

СЛІЩУК Г. І., ВОЛКОВА Н. Е.<sup>✉</sup>, ЗАХАРОВА О. О., КОРЧМАРЬОВА А. В.

ТОВ «Котекна Україна Лімітед»,

Україна, 65114, м. Одеса, вул. Люстдорфська дорога, 140а, e-mail: natalia.volkova@cotecna.com

<sup>✉</sup> natalia.volkova@cotecna.com

## БІОІНФОРМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ ГЕНА, ЩО КОДУЄ АЦЕТОГИДРОКСИАЦИДСИНТАЗУ НУТУ ЗВИЧАЙНОГО

**Мета.** Аналіз гомологів гена, що кодує ацетогидроксиацетатсинтазу нуту звичайного біоінформатичними методами. **Методи.** Вирівнювання нуклеотидних послідовностей, метод UPGMA, метод максимальної правдоподібності Maximum Composite Likelihood method, гомологічне моделювання тримірної структури ензиму. **Результати.** Знайдено гомологи гена ацетогидроксиацетатсинтази ANAS нуту у представників різних родин, в т. ч. родини Бобові. Помічено певний рівень консервативності послідовностей гомологів мРНК гена ANAS в межах родин, у т. ч. серед представників родини Бобові. Розподіл кластерів відповідає таксономічному положенню досліджених видів рослин. Виявлено однонуклеотидний поліморфізм (Single nucleotide polymorphism) C/T в позиції 581, потенційно асоційований зі стійкістю до гербіцидів. За результатами гомологічного моделювання побудовано дві моделі ензиму ANAS. Заміна C/T, що веде до заміни амінокислот аланіну на валін, призводить до зміни конформації в А ланцюгу протеїну. **Висновки.** Маркерний скринінг вихідного селекційного матеріалу методом полімеразної ланцюгової реакції у режимі «реального часу» з розробленими праймерами й TaqMan-зондом до поліморфного регіону гена ANAS дозволить диференціювати «гербіцидостійкі» й «гербіцидонестійкі» алелі цього гена для добору генотипів із цільовою ознакою.

**Ключові слова:** нут звичайний, ген ацетогидроксиацетатсинтази, однонуклеотидний поліморфізм, стійкість до гербіцидів.

Нут звичайний (*Cicer arietinum* L.) визнано високотехнологічною культурою, він є добрим попередником для багатьох сільськогосподарських рослин, не виснажує ґрунт, через здатність фіксувати азот із повітря забезпечує себе і вирощувані після нього культури додатковими живильними речовинами. Нут є цінним високопротеїновим компонентом, джерелом незамінних амінокислот, особливо лізину й триптофа-

ну. Протеїн нуту визнаний ідеальним стандартом Продовольчої та сільськогосподарської організації ООН (Food and Agriculture Organization, FAO) за амінокислотним складом. Як продовольча культура має добрі кулінарні якості, містить у зерні багато жиру, протеїнів, мінеральних речовин, вітамінів. Його зерно цінують за енергетичні властивості та вміст значної кількості провітаміну А. Поживні речовини нуту добре перетравлюються, тож його можна вживати замість м'яса. Зерно кормові сорти нуту використовують розмеленими в суміші з іншими концентрованими кормами як протеїново-вітамінну добавку до комбікормів. Для аграріїв України нут є перспективною сільськогосподарською культурою. За сприятливих погодних умов і на належному агрофоні врожайність нуту може становити 2,5–4,2 т/га. Нут як найбільш посухостійка рослина серед бобових дає стійкі врожаї в умовах спекотного клімату. З іншого боку, нут є досить холодостійкою рослиною, сходи витримують короточасні заморозки [1].

Одним із важливих факторів, що стримують зростання площ цієї культури, є неефективний захист від бур'янів, особливо широколистяних. Це пов'язано з тим, що на сьогоднішній день відсутні високоефективні гербіциди для боротьби з цією групою бур'янів [2]. Стійкість рослин до гербіцидів може бути зумовлена точковими мутаціями в генах, що кодують протеїн – мішень для такого гербіциду, зокрема пов'язаних із фотосинтезом рослин і синтезом амінокислот.

Ацетогидроксиацетатсинтаза (acetylhydroxyacid synthase, ANAS, E.C. 2.2.1.6; також відома як ацетолактатсинтаза, acetolactatsynthase, ALS) являє собою перший ензим, що каталізує біохімічний синтез амінокислот із розгалуженим ланцюгом, зокрема таких, як валін, лейцин і ізолейцин. Вона є мішенню дії п'яти структурно різних сімейств гербіцидів: синтез амінокислот пригнічується, що призводить до швидкої загибелі рослини. Отже,

© СЛІЩУК Г. І., ВОЛКОВА Н. Е., ЗАХАРОВА О. О., КОРЧМАРЬОВА А. В.

інгібуючи активність АНАС, гербіциди перешкоджають подальшому зростанню й розвитку чутливих рослин, охоплюючи багато видів бур'янів [3]. Одними з найбільш широко застосовуваних є імідазолінонові й сульфонілкарбамідні гербіциди через їх ефективність за дуже низьких норм внесення і відносної нетоксичності для птахів, ссавців та ґрунтових організмів, ненакопичення в ґрунті, нечутливості до вимивання та стоку.

Сучасний селекційний процес здійснюється за використання молекулярно-маркерного добору. Тому доцільним є біоінформатичний та молекулярно-маркерний аналіз геному нуту за локусами, пов'язаними із забезпеченням стійкості до гербіцидів.

Мета наших досліджень полягала в аналізі гомологів гена АНАС нуту звичайного біоінформатичними методами.

### Матеріали і методи

Матеріалом слугували 85 нуклеотидних послідовностей мРНК гена АНАС нуту та його гомологів, представлених у базі даних Національного центру біотехнологічної інформації (National Center for Biotechnology Information, NCBI) [4].

Пошук нуклеотидних послідовностей виконано за алгоритмом BLAST сервера NCBI. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей проведено за допомогою програми MEGA 7.0.26 [5]. Філогенетичний аналіз виконано методом UPGMA [6]. Еволюційні дистанції обчислювали за допомогою методу максимальної правдоподібності (Maximum Composite Likelihood method) [7]. Гомологічне моделювання тримірної структури ензиму АНАС виконували за допомогою сервера SWISS-MODEL [8–12]. Дизайн праймерів та зонду виконували за допомогою Primer3 [13–14].

### Результати та обговорення

Знайдено гомологи гена АНАС нуту у представників різних родин, в т. ч. родини Бобові. На дендрограмі (рис. 1) відокремлено два кластери. Кластер I, до якого увійшли однодольні рослини, містить субкластер із двох представників Орхідних: дендробіум (*Dendrobium catenatum* Lindl.) і фаленопсис-наїзник (*Phalaenopsis equestris* Schauer) та окремою гілкою представника Злакових – зойсію японську

(*Zoysia japonica* Steud.).

Кластер II, до якого увійшли дводольні рослини, складається з двох субкластерів – Па і Пб. В субкластері Па зібрано представників трьох видів родини Капустяні (*Brassica rapa* L., *B. napus* L., *Camelina microcarpa* Andr. ex DC.). Субкластер Пб є великим за кількістю зразків та угруповань. У групу Пб-1 увійшли зразки родини Маренових видів *Galium aparine* L. та *G. spurium* L. Група Пб-2 складається з двох субкластерів – Пб-2а й Пб-2б. Субкластер Пб-2а об'єднав усіх представників родини Бобові: нут звичайний, соя культурна (*Glycine max* (L.) Merr.), квасоля звичайна (*Phaseolus vulgaris* L.), квасоля незграбна (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & H. Ohashi), вігна промениста (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek), люпин вузьколистий (*Lupinus angustifolius* L.), три види арахісу (*Arachis duranensis* Krapov. & W. C. Greg., *A. hypogaea* L. *A. ipaënsis* Krapov. & W.C. Greg.), два види люцерни (*Medicago littoralis* Rohde ex Loisel., *M. truncatula* Gaertn.), горох голубиний (*Cajanus cajan* (L.) Huth).

Субкластер Пб-2б містить кілька груп, кожна з яких створена представниками певної родини, зокрема, група з восьми зразків чотирьох видів шириці родини Амарантові (*Amaranthus hybridus* L., *A. hypochondriacus* L., *A. powellii* S. Watson, *A. retroflexus* L.), група представників видів соняшнику родини Айстрові (*Helianthus annuus* L., *H. nuttallii* Torr. & A. Gray, *H. praecox* Engelm. & A. Gray), група представників дерев, в т. ч. плодових (*Populus euphratica* L., *P. trichocarpa* Torr. & A. Gray, *Malus domestica* Borkh, *Pyrus × bretschneideri* Rehder etc), група представників трьох видів бавовнику (*Gossypium raimondi* L., *Gossypium hirsutum* L., *Gossypium arboreum* L.) та інш. Помічено певний рівень консервативності послідовностей гомологів мРНК гена АНАС у межах родин, у т. ч. серед представників родини Бобові. Розподіл кластерів відповідає таксономічному положенню досліджених видів рослин.

Із метою функціонального аналізу досліджено поліморфізм мРНК гена АНАС нуту. Виявлено одноклеотидний поліморфізм (Single nucleotide polymorphism, SNP) С/Т в позиції 581, потенційно асоційований зі стійкістю до гербіцидів: ccccgagaatgatcggaaccgatg[c/t]ttttcaagaaacccccatcgttga (c – алель дикого типу, t – мутантний алель).

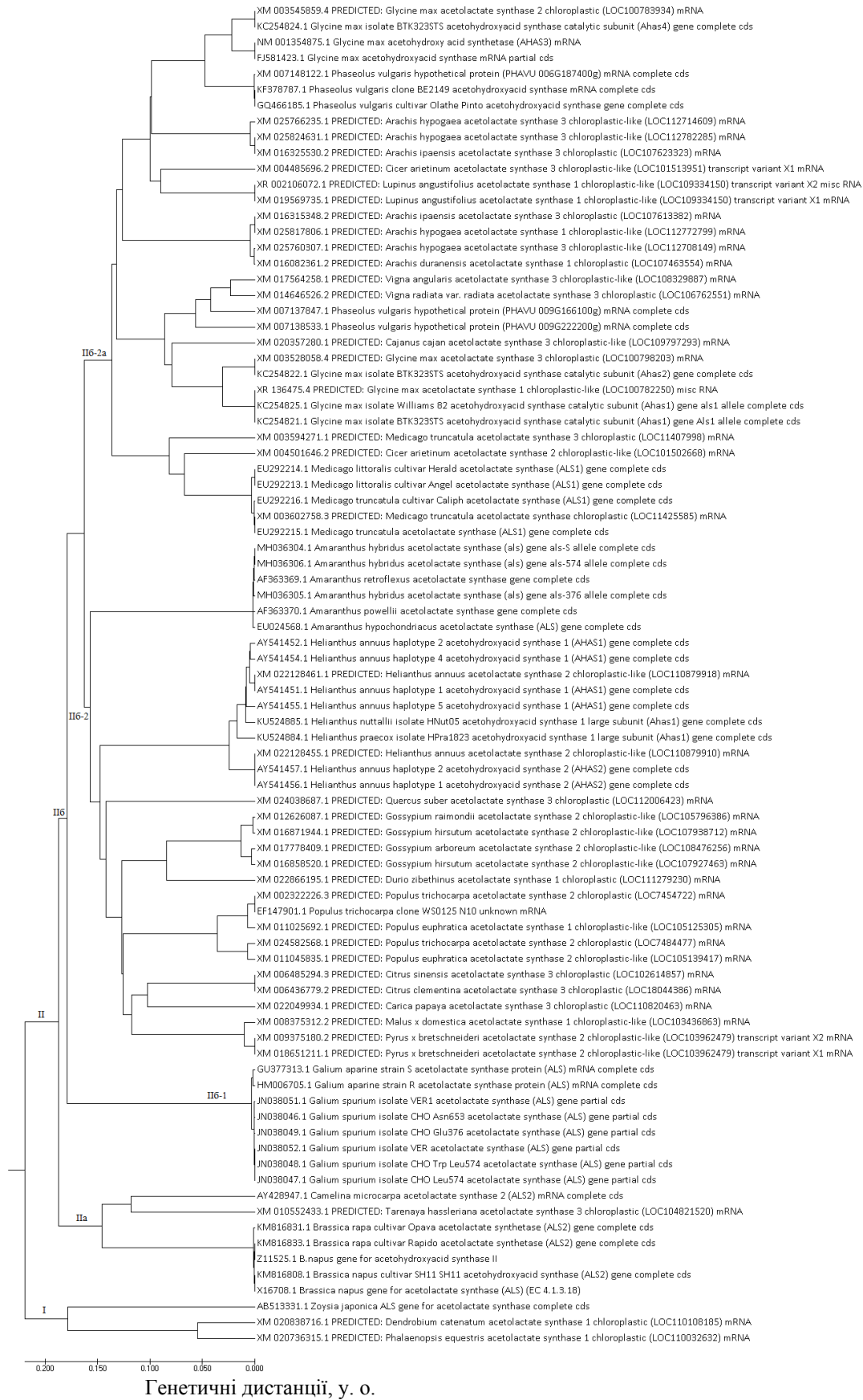


Рис. 1. Філодендрограма гомологів мРНК гена AHAS.

За результатами гомологічного моделювання побудовано дві моделі ензиму АНАС (рис. 2). Заміна С/Т, що веде до заміни амінокислоти аланіну на валін, призводить до зміни конформації в А ланцюгу протеїну.

Розроблено дизайн праймерів та ТаqМан-зонду для полімеразної ланцюгової реакції у режимі «реального часу» (послідовності надаються за зверненням).

## Висновки

Маркерний скринінг вихідного селекційного матеріалу методом полімеразної ланцюгової реакції у режимі «реального часу» з розробленими праймерами й ТаqМан-зондом до поліморфного регіону гена АНАС дозволить диференціювати «стійкі» та «нестійкі» алелі цього гена для добору генотипів із цільовою ознакою.

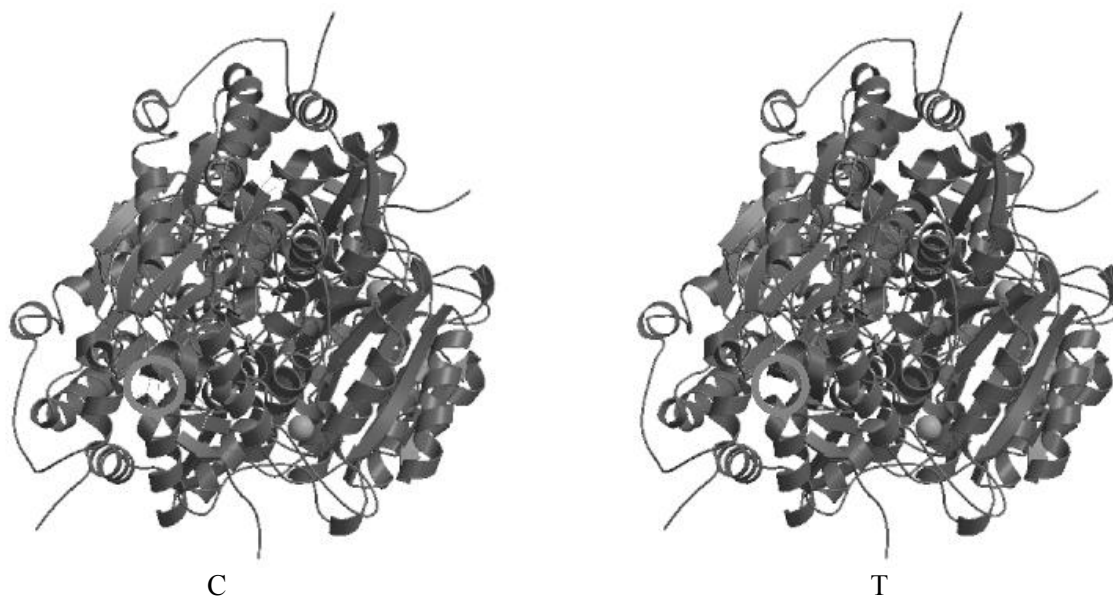


Рис. 2. Моделі ензиму АНАС, трансльовані з алелів з однонуклеотидним поліморфізмом С/Т відповідно. Поліморфна ділянка обведена кружечком.

## References

1. Sichkar V.I., Burikina S.I., Velper M.O. Nut: fakti i perspektivi naukovih doslidzhen v sviti ta Ukraini (oglyadova). *Tavriysk. nauk. visnik*. 2018. Vip. 99. S. 133–141. [in Ukrainian] / Січкарь В.І., Бурикіна С.І., Вельвер М.О. Нут: факти і перспективи наукових досліджень в світі та Україні (оглядова). *Таврійськ. наук. вісник*. 2018. Вип. 99. С. 133–141.
2. Bushulyan O.V., Sichkar V.I., Babayants O.V. Suchasna integrovana sistema zahistu posiviv nutu: metod. rekomend. Odesa: SGI NT. 2017. 26 s. [in Ukrainian] / Бушулян О.В., Січкарь В.І., Бабаянц О.В. Сучасна інтегрована система захисту посівів нуту: метод. рекомендації. Одеса: СГІ НЦ НС, 2017. 26 с.
3. Garcia M., Nouwens A., Lonhienne T., Guddata L. Comprehensive understanding of acetohydroxyacid synthase inhibition by different herbicide families. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. Vol. 114 (7). P. E1091–E1100. doi: 10.1073/pnas.1616142114.
4. National Center for Biotechnology Information Database. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Last accessed: 1.03.2019).
5. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016. Vol. 33. P. 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.
6. Sneath P., Sokal R. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco : W.H. Freeman & Co, 1973. 573 p.
7. Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. Vol. 101. P. 11030–11035. doi: 10.1073/pnas.0404206101.
8. Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 2018. Vol. 46 (W1). P. W296–W303. doi: 10.1093/nar/gky427.
9. Bienert S., Waterhouse A., de Beer T. et al. The SWISS-MODEL Repository – new features and functionality. *Nucleic Acids Res.* 2017. Vol. 45. P. D313–D319. doi: 10.1093/nar/gkw1132.
10. Guex N., Peitsch M., Schwede T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis*. 2009. Vol. 30. P. S162–S173. doi: 10.1002/elps.200900140.
11. Benkert P., Biasini M., Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*. 2011. Vol. 27. P. 343–350. doi: 10.1093/bioinformatics/btq662.
12. Bertoni M., Kiefer F., Biasini M., Bordoli L., Schwede T. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7 (1). P. 10480. doi: 10.1038/s41598-017-09654-8.

13. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T. et al. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucl. Acids Res.* 2012. Vol. 40 (15). P. e115. doi: 10.1093/nar/gks596.
14. Koressaar T., Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics.* Vol. 23 (10). P. 1289–1291. doi: 10.1093/bioinformatics/btm091.

**SLISHCHUK H., VOLKOVA N., ZAKHAROVA O., KORCHMARYOVA A.**

*Cotecna Ukraine Limited,*

*Ukraine, 65114, Odesa, Lyustdorfs'ka doroga str., 140a, e-mail: natalia.volkova@cotecna.com*

#### **BIOINFORMATIC ANALYSIS OF CHICKPEA ACETOHYDROXYACID SYNTHASE GENE**

**Aim.** Analysis of homologues of chickpea gene encoding acetohydroxyacid synthase, by bioinformatics methods.

**Methods.** Alignment of nucleotide sequences, UPGMA method, Maximum Composite Likelihood method, homologous modeling of three-dimensional structure of enzyme. **Results.** Homologues of the acetohydroxyacid syntase gene (AHAS) of chickpea were found among representatives of different families. A certain level of conservativeness of mRNA homologues sequences of AHAS gene within the families was noted, including legumes. The distribution of clusters corresponds to the taxonomic position of the investigated plant species. The single nucleotide polymorphism C / T at position 581, potentially associated with herbicide resistance, was detected. Based on the homologous modeling results, two models of the enzyme AHAS were constructed. The replacement of C / T, which leads to the replacement of the amino acids of alanine with valine, leads to a change in the conformation in the A chain of protein. **Conclusions.** Marker screening of the source breeding material by «real-time» polymerase chain reaction with the developed primers and the TaqMan probe to the polymorphic region of the AHAS gene will allow differentiating the herbicide «resistant» and «tolerant» alleles of the gene for the selection of target genotypes.

**Keywords:** chickpea, acetohydroxyacid syntase gene, single nucleotide polymorphism, resistance to herbicides.