

ЕВОЛЮЦІЙНА ЕКОЛОГІЯ ТА ЕКОГЕНЕТИКА

УДК 633.52:577.21:632.165

БАСР Г.Я., ПИДЮРА М.О., ПІРКО Я.В., ЄМЕЦЬ А.І., БЛЮМ Я.Б.

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А, e-mail: galinabayer@mail.ru

БІОІНФОРМАЦІЙНИЙ ПОШУК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ГЕНІВ, ЩО КОДУЮТЬ ТУБУЛІНИ У ГЕНОМІ ЛЬОНУ

Льон (*Linum usitatissimum* L.) є однією з основних технічних культур, здавна забезпечує потреби людини у високоякісному волокні. Надзвичайно довгі (≤ 77 мм) волокна льону утворюються на зовнішніх тканинах стебла між флоемою і епідермісом [1]. Основним полімером льоноволокна є целюлоза, вміст якої може досягати 70% від маси зрілого волокна. Даний полімер переважно накопичується в клітинах флоєми (луб'яне волокно), де відкладається в клітинній стінці [2]. Молекулярні механізми біосинтезу целюлози поки що вивчені недостатньо, але основний компонент уже визначений – це сукупність 36-ти поліпептидів, що утворюють целюлозосинтазу розетку, зв'язану з елементами цитоскелету [3]. Важливим етапом в дослідженні рослинної клітини стала візуалізація руху целюлозосинтазного комплексу вздовж мікротрубочок в живих клітинах [4]. Припускають, що мікротрубочки слугують не лише «матрицею» для руху целюлозосинтазних комплексів [4–7], а і орієнтиром для їх вбудовування та видалення з плазматичної мембрани [6, 8]. Протягом останніх 15 років відкрито ряд генів, асоційованих з синтезом целюлози. Однак, лише для целюлозосинтазо-активного (CS11) білка встановлено безпосередній зв'язок з целюлозосинтазним комплексом та мікротрубочками [9–12]. Подальші роботи в напрямку вивчення різних механізмів взаємодії целюлозосинтазного комплексу і мікротрубочок, а також взаємодія останніх з мікрофібрилами льняних волокон, що формуються, можуть відкрити нові можливості для створення сортів льону з покращеною якістю волокна.

Тому метою роботи було проведення біоінформаційного пошуку та аналіз послідовностей генів, що кодують синтез α - і β -тубуліну (основних білків мікротрубочок) у льону для подальшого вивчення експресії відповідних генів.

Матеріали і методи

Пошук генів аналіз послідовностей генів, що кодують синтез α - і β - тубуліну у льону здійснювали за допомогою інструменту TBLASTN версії 2.2.26+ в базі даних Phytozome v9.1 (Phytozome. www.phytozome.net). Даний тип пошуку передбачає пошук на основі порівняння заданих амінокислотних послідовностей з трансльованою у амінокислотні послідовності базою даних нуклеотидів. Для цього було використано налаштування програми TBLASTN за замовчуванням. Відібрано амінокислотні послідовності, для яких поріг відсіву випадкових співпадінь (e-value) складало не більше 1^{-10} . Отримані послідовності були перевірені за допомогою алгоритму Hidden Markov Model у програмі HMMER3 (HMMER. <http://hmmer.janelia.org>) з використанням референтної бази даних родин білків Pfam-A (версія 25.0) [13]. Генетичні локуси, транскрибовані послідовності яких були віднесені за даними бази даних Pfam до родини тубулінів, було визначено як гени тубулінів льону. Для вирівнювання генетичних послідовностей та побудови філогенетичного дерева використовували програму ClustalW [14].

У базі даних Uniprot (<http://www.uniprot.org/help/sequence-alignments>) на даний момент не міститься жодної достовірно анотованої послідовності α - чи β -тубулінів, закодованих у геномі льону (*Linum usitatissimum*). Як правило, у геномах вищих рослин міститься від 3 до 11 ізоформ α - і β -субодиниць тубулінів. Так, наприклад, у геномі *A. thaliana*, який є досить добре дослідженим, анотовано 6 ізоформ α - тубуліну і 9 ізоформ β -тубуліну [15, 16]. Середня кількість амінокислот у послідовностях α - і β -тубуліну вищих рослин складає близько 445–450 амінокислот [17]. Відомо, що α - і β -тубуліни філогенетично мають суттєві відмінності, тому для пошуку

генів тубуліну у геномі льону нами було взято по одній послідовності α - і β -тубуліну *A. thaliana*, а саме – ізоформи alpha-1 (TBA1_ARATH) і beta-1 (TBB1_ARATH). У результаті проведеного дослідження, у геномі льону було виявлено 17 генів, які кодують послідовності тубулінів. До них віднесено гени, які закодовані у локусах Lus10021094, Lus10017217, Lus10036069, Lus10026813, Lus10002000, Lus10035497, Lus10008528, Lus10023348, Lus10038458, Lus10039231, Lus10027476, Lus10016448, Lus10040712, Lus10007851, Lus10005705, Lus10020281 і Lus10035422. Середня кількість амінокислот у послідовностях, які транскрибуються на основі даних генів тубулінів льону, складає близько 450 амінокислот, вказані гени мають невеликий розмір і подібну структуру. На основі філогенетичної подібності генів, що кодують α - і β -тубуліни льону, виділено групи найбільш подібних послідовностей (рис. 1). На основі цих даних зроблено припущення, що у геномі льону може бути закодовано до 7 ізоформ тубуліну α - і до 10 ізоформ β -тубуліну.

Далі, до множинного вирівнювання було включено по одній ізоформі α - і β -тубулінів *A. thaliana* – ті ж послідовності, що брали для пошуку генів льону. У результаті вирівнювання виявлених генів α - і β -тубуліну льону, транскрибованих у амінокислотні послідовності та десяти типів α - і β -тубуліну *A. thaliana* виділено дві групи генів тубуліну льону, які виявляють значну подібність до анотованих фрагментів α - і β -тубулінів *A. thaliana* з бази даних UniProt (рис. 2), тобто, можна виділити локуси, що кодують тубуліни різних типів. Так, генетичні локуси

Lus10007851, Lus10005705, Lus10020281 і Lus10035422 з високою долею ймовірності кодують ізоформи тубуліну α , а локуси Lus10021094, Lus10017217, Lus10036069, Lus10026813, Lus10023348, Lus10038458, Lus10039231, Lus10027476, Lus10016448 і Lus10040712 кодують ізоформи β -тубуліну. Локуси Lus10002000, Lus10035497 і Lus10008528 найбільш ймовірно кодують послідовності ізоформ α -тубуліну. Нами було висунуте припущення, що геном льону може містити 7 ізоформ α -тубуліну і 10 ізоформ β -тубуліну.

Для всіх даних генів отримані генетичні та транскрибовані амінокислотні послідовності. Виявлено, що дані гени мають у своїй послідовності 3 екзони і 2 інтрони. Використовуючи отримані амінокислотні послідовності та онлайн програму Primer3: WWW primer tool (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) було розроблено дизайн праймерів, які в подальшому будуть використані для оцінки експресії генів, що кодують α - і β -тубуліни льону.

Висновки

Таким чином, нами передбачено 17 генів тубуліну льону. За гомологією амінокислотних послідовностей до анотованих послідовностей *A. thaliana* гени льону вдалося віднести до 7 типів ізоформ α -тубуліну і 10 ізоформ β -тубуліну.

Робота була виконана при підтримці Фонду фундаментальних досліджень України, грант № Ф54.4/025 (2013–2014).

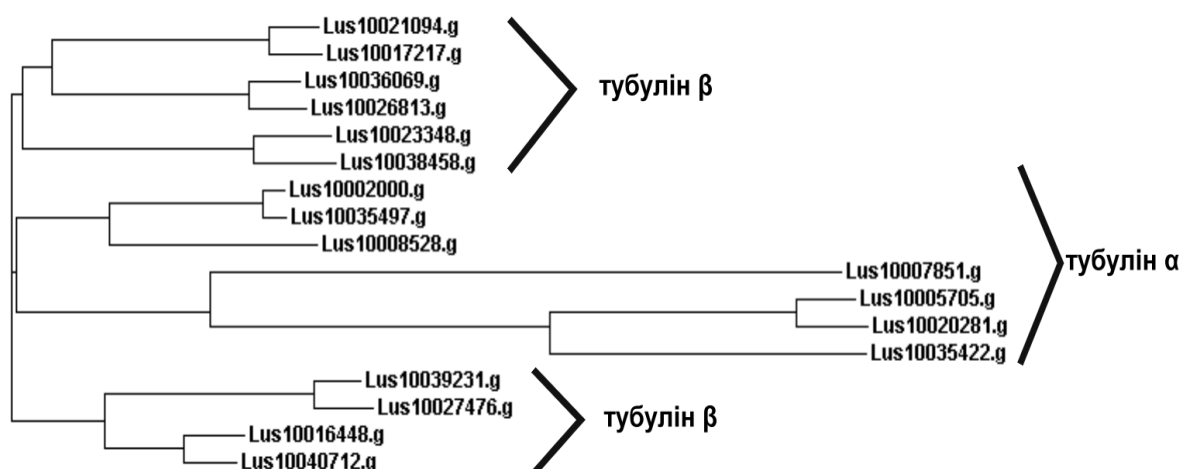


Рис. 1. Філогенетичне дерево подібності визначених нами генів, що кодують α - і β -тубуліни льону

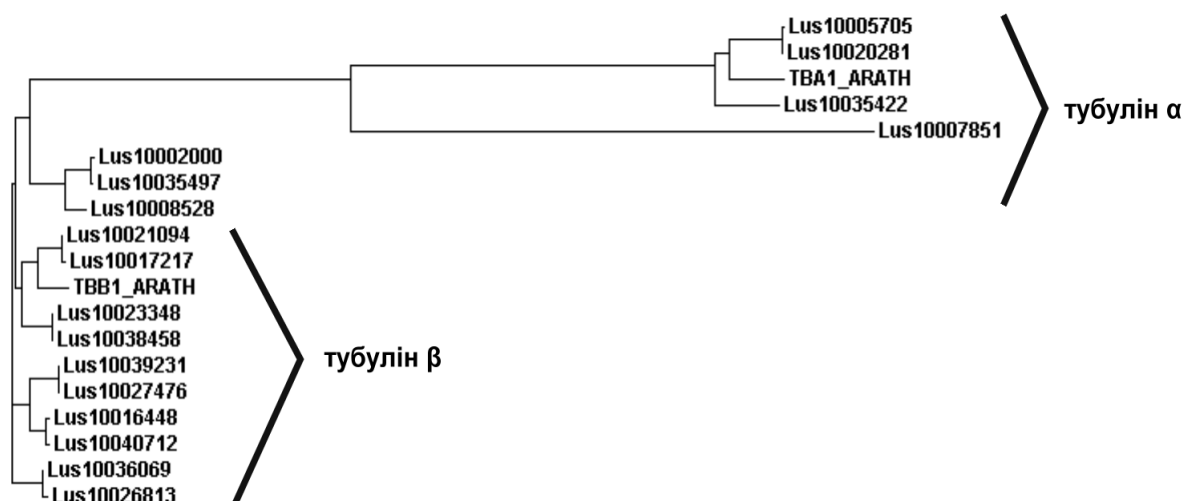


Рис. 2. Філогенетичне дерево подібності виявлених генів, що кодують α - і β -тубуліни льону, по одній ізоформі α - і β -тубулінів *A. thaliana* – ті ж послідовності, які брали для пошуку генів льону (TBA1_ARATH і TBB1_ARATH)

Література

1. Reddy N., Yang Y. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications//Trends in Biotech. – 2005. – 23. – P. 22–27.
2. Titok V., Leontiev V., Shostak L., Khotyleva L. Thermogravimetric analysis of the flax bast fiber bundle // J. Nat. Fibers. – 2006. – 3, № 1. – P. 35–41.
3. Doblin M.S., Kurek I., Jacob-Wilk D., Delmer D.P. Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes // Plant Cell Physiol. – 2002. – 43. – P. 1407–1420.
4. Paredez A.R., Somerville C.R., Ehrhardt D.W. Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules // Sci. – 2006. – 312. – P. 1491–1495
5. Emons A.M.C., Hofte H., Mulder B.M. Microtubules and cellulose microfibrils: how intimate is their relationship? // Trends Plant Sci. – 2008. – 12. – P. 279–281.
6. Crowell E.F., Bischoff V., Desprez T., Rolland A., Stierhof Y.D., Schumacher K., Gonneau M., Hofte H., Vernhettes S. Pausing of Golgi bodies on microtubules regulates secretion of cellulose synthase complexes in *Arabidopsis*// Plant Cell. – 2009. – 21. – P. 1141–1154.
7. Chan J., Crowell E., Eder M. The rotation of cellulose synthase trajectories is microtubule-dependent and influences the texture of epidermal cell walls in *Arabidopsis* hypocotyls // J. Cell Sci. – 2010. – 123. – P. 3490–3495.
8. Gutierrez R., Lindeboom J. J., Paredez A. R., Emons A. M., Ehrhardt D. W. Arabidopsis cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane and interact with cellulose synthase trafficking compartments // Nat. Cell Biol. – 2009. – 11. – P. 797–806.
9. Gu Y., Kaplinsky N., Bringmann M., Cobb A., Carroll A., Sampathkumar A., Baskin T.I., Persson S., Somerville C.R. Identification of a cellulose synthase-associated protein required for cellulose biosynthesis // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2010. – 107. – P. 12866–12871.
10. Li Y., Shen Y., Cai C., Zhong C., Zhu L., Yuan M., Ren H. The type II *Arabidopsis* formin14 interacts with microtubules and microfilaments to regulate cell division // Plant Cell. – 2010. – 22. – P. 2710–2726.
11. Bringmann M., Li E., Sampathkumar A., Kocabek T., Hauser M.T., Persson S. POM- POM2/cellulose synthase interacting1 is essential for the functional association of cellulose synthase and microtubules in *Arabidopsis* // Plant Cell. – 2012. – 24. – P. 163–177.
12. Mei Y., Gao H.B., Yuan M., Xue H.W. The arabidopsis ARCP protein CS11 which is required for microtubule stability is necessary for root and anther development // Plant Cell. – 2012. – 24. – P. 1066–1080.
13. Punta M., Coghill P.C.I., Eberhardt R.Y., Mistry J., Tate J., Boursnell C., Pang N., Forslund K., Ceric G., Clements J., Heger A., Holm L., Sonnhammer E.L.L., Eddy S.R., Bateman A., Finn R.D. The Pfam protein families database // Nucleic Acids Res. – 2012. – 40. – P. 290–301.
14. 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 Res. – 1994. – 22. – P. 4673–4680.
15. Snustad D.P., Haas N.A., Koczak S.D., Silflowa C.D. The small genome of *Arabidopsis* contains at least nine expressed β -tubulin genes // Plant Cell. – 1992. – 4. – P. 549–556.

16. Koczak S.D., Haas N.A., Hussey P.J., Silflow C.D., Snustad D.P. The small genome of *Arabidopsis* contains at least six expressed α -tubulin genes // Plant Cell. – 1992. – 4. – P. 539–547.
17. Blume Ya.B., Baird W.V., Yemets A.I., Breviario D. The Plant Cytoskeleton: Key Tool for Agro-Biotechnology. – Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NY, 2008. – 457 p.

BAYER G.YA., PYDIURA N.A., YEMETS A.I., PIRKO YA.V., BLUME YA.B.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: galinabayer@mail.ru*

BIOINFORMATICS SEARCH OF THE TUBULINE GENES IN LINUM GENOME

Aims. Flax (*Linum usitatissimum*) is the most important industrial crop that covers human needs in the cellulose-rich fibers of high quality. Molecular mechanisms of cellulose biosynthesis are still poorly understood, but a basic component consisting of 36-polypeptides is already known. It is cellulose synthase complex associated with cytoskeleton elements. Obviously, both physical and chemical properties of cellulose biopolymer as well as the characteristics of newly-formed fiber depend on the genes expression during the cell wall biogenesis. **Methods.** Using *Arabidopsis* tubulin genes we have performed the similarity search of genes via TBLASTN predicted proteins of the *Linum* genome available at Phytozome v9.1. **Results.** A total of 17 tubulin gene candidates were found in *Linum* genome. Using ClustalW software we have made a multiple amino acid sequence alignment of the tubulin type specific regions of these genes with the sequences of *Arabidopsis* tubulin genes and obtained a phylogenetic tree for these sequences. **Conclusions.** We provide 17 genes of α - and β -tubulin in flax genome. Homology of amino acid sequences to sequences annotated *A. thaliana* genes flax able to carry up to 7 types of isoforms of α -tubulin and 10 isoforms of β -tubulin.

Key words: *Linum usitatissimum*, α -tubulin, β -tubulin, gene.

УДК 575.2:634.942 (477.62)

ДЕМКОВИЧ А.Е., КОРШИКОВ И.И., МАКОГОН И.В.

*Донецкий ботанический сад НАН Украины,
Украина, 83059, г. Донецк, пр. Ильича, 110, e-mail: dbsgenetics@gmail.com*

ПОЛИМОРФИЗМ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО (*QUERCUS ROBUR* L.) НА ДОНЕЦКОМ КРЯЖЕ ПО МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ ЛОКУСАМ

Аборигенный вид украинской флоры и одна из главных лесобразующих пород Украины – дуб черешчатый (*Quercus robur* L.) – отличается высоким адаптационным потенциалом. Об этом свидетельствует его природная распространенность: от севера Скандинавии до юга Европы, от Пиренейского полуострова до Уральских гор. *Q. robur* – анемофильный вид с высоким уровнем ауткроссинга, доля самоопыления у растений в популяциях составляет 2–5% [1]. При этом жизнеспособная пыльца может распространяться до 80 км, обеспечивая опосредованный поток генов [2]. Изменчивость *Q. robur* давно является предметом исследований [3], а генетическое разнообразие с использованием молекулярных маркеров изучается в пределах ареала вида в Европе уже более 20 лет [4, 5]. В этом плане *Q. robur* на территории Украины изучен фрагментарно и то

зарубежными учеными, которые исследовали его популяционно-генетическую изменчивость в пределах определенной части ареала. Краевые популяции, находящиеся вне зоны экологического оптимума, где возможен дрейф генов, в поле зрения пока не попадали. На территории Украины природные дубравы встречаются в степной зоне, где их разнообразие лимитировано действием неблагоприятных факторов среды и влиянием человека.

В изучении популяционно-генетического разнообразия древесных растений активно применяются микросателлитные локусы. Их рассматривают в качестве эффективных маркеров, позволяющих проводить разносторонние исследования генетической изменчивости видов рода *Quercus* L. [2, 6, 7]. Многолокусный анализ микросателлитов, которые наследуются кодоминантно, позволяет идентифицировать каждый из двух аллелей