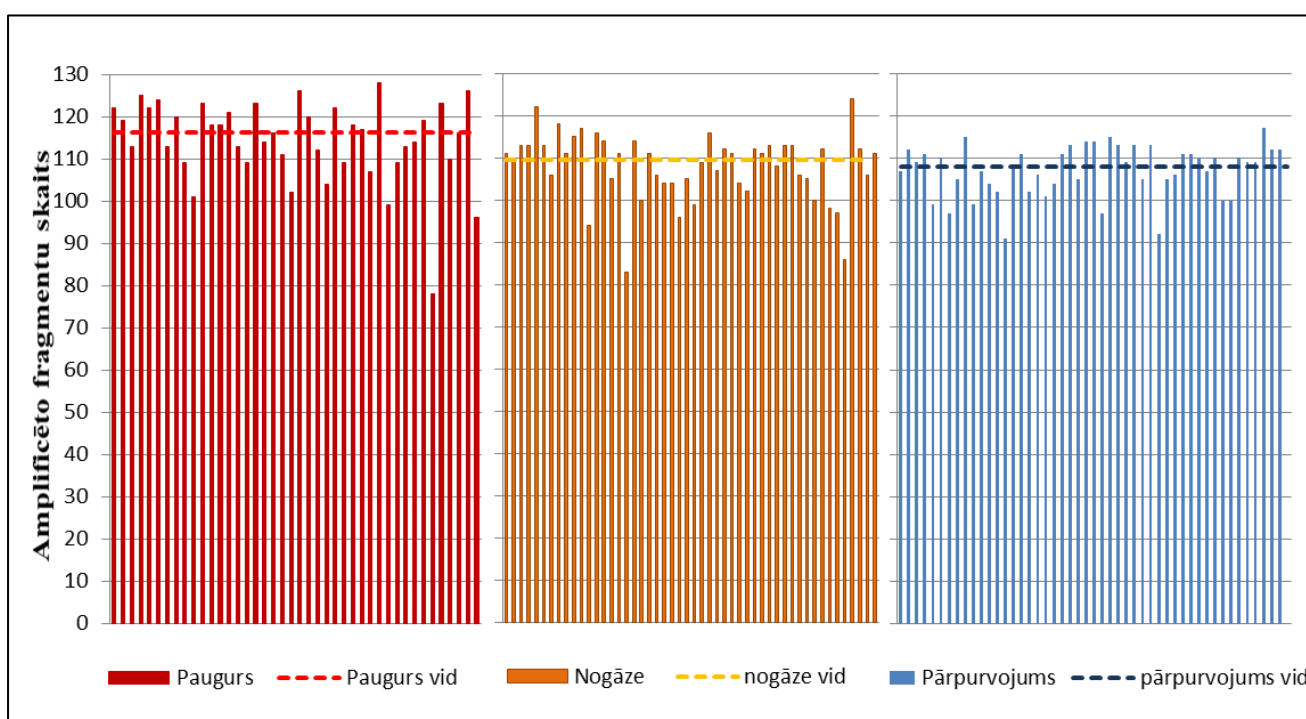


43. attēls. SSR datu analīze ar PCoA testu dabīgi atjaunojušās priedes audzei. Nogāzes un pārpurvojuma populācijām vidējās lokusu skaita vērtības atšķirās standartnovirzes robežās. Lai gan variācija populāciju iekšienē ir augsta (44. attēls), var redzēt, ka amplificēto lokusu vidējais aritmētiskais skaits konstanti pieaug paugurā augošai populācijai veicot līdzīgu statistisku analīzi sadalot datus pēc marķieriem (45. attēls).

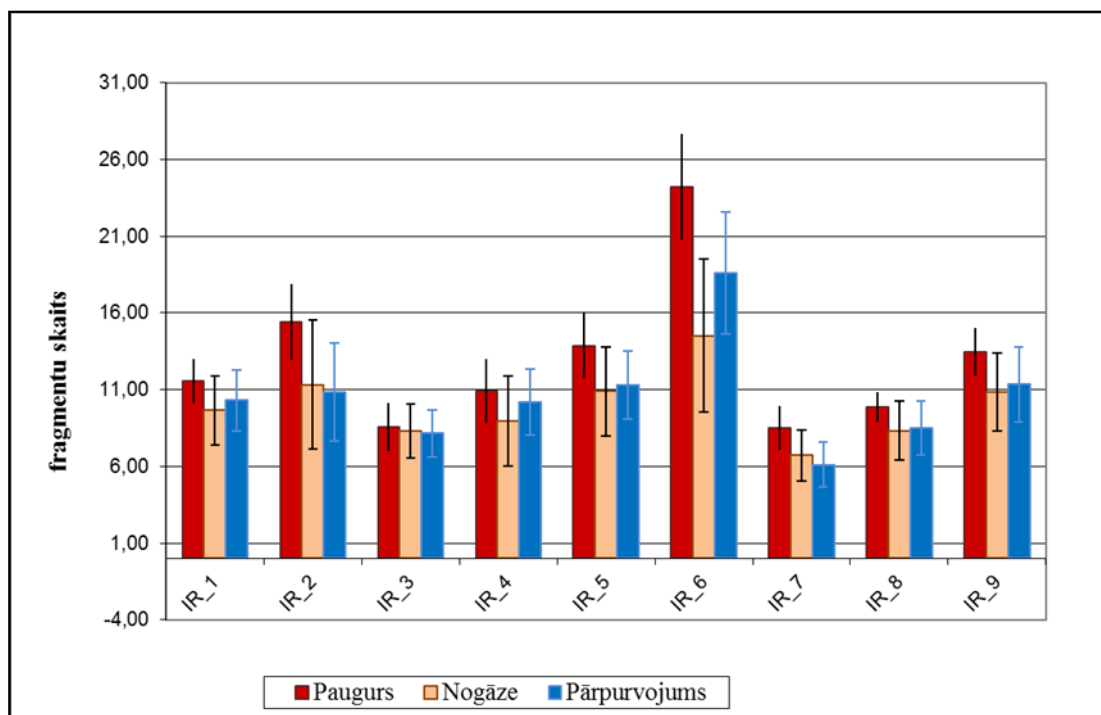
Lai noskaidrotu, vai atšķirība starp paugura un nogāzes/pārpurvojuma populācijām ir būtiska, noteica vidējo vērtību starpību ( $d$ ), šīs starpības vidējo kļūdu ( $S_d$ ) un normēto novirzi ( $t$ ). Starpība starp paugura un nogāzes populācijām ir vienāda ar  $6,78 \pm 1,42$ , bet starp paugura un pārpurvojumu starpība ir  $8,48 \pm 1,34$ . Tā kā ticamības koeficientam vērtības ir lielākas par vērtību trīs (17. tabula), starpību var vērtēt kā būtisku ar varbūtību 99% ( $P=0,01$ ). Papildus tika izmantota arī tiešāka metode, kur tika noteikts F-kritērijs un novērtēta tā vērtība pēc tabulu vērtībām ticamības līmenim  $P=0,05$  un brīvības pakāpei  $df$  (40). Pēc F-kritērija novērtēšanas, paugura un pārpurvojuma lokusu skaita vidējo vērtību starpību var uzskatīt par būtisku, bet atšķirības starp paugura un nogāzes populācijām par nejaušām atbilstoši dotajai ticamības pakāpei (18. tabula).

18. tabula. Retrotranspozonu fragmentu amplifikācijas datu kopas analīzes statistiskie rādītāji. Populācija augoša paugurā (pg), nogāzē (n) un pārpurvojumā (p).

Populācija	Vidējais aritmētiskais	Vidējā kvadrātiskā novirze	vidējā kvadrātiskā kļūda	Starpība	Vidējā starpības kļūda	Ticamības koeficients	F-kritērijs
	Xvid	$\delta$	Sx	$d(X_{vpg}-X_{vn/p})$	Sd (pg-n/p)	$t>3$	$F, P= 0,05, df(40) \geq 1,51$
Paugurs	116,37	6,80	1,10	-	-	-	-
Nogāze	109,59	6,08	0,92	6,78	1,42	4,77	1,25
Pārpurvojums	107,89	5,40	0,80	8,48	1,34	6,33	1,58

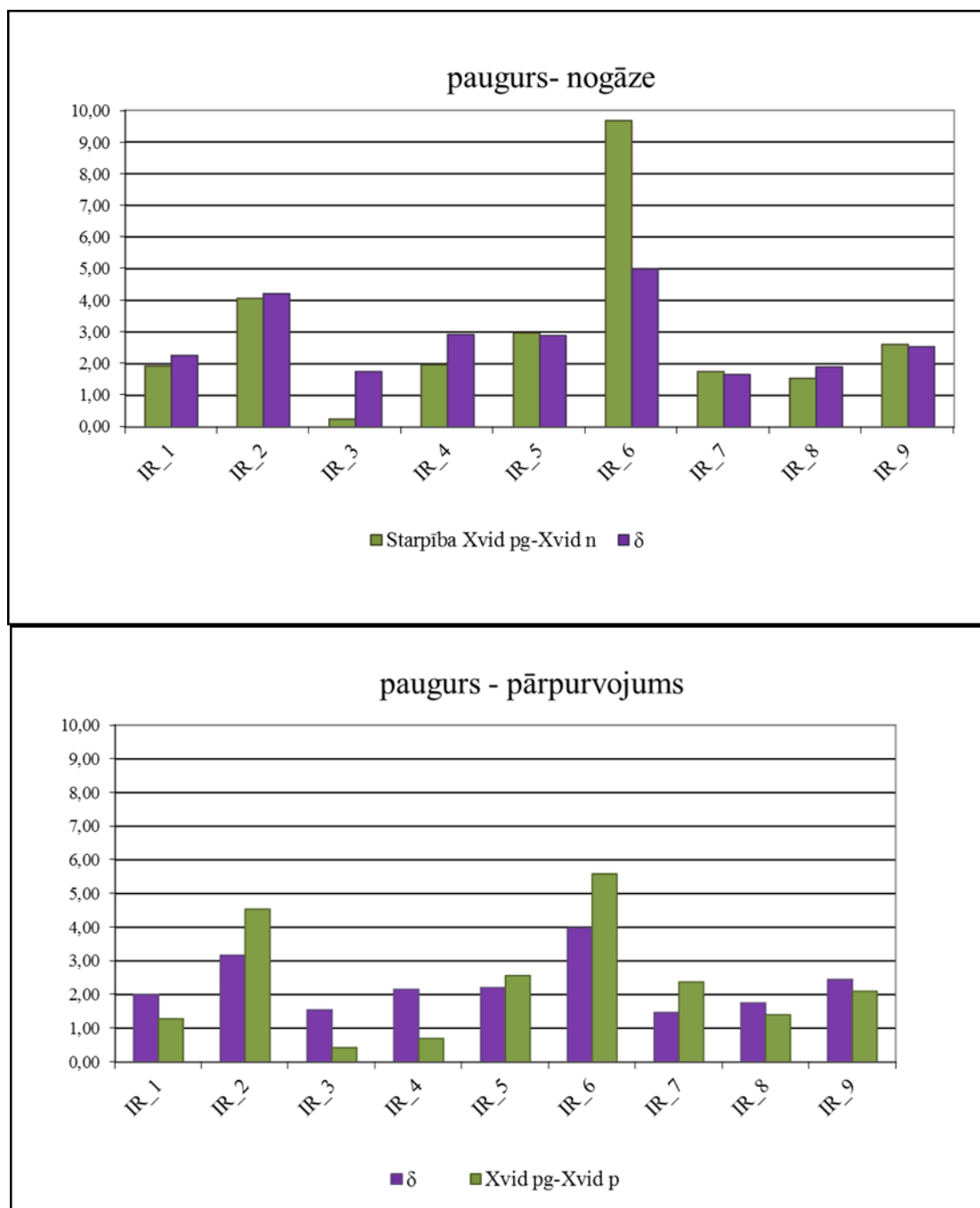


45. attēlā parādīts vidējo lokusu skaita sadalījums katram marķierim. Redzams, ka dažiem marķieriem (IR\_6, IR\_4, IR\_1) amplifikācija pieaug arī pārpurvojuma populācijā. Lai novērtētu starpības būtiskumu, tā tika salīdzināta ar vidējo kvadrātisko novirzi. Jo starpības vērtība vairāk pārsniedz novirzi, jo šīs atšķirības ir būtiskākas (46. attēls). Atšķirības amplifikācijā starp pauguru un pārpurvojumu ir būtiskas marķieriem IR\_2, IR\_7, IR\_5, IR\_6, bet starp pauguru un nogāzi tikai IR\_6.



45. attēls. Retrotranspozonu amplifikācijas lokusu skaita vidējās aritmētiskās vērtības atkarībā no izmantotā marķiera.

Izmantojot jaunizveidotos parastajai priedei specifiskus retrotranspozonu marķierus, dabiskai priedes populācijai tika noteikta augsta ģenētiskās daudzveidības pakāpe, kas bija sagaidāms. Novērtējot fragmentu izplatības atšķirību atkarībā no augšanas apstākļiem, konstatēja būtisku fragmentu skaita pieaugumu kalnā augošajiem indivīdiem. Šajā pētījumā marķieri tika konstruēti, balstoties uz augstas temperatūras un kukaiņu uzbrukuma rezultātā iegūtiem ekspresētiem fragmentiem, bet vērtētas tika mitruma režīma rezultātā iegūtās atšķirības, jo nav iespējams atrast priežu populāciju ar pierādītu konstantu kukaiņu uzbrukumu vai ilgtermiņa klimatiskajām ietekmēm. Karstuma stress ir konservatīvs un plaši sastopams, iespējams tāpēc uz šo stresa veidu reaģējošo mobilo elementu izplatība varētu būt plašāka un atšķirība subpopulāciju vidū varētu būt mazāka. Iespējams, atšķirības nav tik izteiktas arī paraugkopas izvēles dēļ. Tomēr, viens marķieris IR\_2 parāda būtisku atšķirību starp paugura un pārpurvojuma subpopulācijām. Biotiskā stresa marķieru amplificēto fragmentu skaits būtiski pieaug paugurā augošajiem indivīdos. Novērtējot visu datu kopu, konstatēja statistiski ticamu atšķirību retroelementu izplatībā paugurā augošajiem indivīdiem.



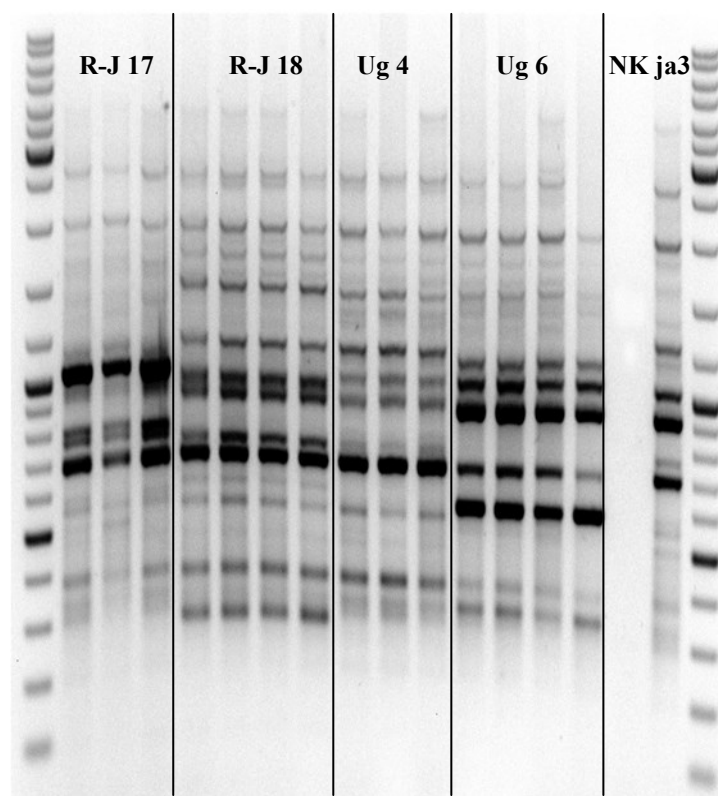
46. attēls. Marķieru amplifikācijas joslu skaita vidējo aritmētisko starpības salīdzinājums ar vidējo kvadrātisko novirzi ( $\sigma$ ).

### 3.5.2. Somaklonālās variācijas novērtēšana

Deviņus izveidotus IRAP praimerus pārbaudīja uz 26 gadus veciem parastās priedes kokiem, kas reprezentē četru klonu rametus augošus dažādās klimatiskajās zonās ierīkotajās plantācijās „Dravas” un „Sāviena”. Pēc SSR datiem rameti neatšķīrās (19. tabula).

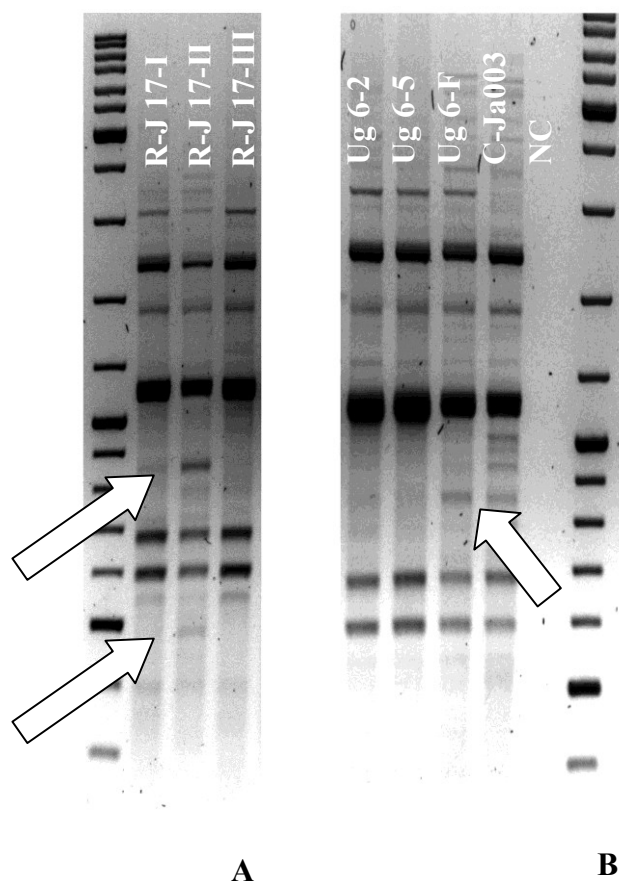
19. tabula. Pārbaudīto rametu nosaukums, ievākšanas plantācija, SSR dati.

Nr.	Rameti	Plantācija	3107		4001		4011	
1	R-J 17-I	Sāviena	164	166	214	216	262	262
2	R-J 17-II	Sāviena	164	166	214	216	262	262
3	R-J 17-3	Dravas	164	166	214	216	262	262
4	R-J 18-1	Dravas	164	164	202	206	260	260
5	R-J 18-2	Dravas	164	164	202	206	260	260
6	R-J 18-F	Sāviena	164	164	202	206	260	260
7	R-J 18-C11	Sāviena	164	164	202	206	260	260
8	Ug 4sv-3	Dravas	164	166	216	228	267	280
9	Ug 4-F	Sāviena	164	166	216	228	267	280
10	Ug 4-E	Sāviena	164	166	216	228	267	280
11	Ug 6m-2	Dravas	158	166	216	216	260	262
12	Ug 6sv-5	Dravas	158	166	216	216	260	262
13	Ug 6-E	Sāviena	158	166	216	216	260	262
14	Ug 6-F	Sāviena	158	166	216	216	260	262



47. attēls. IR\_3 IRAP amplifikācijas produkti parastās priedes rametu gDNS, (NK) negatīvā kontrole, (ja3) gDNS no Ja003 klona.

Astoņiem IRAP marķieriem amplifikācijas produkti bija vienveidīgi (47. attēls), neidentificēja skaidri atšķiramus polimorfus fragmentus. Tikai ar praimeru IR\_2 ieguva polimorfus produktus, kas bija skaidri atšķirami katrai rāmetu grupai (48. attēls).



48. attēls. IR\_7h (T73, Gypsy-I) IRAP amplifikācijas produktu polimorfisms priedes rāmetiem.

(A) R-J 17

(B) Ug 6

Polimorfi produkti novēroti gan „Sāvienas”, gan „Dravas” plantāciju paraugiem no dažādiem rāmetiem. Produktus izolēja un sekvenēja. Izolēja septiņus polimorfus fragmentus, pēc aprakstītā protokola tos ligēja ar plazmīdu un pavairoja *E.coli* šūnās, ieguva 17 sekvences. Visiem fragmentiem to galos atrasts praimeris IR\_2. Ieguva trīs līdzīgas sekvenču grupas un divas individuālās sekvences. Viena no identificēto sekvenču grupām nelīdzinājās nevienam datubāžu ierakstam. Otrās grupas piecas sekvences (869 bp) 3' galā līdzinājās *Gypsy-30 Pab-I* elementa iekšējās daļas 3' galam. Tā kā *Repbases* nav šī elementa LTR, tos izolēja no *Picea glauca* BAC sekvences, bet šī elementa LTR nelīdzinājās nevienai no atrastajām sekvencēm. *Pinaceae* BAC identificētās sekvences bija daļēji līdzīgas *P.taeda* genomiskajai sekvencai. Analizējot šo sekvenču izdevies identificēt divus tiešos atkārtojumus (iespējamus LTR), kas ar 555 bp līdzinās pirmās grupas identificētajām sekvencēm. Šī struktūra pilnībā nelīdzinās nevienam retrotranspozonom datubāzēs, bet daļēji līdzinās (par

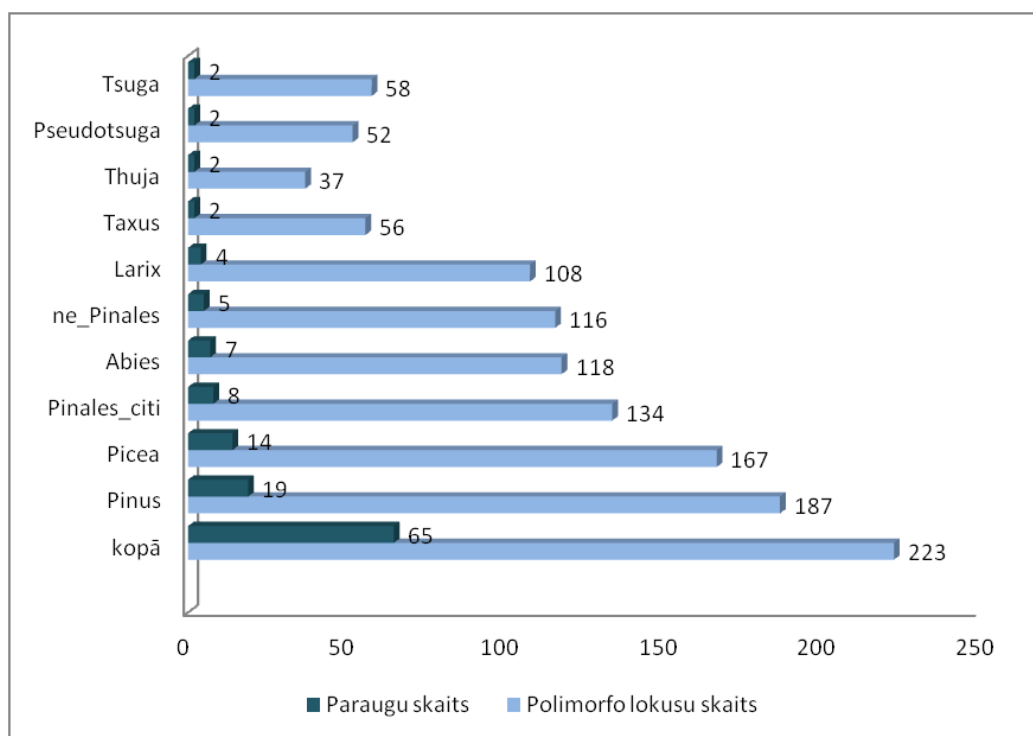
70%) *Copia-17\_PAb-I* (MA\_172979) no *Picea abies* iekšējam domēnam un nelielam LTR rajonam (63 bp). Identificētais *Copia-17-Pab-I* elements ir tikai 4052 bp garš ar 858 bp LTR, pa vidu ir ORF ar vāju līdzību *Copia* poliproteīnam. NCBI datubāzē ir pilnas struktūras līdzība tikai ar sešām *P.taeda* BAC sekvencēm. 17 EST līdzība ir ar struktūras LTR rajoniem, bet 4 EST līdzinās arī iekšējai sekvencei ar zemāku līdzības pakāpi. Vēl vienas grupas sekvences (507 bp) arī līdzinājās *Copia-17-PAb-I* un arī identificētās *P.taeda* struktūras LTR, kur bija līdzīgi 32 bp no fragmenta beigām. Individuālas sekvences nelīdzinājās datu bāzu ierakstiem. Kopumā trīs no sekvenētiem polimorfēm priedes rametu fragmentiem, izgrieztiem no dažādiem kloniem, līdzinājās jaunatklātajai struktūrai, līdzīgai *Copia-17-Pta-I* LTR TE, kura sekvence arī identificēta *P.taeda* BAC. Viena elementa LTR fragmentu identificēšana starp klonu priežu rametiem polimorfēm fragmentiem, var liecināt par nesenu transpozīcijas gadījumu šīs ģimenes elementiem.

### 3.6. Identificēto retrotranspozonu izplatība un daudzveidība kailsēkļos

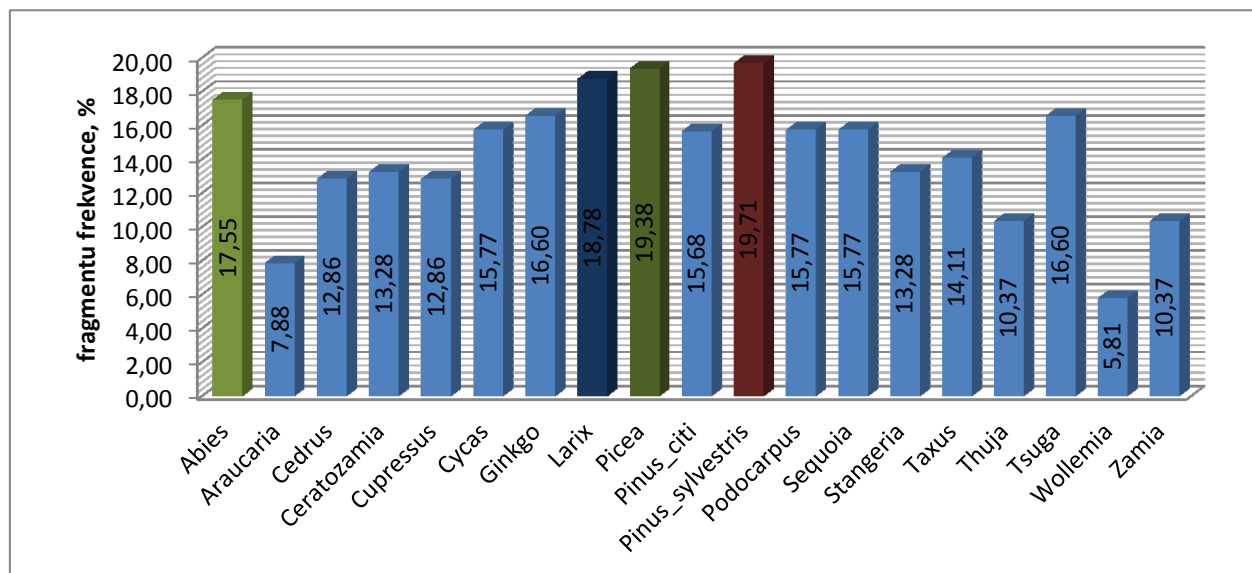
#### 3.6.1. Kailsēkļu filoģenētiskā analīze ar IRAP

60 dažādu sugu kailsēkļu DNS paraugu (ar atkārtojumiem) analīzei izmantoja sešus IRAP marķierus, filoģenētiskā analīzē iekļāva arī četrus parastās priedes paraugus. 241 fragmentu ieguva ar: IR\_2, IR\_5, IR\_6, IR\_4, IR\_1, IR\_3. Vidēji katram indivīdam ieguva 38,8 fragmentus, ar variāciju 134,59 un standartnovirzi 11,6. Datus sagrupēja lielākās grupās pēc piederības ģintij: baltegles (7), egles (14), priedes (19), citi *Pinales* (20) un citi kailsēkļi (5). 223 fragmenti bija polimorfi, nav atrasti fiksētie fragmenti nevienā grupā. Šo datu AMOVA analīze uzrādīja 12,4% variāciju starp grupām un 87,6% variāciju grupu iekšienē. Kailsēkļu ģintis nav pārstāvētas ar vienādu sugu skaitu (49. attēls), tomēr *Thuja* raksturojas ar vismazāko amplificēto polimorfo lokusu skaitu (37), salīdzinot ar līdzīgi pārstāvētiem *Tsuga* (58), *Taxus* (56) un *Pseudotsuga* (52). Pārējām skujkoku ģintīm polimorfo lokusu skaits bija lielāks par 100 un daļēji atkarīgs arī no analizēto paraugu skaita. Fragmentu reprezentācija indivīdā (%) jeb frekvence (50. attēls) ir aprēķināta kā fragmentu skaits indivīdam attiecībā pret kopējo lokusu skaitu reizināts ar 100. Ģintīm sastāvošām no vairākiem paraugiem aprēķināja šo frekvenču vidējo aritmētisko, atdalot *Pinus sylvestris* paraugus atsevišķi no pārējām *Pinus* sugām. Augstākā fragmentu amplifikācija ir parastajai priedei, kuras genomam veidoja marķierus (19,71), tāpat augsta frekvence ir priedei radniecīgajai eglei (19,38). Pārējo

priežu sugu zemāka fragmentu reprezentācija skaidrojama ar vairāku attālu priežu sugu iekļaušanu analīzē (*P.banksiana*, *P.contorta*, *P.pumila*, *P.canariensis*).



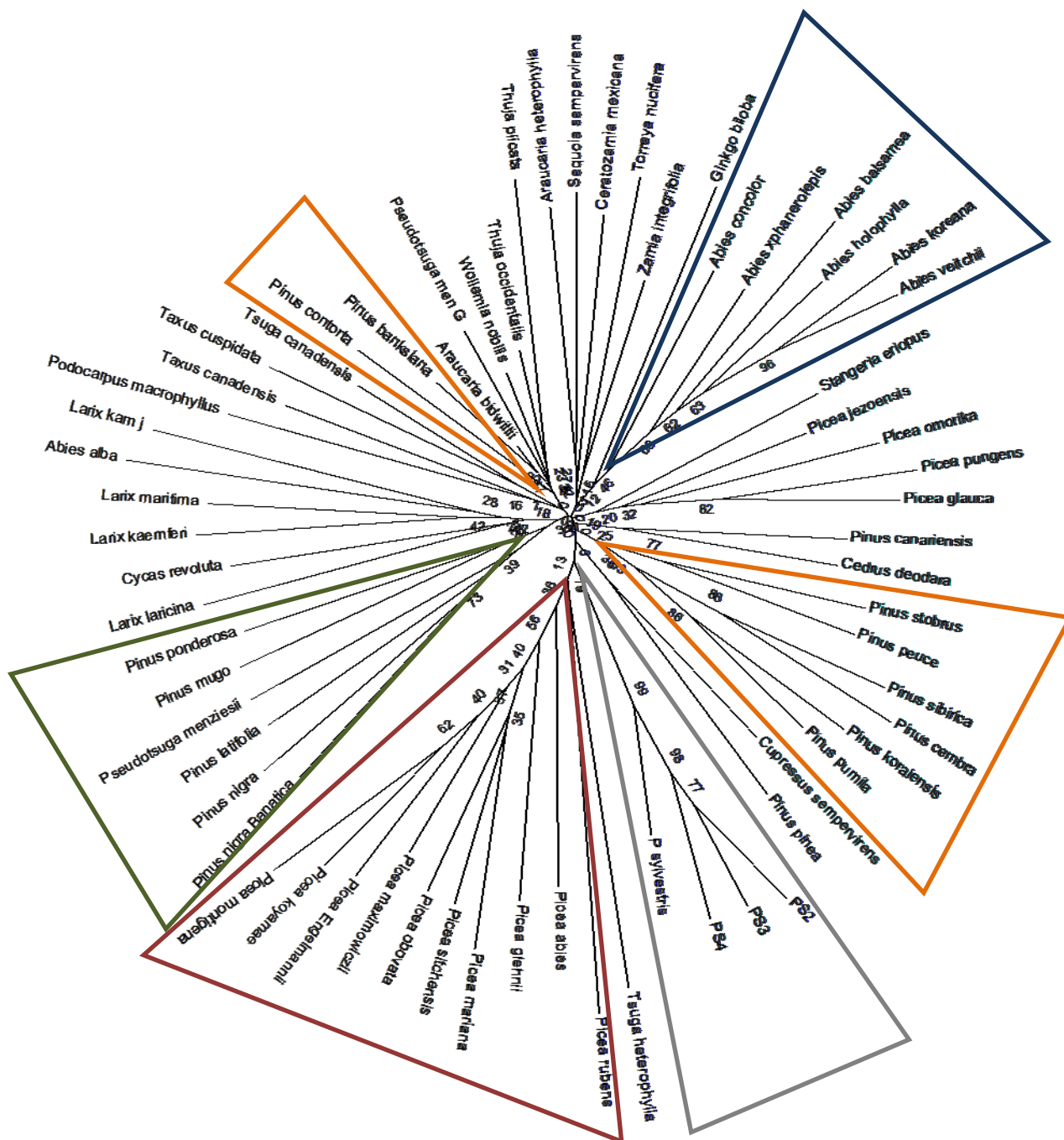
49. attēls. Polimorfo lokusu skaits dažādās kailsēkļu grupās un šo grupu lielums.



50. attēls. Vidējā (kur ir iespējams) un individuālā fragmentu reprezentācijas frekvence, %.



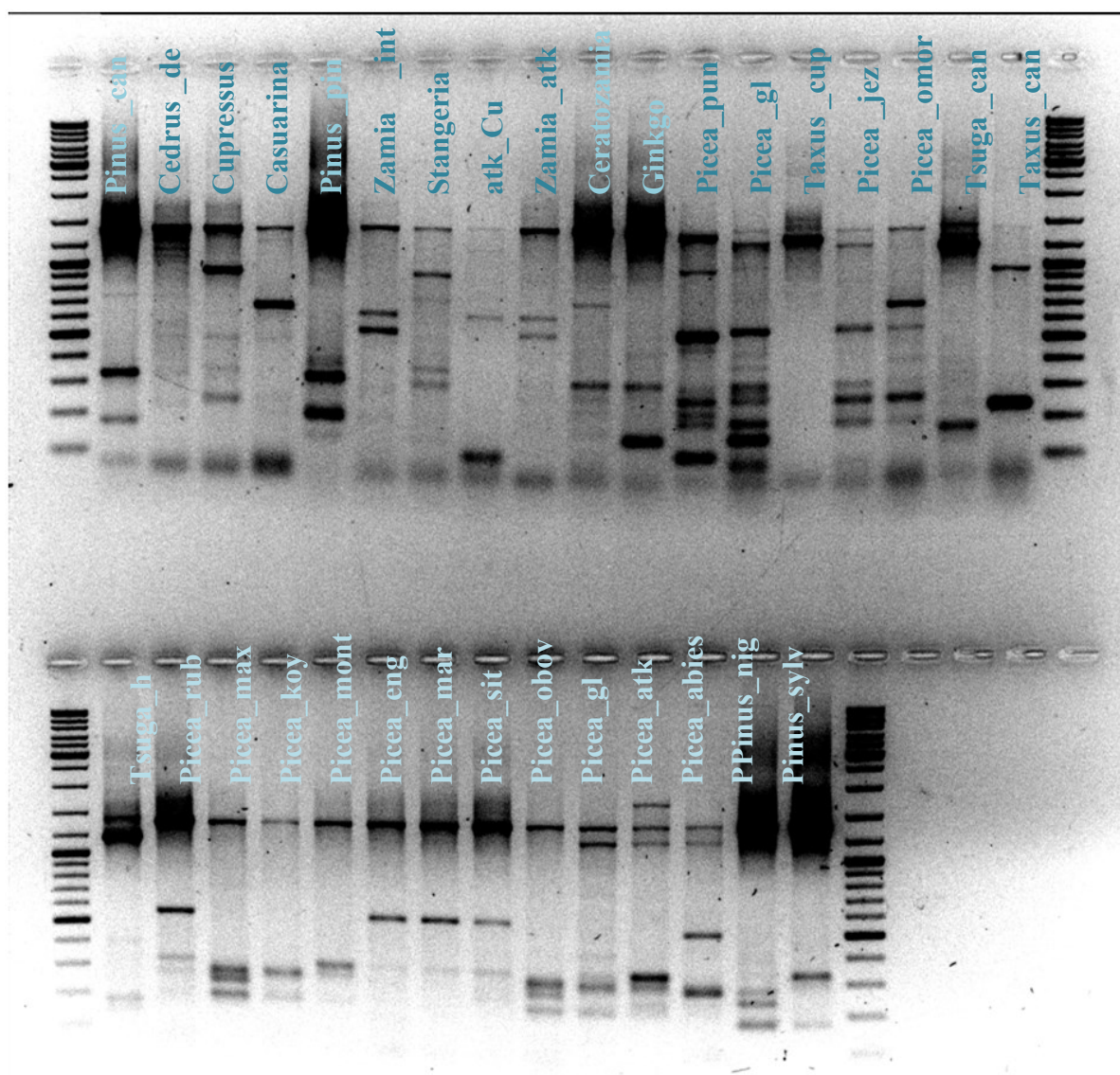




52. attēls. Kailsēkļu filoģenētiskā analizē izmantojot priedei specifiskus IRAP retrotranspozonu marķierus. Oranžajā trīsstūrī - priežu apakšģints Strobilus; zaļajā trīsstūrī - priežu apakšģints Pinus; sarkanajā trīsstūrī - egļu ģints klāsteris; zilajā trīsstūrī - balteģļu ģints klāsteris; pelēkajā trīsstūrī - *Pinus sylvestris*.

### 3.6.2. Identificēto fragmentu izplatība kailsēkļu genomos

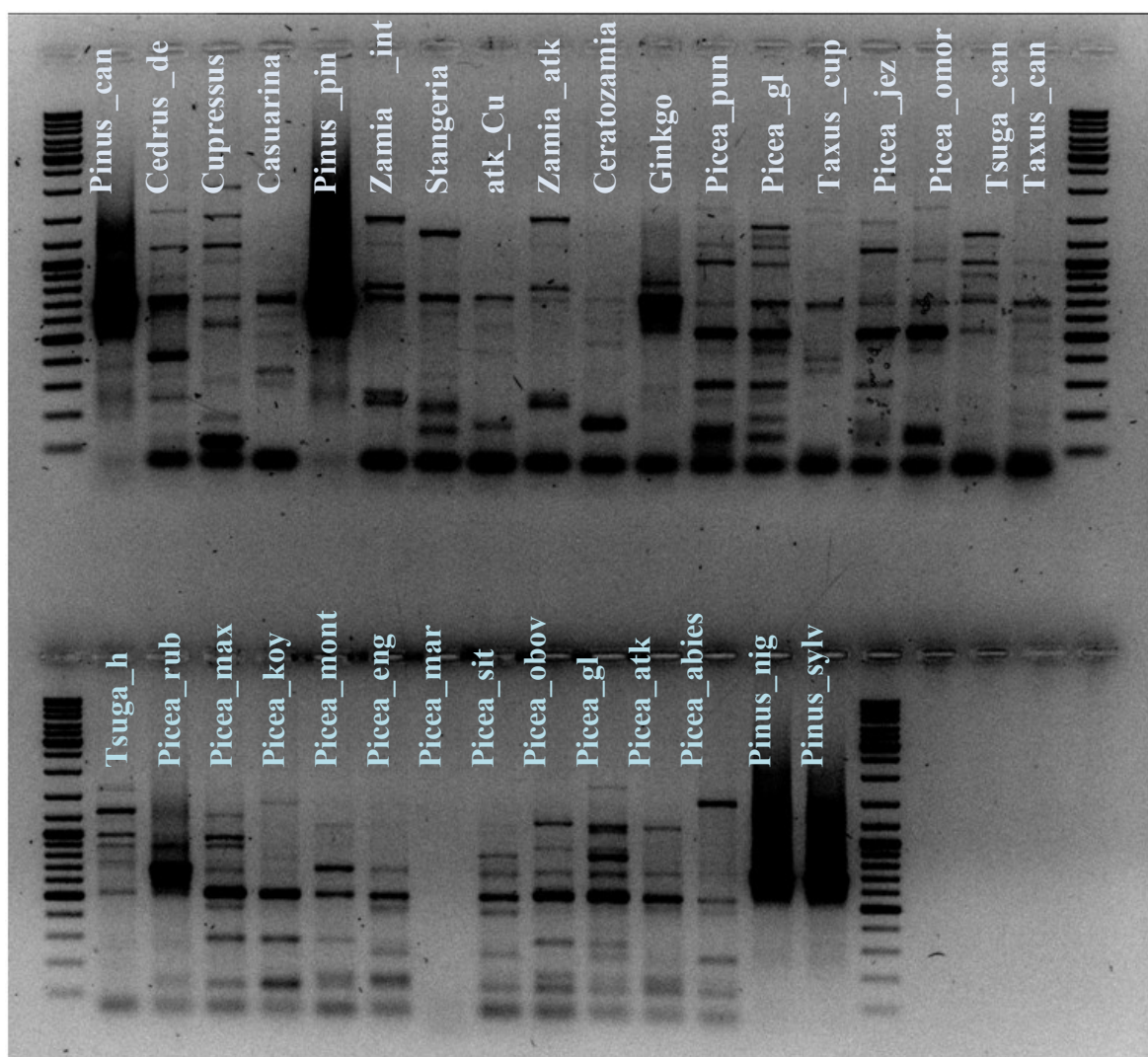
Izolēto retrotranspozonu izplatību pārbaudīja ar iekšējo sekvenču amplifikāciju 68 kailsēkļu paraugiem ar astoņiem atkārtotiem paraugiem (sākot no paraugu ievākšanas un DNS izolēšanas). Parastajai priedei karstuma stresā identificētā un sekvenētā psTE283 retrotranspozona gag-RT domēnu amplifikācija uzrādīja lielāko produktu daudzumu sagaidāmā fragmenta garuma diapazonā parastajai priedei un vēl piecām priedes sugām, divām eglēm, hemlokeglēm, ciedriem un arī diviem tādiem attāliem taksoniem kā ginks un ceratozāmija (53. attēls).



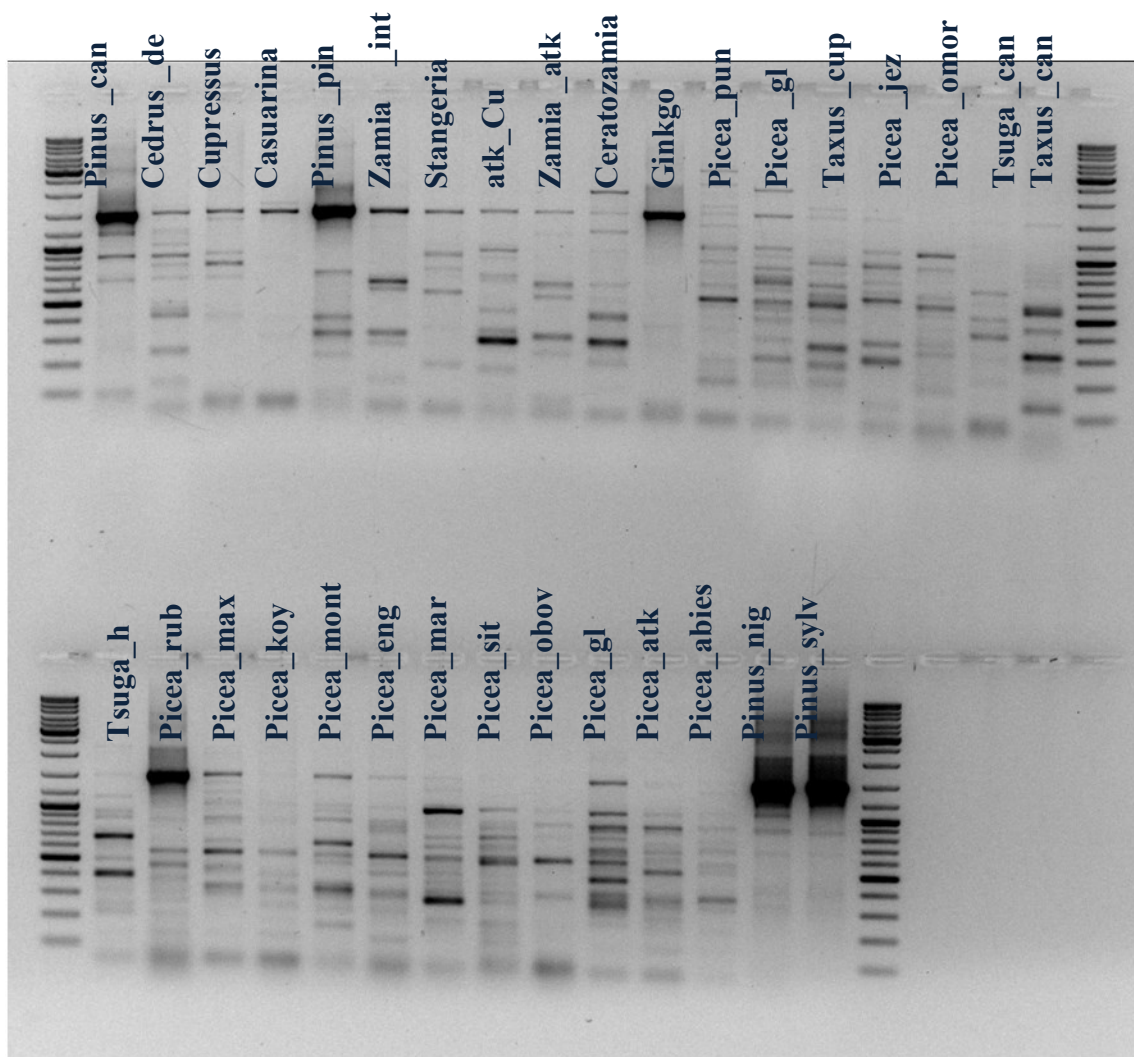
53. attēls. psTE283 retrotranspozona gag-RT domēnu amplifikācija 32 paraugiem, sagaidāmais produkta garums 1518 bp.

Ar psTE283 nenotika sagaidāmā garuma fragmentu amplifikācija duglāzijām, ciedrupriedēm, lapeglēm, volēmijai, kā arī greizajai priedei (*P.contorta*). Sarkanajai eglei (*Picea rubens*), vienkāršas balteglei (*A.concolor*), kā arī pārējām balteglēm fragments bija nedaudz garāks. Pārējiem paraugiem josla amplificējās tuvu sagaidāmajam fragmentam, bet joslas nebija spilgtas, kas varētu norādīt uz mazāku kopiju skaitu šīm sugām, vai arī retrotranspozona homologa mutācijām praimeru komplementaritātes vietās.

psTE101 (no T50) elementam amplificēja 5' LTR 3' daļu un gag domēna daļu. Atšķirībā no iepriekšējā retrotranspozona, ptTE101 izteikta amplifikācija bija mazākam sugu skaitam - septiņām priedēm (*P.sylvestris*, *P.nigra* var. *banatica*, *P.latifolia*, *P.mugo*, *P. ponderosa*, *P.canariensis*, *P.pinea*). Amplificēto joslu skaits šīm sugām bija plašākā diapazonā no 500 bp līdz 1500 bp (54. attēls).



54. attēls. psTE101 retrotranspozona LTR-gag domēnu amplifikācija 32 paraugiem, sagaidāmais produkta garums 700 bp.



55. attēls. psTE121 (T73) iekšējās sekvenses-LTR amplifikācija 32 paraugiem ar *ltr121-3\_F-R* praimeriem un 1608 bp sagaidāmo produkta garumu.

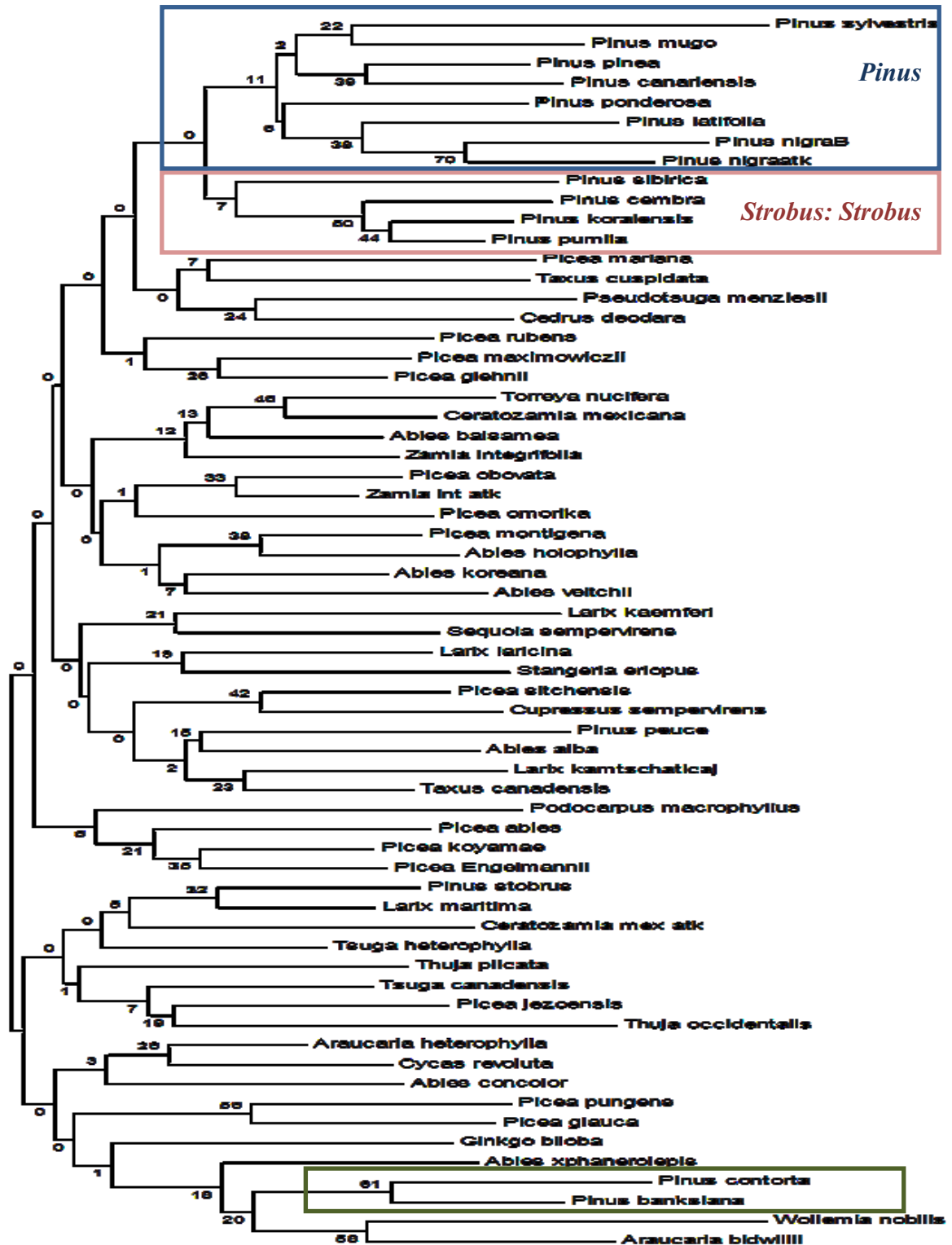
TE121 retrotranspozonomam amplificēja iekšējās sekvenses-LTR fragmentu (1608 bp). Fragmenti variēja no 1,2 kb līdz apmēram 2,5 kb (55. attēls) *P.nigra*, *P.latifolia*, *P.nigra* var. *banatica*, *P.mugo*, *P.ponderosa*, *P.sylvestris*. Salīdzinoši specifiska un spilgta josla sagaidāmajā garumā novērota eglei *P.rubens*, vairākām priežu sugām *P.peuce*, *P.sibirica*, *P.koraiensis*, *P.canariensis*, *P.pinea*, kā arī attālākajiem *Ginkgo biloba* un *Araucaria heterophilla*.

*Copia-18\_BD* homologam konstruētie praimeru iekšējai elementa sekvencei amplificēja daudz polimorfo lokusu, bet amplificētie fragmenti nebija līdzīgi psTE101, psTE121, psTE283 elementu domēnu amplifikācijas gadījumā. Kā zināms, ar šiem praimeriem priedē amplificējas ar TE nesaistītas sekvenses. Amplifikācijas ar SA07 (ar *Copia-18BD*-līdzīgu rajonu) rezultējās vienā specifiskā produktā visiem kailsēkļu paraugiem,

kas droši vien ir hloroplasta augsti konservatīvais rajons. Monomorfus produktus, kas arī līdzinās hloroplasta sekvencei, ieguva ar B153C praimeriem. Analīze parādīja, ka šie fragmenti ir sastopami visu pētījumā iekļauto paraugu vidū, kas apstiprina šī rajona izcelsmi no hloroplasta genoma. Savukārt *Cereba*-līdzīgā fragmenta B153TE amplifikācijas produkti variēja. Sagaidāmā garuma (120 bp) fragmenti novēroti 15 priedes sugām, 10 egles sugām, divām balteglēm un vienai lapeglei. Tāpat amplifikācijas produkts novērots ginkam, bet vairāki polimorfī fragmenti novēroti tikai *Stangeria eriopus*.

Pārbaudīja arī pārējo specifisko praimeru amplifikāciju. Ieguva atšķirīgus rezultātus, vienā gadījumā praimeris konstanti amplificēja specifisku produktu sagaidāmajā garumā, citos gadījumos dažām sugām iegūts atšķirīga garuma fragments, dažreiz katrai sugai ieguva daudz polimorfo joslu gan ar sagaidāmā lieluma produktu, gan ar atšķirīgiem produktiem. Rezultātus vērtēja sekojoši: atzīmēja ar 1/0 sagaidāmā garuma produktu esamību, bet ar 1-4 polimorfo lokusu salīdzinošo skaitu (20. tabula). Ar 4 atzīmēja lokusus ar spilgtu izsmērētu joslu (kā aprakstīts retrotranspozonu domēnu amplificēšanas gadījumā), ar 1 - viens amplificēts fragments, 2 - dažas polimorfās joslas, 3 - daudz polimorfo joslu. Pievienoja arī ptTE101, psTE283 un ptTE121 aprakstīto retrotranspozonu amplifikācijas analīzi. Var redzēt, ka *Pinus* sugu grupai ir biežāk sastopama izolēto TE polimorfa amplifikācija un attālākās kailsēkļu ģintīs tā samazinās. Specifisko fragmentu izplatība ir vienmērīgāka, jo praimeris piemeklēti nelielam homoloģijas rajonam. Šajā pētījumā no *P.sylvestris* izolētie TE ir arī *P.nigra*, *P.latifolia*, *P.mugo* un *P.ponderosa* genomos. Karstuma stresā izolētais psTE283, atšķirībā no pārējiem aprakstītajiem elementiem, ir atrodams arī attālajos *Cedrus deodara*, *Ginkgo biloba*, *Ceratozamia mexicana* genomos, kas liecina par šī elementa senu izcelsmi un saglabāšanos priedes sugām apejot egles ģinti. psTE283 domēna amplifikācija ir atšķirīga šim sugām, šī tipa joslas nav novērotas nevienai no pētījumā iekļautajām egļu, balteglu un lapegļu sugām. Visatšķirīgākie no parastās priedes TE bija *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* un *Wollemia nobilis*. Interesanti, ka priežu ģintī pēc izmantotiem marķieriem no parastās priedes ir atšķirīga greizā priede (*P. contorta*). Izmantojot specifisko marķieru datus (26 lokusi) konstruēja dendrogramu (56. attēls). Lai gan lokusu skaits nav liels, 12 priežu sugas klāsterizējās vienā zarojumā. Priežu sugu zarojumā *P.nigra* un *P.nigra* var. *banatica*, kā sagaidāms, klāsterizējas kopā ar augstām varbūtības vērtībām. Līdzīgi, kā ar nespecifisko marķieru filoģenētiskajām analīzēm, Ziemeļamerikas sugas *P.contorta* un *P.banksiana* atšķiras no pārējām priedes sugām. Attāli taksoni pārsvarā vāji, bet nodalās no skujkokiem: *Ginkgo biloba*, *Zamia integrifolia*, *Ceratozamia mexicana*, *Cycas revoluta*, *Stangeria*

*eriopus*. Arī eskotisko ģints pārstāvji klāsterizājas savā starpā vai arī vāji ar citiem taksoniem: *Torreya*, *Wollemia*, *Araucaria*, *Podocarpus*.



56. attēls. Kailsēkļu filoģenētiskais koks, veidots pamatojoties uz specifisko TE-līdzīgo sekvenču marķieriem un triju hipotētisku TE domēnu amplifikācijas.





## 4. Diskusija

### 4.1. TE-līdzīgo transkriptu identificēšana

Transponējamie ģenētiskie elementi ir lielākā augu genoma sastāvdaļa, stresa apstākļos tie var izraisīt funkcionālas mutācijas, ar savām regulatīvajām sekvencēm ietekmējot gēnu darbību vai izjaucot gēnu sekvenses (Rebollo *et al.* 2012), bet I klases TE jeb retrotranspozoni var arī producēt funkcionālus RNS transkriptus (Piriyapongsa *et al.* 2007). Retrotranspozonu vai ar tiem saistīto sekvenču transkripcionālās aktivēšanas pētījumi varētu paātrināt noderīgo regulatīvo lokusu identificēšanu kompleksajiem augu genomiem. Šis pētījums veltīts stresa apstākļos ekspresēto retrotranspozonu un to sekvenču saturošo transkriptu identificēšanai kompleksajā parastās priedes (*P.sylvestris*) genomā.

Sugas nespecifiskā iPBS metode ļauj identificēt retrotranspozonus nesekvenētiem augu genomiem (Kalendar *et al.* 2010). Stresa apstākļos nespecifiski PBS praimeru ļāva konstatēt diferenciālu TE-līdzīgo sekvenču ekspresiju, identificējot virkni zināmiem retrotranspozoniem līdzīgas poliproteīnu sekvenses, kā arī citas, pagaidām neidentificētas sekvenses. Pretēji sagaidāmajai dominējošajai fragmentu struktūrai, kas ir aprakstīta genomiskās DNS amplifikācijas gadījumā, ir detektēti tikai daži diferenciāli ekspresēti transkripti ar pretēji orientētām LTR sekvencēm to galos. Genomiskās DNS amplifikācijas gadījumā ar iPBS metodi ir iespējams iegūt 50-70% ar TE saistītu sekvenču (Kalendar *et al.* 2010). Zemāks identificēto TE-līdzīgo sekvenču skaits ir skaidrojams gan ar šo transkriptu daudz mazāku reprezentāciju transkribējamo sekvenču vidū, gan arī ar mazāku iespēju identificēt priedes TE-līdzīgos transkriptus. Priedes genoma retrotranspozonu sekvenses ir atšķirīgas no segsēkļu retrotranspozoniem (Kovach *et al.* 2010; Nystedt *et al.* 2013), īpaši LTR sekvenses raksturojas ar diverģenci, kā arī izmantotajās datubāzēs publicēto skujkoku TE sekvenču skaits ir nesalīdzināmi mazāks nekā segsēkļiem. Tomēr, šo LTR-LTR fragmentu konstatēšana priedes transkriptomā norāda uz to, ka retrotranspozonu klāsteros var notikt arī nepārtraukta vairāku retrotranspozonu vai arī to nefunkcionālo palieku transkripcija. Vairāki diferenciāli ekspresētie fragmenti saturēja TE homologos rajonus visā tā garumā, īpaši daudz sekvenču identificētas pateicoties TE kodējošo domēnu līdzībai, jo šie rajoni dažādām TE ģimenēm ir viskonservatīvākie. Tāpat, nespecifiskie PBS praimeru amplificēja dažādus RNS gēnus, kas satur PBS komplementārus saitus. Visos gadījumos homologija ar pilnīgu vai daļēju izmantotā PBS praimera sekvenci ir konstatēta arī TE sekvencei. Tā notika arī identificētajam DNS transpozonomam *EnSpm*, kuram izmantotā PBS praimera sekvence bija komplementāra TE ORF, izņemot pirmos trīs

nukleotīdus no 5' praimera gala. Pielietojot nespecifisku amplifikāciju starp PBS sekvencēm, ir izdevies identificēt iepriekš neaprašītus elementus, kuri ir ekspresēti stresa apstākļos.

Šajā pētījumā identificēja četrus transkriptus, kas ir homologi vienam LTR visā transkripta garumā (T10 (*Laura*), T31 (*Erica*), B301 (*PIGY*) un SA03 (*Gypsy-3-HV*). Visi šie elementi pieder *Gypsy* virsgimenei un satur augstu līdzības pakāpi ar atbilstošo homologu nukleotīdu sekvenču līmenī. Citi transkripti saturēja daļēju līdzību ar LTR sekvencēm. Zems identificēto LTR homologu skaits ir skaidrojams ar zināmu LTR sekvenču variabilitāti starp TE ģimenēm, līdz ar to vairums no iespējamajām LTR sekvencēm palika neidentificētas meklējot homoloģiju starp publicēto segsēkļu genomu TE sekvencēm. Nesena papeles genoma TE analīze parādīja, ka tikai 42% no papeles TE ir homologi kādai publicētai TE sekvencei (Cossu *et al.* 2012). Parastās egles genomā, kas ir viens no pirmajiem sekvenētajiem skujkoku genomiem, arī *Gypsy* TE ir ar lielāku īpatsvaru salīdzinot ar *Copia* TE. *P.abies* genomā tikai aptuveni puse atkārtoto sekvenču uzrādīja līdzību ar jau aprakstītiem TE. Salīdzinoša analīze starp dažādiem skujkoku TE rāda, ka vairums TE ir veci, un bija izplatīti genomā jau pirms taksonu atdalīšanās. *P.abies* genoma analīze norāda, ka skujkokiem LTR TE viens no otra ir atšķirīgi, un genomā pastāv arī vairākas TE ģimenes ar zemu izplatību (Nystedt *et al.* 2013).

#### 4.2. Stresa izsaukta TE-saistīto sekvenču ekspresija

Lielākā TE-līdzīgo sekvenču daudzveidība ir atrasta pēc karstuma stresa iniciācijas, kur izolēto fragmentu skaits bija vismazākais, bet starp tiem ir atrasts pat II klases DNS transpozona transkripts, kā arī bez-LTR LINE retrotranspozona sekvenču un *Gypsy* un *Copia* virsgimeneņu pārstāvji. DNS transpozonu CACTA ģimenes *EnSpm*-līdzīgu transpozonu aktivitāte stresa apstākļos ir pierādīta vairākām augu sugām: kukurūzai (Peterson 1953; McClintock 1954), kviešiem (Wicker *et al.* 2003), sorgo (Chopra *et al.* 1999), rīsiem (Jurka 2005), pākšaugiem (Altinkut *et al.* 2006). Nejauša *EnSpm*-līdzīgā RNS transkripta identificēšana norāda uz aktivēšanas iespēju stresa apstākļos šīs ģimenes pārstāvim arī *P.sylvestris* genomā. Tomēr bez pilnā garuma sekvenču noteikšanas, nav iespējams precizēt, vai tiek aktivizēts DNS transpozons, vai tikai tā nefunkcionālā daļa. Senākas izcelsmes *Gypsy* virsgimenei bija homologi vairāk identificēto transkriptu, salīdzinot ar *Copia* virsgimenes homoloģiem. Vienā no nedaudziem bioinformātikajiem pētījumiem par augu retrotranspozonu transkriptiem, kur analizēja kukurūzas EST sekvenču sastāvu, novēroja skaitlisko *Gypsy* transkriptu pārsvaru pār LTR *Copia* un CACTA DNS transpozonu transkriptu skaitu (Vicient 2010). Līdzīgi rezultāti ir novēroti kartupeļiem (Yadav, Singh 2013) un graudaugiem (Echenique *et al.* 2002). Nevienu līdzīgu fragmentu neatrada starp karstuma stresa eksperimentā izolētiem un augu

hormonu apstrādes rezultātā izolētiem fragmentiem. Zināms, ka retrotranspozonu transkripcija ir atkarīga no *in cis* darbošos regulatīvo sekvenču reprezentācijas LTR sekvencē (Vernhettes *et al.* 1998; Takeda *et al.* 1999; Butelli *et al.* 2012). Šīs regulatīvās sekvences ir atkarīgas no dažādām signālmolekulām, un tātad arī dažādiem vides vai stresa faktoriem (Hirochika 1993; Beguiristain *et al.* 2001; Tapia *et al.* 2005; Ito *et al.* 2011).

Kukaiņu invāzijas eksperimentā iegūts liels diferenciāli ekspresēto fragmentu skaits, tomēr atklāto TE-līdzīgo sekvenču skaits ir salīdzināms ar karstuma stresā identificēto. Liela fragmentu grupa līdzinājās dažādām *Ogre* domēnu sekvencēm. *Ogre* ir milzīgs transkripcionāli aktīvs *Gypsy* LTR TE, kurš sākotnēji ir aprakstīts zirņu genomā, bet atrasts arī citu divdīgļlapju sugām, piemēram, *Medicago truncatula* (Neumann *et al.* 2003). Tāpat, aprakstīts, ka šim elementam notiek pre-mRNS nobriešana (splaisings), kas nozīmē, ka var tikt identificēti alternatīvi transkripti (Steinbauerová *et al.* 2008). Dažus līdzīgus transkriptus atrada pēc kukaiņu invāzijas un pēc SA apstrādes, kas ir saskaņā ar zināmu SA funkciju. SA darbojas kā signālmolekula, kura inducē auga pretestības reakciju patogēnu uzbrukuma laikā (Malamy *et al.* 1990; Malamy, Klessig 1992; Klessig *et al.* 2000; Durrant, Dong 2004). Zināms, ka vairāku augu retrotranspozonu transkripcija ir inducējama ar SA apstrādi, piemēram, tomātu *TLCL1.1* (Tapia *et al.* 2005), tabakas *Tnt1* (Grandbastien *et al.* 1997), auzu *OARE-1* (Kimura *et al.* 2001).

Abscizskābe (ABA) ir augu hormons, kurš mitruma nepietiekamības gadījumā tiek iesaistīts atbildes reakcijā, un tas tiek sintezēts gan saknēs, gan lapās, bet var tikt uzņemts arī no apkārtējās vides. ABA receptori lokalizējas atvārsnīšu šūnu membrānā (Wilkinson, Davies 2002). ABA spēj uzkrāties simplasta rezervuārā un neizraisīt atbildes reakcijas augiem, kamēr lapās un saknēs nav panākts tipisks ūdens deficītam raksturīgs pH (Wilkinson, Davies 2002). Iespējams, tas izskaidro tik nelielu ABA efektu uz priedes rametu TE-saistīto sekvenču transkripciju šajā eksperimentā, jo stādiem neradīja ūdens deficītu. Literatūrā ir aprakstīti gadījumi, kad retrotranspozoni transkribējas atbildot uz ABA apstrādi, piemēram, zemenēm *FaRel Copia* LTR TE (He *et al.* 2010). Miežu *Copia* LTR *BARE-1* sekvence satur ABA inducējamu elementu, kas var izskaidrot šī elementa kopiju skaita palielināšanos sausuma stresa ietekmē (Kalendar *et al.* 2000).

Lielākā transkriptu grupa, kuru identificēja pēc apstrādes ar ABA, bija homologa *Copia-18<sub>BD</sub>* elementam no *Brachypodium*, bet šie transkripti ir arī homologu hloroplasta rajonam. Iespējams, hloroplasta rajons ir iekļauts *Copia-18<sub>BD</sub>* retrotranspozonā *Brachypodium* genomā. Zināms arī, ka retrotranspozonu 3' iekšējās sekvences rajons starp pol domēnu un LTR dažiem TE satur konservatīvu rajonu ar nezināmām funkcijām (Havecker *et al.* 2004). Šajā rajonā retrotranspozoniem var atrasties arī hromodomēns (Novikov *et al.* 2012). Iespējams arī, ka šis rajons

var kalpot par piesaistes regulācijas motīvu, līdzīgi kā CRM elementiem (Neumann *et al.* 2007). Nav zināms, vai šī *Copia-18<sub>BD</sub>* homologs ir atrodams priedes genomā, šajā pētījumā homologu sekvenci izolēt neizdevās. Iespējams, šī homologija ar *Copia-18-BD* ir nejauša, jo priedei un visiem augiem šī secība ir atrodama arī hloroplastu genomā. Pētījumā identificētā hloroplasta rajona (ORF64c) insercija citiem augiem (ar sekvenētu genomu) ir atrodama arī kodola genomā. Piemēram, atšķirīga skaita insercijas ir atrodamas aļģēm, *Arabidopsis lyrata*, pākšaugiem (*Glycine max*, *Medicago truncatula*), *Populus trichocarpa*, nakteņu dzimtas augiem (kartupeļi, tomāti). Viendīgļlapjiem, piemēram, rīsiem genomā ir vismaz astoņas šī reģiona insercijas, piecas insercijas atrodamas *Brachypodium distachyon*, bet divas *Sorghum bicolor*. Izplatīta parādība augu genomos ir hloroplastu un mitohondriju DNS insercijas kodola genomā (Lin *et al.* 1999; Stupar *et al.* 2001; Guo *et al.* 2008; Ueda *et al.* 2005). Interesanti, ka šajos kodola genoma rajonos bieži ir sastopami TE ar hloroplasta vai mitohondrija DNS inserciju, un uzskata, ka TE piedalās šo rajonu pārstrukturēšanā (Ueda *et al.* 2005, Guo *et al.* 2008). Hloroplasta genomam homologu transkriptu identificēšana ar variējošām flankējošām sekvencēm, norāda uz vairākām šī rajona kodola insercijām arī parastās priedes genomā. Vēl jo vairāk, citas transkriptu grupas identificēšana (B153) ar hloroplastam homologu daļu un nehomologu TE daļu, apstiprina šo iespēju. Visi šie transkripti (B153, SA01, SA07, ABA03, ABA02) varētu būt dažādu inserciju rezultāts, interesanti, ka šie transkripti ir atrodami pirms stresa iniciācijas un to ekspresijas līmenis strauji pieaug stresa apstākļu ietekmē, bet TE-līdzīgie amplifikācijas produkti ir atrodami tikai stresam pakļautajos augos. Hloroplastu B153C un SA07 daļas atrodas blakus viena otrai hloroplasta genomā, bet SA07 ekspresijas līmenis parastajai priedei vidēji ir divas reizes augstāks par B153C ekspresijas līmeni. Tāpat, šo transkriptu homologi ir sastopami citu augu EST sekvencēs, norādot, ka šīs sekvences ir transkripcionāli aktīvas arī citās sugās, iespējams TE inserciju dēļ. Turpretim, līdzības meklēšana ar B153TE *Cereba*-līdzīgu rajonu rezultējās vienīgajā EST ierakstā Benksa priedei (*P.banksiana*), kas var norādīt uz šīs sekvences specifisku transkripciju dažām priedes sugām. Šo transkriptu motīvu analīze parādīja, ka šī sekvenca var saturēt miRNS gēnu, jo vismaz vienai sekvences daļai ar lielu iespējamību veidojas cilpveida struktūra. Rajona sekvences konservatīvitate, sastopamība, ekspresijas līmeņa izmaiņas dažādu stresa apstākļu ietekmē, norāda uz šī rajona iespējamu funkcionalitāti, kas ir jānoskaidro turpmākos pētījumos.

Nesen ir publicēts pētījums par retrotranspozonu aktivēšanos karstuma stresa ietekmē, kur parādīts, kā viena elementa aktivācija veicina stresā inducējamo gēnu darbības paātrināšanos, ar savu inserciju inkorporējot papildus transkripciju veicinošas sekvences (Ito *et al.* 2011; Feng *et al.* 2012). Tas liecina, ka aktīvo elementu mobilizēšanās var veidot jaunus gēnu atbilžu tīklus un tādā veidā

piešķirīgu piedalīties jaunu pielāgošanās iespēju veidošanā, bet dabiskās izlases procesā paliek genotipi ar priekšrocību sniedzošām mutācijām. Arī parastās priedes genomā tādi dabā sastopami stresa apstākļi, kā karstums un kukaiņu invāzija, veicina dažādu ar TE-saistīto sekvenču ekspresiju. Salīdzinājumā, apstrāde ar ABA un SA jau pirmajā pētījuma posmā izraisīja zemāku nespecifisko iPBS polimorfo lokusu amplifikāciju, un arī izolēto fragmentu vidū TE-saistīto sekvenču transkriptu sastopamība bija viszemākā. Tāpat, nākamajā pētījuma posmā, kur tika analizēts ekspresijas līmenis, pat dažiem augu hormonu apstrādē identificētiem transkriptiem, ekspresija notika salīdzinoši zemākā līmenī. Tas var būt skaidrojams arī ar karstuma stresa un priežu hermesa invāzijas nespecifisku darbību uz vairākiem auga aizsardzību aktivējošiem signālceļiem, savukārt SA un ABA ietekmē tiek aktivēti specifiskie signālceļi, apejot primārā stresa iniciācijas ceļus.

Analizējot TE-līdzīgus un arī anonīmus fragmentus, katram pētāmajam stresa tipam pārsvarā identificēja atšķirīgus transkriptus, tikai daži fragmenti bija kopīgi. Savstarpējā fragmentu salīdzināšana pārsvarā sakrita ar identifikācijas rezultātiem, tomēr īsāks amplifikācijas rajons var novest pie maldinošiem rezultātiem. Pirmkārt, kompleksajā priedes genomā šie lokusi ir pārstāvēti vairākās kopijās un dažādas transkripta daļas praktiski var būt līdzīgas augsti konservatīviem rajoniem, piemēram, kā bija noskaidrots hloroplasta sekvencai un tās insercijām kodola genomā. Otrkārt, zināms, ka vienas ģimenes dažādu tipu TE pārstāvji var transkribēties atšķirīgos apstākļos pateicoties stresam sensitīviem elementiem lokalizētiem TE LTR (Kumar, Bennetzen 1999; Takeda *et al.* 1999; Havecker *et al.* 2004; Beguiristain *et al.* 2001). Treškārt, homologija ar datubāzē esošajiem ierakstiem var būt maldinoša, jo vienai ģimenei kodējošiem domēniem homologie transkripti, priedes genomā var izrādīties dažādu TE ģimeņu pārstāvji. Piemēram, vairākkārt atrastie *Gypsy Ogre* ģimenei homologie transkripti bija ar augstu līdzību dažādiem domēniem pat nukleotīdu sekvenču līmenī, bet amplifikācija starp kodējošiem domēniem ar genomisko DNS nedeva rezultātus. Iespējams, šī līdzība attiecas uz dažādiem elementiem un ar šiem praimeriem tiek amplificēts anonīms genomiskais rajons starp elementiem. Iespējams arī, ka šis elements ir sens un priedes genomā ir palikušas izkaisītas konservatīvās TE daļas, kas ģenerē himērus transkriptus, bet pētījumā identificēja tikai to daļas. Tomēr, amplifikācijas produkti pat ar vienu no *Ogre*-līdzīgo transkriptu praimeriem ir ļoti polimorfī, droši vien, katra no šīm ģimenēm priedes genomā ir pārstāvēta vairākās kopijās.

Parasti TE 5' LTR satur polimerāzes II promoteru (retāk III), kas var kalpot par alternatīvu transkripcijas uzsākšanas vietu genomā. LTR-gēnu transkripti ir pētīti cilvēka genomam, visbiežāk alternatīvie promoteri darbojas audu specifiskajās šūnās un aktīvi LTR ar alternatīvā promotera funkciju cilvēka genomā ir sastopami tikpat bieži kā citi alternatīvo promoteru tipi (Cohen *et al.*

2009). Nesen atklāts, ka salīdzinot gēnus kodējošo sekvenču saturu, daudz lielāka genomiskā DNS daļa tiek transkribēta zemā līmenī un šie transkripti varētu būt nepieciešami hromatīna struktūras veidošanai (Zhang *et al.* 2012). Liela skaita himērisku transkriptu atklāšana peles oocītos un embrijos norāda uz iespējamu funkciju attīstības procesa regulēšanā zīdītājiem (Peaston *et al.* 2004). TE promoteru sastopamības analīze cilvēku gēnu 5' rajonā identificēja daudz TE izcelsmes transkripciju regulējošus signālus (Thornburg *et al.* 2006). Papildus identificētajām hloroplastu DNS homologām sekvencēm, vairākums identificēto fragmentu ir sastopami augu EST datubāzēs. Tas norāda uz to, ka daļa no šīm sekvencēm ir konservatīvas dažādu priežu sugu vidū un ir ekspresētas. TE sekvenču evolūcijas gaita ir strauja un ar augstu mutāciju iespēju, tomēr konservatīvās TE-saistītās sekvenses starp segsēkļu un kailsēkļu genomiem norāda uz šo sekvenču iespējamo funkcionalitāti. Atbildot uz nelabvēlīgiem vides apstākļiem, aktīviem transponējamiem elementiem var būt nozīme augu genomu restrukturizācijā un jaunu genotipu veidošanā. Transpozīcija regulatīvajos vai gēnu rajonos var ievērojami ietekmēt gēnu darbību. Retrotranspozonu sekvenču uzkrāšanās augu genomos var norādīt uz šo sekvenču evolucionāro lomu un iespējamu liela genoma izmēra un lēna metabolisma ritma priekšrocību (Murray 1998, 2005). Ņemot vērā, ka jebkura nelabvēlīga mutācija ātri tiks eliminēta no populācijas, bet labvēlīgi pārkārtējumi tiks uzturēti, evolucionāri katrai augstāko augu TE ģimenei jābūt priekšrocību sniedzošai un jāizvairās no kodējošo rajonu izjaukšanas (Eickbush, Jamburuthugoda 2008). Tomēr parasti tiek atklātas kaitīgas retrotranspozīcijas gadījumi, kas noved pie vienkāršāk pamanāma neparasta fenotipa veidošanās vai pat slimības. Iespējams, tāpēc ilgu laiku tika uzsvērts tikai deletārais retrotranspozonu efekts, bet priekšrocības sniedzošais efekts tiek nemanāmi uzturēts organismu genomos. TE transpozīcija tiek regulēta ar epiģenētisku mehānismu palīdzību gan transkripcijas, gan transpozīcijas līmenī (Slotkin, Martienssen 2007), tāpēc transkripcija ir tikai pirmais posms TE aktivēšanas mehānismā un tas var neizraisīt jaunas transpozīcijas. Nekodējošās RNS sintēze lielā daudzumā vai arī sekojoša tās reversā transkripcija uz DNS varētu būt funkcionāla, īpaši stresa apstākļos. Turpmāki pētījumi ir nepieciešami identificēto TE struktūru un ar tiem saistīto sekvenču izpētei un funkciju noskaidrošanai.

### 4.3. Identificēto priežu TE izplatība kailsēkļiem

Retrotranspozonu sekvenses ir ļoti daudzveidīgas un ir sastopamas visu eikariotu genomos (Kumar, Bennetzen 1999). Vairāku augu genomu retrotranspozonu izplatīšanās un struktūras salīdzinošie pētījumi atklāj, ka retrotranspozoni ir evolucionāri seni un homologas RT ģimenes var būt sastopamas attāliem augu taksoniem (Flavell *et al.* 1992; Voytas *et al.* 1992; Xiong and Eickbush

1990). Iepriekšējie *P.taeda* genoma pētījumi aprakstīja visu klašu un kārtu TE pārstāvju identificēšanu: DNS transpozonus, endogēnos retrovīrusus, LTR un bez LTR retrotranspozonus (Friesen *et al.* 2001; Kovach *et al.* 2010). Kailsēkļu genomos segsēkļiem līdzīgas izcelsmes retrotranspozoni arī ir aprakstīti (Friesen *et al.* 2001; Stuart-Rogers, Flavell 2001). Tādēļ, parastās priedes TE homologijas identificēšana ar elementiem no segsēkļiem bija sagaidāma, jo šiem genomiem TE ir labi izpētīti un to sekvences ir publicētas publiski pieejamās sekvenču datu bāzēs.

*Triticeae*, *Arabidopsis* un *Oryza* genomu *Copia* virsgimenes retrotranspozonu pētījumos atklāti seši evolucionāri atzari, kas izplatījās vēl pirms viendīgļlapju un divdīgļlapju nodalīšanas (Wicker, Keller 2007). Līdzīgs sojas, rīsu un kukurūzas genomu pētījums atrada septiņus *Copia* retrotranspozonu un piecus *Gypsy* evolucionārus atzarus (Du *et al.* 2010). Retrotranspozoni, kas pieder noteiktajam priekšteču atzaram raksturojas ar kopīgām iezīmēm, kā arī var saturēt negaidīti augstu homologiju DNS sekvences līmenī starp attāliem augu taksoniem, un var liecināt par horizontālu gēnu pārnesi šiem elementiem (Wicker, Keller 2007). Šajā pētījumā identificēja retrotranspozonu transkriptus ar homologiju poliproteīnu kodējošām sekvencēm *Copia* virsgimenes *Maximus* evolucionārajam atzaram (*Copia-2-TE* līdzīgie fragmenti B104 un T30), kā arī *Angela* un *Ivana* grupām līdzīgs transkripts (T12). *Gypsy* virsgimenes gadījumā identificēja *Tat* atzara pārstāvjus (*Ogre*-līdzīgie transkripti), *CRM* atzara pārstāvjus (*Appalachian*-līdzīgie fragmenti B193, T28) un *Athila* atzara pārstāvji (*PIGY-1*, B301). *Maximus*, *Athila* un *Tat* evolucionāro grupu pārstāvji satur endogēniem retrovīrusiem līdzīgus struktūrelementus, kas norāda uz šo elementu senu izcelsmi. Kovach *et al.* (2010) pētījumā aprakstīja lielu *TPE1* retrotranspozonu ģimeni, kas pieder *Copia* virsgimenei (*Angela* evolucionārais atzars), un rezultātā secināja, ka *TPE1* ģimenes pārstāvji varētu sastādīt līdz pat 1,6% no *P.taeda* genoma.

Trīs pilna izmēra LTR TE-līdzīgus konstruktus identificēja BAC sekvencēs no *P.taeda* (ptTE101, ptTE121) un *P.glauca* (psTE283), izmantojot līdzību ar stresa pētījumos identificētiem diferenciāli ekspresētiem fragmentiem. TE datubāžu papildinājumi ļāva pārliecināties, ka divi no identificētajiem konstruktiem tiešām pieder skujkokiem specifiskajiem retrotranspozoniem. psTE121 ir homologs *P.taeda PtCumberland\_I* (Wegrzyn, *Repbase*), bet psTE283 ir homologs *PtAppalachian\_I* (Wegrzyn, *Repbase*). Pēc struktūras, ptTE101 un ptTE121 pieder *Copia* LTR retrotranspozoniem, bet psTE283 pieder *Gypsy* virsgimenei. Šo struktūru homologās iekšējās sekvences izdevies izolēt arī no cDNS, bet psTE283 ir sekvenēts pilnībā, kas norāda uz pilna izmēra elementu transkripciju parastās priedes genomā stresa apstākļos. Visu identificēto elementu domēni raksturojas ar izteiktu dažāda garuma fragmentu ‘mākoņu’ amplifikāciju visiem *P.sylvestris* DNS paraugiem, kas norāda uz lielu daudzumu līdzīgu genomisko kopiju esamību. Līdzīga amplifikācija

ir novērota vairākām priežu sugām, kurām, iespējams, šo elementu homologi ir tikpat izplatīti. Domēnu amplifikācijas analīzes norāda, ka psTE283 *PtAppalachian\_I*-līdzīgais retrotranspozons ir atrodams pat tik attālām sugām, kā *Ceratozamia mexicana* un *Ginkgo biloba*, un skujkoku klases Himalaju ciedram un Kanādas hemlokeglei, bet nav tik izplatīts radniecīgajām egļu, balteglu, lapegļu ģintīm. Savukārt, ptTE101 ir augsti izplatīts 10 priežu sugām, pie kam divām priežu sugām (*P.contorta* un *P.siberica*) ar šiem praimeriem nebija amplifikācijas. Ārpus priežu ģints šis elements ir bieži sastopams vienai eglei (*P.rubens*) un vienai lapeglei (*L.kaemferi*), bet zemāka amplifikācija novērota visām balteglēm, hemlokeglēm un pārējiem kailsēkļu taksoniem. ptTE121 ir sastopams tikai 7 priežu ģints pārstāvjiem, pārējiem izteikta amplifikācija nav novērota. Pētot šo elementu izplatību kailsēkļos secināts, ka ptTE101 un ptTE121 ir evolucionāri jaunāki par psTE283, un ir salīdzinoši nesen izplatījušies priežu ģints sugās. Rezultāti sakrīt ar līdzšinējiem TE izplatības pētījumiem, par tās nevienmērīgumu dažāda līmeņa taksoniem (Capy *et al.* 1994; Langdon *et al.* 2000; Friesen *et al.* 2001; Du *et al.* 2010; Kejnovsky *et al.* 2012).

#### 4.4. Retrotranspozonu transkripcionālā un transpozicionālā aktivitāte

Šajā pētījumā ir analizētas salīdzinoši īsas (zem 10 kb) diferenciāli ekspresētas sekvences, tādēļ nevar secināt par visu identificēto homologu patstāvīgu pilna izmēra transkripciju. Potenciāli, var notikt fosilo vai nefunkcionālo elementu un to daļu vai arī TE-gēnu himēru ekspresija (Vignols *et al.* 1995; Betran *et al.* 2002; Wang *et al.* 2002; Rebollo *et al.* 2012). Tik īsu fragmentu piederība retrotranspozoniem var tikt pierādīta tikai analizējot līdzību ar publicētām TE sekvencēm, bet arī līdzības detektēšana nevar sniegt atbildi par fragmenta izcelsmi. Skujkoku genomi raksturojas ar augstu kolinearitāti. Zinot, ka vairāki parastās egles gēnu rajoni satur lielus intronus (virs 50 kb), bet viena autonoma elementa sekvenca var būt tikai dažus simtus bp gara, nav iespējams pierādīt retrotranspozona aktivēšanos pat pēc pilna izmēra sekvences iegūšanas no cDNS. Tomēr, šajā pētījumā no stresam pakļautas priedes cDNS paraugiem ieguva divu elementu (ptTE101 un ptTE121) domēnu sekvences, kā arī vienu pilna izmēra LTR elementu psTE283. Tas liecina, ka šo elementu transkripti ir atrodami priedes transkriptomā un tie nav tikai fosilo elementu palieku transkripcijas rezultāts. Ja šie elementi atrodas intronos, tie var ievērojami ietekmēt gēnu transkripciju un splaisingu (Vignols *et al.* 1995; Marillonnet, Wessler 1997). Tāpat, izolētam elementam (psTE283) ir atrasti divi ORF, viens no kuriem kodē reversās transkriptāzes domēnu, bet otrs integrāzes domēnu. Aktīvi elementi raksturojas ar vienu nepārtrauktu poliproteīna transkriptu, bet nesen transponētie elementi - ar vienādiem LTR atkārtojumiem (Kumar, Bennetzen 1999). Daudzkopiju TE raksturs traucē konkrētā retrotranspozona kopijas izolēšanu, tādēļ sekvenētām



elementam neizdevās salīdzināt tā LTR, jo tiek transkribētas vairākas kopijas un sekvences savā starpā satur nelielus polimorfismus. Taču novērtējot ORF, psTE283 visdrīzāk ir palikusi tikai transkripcionāla aktivitāte. Šajā pētījumā aprakstīto elementu transkripcija ir identificēta karstuma stresa apstākļos. psTE283 transkripti ir identificēti karstuma stresa ietekmē, bet tie tiek ekspresēti arī kukaiņu invāzijas rezultātā un 64 stundas pēc apstrādes ar ABA un SA hormoniem. ptTE101 homologi rajoni identificēti karstuma stresa ietekmē, arī tā ekspresija pierādīta tikai karstumam pakļautajiem paraugiem. PtTE121 transkripti ir atrodami arī pēc kukaiņu invāzijas un 24, 64 stundas pēc apstrādes ar SA. Ekspresijas līmenis netika noteikts tehnisku iemeslu dēļ, jo praimeru amplifikācija bija nespecifiska. Salīdzinot PtTE121 un homologu *PtCumberland\_I* sekvences, novērotas lielas delēcijas. Iespējams, arī priedes genomā šī retrotranspozonu ģimene satur vairākas apakšklases un katrai no tām ir nepieciešams piemeklēt specifiskākus praimerus.

Iepriekšējos kailsēkļu retrotranspozonu pētījumos nav aprakstīti aktīvie TE, pārsvarā šo pētījumu mērķis nebija TE ekspresijas vai transpozīcijas identificēšana. Tomēr, bioinformātiskas *P.taeda* BAC sekvenču analīzes identificēja dažus elementus ar konservatīviem LTR, kas var norādīt uz šo elementu nesenu transpozīciju (Kovach *et al.* 2010). Priedes klonālās variācijas analīžu rezultātā izdevies identificēt divus elementus, kas potenciāli ir nesenu transponējušies, izraisot polimorfismu dažādās plantācijās augošu rametu starpā. IRAP marķieru polimorfisms var norādīt uz transpozīciju, jo marķieris amplificē genomisko rajonu starp diviem pietiekami tuvu esošiem elementiem, bet amplifikācija nenotiek, ja genomiskā rajona izmērs ir pārāk liels (Kalendar *et al.* 1999). Līdz ar jaunas TE kopijas integrēšanos, var parādīties jauns amplifikācijas fragments. IRAP metode tiek plaši lietota somaklonālās variācijas pētījumos (Asif, Othman 2005; Lightbourn *et al.* 2007; Bairu *et al.* 2011; Campbell *et al.* 2011; Bayram *et al.* 2012). Tikai viens praimeris IR\_2 priežu rametiem amplificēja polimorfus fragmentus. Sekvenēšanas rezultātā ieguva divas atšķirīgas sekvenču grupas ar homologiju vienam hipotētiskam LTR *Copia* elementam no vienas puses, kas tehniski bija sagaidāms, jo dažādiem rametiem polimorfismu varēja izraisīt aktīvā elementa integrācija dažādās genoma vietās. Nepieciešami turpmāki pētījumi šo elementu izolēšanai un raksturošanai.

Priedes dabīgās populācijas analīze ar nespecifiskiem retrotranspozonu marķieriem pēc IRAP metodes principa uzrādīja tikpat augstu daudzveidības pakāpi, kā SSR marķieru analīze tiem pašiem indivīdiem. Dabīgu priedes audzi ar krasi atšķirīgu ilggadīgu kāda vides faktora ietekmi ir sarežģīti identificēt. Izvēlētā priedes populācija bija dabīgas izcelsmes un atkarībā no augšanas vietas šo populāciju varēja iedalīt subpopulācijās. Subpopulācijas indivīdi auga atšķirīgā reljefā (paugurā, nogāzē un pārpurvojumā), kas norāda uz ilggadīgām mitruma režīma atšķirībām. Ar abām marķieru

sistēmām paugurā augošiem indivīdiem nenozīmīgi pieauga heterozigotāte. Nespecifiski IRAP amplificēto fragmentu skaita analīze parādīja statistiski būtisku vidējā fragmentu skaita pieaugumu subpopulācijai, kas auga paugurā, salīdzinot ar pārpurvojumā augošajiem indivīdiem. Galveno koordināšu analīze (PcoA) pārlicinoši nodalīja abas subpopulācijas, kas norāda uz alēļu frekvenču atšķirībām. Alēles bija vienmērīgi reprezentētas visās subpopulācijās un atšķirība frekvencē katrā no lokusiem nepārsniedza 0,3. Pārpurvojumā augoši koki bija būtiski tievāki un īsāki, kas iespējams norāda uz dotās subpopulācijas vecuma atšķirību, bet ir iespējama arī vides apstākļu ietekme uz to augšanu. Jebkurā gadījumā, atšķirība amplificēto lokusu skaitā bija novērota arī starp paugurā un nogāzē augošajiem indivīdiem, subpopulācijām, kas neatšķīrās pēc diametra un garuma parametriem. Šīs analīzes rezultāti saskan ar detalizētu savvaļas miežu *BARE-1* retotranspozona izplatības pētījumu, kur sausuma apstākļos dienvidu kanjonā augošai populācijai pieauga pilna izmēra elementu skaits, bet REMAP datu analīze ar PCA testu nodalīja šīs populācijas (Kalendar *et al.* 2000). IRAP amplifikācijas joslu skaita izmaiņas līdz ar ģeogrāfisko izcelsmi ir aprakstītas arī citos pētījumos, piemēram, *Aegilops tauschii* pētījumā noteica augstu daudzveidības pakāpi visām pētītajām sugām, bet amplifikācijas fragmentu skaits bija palielināts ziemeļrietumu izcelsmes sugām (Saeidi *et al.* 2008). Retrotranspozonu inserciju polimorfisms netieši atspoguļo retroelementu kopiju skaitu genomā (Baumel *et al.* 2002; Kentner *et al.* 2003; Li *et al.* 2004; Bousios *et al.* 2010), protams precīzai kopiju skaita noteikšanai izmanto citas metodes. Tomēr, šie rezultāti sniedz ieskatu retotranspozonu nosacītā variācijas pakāpē un daudzveidībā dabīgā priedes populācijā.

#### 4.5. Kailsēkļu filoģenētiskā analīze

Kailsēkļu dzimtu filoģenētiskās saistības molekulārajā līmenī ir labi izpētītas izmantojot rbcL (Chase *et al.* 1993; Hasebe *et al.* 1992), 18S rRNS (Chaw *et al.* 1997), 28S rRNS sekvenču (Stefanovic *et al.* 1998), kodola un plastīdu mazo subvienību rRNS (Troitsky *et al.* 1991), mitohondriju gēnu sekvenču salīdzināšanu (Bowe *et al.* 2000; Ran *et al.* 2010). Skujkoku filoģenētiskās analīzes ir veiktas arī izmantojot nespecifisku retrotranspozonu *Copia* un *Gypsy* RT domēnu sekvenču salīdzināšanu (Friesen *et al.* 2001). Pie kailsēkļiem pieder skujkoku, ginku, cikadeju un gnetu apakšklases (Christenhusz *et al.* 2011). Savukārt skujkoki satur araukāriju (*Araucariales*), ciprešu (*Cupressales*) un priežu (*Pinales*) rindas. Priežu rindā ir priežu (*Pinaceae*) dzimta, un tā iedalās 11 ģintīs (*Cedrus*, *Pinus*, *Cathaya*, *Picea*, *Pseudotsuga*, *Larix*, *Pseudolarix*, *Tsuga*, *Nothotsuga*, *Keteleeria*, *Abies*). Priedes iedala divās apakšģintīs *Pinus* (iekļauj nodalījumus *Pinus* (*Pinus*, *Pinaster*); *Trifoliae* (*Contortrae*, *Ponderosae*, *Australes*) un *Strobis* (iekļauj nodalījumus *Parrya* (*Balfourianae*, *Cembroides*, *Nelsoniae*), *Quinquefoliae* (*Gerardiana*,

*Krempfianae, Strobis*)) (Gernandt *et al.* 2005). Kailsēkļi ir monofilētiska augu grupa (Donoghue, Doyle 2000). Ginku un cikadeju apakšklases ir radniecīgas, ko apstiprina vairākas uz molekulārajiem datiem balstītas filoģenētiskās analīzes, lai gan ginks un cikadejas biežāk sajaucas ar skujkokiem, nekā atšķirīgākā gnetu klase. Sākotnēji balstoties uz morfoloģiskajiem datiem, ginku un skujkoku taksonus uzskatīja par radniecīgiem (Parenti 1980; Crane 1985; Doyle, Donoghue 1986 - pēc Chaw *et al.* 1997). Pašlaik ginkus klasificē atsevišķā apakšklasē, tomēr, arī balsoties uz molekulāro pētījumu datiem, šī klase ir radniecīgāka *Pinaceae* nekā citas (Chaw *et al.* 1997; Bowe *et al.* 2000). Šajā pētījumā par ārējās grupas pārstāvjiem izvēlēta viena *Ginkgoideae* un četras *Cycadidae* apakšklases sugas, kā arī skujkoku rindas *Araucariales* četras sugas un septiņas *Cupressales* rindas sugas. Šo taksonu pārstāvji savā starpā pārsvarā veidoja atsevišķus klāsterus.

Skujkoki ir arī augsti monofilētiski (Raubeson, Jansen 1992; Bowe *et al.* 2000; Kan *et al.* 2007). Tomēr, dzimtas iekšienē filoģenētiskās attiecības līdz galam nav noskaidrotas, piemēram, nav zināms kura ģints ir senākā (Raubeson, Jansen 1992; Bowe *et al.* 2000; Donoghue, Doyle 2000). Zināms, ka priedes, egles, *Cathaya*, duglāzijas un lapegles ģintis nodalās no balteglu, hemlokeglu, *Keteleeria*, *Nothotsuga*, *Pseudolarix* ģintīm, bet ciedru ģints veido atsevišķu atzarojumu (Wang *et al.* 2000). ITS struktūras, SSR pētījums nodalīja lapegļu un duglāziju klāsteri no priežu, egļu un *Cathaya* (Kan *et al.* 2007). Šajā pētījumā dažas no lapeglēm klāsterizējas savā starpā un ar balteglēm, taču neveidojās saistības ar duglāzijām, kuras bija pārstāvētas tikai ar vienu sugu.

Uz 18 kodola gēnu sekvencēm balstīts pētījums 10 priežu sugām (Palmé *et al.* 2009), sīkāk nodalīja *Pinus* un *Strobis* priežu apakšģintis. Saskaņā ar Palmé *et al.* (2009), filoģenētisko analīžu dendrogramās priežu *Pinus* apakšģintī, *Conkortae* nodalījuma *P.contorta* un *P.banksiana* klāsterizējas kopā, tāpat *P.sylvestris* un *P.nigra* veido klāsteri. Mūsu pētījumā *Strobis* apakšģints *Cembrae* nodalījums ir pārstāvēts ar *P.cembra*, *P.pumila*, *P.koraiensis*, *P.sibirica*, kas klāsterizējas kopā gan specifisko TE-līdzīgo marķieru datu dendrogramā, gan nespecifisko IRAP praimeru dendrogramā, kur klāsterim pievienojas arī *Strobis* nodalījuma *P.strobis* un *P.peuce*. Specifiskie TE-līdzīgo marķieru dati izšķīra tikai priedes ģinti, kas skaidrojams ar priedes marķieru specifiskumu un datu nelielo apjomu. IRAP nespecifiskie marķieri atsevišķos klāsteros nodalīja arī egles un baltegles, lai gan klāsteru varbūtības vērtības nebija augstas. Tāpat, IRAP marķieru konstruēšanā izmantoti hipotētiskiem LTR komplementāri praimeru, kas var neatbilst reālo un izplatītāko priežu retrotranspozonu LTR sekvencēm. Taču rezultāti rāda, ka uz retrotranspozonu sekvenču pamata veidotiem marķieriem kailsēkļu filoģenētiskajos pētījumos ir potenciāls, jo metode atspoguļo nekodējošas genoma daļas polimorfismu un var sniegt papildus informāciju par taksonu filoģenētiskajām saistībām.

## 5. Secinājumi

1. Ar nespecifisko iPBS metodi ir iespējams identificēt retrotranspozonu transkriptus, kā arī tos saturošus himēriskus transkriptus, bez iepriekšējās informācijas par sugai specifiskām retrotranspozonu sekvencēm.
2. Retrotranspozoniem-līdzīgas sekvenses tiek diferenciāli ekspresētas *Pinus sylvestris* genomā karstuma, priežu hermesa invāzijas un hormonu apstrādes ietekmē.
3. Starp segsēkļiem un kailsēkļiem augsti konservatīvi retrotranspozoniem-līdzīgie transkripti nenorāda uz homologa retrotranspozona transkripciju *P.sylvestris* genomā. Uz skujkoku transkripcionāli aktīviem retrotranspozoniem norāda transkripti, kas ir vāji līdzīgi segsēkļu retrotranspozoniem.
4. Ir identificēti hloroplastam homologi transkripti (SA07, ABA03, ABA02, B153, SA01) ar izcelsmi no kodola genoma hloroplasta sekvenču insercijām. Hloroplastam homologām sekvencēm ir noteikts augsts ekspresijas līmeņa pieaugums priežu hermesa invāzijas rezultātā, kā arī karstuma stresa ietekmē. Ir identificēts himērisks transkripts B153 saturošs gan hloroplasta, gan retrotranspozona sekvenses.
5. Ir identificēts pilna izmēra elements psTE283, kurš tiek transkribēts karstuma stresa ietekmē, pēc kukaiņu invāzijas un pēc apstrādes ar ABA un SA. psTE283 pieder LTR *Gypsy* retrotranspozoniem un ir homologs *P.taeda PtAppalachian\_I* elementam. psTE283 pilna izmēra elementa transkripti nāk no dažādām vietām *P.sylvestris* genomā, bet tā hipotētiskais ORF satur mutācijas, kas norāda uz ierobežotām transpozīcijas iespējām šim elementam. Uz psTE283 elementa senu evolucionāru izcelsmi norāda tā izplatība attāliem kailsēkļu taksoniem, tādiem kā *Cycadales* un *Gingkoales* klašu pārstāvjiem.
6. Identificēti ptTE101 un ptTE121 homologi pilna izmēra transkripti arī tiek ekspresēti *P.sylvestris* karstumam pakļautiem stādiem un pēc struktūras pieder *Copia* LTR retrotranspozoniem. PtTE121 tiek ekspresēts arī priežu hermesa invāzijas un SA apstrādes ietekmē. Šie elementi ir īpaši izplatīti priežu ģints pārstāvjiem, kas norāda uz to neseno izcelsmi.
7. Tika konstruēti deviņi IRAP marķieri, kas *P.sylvestris* genomā atklāj augstu ģenētisko daudzveidību vienas populācijas iekšienē un spēj nodalīt individuus augošus atšķirīgos

mitruma režīma apstākļos. Atšķirības amplifikācijā starp dažādām grupām ir būtiskas šajā pētījumā izstrādātajiem marķieriem IR\_2, IR\_5, IR\_6, IR\_7.

8. Viena klona dažādu indivīdu IRAP analīze norāda uz nesenu transpozīcijas gadījumu un aktīvo elementu esamību *P.sylvestris* genomā. Polimorfo fragmentu sekvenēšana identificēja *Copia-17-Pab-I* LTR retrotranspozona daļas.
9. Izmantojot *P.sylvestris* specifiskus retrotranspozonu marķierus un IRAP marķierus ir iespējams atklāt jaunas filoģenētiskās saistības starp kailsēkļu taksoniem.

## 6. Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes

1. *P.sylvestris* genoms satur transkripcionāli un transpozicionāli aktīvus retrotranspozonus.
2. Transkripcionāli aktīvie retrotranspozoni un ar tiem saistītās sekvenču diferencēšanas abiotiskā un biotiskā stresa ietekmē.
3. Nelabvēlīgo vides apstākļu ietekmē *P.sylvestris* genomā notiek jaunas retrotranspozīcijas un, iespējams, arī elementu ekspansija.
4. *P.sylvestris* retrotranspozoni ir nevienmērīgi izplatīti skujkoku vidū.

## 7. Pateicības

Esmu pateicīga darba vadītājam Dr. biol. Dainim Ruņģim par līdzdalību darbā gūto rezultātu izprašanā un vērtīgiem padomiem darba izstrādāšanas gaitā.

Izsaku pateicību LVMI „Silava” Ģenētisko resursu centra darbiniekiem un īpaši Dr.chem. Ilzei Veinbergai par sniegto atbalstu un iedrošināšanu izstrādāt šo pētījumu, Dr. biol. Agnesei Gailītei, Mg. math. Anitai Gailei, Dr. silv. Vilnim Šķiparam, Mg. biol. Viktorijai Beļēvičai par sniegtajiem padomiem un praktisku palīdzību eksperimentu izstrādāšanas un darba uzrakstīšanas gaitā.

Pateicos LVMI „Silava” Meža selekcijas grupas darbiniekiem un īpaši Dr. silv. Imantam Baumanim par priežu ramentu materiāla nodrošinājumu. Esmu pateicīga Dr. silv. Ārim Jansonam par iedziļināšanos pētījuma problemātikā un līdzdalību nepieciešamo priežu audžu identificēšanā un eksperimentālo paraugu iegūšanā. Pateicos Mg. biol. Mārtiņam Zepam par profesionālo palīdzību priežu uzmērīšanā.

Pateicos Dr. biol. Nilam Rostokam un viņa darba grupai par ātru un efektīvu palīdzību klonēšanas un transformēšanas metodikas apgūšanā, kā arī par sniegtajiem padomiem darba izstrādāšanas gaitā.

Pateicos Helsinku Universitātes profesoram un Augu genomikas laboratorijas vadītājam Dr. Alanam Šulmanim un viņa darba grupai par iedrošināšanu izstrādāt šo darbu un sniegtajām zināšanām par augu retrotranspozoniem un to analizēšanas iespējām. Pateicos docentam Ruslanam Kalendaram par atļauju izmantot viņa konstruētos nespecifiskos PBS praimerus pirms to publicēšanas.

Izsaku pateicību Nacionālā Botāniskā dārza Dendrofloras nodaļas vadītājai Lindai Strodei un darbiniecei Inesei Graudiņai par palīdzību skujkoku sugu noteikšanā. Pateicos Latvijas Universitātes Botāniska dārza personālam par palīdzību eksotisko kailsēkļu sugu noteikšanā.

Pētījuma lielākā daļa ir finansēta ESF projekta „Ģenētisko faktoru nozīme adaptētās spējīgu un pēc koksnes īpašībām kvalitatīvu mežaudžu izveidē” (Nr. 2009/0200/1DP/1.1.1.2.0/09/APIA/VIAA/146) ietvaros.



## Literatūras saraksts

- 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, Kang HM, Marth GT, McVean GA (2012) An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 491(7422): 56-65
- Aertsen A, Michiels CW (2005) Diversify or die: generation of diversity in response to stress. *Crit Rev Microbiol.* 31: 69–78
- Altinkut A, Raskina O, Nevo E, Belyayev A (2006) *En/Spm*-like transposons in *Poaceae* species: transposase sequence variability and chromosomal distribution. *Cell Mol Biol Lett* 11(2):214-30
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410
- Aronovich EL, Scott McIvor R, Hackett PB (2011) The *Sleeping Beauty* transposon system: a non-viral vector for gene therapy. *Hum Mol Genet.* doi:10.1093/hmg/ddr140
- Asif JM, Othman FY (2005) Characterization of fusarium wilt-resistant and fusarium wilt-susceptible somaclones of banana cultivar rastali (Musa AAB) by random amplified polymorphic DNA and retrotransposon markers. *Plant Molecular Biology Reporter* 23(3): 241-249
- Aye M, Irwin B, Beliakova-Bethell N, Chen E, Garrus J, Sandmeyer S (2004) Host factors that affect *Ty3* retrotransposition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 168: 1159-1176
- Babushok DV, Kazazian HH (2007) Progress in understanding the biology of the human mutagen LINE-1. *Human mutation* 28(6): 527-539
- Bairu MW, Aremu AO, Staden JV (2011) Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul* 63: 147-173
- Ball P (2013) DNA Celebrate the unknowns. *Nature* 496: 419-420
- Baltimore D (1995) Discovery of the reverse transcriptase. *FASEB Journal* 9: 1660-1663
- Baranek M, Meszaros M, Sochorova J, Cechova J, Raddova J (2012) Utility of retrotransposon-derived marker systems for differentiation of presumed clones of the apricot cultivar Velkopavlovická. *Scientia Horticulturae*, 143: 1-6
- Baucom RS, Estill JC, Chaparro C, Upshaw N, Jogi A, Deragon J, Westerman RP, Sanmiguel PJ, Bennetzen JL (2009a) Exceptional diversity, non-random distribution, and rapid evolution of retroelements in the B73 maize genome. *PLoS Genet.* doi:10.1371/journal.pgen.1000732
- Baucom RS, Estill JC, Leebens-Mack J, Bennetzen JL (2009b) Natural selection on gene function drives the evolution of LTR retrotransposon families in the rice genome. *Genome Res* 19(2): 243-254



- Baumanis I, Veinberga I, Ļubinskis L, Ruņģis D, Jansons Ā (2012) Parastās priedes (*Pinus sylvestris* L.) plantāciju sēklu kvalitāte un ģenētiskā daudzveidība mainīgos vides apstākļos. *Mežzinātne* 26(59): 74-87
- Baumel A, Ainouche M, Kalendar R, Schulman AH (2002) Retrotransposons and Genomic Stability in Populations of the Young Allopolyploid Species *Spartina anglica* C.E. Hubbard (*Poaceae*). *Mol Biol Evol* 19(8): 1218-1227
- Bayram E, Yilmaz S, Hamat-Mecbur H, Kartal-Alacam G, Gozukirmizi N (2012) *Nikita* retrotransposon movements in callus cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.) *POJ* 5(3): 211-215
- Beaulieu JM, Leitch IJ, Knight CA (2007) Genome size evolution in relation to leaf strategy and metabolic rates revisited. *Ann Bot* 99(3): 495-505
- Beguiristain T, Grandbastien MA, Puigdomènech P, Casacuberta JM (2001) Three *Tnt1* Subfamilies Show Different Stress-Associated Patterns of Expression in Tobacco. Consequences for Retrotransposon Control and Evolution in Plants. *Plant Physiol* 127: 212-221
- Beliakova-Bethell N, Beckham C, Giddings TH Jr, Winey M, Parker R, Sandmeyer S (2006) Virus-like particles of the *Ty3* retrotransposon assemble in association with P-body components. *RNA* 12(1): 94-101
- Benachou F, Sperber GO, Bongcam-Rudloff E, Andersson G, Boeke JD, Blomberg J (2013) Conserved structure and inferred evolutionary history of long terminal repeats (LTRs). *Mobile DNA*. doi: 10.1186/1759-8753-4-5
- Bennet MD (1972) Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. *Proc R Soc B* 181: 109-135
- Bennet MD (1998) Plant genome values: how much do we know? *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2011-2016
- Bennett MD, Leitch IJ (2005) Plant Genome Size Research: a field in Focus. *Ann Bot* 95: 1-6
- Bennett MD, Smith JB (1976) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philos Trans Roy Soc B* 274: 227-274
- Bennetzen JL, Kellogg EA (1997) Do Plants Have a One-Way Ticket to Genomic Obesity? *Plant Cell* 9(9): 1509-1514
- Bennetzen JL, Ma J, Devos KM (2005) Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. *Ann Bot* 95(1): 127-32
- Bennetzen JL, Schrick K, Springer PS, Brown WE, SanMiguel P (1994) Active maize genes are unmodified and flanked by diverse classes of modified, highly repetitive DNA. *Genome* 37(4): 565-76

- Berg DE, Howe MH (1989) *Mobile DNA* (American Society for Microbiology Press, Washington, DC).
- Betran E, Thornton K, Long M. (2002) Retroposed new genes out of the X in *Drosophila*. *Genome Res* 12: 1854–1859.
- Biémont C (2010) A Brief History of the Status of Transposable Elements: From Junk DNA to Major Players in Evolution. *Genetics* 186: 1085–1093
- Biessmann H, Mason JM (2003) Telomerase-independent mechanisms of telomere elongation. *Cell Mol Life Sci* 60:2325–2333
- Biessmann H., Champion LE, O'Hair M, Ikenaga K, Kasravi B, Mason JM (1992) Frequent transpositions of *Drosophila melanogaster* HeT-A transposable elements to receding chromosome ends. *EMBO J.* 11: 4459–4469
- Bijlsma R, Loeschcke V (1997) Environmental stress, adaptation and evolution: an overview. *Journal of Evolutionary Biology* 18(4): 744-749
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-1523
- Boeke JD, Eickbush T, Sandmeyer SB, and Voytas DF (2006) Index of Viruses – *Pseudoviridae*. ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C (Ed), Columbia University, New York, USA.
- Boeke JD, Eickbush T, Sandmeyer SB, Voytas DF (1998) Metaviridae, in Murphy FA (ed): *Virus Taxonomy: ICTV VIIth Report* (Springer, New York).
- Boerkoel CF, Kung HJ (1992) Transcriptional interaction between retroviral long terminal repeats (LTRs): mechanism of 5' LTR suppression and 3' LTR promoter activation of c-myc in avian B-cell lymphomas. *J Virol* 66(8): 4814-23
- Bogunic F, Muratovic E, Ballian D, Siljak-Yakovlev S, Brown S (2007) Genome size stability among five subspecies of *Pinus nigra* Arnold s.l. *Environmental and Experimental Botany* 59:354-360
- Bogunic F, Muratovic E, Brown SC, Silijak-Yakovlev S (2003) Genome size of five *Pinus* from Balkan region. *Plant Cell Rep.* 22: 59-63
- Bousios A, Waxman D, Pearce SR (2010) Absence of close-facing retrotransposons: A comparison of molecular data and theory. *Theor Biol J* 264: 205-210
- Boutabout M, Wilhelm M, Wilhelm F-X (2001) DNA synthesis fidelity by the reverse transcriptase of the yeast retrotransposon *Ty1*. *Nucleic Acids Res* 29: 2217–2222
- Boutin TS, Rouzic A, Capy P (2012) How does selfing affect the dynamics of selfish transposable elements? *Mobile DNA* doi: 10.1186/1759-8753-3-5.

- Bowe LM, Coat G, dePamphilis CW (2000) Phylogeny of seed plants based on all three genomic compartments: extant gymnosperms are monophyletic and Gnetales' closest relatives are conifers. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(8): 4092-4097
- Bowers JE, Chapman BA, Rong J, Paterson AH (2003) Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. *Nature* 422(6930): 433-438
- Brandes A, Heslop-Harrison JS, Kamm A, Kubis S, Doudrick RL, Schmidt T (1997) Comparative analysis of the chromosomal and genomic organization of *Ty1-copia*-like retrotransposons in pteridophytes, gymnosperms and angiosperms. *Plant Mol Biol* 33(1): 11-21
- Brierley C, Flavell AJ (1990) The retrotransposon *copia* controls the relative levels of its gene products post-transcriptionally by differential expression from its two major mRNAs. *Nucleic Acids Res* 18: 2947–2951
- Brillet B, Bigot Y, Auge-Gouillou C (2007) Assembly of the *Tc1* and mariner transposition initiation complexes depends on the origins of their transposase DNA binding domains. *Genetica* 130(2): 105-120
- Brosius J (1991) Retroposons--seeds of evolution. *Science*. doi:10.1126/science.1990437
- Brosius J (1999) RNAs from all categories generate retrosequences that may be exapted as novel genes or regulatory elements. *Gene* 238: 115–134
- Brown GR, Kadel EE, Bassoni DL, Kiehne KL, Temesgen B, Buijtenen JP, Sewell MM, Marshall KA, Neale DB (2001) Anchored reference loci in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) for integrating pine genomics. *Genetics* 159: 799–809
- Brunner S, Fengler K, Morgante M, Tingey S, Rafalski A (2005) Evolution of DNA sequence nonhomologies among maize inbreds. *Plant Cell* 17: 343-360
- Bureau TE, Wessler SR (1992) *Tourist*: a large family of inverted-repeat element frequently associated with maize genes. *Plant Cell* 4: 1283–1294
- Buschiazzo E, Ritland C, Bohlmann J, Ritland K (2012) Slow but not low: genomic comparisons reveal slower evolutionary rate and higher dN/dS in conifers compared to angiosperms. *BMC Evol Biol*. doi:10.1186/1471-2148-12-8
- Butelli E, Licciardello C, Zhang Y, Liu J, Mackay S, Bailey P, Reforgiato-Recupero G, Martin C (2012) Retrotransposons Control Fruit-Specific, Cold-Dependent Accumulation of Anthocyanins in Blood Oranges. *Plant Cell* 24:1242–1255
- Campbell BC, LeMare S, Piperidis G, Godwin ID (2011) IRAP, a retrotransposon-based marker system for the detection of somaclonal variation in barley. *Mol Breeding* 27:193-206

- Cappello J, Handelsman K, Lodish H (1985) Sequence of Dictyostelium *DIRS-1*: an apparent retrotransposon with inverted terminal repeats and an internal circle junction sequence. *Cell* 43: 105–115
- Capy P (2005) Classification and nomenclature of retrotransposable elements. *Cytogenet Genome Res* 110(1-4):457-461
- Capy P, Anxolabéhère D, Langin T (1994) The strange phylogenies of transposable elements: are horizontal transfers the only explanation? *Trends Genet* 10: 7-12
- Capy P, Bazin C, Higuët D, Langin T (1997) *Dynamic and Evolution of Transposable Elements*. RG Landes Company, Austin, Texas, USA
- Capy P, Gasperi G, Biemont C, Bazin C (2000) Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? *Heredity* 85:101-106
- Carlson CM, Largaespada DA (2005) Insertional mutagenesis in mice: new perspectives and tools. *Nat Rev Genet* 6 (7): 568–580
- Carvalho A, Guedes-Pinto H, Lima-Brito JE (2012) Genetic Diversity in Old Portuguese Durum Wheat Cultivars Assessed by Retrotransposon-Based Markers. *Plant Mol Biol Rep* 30: 578-589
- Casacuberta E, Pardue M (2003) Transposon telomeres are widely distributed in the *Drosophila* genus: TART elements in the virilis group. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:3363–3368
- Castro I, D'Onofrio C, Martín JP, Ortiz JM, De Lorenzis G, Ferreira V, Pinto-Carnide O (2012) Effectiveness of AFLPs and retrotransposon-based markers for the identification of Portuguese grapevine cultivars and clones. *Mol Biotechnol.* 52(1): 26-39
- Cermak T, Kubat Z, Hobza R, Koblizkova A, Widmer A, Macas J, Vyskot B, Kejnovsky E (2008) Survey of repetitive sequences in *Silene latifolia* with respect to their distribution on sex chromosomes. *Chromosome Res* 16: 961–976
- Chang S, Puryear J, Cairney J (1993) A simple and efficient method for Isolating RNA from Pine trees. *Plant molecular Biology Reporter* 11(2): 113-116.
- Chang S, Puryear J, Cairney J (1993) A Simple and Efficient Method for Isolating RNA from Pine Trees. *Plant Mol Biol Rep* 11(2):113-116
- Charlesworth D, Charlesworth B (1995) Transposable elements in inbreeding and outbreeding populations. *Genetics* 140: 415-417
- Chase MW, Soltis DE, Olmstead RG *et al.* (1993) DNA sequence phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Ann MO Bot Gard* 80: 528-580

- Chaw SM, Zharkikh A, Sung HM, Lau TC, Li WH (1997) Molecular phylogeny of extant gymnosperms and seed plant evolution: analysis of nuclear 18S rRNA sequences. *Mol Biol Evol* 14(1): 56-68
- Chen J, Källman T, Gyllenstrand N, Lascoux M (2010) New insights on the speciation history and nucleotide diversity of three boreal spruce species and a Tertiary relict. *Heredity* 104: 3-14
- Cheng Z, Dong F, Langdon T, Ouyang S, Buell CR, Gu M, Blattner FR, Jiang J (2002) Functional rice centromeres are marked by a satellite repeat and a centromere-specific retrotransposon. *Plant Cell* 14: 1691–1704
- Chopra S, Brendel V, Zhang J, Axtell JD, Peterson T (1999) Molecular characterization of a mutable pigmentation phenotype and isolation of the first active transposable element from *Sorghum bicolor*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:15330–15335
- Christenhusz MJM, Reveal JL, Farjon A, Gardner MF, Mill RR, Chase MW (2011) A new classification and linear sequence of extant gymnosperms. *Phytotaxa* 19: 55-70
- Cohen CJ, Lock WM, Marger DL (2009) Endogenous retroviral LTRs as promoters for human genes: A critical assessment. *Gene* 448: 105-114
- containing high polysaccharides and polyphenol component. *Plant Molecular Biology Reporter* 15: 8-15
- Cordaux R, Udit S, Batzer MA, Feschotte C (2006) Birth of a chimeric primate gene by capture of the transposase gene from a mobile element. *Proc Natl Acad Sci* 103: 8101–8106
- Corpet F (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16(22): 10881-10890
- Cossu RM, Buti M, Giordani T, Natali L, Cavallini A (2012) A computational study of the dynamics of LTR Retrotransposons in the *Populus trichocarpa* genome. *Tree Genet Genomes* 8(1):61-75
- Cost GJ, Feng Q, Jacquier A, Boeke JD (2002) Human L1 element target-primed reverse transcription in vitro. *Embo J* 21: 5899-5910
- Cui Y, Barampuram S, Stacey MG, Hancock CN, Findley S, Mathieu M, Zhang Z, Parrott WA, Stacey G (2013) *Tnt1* Retrotransposon Mutagenesis: A Tool for Soybean Functional Genomics. *Plant Physiol.* 161(1): 36-47
- Curcio M., Derbyshire, K. (2003). The outs and ins of transposition: from mu to kangaroo. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 865–877
- D’Onofrio C, De Lorenzis G, Giordani T, Natali L, Cavallini A, Scalabrelli G (2010) Retrotransposon-based molecular markers for grapevine species and cultivars identification. *Tree Genetics&Genomes* 6: 451-466

- Dai J, Xie W, Brady TL, Gao J, Voytas DF (2007) Phosphorylation regulates integration of the yeast *Ty5* retrotransposon into heterochromatin. *Mol Cell* 27(2): 289-299
- Danilevskaya N, Arkhipova IR, Traverse KL, Pardue ML (1997) Promoting in tandem: the promoter for telomere transposon HeT-A and implications for the evolution of retroviral LTRs. *Cell* 88: 647–655
- Devey ME, Sewell MM, Uren TL, Neale DB (1999) Comparative mapping in loblolly and radiata pine using RFLP and microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 99: 656–662
- Devos KM, Brown JKM, Bennetzen JL (2002) Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in *Arabidopsis*. *Genome Res* 12: 1075–1079
- Dewannieux M, Esnault C, Heidmann T (2003) LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat Genet* 35(1):41-8
- Dietrich CR, Cui F, Packila ML, Li J, Ashlock DA, Nikolau BJ, Schnable PS (2002) Maize *Mu* transposons are targeted to the 5' untranslated region of the *gl8* gene and sequences flanking *Mu* target-site duplications exhibit nonrandom nucleotide composition throughout the genome. *Genetics* 160: 697–716
- Domingues DS, Cruz GMQ, Metcalfe CJ, Nogueira FTS, Vicentini R, Alves C, Sluys M (2012) Analysis of plant LTR-Retrotransposons at the fine scale family level reveals individual molecular patterns. *BMC Genomics*. doi:10.1186/1471-2164-13-137
- Donoghue MJ, Doyle JA (2000) Seed Plant Phylogeny: Demise of the Anthophyte Hypothesis. *Curr Biol* 10(3): R106-R109
- Doolittle WF, Sapienza C (1980) Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* 284: 601–603
- Du C, Fefelova N, Caronna J, He L, Dooner HK (2009) The polychromatic *Helitron* landscape of the maize genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 19916–19921
- Du J, Tian Z, Hans CS, Laten HM, Cannon SB, Jackson SA, Shoemaker RC, Ma J (2010) Evolutionary conservation, diversity and specificity of LTR-retrotransposons in flowering plants: insights from genome-wide analysis and multi-specific comparison. *Plant J*. 63(4): 584-598
- Dupuy AJ (2010) Transposon-based screens for cancer gene discovery in mouse models. *Semin Cancer Biol* 20 (4):261–268
- Durrant WE, Dong X (2004) Systemic Acquired Resistance. *Annu Rev Phytopathol* 42:185-209
- Dvornyk V, Sirvio A, Mikkonen M, Savolainen O (2002) Low nucleotide diversity at the *pal1* locus in the widely distributed *Pinus sylvestris*. *Mol Biol Evol* 19:179–199

- Echenique V, Stamova B, Wolters P, Lazo G, Carollo VL, Dubcovsky J (2002) Frequencies of *Ty1-copia* and *Ty3-gypsy* retroelements within the *Triticeae* EST databases. *Theor Appl Genet* 104:840–844
- Eichenbaum Z, Livneh Z (1998) UV light induces IS10 transposition in *Escherichia coli*. *Genetics* 149(3): 1173-1181
- Eickbush TH, Jamburuthugoda VK (2008) The diversity of Retrotransposons and the properties of their reverse transcriptases. *Virus Res* 134: 221-234
- Eickbush TH, Malik HS (2002) Origins and evolution of retrotransposons. *Mobile DNA II*. Ed. Craig NL, Craigie R, Gellert M, Lambowitz AL, Washington DC. ASM press 1111-1144.
- Emerson JJ, Kaessmann H, Betran E, Long M (2004) Extensive gene traffic on the mammalian X chromosome. *Science* 303: 537–540
- Esnault C, Maestre J, Heidmann T (2000) Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nat Genet* 24(4): 363-367
- Evgen'ev M, Zelentsova H, Shostak N, Kozitsina M, Barskyi V, Lankenau DH, Corces VG (1997) *Penelope*, a new family of transposable elements and its possible role in hybrid dysgenesis in *Drosophila virilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 196–201
- Fehér T, Bogos B, Méhi O, Fekete G, Csörge B, Kovács K, Pósfai G, Papp B, Hurst LD, Pál C (2012) Competition between transposable elements and mutator genes in bacteria. *Mol Biol Evol.* 29(10): 3153-3159
- Feng G, Leem Y, Levin HL (2012) Transposon integration enhances expression of stress response genes. *Nucleic Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gks1185
- Feschotte C, Jiang N, Wessler SR (2002) Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nature Reviews, Genetics* 3: 329-341
- Finnegan DJ (1989) Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet* 5: 103–107
- Finnegan DJ (1992) Transposable elements. In *The genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, New York.
- Finnegan EJ, Genger RK, Peacock WJ, Dennis ES (1998) DNA Methylation in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:223-247
- Flavell AJ, Dunbar E, Anderson R, Pearce SR, Hartley R, Kumar A (1992) *Ty1-copia* group Retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants. *Nucleic Acids Res* 20:3639–3644

- Flavell AJ, Knox MR, Pearce SR, Ellis THN (1998) Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis. *Plant J* 16: 643–650
- Flavell AJ, Pearce SR, Kumar A (1994) Plant transposable elements and the genome. *Curr Opin Genet Dev* 4: 838–844
- Foster PL (2007) Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 42: 373–397
- Francki MG (2001) Identification of *Bilby*, a diverged centromeric *Ty1-copia* retrotransposon family from cereal rye (*Secale cereale* L.). *Genome* 44: 266–274
- Friesen N, Brandes A, Heslop-Harrison JS (2001) Diversity, Origin and Distribution of Retrotransposons (*gypsy* and *copia*) in Conifers. *Mol Biol Evol* 18(7): 1176-1188
- Fuchs J, Jovtchev G, Schubert I (2008) The chromosomal distribution of histone methylation marks in gymnosperms differs from that of angiosperms. *Chromosome Res* 16(6): 891-898
- Fukai E, Soyano T, Umehara Y, Nakayama S, Hirakawa H, Tabata S, Sato S, Hayashi M (2011) Establishment of a *Lotus japonicus* gene tagging population using the exon-targeting endogenous retrotransposon LORE1. *Plant J.* doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04826.x.
- Gabriel A, Mules EH (1999) Fidelity of Retrotransposon Replication. *Ann N Y Acad Sci* 18: 108-118
- Gai X, Voytas DF (1998) A single amino acid change in the yeast retrotransposon *Ty5* abolishes targeting to silent chromatin. *Mol Cell* 1: 1051-1055
- Gama Sosa MA, Rosas DH, DeGasperi R, Morita E, Hutchison MR, Ruprecht RM (1994) Negative regulation of the 5' long terminal repeat (LTR) by the 3' LTR in the murine proviral genome. *J Virol* 68(4): 2662–2670
- Gao D, Chen J, Chen M, Meyers BC, Jackson S (2012) A Highly Conserved, Small LTR Retrotransposon that Preferentially Targets Genes in Grass Genomes. *PloS one* doi:10.1371/journal.pone.0032010
- Gao D, Gill N, Kim H, Walling JG, Zhang W, Fan C, Yu Y, Ma J, SanMiguel P, Jiang N et al (2009) A lineage-specific centromere retrotransposon in *Oryza brachyantha*. *Plant J* 60: 820–831
- Gent JI, Dong Y, Jiang J, Dawe RK (2012) Strong epigenetic similarity between maize centromeric and pericentromeric regions at the level of small RNAs, DNA methylation and H3 chromatin modifications. *Nucleic Acids Res* 40(4):1550-1560
- George JA, Burke WD, Eikbush TH (1996) Analysis of the 5' junctions of R2 insertions with the 25S gene: implications for non-LTR retrotransposition. *Genetics* 142: 853-863
- Gernandt DS, Lopez GG, Garcia SO, Liston A (2005) Phylogeny and classification of *Pinus*. *Taxon* 54: 29–42



- Giraud T, Capy P (1996) Somatic activity of the mariner transposable element in natural populations of *Drosophila simulans*. *Proc Biol Sci* 263(1376): 1481-1486
- Goodier JL, Zhang L, Vetter MR, Kazazian HH (2007) *LINE-1* ORF1 protein localizes in stress granules with other RNA-binding proteins, including components of RNA interference RNA-induced silencing complex. *Mol Cell Biol* 27: 6469-6483
- Gorinsek B, Gubensek F, Kordis D (2005) Phylogenomic analysis of chromoviruses. *Cytogenet. Genome Res.* 110: 543–552.
- Grandbastien MA, Audeon C, Casacuberta JM, Grappin P, Lucas H, Moreau C, Pouteau S (1994) Functional analysis of the tobacco *Tnt1* retrotransposon. *Genetica* 93(1-3): 181-189
- Grandbastien M-A, Lucas H, Morel JB, Corinne MC, Vernhettes S, Casacuberta JM (1997) The expression of the tobacco *Tnt1* Retrotransposon is linked to plant defense responses. *Genetica* 100:241–252
- Grandbastien MA, Spielmann A, Caboche M (1989) *Tnt1*, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics. *Nature* 337: 376 – 380
- Greenblatt IM, Brink RA (1962) Twin Mutations in Medium Variegated Pericarp Maize. *Genetics* 47(4): 489-501
- Griffith JL, Coleman LE, Raymond AS, Goodson SG, Pittard WS, Tsui C, Devine SE (2003) Functional genomics reveals relationships between the retrovirus-like *Ty1* element and its host *accharomyces cerevisiae*. *Genetics* 164: 867-879
- Grotkopp E, Rejmanek M, Sanderson MJ, Rost TL (2004) Evolution of genome size in pines (*Pinus*) and its life-history correlates: supertree analyses. *Evolution* 58: 1705–1729
- Guo X, Ruan S, Hu W, Cai D, Fan L (2008) Chloroplast DNA insertions into the nuclear genome of rice: the genes, sites and ages of insertion involved. *Funct Integr Genomics*. doi:10.1007/s10142-007-0067-2
- Hackett PB, Ekker SC, Largaespada DA, McIvor RS (2005) *Sleeping beauty* transposon-mediated gene therapy for prolonged expression. *Adv Genet Advances in Genetics* 54: 189–232
- Hall BG (1998) Adaptive mutagenesis: a process that generates almost exclusively beneficial mutations. *Genetica* 102-103(1-6): 109-125
- Han JS (2010) Non-long terminal repeat (non-LTR) retrotransposons: mechanisms, recent developments, and unanswered questions. *Mob DNA*. doi: 10.1186/1759-8753-1-15.
- Hannien H, Tanino K (2011) Tree seasonality in a warming climate. *Trends in Plant Science* 16: 312-416
- Hasebe M., Kofuji R, Ito M, Kato M, Iwatsuki K, Ueda K (1992) Phylogeny of gymnosperms inferred from *rbcL* gene sequences. *Bot Mag Tokyo* 105: 673-679

- Hashida S, Kitamura K, Mikami T, Kishima Y (2003) Temperature shift coordinately changes the activity and the methylation state of transposon Tam3 in *Antirrhinum majus*. *Plant Physiol* 132(3):1207-1216
- Havecker ER, Gao X, Voytas DF (2004) The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biology*. doi:10.1186/gb-2004-5-6-225
- Hawkins JS, Kim H, Nason JD, Wing RA, Wendel JF (2006) Differential lineage-specific amplification of transposable elements is responsible for genome size variation in *Gossypium*. *Genome Res* 16: 1252-1261
- Hawkins JS, Proulx SR, Rapp RA, Wendel JF (2009) Rapid DNA loss as a counterbalance to genome expansion through retrotransposon proliferation in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(42): 17811-17816
- He P, Ma Y, Zhao G, Dai H, Li H, Chang L, Zhang Z (2010) *FaRE1*: a transcriptionally active *Ty1-copia* Retrotransposon in strawberry. *J Plant Res* 123(5):707-714
- Heslop-Harrison JS, Brandes A, Taketa S, Schmidt T, Vershinin AV, Alkhimova EG, Kamm A, Doudrick RL, Schwarzacher T, Katsiotis A, Kubis S, Kumar A, Pearce SR, Flavell AJ, Harrison GE (1997) The chromosomal distribution of *Ty1-copia* group retrotransposable elements in higher plants and their implications for genome evolution. *Genetica* 100: 197–204
- Heuertz M, De Paoli E, Källman T, Larsson H, Jurman I, Morgante M, Lascoux M, Gyllenstrand N (2006) Multilocus patterns of nucleotide diversity, linkage disequilibrium and demographic history of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst]. *Genetics* 174(4): 2095-105
- Hirochika H (1993) Activation of tobacco Retrotransposons during tissue culture. *EMBO J* 12(6):2521-2528
- Hirochika H, Okamoto H, Kakutani T (2000) Silencing of retrotransposons in *Arabidopsis* and reactivation by the *ddm1* mutation. *Plant Cell* 12: 357-368
- Hoffman, A. A., and P. A. Parsons (1997) *Extreme environmental change and evolution*. Cambridge Univ Press, Cambridge, UK
- Hollister JD, Smith LM, Guo YL, Ott F, Weigel D, Gaut BS (2011) Transposable elements and small RNAs contribute to gene expression divergence between *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis lyrata*. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(6): 2322-2327
- Howe GT, Aitken SN, Neale DB, Jermstad KD, Wheeler NC, Chen TTH (2003) From genotype to phenotype: unraveling the complexities of cold adaptation in forest trees *Can J Bot* 81: 1247–1266

- Hudson ME, Lisch DR, Quail PH (2003) The FHY3 and FAR1 genes encode transposase-related proteins involved in regulation of gene expression by the phytochrome A-signaling pathway. *Plant J* 34: 453–471
- Hull R (2001) Classifying reverse transcribing elements: a proposal and a challenge to the ICTV. *Arch Virol* 146: 2255–2261
- Ichiiyanagi K (2013) Transposable elements in eukaryotic genomes: epigenetic regulation by the host and functionalization for the host. *Genes Genet Syst* 88(1): 1
- Ikeda R, Kokubu C, Yusa K, Keng VW, Horie K, Takeda J (2007) *Sleeping beauty* transposase has an affinity for heterochromatin conformation. *Mol Cell Biol* 27(5): 1665-1676
- Ilves H, Hõrak R, Kivisaar M (2001) Involvement of sigma (S) in starvation-induced transposition of *Pseudomonas putida* transposon *Tn4652*. *J Bacteriol* 183: 5445–5448
- Imasheva AG, Loeschke V, Zhivotovsky LA, Lazebny OE (1998) Stress temperatures and quantitative variation in *Drosophila melanogaster*. *Heredity (Edinb)*. 81(3): 246-253
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23–28
- Ito H, Gaubert H, Bucher E, Mirouze M, Vaillant I, Paszkowski J (2011) An siRNA pathway prevents transgenerational retrotransposition in plants subjected to stress. *Nature* 472:115-118
- Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvák Z (1997) Molecular reconstruction of *Sleeping Beauty*, a *Tc1*-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell* 91 (4): 501–510
- Izsvák Z, Ivics Z (2004) *Sleeping beauty* transposition: biology and applications for molecular therapy. *Mol Ther* 9 (2): 147–156.
- Jaakola L, Pirttilä AM, Vuosku J, Hohtola A (2004) Method based on electrophoresis and gel extraction for obtaining genomic DNA-free cDNA without DNase treatment. *Biotechniques* 37: 744–748
- Jaakola L, Pirttilä AM, Vuosku J, Hohtola A (2004) Method based on electrophoresis and gel extraction for obtaining genomic DNA-free cDNA without DNase treatment. *Biotechniques* 37(5): 744-748
- Jääskeläinen MJ, Mykkänen AH, Arna T, Vicient CM, Suoniemi A, Kalendar R (1999) Retrotransposon *BARE-1*: expression of encoded proteins and formation of virus-like particles in barley cells. *Plant J* 20: 413–422.
- Jansons Ā, Krišāns O, Jansons J (2011) Parastās priedes (*Pinus sylvestris* L.) augstuma pieauguma veidošanās sezonālā dinamika. *Mežzinātne* 23(56):15-24

- Jiang J, Birchler JA, Parrott WA, Dawe RK (2003(b)) A molecular view of plant centromeres. *Trends Plant Sci* 8: 570–575
- Jiang N, Bao Z, Zhang X, Hirochika H, Eddy SR, McCouch SR, Wessler SR (2003(a)) An active DNA transposon in rice. *Nature* 421: 163–166
- Jiang N, Wessler SR (2001) Insertion preference of maize and rice miniature inverted repeat transposable elements as revealed by the analysis of nested elements. *Plant Cell* 13: 2553–2564
- Jin YK, Bennetzen JL (1994) Integration and nonrandom mutation of a plasma membrane proton ATPase gene fragment within the *Bs1* retroelement of maize. *Plant Cell*. 6(8): 1177-1186
- Johns MA, Mottinger J, Freeling MA (1985) A low copy number, *copia*-like transposon in maize. *EMBO J*. 4, 1093 – 1102
- Jordan IK, Rogozin IB, Glazko GV, Koonin EV (2003) Origin of a substantial fraction of human regulatory sequences from transposable elements. *Trends Genet* 19: 68-72
- Jurka J (2005) OSHOOTER: *EnSpm*-type DNA transposon from rice. *Rebase Reports* 5(8):205-205
- Kalendar R, Antonius K, Smykal P, Schulman AH (2010) iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and Retrotransposon isolation. *Theor Appl Genet*. doi:10.1007/s00122-010-1398-2
- Kalendar R, Flavell AJ, Ellis TH, Sjakste T, Moisy C, Schulman AH (2011) Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. *Heredity (Edinb)*. 106(4): 520-530
- Kalendar R, Grob T, Regina M, Suoniemi A, Schulman A (1999) IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theor Appl Genet* 98: 704–711
- Kalendar R, Lee D, Schulman AH (2011) Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics* 98(2): 137-144
- Kalendar R, Schulman AH (2007) IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nat Protoc* 1(5): 2478-2484
- Kalendar R, Tanskanen J, Immonen S, Nevo E, Schulman AH (2000) Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by *BARE-1* Retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(12):6603-6607
- Kamm A, Doudric RL, Heslop-Harrison JS, Schmidt T (1996) The genomic and physical organization of *Ty1-copia*-like sequences as a component of large genomes in *Pinus elliottii* var. *elliottii* and other gymnosperms. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2708-2713
- Kan XZ, Wang SS, Ding X, Wang XQ (2007) Structural evolution of nrDNA ITS in *Pinaceae* and its phylogenetic implications. *Mol Phylogen Evol* 44(2): 765-777
- Kapitonov VV, Jurka J (2005) RAG1 core and V(D)J recombination signal sequences were derived from *Transib* transposons. *PLoS Biol*. doi:10.1371/journal.pbio.0030181

- Karhu A, Dieterich JH, Savolainen O (2000) Rapid Expansion of Microsatellite Sequences in Pines. *Mol Biol Evol* 17(2): 259-265
- Kasak L, Hõrak R, Kivisaar M (1997) Promoter-creating mutations in *Pseudomonas putida*: a model system for the study of mutation in starving bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3134–3139
- Kashkush K, Feldman M, Levy AA (2003) Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nat Genet* 33(1): 102-106.
- Kato H, Sriprasertsak P, Seki H, Ichinose Y, Shiraishi T, Yamada T (1999) Functional Analysis of Retrotransposons in Pea. *Plant Cell Physiol* 40(9): 933-41
- Kato M, Miura A, Bender J, Jacobsen SE, Kakutani T (2003) Role of CG and non-CG methylation in immobilization of transposons in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 13: 421-426
- Kazazian Jr HH (2004) Mobile elements: Drivers of genome evolution. *Science* 303: 1626–1632
- Kazazian Jr HH (2011) Mobile DNA finding treasure in junk. Pearson Education Inc. ISBN-10: 0-13-707062-4
- Kejnovsky E, Hawkins JS, Feschotte C (2012) Plant Transposons and Genome Dynamics in Evolution. Ed. Fedoroff NV, Wiley-Blackwell, US
- Kentner EK, Arnold ML, Wessler SR (2003) Characterization of High-Copy-Number Retrotransposons From the Large Genomes of the Louisiana Iris Species and Their Use as Molecular Markers. *Genetics* 164(2): 685-697
- Kidwell MG, Lisch DR (2001) Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution* 55(1): 1-24
- Kimura Y, Tosa Y, Shimada S, Sogo R, Kusaba M, Sunaga T, Betsuyaku S, Eto Y, Nakayashiki H, Mayama S (2001) *OARE-1*, a *Ty1-copia* Retrotransposon in Oat Activated by Abiotic and Biotic Stresses. *Plant Cell Physiol* 42 (12):1345-1354
- Kinlaw CS, Neale DB (1997) Complex gene families in pine genomes. *Trends Plant Sci* 2: 356–359
- Kivisaar M (2003) Stationary phase mutagenesis: mechanisms that accelerate adaptation of microbial populations under environmental stress. *Environmental Microbiology* 5(10): 814–827
- Klaver B, Berkhout B (1994) Comparison of 5' and 3' long terminal repeat promoter function in human immunodeficiency virus. *J Virol* 68(6): 3830-3840
- Klessig DF, Durner J, Noad R, Navarre DA, Wendehenne D, Kumar D, Zhou JM, Shah J, Zhang S, Kachroo P, Trifa Y, Pontier D, Lam E, Silva H (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(16): 8849-8855
- Knight CA, Ackerly DD (2002) Variation in nuclear DNA content across environmental gradients: a quantile regression analysis. *Ecology Letters* 5: 66-76

- Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Hirochika H (2004) Retrotransposon-Induced Mutations in Grape Skin Color. *Science* 304:982
- Koch MA, Haubold B, Mitchell-Olds T (2000) Comparative evolutionary analysis of chalcone synthase and alcohol dehydrogenase loci in *Arabidopsis*, *Arabis*, and related genera (*Brassicaceae*). *Mol Biol Evol* 17: 1483-1498
- Kohany O, Gentles AJ, Hankus L, Jurka J (2006) Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor. *BMC Bioinformatics*. doi:10.1186/1471-2105-7-474
- Komatsu M, Shimamoto K, Kyojuka J (2003) Two-Step Regulation and Continuous Retrotransposition of the Rice LINE-Type Retrotransposon Karma. *Plant Cell* 15:1934–1944
- Komulainen P, Brown GR, Mikkonen M, Karhu A, García-Gil MR, O'Malley D, Lee B, Neale DB, Savolainen O (2003) Comparing EST-based genetic maps between *Pinus sylvestris* and *Pinus taeda*. *Theor Appl Genet* 07(4): 667-678
- Koski V (1970) A study of pollen dispersal as a mechanism of gene flow in conifers. *Comm Inst For Fenn* 70:1-78
- Kossack DS, Kinlaw CS (1999) IFG, a *gypsy*-like retrotransposon in *Pinus* (*Pinaceae*), has an extensive history in pines. *Plant Mol Biol* 39: 417-426
- Kovach A, Wegrzyn JL, Parra G, Holt C, Bruening GE, Loopstra CA, Hartigan J, Yandell M, Langley CH, Korf I, Neale DB (2010) The *Pinus taeda* genome is characterized by diverse and highly diverged repetitive sequences. *BMC Genomics*. doi: 10.1186/1471-2164-11-420
- Kozłowski J, Konarzewski M, Gawelczyk AT (2003) Cell size as a link between noncoding DNA and metabolic rate scaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(24): 14080-14085
- Kumar A, Bennetzen JL (1999) Plant Retrotransposons. *Annu Rev Genet* 33: 479-532
- Kumar A, Hirochika H (2001) Applications of retrotransposons as genetic tools in plant biology. *TRENDS in Plant Science* 6(3): 127-134
- Kumar A, Pearce SR, McLean K, Harrison G, Heslop-Harrison JS, Waugh R, Flavell AJ (1997) The *Ty1-copia* group of retrotransposons in plants: genomic organisation, evolution, and use as molecular markers. *Genetica*.100(1-3): 205-217
- Kumekawa N, Ohmido N, Fukui K, Ohtsubo E, Ohtsubo H (2001) A new *gypsy*-type retrotransposon, *RIRE7*: preferential insertion into the tandem repeat sequence TrsD in pericentromeric heterochromatin regions of rice chromosomes. *Mol Genet Genomics* 265:48488
- Kumekawa N, Ohtsubo H, Horiuchi T, Ohtsubo E (1999) Identification and characterization of novel retrotransposons of the *gypsy* type in rice. *Mol Gen Genet* 260: 593-602

- Kunkel TA (1990) Misalignment-mediated DNA synthesis errors. *Biochemistry* 29: 8003–8011
- L’Homme Y, Seguin A, Tremblay FM (2000) Different classes of retrotransposons in coniferous spruce species. *Genome* 43: 1084-1089
- Lampe DJ, Churchill ME, Robertson HM (1996) A purified mariner transposase is sufficient to mediate transposition *in vitro*. *EMBO J* 15(19): 5470-5479
- Lane D, Cavaillé J, Chandler M (1994) Induction of the SOS response by *IS1* transposase. *J Mol Biol* 242(4): 339-350
- Langdon T, Seago C, Mende M, Leggett M, Thomas H, Forster JW, Jones RN, Jenkins G (2000) Retrotransposon evolution in diverse plant genomes. *Genetics* 156(1): 313-325
- Le Rouzic A, Boutin TS, Capy P (2007) Long-term evolution of transposable elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(49): 19375-19380
- Leitch IJ (1998) Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. *Ann Bot* 82: 85-94
- Leitch IJ, Bennet MD (2007) Genome size and its uses: the impact of flow cytometry. Wiley-VCH Weinheim 153-176.
- Leitch IJ, Bennett MD (2004) Genome downsizing in polyploid plants. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 651–663.
- Lenski RE (2004) Phenotypic and genomic evolution during a 20 000-generation experiment with the bacterium *Escherichia coli*. *Plant Breed. Rev.* 24: 225–265
- Leprince AS, Grandbastien MA, Meyer C (2001) Retrotransposons of the *Tnt1B* family are mobile in *Nicotiana plumbaginifolia* and can induce alternative splicing of the host gene upon insertion. *Plant Mol. Biol.* 47: 533 – 541
- Levin HL, Moran JV (2011) Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. *Nat Rev Gen* 12: 615-627
- Li W, Zhang P, Fellers JP, Friebe B, Gill BS (2004) Sequence composition, organization, and evolution of the core *Triticeae* genome. *Plant Journal* 40: 500-511
- Lightbourn GJ, Jelesko JG, Veilleux RE (2007) Retrotransposon-based markers from potato monoloids used in somatic hybridization. *Genome* 50(5): 492-501
- Lin RC, Ding L, Casola C, Ripoll DR, Feschotte C, Wang HY (2007) Transposase-derived transcription factors regulate light signaling in *Arabidopsis*. *Science* 318: 1302–1305
- Lin X, Kaul S, Rounsley S, Shea TP, Benito MI, Town CD, Fujii CY, Mason T, Bowman CL, Barnstead M, Feldblyum TV, Buell CR, Ketchum KA, Lee J, Ronning CM, Koo HL, Moffat KS, Cronin LA, Shen M, Pai G, Van Aken S, Umayam L, Tallon LJ, Gill JE, Adams MD, Carrera AJ,

- Creasy TH, Goodman HM, Somerville CR, Copenhagen GP, Preuss D, Nierman WC, White O, Eisen JA, Salzberg SL, Fraser CM, Venter JC. (1999) Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 402(6763):761-768
- Lin X, Long L, Shan X, Zhang S, Shen S, Liu B (2006) In planta mobilization of *mPing* and its putative autonomous element Pong in rice by hydrostatic pressurization. *J Exp Bot* 57(10): 2313-2323
- Linderholm HW, Linderholm K (2004) Age-dependent climate sensitivity of *Pinus sylvestris* L. in the central Scandinavian Mountains. *Boreal Env Res* 9: 307-317
- Lippman Z, Gendrel A, Black M, Vaughn MW, Dedhia N, McCombie WR, Lavine K, Mittal V, May B, Kasschau KD, Carrington JC, Doerge RW, Colot V, Martienssen R (2004) Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature* 430:471-476
- Liu S, Yeh CT, Ji T, Ying K, Wu H, Tang HM, Fu Y, Nettleton D, Schnable PS (2009) *Mu* transposon insertion sites and meiotic recombination events co-localize with epigenetic marks for open chromatin across the maize genome. *PLoS Genet* 5:e1000733
- Liu Z, Yue W, Li D, Wang RR, Kong X, Lu K, Wang G, Dong Y, Jin W, Zhang X (2008) Structure and dynamics of retrotransposons at wheat centromeres and pericentromeres. *Chromosoma* 117: 445–456
- Llorens C, Futami R, Covelli L, Dominguez-Escriba L, Viu JM, Tamarit D, Aguilar-Rodriguez J, Vicente-Ripolles M, Fuster G, Bernet GP, Maumus F, Munoz-Pomer A, Sempere JM, LaTorre A, Moya A (2011) The Gypsy Database (*GyDB*) of mobile genetic elements: release 2.0 *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkq1061
- Lockton S, Gaut BS (2010) The evolution of transposable elements in natural populations of self-fertilizing *Arabidopsis thaliana* and its outcrossing relative *Arabidopsis lyrata*. *BMC Evol Biol* 10:10
- Lorenz R, Bernhart SH, Siederdisen HC, Tafer H, Flamm C, Stadler PF, Hofacker IL (2011) ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol Biol.* doi: 10.1186/1748-7188-6-26
- Lovett ST (2004) Encoded errors: mutations and rearrangements mediated by misalignment at repetitive DNA sequences. *Mol Microbiol* 52(5): 1243-1253
- Luan DD, Korman MH, Jakubczak JL, Eickbush TH (1993) Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition. *Cell* 72: 595-605
- Lucht JM, Mauch-Mani B, Steiner HY, Metraux JP, Ryals J, Hohn B (2002) Pathogen stress increases somatic recombination frequency in *Arabidopsis*. *Nat Genet* 30(3):311-314



- Ma J, Devos KM, Bennetzen JL. (2004) Analyses of LTR-retrotransposon structures reveal recent and rapid genomic DNA loss in rice. *Genome Res* 14(5): 860-869
- Madlung A, Comai L (2004) The Effect of Stress on Genome Regulation and Structure. *Annals of Botany* 94: 481-495
- Maestre J, Tchenio T, Dhellin O, Heidmann T (1995) mRNA retroposition in human cells: processed pseudogene formation. *EMBO J* 14: 6333-6338
- Magbanua ZV, Ozkan S, Bartlett BD, Chouvarine P, Saski CA, Liston A, Cronn RC, Nelson CD, Peterson DG (2011) Adventures in the enormous: a 1.8 million clone BAC library for the 21.7 Gb genome of loblolly pine. *PLoSone*. doi: 10.1371/journal.pone.0016214
- Mak J, Kleiman L (1997) Primer tRNAs for reverse transcription. *J Virol* 71(11): 8087-8095
- Malamy J, Carr JP, Klessig DF, Raskin I (1990) Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250:1002–1004
- Malamy J, Klessig DF (1992) Salicylic acid and plant disease resistance. *Plant J* 2(5):643-654
- Marillonnet S, Wessler SR (1997) Retrotransposon insertion into the maize waxy gene results in tissue-specific RNA processing. *Plant Cell* 9: 967 – 978
- Mason JM, Frydrychova RC, Biessmann H (2008) *Drosophila* telomeres: An exception providing new insights. *Bioessays* 30: 25–37
- Masson P, Surosky R, Kingsbury JA, Fedoroff NV (1987) Genetic and molecular analysis of the *Spm*-dependent a-m2 alleles of the maize a locus. *Genetics* 117(1): 117-137.
- Mattick JS, Makunin IV (2006) Non-coding RNA. *Hum Mol Genet* 15:17-29
- May BP, Lippman ZB, Fang Y, Spector DL, Martienssen RA (2005) Differential regulation of strand-specific transcripts from *Arabidopsis* centromeric satellite repeats. *PLoS Genet*. doi: 10.1371/journal.pgen.0010079
- McClintock B (1954) Mutations in maize and chromosomal aberrations in *Neurospora*. *Carnegie I Wash* 53:254-261
- McClintock B (1984) The significance of responses of the genome to challenge. *Science* 226:792–801
- Meijer HA, Thomas AAM (2002) Control of eukaryotic protein synthesis by upstream open reading frames in the 5'-untranslated region of an mRNA. *Biochem J* 367: 1-11
- Melayah D, Bonnivard E, Chalhoub B, Audeon C, Grandbastien M (2001) The mobility of the tobacco Tnt1 Retrotransposon correlates with its transcriptional activation by fungal factors. *Plant J* 28(2):159-168

- Mieczkowski PA, Lemoine FJ, Petes TD (2006) Recombination between retrotransposons as a source of chromosome rearrangements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA repair* 5: 1010–1020
- Mignone F, Grillo G, Licciulli F, Iacono M, Liuni S, Kersey PJ, Duarte J, Saccone C, Pesole G (2005) UTRdb and UTRsite: a collection of sequences and regulatory motifs of the untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 33: D141-146
- Mignone F, Grillo G, Licciulli F, Iacono M, Liuni S, Kersey PJ, Duarte J, Saccone C, Pesole G (2005) UTRdb and UTRsite: a collection of sequences and regulatory motifs of the untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 33: D141-146
- Miguel C, Simoes M, Oliveira MM, Rocheta M (2008) Envelope-like retrotransposons in the plant kingdom: evidence of their presence in Gymnosperms (*Pinus pinaster*). *J Mol Evol* 67: 517-525
- Miller JT, Dong F, Jackson SA, Song J, Jiang J (1998) Retrotransposon-related DNA sequences in the centromeres of grass chromosomes. *Genetics* 150: 1615–1623
- Miller WJ, McDonald JF, Nouaud D, Anxolabéhère D (1999) Molecular domestication--more than a sporadic episode in evolution. *Genetica* 107(1-3): 197-207
- Miyao A, Tanaka K, Murata K, Sawaki H, Takeda S, Abe K, Shinozuka Y, Onosato K, Hirochika H (2003) Target site specificity of the *Tos17* retrotransposon shows a preference for insertion within genes and against insertion in retrotransposon-rich regions of the genome. *Plant Cell*.15: 1771–1780
- Morgan MT (2001) Transposable element number in mixed mating populations. *Genet Res*, 77(3): 261-275
- Morgante M, Brunner S, Pea G, Fengler K, Zuccolo A, Rafalski A (2005) Gene duplication and exon shuffling by *Helitron*-like transposons generate intraspecies diversity in maize. *Nature Genet.* 37: 997–1002
- Morgante M, De Paoli E, Radovic S (2007) Transposable elements and the plant pan-genomes. *Curr Opin Plant Biol* 10:149-155
- Morse AM, Peterson DG, Islam-Faridi MN, Smith KE, Magbanua Z, Garcia SA, Kubisiak TL, Amerson HV, Carlson JE, Nelson CD, Davis JM (2009) Evolution of Genome Size and Complexity in *Pinus*. *PLOSone*. doi:10.1371/journal.pone.0004332
- Mourier T, and Willerslev E (2009) Retrotransposons and non-protein coding RNAs. *Brief Funct Genomic Proteomic* 8(6):493-501
- Munoz-Lopez M, Garcia-Perez J (2009) DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. *Curr Genomics* 11: 115-128
- Murray BG (1998) Nuclear DNA Amounts in Gymnosperms. *Ann Bot* 82:3-15

- Murray BG (2005) When does Intraspecific C-value Variation become Taxonomically Significant? *Ann Bot* 95: 119-125
- Nagaki K, Neumann P, Zhang D, Ouyang S, Buell CR, Cheng Z, Jiang J (2005) Structure, divergence, and distribution of the CRR centromeric retrotransposon family in rice. *Mol Biol Evol* 22: 845–855
- Nagaki K, Song J, Stupar RM, Parokonny AS, Yuan Q, Ouyang S, Liu J, Hsiao J, Jones KM, Dawe RK, Buell CR, Jiang J (2003) Molecular and cytological analyses of large tracks of centromeric DNA reveal the structure and evolutionary dynamics of maize centromeres. *Genetics* 163: 759–770
- Nakazaki T, Okumoto Y, Horibata A, Yamahira S, Teraishi M, Nishida H, Inoue H, Tanisaka T. (2003) Mobilization of a transposon in the rice genome. *Nature* 421:170–172
- Nassif N., Penney J., Pal S., Engels W. & Gloor G. (1994) Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1613–1625
- Neumann P, Koblizkova A, Navratilova A, Macas J (2006) Significant expansion of *Vicia pannonica* genome size mediated by amplification of a single type of giant retroelement. *Genetics* 173:1047-1056
- Neumann P, Pozárková D, Macas J (2003) Highly abundant pea LTR Retrotransposon *Ogre* is constitutively transcribed and partially spliced. *Plant Mol Biol* 53(3):399-410
- Neumann P, Yan H, Jiang J (2007) The centromeric retrotransposons of rice are transcribed and differentially processed by RNA interference. *Genetics* 176: 749–761
- Nevo E (2001) Evolution of genome–phenome diversity under environmental stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(11): 6233-6240
- Niinemets U (2010) Responses of forest trees to single and multiple environmental stresses from seedlings to mature plants: past stress history, stress interactions, tolerance and acclimation. *Forest Ecology and Management* 260: 1623-1639
- Novikov A, Smyshlyaev G, Novikova O (2012) Evolutionary History of LTR Retrotransposon Chromodomains in Plants. *International Journal of Plant Genomics*. doi:10.1155/2012/874743.
- Nuzhdin SV (1999) Sure facts, speculations, and open questions about the evolution of transposable element copy number. *Genetica* 107: 129–137
- Nystedt B, Street NR, Wetterbom A, Zuccolo A, Lin YC, Scofield DG, Vezzi F, Delhomme N, Giacomello S, Alexeyenko A, Vicedomini R, Sahlin K, Sherwood E, Elfstrand M, Gramzow L, Holmberg K, Hällman J, Keech O, Klasson L, Koriabine M, Kucukoglu M, Käller M, Luthman J, Lysholm F, Niittylä T, Olson A, Rilakovic N, Ritland C, Rosselló JA, Sena J, Svensson T, Talavera-López C, Theißen G, Tuominen H, Vanneste K, Wu ZQ, Zhang B, Zerbe P, Arvestad L, Bhalerao R,

- Bohlmann J, Bousquet J, Garcia Gil R, Hvidsten TR, de Jong P, MacKay J, Morgante M, Ritland K, Sundberg B, Thompson SL, Van de Peer Y, Andersson B, Nilsson O, Ingvarsson PK, Lundeberg J, Jansson S (2013) The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature*. doi:10.1038/nature12211
- Orgel LE, Crick FHC (1980) Selfish DNA—the ultimate parasite. *Nature* 284: 604–607
- Orloci L (1978) *Multivariate analysis in vegetation research*. The Hague, Dr W Junk BV.
- Palmé AE, Pyhäjärvi T, Wachowiak W, Savolainen O (2009) Selection on nuclear genes in a *Pinus* phylogeny. *Mol Biol Evol* 26(4): 893-905
- Panstruga R, Büschges R, Piffanelli P, Schulze-Lefert P (1998) A contiguous 60 kb genomic stretch from barley reveals molecular evidence for gene islands in a monocot genome. *Nucleic Acids Res* 26(4): 1056-1062
- Papadopoulos D, Schneider D, Meier-Eiss J, Arber W, Lenski RE, Blot M (1999) Genomic evolution during a 10 000-generation experiment with bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3807–3812
- Pardue ML, DeBaryshe PG (2003) Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres. *Annu Rev Genet* 37: 485–511
- Pasyukova EG, Nuzhdin SV, Morozova TV, Mackay TFC (2004) Accumulation of transposable elements in the genome of *Drosophila melanogaster* is associated with a decrease in fitness. *J. Hered.* 95: 284–290
- Paterson AH, Bowers JE, Bruggmann R, Dubchak I, Grimwood J, Gundlach H, Haberler G, Hellsten U, Mitros T, Poliakov A, Schmutz J, Spannagl M, Tang H, Wang X, Wicker T, Bharti AK, Chapman J, Feltus FA, Gowik U, Grigoriev IV, Lyons E, Maher CA, Martis M, Narechania A, Olliaro RP, Penning BW, Salamov AA, Wang Y, Zhang L, Carpita NC, Freeling M, Gingle AR, Hash CT, Keller B, Klein P, Kresovich S, McCann MC, Ming R, Peterson DG, Mehboob-ur-Rahman, Ware D, Westhoff P, Mayer KF, Messing J, Rokhsar DS. (2009) The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature* 457: 551–556
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295
- Peaston AE, Evsikov AV, Graber JH, de Vries WN, Holbrook AE, Solter D, Knowles BB (2004) Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Dev cell* 7 (4): 597-606
- Pereira V (2004) Insertion bias and purifying selection of retrotransposons in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Genome Biol* 5:R79

- Perry DJ, Furnier GR (1996) *Pinus banksiana* has at least seven expressed alcohol dehydrogenase genes in two linked groups. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13020–13023
- Peterson PA (1953) A mutable pale green locus in maize. *Genetics* 38:682-683
- Petit RJ, Hampe A (2006) Some Evolutionary Consequences of Being a Tree. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 37: 187-214
- Piednoël M, Gonçalves IR, Higuët D, Bonnivard E (2011) Eukaryote *DIRSI*-like retrotransposons: an overview. *BMC Genomics* doi: 10.1186/1471-2164-12-621
- Piegu B, Guyot R, Picault N, Roulin A, Saniyal A, Kim H, Collura K, Brar DS, Jackson S, Wing RA et al (2006) Doubling genome size without polyploidization: dynamics of retrotransposition-driven genomic expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative of rice. *Genome Res* 16: 1262–1269
- Piegu B, Guyot R, Picault N, Roulin A, Sanyal A, Kim H, Collura K, Brar DS, Jackson S, Wing RA, Panaud O. (2006) Doubling genome size without polyploidization: dynamics of retrotransposition-driven genomic expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative of rice. *Genome Res* 16: 1262-1269
- Piriyapongsa J, Marino-Ramirez L, Jordan IK (2007) Origin and Evolution of Human microRNAs From Transposable Elements. *Genetics* 176:1323–1337
- Plomion C, Chagné D, Pot D, Kumar S, Wilcox PL, Burdon RD, Prat D, Peterson DG, Paiva J, Chaumeil P, Vendramin GG, Sebastiani F, Nelson CD, Echt CS, Savolainen O, Kubisiak TL, Ponting CP, Oliver PL, Reik W (2009) Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs. *Cell* 136:629-641
- Porebski S, Bailey GL, Baum BR (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaharide and polyphenol componenets. *Plant Mol Biol Rep* 15(1): 8-15
- Pouteau S, Huttner E, Grandbastien MA, Caboche M (1991) Specific expression of the tobacco *Tnt1* retrotransposon in protoplasts. *EMBO J* 10(7): 1911-1918
- Presting GG, Malysheva L, Fuchs J, Schubert I (1998) A *Ty3/gypsy* retrotransposon-like sequence localizes to the centromeric regions of cereal chromosomes. *Plant J* 16: 721–728
- Preston BD (1996). Error-prone retrotransposition: rime of the ancient mutators. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7427–7431
- Prokopowich CD, Gregory TR, Crease TJ (2003) The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. *Genome* 46: 48-50.
- Provan J, Thomas WTB, Forster BP, Powell (1999) Copia-SSR: A simple marker technique which can be used on total genomic DNA. *Genome* 42: 363-366

- Purugganan M, Wessler SR (1995) Transposon signatures – species-specific molecular markers that utilise a class of multiplecopy nuclear-DNA. *Mol. Ecol.* 4: 265–269
- Pyhäjärvi T, García-Gil MR, Knürr T, Mikkonen M, Wachowiak W, Savolainen O (2007) Demographic history has influenced nucleotide diversity in European *Pinus sylvestris* populations. *Genetics*. 177(3): 1713-24
- Quesada T, Gopal V, Cumbie WP et al. (2010) Association mapping of quantitative disease resistance in a natural population of Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.). *Genetics* 186: 677-686
- Quesneville H, Nouaud D, Anxolabehere D (2005) Recurrent recruitment of the THAP DNA-binding domain and molecular domestication of the P-transposable element. *Mol Biol Evol* 22: 741–746
- Ramallo E, Kalendar R, Schulman AH, Martínez-Izquierdo JA (2008) *Remel*, a *Copia* retrotransposon in melon, is transcriptionally induced by UV light. *Plant Mol Biol* 66(1-2): 137-150
- Ran JH, Gao H, Wang XQ (2010) Fast evolution of the retroprocessed mitochondrial rps3 gene in Conifer II and further evidence for the phylogeny of gymnosperms. *Mol Phylogenet Evol* 54(1): 136-149
- Raubeson LA, Jansen RK (1992) A rare chloroplast DNA structural mutation is shared by all conifers. *Biochem Sys. Evol* 20: 17-24
- Rayburn AL, Auger JA (1990) Genome size variation in *Zea mays* ssp. *Mays* adapted to different altitudes. *Theor Appl Genet* 79: 470-474
- Rebollo R, Romanish MT, Mager DL (2012) Transposable Elements: An Abundant and Natural Source of Regulatory Sequences for Host Genes. *Annu Rev Genet* 46:21-42
- Richards CL, Bossdorf O, Verhoeven KJF (2010) Understanding natural epigenetic variation. *New Phytologist* 187: 562-564
- Ritland K (1996) Marker-based method for inference about quantitative inheritance in natural populations. *Evolution* 50: 1062-1073
- Roberts D, Kleckner N (1988) *Tn10* transposition promotes RecA-dependent induction of a lambda prophage. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(16): 6037-6041
- Rocheta M, Carvalho L, Viegas W, Morais-Cecílio L (2012) Corky, a gypsy-like Retrotransposon is differentially transcribed in *Quercus suber* tissues. *BMC Res Notes*. doi:10.1186/1756-0500-5-432
- Rocheta M, Cordeiro J, Oliveira M, Miguel C (2007) *PpRT1*: the first complete gypsy-like retrotransposon isolated in *Pinus pinaster*. *Planta* 225: 551-562.
- Rogers J (1983) Retroposons defined. *Nature* 301: 460

- Rohd A, Bhalerao RP (2007) Plant dormancy in the perennial context. *Trends in Plant Science* 15: 217-223
- Rolfe M, Spanos A, Banks G (1986) Induction of yeast *Ty* element transcription by ultraviolet light. *Nature* 319: 339-340
- Rostoks N, Park Y-J, Ramakrishna W, Ma J, Druka A, et al. (2002) Genomic sequencing reveals gene content, genomic organization, and recombination relationships in barley. *Functional & Integrative Genomics* 2: 51–59
- Sabot F, Schulman AH (2006) Parasitism and the retrotransposon life cycle in plants: a hitchhiker's guide to the genome. *Heredity* 97: 381-388
- Sabot F, Schulman AH (2007) Template switching can create complex LTR retrotransposon insertions in *Triticeae* genomes. *BMC Genomics*. doi:10.1186/1471-2164-8-247
- Sabot F, Sourdille P, Bernard M (2005) Advent of a new retrotransposon structure: the long form of the *Veju* elements. *Genetica* 125: 325–332
- Saeidi H, Rahiminejad MR, Heslop-Harrison JS (2008) Retroelement insertional polymorphisms, diversity and phylogeography within diploid, D-genome *Aegilops tauschii* (*Triticeae*, *Poaceae*) sub-taxa in Iran. *Ann Bot* 101(6): 855-861
- SanMiguel P, Gaut BS, Tikhonov A, Nakajima Y, Bennetzen JL (1998) The paleontology of intergene retrotransposons of maize. *Nat Genet* 20: 43–45
- SanMiguel P, Tikhonov A, Jin YK, Motchoulskaia N, Zakharov D, Melake-Berhan A, Springer PS, Edwards KJ, Lee M, Avramova Z, Bennetzen JL (1996) Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* 274: 737–738
- Savolainen O, Kujala ST, Sokol C, Pyhäjärvi T, Avia K, Knürr T, Kärkkäinen K, Hicks S, J Hered. (2011) Adaptive potential of northernmost tree populations to climate change, with emphasis on Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *J Hered.* 102(5): 526-36.
- Savolainen O, Pyhäjärvi T (2007) Genomic diversity in forest trees. *Curr Opin Plant Biol* 10:162-167
- Sayah DM, Sokolskaja E, Berthoux L, Luban J (2004) Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1. *Nature* 430: 569–573
- Schlenke T, Begun D (2004) Strong selective sweep associated with a transposon insertion in *Drosophila simulans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1626–1631.
- Schlüter PM, Harris SA (2006) Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular Ecology Notes* 6: 569-572
- Schmidt A, Doudrick RL, Heslop-Harrison JS, Schmidt T (2000) The Contribution of Short Repeats of Low Sequence Complexity to Large Conifer Genomes. *Theor Appl Genet* 101:7-14

- Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method. *Nat Protoc* 3:1101–1108
- Kalendar R, Tanskanen JA, Chang W, Antonius K, Sela H, Peleg P, Schulman AH (2008) Cassandra Retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:5833–5838
- Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W, Hyten DL, Song Q, Thelen JJ, Cheng J, Xu D, Hellsten U, May GD, Yu Y, Sakurai T, Umezawa T, Bhattacharyya MK, Sandhu D, Valliyodan B, Lindquist E, Peto M, Grant D, Shu S, Goodstein D, Barry K, Futrell-Griggs M, Abernathy B, Du J, Tian Z, Zhu L, Gill N, Joshi T, Libault M, Sethuraman A, Zhang XC, Shinozaki K, Nguyen HT, Wing RA, Cregan P, Specht J, Grimwood J, Rokhsar D, Stacey G, Shoemaker RC, Jackson SA (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463:178–183
- Schnable PS, Ware D, Fulton RS, Stein JC, Wei F, Pasternak S, Liang C, Zhang J, Fulton L, Graves TA, Minx P, Reily AD, Courtney L, Kruchowski SS, Tomlinson C, Strong C, Delehaunty K, Fronick C, Courtney B, Rock SM, Belter E, Du F, Kim K, Abbott RM, Cotton M, Levy A, Marchetto P, Ochoa K, Jackson SM, Gillam B, Chen W, Yan L, Higginbotham J, Cardenas M, Waligorski J, Applebaum E, Phelps L, Falcone J, Kanchi K, Thane T, Scimone A, Thane N, Henke J, Wang T, Ruppert J, Shah N, Rotter K, Hodges J, Ingenthron E, Cordes M, Kohlberg S, Sgro J, Delgado B, Mead K, Chinwalla A, Leonard S, Crouse K, Collura K, Kudrna D, Currie J, He R, Angelova A, Rajasekar S, Mueller T, Lomeli R, Scara G, Ko A, Delaney K, Wissotski M, Lopez G, Campos D, Braidotti M, Ashley E, Golser W, Kim H, Lee S, Lin J, Dujmic Z, Kim W, Talag J, Zuccolo A, Fan C, Sebastian A, Kramer M, Spiegel L, Nascimento L, Zutavern T, Miller B, Ambroise C, Muller S, Spooner W, Narechania A, Ren L, Wei S, Kumari S, Faga B, Levy MJ, McMahan L, Van Buren P, Vaughn MW, Ying K, Yeh CT, Emrich SJ, Jia Y, Kalyanaraman A, Hsia AP, Barbazuk WB, Baucom RS, Brutnell TP, Carpita NC, Chaparro C, Chia JM, Deragon JM, Estill JC, Fu Y, Jeddelloh JA, Han Y, Lee H, Li P, Lisch DR, Liu S, Liu Z, Nagel DH, McCann MC, SanMiguel P, Myers AM, Nettleton D, Nguyen J, Penning BW, Ponnala L, Schneider KL, Schwartz DC, Sharma A, Soderlund C, Springer NM, Sun Q, Wang H, Waterman M, Westerman R, Wolfgruber TK, Yang L, Yu Y, Zhang L, Zhou S, Zhu Q, Bennetzen JL, Dawe RK, Jiang J, Jiang N, Presting GG, Wessler SR, Aluru S, Martienssen RA, Clifton SW, McCombie WR, Wing RA, Wilson RK (2009) The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science*. 326(5956): 1112-1115.
- Schneider D, Duperchy E, Coursange E, Lenski RE, Blot M (2000) Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. IX. Characterization of insertion sequence-mediated mutations and rearrangements. *Genetics* 156 477–488



- Schneider D, Lenski RE (2004) Dynamics of insertion sequence elements during experimental evolution of bacteria. *Res Microbiol.*155:319–327
- Schneider TD (2002) Consensus Sequence Zen. *Appl Bioinformatics* 1 (3): 111–119
- Schulman AH (2006) Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica* doi:10.1007/s10681-006-9282-5
- Schulman AH, Flavell AJ, Ellis TH (2004) The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants. *Methods Mol Biol* 260:145-173
- Schulman AH, Flavell AJ, Paux E, Ellis TH (2012) The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants. *Methods Mol Biol.*859:115-153
- Seto D, Seto J, Deshpande P, Hood L (1995) DMSO resolves certain compressions and signal dropouts in fluorescent dye labeled primer-based DNA sequencing reactions. *DNA Seq* 5(3):131-140
- Shapiro JA (1997) Genome organization, natural genetic engineering and adaptive mutation. *Trends Genet* 13: 98–104
- Shapiro JA, Higgins NP (1989) Differential activity of a transposable element in *Escherichia coli* colonies. *J Bacteriol* 171: 5975–5986
- Shirasu K, Schulman AH, Lahaye T, Schulze-Lefert P (2000) A contiguous 66-kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion. *Genome Res* 10(7):908-15
- Sillanpaa MJ (2011) On statistical methods for estimating heritability in wild populations. *Mol Ecol* 20:1324-1332
- Sinzelle L, Izsvak Z, Ivics Z (2009) Molecular domestication of transposable elements: from detrimental parasites to useful host genes. *Cell Mol Life Sci* 66(6):1073-1093
- Slotkin RK, Martienssen R (2007) Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet* 8: 272-285
- Smith GP (1976) Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science* 191: 528–535
- Solovyev VV (2002) Structure, Properties and Computer Identification of Eukaryotic genes. In *Bioinformatics from Genomes to Drugs. V.1. Basic Technologies.* (ed. Lengauer T.), 59 - 111.
- Solovyev VV, Shahmuradov IA (2003) PromH: Promoters identification using orthologous genomic sequences. *Nucleic Acids Res.* 31(13): 3540-3545
- Soltis DE, Soltis PS (1999) Polyploidy: Recurrent formation and genome evolution. *Trends Ecol Evol* 14: 348–352
- Soranzo N, Provan J, Powell W (1998) Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Mol Ecol* 7: 1247–1263

- Stefanovic S, Jager M, Deutsch J, Broutin J, Masselot M (1998) Phylogenetic Relationships of Conifers Inferred from Partial 28S rRNA Gen Sequences. *Amer J Bot* 85(5): 688 -697
- Steinbauerová V, Neumann P, Macas J (2008) Experimental evidence for splicing of intron-containing transcripts of plant LTR retrotransposon *Ogre*. *Mol Genet Genomics* 280: 427–436
- Strand DJ, McDonald JF (1985) *Copia* is transcriptionally responsive to environmental stress. *Nucleic Acids Res* 13(12): 4401-4410
- Stuart-Rogers C, Flavell AJ (2001) The Evolution of *Ty1-copia* Group Retrotransposons in Gymnosperms. *Mol Biol Evol* 18(2):155–163
- Stupar RM, Lilly JW, Town CD, Cheng Z, Kaul S, Buell CR, Jiang J (2001) Complex mtDNA constitutes an approximate 620-kb insertion on *Arabidopsis thaliana* chromosome 2: implication of potential sequencing errors caused by large-unit repeats. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5099-5103
- Subudhi P, Magpantay G, Karan R (2013) A retrotransposon-based probe for fingerprinting and evolutionary studies in rice (*Oryza sativa*). *Genet Res Crop Evol* 60(4): 1263-1273
- Suoniemi A, Narvanto A, Schulman AH (1996) The BARE-1 retrotransposon is transcribed in barley from an LTR promoter active in transient assays. *Plant Mol Biol* 31:295-306
- Surovtseva YV, Churikov D, Boltz KA, Song X, Lamb JC, Warrington R, Leehy K, Heacock M, Price CM, Shippen DE. (2009) Conserved telomere maintenance component 1 interacts with STN1 and maintains chromosome ends in higher eukaryotes. *Mol. Cell* 36: 207–218
- Taddei F, Vulić M, Radman M, Matić I (1997) Genetic variability and adaptation to stress. *EXS* 83:271-290
- Tadege M, Wen J, He J, Tu H, Kwak Y, Eschstruth A, Cayrel A, Endre G, Zhao PX, Chabaud M, Ratet P, Mysore KS (2008) Large-scale insertional mutagenesis using the *Tnt1* retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J.* 54: 335–347
- Takano M, Kanegae H, Shinomura T, Miyao A, Hirochika H, Furuya M (2001) Isolation and characterization of rice phytochrome A mutants. *Plant Cell* 13: 521 – 534.
- Takeda S, Sugimoto K, Kakutani T, Hirochika H (2001) Linear DNA intermediates of the *Tto1* retrotransposon in Gag particles accumulated in stressed tobacco and *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 28(3): 307-317
- Takeda S, Sugimoto K, Otsuki H, Hirochika H (1999) A 13-bp cis-regulatory element in the LTR promoter of the tobacco Retrotransposon *Tto1* is involved in responsiveness to tissue culture, wounding, methyl jasmonate and fungal elicitors. *Plant J* 18(4):383-393

- Tam SM, Mhiri C, Vogelaar A, Kerkveld M, Pearce SR, Grandbastien MA (2005) Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR. *Theor Appl Genet* 110(5): 819-831
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Method. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739
- Tapia G, Verdugo I, Yañez M, Ahumada I, Theoduloz C, Cordero C, Poblete F, González E, Ruiz-Lara S (2005) Involvement of Ethylene in Stress-Induced Expression of the TLC1.1 Retrotransposon from *Lycopersicon chilense* Dun. *Plant Physiol* 138(4): 2075–2086
- Temin HM (1976) The DNA provirus hypothesis. *Science* 192: 1075-1080
- Thomas CA Jr (1971) The genetic organization of chromosomes. *Annual Review of Genetics* 5: 237–256
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22):4673-4680
- Thornburg BG, Gotea V, Makalowski W (2006) Transposable elements as a significant source of transcription regulating signals. *Gene* 365: 104-110
- Topp CN, Zhong CX, Dawe RK (2004) Centromere-encoded RNAs are integral components of the maize kinetochore. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15986–15991
- Torrell M, Valles J (2001) Genome size in 21 *Artemisia* L. species (*Asteraceae*, *Anthemideae*): systematic, evolutionary, and ecological implications. *Genome* 44(2):231-238
- Tosi LR, Beverley SM (2000) cis and trans factors affecting Mos1 mariner evolution and transposition *in vitro*, and its potential for functional genomics. *Nucleic Acids Res* 28(3): 784-790
- Troitsky AV, Melekhovets YuF, Rakhimova GM, Bobrova VK, Valiejo-Roman KM, Antonov AS. (1991) Angiosperm origin and early stages of seed plant evolution deduced from rRNA sequence comparison. *J Mol Evol* 32: 255-261
- Turcich MP, Bokhari-Riza A, Hamilton DA, He C, Messier W, Stewart CB, Mascarenhas JP (1996) *PREM-2*, a *copia*-type retroelement in maize is expressed preferentially in early microspores. *Sex Plant Reprod* 9: 65–74
- Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, Schein J, Sterck L, Aerts A, Bhalerao RR, Bhalerao RP, Blaudez D, Boerjan W, Brun A, Brunner A, Busov V, Campbell M, Carlson J, Chalot M, Chapman J, Chen GL, Cooper D, Coutinho PM, Couturier J, Covert S, Cronk Q, Cunningham R, Davis J, Degroeve S,

- Déjardin A, Depamphilis C, Detter J, Dirks B, Dubchak I, Duplessis S, Ehlting J, Ellis B, Gendler K, Goodstein D, Gribskov M, Grimwood J, Groover A, Gunter L, Hamberger B, Heinze B, Helariutta Y, Henrissat B, Holligan D, Holt R, Huang W, Islam-Faridi N, Jones S, Jones-Rhoades M, Jorgensen R, Joshi C, Kangasjärvi J, Karlsson J, Kelleher C, Kirkpatrick R, Kirst M, Kohler A, Kalluri U, Larimer F, Leebens-Mack J, Leplé JC, Locascio P, Lou Y, Lucas S, Martin F, Montanini B, Napoli C, Nelson DR, Nelson C, Nieminen K, Nilsson O, Pereda V, Peter G, Philippe R, Pilate G, Poliakov A, Razumovskaya J, Richardson P, Rinaldi C, Ritland K, Rouzé P, Ryaboy D, Schmutz J, Schrader J, Segerman B, Shin H, Siddiqui A, Sterky F, Terry A, Tsai CJ, Uberbacher E, Unneberg P, Vahala J, Wall K, Wessler S, Yang G, Yin T, Douglas C, Marra M, Sandberg G, Van de Peer Y, Rokhsar D. (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313: 1596–1604
- Ueda M, Tsutsumi N, Kadowaki K (2005) Translocation of a 190-kb mitochondrial fragment into rice chromosome 12 followed by the integration of four Retrotransposons. *Int J Biol Sci* 1(3): 110–113
- Ullu E, Tschudi C (1984) Alu sequences are processed 7SL RNA genes. *Nature* 312 (5990): 171–172
- Urbański DF, Małolepszy A, Stougaard J, Andersen SU (2012) Genome-wide *LOREI* retrotransposon mutagenesis and high-throughput insertion detection in *Lotus japonicus*. *The Plant Journal* 69: 731–741
- Valkonen JPT, Nygren M, Ylonen A, Mannonen L (1994) Nuclear DNA content of *Pinus sylvestris* (L.) as determined by laser flow cytometry. *Genetica* 92: 203–207
- Vandenbussche M, Janssen A, Zethof J, van Orsouw N, Peters J, van Eijk MJ, Rijpkema AS, Schneiders H, Santhanam P, de Been M, van Tunen A, Gerats T (2008) Generation of a 3D indexed *Petunia* insertion database for reverse genetics. *Plant J.* 54: 1105–1114
- Varagona MJ, Purugganan M, Wessler SR (1992) Alternative splicing induced by insertion of retrotransposons into the maize waxy gene. *Plant Cell* 4: 811 – 820
- Vernhettes S, Grandbastien M-A, Casacuberta JM (1998) The evolutionary analysis of the *Tnt1* Retrotransposon in *Nicotiana* species reveals the high variability of its regulatory sequences. *Mol Biol Evol* 15:827–836
- Vershinin AV, Ellis THN (1999) Heterogeneity of the internal structure of PDR1, a family of *Ty1-copia*-like retrotransposons. *Mol Gen Genet* 262:703–713
- Vicient CM (2010) Transcriptional activity of transposable elements in maize. *BMC Genomics*. doi:10.1186/1471-2164-11-601

- Vicient CM, Kalendar R, Schulman AH (2001) Envelope-class retrovirus-like elements are widespread, transcribed and spliced, and insertionally polymorphic in plants. *Genome Res* 11:2041–2049
- Vicient CM, Kalendar R, Schulman AH (2005) Variability, recombination and mosaic evolution of the barley *BARE-1* retrotransposon. *J Mol Evol* 61: 275–291
- Vicient CM, Suoniemi A, Ananthawat-Jónsson K, Tanskanen J, Beharav A, Nevo E, Schulman AH (1999) Retrotransposon *BARE-1* and Its Role in Genome Evolution in the Genus *Hordeum*. *Plant Cell* 11(9): 1769-1784
- Vieira C, Biéumont C (1996) Geographical variation in insertion site number of retrotransposon 412 in *Drosophila simulans*. *J Mol Evol* 42(4): 443-451
- Vignols F, Rigau J, Torres MA, Capellades M, Puigdomenech P (1995) The brown midrib3 (bm3) mutation in maize occurs in the gene encoding caffeic acid O-methyltransferase. *Plant Cell* 7: 407 – 416
- Vinogradov, A.E. (1999) Intron–genome size relationship on a large evolutionary scale. *J. Mol. Evol.* 49: 376–384
- Vitte C, Bennetzen JL (2006) Analysis of retrotransposon structural diversity uncovers properties and propensities in angiosperm genome evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:17638–17643
- Vitte C, Panaud O, Quesneville H (2007) LTR retrotransposons in rice (*Oryza sativa*, L.): recent burst amplifications followed by rapid DNA loss. *BMC Genomics*. doi:10.1186/1471-2164-8-218
- Volff JN (2006) Turning junk into gold: domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes. *Bioessays* 28(9): 913-922
- Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SIS, Martienssen RA (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297:1833–1837
- Voronova A, Jansons Ā, Ruņģis D (2011) Expression of retrotransposon-like sequences in Scots pine (*Pinus sylvestris*) in response to heat stress. *Environmental and Experimental Biology* 9: 121-127
- Voytas D F, Cummings MP, Konieczny A, Ausubel FM, Rodermel SR (1992) *Copia*-like Retrotransposons are ubiquitous among plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7124–7128
- Vukich M, Giordani T, Natali L, Cavallini A (2009) *Copia* and *Gypsy* Retrotransposons activity in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *BMC Plant Biol.* doi:10.1186/1471-2229-9-150
- Walkamiya I, Newton RJ, Johnston JS, Price HJ (1993) Genome size and environmental factors in the genus *Pinus*. *American Journal of Botany* 80: 1235-1241
- Walker GC. (1985) Mutagenesis-enhancement by plasmids in mutagenesis tester strains. *Basic Life Sci.*34: 111-120

- Wang H, Liu J-S (2008) LTR retrotransposon landscape in *Medicago truncatula*: more rapid removal than in rice. *BMC Genomics*. doi: 10.1186/1471-2164-9-382.
- Wang W, Brunet FG, Nevo E, Long M (2002) Origin of sphinx, a young chimeric RNA gene in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 4448–4453
- Wang W, Zheng H, Fan C, Li J, Shi J, Cai Z, Zhang G, Liu D, Zhang J, Vang S, Lu Z, Wong GK, Long M, Wang J (2006) High rate of chimeric gene origination by retroposition in plant genomes. *Plant Cell* 18(8): 1791-1802
- Wang XQ, Tank DC, Sang T (2000) Phylogeny and divergence times in *Pinaceae*: evidence from three genomes *Mol Biol Evol* 17: 773–781
- Waugh R, McLean K, Flavell AJ, Pearce SR, Kumar A, Thomas BB, 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(6): 687-694
- Wei F, Stein JC, Liang C, Zhang J, Fulton RS, Baucom RS, De Paoli E, Zhou S, Yang L, Han Y, Pasternak S, Narechania A, Zhang L, Yeh CT, Ying K, Nagel DH, Collura K, Kudrna D, Currie J, Lin J, Kim H, Angelova A, Scara G, Wissotski M, Golser W, Courtney L, Kruchowski S, Graves TA, Rock SM, Adams S, Fulton LA, Fronick C, Courtney W, Kramer M, Spiegel L, Nascimento L, Kalyanaraman A, Chaparro C, Deragon JM, Miguel PS, Jiang N, Wessler SR, Green PJ, Yu Y, Schwartz DC, Meyers BC, Bennetzen JL, Martienssen RA, McCombie WR, Aluru S, Clifton SW, Schnable PS, Ware D, Wilson RK, Wing RA (2009) Detailed analysis of a contiguous 22-Mb region of the maize genome. *PLoS Genet*. doi:10.1371/journal.pgen.1000728
- Wessler S (2001) Plant Transposable Elements. A Hard Act to Follow. *Plant Physiology* 125: 149–151
- Wessler SR (1996) Plant Retrotransposons: Turned on by stress. *Curr Biol* 6 (8): 959–961
- Wessler SR (2006a) Eukaryotic Transposable Elements: Teaching Old Genomes New Tricks. *The Implicit Genome* (Caporale L ed.). Oxford University Press. USA.
- Wessler SR (2006b) Transposable elements and the evolution of eukaryotic genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(47): 17600–17601
- Wicker T, Guyot R, Yahiaoui N, Keller B (2003) CACTA Transposons in *Triticeae*. A Diverse Family of High-Copy Repetitive Elements. *Plant Physiol* 132:52–63
- Wicker T, Keller B (2007) Genome-wide comparative analysis of *copia* retrotransposons in *Triticeae*, rice, and *Arabidopsis* reveals conserved ancient evolutionary lineages and distinct dynamics of individual *copia* families. *Genome Res* 17(7):1072–1081

- Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, Flavell A, Leroy P, Morgante M, Panaud O, Paux E, SanMiguel P, Schulman AH (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet* 8(12): 973-982
- Wicker T, Stein N, Albar L, Feuillet C, Schlagenhauf E, Keller B (2001) Analysis of a contiguous 211 kb sequence in diploid wheat (*Triticum monococcum* L.) reveals multiple mechanisms of genome evolution. *Plant J* 26(3): 307-316
- Wicker T, Taudien S, Houben A, Keller B, Graner A, Platzer M, Stein N (2009) A whole-genome snapshot of 454 sequences exposes the composition of the barley genome and provides evidence for parallel evolution of genome size in wheat and barley. *Plant J* 59: 712–722
- Wilhelm M, Wilhelm FX (2001) Reverse transcription of retroviruses and LTR retrotransposons. *Cell Mol Life Sci* 58: 1246–1262.
- Wilkinson S, Davies W (2002) ABA-based chemical signaling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ* 25:195-210
- Williams CG, Savolainen O (1996) Inbreeding depression in conifers: implications for breeding strategy. *Forest Sci* 42: 102-117.
- Williams-Carrier R, Stiffler N, Belcher S, Kroeger T, Stern DB, Monde RA, Coalter R Barkan A (2010) Use of Illumina sequencing to identify transposon insertions underlying mutant phenotypes in high copy *Mutator* lines of maize. *Plant J* 63: 167–177
- Willyard A, Syring J, Gernandt DS, Liston A, Cronn R (2007) Fossil calibration of molecular divergence infers a moderate mutation rate and recent radiations for *Pinus*. *Mol Biol Evol* 24: 90-101
- Witte C, Le QH, Bureau T, Kumar A (2001) Terminal-repeat Retrotransposons in miniature (TRIM) are involved in restructuring plant genomes. *PNAS* 98(24):13778–13783
- Xing J, Zhang Y, Han K, Salem AH, Sen SK, Huff CD, Zhou Q, Kirkness EF, Levy S, Batzer MA, Jorde LB (2009) Mobile elements create structural variation: analysis of a complete human genome. *Genome Res* 19(9):1516-1526
- Xiong Y, Eickbush TH (1990) Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J* 9:3353–3362
- Xu Z, Yan X, Maurais S, Fu H, O'Brien DG, Mottinger J, Dooner HK (2004) *Jittery*, a *Mutator* distant relative with a paradoxical mobile behavior: excision without reinsertion. *Plant Cell* 16(5):1105-1114
- Yadav CB, Singh HN (2013) In-Silico Identification of LTR type Retrotransposons and Their Transcriptional Activities in *Solanum Tuberosum*. *IJSCE* 3(1):160-164

- Yang G, Zhang F, Hancock CN, Wessler SR (2007) Transposition of the rice miniature inverted repeat transposable element mPing in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 10962–10967
- Yang L, Bennetzen JL (2009) Structure-based discovery and description of plant and animal *Helitrons*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 12832-12837
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T (2012) Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. doi:10.1186/1471-2105-13-134
- Yoshioka K, Honma H, Zushi M, Kondo S, Togashi S, Miyake T, Shiba T (1990) Virus-like particle formation of *Drosophila copia* through autocatalytic processing. *EMBO J* 9(2): 535-541
- Zhang J, Dean AM, Brunet F, Long M (2004) Evolving protein functional diversity in new genes of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:16246–16250
- Zhang L, Rong YS (2012) Retrotransposons at *Drosophila* telomeres: Host domestication of a selfish element for the maintenance of genome integrity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1819: 771–775
- Zhang R, Zhang L, Yu W (2012) Genome-wide expression of non-coding RNA and global chromatin modification. *Acta Biochim Biophys Sin* 44(1): 40-47
- Zhang X, Wessler SR (2004) Genome-wide comparative analysis of the transposable elements in the related species *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 5589–5594
- Zhang Y, Wu Y, Liu Y, Han B (2005) Computational identification of 69 retroposons in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 138: 935–948
- Zhong CX, Marshall JB, Topp C, Mroczek R, Kato A, Nagaki K, Birchler JA, Jiang J, Dawe RK (2002) Centromeric retroelements and satellites interact with maize kinetochore protein CENH3. *Plant Cell* 14: 2825–2836
- Rokickij PF (1973) *Biologiskā statistika*. 3.izdevums. (Рокицкий ПФ 1973 Биологическая статистика. Минск: Высшая школа).













Parauga Nr.	IR 3													IR 4																				
	480	580	820	820s	900	1190	1450	1450s	1600	1700	1800	2100	2500	460	480	480d	490	550	600	780	900	920	1000	1030	1200	1500	2050	2100	2100b	2200	3700	4000	4000b	
31	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	
32	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	?	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	
34	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	
36	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	
37	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	
38	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	
40	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	
41	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	
42	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	
43	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	
44	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	
45	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	?	?	?	1	?	1	?	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
46	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	
47	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	
48	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	
49	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	
50	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	
51	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	
52	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	
53	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	
54	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	
55	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	
56	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0
57	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	
58	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	
59	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	
60	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	
61	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	
62	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	?	1	0	?	0	?	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	
63	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	
64	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	
65	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	
66	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	
67	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
68	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0







Parauga Nr.	IR 3													IR 4																				
	480	580	820	820s	900	1190	1450	1450s	1600	1700	1800	2100	2500	460	480	480d	490	550	600	780	900	920	1000	1030	1200	1500	2050	2100	2100b	2200	3700	4000	4000b	
141	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	
142	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	
143	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	
144	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	
145	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	
146	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1
147	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	
148	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	
149	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	
150	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	

Parauga Nr.	IR 5																	IR 7															
	500	550	600	700	750	800	850	900	1000	1100	1150	1200	1300	1350	1450	1500	2000	2050	2100	250	300	500	550	800	880	980	1000	1000b	1100	1200	1200b	1250	1300
1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1
2	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1
3	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
6	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1
11	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1
12	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
13	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1
15	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1
16	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
17	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
18	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
19	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1
20	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
21	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
23	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1

Paragrafa Nr.	IR 5																		IR 7															
	500	550	600	700	750	800	850	900	1000	1100	1150	1200	1300	1350	1450	1500	2000	2050	2100	250	300	500	550	800	880	980	1000	1000b	1100	1200	1200b	1250	1300	
24	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	
26	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	
27	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	
28	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1		
30	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	
31	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	
32	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	
34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	
36	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	
37	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
38	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	
40	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	
41	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
42	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	
43	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	
44	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1
45	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1
46	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
47	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	
48	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
49	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
50	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1
51	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	
52	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0
53	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	
54	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1
55	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1
56	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
57	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
58	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
59	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0
60	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
61	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1
62	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0
63	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1

Paragraf a Nr.	IR 5																	IR 7																
	500	550	600	700	750	800	850	900	1000	1100	1150	1200	1300	1350	1450	1500	2000	2050	2100	250	300	500	550	800	880	980	1000	1000b	1100	1200	1200b	1250	1300	
64	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1
65	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	
66	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	
67	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	
68	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	
69	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1
70	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1
71	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1
72	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
73	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	
74	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	
75	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	
76	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	
77	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	
78	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	
79	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	
80	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	
81	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	
82	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1
83	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	
84	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	
85	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	
86	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	
87	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	
88	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	
89	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	
90	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	
91	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	
92	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	
93	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	
94	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1		
95	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	
96	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	
97	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	
98	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	

Paragraf a Nr.	IR 5																	IR 7																
	500	550	600	700	750	800	850	900	1000	1100	1150	1200	1300	1350	1450	1500	2000	2050	2100	250	300	500	550	800	880	980	1000	1000b	1100	1200	1200b	1250	1300	
99	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	
100	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	
101	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	
102	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	
103	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	
104	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	
106	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	
107	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	
108	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	
109	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	
110	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	
111	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	
112	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	
113	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0
114	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
115	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	
116	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
117	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	
118	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	
119	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	
120	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	
121	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	
122	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	
123	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	
125	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	
126	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	
127	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0
128	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0
129	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0
130	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	
131	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	
132	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	
133	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0
134	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
135	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1

Parau a Nr.	IR 5																	IR 7																		
	500	550	600	700	750	800	850	900	1000	1100	1150	1200	1300	1350	1450	1500	2000	2050	2100	250	300	500	550	800	880	980	1000	1000b	1100	1200	1200b	1250	1300			
136	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	
137	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	
138	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	
139	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	
140	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	
141	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1
142	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1
143	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0
144	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1
145	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1
146	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1
147	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1
148	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1
149	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1
150	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1

Parau ga Nr.	IR 8														IR 9																								
	750	720	1000	1020	1020b	1200	1500	1600	1700	1800	2100	2300	2500	3000	3500	3600	500	520	550	570	630	680	700	730	760	800	850	900	1000	1000b	1100	1150	1200	1250	1300	1400	1500		
1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	
2	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	
3	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
4	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	
5	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1
6	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	
7	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	
8	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
10	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	
11	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	
12	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1
13	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1
15	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1
16	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
17	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1

Parauga Nr.	IR 8															IR 9																						
	750	720	1000	1020	1020b	1200	1500	1600	1700	1800	2100	2300	2500	3000	3500	3600	500	520	550	570	630	680	700	730	760	800	850	900	1000	1000b	1100	1150	1200	1250	1300	1400	1500	
18	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1
19	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
20	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1
21	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	
23	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	
24	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	
26	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	
27	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	
28	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	
30	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	
31	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
32	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1
34	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	
36	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	
37	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	
38	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	
40	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	
41	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	
42	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1		
43	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
44	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	
45	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	
46	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	
47	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	
48	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	
49	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	
50	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	
51	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	
52	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	
53	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	
54	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	
55	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	
56	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	
57	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	
58	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	

Parau ga Nr.	IR 8																IR 9																									
	750	720	1000	1020	1020b	1200	1500	1600	1700	1800	2100	2300	2500	3000	3500	3600	500	520	550	570	630	680	700	730	760	800	850	900	1000	1000b	1100	1150	1200	1250	1300	1400	1500					
59	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	
60	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1		
61	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1		
62	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	
63	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	
64	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	
65	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1		
66	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1		
67	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	
68	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1		
69	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	
70	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	
71	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1		
72	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1		
73	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	
74	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	
75	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	
76	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	
77	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1		
78	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1		
79	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1		
80	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1		
81	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	
82	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	
83	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1		
84	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	
85	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	
86	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1		
87	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1		
88	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1		
89	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
90	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	
91	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	
92	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1		
93	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1		

Parau ga Nr.	IR 8															IR 9																									
	750	720	1000	1020	1020b	1200	1500	1600	1700	1800	2100	2300	2500	3000	3500	3600	500	520	550	570	630	680	700	730	760	800	850	900	1000	1000b	1100	1150	1200	1250	1300	1400	1500				
94	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1		
95	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1		
96	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1		
97	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	
98	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	
99	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	
100	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	
101	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1		
102	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1		
103	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	
104	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1		
106	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1
107	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	
108	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	
109	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
110	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	
111	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	
112	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	
113	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
114	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
115	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1
116	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1
117	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	
118	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	
119	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	
120	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1
121	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
122	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
123	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	
125	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	
126	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	
127	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
128	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	
129	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	
130	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	



Parau ga Nr.	IR 8															IR 9																							
	750	720	1000	1020	1020b	1200	1500	1600	1700	1800	2100	2300	2500	3000	3500	3600	500	520	550	570	630	680	700	730	760	800	850	900	1000	1000b	1100	1150	1200	1250	1300	1400	1500		
131	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1
132	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	
133	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	
134	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	
135	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1		
136	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	
137	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	
138	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	
139	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	
140	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	
141	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
142	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
143	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1
144	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
145	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1
146	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1
147	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1
148	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1
149	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
150	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	

Parau ga Nr.	IR 6																																						
	480	500	550	580	600	620	650	670	700	900	950	1000	1050	1100	1150	1200	1250	1300	1350	1400	1500	1550	1600	1650	1700	1800	1850	1900	2000	2200	2300	2400	2500	2800	2900	3000	3100		
1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
2	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1
3	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1
4	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1
5	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
6	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
7	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1
8	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
10	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1
11	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	

Parau ga Nr.	IR 6																																									
	480	500	550	580	600	620	650	670	700	900	950	1000	1050	1100	1150	1200	1250	1300	1350	1400	1500	1550	1600	1650	1700	1800	1850	1900	2000	2200	2300	2400	2500	2800	2900	3000	3100					
12	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1				
13	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1			
15	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1			
16	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1			
17	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1			
18	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1			
19	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1			
20	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1			
21	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	
23	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1		
24	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1		
26	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	
27	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1
28	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
30	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	
31	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
32	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	
34	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
36	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
37	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	
38	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
40	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	
41	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	
42	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1
43	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1
44	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
45	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	
46	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	
47	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
48	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	
49	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	
50	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	
51	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	
52	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
53	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Parau ga Nr.	IR 6																																								
	480	500	550	580	600	620	650	670	700	900	950	1000	1050	1100	1150	1200	1250	1300	1350	1400	1500	1550	1600	1650	1700	1800	1850	1900	2000	2200	2300	2400	2500	2800	2900	3000	3100				
54	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
55	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	
56	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1		
57	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1		
58	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1			
59	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1			
60	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1			
61	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1		
62	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1		
63	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	
64	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1		
65	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1
66	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	
67	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	
68	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1		
69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1		
70	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1		
71	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1		
72	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1		
73	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	
74	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	
75	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	
76	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	
77	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	
78	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	
79	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	
80	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1		
81	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	
82	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	
83	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	
84	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
85	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	
86	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
87	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	
88	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	

Parauga Nr.	IR 6																																								
	480	500	550	580	600	620	650	670	700	900	950	1000	1050	1100	1150	1200	1250	1300	1350	1400	1500	1550	1600	1650	1700	1800	1850	1900	2000	2200	2300	2400	2500	2800	2900	3000	3100				
89	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1			
90	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1		
91	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1			
92	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?			
93	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1		
94	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1		
95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	?	?	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1			
96	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?		
97	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1		
98	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1		
99	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1		
100	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1		
101	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	
102	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1		
103	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	
104	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1		
106	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	
107	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1		
108	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
109	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1
110	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	
111	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	
112	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	
113	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	
114	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	
115	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1
116	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1
117	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1
118	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	
119	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	
120	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	
121	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1		
122	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1		
123	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
125	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1		

Parau ga Nr.	IR 6																																							
	480	500	550	580	600	620	650	670	700	900	950	1000	1050	1100	1150	1200	1250	1300	1350	1400	1500	1550	1600	1650	1700	1800	1850	1900	2000	2200	2300	2400	2500	2800	2900	3000	3100			
126	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	
127	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
128	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	
129	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	
130	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	
131	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
132	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	
133	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	
134	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	
135	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
136	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1
137	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
138	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
139	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	
140	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
141	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1
142	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1
143	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
144	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1
145	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1
146	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
147	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
148	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
149	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1
150	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1

2. Pielikums

Ar SSR marķieriem pēc IRAP metodes iegūtie dati dabiski atjaunojušās parastās priedes populācijai.

Parauga Nr.	150	152	156	158	160	162	164	166	170	176	200	202	204	206	208	214	216	218	224	220	222	226	228	258	260	261	263	264	265	267	266	270	280	
1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
3	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
5	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
6	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
8	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
9	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
10	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
11	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
13	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
14	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
15	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
16	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
17	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
18	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
19	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
20	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
21	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
22	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
23	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
24	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
25	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
26	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
27	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
29	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
30	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
32	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Parauga Nr.	150	152	156	158	160	162	164	166	170	176	200	202	204	206	208	214	216	218	224	220	222	226	228	258	260	261	263	264	265	267	266	270	280
33	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
34	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
35	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
37	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
38	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
39	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
40	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
41	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
42	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
43	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
44	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
45	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
46	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
47	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
48	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
50	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
51	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
52	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
53	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
54	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
56	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
57	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
58	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
59	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
60	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
61	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
62	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
63	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
64	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
65	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
66	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
67	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
68	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
69	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0

Parauga Nr.	150	152	156	158	160	162	164	166	170	176	200	202	204	206	208	214	216	218	224	220	222	226	228	258	260	261	263	264	265	267	266	270	280	
70	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	
71	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	
72	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
73	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
74	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
75	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
76	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
77	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
78	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
79	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
80	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
81	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
82	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
83	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
84	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
85	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
86	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
87	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
88	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
89	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
90	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
91	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
92	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
93	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
94	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
95	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
96	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
97	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
98	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
99	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
100	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
101	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
102	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
103	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
104	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
106	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
107	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0



Parauga Nr.	150	152	156	158	160	162	164	166	170	176	200	202	204	206	208	214	216	218	224	220	222	226	228	258	260	261	263	264	265	267	266	270	280					
108	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0				
109	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
110	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0				
111	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0				
112	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0			
113	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0			
114	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0			
115	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0			
116	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
117	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0			
118	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0			
119	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0			
120	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0			
121	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0			
122	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0		
123	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
124	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
125	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
126	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
127	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
128	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
129	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
130	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
131	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
132	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
133	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	
134	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
135	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	
136	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
137	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
138	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
139	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
140	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
141	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
142	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
143	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
144	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0		

Parauga Nr.	150	152	156	158	160	162	164	166	170	176	200	202	204	206	208	214	216	218	224	220	222	226	228	258	260	261	263	264	265	267	266	270	280	
145	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
146	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
147	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
148	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
149	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
150	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0