

РОЗДІЛ І. ГЕНЕТИКА, ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН ТА ПРИКЛАДНА БОТАНІКА

УДК 633.15 : 577.151 : 577.212

ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ *y1* ГЕНА КУКУРУДЗИ

Жуков Б.С., Сліщук Г.І., Волкова Н.Е.

*Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннезнавства
та сортовивчення НААН України*

65036, Україна, Одеса, Овідіопольська дорога, 3

vanbjorn@gmail.com

За допомогою методів філогенетичного аналізу нуклеотидних послідовностей досліджено ген *y1* злакових та встановлено, що розподіл кластерів збігається з систематичним розподілом таксонів. Встановлений *D* коефіцієнт Таджими демонструє нейтральний диверсифікуючий характер еволюції *y1* гена. За результатами аналізу сили відбору окремих амінокислотних залишків встановлено 19 важливих позицій, у яких кількість синонімічних замін перевищує кількість несинонімічних, що свідчить про їх суттєву роль для функціонування ферменту фітоїнсинтази.

Ключові слова: філогенетика, кукурудза, ген y1, екзон, інтрон, поліморфізм, селекція.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ *y1* ГЕНА КУКУРУЗЫ

Жуков Б.С., Слищук Г.И., Волкова Н.Э.

*Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноводства и сортоизучения НААН Украины
65036, Украина, Одесса, Овидиопольская дорога, 3*

vanbjorn@gmail.com

С помощью методов филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей исследован ген *y1* злаковых и установлено, что распределение кластеров совпадает с систематическим распределением таксонов. Установленный *D* коэффициент Таджими демонстрирует нейтральный диверсифицирующий характер эволюции *y1* гена. По результатам анализа силы отбора отдельных аминокислотных остатков установлены 19 важных позиций, в которых количество синонимичных замен превышает количество несинонимичных, что свидетельствует об их существенной роли для функционирования фермента фитоинсинтазы.

Ключевые слова: филогенетика, кукуруза, ген y1, экзон, интрон, полиморфизм, селекция.

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF MAIZE *y1* GENE

Zhukov B.S., Shishuk G.I., Volkova N.E.

Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar investigation

65036, Ukraine, Odessa, Ovidiopolskaya doroga Str., 3

vanbjorn@gmail.com

First important step in carotene biosynthesis pathway is geranylgeranyl pyrophosphate to phytoene conversion via phytoene synthase enzyme. Phytoene synthase-coding gene in maize genome was designated as *y1*. Phylogenetic dendrogram was reconstructed as a result of 92 *y1* gene nucleotide sequences global alignment. The bootstrap consensus tree inferred from 500 replicates. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates are collapsed. Samples were divided into two clusters. Panicoideae, Pooideae, and Bombusodae clades representatives have formed cluster I, while as Oryzodae subfamily have formed cluster II. Maize formed I cluster with other Panicoideae clade representatives, such as tripsacum (*Tripsacum spp.*), Job's Tears (*Coix lacryma*), sorghum (*Sorghum bicolor*), and foxtail millet (*Setaria italica*). Pooideae subfamily, as well as Bombusodae formed separate branches within cluster I. Cluster allocation generally corresponds to systematic one. Maize *y1* gene neutrality of evolution evaluation was conducted using Tajima *D* criteria. Tajima *D* negative value, which equals -0,036137, indicates this gene neutral evolution pattern, and

consequently its diversifying pattern. Due to the fact that maize is domesticated plant, this indicates that artificial selection was not centered on one or another allele of this gene.

For maize *y1* intraspecific polymorphism investigation 53 pre-mRNA, 53 mature mRNA *y1* gene samples, obtained via in silico splicing nucleotide alignment was conducted.

Maize *y1* pre-mRNA phylogenetic dendrogram contains large amount of separate subclusters, their allocation indicates that vast majority of polymorphic sites in *y1* gene belong to intronic regions and doesn't interfere with enzyme function. Large amount of subclusters within maize *y1* gene mature mRNA phylogenetic dendrogram, which indicates that there is large amount of lesser polymorphisms within exons. Samples FJ971190 and FJ971191 formed separate cluster, which indicates polymorphism within exons.

Maximum Likelihood analysis of natural selection codon-by-codon was performed. So, within 412 investigated codons only 26 were nonzero selection rate. For these aminoacid residues, which $dN - dS$ evaluated to be negative (codons 33, 38, 54, 56, 59, 61, 104, 161, 184, 241, 250, 265, 270, 272, 291, 308, 339, 341, 376), it can be argued that number of synonymous substitutions exceeds the number nonsynonymous ones by these sites, which indicates that these sites are critical for phytoene synthase enzyme.

For these sites, were $dN - dS$ was positive (codons: 47, 52, 53, 199, 201, 256, 343), it can be assumed that there was diversifying selection by these sites.

Thereby, as a result of phylogenetic analysis it was concluded that cereals distribution by *y1* gene generally corresponds to their common systematic taxon distribution and to «An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III». As a result of maize pre-mRNA and mature mRNA nucleotide alignment it was shown that majority of *y1* gene polymorphism is within intronic regions and doesn't influence enzyme function. Large amount of lesser substitutions were detected within *y1* gene exons.

Maximum Likelihood analysis of natural selection codon-by-codon is concluded that 26 codons were under non-neutral selection. Within only 19 among them amount of synonymous substitutions exceeds non-synonymous ones, which indicates their importance for phytoene synthase functioning.

Obtained results could become strong scientific basis for *y1* gene molecular-genetic analysis, which could led to Marker assisted selection technique. Molecular genetics approaches combination with traditional breeding ones may enhance maize lines creation efficiency.

Keywords: phylogenetics, Zea mays L., gene y1, exon, intron, polymorphism, breeding.

ВСТУП

Кукурудза (*Zea mays* L.) є однією з найважливіших злакових культур для більшості країн світу, в тому числі для народного господарства України. Зерно кукурудзи містить велику кількість нутрієнтів, воно є надійним джерелом олії, борошна, крупи, крохмалю, етилового спирту, декстрину, глюкози, вітаміну А та інших речовин [1]. Окрім цього, кукурудза характеризується значним природним різноманіттям складу каротиноїдів, у тому числі попередника вітаміну А – β -каротину, але містить їх у дуже низькій концентрації (у середньому 0,13-2,70 нмоль/г) [2]. Тому актуальним є вивчення генів, що кодують ферменти каротиногенезу в зерні кукурудзи.

Ген *y1* кукурудзи, що кодує фітоїнсинтазу (phytoene synthase), – перший фермент у циклі каротиногенезу – локалізовано у довгому плечі хромосоми 6. До його структури входить 6 екзонів та 5 інтронів.

Фітоїнсинтаза каталізує двоступеневу реакцію, під час якої конденсуються дві молекули гераніл-гераніл пірофосфата (geranylgeranyl pyrophosphate) для утворення фітоїну (phytoene) через префітоїнпірофосфат (prephytoene pyrophosphate). Але сам фітоїн рідко накопичується в рослинах, у подальших етапах біосинтезу каротиноїдів він повністю перетворюється в лікопін [4].

Алелі гена *y1* пов'язані з концентрацією каротина в ендоспермі насіння, що фенотипово виражається в кольорі, якій стає менш насиченим або зовсім білим. Для кукурудзи це проявляється білим або блідо-жовтим ендоспермом [3].

Різні "дикі типи" алелів гена *y1* відрізняються інсерціями мобільних елементів у промотор, поліаденіновими додатковими регіонами та довгими тандемними повторами нуклеотидів ССА, без помітного впливу на функцію гена. Домінантний "дикий тип" *Y1* алеля проявляється у високому рівні експресії в ембріоні та ендоспермі [5].

Мета нашої роботи полягала у філогенетичному дослідженні поліморфізму *u1* гена у злакових та кукурудзи зокрема.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліджували 92 нуклеотидні послідовності гена *u1* злакових, із них 53 нуклеотидні послідовності кукурудзи, отримані з бази даних Національного центру біотехнологічної інформації (National Center for Biotechnology Information). Пошук нуклеотидних послідовностей гена *u1* проводили локальним вирівнюванням за алгоритмом Сміта-Вотермана за допомогою он-лайн програми “blastn” [6]. Глобальне понуклеотидне та покодонне вирівнювання послідовностей проводили за алгоритмом Нідлмана-Вунша [7] з використанням програм MEGA5.2 та UGENE за алгоритмом ClustalW та ClustalW (Codons) [8].

Філогенетичний аналіз проводили з використанням пакета MEGA5.2 [9]. Дослідження нейтральності еволюції проводили за D-критерієм Тадзими [10]. Конструювання філогенетичних дендрограм проводили за методом UPGMA [11], еволюційні дистанції розраховані з використанням Maximum Composite Likelihood (MCL) методу, критерієм достовірності слугував bootstrep test [12]. Масштаб дендрограми такий, що довжина гілок пропорційна еволюційним дистанціям, згідно зі шкалою під дендрограмою [13]. Співвідношення синонімічних та несинонімічних замін аналізували за допомогою функції тестування відбору за окремими кодонами програми MEGA5.2.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті глобального вирівнювання 92 нуклеотидних послідовностей гена *u1* реконструйовано філогенетичну дендрограму (рис. 1).

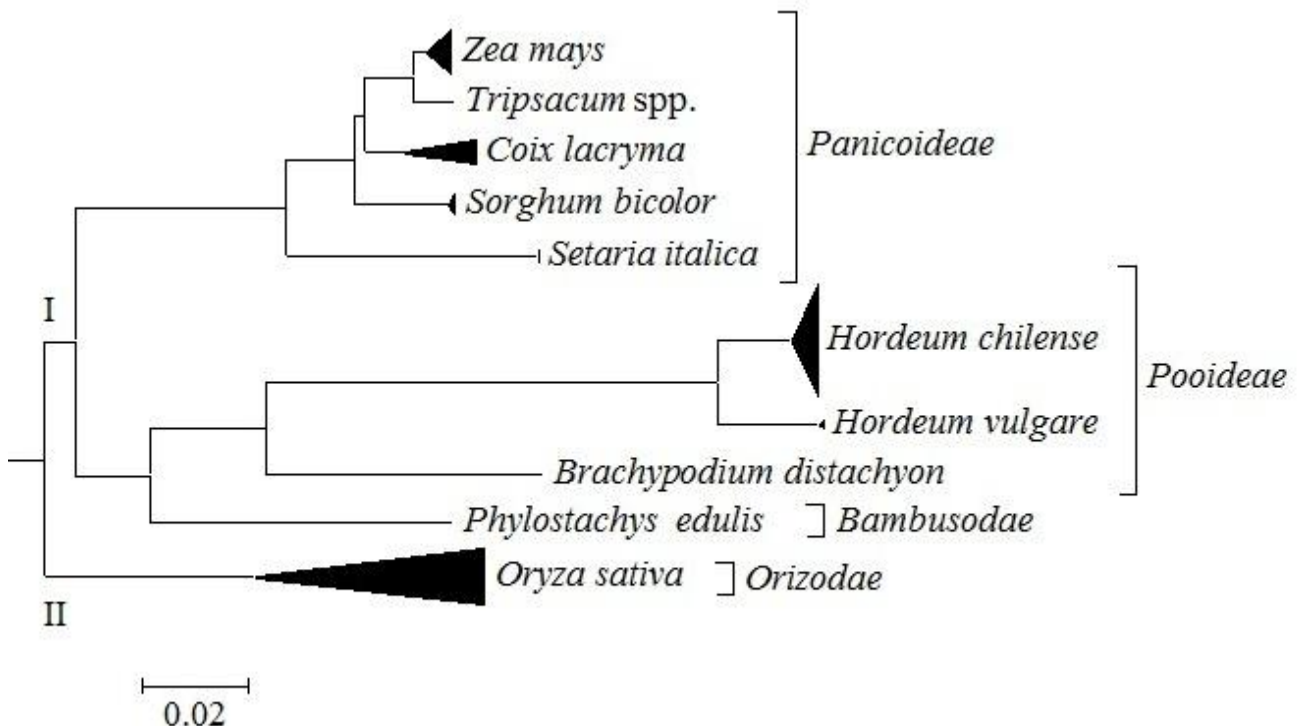


Рис. 1. Філогенетична дендрограма злаків, що отримана за результатами глобального вирівнювання нуклеотидних послідовностей гена *u1*. Трикутниками відмічена кількість проаналізованих зразків

Бутстреп-консенсусне дерево сформовано з 500 повторів. Гілки, що відтворювалися менш ніж у 50 % повторностей, видалено. Зразки розподілилися у два кластери. До кластеру I увійшли представники класу *Pooideae*, *Panicoideae* та *Bombusodae*, до кластеру II увійшли представники лише однієї класу *Oryzodae*. Кукурудза увійшла в один субкластер з іншими представниками класу *Panicoideae*, такими як трипсакум (*Tripsacum* spp.), бусенник звичайний (*Coix lacrima*), сорго (*Sorghum bicolor*) та мого (Setaria italica). Представники *Pooideae* та *Bombusodae* утворили окремий субкластер у кластері I. Розподіл кластерів збігається з систематичним розподілом таксонів An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III [14].

Проводили визначення нейтральності еволюції *y1* гена в кукурудзі з використанням критерію Тадзими. Негативне значення, що дорівнює -0,036137, свідчить про нейтральний характер еволюції цього гена та, як наслідок, про диверсифікуючий характер. У зв'язку з тим, що кукурудза є окультуреною рослиною, це свідчить про те, що штучний відбір не був сконцентрований на тому або іншому варіанті цього гена.

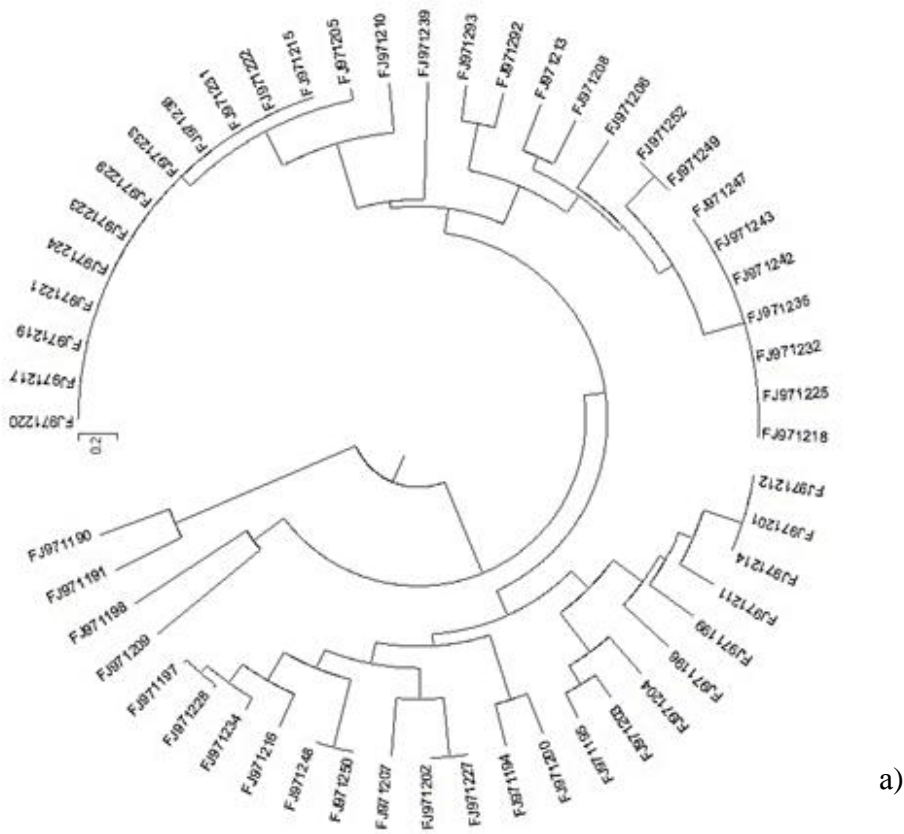
Для вивчення внутрішньовидового поліморфізму кукурудзі за геном *y1* проведено вирівнювання та аналіз 53 зразків про-мРНК та 53 зразків зрілої мРНК, отриманої при проведенні *in silico* сплайсінгу та вирівнювання зразків про-мРНК (рис. 2).

Філогенетична дендрограма зразків про-мРНК *y1* гена кукурудзі (рис. 2а) містить велику кількість кластерів, розподіл яких свідчить про те, що більша частина поліморфізму в гені *y1* приходить на регіони інтронів та не впливає на функцію ферменту. Присутність великої кількості субкластерів у дендрограмі зрілої мРНК *y1* гена кукурудзі (рис. 2б) та різниця між дистанціями у дендрограмах про-мРНК та мРНК демонструє наявність поліморфізму в екзонній структурі гена *y1*. Окремим кластером в обох дендрограмах виділилися зразки FJ971190 та FJ971191, для яких встановлено зсув рамки зчитування.

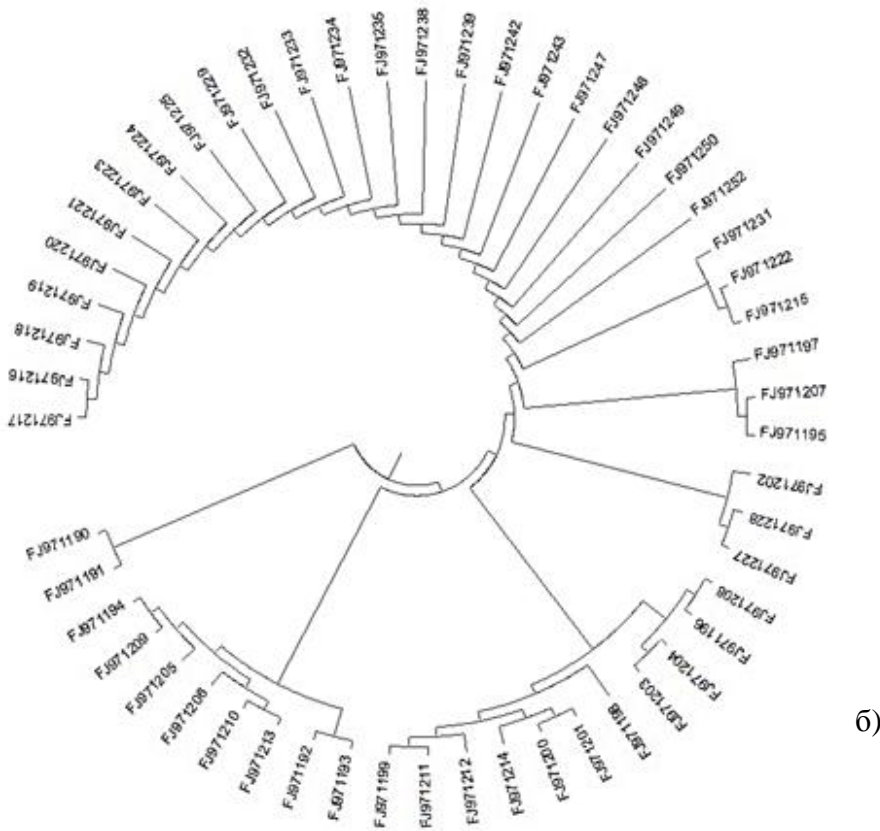
Також проводили вивчення сили відбору щодо окремих триплетів, що кодують амінокислоти (табл. 1). Так, серед 412 досліджуваних триплетів лише для 26 значення сили відбору відмінне від нуля. Для тих амінокислотних залишків, для яких значення сили відбору мало негативні показники (кодони: 33, 38, 54, 56, 59, 61, 104, 161, 184, 241, 250, 265, 270, 272, 291, 308, 339, 341, 376), можна стверджувати, що за цими позиціями кількість синонімічних замін перевищує кількість несинонімічних, що може свідчити про те, що саме ці позиції є критичними для функціонування ферменту фітоїнсинтази.

Для позицій, для яких характерне позитивне значення (кодони: 47, 52, 53, 199, 201, 256, 343), можна припустити, що відбір був спрямований на підвищення різноманіття.

Fu Z. зі співавторами [15] проведено філогенетичний аналіз родини генів *PSy1* (*y1*) при дослідженні їх різноманіття та еволюції. Встановлено відповідність наших результатів щодо розподілу кластерів на дендрограмі та негативного значення D-коефіцієнта Тадзими.



а)



б)

Рис. 2. Філогенетичний аналіз *u1* гена кукурудзи: а) вирівнювання про-мРНК, б) вирівнювання зрілої мРНК

Таблиця 1– Сила відбору за амінокислотами, що складають фермент фітоїнсинтази

Кодони	Триплети	Сила відбору
33	ACG	-108,92
38	GCG	-54,46
47	CTT	25,92
52	TGG	12,67
53	GAG	11,47
54	GCT	-27,23
56	CGT	-54,46
59	CCC	-27,23
61	GTC	-54,46
104	AGG	-36,91
161	CTT	-27,23
184	CTG	-21,42
199	GAT	10,01
201	ATC	11,39
241	GCT	-27,23
250	CCT	-54,46
256	ACC	54,46
265	GTA	-81,69
270	TTG	-78,12
272	CTG	-65,45
291	AGA	-36,47
308	GAT	-100,49
339	GAG	-71,52
341	GGG	-27,23
343	AAT	13,56
376	ACG	-27,23

Отримані результати будуть використані для проведення молекулярно-генетичного дослідження поліморфізму *u1* гена за допомогою ПЛР *in vitro*, що дозволить у перспективі створити систему молекулярних маркерів алельного стану *u1* гена. Поєднання добору за молекулярними маркерами (Marker assisted selection) з прийомами традиційної селекції підвищить ефективність створення вихідного матеріалу кукурудзи з певним вмістом каротиноїдів у зерні.

ВИСНОВКИ

Філогенетична дендрограма гена *u1* кукурудзи та інших злакових рослин демонструє те, що розподіл кластерів за *u1* геном у злакових збігається з загальноприйнятим систематичним розподілом таксонів за «An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III».

Дендрограми про-мРНК та зрілої мРНК *u1* гена кукурудзи свідчать про наявність поліморфізму як у інтронній, так і в екзонній структурі, але більша частина поліморфізму у гені *u1* виявлена саме в інтронах та не впливає на функцію ферменту.

Значення D коефіцієнта Тадзими демонструє нейтральний диверсифікуючий характер еволюції гена, що говорить про те, що штучний відбір не був направлений на певні варіанти.

Аналіз сили відбору окремих амінокислотних залишків виявив, що з 412 триплетів лише 26 піддавалися відбору. Серед них лише у 19 позицій кількість синонімічних замін перевищує кількість несинонімічних, що свідчить про їх важливість для функціонування ферменту фітоїнсинтази.

ЛІТЕРАТУРА

1. Батурина А. К. Химический состав и энергетическая ценность пищевых продуктов: [справочник] / А. К. Батурина. – СПб.: Профессия, 2006. – 245 с.
2. Nestel P. Biofortification of Staple Food Crops / P. Nestel, H. Bouis, J. Meenakshi [et al.] // J. Nutr. – 2006. – Vol. 136. – P. 1064–1067.
3. National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Электронный ресурс] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
4. Gallagher C. Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses (*Poaceae*) / C. Gallagher, P. Matthews, F. Li // Plant Physiology. – 2004. – Vol. 135. – P. 1776–1783.
5. Brent B. The *y1* Gene of Maize Codes for Phytoene Synthase / B. Brent, S. Phillip, J. Diane // Genetics. – 1996. – Vol. 143 (1). – P. 479–488.
6. Smith S. Identification of Common Molecular Subsequences / S. Smith, M. Waterman // Journal of Molecular Biology. – 1981. – Vol. 147. – P. 195–197.
7. Needleman S. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins / S. Needleman, C. Wunsch // J. Mol. Biol. – 1970. – Vol. 48 (3). – P. 443–453.
8. Okonechnikov K. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov // UGENE team Bioinformatics. – 2012. – Vol. 28. – P. 1166–1167.
9. Tamura K. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods / K. Tamura, N. Peterson // Molecular Biology and Evolution. – 2011. – Vol. 28. – P. 2731–2739.
10. Tajima F. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism / F. Tajima // Genetics. – 1989. – Vol. 123. – P. 585–595.
11. Sneath P. Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification / P. Sneath, R. Sokal // Systematic. – 1973. – Vol. 24 (2). – P. 263–268.
12. Tamura K. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method / K. Tamura, M. Nei, S. Kumar // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – Vol. 101. – P. 11030–11035.
13. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap / J. Felsenstein // Evolution. – 1985. – Vol. 39. – P. 783–791.
14. Bremer B. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III / B. Bremer, K. Bremer, M. Chase // Botanical Journal of the Linnean Society. – 2009. – Vol. 161 (2). – P. 105–121.
15. Fu Z. Nucleotide diversity and molecular evolution of the *PSy1* gene in *Zea mays* compared to some other grass species / Z. Fu, J. Yan, Y. Zheng [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2010. – Vol. 120. – P. 709–720.

REFERENCE

1. Baturina A. K. Khimicheskiy sostav i energeticheskaya tsennost pishchevikh produktov: [spravochnik] / A. K. Baturina. – Sankt-Peterburg: Professiya, 2006. – 245 s.
2. Nestel P. Biofortification of Staple Food Crops / P. Nestel, H. Bouis, J. Meenakshi [et al.] // J. Nutr. – 2006. – Vol. 136. – P. 1064–1067.
3. National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Электронный ресурс] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
4. Gallagher C. Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses (*Poaceae*) / C. Gallagher, P. Matthews, F. Li // Plant Physiology. – 2004. – Vol. 135. – P. 1776–1783.
5. Brent B. The *y1* Gene of Maize Codes for Phytoene Synthase / B. Brent, S. Phillip, J. Diane // Genetics. – 1996. – Vol. 143 (1). – P. 479–488.

6. Smith S. Identification of Common Molecular Subsequences / S. Smith, M. Waterman // Journal of Molecular Biology. – 1981. – Vol. 147. – P. 195–197.
7. Needleman S. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins / S. Needleman, C. Wunsch // J. Mol. Biol. – 1970. – Vol. 48 (3). – P. 443–453.
8. Okonechnikov K. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov // UGENE team Bioinformatics. – 2012. – Vol. 28. – P. 1166–1167.
9. Tamura K. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods / K. Tamura, N. Peterson // Molecular Biology and Evolution. – 2011. – Vol. 28. – P. 2731–2739.
10. Tajima F. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism / F. Tajima // Genetics. – 1989. – Vol. 123. – P. 585–595.
11. Sneath P. Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification / P. Sneath, R. Sokal // Systematic. – 1973. – Vol. 24 (2). – P. 263–268.
12. Tamura K. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method / K. Tamura, M. Nei, S. Kumar // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – Vol. 101. – P. 11030–11035.
13. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap / J. Felsenstein // Evolution. – 1985. – Vol. 39. – P. 783–791.
14. Bremer B. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III / B. Bremer, K. Bremer, M. Chase // Botanical Journal of the Linnean Society. – 2009. – Vol. 161 (2). – P. 105–121.
15. Fu Z. Nucleotide diversity and molecular evolution of the PSy1 gene in Zea mays compared to some other grass species / Z. Fu, J. Yan, Y. Zheng [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2010. – Vol. 120. – P. 709–720.

УДК 582.751.42 : 681.151

ДИНАМІКА ЛЕКТИНОВОЇ АКТИВНОСТІ ХЛОРОПЛАСТІВ ХЛОРОФІЛЬНИХ МУТАНТІВ *LINUM HUMILE* MILL. ПРОТЯГОМ ОНТОГЕНЕЗУ

Левчук Г.М.

*Запорізький національний університет,
69600, Україна, Запоріжжя, вул. Жуковського, 66*

anna.levchuck@yandex.ua

На чотирьох мутантних лініях льону олійного з різним морфологічним проявом хлорофільної недостатності був проаналізований рівень лектинової активності двох типів хлоропластів протягом онтогенезу. Встановлено, що в мутантного зразка з рівномірним проявом хлорофільної недостатності (М-28) рівень лектинової активності обох типів хлоропластів є вищим у порівнянні з контролем протягом усього онтогенезу. У хлорофільних мутантів з частковим проявом хлорофільної недостатності (М-80, М-81 та М-84) на початкових етапах онтогенезу лектинова активність значно нижча за контрольний варіант, а на стадії цвітіння – достовірно збільшується в дрібних хлоропластах, а у великих достовірно від контролю не відрізняється.

Ключові слова: Linum humile Mill, хлорофільна недостатність, лектинова активність, хлоропласти, лектин-пігментний комплекс.

ДИНАМИКА ЛЕКТИНОВОЙ АКТИВНОСТИ ХЛОРОПЛАСТОВ ХЛОРОФИЛЛЬНЫХ МУТАНТОВ *LINUM HUMILE* MILL. НА ПРОТЯЖЕНИИ ОНТОГЕНЕЗА

Левчук А.Н.

*Запорожский национальный университет
69600, Украина, Запорожье, ул. Жуковского, 66*

anna.levchuck@yandex.ua

На четырех мутантных линиях льна масличного с различным морфологическим проявлением хлорофилльной недостаточности был проанализирован уровень лектиновой активности двух типов хлоропластов в течение онтогенеза. Установлено, что у мутантного образца с равномерным проявлением хлорофилльной недостаточности (М-28) уровень лектиновой активности обоих типов