

КЛОНИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ИНТРОН-ЭКЗОННОГО УЧАСТКА ГЕНА *VIVIPAROUS1* У *THINOPYRUM INTERMEDIUM* И *THINOPYRUM PONTICUM*

Дивашук М.Г., Крупин П.Ю., Фесенко И.А., Коротаева А.С., Разумова О.В., Карлов Г.И.

Центр молекулярной биотехнологии. ФГОУ ВПО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», г. Москва, Россия, e-mail: divashuk@gmail.com

В результате клонирования и секвенирования были получены нуклеотидные последовательности интрон-экзонного участка генов-ортологов гена *Viviparous1* у видов *Thinopyrum intermedium* и *Thinopyrum ponticum*. Полученные сиквенсы имеют высококонсервативные последовательности в области экзона и полиморфны в области интрона. Нами выделены три аллельных варианта гена *Viviparous1* у *Thinopyrum intermedium* и четыре аллельных варианта у *Thinopyrum ponticum*. Полученные сиквенсы гена *Viviparous1* у *Thinopyrum intermedium* и *Thinopyrum ponticum* попадают в кластер с *Triticum aestivum*.

Ключевые слова: *Viviparous1*, экзон, интрон, *Thinopyrum intermedium*, *Thinopyrum ponticum*.

CLONING AND ANALYSIS OF INTRON-EXON REGION GENE *VIVIPAROUS1* HAVE *THINOPYRUM INTERMEDIUM* AND *THINOPYRUM PONTICUM*.

Divashuk M.G., Krupin P.Y., Fesenko I.A. Korotaeva A.S., Razumova O.V., Karlov G.I.

Center for Molecular Biotechnology. FGOU VPO Russian State Agrarian University named after K.A. MSHA Timiryazev, Moscow, Russia, e-mail: divashuk@gmail.com

The nucleotide sequences of the intron-exon region of the *Viviparous1* gene ortholog of *Thinopyrum intermedium* и *Thinopyrum ponticum* have been obtained as a result of cloning and sequencing analysis. The exon and the intron have appeared to contain highly conservative and polymorphic sequences, respectively. Three alleles have been identified for *Viviparous1* of *Thinopyrum intermedium* and four alleles for *Thinopyrum ponticum*. The nucleotide sequence are clustered together with *Viviparous1* of *Triticum aestivum*.

Keywords: *Viviparous1*, exon, intron, *Thinopyrum intermedium*, *Thinopyrum ponticum*.

Введение

Ген *Viviparous1* (*Vp1*) является одним из важных регуляторов позднего эмбриогенеза у мягкой пшеницы [1]. Ген *Vp1* кукурузы и риса способствуют транскрипции многих регулируемых абсцизовой кислотой (АБК) генов в развивающемся алейроне [1; 7; 8]. Фенотипы мутантов кукурузы по гену *Vp1* свидетельствуют о том, что ген выполняет две различные функции: первая – обеспечение созревания зародыша, вторая – регуляция перехода семени в покой и репрессия прорастания. Три гена-гомолога *Vp1* клонированы и секвенированы у мягкой пшеницы [9]. Анализ структуры и экспрессии этих трёх генов показал, что каждый из них потенциально кодирует полноразмерную цепь аминокислот. Однако некорректный сплайсинг проматричной РНК приводит к aberrantным продуктам трансляции. Исследование уровня экспрессии гена *Vp1* в созревающих зародышах устойчивых и неустойчивых к доуборочному прорастанию сортов выявило положительную корреляцию между покоем семян и чувствительностью к АБК [10]. McKibbin и др. (2002) сообщили, что неправильный сплайсинг пре-мРНК *TaVp1*

происходит вокруг домена ВЗ, приводя к синтезу абберантных мРНК с наличием стоп-кодонов в открытой рамке считывания (*ORF*) [11].

Анализ структуры и функционирования гена *Vp1* у различных злаков может дать новые сведения о механизмах взаимодействия генетических систем в организме, а также понять принципы регуляции важнейшего процесса – толерантности к прорастанию на корню. Все это в целом позволит разработать биоинженерные и другие подходы к регуляции прорастания зерновых на корню. Таким образом, исследования гена *Vp1* у диких сородичей пшеницы может послужить 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 интрогрессии в пшеницу генов, обеспечивающих устойчивость её к прорастанию на корню.

Генетические ресурсы важны для поддержания мирового производства пшеницы как в настоящий момент, так и в будущем. Это понятие включает широкий диапазон генетического разнообразия, необходимого для усиления потенциала урожайности пшеницы. Генетические ресурсы открывают доступ к новым источникам устойчивости и толерантности к биотическим и абиотическим стрессам.

Современные высокоурожайные сорта пшеницы представляют собой сочетания генов или генных комбинаций, собранных селекционерами, использующими, в большинстве случаев, хорошо приспособленные сорта собственных регионов. Международные исследования в аграрной сфере значительно расширили доступность высокоадаптивных генетически разнообразных ресурсов для селекции мягкой пшеницы. Интрогрессия дополнительной вариации, обнаруженной в генетических ресурсах, необходима для увеличения стабильности получаемого урожая и дальнейшего улучшения пшеницы.

В качестве доноров хозяйственно-ценных признаков в отдалённой гибридизации пшеницы в разное время использовалось несколько видов пырея. Среди видов рода *Thinopyrum* наиболее ценными для отдалённой гибридизации с пшеницей представляются пырей средний *Th. intermedium* (JJJ^SJ^SSS, 2n = 6x = 42) и пырей понтийский *Th. ponticum* (JJJJJJ^SJ^SJ^SJ^S, 2n = 10x = 70).

Целью нашей работы было прямое клонирование и сравнительный анализ области ВЗ домена гена *Viviparous1* у *Th. intermedium* и *Th. ponticum*.

Материалы и методы

Растительный материал

В работе использовали образец *Th. intermedium* PI 547312 и *Th. ponticum* PI 401200 (полученные из Germplasm Research International Network).

Выделение ДНК

ДНК выделяли из молодых листьев и корешков по методу Bernatzky и Tanksley [12].

ПЦР, клонирование, секвенирование

В работе использовались следующие праймеры: VP-1BB4F и VP-1BB4R. Условия амплификации: первоначальная денатурация 5 минут 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 минут при 72 °C.

Лигирование амплифицированной ДНК осуществляли с помощью pGEM®-T Easy Vectors. 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 Lasergene.

Результаты и обсуждение

При проведении ПЦР с праймерами VP-1BB4F и VP-1BB4R, комплементарными к шестому экзону и пятому интрону гена *Viviparous1* у субгенома *B* мягкой пшеницы на всех исследуемых образцах *Th. intermedium* и *Th. ponticum* были получены продукты амплификации различного размера. Нами были клонированы и секвенированы все ПЦР-продукты, амплифицируемые на видах *Th. intermedium* и *Th. ponticum*.

Для образцов *Th. intermedium* были получены различные сиквенсы, которые укладывались в три варианта, поэтому мы посчитали целесообразным выделить у *Th. intermedium* три аллельных варианта этого участка гена *Viviparous1* (рис. 1). Как видно на рисунке 1, полученные нами сиквенсы на *Th. intermedium* в основном различаются в своей неинформативной интронной части, а в участке нуклеотидной последовательности, относящейся к экзону, больших различий не наблюдается, кроме одно-нуклеотидные замены. Подобная картина наблюдалась и в предыдущей нашей работе по анализу гена *Viviparous1* у видов *Thinopyrum elongatum*, *Thinopyrum bessarabicum*, *Pseudoroegneria stripifolia*, *Dasypyrum villosum* [13]. При этом следует отметить, что именно полиморфизм в этой области интрона у белозерных 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 *Viviparous1* оказывает влияние не только информация, закодированная в экзонах, но и наблюдающийся полиморфизм в интронах.

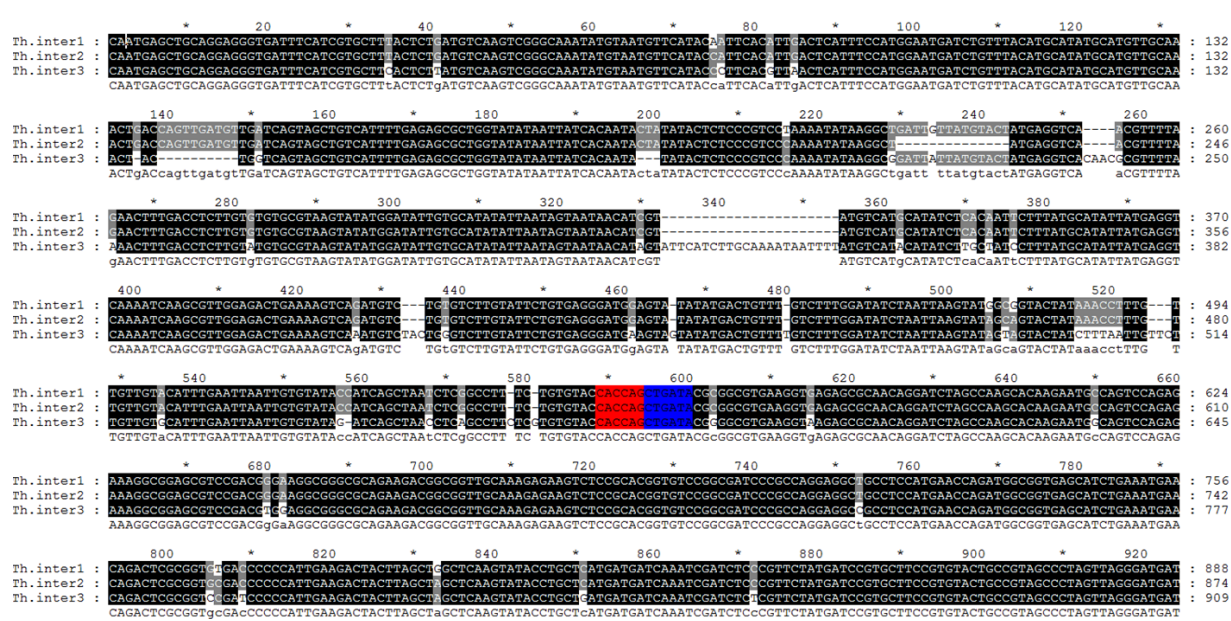


Рис. 1. Выравнивание трех аллельных вариантов участка гена *Viviparous1*, выявленных у аллелей *Thinopyrum intermedium*. Цветом обозначен конец интрона (красный) и начало экзона (синий)

Для образцов *Th. ponticum* были получены различные сиквенсы, которые укладывались в четыре варианта нуклеотидных последовательностей различных аллелей (рис. 2). При этом следует отметить, что в отличие от сиквенсов, полученных нами на видах *Th. intermedium*, *Th. elongatum*, *Th. bessarabicum*, *Pseudoroegneria stipifolia*, *Dasypyrum villosum*, у *Th. ponticum* наблюдалось достаточно существенное разнообразие в области шестого экзона (рис. 2). Так, у последовательности *Th. pont1* в районе экзона имеется вставка размером 427 п.н. Таким образом, можно предположить, что функционирование данного аллеля может существенно отличаться от функционирования аллелей гена *Viviparous1*, известных к настоящему времени.

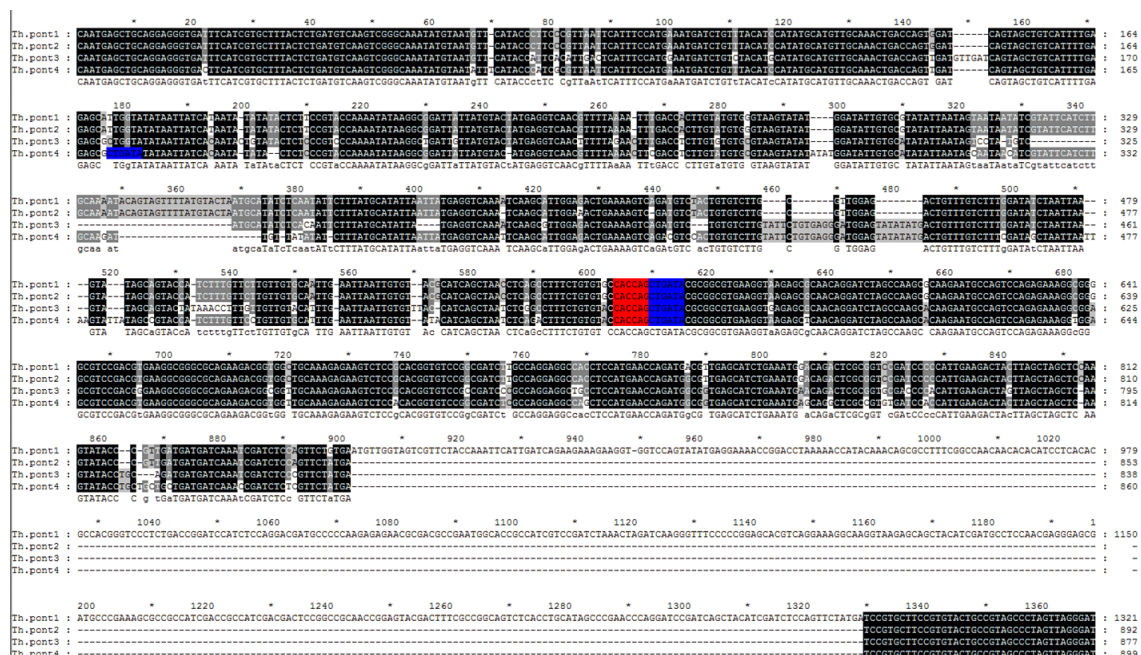


Рис. 2. Выравнивание четырех аллельных вариантов участка гена *Viviparous1*, выявленных у аллелей *Thinopyrum ponticum*. Цветом обозначен конец интрона (красный) и начало экзона (синий)

При построении филогенетических деревьев с участием полученных в нашей работе сиквенсов мы установили, что все они попадают в один кластер с последовательностями к виду мягкой пшеницы *Triticum aestivum* (рис. 3). Сиквенсы генов-гомологов *Vp1* мягкой пшеницы различных субгеномов оказались в различных кластерах, в то время как сиквенсы пырея среднего и пырея понтийского были объединены в один кластер. Полученные нами результаты согласуются с данными Cai и Jones [14], в соответствии с которыми субгеномы пырея понтийского и среднего J, S и J^S ближе друг к другу, чем субгеномы мягкой пшеницы A, B и D. На себя обращает внимание кластеризация выявленных нами последовательностей пырея понтийского и пырея удлиненного с опубликованной последовательностью *Triticum aestivum* vp1D, которая относится к D-субгеному мягкой пшеницы, что согласуется с данными о близости D-субгенома и субгеномов St и J пырея [15]. Таким образом, полученные нами результаты способствуют установлению филогенетических и эволюционных связей между различными видами пырея и мягкой пшеницы.

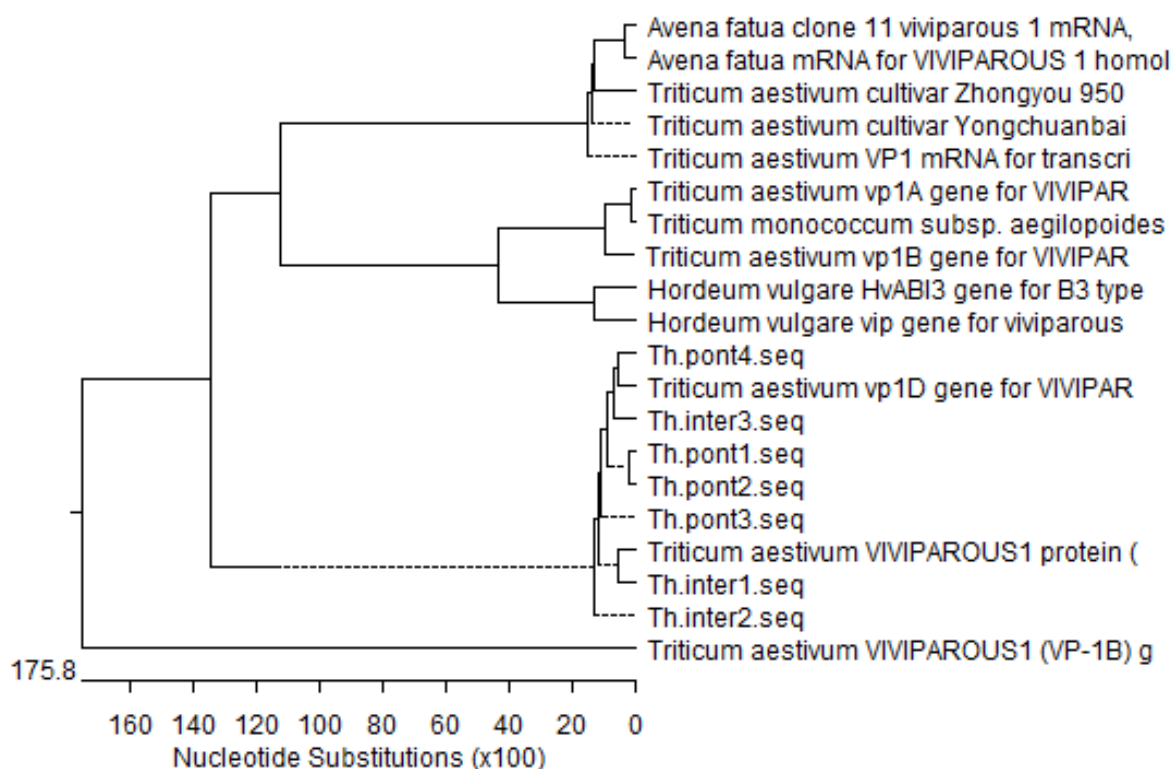


Рис. 3. Кластеризация полученных нами сиквенсов участка гена *Viviparous1* с известными сиквенсами злаковых культур

Клонированные и охарактеризованные нами последовательности ДНК могут служить отправной точкой для клонирования полноразмерных генов-ортологов у изучаемых видов. Как известно, одним из способов повышения устойчивости к

прорастанию на корню может быть внедрение в геном мягкой пшеницы генов *Vp1* из различных видов злаков при межвидовой и отдаленной гибридизации. Благодаря высокой скрещиваемости наиболее привлекательными для этой цели являются различные виды пырея.

Таким образом, полученные нами нуклеотидные последовательности смогут послужить для создания молекулярных маркеров для оценки влияния различных генов *Viviparous1* пырейного происхождения на прорастание семян злаковых, а в дальнейшем и для интрогрессии их в геном пшеницы.

Выводы

1. Полученные сиквенсы ортологов гена *Viviparous1* у *Thinopyrum ponticum* и *Thinopyrum intermedium* имеют высококонсервативные последовательности в области экзона и полиморфны в области интрона.
2. Нами выделены три аллельных варианта гена *Viviparous1* у *Thinopyrum intermedium* и четыре аллельных варианта у *Thinopyrum ponticum*.
3. Полученные сиквенсы участка гена *Viviparous1* у *Thinopyrum ponticum* и *Thinopyrum intermedium* попадают в кластер к виду *Triticum aestivum*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по образованию в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», государственный контракт П598 от 06 августа 2009 г. «Конструирование ДНК-библиотеки генов гомологов гена Vp-1 (viviparous) злаковых культур и её характеристика». Работа была выполнена с использованием оборудования ЦКП «ВНИИСБ»

Список литературы

1. Cao J., Duan X., McElroy D. and Wu R. (1992) Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile- mediated transformation of suspension culture cells. *Plant Cell Rep.* 11, 586–591.
2. Shen Q., Gomez-Cadenas A., Zhang P., Walker-Simmons M.K., Sheen J. and Ho T.H. (2001) Dissection of abscisic acid signal transduction pathways in barley aleurone layers. *Plant Mol. Biol.* 47, 437–448.
3. Utsugi S., Maekawa M. and Noda K. (2006) An efficient transient gene expression system using aleurones of diploid wheat seeds. *Plant Biotechnology* 23, 413–417.
4. Jacobsen J.V. and Close, T.J. (1991) Control of transient expression of chimaeric genes by gibberellic acid and abscisic acid in protoplasts prepared from mature barley aleurone layers. *Plant Mol. Biol.* 16, 713–724.

5. Kushiro T., Okamoto M., Nakabayashi K., Yamagishi K., Kitamura S., Asami T., Hirai N., Koshiba T., Kamiya Y. and Nambara E. (2004) The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in catabolism. *EMBO J.* 23, 1647–1656.
6. Nakamura S. and Toyama T. (2001) Isolation of a VP11 homologue from wheat and analysis of its expression in embryos of dormant and non-dormant cultivars. *J. Exp. Bot.* 52, 875–876.
7. Ezcurra I., Wycliffe P., Nehlin L., Ellerstrom M. and Rask L. (2000) 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.* 24, 2457–2466.
8. Zentella R., Yamauchi D. and Ho T.H. (2002) Molecular dissection of the gibberellin/abscisic acid signaling pathways by transiently expressed RNA interference in barley aleurone cells. *Plant Cell* 14, 2289–2301.
9. Gomez-Cadenas A., Zentella R., Walker-Simmons M.K. and Ho T.H. (2001) Gibberellin/abscisic acid antagonism in barley aleurone cells: site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules. *Plant Cell* 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. and Holdsworth M.J. (2002) Transcripts of *Vp1-1* homeologues are misspliced in modern wheat and ancestral species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 10203–10208.
11. Yang Y., Zhao X.L., Xia L.Q., Chen X.M., Xia X.C., Yu Z., He Z.H., and Roder M. Development and validation of a Viviparous1-1 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.
13. Дивашук М.Г., Крупин П.Ю., Фесенко И.А., Карлов Г.И. Клонирование и анализ интрон-экзонного участка генов-ортологов гена *Viviparous1* некоторых видов диких сородичей пшеницы // *Изв. Тимирязевской сельскохозяйственной академии.* – 2010. – 2: 76–81.
14. Cai X., Jones S. Direct evidence for high level of autosyndetic pairing in hybrids of *Thinopyrum intermedium* and *Th. ponticum* with *Triticum aestivum* // *Theor Appl Genet.* – 1997. – 95: 568–572.
15. Liu Z., Li D., Zhang X. Genetic Relationships Among Five Basic Genomes St, E, A, B and D in *Triticeae* Revealed by Genomic Southern and *in situ* Hybridization // *Journal of Integrative Plant Biology.* – 2007. – Vol. 49. – Issue 7. – P. 1080–1086. July.

Рецензенты:

Соловьев А.А., д.б.н., профессор, зав. кафедрой генетики и биотехнологии РГАУ МСХА им. К.А. Тимирязева, г. Москва.

Джалилов Ф.С., д.б.н., профессор, зав. лабораторией защиты растений РГАУ МСХА им. К.А. Тимирязева, г. Москва.

Работа получена 30.08.2011