

## БІОІНФОРМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ ГЕНА, ЩО КОДУЄ ГРАНУЛОАСОЦІЙОВАНУ КРОХМАЛЬСИНТАЗУ КУКУРУДЗИ

Проведено вирівнювання нуклеотидних послідовностей гена *Wx* і його гомологів та побудовано дендрограму, яка у цілому відображає філогенетичні зв'язки родини *Poaceae*. Зроблено припущення щодо давнього горизонтального переносу гена *Wx* від *Zea mays* до *Dimeria lawsonii*. Розроблено праймери до поліморфного регіону екзонів 8–10. Проведено *in silico* ПЛР-аналіз.

**Ключові слова:** ген *Wx*, кукурудза, біоінформатичний аналіз.

**Вступ.** Значна частка споживаних людиною і тваринами калорій знаходиться у формі крохмалю. Крохмаль є важливою сировиною для харчової, фармацевтичної та технічних галузей промисловості. Однак якість природних крохмалів, як правило, не задовольняє специфічних вимог виробництва і потребує поліпшення. Традиційним засобом забезпечення високих технологічних властивостей крохмалю є хімічна модифікація рослинної сировини, що потребує спеціальних заводських технологій, додаткових фінансових витрат, використання екологічно небезпечних хімічних реагентів. Тому більш екологічно та економічно вигідним шляхом є створення біогенних джерел крохмалів з генетично обумовленим перерозподілом співвідношення амілози та амілопектину [1].

Однією з провідних крохмалоносних культур світу є кукурудза завдяки високій продуктивності, найбільшій економічній ефективності отримання крохмалю, досить низькому рівню екологічного забруднення товарної продукції, пристосованості до індустріальних технологій вирощування в широкому діапазоні агрокліматичних умов, можливості отримання цінних супутніх продуктів промислової переробки, високому генетичному різноманіттю, яке може бути результативно використано в селекції [2].

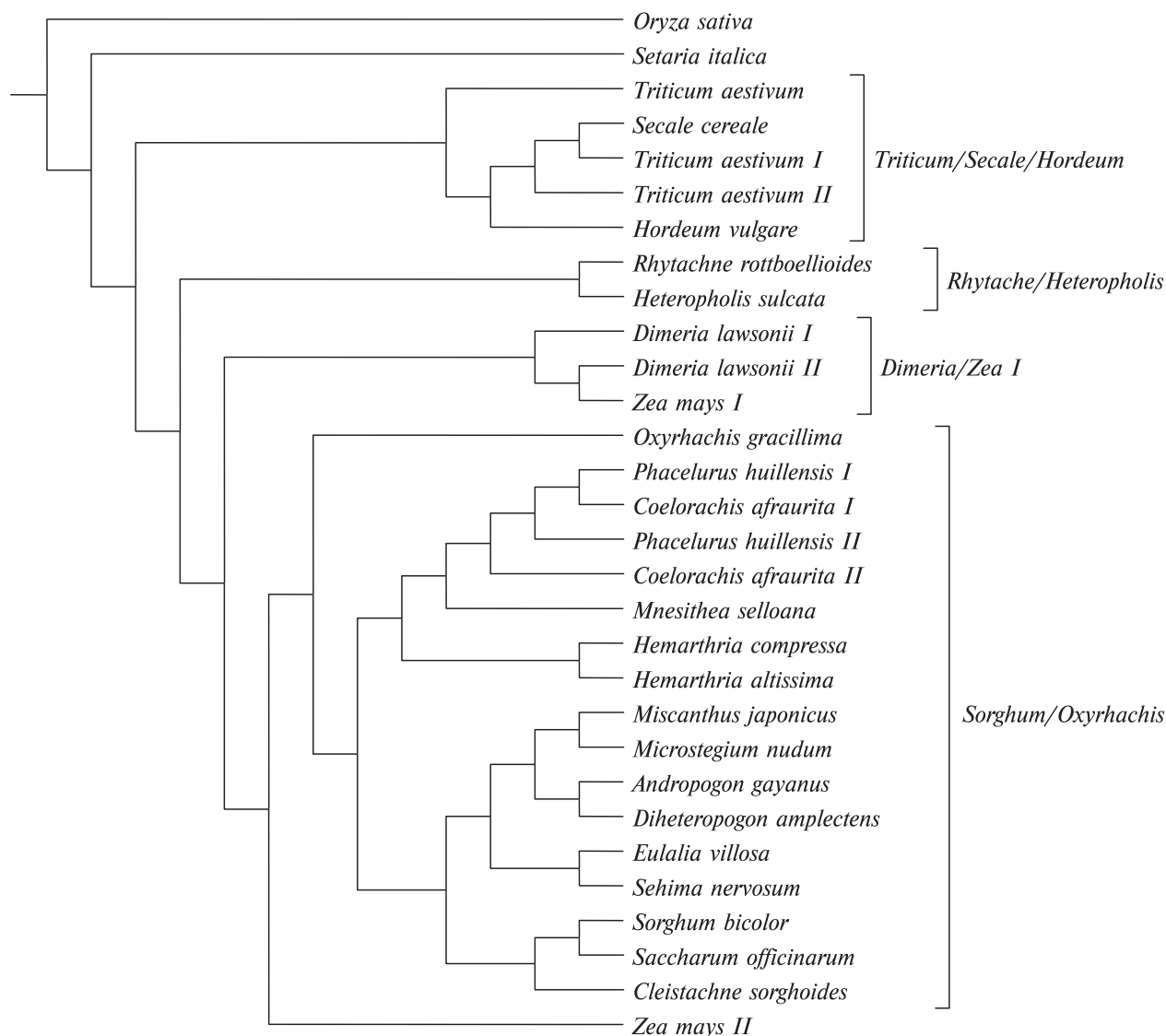
Синтез крохмалю в ендоспермі вищих рослин здійснюється в чотири ключові стадії. У

першій стадії АДФ-глюкозопірофосфорилаза (ADP-glucose pyrophosphorylase) активує мономерний попередник крохмалю шляхом синтезу АДФ-глюкози з глюкоза-1-фосфату і АТФ. У другій стадії активований глюкозильний донор, АДФ-глюкоза, переноситься крохмальсинтазами (starch synthases) на невідновлюваний кінець вже існуючого  $\alpha(1-4)$ -зв'язку. На третій стадії ферменти розгалуження крохмалю (starch branching enzymes) вводять точки розгалуження шляхом розщеплення ділянки  $\alpha(1-4)$ -зв'язаного глюкану з наступним перенесенням відщепленого ланцюга на акцепторний ланцюг з утворенням нового  $\alpha(1-6)$ -зв'язку. Крохмаль-розгалужуючими ферментами є лише ті, які можуть вводити  $\alpha(1-6)$ -зв'язки в  $\alpha$ -поліглюкани, тому вони грають важливу роль в утворенні амілопектину. І, нарешті, ферменти дерозгалуження крохмалю (starch debranching enzymes) видаляють деякі із зазначених зв'язків в точці розгалуження [3].

Однією з ключових крохмальсинтаз є нуклеозиддифосфат-глюкозокрохмальглюкозилтрансфераза (NDP-glucose: 1,4- $\alpha$ -D-glucan 4- $\alpha$ -D-glucosyltransferase) (EC 2.4.1.242 згідно з IUBMB Enzyme Nomenclature). Більш широко в літературі використовують назву «гранулоасоційована крохмальсинтаза» (granule-bound starch synthase, GBSS) [4].

Ген, що кодує гранулоасоційовану крохмальсинтазу, існує в єдиній копії майже у всіх рослинах, вивчених досі. У кукурудзи гранулоасоційовану крохмальсинтазу, що має молекулярну масу 58 000 дальтон, кодує домінуючий ген *Wx* (*waxy*), локалізований на короткому плечі хромосоми 9 (bin 9.03). Послідовність гена *Wx* містить 14 екзонів та 13 інтронів. Виявлено три регіони, що містять мікросателітні повтори – *phi022*, *phi027*, *phi061* [5, 6].

У звичайної (немутантної) кукурудзи цей фермент високоактивний, і його продукти (амілоза) не можуть бути повністю трансформова-



**Рис. 1.** Філогенетична дендрограма за результатами вирівнювання 118 генів – гомологів гена *Wx* кукурудзи. Гілки з довжинами менш 0,001 об'єднано в одну гілку

ні в амілопектин ферментами розгалуження. Близько чверті крохмалю, акумульованого в зрілому ендоспермі, перебуває в стані амілози, і фенотип – не-ваху (не воскоподібний). Рецесивний ген *wx* мутовував з гена *Wx* завдяки інсерціям транспозонних елементів *Ac*, *Ds*, *En/Spm*, *Mu* та інших в різні сайти екзонів, що змінює структуру білка GBSS та інгібує синтез амілози. Активність GBSS зменшується до 95%; вся амілоза, що синтезована крохмальсинтазами низької активності, трансформується в амілопектин ферментом розгалуження. У ен-

доспермі акумулюється тільки амілопектин, і фенотип – ваху (воскоподібний) [7, 8].

Таким чином, мутантний ген *wx* викликає утворення крохмалів, що майже повністю складаються з амілопектину, причому цей ефект має фіксований характер, незалежний від генотипу рекурентної батьківської форми та погодних умов вирощування, і успадковується як практично якісна ознака. Визначено, що мутація *wx* не викликає істотного зниження зернової продуктивності та погіршення інших ознак якості зерна [9].

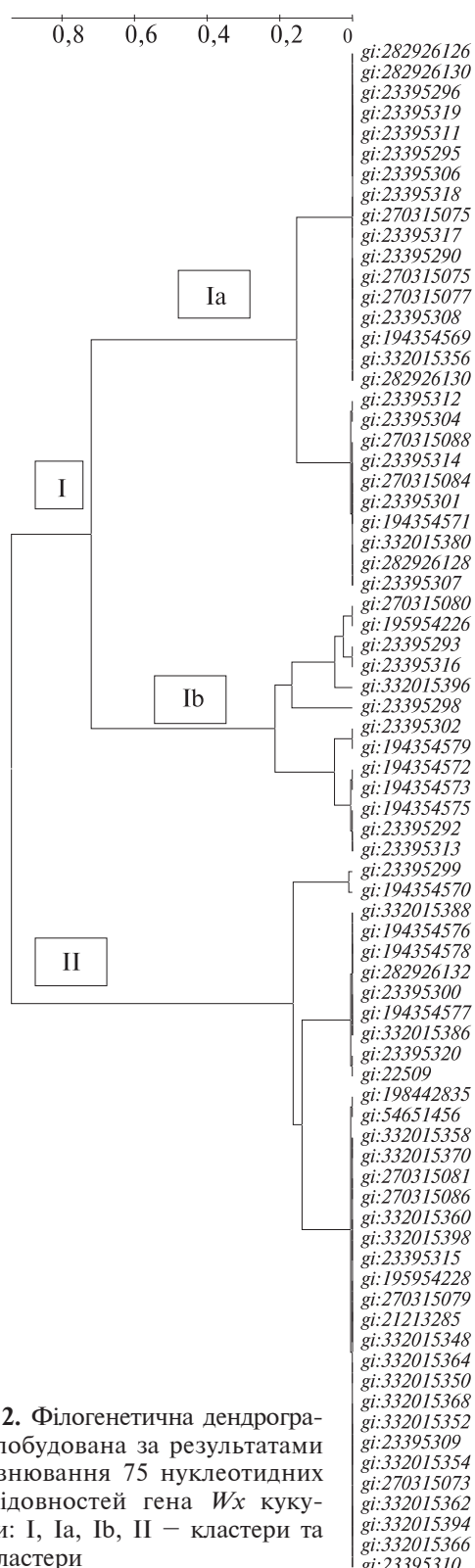


Рис. 2. Філогенетична дендрограма, побудована за результатами вирівнювання 75 нуклеотидних послідовностей гена *Wx* кукурудзи: I, Ia, Ib, II – кластери та субкластери

Всебічне розуміння шляхів біосинтезу крохмалю, в тому числі біоінформатичний та молекулярно-генетичний аналіз генів ферментів синтезу крохмалю, дозволить створювати системи молекулярних маркерів для цілеспрямованого добору та молекулярної селекції за бажаним кількісним та якісним складом крохмалю.

Мета даної роботи полягала у дослідженні поліморфізму гена *Wx* у кукурудзи та інших представників родини *Poaceae* за допомогою біоінформатичного підходу.

**Матеріали і методи.** Матеріалом досліджень слугували 118 повних і часткових нуклеотидних послідовностей гена *Wx* та послідовностей мРНК представників родини *Poaceae* з інтегрованої бази даних National Center for Biotechnology Information, а саме: 75 послідовностей кукурудзи *Zea mays*, 13 – рису *Oryza sativa*, 12 – пшениці *Triticum aestivum*, 8 – ячменю *Hordeum vulgare*, 2 – сорго *Sorghum bicolor*, 1 – жита *Secale cereale*, по одній *Cleistachne sorghoides*, *Microstegium nudum*, *Miscanthus japonicus*, *Saccharum officinarum*, *Setaria italica*, *Dimeria lawsonii*, *Oxyrhachis gracillima*. Локальне вирівнювання нуклеотидних послідовностей проводили за алгоритмом Сміта-Уотерманна з використанням програми BLAST, глобальне вирівнювання – за алгоритмом Нідльмана-Вунша [10] за допомогою програми MEGA5 та за алгоритмом MUSCLE [11]. Дизайн праймерів розробляли за допомогою програми Fast PCR. Внутрішньовидовий поліморфізм гена *Wx* кукурудзи досліджений методом найближчого сусіда (Neighbor-Joining method) [12]. Оптимальну філогенетичну дендрограму конструювали методом UPGMA з сумарною довжиною гілок 8,12983088, достовірність якої досліджували за методом бутстреп (500 ітерацій) [13]. Масштаб дендрограми такий, що довжина гілок пропорційна еволюційним дистанціям згідно зі шкалою над дендрограмою. Еволюційні дистанції обчислювали за методом Maximum Composite Likelihood [14] і виражали в числі нуклеотидних замін на сайт. Аналіз проводили за допомогою програми MEGA5 [15]. *In silico* полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) здійснювали з використанням програми VectorNTI. Оптимальні умови ПЛР розраховували за термодинамічними характеристиками розроблених олігонуклеотидів [16], користуючись алгоритмом Річлика [17].

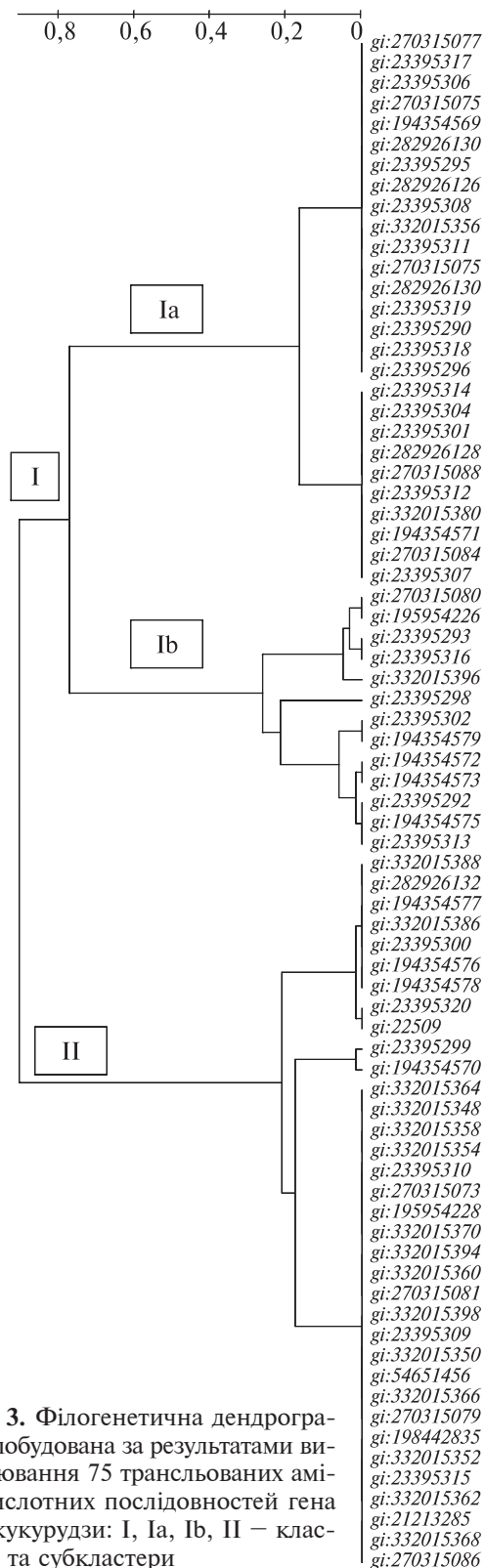
**Результати досліджень та їх обговорення. Філогенетичний аналіз гена *Wx* та його гомологів.** За результатами локального вирівнювання знайдено 118 нуклеотидних послідовностей гена *Wx*, з них 75 – кукурудзи. За результатами вирівнювання побудовано філогенетичну дендрограму (рис. 1), яка у цілому відображає філогенетичні зв'язки родини *Poaceae*.

Зокрема, гомолог гена *Wx* рису є сестринським відносно інших злакових; пшениця, жито та ячмінь утворили окремий кластер; сорго увійшло до одного кластеру з кукурудзою. Однак частина нуклеотидних послідовностей гена *Wx* кукурудзи (*Zea mays I*) проявила високий рівень гомології до *Dimeria lawsonii*, утворив кластер *Dimeria/Zea*, інша частина нуклеотидних послідовностей гена *Wx* кукурудзи (*Zea mays II*) сестринська до клади *Sorghum/Oxyrhachis*. Припускаємо, що цей факт свідчить про давній горизонтальний перенос гена *Wx* від кукурудзи до *Dimeria lawsonii*.

**Глобальне вирівнювання нуклеотидних послідовностей.** Результати глобального вирівнювання за кодонами нуклеотидних послідовностей гена *Wx* кукурудзи дозволили побудувати філогенетичну дендрограму (рис. 2).

У зв'язку з тим, що проводили кодон-специфічне вирівнювання нуклеотидних послідовностей, дослідили лише несинонімічні нуклеотидні заміни, які призводять саме до зміни амінокислотних послідовностей транслятив гена *Wx*, тобто мутації, що змінюють функцію білка – продукту експресії гена. На дендрограмі нуклеотидні послідовності розподілено на два кластери – I і II. Кластер I розподілився на два субкластери – Ia і Ib. Середнє значення індексу BCL (bootstrap confidence level) становило 0,87. Така ж будова філогенетичного дерева зберігалася при вирівнюванні транслятив нуклеотидних послідовностей гена *Wx* (рис. 3), що свідчить про існування як мінімум трьох функціонально розрізняваних форм продукту експресії гена.

**In silico полімеразна ланцюгова реакція.** За результатами вирівнювання нуклеотидних послідовностей до поліморфного регіону екзонів 8–10 добрано послідовності праймерів: wx-BYOSP: 5'-ccacaacatctcctaccagg-3' та wxBYOASP 5'-gcagaacgatctgcacgtcc-3', специфічні до гена *Wx* кукурудзи. Характеристики сенс-праймера wx-



**Рис. 3.** Філогенетична дендрограма, побудована за результатами вирівнювання 75 трансльованих амінокислотних послідовностей гена *Wx* кукурудзи: I, Ia, Ib, II – кластери та субкластери

Класи фрагментів ампліфікації нуклеотидних послідовностей гена *Wx* кукурудзи при *in silico* ПЛР з праймерами wxBYOSP та wxBYOASP

Класи фрагментів ампліфікації за довжиною, п.н.	Генетичний індекс послідовності
410–426	gi:23395298, gi:23395300
506–521	gi:270315077, gi:270315073, gi:270315075, gi:21213285, gi:195954226, gi:54651456, gi:195954228, gi:270315079, gi:270315081, gi:270315080, gi:198442835, gi:332015356, gi:332015358, gi:332015360, gi:332015348, gi:332015350, gi:332015364, gi:332015352, gi:332015354, gi:332015362
715–732	gi:23395302, gi:23395290, gi:194354575, gi:23395318, gi:194354576, gi:194354571, gi:282926126, gi:282926128, gi:282926132, gi:194354572, gi:270315082, gi:194354573, gi:270315084, gi:270315088, gi:194354578, gi:23395292, gi:23395312, gi:23395320, gi:23395293, gi:23395315, gi:23395314, gi:23395296, gi:23395308, gi:23395306, gi:23395316, gi:23395311, gi:23395307, gi:282926130, gi:194354579, gi:270315086, gi:194354577, gi:23395304, gi:23395313, gi:22509, gi:23395299, gi:194354569, gi:194354570, gi:23395295, gi:23395309, gi:23395310, gi:23395317, gi:23395319, gi:332015380, gi:332015396, gi:332015386, gi:332015388, gi:332015398, gi:332015394, gi:23395301

BYOSP такі: температура плавлення (melting temperature, Tm) 49,2 °C, відсоток GC-пар – 55,0; антисенс-праймера wxBYOASP: Tm 55,5 °C, відсоток GC-пар – 60,0. За їхніми термодинамічними характеристиками добрано такі умови ПЛР: перша денатурація 94 °C 1 хв, 29 циклів: денатурація 94 °C 1 хв, відпал праймерів 54,2 °C 30 с (з підвищенням на 0,5 °C кожний цикл), елонгація 72 °C 44 с, фінальна елонгація 72 °C 10 хв.

За результатами *in silico* ПЛР фрагмент, що ампліфікувався з використанням нуклеотидної послідовності доміантного алеля gi:22509 гена *Wx* як матриці, мав розмір 728 п.н. При використанні рецесивного алеля gi:23395298 як матриці для *in silico* ПЛР продукувався фрагмент розміром 410 п.н. Провели ПЛР *in silico* з використанням 72 нуклеотидних послідовностей гена *Wx* кукурудзи. Фрагменти ампліфікації за довжиною диференційовано в три класи (таблиця). До класу 410–426 п.н. увійшли дві нуклеотидні послідовності, до класу 506–521 п.н. – 20, до класу 715–732 п.н. – 50.

Слід зазначити, що розподіл представників класів за даними *in silico* ПЛР збігається з результатами глобального вирівнювання. Це демонструє, що обраний для *in silico* ПЛР-аналізу регіон гена *Wx* відображає в цілому поліморфізм даного гена.

Маркерна система на основі ПЛР з використанням розроблених праймерів дозволить *in vitro* вивчати поліморфізм кукурудзи за алельним станом гена *Wx* та диференціювати генотипи з доміантним алелем гена від генотипів з рецесивним алелем для добору необхідних зразків кукурудзи на ранніх етапах селекції.

Таким чином, проведено філогенетичний аналіз гена *Wx* та його гомологів. Дендрограма в цілому збігається з даними Angiosperm Phylogeny Group II щодо систематики злакових. Але розбіжність в кладах *Dimeria/Zea* та *Sorghum/Oxyrhachis* дає можливість припустити давній акт горизонтального переносу нуклеотидних послідовностей гена *waxy* від кукурудзи до *Dimeria lawsonii*.

За результатами глобального вирівнювання нуклеотидних послідовностей гена *Wx* досліджено несинонімічні заміни, що призводять до зміни первинної послідовності транскриптів гена. За допомогою біоінформатичних програм розроблений дизайн праймерів, проведено оптимізацію умов ПЛР та здійснено *in silico* ПЛР-аналіз. Встановлено поліморфізм нуклеотидних послідовностей гена *Wx* кукурудзи. Проведено *in silico* ПЛР-аналіз 72 нуклеотидних послідовностей гена, визначено три класи фрагментів, що продукувалися в процесі ПЛР з розробленою парою праймерів.



Yu. O. Baranov, G. I. Slischuk, N. E. Volkova, Y. M. Sivolap  
Plant-Breeding and Genetics Institute, Odessa  
E-mail: natavolk@rambler.ru

#### БІОІНФОРМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО ГРАНУЛОАСОЦІЙОВАНУ КРОХМАЛЬСИНТАЗУ КУКУРУДЗИ

Local alignment of *Wx* gene and its homolog sequences has been conducted. Phylogenetic dendrogram displaying evolutionary relationship between *Poaceae* members has been built basing on results of the alignment. Ancient *Wx* gene transfer from *Zea mays* to *Dimeria lawsonii* has been assumed. Primers for the exons 8–10 polymorphic region have been designed. *In silico* PCR has been conducted.

Ю.О. Баранов, Г.І. Слищук,  
Н.Э. Волкова, Ю.М. Сиволап

#### БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО ГРАНУЛОАСОЦИИРОВАННУЮ КРАХМАЛСИНТАЗУ КУКУРУДЗИ

Проведено вирівнювання нуклеотидних послідовностей гена *Wx* і його гомологів, по результатам якого побудована філогенетична дендрограма, що відображає еволюційні зв'язки між представниками *Poaceae*. Предполагается факт древнего горизонтального переноса гена *Wx* от *Zea mays* в *Dimeria lawsonii*. Разработаны праймеры к полиморфному региону экзонов 8–10. Проведен *in silico* ПЦР-анализ.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Діденко С.Ю. Розширення генетичного різноманіття кукурудзи за фракційним складом крохмалю // Генет. ресурси рослин. – 2008. – № 5. – С. 77–85.
2. Шпаар Д., Гінанн К., Дрегер Д. та ін. Кукурудза. Вирощування, збирання, консервування і використання / Під ред. Д. Шпаара. – К.: Альфа-стевія ЛТД, 2009. – 396 с.
3. Longjiang Fan, Jiandong Bao, Yu Wang et al. Post-domestication selection in the maize starch pathway // PLoS ONE. – 2009. – 4, № 10. – 9 p.
4. Mason-Gamer R., Weil C., Kellogg E. Granule-bound starch synthase: structure, function, and phylogenetic utility // Mol. Biol. Evol. – 1998. – 15, № 12. – P. 1658–1673.
5. Klosgen R., Gierl A., Schwarz-Sommer Z., Saedler H. Molecular analysis of the waxy locus of *Zea mays* // Mol. Gen. Genet. – 1986. – 203. – P. 237–244.
6. Mu-Forster C., Huang R., Powers J.R. et al. Physical associated of starch biosynthetic enzymes with starch granules of maize endosperm. Granule-associated forms of starch synthase and starch branching enzyme II // Plant Physiol. – 1996. – 111. – P. 821–829.
7. Tsai P. The function of the waxy locus in starch synthesis in maize endosperms // Biochem. Genet. – 1974. – 11. – P. 83–96.
8. Wessler S., Baran G., Varagona M. et al. Excision of Ds produces waxy protein with a range of enzymatic activities // EMBO J. – 1986. – 5. – P. 2427–2432.
9. Тимчук Д.С., Жмурко В.В., Тимчук С.М. Вміст крохмалю і амілози в зерні ліній кукурудзи – носіїв ендоспермальних мутацій // Вісн. Харк. нац. ун-ту ім. В.Н. Каразіна. Сер. біол. – 2007. – Вип. 5, № 768. – С. 174–180.
10. Needleman S.B., Wunsch C.D. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins // J. Mol. Biol. – 1970. – 48. – P. 443–453.
11. Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // Nucl. Acids Res. – 2004. – 32. – P. 1792–1797.
12. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. – 1987. – 4. – P. 406–425.
13. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // Evolution. – 1985. – 39. – P. 783–791.
14. Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2004. – 101. – P. 11030–11035.
15. Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. – 2011. – 28, № 10. – P. 2731–2739.
16. Breslauer K.J., Frank R., Blocker H., Marky L.A. Predicting DNA duplex stability from the base sequence // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1986. – 83. – P. 3746–3750.
17. Rychlik W., Spencer W.J., Rhoads R.E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro* // Nucl. Acids Res. – 1990. – 18. – P. 6409–6412.

Надійшла 05.10.12