

УРБАНОВИЧ О.Ю.✉, КУЗМИЦКАЯ П.В.

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»,

Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: O.Urbanovich@igc.bas-net.by

✉ O.Urbanovich@igc.bas-net.by, (+375 17) 294-91-80

### ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА MDP0000151428 СРЕДИ СОРТОВ И ВИДОВ ЯБЛОНИ

**Цель.** Целью данной работы было изучение вариабельности гена MDP0000151428, относящегося к DREB семейству, среди сортов различного генетического происхождения, обладающих разной устойчивостью к холоду. **Методы.** Анализ полиморфизма проводили с помощью методов ПЦР и секвенирования. **Результаты.** Проведены клонирование и секвенирование гена MDP0000151428 из 18 сортов и видов яблони с различным уровнем устойчивости к холоду. Оценка вариабельности его первичной структуры показала присутствие точечных мутаций. Большинство из них являлись однонуклеотидными заменами, в одном случае обнаружена однонуклеотидная делеция. Степень идентичности последовательностей колебалась от 97,5 % до 100 %. **Выводы.** Оценка полиморфизма длины гена MDP0000151428 показала, что он достаточно консервативен и не несет протяженных инсерций или делеций у 20 сортов и видов яблони с различным уровнем устойчивости к холоду. Анализ показал, что частота возникновения мутаций в различных сайтах гена MDP0000151428 различается. Наиболее подвержены мутациям нуклеотиды, находящиеся в 138, 341 и 472 позициях. Сравнение гипотетических аминокислотных последовательностей показало наличие отдельных замен. Чаще всего они встречаются в 114 и 158 позициях.

**Ключевые слова:** яблоня, ген MDP0000151428, транскрипционные факторы, устойчивость к холоду.

Погодные условия Беларуси создают определенные трудности в выращивании плодовых деревьев. Сильные морозы и оттепели зимой, возвратные заморозки весной могут приводить к значительному снижению урожая и даже гибели растений, что ограничивает количество сортов, пригодных для выращивания в регионе. Районированные сорта проходят серьезную проверку на адаптивность. Селекционеры

давно ищут пути повышения холодоустойчивости и морозоустойчивости сортов растений. Устойчивость растений к низким температурам – сложный признак, контролируемый полигенно. При этом морозостойкость различных тканей растения может значительно отличаться, что делает этот признак еще более сложным для изучения. Так, было показано, что устойчивость к воздействию низких температур значительно выше у более зрелых тканей по сравнению с меристемами [1].

Механизм морозоустойчивости не достаточно изучен, в том числе и на молекулярном уровне. Установлено, что важным компонентом холодовой акклиматизации являются транскрипционные факторы, участвующие в регуляции экспрессии целевых генов. К ним относятся члены семейства транскрипционных факторов DREB/CBF (dehydration-responsive element binding factors / C-repeat binding factors), отвечающие за устойчивость растений к ряду неблагоприятных абиотических факторов. Отличительной особенностью транскрипционных факторов DREB/CBF является консервативный домен AP2, имеющий длину около 60 аминокислотных остатков. Все DREB-белки содержат высококонсервативный ERF/AP2 домен и принадлежат к большому мультигенному семейству растительных транскрипционных факторов, насчитывающему свыше 100 членов. Эти гены подразделяются на два класса на основании числа ERF/AP2 доменов. Первый класс включает APETALA2 (AP2), AINTEGUMENTA (ANT) и Glossy15, каждый из которых кодирует белок, содержащий два ERF/AP2 домена [2–4]. Второй класс включает EREBPs, TINY, DREB1/CBF, DREB2, Pti5, EBP, ERF, AtEBP, AtERFS и ABI4, каждый из них кодирует белок с одним ERF/AP2 доменом [5–7]. Третий класс, к которому относятся гены RAV1 и RAV2, кодирует белки, имеющие 2 разных ДНК-связывающих домена ERF/AP2 и В3. ДНК-связывающий до-

мен В3 консервативен в гомологах VP1/ABI3 [8–10]. Отдельные гены, относящиеся ко второму классу, например, EREBPs, AtERFs, Ptis и ERF способны специфично связываться с GCC-боксом (AGCCGCC), который присутствует в промоторных регионах многих генов, индуцируемых этиленом и кодирующих белки, связанные с патогенезом [11].

Транскрипционные факторы яблони, отвечающие за экспрессию генов в ответ на холодовой стресс, изучены слабо. К настоящему моменту в геноме яблони было выявлено 68 генов, предположительно кодирующих транскрипционные факторы из семейства DREB. С разной плотностью они расположены на 12 хромосомах. Все гипотетические белки, кодируемые этими генами, содержат APETALA 2-домен. Девять из них были изучены более детально. Было показано, что уровень транскрипции пяти из них повышается в ответ на воздействие холода [12]. Однако данных о молекулярной изменчивости этих генов среди сортов яблони по-прежнему недостаточно. В связи с этим целью данной работы было изучение варибельности гена MDP0000151428, относящегося к DREB семейству, среди сортов различного генетического происхождения, обладающих разной устойчивостью к холоду.

### Материалы и методы

Коллекция растительного материала яблони содержала образцы с различной степенью устойчивости к холоду. Препараты ДНК выделялись из листьев яблони с помощью Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, EU) согласно протоколу производителя с модификациями.

Для проведения ПЦР-анализа использовали праймеры F: ATGGAATCCCAGGCTGCA-GA и R: CTAGGGATCCCAATGGACC. 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 25°C), 20 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 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 ПЦР разделяли методом элек-

трофореза в 2 % агарозном геле в TAE-буфере с добавлением этидиумбромида. Размеры амплифицированных фрагментов определяли, используя в качестве маркера GeneRuler™100 bp (1000 bp) Plus DNA ladder (Thermo Scientific, EU). Визуализацию результатов осуществляли с помощью трансиллюминатора GelDoc 2000 (BIO-RAD) и программного обеспечения Quantity One.

Для выделения ДНК из геля использовали набор GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, EU). Для трансформации использовали набор InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, EU). Трансформацию бактерий проводили в два этапа. Для выделения плазмидной ДНК использовали набор GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, EU). Для проведения амплификации для секвенирования встроенных фрагментов использовали Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit.

Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программного обеспечения Geneious 7 (триал-версия). Помимо последовательностей, полученных в ходе выполнения данной работы, были использованы некоторые последовательности (либо их фрагменты) из базы данных GenBank.

### Результаты и обсуждение

Анализ варибельности длины гена MDP0000151428 с помощью ПЦР среди расширенной выборки сортов яблони, включающие растения различного генетического происхождения, показал, что сорта яблони, обладающие низкой устойчивостью к холоду, как и зимостойкие сорта, не имели различий в длине нуклеотидных последовательностей. Ген достаточно консервативен и не содержит протяженных инсерций или делеций, которые можно выявить методом электрофореза продуктов амплификации в агарозном геле.

Для изучения варибельности первичной структуры гена MDP0000151428 были клонированы и секвенированы последовательности, выделенные из геномов различных видов и сортов яблони с высокой, низкой и средней морозоустойчивостью. Характеристики использованных растений представлены в таблице (№ 1–18). Для анализа варибельности исследуемого гена также были использованы две нуклеотидные последовательности из базы данных GenBank (№ 19 и 20 табл.)

Таблица. Растения, использованные для изучения вариабельности первичной структуры гена MDP0000151428

№	Название сорта или вида яблони	Морозоустойчивость
1	Антоновка обыкновенная	Высокая
2	Белый налив	Высокая
3	Важак	Средняя
4	Черное дерево	Низкая
5	Чулановка	Высокая
6	Штрейфлинг	Высокая
7	М 9 (клоновый подвой)	Низкая
8	М 26 (клоновый подвой)	Средняя
9	Freedom	Слабая
10	McIntosh	Средняя
11	Pinova	Слабая
12	<i>Malus ioensis</i>	Высокая
13	<i>Malus prunifolia</i>	Высокая
14	<i>Malus robusta</i>	Средняя
15	<i>Malus sargentii</i>	Низкая
16	<i>Malus seracifera</i>	Высокая
17	<i>Malus sieboldii</i>	Низкая
18	<i>Malus sylvestris</i>	Средняя
19 <sup>1</sup>	<i>Malus prunifolia</i>	Высокая
20 <sup>2</sup>	Golden Delicious	Низкая

Примечания: <sup>1</sup> последовательность гена MDP0000151428 была получена из базы данных GenBank, номер доступа – JQ669820; <sup>2</sup> последовательность гена MDP0000153866 была получена из базы данных GenBank, номер доступа XM\_008340868.2.

Сравнение нуклеотидных последовательностей генов MDP0000151428, выделенных из геномов яблони различного генетического происхождения, показало присутствие точечных мутаций. Большинство из них являлись однонуклеотидными заменами, однонуклеотидная делеция была обнаружена только в одном случае. Степень идентичности последовательностей колебалась от 97,5 % до 100 %. Полностью идентичными оказались гены, выделенные из двух сортов яблони домашней – Важак и Pinova, а также трех яблонь – Чулановка, Черное дерево и *Malus robusta*. Наибольшее количество различий было обнаружено у генов, выделенных из сортов яблони домашней Freedom и McIntosh. Анализ показал, что частота возникновения мутаций в различных сайтах гена MDP0000151428 различается. Наиболее подвержены мутациям нуклеотиды, находящиеся в 138, 341 и 472 позициях. В первом случае нуклеотидные замены

не влияют на аминокислотные последовательности белков, кодируемые исследуемыми генами: замены приходится на третью позицию кодона, во всех случаях кодирующего аланин, во втором и третьем случаях нуклеотидные замены являются несинонимичными – происходит замена валина на аланин и глицина на цистеин соответственно. Примечательно, что делеция, обнаруженная в гене, выделенном из *Malus ioensis*, находится в позиции 472.

В исследуемых последовательностях генов были обнаружены открытые рамки считывания. У 16 из 18 секвенированных последовательностей они были полноразмерными. Их длина составляла 606 п. н., они кодировали гипотетические белки длиной 201 а. к. В последовательностях этого белка с помощью Conserved Domain Database был выявлен AP2-домен, характерный для членов семейства транскрипционных факторов DREB (рис. 1).

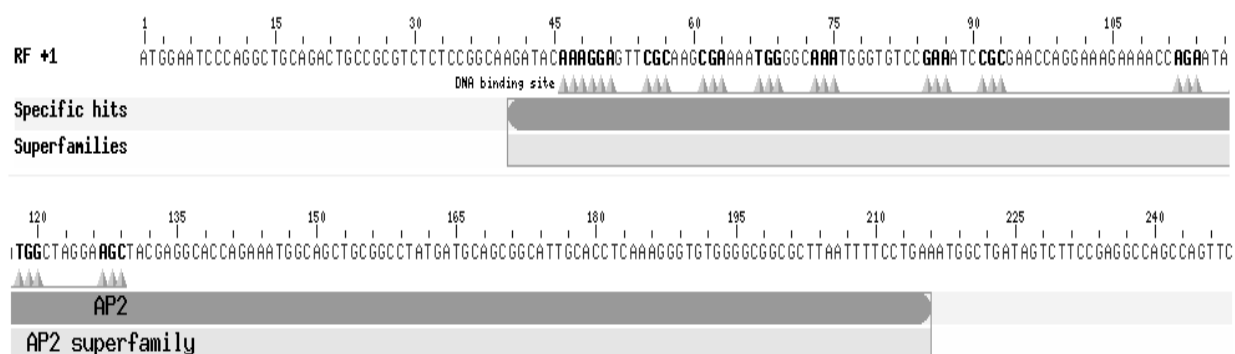


Рис. 1. Фрагмент гена MDP0000151428, содержащий AP2-домен (на примере нуклеотидной последовательности, выделенной из сорта яблони Антоновка обыкновенная).

У двух растений (яблони *Malus ioensis* и яблони домашней сорта McIntosh) в последовательностях изучаемого гена были обнаружены мутации, приводящие к возникновению стоп-кодонов. В первом случае причиной этого была однонуклеотидная делеция в позиции 472, во втором – однонуклеотидная замена в позиции 368. В результате кодируемые ими гипотетические белки оказались короче гомологов из других исследованных нами растений: 122 аминокислоты в случае сорта McIntosh и 164 – у *Malus ioensis*. Анализ показал, что регион, кодирующий AP2-домен, находящийся ближе к С-концу, присутствует и у этих укороченных вариантов, что не исключает того, что они не утратили способность связываться с ДНК. Вопрос о том, могут ли они функционировать в качестве транскрипционных факторов, остается открытым.

Сравнение аминокислотных последовательностей, кодируемых генами MDP0000151428, выделенными из разных сортов яблони, показало наличие отдельных аминокислотных замен. Чаще всего они встречаются в 114 и 158 позициях. В первом случае произошла замена аланина на валин, во втором – глицина на аланин (все эти аминокислоты являются неполярными). Примечательно, что в случае аланина в сайте 114 в 158 позиции находится глицин, а в случае валина – аланин.

Для секвенированных в этом исследовании генов MDP0000151428, выделенных из сортов и видов яблони различного генетического происхождения, было проведено установление филогенетических связей. Родственные связи между генами, кодирующими транскрипцион-

ные факторы, отвечающие за реакцию на стресс, выделенные из растений, приспособленных к произрастанию в различных климатических условиях, могут отражать особенности их адаптации к окружающей среде. На филогенетическом древе, представленном на рисунке 2, видно, что последовательности группируются в два кластера. В один из них входят гены, кодирующие транскрипционные факторы высокоустойчивых к холоду сортов яблони домашней Антоновка обыкновенная, Белый налив, двух экземпляров *Malus prunifolia*, а также *Malus ioensis*, обладающих средней устойчивостью сортов Ваяк и McIntosh, а также чувствительные к холоду *Malus sargentii* и яблоня домашняя сорта Pinova. Во второй кластер также входят растения с различной устойчивостью к холоду.

Из представленной дендрограммы видно, что количество нуклеотидных замен в рамках гена между сортами сопоставимо с таковым между видами. Однако, какова роль этих замен в ответе яблони на холодовой стресс, еще предстоит выяснить. Выяснение роли, которую играют различные аллели генов семейства DREB при различных видах стресса, является важной задачей. Ее решение поможет создавать сорта яблони с высоким уровнем устойчивости к стрессам, включая холодовой.

Таким образом, в геноме сортов и видов яблони представлены аллельные варианты гена MDP0000151428, относящегося к семейству DREB. Улучшение понимания того, как растения адаптируются к холоду и какие гены влияют на этот признак, поможет в разработке подходов для создания более зимостойких сортов.

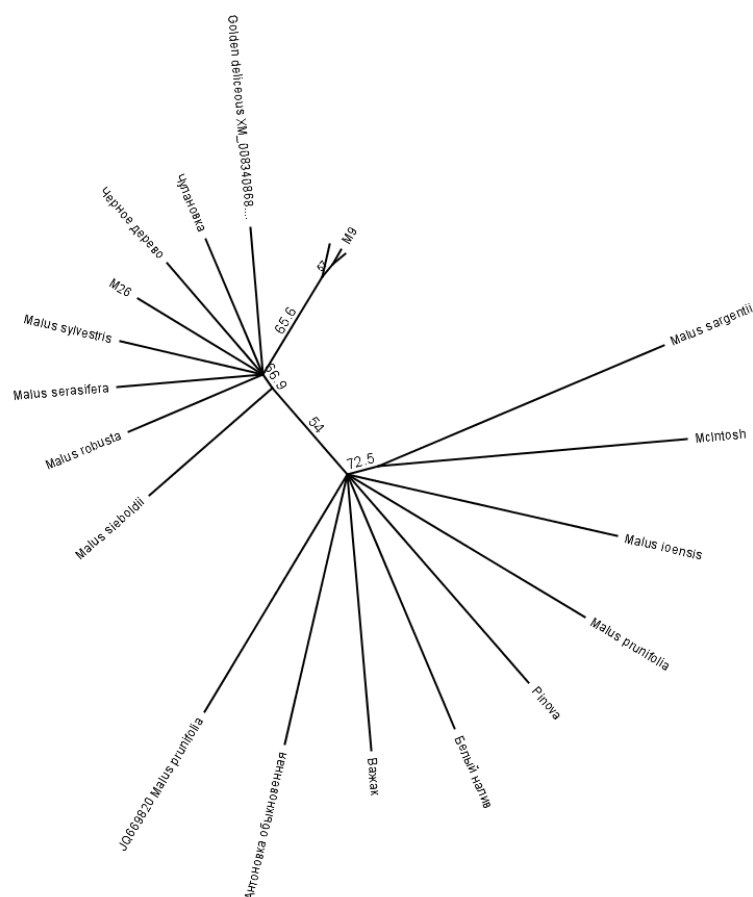


Рис. 2. Филогенетическое сходство генов MDP0000151428, выделенных из яблонь различного генетического происхождения. Цифры на ветвях дерева отражают консенсусную поддержку (%).

### Выводы

Оценка вариабельности первичной структуры гена MDP0000151428, кодирующего транскрипционный фактор семейства DREB у яблони, показала присутствие точечных мутаций. Большинство из них являлись однонуклеотидными заменами. Степень идентичности последовательностей колебалась от 97,5 % до 100 %. В исследуемых последовательностях генов обнаружены открытые рамки считывания,

длина которых составляла 606 п.н. Они кодируют гипотетические белки длиной 201 а. к. В последовательностях этого белка выявлен AP2-домен, характерный для членов семейства транскрипционных факторов DREB. Сравнение аминокислотных последовательностей, кодируемых генами MDP0000151428, выделенными из разных сортов яблони, показало наличие отдельных аминокислотных замен, которые чаще встречаются в 114 и 158 позициях.

### Литература

1. Beck E.H., Heim R., Hansen J. Plant resistance to cold stress: Mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. *Journal of Biosciences*. 2004. Vol. 29, № 4. P. 449–459.
2. Moose S.P., Sisco P.H. Glossy15, an APETALA2-like gene from maize that regulates leaf epidermal cell identity. *Genes Dev*. 1996. Vol. 10, № 23. P. 3018–3027.
3. Elliott R.C., Betzner A.S., Huttner E., Oakes M.P., Tucker W.Q., Gerentes D., Perez P., Smyth D.R. AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of Arabidopsis with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell*. 1996. Vol. 8, № 2. P. 155–168.
4. Jofuku K.D., den Boer B.G., Van Montagu M., Okamura J.K. Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *The Plant Cell*. 1994. Vol. 6, № 9. P. 1211–1225.
5. Finkelstein R.R., Wang M.L., Lynch T.J., Rao S., Goodman H.M. The Arabidopsis abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell*. 1998. Vol. 10, № 6. P. 1043–1054.
6. Fujimoto S.Y., Ohta M., Usui A., Shinshi H., Ohme-Takagi M. Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell*. 2000. Vol. 12, № 3. P. 393–404.

7. Ohme-Takagi M., Shinshi H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *The Plant Cell*. 1995. Vol. 7, № 2. P. 173–182.
8. Suzuki M., Kao C.Y., McCarty D.R. The conserved B3 domain of VIVIPAROUS1 has a cooperative DNA binding activity. *Plant Cell*. 1997. Vol. 9, № 5. P. 799–807.
9. Bobb A.J., Eiben H.G., Bustos M.M. PvAlf, an embryo-specific acidic transcriptional activator enhances gene expression from phaseolin and phytohemagglutinin promoters. *Plant J*. 1995. Vol. 8, № 3. P. 331–343.
10. Giraudat J., Hauge B.M., Valon C., Smalle J., Parcy F., Goodman H.M. Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell*. 1992. Vol. 4, № 10. P. 1251–1261.
11. Sakuma Y., Liu Q., Dubouzet J.G., Abe H., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002. Vol. 290, № 3. P. 998–1009.
12. Zhao T., Liang D., Wang P., Liu J., Ma F. Genome-wide analysis and expression profiling of the DREB transcription factor gene family in Malus under abiotic stress. *Mol. Gene. Genomics*. 2012. Vol. 287, № 5. P. 423–436.

**URBANOVICH O.Yu., KUZMITSKAYA P.V.**

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

**STUDYING THE POLYMORPHISM OF THE GENE MDP0000151428 AMONG THE VARIETIES AND SPECIES OF APPLES**

**Aim.** The aim of this work was to study the variability of the gene MDP0000151428, which belongs to the DREB family, among varieties of different genetic origin, which have different resistance to cold. **Methods.** Polymorphism was analyzed by PCR and sequencing. **Results.** Cloning and sequencing of the gene MDP0000151428 from 18 varieties and species of apple with different levels of resistance to cold have been carried out. An assessment of the variability of its primary structure showed the presence of point mutations. Most of them were single nucleotide substitutions, in one case a single nucleotide deletion was observed. The degree of sequence identity ranged from 97.5 % to 100 %. **Conclusions.** Evaluation of polymorphism of gene length MDP0000151428 showed that it is quite conservative and does not carry extended insertions or deletions in 20 varieties and species of apple trees with different levels of resistance to cold. The analysis showed that the frequency of occurrence of mutations in different sites of the gene MDP0000151428 differs. The nucleotides in 138, 341 and 472 positions are most susceptible to mutations. Comparison of hypothetical amino acid sequences showed the presence of separate substitutions. Most often they occur in 114 and 158 positions.

**Keywords:** apple tree, gene MDP0000151428, transcription factors, resistance to cold.

**УРБАНОВИЧ О.Ю., КУЗМІЦЬКА П.В.**

*ГНУ "Інститут генетики і цитології НАН Білорусі",  
Республіка Білорусь, 220072, м. Мінськ, вул. Академічна, 27, e-mail: O.Urbanovich@igc.bas-net.by*

**ВИВЧЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА MDP0000151428 СЕРЕД СОРТІВ І ВИДІВ ЯБЛУНІ**

**Мета.** Метою даної роботи було вивчення варіабельності гена MDP0000151428, що відноситься до DREB сімейства, серед сортів різного генетичного походження, що володіють різною стійкістю до холоду. **Методи.** Аналіз поліморфізму проводили за допомогою методів ПЛР і секвенування. **Результати.** Проведено клонування і секвенування гена MDP0000151428 з 18 сортів і видів яблуні з різним рівнем стійкості до холоду. Оцінка варіабельності його первинної структури показала присутність точкових мутацій. Більшість з них були однонуклеотидними замінами, в одному випадку виявлено однонуклеотидну делецію. Ступінь ідентичності послідовностей коливався від 97,5 % до 100 %. **Висновки.** Оцінка поліморфізму довжини гена MDP0000151428 показала, що він досить консервативний і не несе протяжних інсерцій або делецій у 20 сортів і видів яблуні з різним рівнем стійкості до холоду. Аналіз показав, що частота виникнення мутацій у різних сайтах гена MDP0000151428 відрізняється. Найбільш схильні до мутацій нуклеотиди, що знаходяться в 138, 341 і 472 позиціях. Порівняння гіпотетичних амінокислотних послідовностей показало наявність окремих заміні. Найчастіше вони зустрічаються в 114 і 158 позиціях.