

УДК 631.421.1

КЛОНИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ИНТРОН-ЭКЗОННОГО УЧАСТКА
ГЕНОВ ОРТОЛОГОВ ГЕНА *VIVIPAROUS* НЕКОТОРЫХ ВИДОВ
ДИКИХ СОРОДИЧЕЙ ПШЕНИЦЫ

М.Г. ДИВАШУК, П.Ю. КРУПИН, И.А. ФЕСЕНКО, Г.И. КАРЛОВ

(Центр молекулярной биотехнологии)

В результате проведенного прямого клонирования были получены сиквенсы интрон-экзонного участка генов ортологов гена *Viviparous* у видов *Thinopyrum elongatum*, *Thinopyrum bessarabicum*, *Pseudoroegneria stripifolia*, *Dasyphyrum villosum*. Полученные сиквенсы имеют высококонсервативные последовательности в области экзона и полиморфны в области интрона. Было выделено два аллельных варианта участка гена *Viviparous* у *Dasyphyrum villosum*, различающихся между собой в интронной части и несущих четыре аминокислотные замены в полипептидной цепи. Кластерный анализ показал, что полученные сиквенсы гена *Viviparous* у *Thinopyrum elongatum*, *Thinopyrum bessarabicum*, *Pseudoroegneria stripifolia*, *Dasyphyrum villosum* попадают в кластер с видами, относящимися к родам *Triticum* и *Hordeum*.

Ключевые слова: *Viviparous*, устойчивость к прорастанию,
elongatum, *Thinopyrum bessarabicum*, *Pseudoroegneria stripifolia*,
villosum.

Thinopyrum
Dasyphyrum

Ген *Viviparous* (*Vp*) является одним из важных регуляторов позднего эмбриогенеза у кукурузы и пшеницы [1]. Анализ и клонирование *Vp1*-генов кукурузы и зерновых культур, а также их ортологов у других растений, включая ген нечувствительности к абсцизовой кислоте (АБК) арабидопсиса *Insensitive3* (*ABI3*), показали, что они кодируют факторы транскрипции, которые характеризуются высоким уровнем экспрессии в развивающихся зародышах семян [1—3]. Все клонированные ортологи *ABI3/VP1* (арабидопсиса, кукурузы, риса, овса, бобов и моркови) содержат функциональные домены *V1*, *V2* и *V3*, которые связываются с ДНК и активизируют

целевые промоторы [1—6]. *VP1*-гены кукурузы и риса способствуют транскрипции многих регулируемых АБК генов в развивающемся алейроне [1, 7, 8]. Фенотипы мутантов кукурузы по гену *Vp-1* свидетельствуют о том, что ген выполняет две различных функции: первая — обеспечение созревания зародыша, вторая — регуляция перехода семени в покой и репрессия прорастания.

Три гена-гомолога *Vp-1* клонированы и секвенированы у пшеницы [9]. Анализ структуры и экспрессии этих трех генов показал, что каждый из них потенциально кодирует полноразмерную цепь аминокислот. Однако некорректный сплайсинг проматрич-

ной РНК приводит к aberrантным продуктам трансляции. Исследование уровня экспрессии гена *Vp-1* в созревающих зародышах сортов, устойчивых и неустойчивых к доуборочному прорастанию, выявило положительную корреляцию между покоем семян и чувствительностью к АБК [10]. Авторы [11] сообщили, что неправильный сплайсинг про-мРНК *TaVp1* происходит вокруг домена ВЗ и приводит к синтезу aberrантных мРНК с наличием стоп-кодонов в открытой рамке считывания (ORF). Такой неправильный сплайсинг был также обнаружен в большинстве транскриптов *TaVp1* у диплоидных и тетраплоидных предков мягкой пшеницы, что позволяет предполагать, что современная пшеница унаследовала структуру *TaVp1* от предковых форм [11].

Анализ структуры и функционирования гена *Vp1* у различных злаков может дать новые сведения о механизмах взаимодействия генетических систем в организме, а также о принципах регуляции важнейшего процесса толерантности к прорастанию на корню. Все это в целом позволит разработать биотехнологические и другие подходы к регуляции прорастания зерновых на корню. Таким образом, исследование гена *Vp1* у диких сородичей пшеницы может послужить базой как для изучения функционирования данного гена у различных видов, что приблизит нас к пониманию всех сторон его функциональных особенностей, так и в дальнейшем для направленного трансгеноза или отдаленной гибридизации для привнесения в пшеницу генов, обеспечивающих устойчивость ее к прорастанию на корню.

Целью нашей работы было прямое клонирование и сравнительный анализ области ВЗ домена гена *Viviparous* у следующих видов злаков: *Thinopyrum elongatum*, *Thinopyrum bessarabicum*, *Pseudoroegneria stri-pifolia*, *Dasyphyrum villosum*.

В работе использовали образцы *Thinopyrum elongatum* (PI 401007), *Thinopyrum bessarabicum* (PI 531711), *Pseudoroegneria stri-pifolia* (W621759), *Dasyphyrum villosum* (W621717), полученные из Germplasm Research International Network. ДНК выделяли из молодых листьев и корешков по методу Bernatzky и Tanksley [12]. Использовали праймеры VP-1BB4F и VP-1BB4R [11]. Условия амплификации — первоначальная денатурация 5 мин при 94°C, далее 35 циклов при следующих условиях 95°C — 1 мин, 66°C — 1 мин, 72°C — 1 мин, и конечная элонгация в течении 10 мин при 72°C. Прямое секвенирование осуществляли с ПЦР продукта с помощью праймеров VP-1BB4F и VP-1BB4R [11]. Секвенирование проводили на приборе ABI-3130XL. Выравнивание сиквенсов проводили с использованием программы GenDoc; поиск гомологий и построение филогенетических деревьев — с помощью программного обеспечения Blast и Mega 4.0.

Результаты и их обсуждение

При проведении ПЦР с праймерами VP-1BB4F и VP-1BB4R, комплементарными к шестому экзону и пятому интрону гена *Viviparous* у субгенома В мягкой пшеницы на всех исследуемых образцах были получены единичные продукты амплификации одного размера, что обеспечивало возможность прямого секвенирования. Прямое секвенирование указало на однородность амплифицируемых фрагментов для каждого из изучаемых образцов внутри одного вида. В результате проведенного прямого секвенирования ПЦР-продуктов нами были получены сиквенсы, включающие в свой состав шестой экзон и часть пятого интрона гена *Viviparous*, у следующих видов *Th. elongatum*, *Th. bessarabicum*,

P. stripifolia, *D. villosum*. Для разных растений *D. villosum* были получены различные сиквенсы, которые укладывались в два варианта, поэтому мы выделили у *D. villosum* два аллельных варианта этого участка гена *Viviparous* (рис. 1).

Как видно на рисунке 2, полученные нами сиквенсы на диких сородичах в основном различаются своей неинформативной интронной частью, а на нуклеотидной последовательности, относящейся к экзону, больших различий не наблюдается. При этом следует отметить, что именно полиморфизм в этой области интрона у беззерных пшениц вызывает различия в устойчивости к прорастанию на корню [11]. Это связывают с альтернативным сплайсингом при наличии определенного полиморфизма в интронах. Таким образом, на функционирование гена *Viviparous* оказывает влияние не только информация, закодированная в экзонах, но и наблюдающийся полиморфизм в интронах.

Трансляции полученных нами сиквенсов и выравнивание их между собой и с полипептидами, продуцируемыми генами пшеницы *VP-1B* и *VP-1D*, представлены на рисунке 3.

Как видно, среди полипептидов наблюдается высокий консерватизм и сродство к полипептидам, продуцируемым субгенами мягкой пшеницы. При этом различия в аминокислотах в основном повторяют полиморфизм и у субгеномов мягкой пшеницы.

При построении филогенетических деревьев с участием полученных сиквенсов мы можем видеть, что все сиквенсы попадают в кластер с видами, относящимися к родам *Triticum* и *Hordeum* (рис. 4). При этом сиквенсы участка гена *Viviparous*, полученные нами на *Th. elongatum* и *Th. bessarabicum*, стоят ближе к видам *Hordeum* по сравнению с сиквенсами из *Dasypyrum villosum* и *Pseudoroegneria stripifolia*.

Таким образом, клонированные и охарактеризованные нами последовательности ДНК могут служить от-

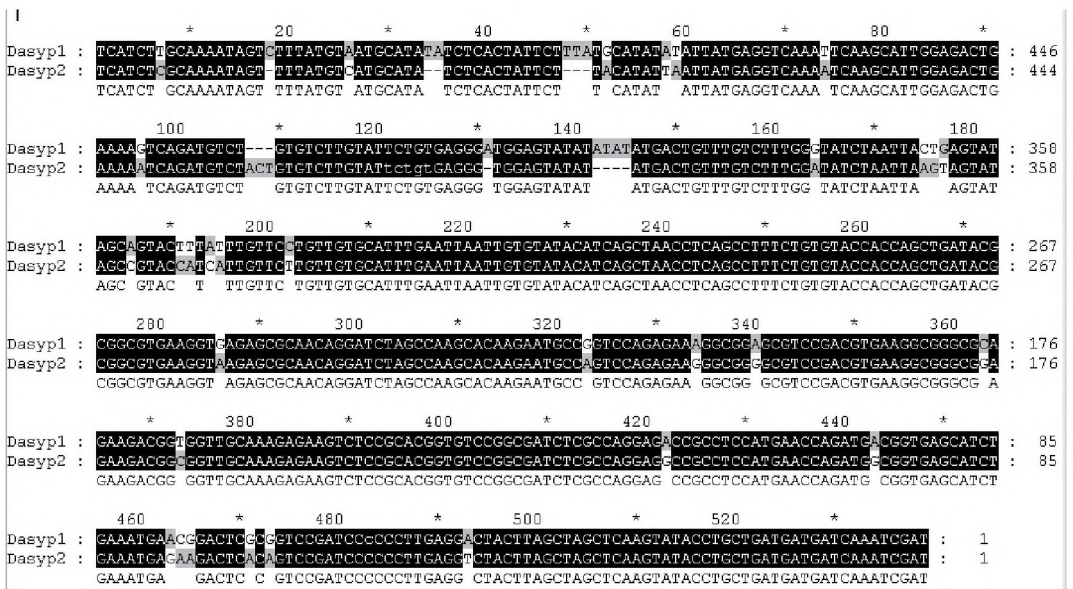


Рис. 1. Выравнивание двух аллельных вариантов участка гена *Viviparous*, выявленных у *Dasypyrum villosum*

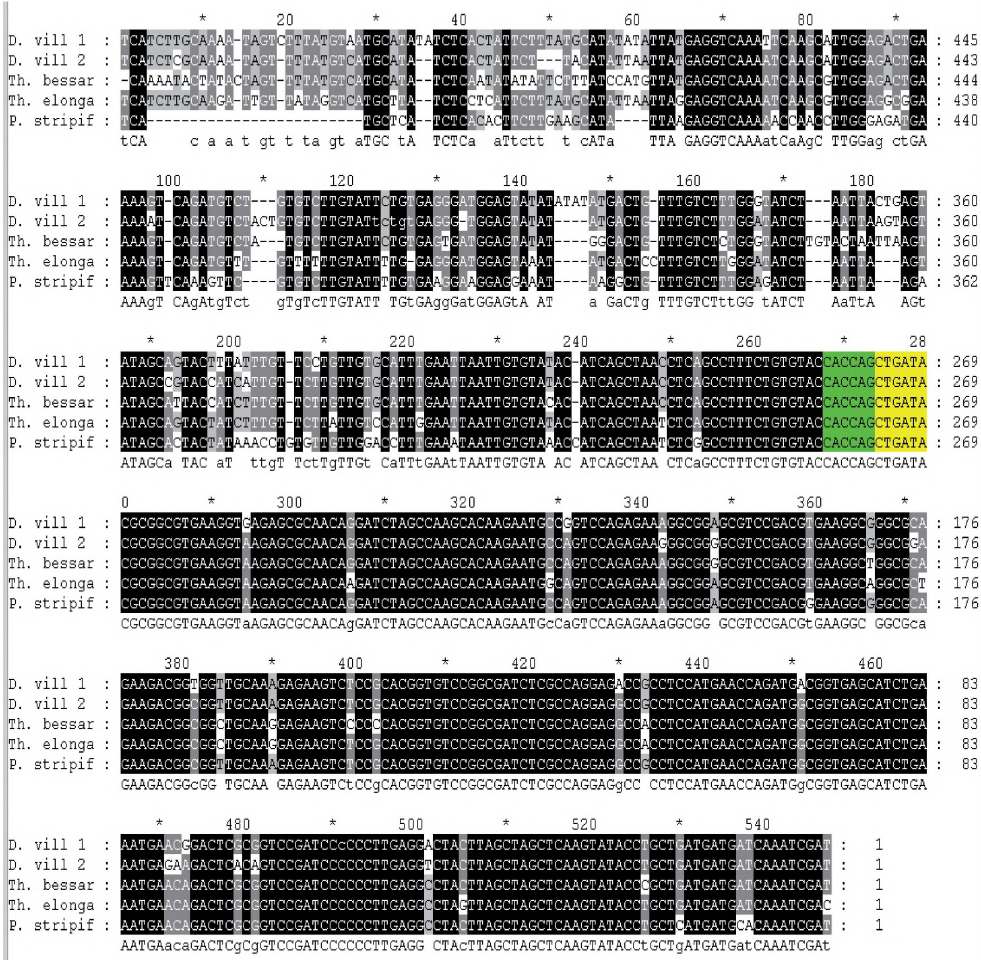


Рис. 2. Выравнивание полученных нами сиквенов участка гена *Viviparous* у диких сородичей пшеницы. Цветом обозначен конец интрона (зеленый) и начало экзона (желтый)

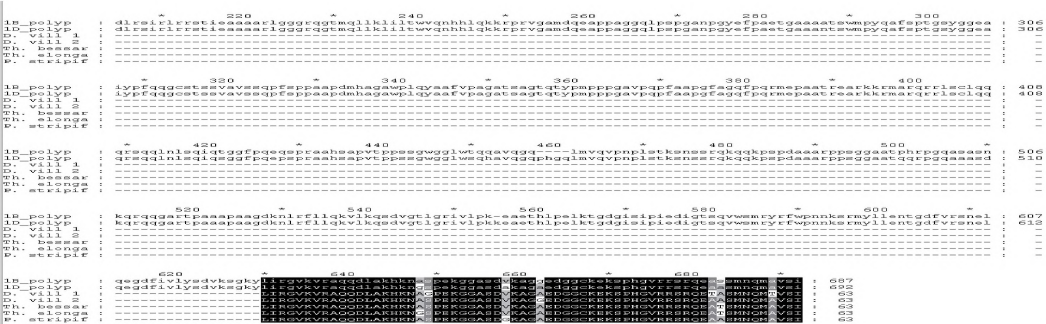


Рис. 3. Выравнивание полипептидов генов *VP-18* и *Vp-10* и вновь полученных сиквенов диких сородичей пшеницы

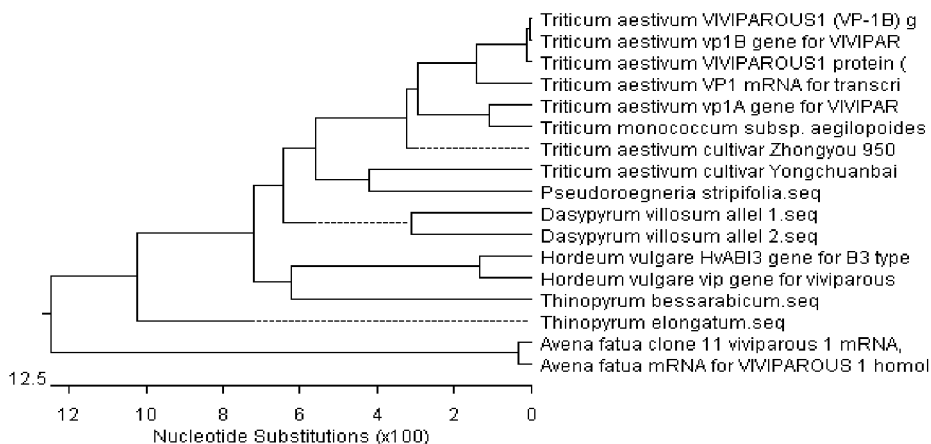


Рис. 4. Кластеризация пшеницы сиквенса участка гена Viviparous диких сородичей

правной точкой для клонирования полноразмерных генов ортологов у изучаемых видов.

Выводы

1. Полученные сиквенса ортологов гена Viviparous у *Thinopyrum elongatum*, *Thinopyrum bessarabicum*, *Pseudoroegneria stripifolia*, *Dasyphyrum villosum* имеют высококонсервативные последовательности в области экзона и полиморфны в области интрона.

2. Нами выделены два аллельных варианта гена Viviparous у *Dasyphyrum villosum*, различающиеся как в ин-

тронной части, так и несущие четыре аминокислотные замены в полипептидной цепи.

3. Полученные сиквенса участка гена Viviparous у *Thinopyrum elongatum*, *Thinopyrum bessarabicum*, *Pseudoroegneria stripifolia*, *Dasyphyrum villosum* попадают в кластер с видами, относящимися к родам *Triticum* и *Hordeum*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по образованию в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» 2009-2013 гг. (государственный контракт П598 «Конструирование ДНК-библиотеки генов гомологов гена Vp-1 (viviparous) злаковых культур и её характеристика»).

Библиографический список

1. Cao J., Duan X., McElroy D., Wu R. Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells. *Plant Cell Rep*, 1992. 11, 586-591.
2. Shen Q., Gomez-Cadenas A., Zhang P., Walker-Simmons M.K., Sheen J., Ho T.H. Dissection of abscisic acid signal transduction pathways in barley aleurone layers. *Plant Mol. Biol*, 2001. 47, 437-448.
3. Utsugi S., Maekawa M., Noda K. An efficient transient gene expression system using aleurones of diploid wheat seeds. *Plant Biotechnology*, 2006. 23, 413-417.
4. Jacobsen J.V., Close T.J. Control of transient expression of chimaeric genes by gibberellic acid and abscisic acid in protoplasts prepared from mature barley aleurone layers. *Plant Mol. Biol*, 1991.16, 713-724.

5. Kushiro T., Olcamoto M., Nakabayashi K., Yamagishi K., Kitamura S., Asami T., Hirai N., Koshiba T., Kamiya Y., Nambara E. The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8^h-hydroxylases: key enzymes in catabolism. *EMBO J*, 2004. 23,1647-1656.
6. Nakamura S., Toyama T. Isolation of a VP1 homologue from wheat and analysis of its expression in embryos of dormant and non-dormant cultivars. *J. Exp. Bot.*, 2001. 52,875-876.
7. Ezcurra I., Wycliffe P., Nehlin L., Ellerstrom M., Rask L. Transactivation of the Brassica napus napin promoter by ABI3 requires interaction of the conserved B2 and B3 domains of ABI3 with different cis-elements: B2 mediates activation through an ABRE, whereas B3 interacts with an RY/G-box. *Plant J.*, 2000. 24, 2457-2466.
8. Zentella R., Yamauchi D., Ho T.H. Molecular dissection of the gibberellin/abscisic acid signaling pathways by transiently expressed RNA interference in barley aleurone cells. *Plant Cell*, 2002. 14, 2289-2301.
9. Gomez-Cadenas A., Zentella R., Walker-Simmons M.K., Ho T.H. Gibberellin/abscisic acid antagonism in barley aleurone cells: site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules. *Plant Cell*, 2001. 13, 667-679.
10. McKibbin R.S., Wilkinson M.D., Bailey P.C., Flintham J.E., Andrew L.M., Lazzeri P.A., Gale M.D., Lenton J.R., Holdsworth M.J. Transcripts of Vp-1 homeologues are misspliced in modern wheat and ancestral species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2002.10203-10208.
11. Yang Y., Zhao X.L., Xia L.Q., Chen X.M., Xia X.C., Yu Z., He Z.H., Roder M. Development and validation of a Vv1 parous-1 STS marker for pre-harvest sprouting tolerance in Chinese wheats. *Theor. Appl. Genet.*, 2007. 115, 971-980.
12. Bernatzky R., Tanksley S.D. Toward a saturated linkage map in tomato based on isozyme and random cDNA sequences // *Genetics*, 1986. Vol. 112. P. 887-898.

SUMMARY

As a result of carried out direct cloning, some sequences of intron-exon genes' part of Viviparous gene orthologues in varieties *Trunopyrum elongatum*, *Thinopyrum bessarabicum*, *Pseudoroegneria stripifolia*, *Dasyphyrum villosum* have been obtained. These sequences have highly conservative successions in exon area and are polymorphous in intron zone. Two allelic variants of gene part Viviparous in *Dasyphyrum villosum*, differing in intron area and having four aminoacidic changes in a polypeptide chain, have been detected and sorted out. Cluster analysis shows that the sequences of the gene Viviparous in *Trunopyrum elongatum*, *Thinopyrum bessarabicum*, *Pseudoroegneria stri pifolia*, *Dasyphyrum villosum* come to the cluster with varieties of *Triticum* and *Hordeum* families.

Key words: Viviparous, resistance to germination, *Trunopyrum elongatum*, *Thinopyrum bessarabicum*, *Pseudoroegneria stripifolia*, *Dasyphyrum villosum*.

Дивашук Михаил Георгиевич — к. б. н. Тел. 977-70-01.
 Крупин Павел Юрьевич — асп. центра молекулярной биотехнологии РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел. 977-70-01.
 Фесенко Игорь Александрович — к. б. н. Тел. 977-70-01.
 Карлов Геннадий Ильич — к. б. н. Эл. почта: karlov@timacad.ru