

УРБАНОВИЧ О. Ю.^{1✉}, КУЗМИЦКАЯ П. В.¹, БОРОВСКИЙ Г. Б.²

¹ Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: O.Urbanovich@igc.by

² Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Россия, 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru

✉ O.Urbanovich@igc.by

ПОЛИМОРФИЗМ ДВУХ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ДЕГИДРИНЫ ПШЕНИЦЫ

Цель. Цель данной работы – изучение вариабельности нуклеотидных последовательностей двух генов, кодирующих дегидрины пшеницы. Один из них относится к типу К-2, другой – К-3 (соответственно, *TaDHN18* и *TaDHN19.3* по классификации Wang et al.). Интерес к данным локусам обусловлен участием этих генов в защите растения от воздействия различных неблагоприятных абиотических факторов. **Методы.** Полиморфизм двух генов, кодирующих дегидрины, исследовали на примере 6 сортов пшеницы, среди которых были яровые и озимые сорта с разной устойчивостью к холоду, с помощью методов ПЦР-основанного клонирования, секвенирования и программ для обработки данных. **Результаты.** Анализ выравнивания полученных нуклеотидных и гипотетических белковых последовательностей показал, что исследуемый локус в геномах различных сортов пшеницы, как яровой, так и озимой, характеризуется высокой степенью идентичности. **Выводы.** При выполнении этой работы продемонстрирована высокая консервативность двух локусов, кодирующих дегидрины К-2 и К-3 типа.

Ключевые слова: пшеница, дегидрины, полиморфизм.

Поскольку растения неподвижны, их единственный способ выжить в неблагоприятных условиях окружающей среды заключается в быстрой и эффективной адаптации к изменяющимся условиям. В ответ на разнообразные стрессовые абиотические факторы окружающей среды (засуха, высокие и низкие температуры, засоление) запускается экспрессия множества генов, продукты которых защищают растение. Некоторые из них индуцируются исключительно при воздействии определенных условий, например, только при засухе или только при низких температурах, в то время как другие экс-

прессируются при воздействии различных экологических факторов [1–3].

Молекулярные механизмы устойчивости растений к низким температурам являются одной из наиболее актуальных проблем современной генетики культурных растений. Значимость исследований в этой сфере объясняется большой экономической важностью проблемы. Примерно две трети поверхности суши ежегодно подвергаются охлаждению ниже точки замерзания воды, при этом половина из них подвержена влиянию температур менее -20°C [4]. Низкие температуры могут отрицательно влиять на рост и развитие культивируемых человеком растений, снижать их продуктивность и ограничивать географию возделывания сортов, не обладающих устойчивостью к холоду, но ценных по другим признакам. Изучение механизмов формирования устойчивости к низким температурам может способствовать созданию новых сортов, пригодных для возделывания в странах с холодным климатом, к которым относится и Беларусь.

Белки дегидрины относятся ко второй группе белков позднего эмбриогенеза (так называемых LEA-белков). Первоначально они были охарактеризованы как растворимые белки, экспрессия которых индуцируется дегидратацией. Однако позже было показано их участие в защите растения и при наступлении других неблагоприятных условий: (холода, засоления и др.). Семейство дегидринов отличается высококонсервативным лизин-богатым мотивом, содержащим 15 аминокислотных остатков (консенсусная последовательность EKKGIMDKIKE-KLPG), известным как К-сегмент [5]. Считается, что К-сегменты белков формируют амфипатические альфа-спирали [6]. К-сегменты участвуют в поддержании функциональной активности белков-ферментов в условиях абиотического стресса путем предотвращения агрегации белков [7]. Как правило, один белок содержит бо-

лее одной копии в комбинации с функциональными доменами, богатыми глицином и серином (так называемыми S-сегментами). N-концевые участки некоторых дегидринов могут содержать другую консервативную последовательность ((V/T)DEYGNP), известную как Y-сегмент. Он имеет значительную гомологию с нуклеотид-связывающими сайтами растений и бактериальными шаперонами [8]. Дегидрины разделяют на несколько классов в соответствии с комбинацией содержащихся в них консервативных сегментов [6]. В зависимости от наличия и числа консервативных доменов их разделяют на несколько типов: YSK₂, SK₃, K_n и KS. Известно, что экспрессия дегидринов является одним из компонентов системы защиты растений от абиотического стресса. В формировании ответа растения на холодостресс принимают участие дегидрины SK₃-, K_n- и KS-типов.

Целью данной работы было изучение вариативности нуклеотидных последовательностей двух генов, кодирующих дегидрины пшеницы. Один из них относится к типу K-2, другой – K-3 (соответственно, *TaDHN18* и *TaDHN19.3* по классификации Wang et al.). Интерес к данным локусам обусловлен участием этих генов в защите растения от воздействия различных неблагоприятных абиотических факторов. Так, было показано, что экспрессия белков, кодируемых генами *TaDHN19*, возрастает при дегидратации и охлаждении в корнях и листьях растений пшеницы, и только в корнях – при засолении [9].

Материалы и методы

Препараты ДНК выделялись из зерен пшеницы с помощью Genomic DNA Purification Kit (Thermo scientific (EC)) согласно протоколу производителя с модификациями. Концентрацию и чистоту выделенной ДНК определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Ultrospec 3300 pro UV/Visible (Biochrom Ltd). Для проведения ПЦР-анализа транскрипционных факторов яблони семейства DREB использовали праймеры, представленные в таблице 1.

Праймеры синтезированы компанией «Primetech» (Беларусь). Для проведения реакций амплификации использовали амплификатор MyCycler™ (BIO-RAD). Реакционная смесь для ПЦР объемом 20 мкл содержала 40 нг ДНК, 75 мМ трис-HCl (pH 8.8 при 250C), 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 0,2 мМ dNTP, 200 мМ каждого праймера, 1 ед. Taq-полимеразы. В

качестве отрицательного контроля матрицу кДНК в реакции заменяли равным количеством деионизированной воды.

Продукты амплификации после электрофоретического разделения вырезали из агарозного геля для последующего выделения фрагментов ДНК с помощью Gene Jet™ Gel Extraction Kit (Thermoscientific (EC)). Выделенные ампликоны лигировали в плазмиду pTZ57R/T, которой трансформировали штамм E.coli DH56 с помощью Ins TAclone™ PCR Cloning Kit (Thermo scientific (EC)) согласно рекомендациям производителя. После выращивания на LB-Amp среде из трансформантов выделяли плазмидную ДНК с помощью Plasmid Gene Jet™ Miniprep Kit (Thermoscientific (EC)) согласно протоколу производителя. Фрагмент, встроенный в плазмидную ДНК, секвенировали с помощью праймеров к последовательности полилинкера вектора pTZ57R/T M13F (GTAAAACGACGGCCAGT) и M13 R (CAGGAAACAGCTATGAC). Для проведения реакции использовали BigDye Terminatorv3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Амплификацию для секвенирования и очистку полученных продуктов проводили в соответствии с методикой производителя. Продукты амплификации разделяли на секвенаторе Geneti cAnalyzer 3500 (Applied Biosystems, США). Компьютерный анализ нуклеотидной последовательности выполняли с помощью программы Mega6 [10]. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей было выполнено с помощью алгоритма CLUSTALW [11]. Дополнительные нуклеотидные последовательности были получены из базы данных GenBank с помощью алгоритма BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [12].

Результаты и обсуждение

Полиморфизм локуса *TaDHN18* исследовали на примере 6 сортов пшеницы, среди которых были яровые и озимые сорта с разной устойчивостью к холоду. Характеристика сортов представлена в таблице 2.

Амплификация полноразмерной рамки считывания была проведена с помощью праймеров, разработанных на основании нуклеотидных последовательностей из базы данных GenBank (номера доступа TAU73212, AM180932, а также их гомологи). Последовательности праймеров представлены в разделе материалы и методы. С их помощью были ам-

плифицированы полноразмерные последовательности генов, каждый из которых содержал открытую рамку считывания длиной 282 п.н. Анализ выравнивания полученных нуклеотидных последовательностей показал, что исследуемый локус в геномах различных сортов пшеницы, как яровой, так и озимой, характеризуется высокой консервативностью. Об этом свидетельствует степень идентичности последовательностей, кодирующих открытую рамку считывания, колеблющаяся в пределах 97,52 – 100%. Причем все обнаруженные мутации представляли собой однонуклеотидные замены. Наибольшее их число было обнаружено в последовательности гена, выделенной из ярового

сорта пшеницы Бонпэйн. При этом трансляция *in silico* показала, что гипотетический белок, кодируемый этим геном, не имеет значительных отличий от гипотетических белков, кодируемых геномами других сортов. Так, гены, выделенные из сортов Капылянка, Ritmo, Щара, являются полностью идентичными, в то время как гены, выделенные из сортов Сукцесс, Бонпэйн и Фантазия мели отличия в одну аминокислоту (рис. 1).

Изучение молекулярной варибельности локуса *TaDHN19.3* проводили на 6 сортах пшеницы, среди которых были яровые и озимые сорта с разной устойчивостью к холоду. Характеристика сортов представлена в таблице 3.

Таблица 1. Последовательности праймеров, разработанных для амплификации полноразмерных рамок считывания генов, кодирующих дегидрины пшеницы

Название	Последовательность
TaDHN18F	AACCAAGACAAGTAAACAG
TaDHN18R	TCATATACGGTGGAGTATTA
TaDHN19F	AGATTTCCCGAGGGACAA
TaDHN19R	GAAGTTGGCCATCTTATTAT

Таблица 2. Характеристика сортов пшеницы, использованных для изучения молекулярной варибельности гена, кодирующего дегидрин *TaDHN18* (по классификации Wanget. all.)

Название	Время посадки	Страна происхождения	Устойчивость к холоду
Бонпэйн	Яровая	Франция	-
Капылянка	Озимая	Беларусь	Высокая
Сукцесс	Озимая	США	Средняя
Фантазия	Озимая	Беларусь	Высокая
Щара	Озимая	Беларусь	Высокая
Ritmo	Яровая	Нидерланды	-

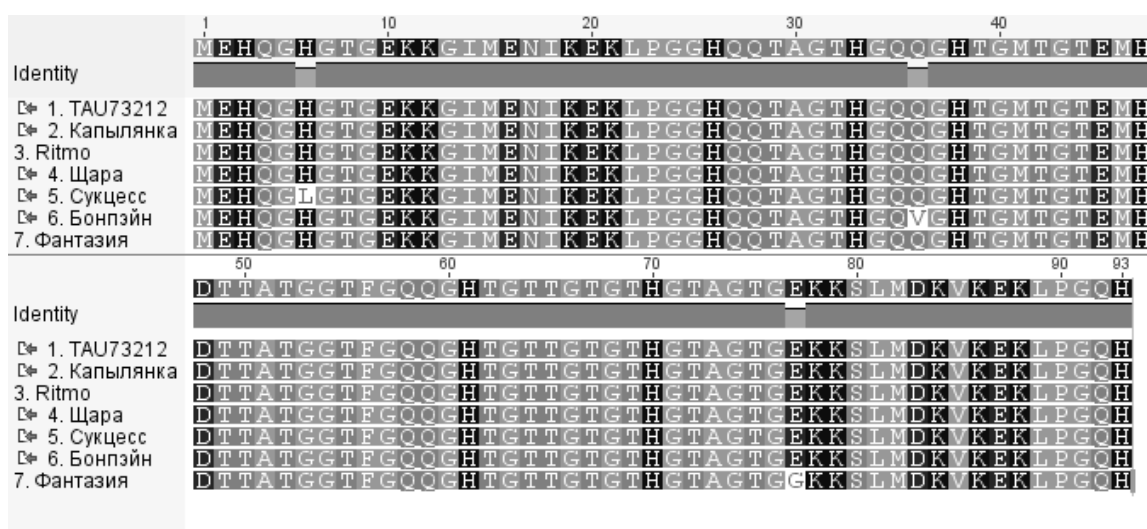


Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей гипотетических белков дегидринов К-3 типа, кодируемых генами *TaDHN18*.

Таблица 3. Характеристика сортов пшеницы, использованных для изучения молекулярной вариативности гена, кодирующего дегидрин *TaDHN19.3* (по классификации Wanget. all.

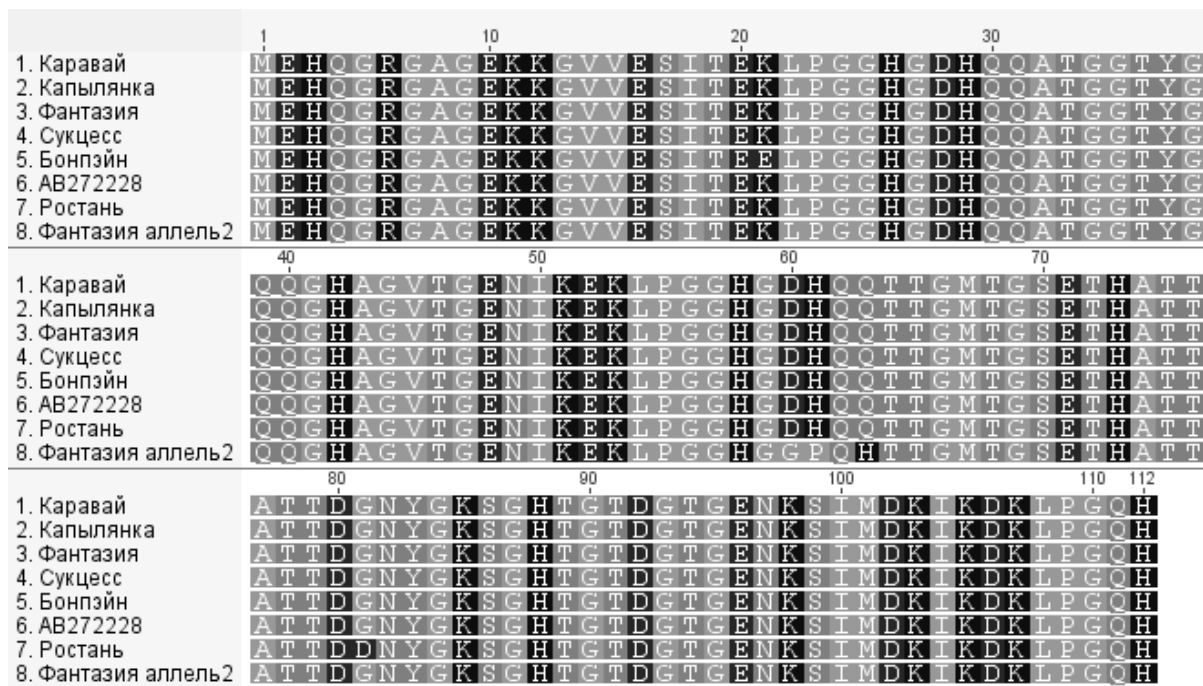
Название	Вид	Страна происхождения	Устойчивость к холоду
Капылянка	Озимая	Беларусь	Высокая
Каравай	Озимая	Беларусь	Высокая
Фантазия	Озимая	Беларусь	Высокая
Сукцесс	Озимая	США	Средняя
Бонпэйн	Яровая	Франция	
Ростань	Яровая	Беларусь	

На основании нуклеотидной последовательности мРНК, кодирующей исследуемый дегидрин (номер доступа в GenBank AB272228 а также гомологичные последовательности) были разработаны праймеры, позволяющие амплифицировать полноразмерную открытую рамку считывания гена *TaDHN19.3* (представлены в разделе материалы и методы): С помощью этих праймеров были получены последовательности генов *TaDHN19.3* из 6 сортов яровой и озимой пшеницы. В случае сорта Фантазия нам удалось выделить 2 аллельных варианта этого гена.

Анализ выравниваний нуклеотидных последовательностей открытых рамок считывания, кодирующих дегидрины *TaDHN19.3*, показал их высокую консервативность. Степень идентичности колебалась в пределах 98,23 – 100 %. Так, полностью идентичными оказались

последовательности, выделенные из сортов Каравай, Капылянка, Сукцесс, один из аллельных вариантов сорта Фантазия, а также последовательность из базы данных GenBank AB272228, полученная из японского сорта Chihoku. Наибольшее число отличий от других гомологичных генов имела одна из аллелей, выделенная из пшеницы сорта Фантазия. Сравнение нуклеотидных последовательностей генов *TaDHN19.3*, выделенных из геномов пшеницы различного генетического происхождения, показало присутствие точечных мутаций. Все они являлись однонуклеотидными заменами, инсерций и делеций обнаружено не было.

Трансляция открытых рамок считывания и анализ последовательностей (рис. 2) гипотетических белков показали, что их степень идентичности колеблется в пределах 96,43–100 %.

Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей гипотетических белков дегидринов К-3 типа, кодируемых генами *TaDHN19.3*.

Больше всего отличий по аминокислотному составу имел один из аллельных вариантов высокоустойчивой к холоду пшеницы сорта Фантазия (3 аминокислотных замены). По одной аминокислотной замене было выявлено в аллельных вариантах гена *TaDHN19.3*, выделенных из сортов Бонпэйн и Ростань. Примечательно, что оба эти сорта относятся к яровым. Полностью идентичными оказались гипотетические последовательности белков из сортов Каравай, Капылянка, Сукцесс, Chihoku и один

из аллельных вариантов из сорта Фантазия. Следует отметить, что все эти сорта пшеницы являются озимыми.

Выводы

При выполнении этой работы было продемонстрировано высокая консервативность двух локусов, кодирующих дегидрины К-2 и К-3 типа в геноме пшеницы.

Исследование поддержано грантом БРФФИ Б18Р-166 и РФФИ №18-54-00026.

References

- Ingram J., Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1996. Vol. 47. P. 377–403. doi: 10.1146/annurev.arplant.47.1.377.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol*. 1997. Vol. 115. P. 327–334.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol*. 2000. Vol. 3. P. 217–223. doi.org/10.1016/S1369-5266(00)80068-0.
- Beck E.H., Heim R., Hansen J. Plant resistance to cold stress: mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. *J Biosci*. 2004. Vol. 29. P. 449–459.
- Close T.J. Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum*. 1997. Vol. 100. P. 291–296. doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb04785.x.
- Hanin M., Brini F., Ebel C., Toda Y., Takeda S., Masmoudi K. Plant dehydrins and stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior*. 2011. Vol. 6, I. 10. P. 1503–1509. doi: 10.4161/psb.6.10.17088.
- Drira M., Saibi W., Brini F., Gargouri A., Masmoudi K., Hanin M. The K-segments of the wheat dehydrin DHN-5 are essential for the protection of lactate dehydrogenase and α -glucosidase activities *in vitro*. *Mol Biotechnol*. 2013. Vol. 54. P. 643–650. doi: 10.1007/s12033-012-9606-8.
- Allagulova Ch.R., Gimalov F.R., Shakirova F.M., Vakhitov V.A. The plant dehydrins: structure and putative functions. *Biochemistry*. 2003. Vol. 68. P. 945–951.
- Wang Y., Xu H., Zhu H., Tao Y., Zhang G., Zhang L. et al. Classification and expression diversification of wheat dehydrin genes. *Plant Sci*. 2014. Vol. 214. P. 113–120. doi: 10.1016/j.plantsci.2013.10.005.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2013. Vol. 30. P. 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 1994. Vol. 22. P. 4673–4680.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990. Vol. 215. P. 403–410.

URBANOVICH O. Yu.¹, KUZMITSKAYA P. V.¹ BOROVSKIY G. B.²

¹ *The Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Belarus, 220072, Minsk, Akademicheskaya str., 27, e-mail: O.Urbanovich@igc.by*

² *Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Russia, 664033, Irkutsk, Lermontov str., 134, e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru*

POLYMORPHISM OF TWO WHEAT DEHYDRINS GENES

Aim. The aim of this work is to study the nucleotide sequences variability of two genes encoding wheat dehydrins. One of them belong to K-2 group, the other refers to K-3 type (respectively, *TaDHN18* and *TaDHN19.3* according to the classification of Wang et al.). These loci are interesting due to their's genes participation in protection of plants from the various adverse abiotic effects. **Methods.** Polymorphism of two genes encoding dehydrins was investigated using 6 wheat varieties as examples, among which were spring and winter varieties with different cold resistance, using PCR-based cloning, sequencing, and data processing softwares. **Results.** An analysis of the obtained nucleotide and hypothetical protein sequences alignment showed that the locus under study in the genomes of different wheat varieties, both spring and winter, is characterized by a high identity degree. **Conclusions.** The high conservatism of two loci encoding K-2 and K-3 dehydrins was demonstrated.

Keywords: wheat, dehydrins, polymorphism.

УРБАНОВИЧ О. Ю.¹, КУЗМІЦЬКА П. В.¹, БОРОВСЬКИЙ Г. Б.²

¹ Інститут генетики і цитології Національної академії наук Білорусі,
Білорусь, 220072, м. Мінск, вул. Академічна, 27, e-mail: O.Urbanovich@igc.by

² Сибірський інститут фізіології і біохімії рослин СВ РАН,
Росія, 664033, м. Іркутськ, вул. Лермонтова, 132, e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru

ПОЛІМОРФІЗМ ДВОХ ГЕНІВ, ЯКІ КОДУЮТЬ ДЕГІДРИНИ ПШЕНИЦІ

Мета. Мета роботи – вивчення варіабельності нуклеотидних послідовностей двох генів, що кодують дегідрини пшениці. Один з них належить до типу К-2, другий – К-3 (відповідно, *TaDHN18* і *TaDHN19.3* за класифікацією Wang et al.). Інтерес до цих генів обумовлений їх участю у захисті рослини від впливу різних несприятливих абіотичних чинників. **Методи.** Поліморфізм двох генів, що кодують дегідрини, досліджували на прикладі 6 сортів пшениці, серед яких були ярі та озимі сорти з різною стійкістю до холоду, за допомогою методів ПЛР-заснованого клонування, секвенування і програм для обробки даних. **Результати.** Аналіз вирівнювання отриманих нуклеотидних і гіпотетичних білкових послідовностей показав, що досліджені локуси у геномах різних сортів пшениці як ярої, так і озимої, характеризуються високим ступенем ідентичності. **Висновки.** У результаті було продемонстровано високу консервативність двох локусів, що кодують дегідрини К-2 і К-3 типу.

Ключові слова: пшениця, дегідрини, поліморфізм.