

УДК 577.21: 633.16

ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНОВ β -АМИЛАЗЫ В КАЧЕСТВЕ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

О.Р. Стратула¹, В.В. Коцеруба², Р.Н. Календарь³

¹Селекционно-генетический институт Украинской аграрной академии наук, Овидиопольская дорога 3, 65036, Одесса, Украина

²Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН (БИН РАН), ул. Профессора Попова, д. 2, Санкт-Петербург, 197376, Россия

³Лаборатория геномики растений и биоинформатики, РГП «Национальный центр биотехнологии», ул. Ш. Валиханова, 13/1, Астана, 010000, Казахстан

olgastratula@rambler.ru
viola.kotseruba@gmail.com
ruslan.kalendar@helsinki.fi

АБСТРАКТ

Изучен новый молекулярный маркер – ядерный ген *BAMY*, кодирующий фермент β -амилазу, осуществляющую гидролиз α -(1,4)-гликозидной связи в мальтоолигосахаридах на примере однодольных и двудольных растительных видов. Нами были клонированы и секвенированы нуклеотидные последовательности генов *BAMY* для злаковых видов, а также соответствующие им аминокислотные последовательности β -амилаз. На основе полученных данных о последовательностях ДНК *BAMY*, а также аминокислотных последовательностей β -амилаз показаны филогенетические взаимоотношения между родами, семействами, порядком и классами растений. Филогенетический анализ полученных данных соответствует современным представлениям о систематике анализируемых видов. Изученный ген *BAMY* перспективен для дальнейшего исследования и использования в качестве маркера молекулярной идентификации при анализе близких и отдаленных видов растительного царства. Получены родо- и видоспецифичные EPCR-праймеры из экзонов, для амплификации фрагментов генов *BAMY* представителей семейства *Poaceae*, которые дают возможность применения их для анализа широкого таксономического диапазона. При помощи полученных праймеров проведен скрининг коллекции видов злаков и установлена их меж- и внутривидовая вариабельность. Данный подход позволяет предсказать принадлежность неизвестной геномной ДНК последовательности к известным видам, родам, семействам или классам растений.

Ключевые слова: β -амилаза, филогения, покрытосеменные, *Poaceae*, *Triticeae*.

THE β -AMYLASE GENES OF GRASSES AND A PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE GREEN PLANTS

O.R. Stratula¹, V.V. Kotseruba², R.N. Kalendar³

¹Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation, Department of Genomics and Biotechnology, Ovidiopolskaya Road 3, Odessa, 65036, Ukraine

²Komarov Botanical Institute, Russian Academy of Science, Professor Popova Street, 2, St. Peterburg, 197376, Russia

³Laboratory of Plant Genomics and Bioinformatics, RSE "National Center for Biotechnology", 13/1, Sh. Valikhanov str., Astana, 010000, Kazakhstan

olgastratula@rambler.ru
viola.kotseruba@gmail.com
ruslan.kalendar@helsinki.fi

ABSTRACT

A new molecular marker – nuclear gene *BAMY*, encoding β -amylase enzyme which carries out hydrolysis mainly 1,4- α -glucan maltohydase in amylose, amylopectin, glycogen, and other maltooligosaccharides for example monocotyledonous and dicotyledonous plant species has been studied. We cloned and sequenced the nucleotide sequences of the genes of *BAMY* for cereal species and obtained their corresponding amino acid sequences. Based on the data on DNA sequences *BAMY*, as well as the amino acid sequences of β -amylase

showing phylogenetic relationships between genera, families, orders and classes of plants. The result of phylogenetic analysis corresponds to the modern concept of the taxonomy of the analysed species. The studied gene BAMY promising for further exploration and use as a marker of molecular identification in the analysis of near and distant species of the plant kingdom. We obtained the genera and species-specific EPIC-exons primers sets to amplify BAMY gene fragments representatives of the family *Poaceae*, which enable them to use the taxonomic analysis of a wide range. The PCR primers sets allowed to use for screening a collection of species of grasses and established their inter- and intraspecific variability. This approach allows us to predict accessory an unknown genomic DNA sequences to known species, genera, families or classes of plants.

Keywords: β -amylase, phylogeny, angiosperms, *Poaceae*, *Triticeae*.

ВВЕДЕНИЕ

В свете растущего объема данных, предоставленных проектами геномного секвенирования и в связи с открытием регуляторных функций, которые приписывают интронам, изучение полиморфизма интронных участков становится важным аспектом в селекционных и генетических исследованиях основных видов сельскохозяйственных культур [1, 2]. По сравнению с экзонами, интроны более изменчивы, так как селективное давление в интронных регионах гораздо меньше, чем в экзонных, то есть скорость накопления мутаций в этих участках достаточно высока [3, 4, 5].

Интроны представляют собой наиболее варибельные участки генов, содержащих множество функциональных элементов, в том числе усилители и гасители транскрипции, регулирующие альтернативный сплайсинг, транс-сплайсинг элементы и другие регуляторные элементы, некоторые из них могут находиться в протяженных интронах [6, 7]. По данным многочисленных исследований, такие характеристики интронов, как варибельность длины, положение в гене, зависимость от длины экзонов и др., могут быть связаны и со свойствами генов (экспрессией, транскрипцией, сплайсингом, время жизни мРНК и т.д.), и с эволюцией организма в целом [8, 9]. В интронах растений в основном исследована их роль в экспрессии генов – в растениях несколько интронов могут влиять на экспрессию собственных генов за счёт увеличения количества транскриптов, также некоторые интроны отвечают за ткане- и стадияспецифичную экспрессию генов. Анализ интронных последовательностей успешно использовался в ряде видовых исследований [10, 11, 12, 13].

Для выявления полиморфизма, представляющих интерес исследуемых участков генов, а именно полиморфных интронных последовательностей, применяют ПЦР, при которой ПЦР-праймеры подбираются к высококонсервативным участкам экзонов. Этот подход применяется уже достаточно давно, например, использование консервативных участков рибосомальных генов 18S и 28S эукариот, или 16S и 23S у прокариот, для амплификации варибельного межгенного участка (ITS, internal transcribed spacer), включающий рибосомальный ген 5.8S [14]. Некоторые авторы предпочитают называть данный тип ПЦР как экзон-праймированная амплификация интронов (exon-primed intron-crossing – EPIC) [15]. Экзон-праймированная амплификация интронов имеет следующие преимущества.

Праймеры к консервативным последовательностям экзонов могут применяться в широком таксономическом диапазоне, гомологичные амплифицированные последовательности легко определяются путём сравнения их экзонных или интронных частей, в зависимости от генетического расстояния между таксонами, а также экзонные и интронные фрагменты могут помочь в одновременном изучении генетического разнообразия на внутри- и межвидовом уровне, при изучении комплекса видов [16, 17, 18, 19]. Достоинство этого подхода состоит в том, что нет необходимости в разработке индивидуальных маркеров, которая обычно включает в себя дорогостоящие клонирование и секвенирование геномной ДНК. Для проектирования праймеров при данном подходе

достаточно имеющихся в базах данных последовательностей изучаемых генов других таксонов.

Амилазы объединяют большую группу ферментов, которые осуществляют гидролиз преимущественно α -(1,4)-гликозидной связи в амилозе, амилопектине, гликогене и других мальтоолигосахаридах. К группе амилотических ферментов относятся в первую очередь α - и β -амилазы, а также некоторые другие ферменты, которые имеются у всех растительных и животных видов. Гены α - и β -амилазы – гомологические и кодируются у разных видов несколькими копиями. Ключевым амилотическим ферментом у зерновых является β -амилаза (1,4- α -D-глюканмальтогидролаза). При прорастании зерна, в процессе гидролиза крахмала, β -амилаза расщепляет α -1,4-гликозидные связи, в результате чего образуются высокомолекулярные декстрины и мальтоза – дисахарид, который легко диффундирует и может использоваться прорастающим зародышем, а также являющийся главным компонентом сусла [20]. В результате проращивания зерно превращается в солод, для получения которого могут применяться такие злаковые культуры как ячмень, рожь, тритикале, пшеница, овёс, просо [21]. Согласно литературным данным [22], только представители трибы *Triticeae* (к которой относятся пшеница, ячмень и рожь) имеют две различные формы β -амилазы, которые отличаются характером экспрессии гена: одна форма специфична только для эндосперма (эндоспермальная β -амилаза) – кодируется геном *ВAMУ1*, другая экспрессируется во всех тканях (общая β -амилаза) – кодируется гомологичным геном *ВAMУ2*. Данные гены являются паралогами и состоят из 7 экзонов и 6 интронов.

Настоящее исследование проводилось с целью изучения внутривидового полиморфизма генов β -амилаз у злаковых, а также применения в качестве филогенетического маркера для межвидовых исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал

Исследованные виды злаков представлены в таблице 1. Виды *Brachypodium*, *Zingeria*, *Colpodium* и *Milium* исследовались как модельные организмы в изучении генов *ВAMУ*. Такие виды трибы *Poaceae* как *Zingeria biebersteiniana* и *Colpodium versicolor* характерны самым малым хромосомным набором ($2n=4$) [23], получены из Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук (<http://www.binran.ru/>).

Таблица 1. Виды и образцы растений, использованных в работе

Table 1. Plants species and samples used in this work

Материал Plant Material	Источник The source	Виды/Сорта Species/Cultivars
Анализ внутривидового полиморфизма		
25 сорта ярого тритикале (x <i>Triticosecale</i> Witt.)	Генбанк Словакии	<i>Arc en Ciel, Fronteiro, Tentudia, Sierra de Almaraz, Sierra de Arroyo, Sierra de Lobos, Alter, Camarma, Cume, Curtido, Vrodi, Thisbi, Vrito, Legalo, Senatrit, Trimour, Dublet, Wanad, Gabo, Logo, Matejko, Nobi, Noe, Somtri, Sierra de Villuercas;</i>

37 сорта озимого тритикале		<i>Benetto, NE 422T, UCRTCL 1, Greneder, Plains, Terreland 22, Mungis, Leontino, Constant, Trizeps, Tribeca, Dusi, Alekto, Cosinus, Kandara, Largus, Magistral, Noe, Pletomax, Tatra, Massimo, Nutriseeds 1-18, Bienvenu, Trigold, Trismart, Trimmer, Wilfried, Pizarro, Aprim, Innoval, Amarillo 105, Blenio, Kinerit, UCRTCL3, Algos, UCRTCL2, Flavius;</i>
5 сорта ржи (<i>Secale cereale</i> L.)	MTT Agrifood Research, Finland	<i>Riichi, Akusti, Iissavaara, Loppi, Hirvessalmi;</i>
Анализ межвидового полиморфизма		
38 видов семейства <i>Poaceae</i>	Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН	<i>Hordeum vulgare</i> (Джау Кабутак), <i>H. vulgare</i> (Паллидум 107), <i>H. vulgare</i> (Одесский 17), <i>H. vulgare</i> (Одесский 31), <i>H. spontaneum</i> , <i>H. murinum</i> , <i>H. marinum</i> , <i>H. brachyantherum</i> , <i>H. leporinum</i> , <i>Triticum durum</i> (AABB), <i>Aegilops speltoides</i> , <i>Agropyron cristatum</i> , <i>Amblyopyrum muticum</i> , <i>Comopyrum comosum</i> , <i>Crithodium monococcum</i> , <i>Crithopsis delileana</i> , <i>Dasyphyrum villosum</i> , <i>Eremopyrum distans</i> , <i>Henrardia persica</i> , <i>Heteranthelium piliferum</i> , <i>Lophopyrum elongatum</i> , <i>Peridictyon sanctum</i> , <i>Pseudoroegneria spicata</i> , <i>Secale strictum</i> , <i>Taeniatherum caput-medusae</i> , <i>Thinopyrum bessarabicum</i> , <i>Psathyrostachys fragillis, fragilis</i> , <i>Psathyrostachys fragillis, villosus</i> , <i>Festucopsis serpentini</i> , <i>Elymus repens</i> , <i>Phleum pretense</i> , <i>Zingeria biebersteiniana</i> , <i>Z. trichopoda</i> , <i>Colpodium versicolor</i> , <i>Spartina alterniflora</i> , <i>Bromus sterilis</i> , <i>Avena sativa</i> , <i>Brachypodium distachyon</i> .
<i>Aegilops speltoides</i> syn. <i>Sitopsis speltoides</i> (Tausch) Á.Löve	The Institute of Evolution, Haifa	Семена отобраны случайным способом из полученных популяций
<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>Dicoccoides</i>		

<i>Milium sp.</i>	Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН	<p><i>Milium vernale</i> subsp. <i>vernale</i> $2n=2x=10$ ($x=5$); <i>Milium vernale</i> subsp. <i>alexeenkoi</i> $2n=2x=14$ ($x=7$); <i>Milium vernale</i> subsp. <i>scabrum</i> $2n=2x=8$ ($x=4$); <i>Milium vernale</i> subsp. <i>montianum</i> $2n=2x=22$ ($x=11$); <i>Milium vernale</i> subsp. <i>intermedium</i>; <i>Milium vernale</i> subsp. <i>tzvelevii</i> $2n=2x=18$ ($x=9$); <i>Milium pedicellare</i>; <i>Milium schmidtianum</i> (<i>M.caucasicum</i>?) $2n=6x=42$ ($x=7$); <i>Milium transcaucasicum</i>; <i>Milium effusum</i> $2n=4x=28$ ($x=7$); <i>Milium verticillatum</i> (<i>Zingeriopsis</i>);</p>
<i>Zingeria sp.</i>	Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН	<p><i>Zingeria biebersteiniana</i> $2n=2x=4$ ($x=2$); <i>Zingeria trichopoda</i> $2n=4x=8$ ($x=2$); <i>Zingeria kochii</i> $2n=6x=12$ ($x=2$); <i>Zingeria pisdica</i>;</p>
<i>Colpodium sp.</i>	Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН	<p><i>Colpodium versicolor</i> $2n=2x=4$ ($x=2$); <i>Colpodium balansae</i> (<i>Catabrosella variegata</i>) $2n=2x=10$ ($x=5$); <i>Colpodium vahlium</i> (<i>Puccinellia vahliana</i>) $2n=2x=14$ ($x=7$); <i>Colpodium latifolium</i> (<i>Arctagrostis arundinacea</i>) $2n=4x=28$ ($x=7$); <i>Colpodium hierochloides</i>; <i>Colpodium violaceum</i>; <i>Catabrosella araratca</i> $2n=6x=42$ ($x=7$); <i>Catabrosella chrysanthum</i>; <i>Catabrosella fibrosa</i> $2n=?x=18, 20$; <i>Catabrosella gillettii</i>; <i>Catabrosella humilis</i> subsp. <i>Calvertii</i>; (<i>Colpodium woronowii</i>) $2n=2x=10$ ($x=5$); <i>Catabrosella humilis</i> subsp. <i>humilis</i> $2n=2x=10$ ($x=5$); <i>Catabrosella humilis</i> subsp. <i>ornata</i>; <i>Catabrosella humilis</i> subsp. <i>Songorica</i>; <i>Catabrosa algida</i> (<i>Phippsia algida</i>) $2n=2x=20$; <i>Catabrosa aquatica</i> subsp. <i>aquatica</i> $2n=2x=20$ ($x=?$); <i>Catabrosa aquatica</i> subsp. <i>capusii</i> $2n=?x=20$ ($x=?$); <i>Catabrosa aquatica</i> subsp. <i>pseudairoides</i> $2n=?x=20$; <i>Paracolpodium leucolepis</i>; <i>Paracolpodium colchicum</i> (<i>Catabrosella caucasica</i>) $2n=4x=28$ ($x=7$); <i>Paracolpodium altaicum</i> subsp. <i>altaicum</i> $2n=6x=42$; ($x=7$) <i>Paracolpodium altaicum</i> subsp. <i>leucolepis</i>;</p>

Для злаковых характерен гаплоидный набор кратный 7, тогда как для семейства *Zingieria* он равен 2. Для семейств *Colpodium* и *Milium* гаплоидный набор хромосом кратен 2, 5, 7 и 9. На основании различий в числе гаплоидного набора хромосом в пределах семейства можно предсказать гибридную природу данного вида. Полиплоидия – характерная черта эволюции растений [24], особенно для семейства *Poaceae*.

Высокогорный злак *Colpodium versicolor* (Stev.) Schmalh. – уникальное растение по количеству хромосом, их у него всего 2 пары, в то время как у большинства злаков основное (базовое) число хромосом равно 7. На сегодняшний момент известно только 5 видов с $2n=4$, два из которых принадлежат к семейству Злаки – это *Colpodium versicolor* и *Zingieria biebersteiniana* (Claus) P.A. Smirn.

Конструирование ПЦР экзон-специфических праймеров для исследования генов, кодирующих β-амилазу злаков

Подбор ПЦР-праймеров для исследования генов эндоспермальной и общей β-амилаз злаков осуществляли на основе полных нуклеотидных последовательностей генов *BAMY1* (FJ161080) и *BAMY2* (DQ889983) ячменя, фрагментов генов и кДНК *BAMY1* и *BAMY2* ячменя, мягкой пшеницы, ржи, сорго и кукурузы, которые были получены из базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). В целом сравнили 45 нуклеотидных последовательностей соответствующих генов: AB048949, AB306504, AF012343, AF061203, AF061204, AF300799, AF300800, AF414081, AF414082, AF470353, AJ301645, AK365629, AK375028, AY111979, AY454398, AY835429, AY835430, D21349, D49999, D63574, DQ889983, EF175466, EF175467, EF175468, EF175469, EF175470, EF175471, EF175472, EF175473, EU589327, EU589328, FJ161078, FJ161079, FJ161080, FJ936153, FN179393, FN179394, GU017481, NM_001112026, NM_001188314, X52321, X56785, X98504, XM_003562919, Z11772.

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей β-амилаз проводилось с использованием программы Multain [25]. На основании этих данных с помощью программы FastPCR [26] сконструированы и синтезированы «универсальные» для генов β-амилаз EPIC-праймеры. Праймеры комплементарны наиболее консервативным белок-кодирующим районам генов *BAMY*, выявленным в процессе выравнивания – «прямые» праймеры – к экзону 1, «обратные» – к экзонам 4, 5 и 6 (таблица 2). ПЦР с использованием сконструированных праймеров обеспечивала появление соответствующих продуктов амплификации участков генов *BAMY1* и *BAMY2* исследуемых представителей семейства *Poaceae*.

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности генов *BAMY1,2*

Table 2. The nucleotide sequences of the genes *BAMY1,2*

Растительный вид Plant species	Участок гена, между экзонами (между 1 и 5-6) Location of the gene between exons (between 1 and 5-6)	Регистрационный номер генбанка «NCBI», под которыми были нами размещены последовательности генов (HE565890-HE56597) Accession «NCBI» genebank number under which we have placed the gene sequence (HE565890-HE56597)
<i>Aegilops peregrina</i>	1-6, <i>BAMY1</i> , <i>BAMY2</i>	HE565890, HE565891
<i>Elymus repens</i>	1-6, <i>BAMY1</i>	HE565893-HE565895
	1-5, <i>BAMY1</i>	HE565892
<i>Dasyphyrum villosum</i>	1-6, <i>BAMY1</i>	HE565896, HE565897
<i>Phleum pratense</i>	1-6, <i>BAMY2</i>	HE565898, HE565899
<i>Deschampsia antarctica</i>	1-6, <i>BAMY2</i>	HE565900

	1-5, BAMY2	HE565901
<i>Spartina alterniflora</i>	1-6, BAMY2	HE565902, HE565903
<i>Bromus sterilis</i>	1-6, BAMY1	HE565904, HE565905
<i>Catabrosa aquatica</i>	1-6, BAMY2	HE565906, HE565907, HE565937, HE565938
<i>Paracolpodium tzvelevii</i>	1-6, BAMY2	HE565908, HE565909
<i>Milium vernale</i>	1-6, BAMY2	HE565910
<i>Colpodium versicolor</i>	1-4, BAMY2	HE565946
	1-5, BAMY2	HE565947
	1-6, BAMY2	HE565911
<i>Catabrosella araratica</i>	1-6, BAMY2	HE565912, HE565948, HE565949
<i>Colpodium drakensbergense</i>	1-5, BAMY2	HE565913, HE565950
	1-6, BAMY2	HE565914-HE565916
<i>Zingieria biebersteiniana</i>	1-6, BAMY2	HE565917-HE565921
<i>Zingieria kochii</i>	1-6, BAMY2	HE565922, HE565924-HE565928, HE565951, HE565953-HE565955
	1-5, BAMY2	HE565923, HE565952
<i>Zingieria biebersteiniana subsp. trichopoda</i>	1-6, BAMY2	HE565929, HE565930-HE565933
<i>Zea mays</i>	1-5, BAMY2	HE565934
	1-6, BAMY2	HE565935, HE565936, HE565939
<i>Brachypodium distachyon</i>	1-6, BAMY2	HE565940, HE565941
<i>Milium effusum</i>	1-5, BAMY2	HE565942, HE565945
	1-6, BAMY2	HE565943, HE565944
<i>Triticum turgidum subsp. dicoccoides</i>	1-4, BAMY1, BAMY2	HE565956-HE565960, HE565969
	1-5, BAMY1, BAMY2	HE565961
<i>Aegilops speltoides</i>	1-4, BAMY1, BAMY2	HE565962-HE565971
<i>Oryza sativa</i>	BAMY2	L10345, L10346
<i>Zea mays</i>	AMY2	AF068119
<i>Sorghum bicolor</i>	BAMY2 (хромосома 2: 69,991,535-69,994,435)	D3JBK2_SORBI
<i>Hordeum vulgare</i>	BAMY1	FJ161080, EF175466, AJ301645, AB306504
<i>Hordeum vulgare</i>	BAMY2	FJ936156, FJ936157, DQ889983, FJ936156

После изучения эффективности амплификации с полученными праймерами была отобрана наиболее продуктивная пара – 3162 и 3816:

3162 (5'-ТССААГТСТАСГТСАТГСТСС-3', локализация праймера – 1389→1409 в экзоне 1 гена *BAMY1* и 54→74 в экзоне 1 гена *BAMY2*) и 3816 (5'-GCTGCTGCTGCTTTGAAGTCTGCT-3', локализация праймера – 3660←3683 в экзоне 4 гена *BAMY1* и 1386→1409 в экзоне 4 гена *BAMY2*). Характеристика олигонуклеотидных праймеров, использованных в работе, показана в таблице 3.

Праймеры (качество HPSF – High Purity Salt Free Purification) синтезированы в Eurofins MWG Operon (Германия).

Таблица 3. Характеристика олигонуклеотидных праймеров, использованных в работе
Table 3. Characterization of oligonucleotide primers used in this work

ID	Последовательность (5'-3') Sequence (5'-3')	Тм (°C)	Положение праймера Primer location	
			ВAMY1 (FJ161080) ¹	ВAMY2 (DQ889983) ²
3162	tccaagtctacgtcatgctcc	56.4	1389->1409	54->74
3814	cagctggagagatgaggtaccc	58.9	2485->2506	881->902
3806	atcctcagagccacggatgg	59.0	2512->2531	908->927
3812	ttcccaggcatcggagaattca	58.3	2535->2556	931->952
3808	tcggagaattcatcgtgagtg	54.5	2545->2565	941->961
2782	actcacgatgaattctccgatg	54.6	2543<-2564	939<-960
3815	tccaggtaacttatcatagcactgca	57.0	3635<-3659	1361<-1385
3816	gctgctgctgctttgaagtctgct	62.3	3660<-3683	1386<-1409
3165	tggaaccttgaccaccagtg	57.1	4125<-4145	1850<-1870
3164	cagccggaggtaggtgaatcc	59.8	4646<-4666	2293<-2313
¹ экзоны: 1361..1411,1627..2025,2394..2558,3640..3903,4113..4322,4499..4738,4852..5130				
² экзоны: 26..76,240..638,790..954,1366..1629,1838..2047,2146..2385,2471..2659				

Выделение ДНК

ДНК выделяли из пятидневных этиолированных проростков с помощью СТАВ буфера: 2М NaCl, 20 mM Na₃ЭДТА, 100 mM HEPES pH 5,6 при 25°C, 2% СТАВ по протоколу (<http://primerdigital.com/dna.html>).

Экзон-праймированная амплификация интронов

Для амплификации коротких (до 3 тыс. п.н.) фрагментов генов использовали стандартный протокол для Taq полимеразы.

Реакцию проводили в 25 µl реакционной смеси, содержащей 25 нг ДНК, 1x DreamTaq буфер с MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.3 µM каждого праймера и 1 ед. DreamTaq (Thermo Scientific).

Амплификацию осуществляли на MasterCycler Gradient (Eppendorf AG): начальная денатурация 95°C – 3 мин.; последующие 32 цикла: 95°C – 15 сек., 65°C – 60 сек. и 72°C – 2 мин; последняя элонгация при 72°C – 5 мин.

ПЦР для длинных фрагментов

ПЦР для длинных (более 3 тыс. п.н.) фрагментов ДНК проводили с помощью Phire® Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific).

Реакцию проводили в 25 µl реакционной смеси, содержащей 25 нг ДНК, 1x Phire® буфер с MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.3 µM каждого праймера и 0.2 µl Phire® Hot Start II DNA Polymerase.

Программа амплификации для MasterCycler Gradient: начальная денатурации 98°C – 30 сек. и последующие 30 циклов амплификации проводились при высокой температуре отжига – двухступенчатый ПЦР: 98°C – 10 сек, денатурация, и 65-72°C – 2 мин. отжиг праймера и синтез одновременно; последнюю элонгацию проводили при 72°C дополнительно 5 минут.

Электрофорез

Амплифицированные продукты анализировали путем электрофореза в 1,3%-ном агарозном геле (RESolute Wide Range, BIOzym) размером: 20x20 см, при 70 V, в течение 5 часов и визуализировали бромидом этидия. Гели были отсканированы на сканере FujiFilm FLA-5100. Для определения длин фрагментов ДНК использовали маркер молекулярного веса GeneRules DNA ladder mix (SM1173), от 100-10.000 оснований (Thermo Scientific).

Клонирование фрагментов генов *VAMY* с помощью TOPO TA Cloning®

Очищенные ПЦР фрагменты с помощью набора QIAquick лигировали с pCR® 2.1-TOPO® (Invitrogen Life Technologies) плазмидным вектором.

Трансформация компетентных клеток One Shot® DH5α™ -T1 R

Трансформация плазмидной ДНК проведена в клетки *E. coli* штамма One Shot® DH5α™ -T1 R (Invitrogen Life Technologies). Клетки, несущие плазмиду со вставкой фрагмента чужеродной ДНК, выявляли путем бело-синей селекции на среде с ампициллином, X-Gal и IPTG.

Секвенирование

Секвенирование последовательностей фрагментов генов *VAMY* (с экзона 1 до экзона 4-5-6) проведено с использованием капиллярного секвенатора ABI3700 (Applied Biosystems Thermo Fisher Scientific), методом Сэнгера (BigDye® Terminator chemistry).

Образцы подготовили для 96-луночной платы. Первое секвенирование проводилось с помощью стандартных M13 праймеров: прямым и обратным. Так как фрагменты анализируемого гена намного длиннее возможности полного «прочтения» сразу с обеих сторон, последующие этапы секвенирования проводили с помощью праймеров из секвенирующих фрагментов. Было проведено 5 этапов секвенирования, чтобы получить полную длину всех фрагментов генов.

Нуклеотидные последовательности генов β-амилаз для исследуемых видов растений были размещены в базе данных NCBI под номерами: HE565890-HE56597.

Филогенетический анализ последовательностей генов β-амилаз

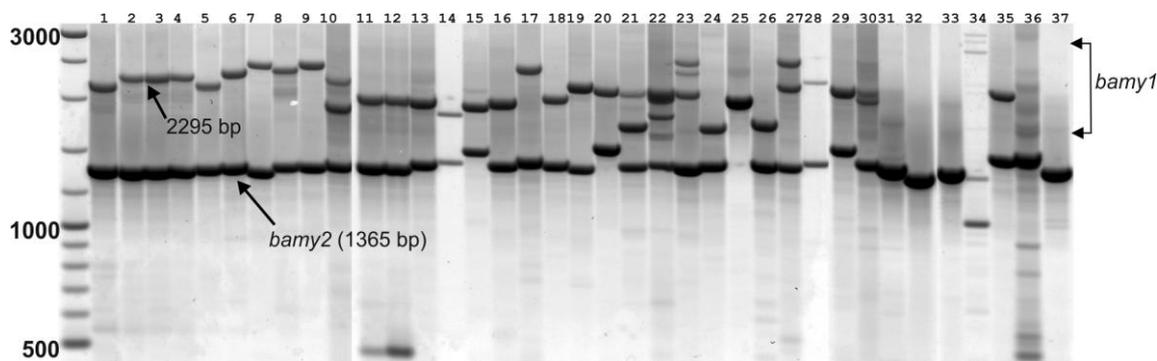
Для нуклеотидных и аминокислотных последовательностей β-амилаз проведено множественное выравнивание с помощью программы Multalin [25] и Muscle (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>).

Кластерный анализ аминокислотных последовательностей проведен с помощью метода ME (Minimum Evolution, Close-Neighbor-Interchange), а нуклеотидных последовательностей – с помощью метода UPGMA в программе MEGA [27]. Значения бутстреп получены в результате анализа 1000 повторности.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Молекулярный анализ генов β-амилазы представителей трибы *Triticeae*

Нами был проведен анализ нуклеотидных последовательностей генов β-амилаз для выявления причин полиморфизма в исследуемых образцах видов злаков (рисунок 1). Полиморфизм ДНК, обнаруженный при использовании направленных праймеров 3162 и 3816, связан с различиями в интронах генов β-амилазы, которые имеют высококонсервативные последовательности в области экзона и полиморфны в области интрона. Эти данные подтвердились после определения нуклеотидных последовательностей генов *VAMY1* и *VAMY2* *Triticum dicoccoides* и *Aegilops speltoides* (HE565956-HE565971) и сравнения их с уже имеющимися в базах данных последовательностями генов β-амилаз.



1 – *Hordeum vulgare* (Джау Кабутак); 2 – *H. vulgare* (Паллидум 107); 3 – *H. vulgare* (Одесский 17); 4 – *H. vulgare* (Одесский 31); 5 – *H. spontaneum*; 6 – *H. murinum*; 7 – *H. murinum*; 8 – *H. brachyantherum*; 9 – *H. leporinum*; 10 – *Triticum durum* (AABB); 11 – *Aegilops speltoides*; 12 – *Agropyron cristatum*; 13 – *Amblyopyrum muticum*; 14 – *Comopyrum comosum*; 15 – *Crithodium monococcum*; 16 – *Crithopsis delileana*; 17 – *Dasypyrum villosum*; 18 – *Eremopyrum distans*; 19 – *Henrardia persica*; 20 – *Heterantherium piliferum*; 21 – *Lophopyrum elongatum*; 22 – *Peridictyon sanctum*; 23 – *Pseudoroegneria spicata*; 24 – *Secale strictum*; 25 – *Taeniatherum caput-medusae*; 26 – *Thinopyrum bessarabicum*; 27 – *Psathyrostachys fragillis; fragillis*; 28 – *Psathyrostachys fragillis, villosus*; 29 – *Festucopsis serpentinii*; 30 – *Elymus repens*; 31 – *Phleum pretense*; 32 – *Zingieria biebersteiniana*; 33 – *Colpodium versicolor*; 34 – *Spartina alterniflora*; 35 – *Bromus sterilis*; 36 – *Avena sativa*; 37 – *Brachypodium distachyon*.

Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации генов *BAMY1* и *BAMY2* у видов семейства *Poaceae*

1 – *Hordeum vulgare* (Dжау Кабутак); 2 – *H. vulgare* (Pаллидум 107); 3 – *H. vulgare* (Oдесский17); 4 – *H. vulgare* (Oдесский31); 5 – *H. spontaneum*; 6 – *H. murinum*; 7 – *H. murinum*; 8 – *H. brachyantherum*; 9 – *H. leporinum*; 10 – *Triticum durum* (AABB); 11 – *Aegilops speltoides*; 12 – *Agropyron cristatum*; 13 – *Amblyopyrum muticum*; 14 – *Comopyrum comosum*; 15 – *Crithodium monococcum*; 16 – *Crithopsis delileana*; 17 – *Dasypyrum villosum*; 18 – *Eremopyrum distans*; 19 – *Henrardia persica*; 20 – *Heterantherium piliferum*; 21 – *Lophopyrum elongatum*; 22 – *Peridictyon sanctum*; 23 – *Pseudoroegneria spicata*; 24 – *Secale strictum*; 25 – *Taeniatherum caput-medusae*; 26 – *Thinopyrum bessarabicum*; 27 – *Psathyrostachys fragillis; fragillis*; 28 – *Psathyrostachys fragillis, villosus*; 29 – *Festucopsis serpentinii*; 30 – *Elymus repens*; 31 – *Phleum pretense*; 32 – *Zingieria biebersteiniana*; 33 – *Colpodium versicolor*; 34 – *Spartina alterniflora*; 35 – *Bromus sterilis*; 36 – *Avena sativa*; 37 – *Brachypodium distachyon*.

Fig. 1. Electropherogram of the amplification products of gene *BAMY1* *BAMY2* within the species of the family *Poaceae*

Молекулярно-генетический анализ генов *BAMY1* и *BAMY2* позволяет выявить внутривидовое генетическое разнообразие у изучаемых видов. И тем самым способствует отбору генотипов таким образом, чтобы добиваться нужной активности β -амилаз злаков в каждом конкретном случае. Исследования генов *BAMY1* и *BAMY2* у диких и близкородственных видов злаков способствуют всестороннему изучению генетического разнообразия, как в пределах конкретного вида, так и в дальнейшем для направленного трансгенеза или отдаленной гибридизации для интрогрессии в культурные злаки генов, обеспечивающих высокий уровень активности фермента в зерне злаков.

Исследование межвидового полиморфизма генов *BAMY1* и *BAMY2* представителей семейства *Poaceae*

Для изучения межвидовой дифференциации были проанализированы образцы видов злаков, представленных в таблице 1. Детекция молекулярно-генетического полиморфизма генов β -амилазы у представителей семейства *Poaceae* проводилась при помощи разработанных ЕРС-праймеров 3162 и 3816, позволяющих исследовать фрагменты сразу двух генов – *BAMY1* и *BAMY2*. Следует отметить, что выбранные для отжига праймеров участки экзонов, по результатам выравнивания, проявляют высокую степень консервативности не только для злаков, но и для представленных в базе данных более отдаленных видов растений, что демонстрирует универсальность данной методики.

А именно: последовательности экзона 1 и 4 использовали для выявления полиморфизма в интронных участках. Размер последовательности генов β -амилазы для ячменя (как модельного организма) в анализируемой области составляет для гена *VAMY1* – 2294 п.н., и для гена *VAMY2* – 1355 п.н., соответственно.

Исследования генов *VAMY1* и *VAMY2* для исследуемой выборки злаков показали, что их характеристики у разных видов имеют как свои особенности, так и общие для всех закономерности.

При исследовании межвидового полиморфизма генов *VAMY1* и *VAMY2* с применением EPIC-ПЦР у 38 представителей семейства *Poaceae* был показан достаточно широкий диапазон генетического разнообразия по изучаемым генам (рисунок 1).

Расчетные размеры ПЦР-фрагментов, полученных с помощью FastPCR, для гена *VAMY1* – 2295 или 2169 п.н. и для *VAMY2* – 1365 п.н. Такие продукты амплификации обнаружены у образцов, содержащих ДНК *Hordeum vulgare* (рисунок 1, образцы 1-4) – варьирование длины фрагмента у *H. vulgare* обусловлено вставкой MITE (Stowaway транспозон) в 126 п.н. в области интрона 3 [28], *H. spontaneum*, *H. murinum* и *T. durum*. Другие образцы имели отличные от данных размеры амплифицированного участка – размеры их последовательностей лежат в пределах от 1700 до 2500 п.н. для гена *VAMY1*, и от 1300 до 1500 п.н. для гена *VAMY2* (рисунок 1). В целом, при использовании данных EPIC-праймеров в локусах генов *VAMY1* и *VAMY2* был выявлен ряд аллельных вариантов: 10 различных аллелей для *VAMY1* (от одного до трех ампликонов на образец) и 4 аллеля *VAMY2* (по одному ампликону на образец).

На рисунке 1, образцы с 1 по 30, представлены результаты ПЦР-анализа ДНК сортов и видов, принадлежащих к трибе *Triticeae* (таблица 1). Электрофорез ПЦР-продуктов для этих видов представлен двумя полосами: нижняя полоса соответствует амплификации гена *VAMY2* и верхняя – гену *VAMY1*, соответственно. Вид *Bromus sterilis* (образец 35), принадлежащий к трибе *Bromeae*, который содержит оба гена как виды из трибы *Triticeae*. Нами были получена нуклеотидная последовательность гена *VAMY1* *Bromus sterilis* (HE565904, HE565905). В связи с этим можно отметить, что присутствие гена эндоспермальной β -амилазы не является преимуществом представителей трибы *Triticeae*.

Для видов, принадлежащих к трибе *Aveneae*, *Poeae* и *Brachypodieae*: *Phleum pratense*, *Zingieria biebersteiniana*, *Zingieria trichopoda*, *Colpodium versicolor*, *Spartina alterniflora*, *Avena sativa*, *Brachypodium distachyon* (образцы с 31 по 37, кроме 35: *Bromus sterilis*) содержат только единственный ген – общая β -амилаза *VAMY2*.

Не прибегая к использованию других праймеров или методов, специфичность полученных спектров дает возможность делать предварительные заключения о характере родства. Фингерпринты на основе EPIC-ПЦР метода выявляют как меж- так и внутривидовые различия проанализированных образцов (образцы 1-9 *Hordeum*, рисунок 1). EPIC-праймеры, специфичные к участкам экзон 1 – экзон 4 генов β -амилазы злаков, оказались пригодными для того, чтобы охарактеризовать генетическое разнообразие семейства *Poaceae*, что в свою очередь позволило рассматривать их как новое средство для идентификации злаков.

Полиморфизм генов β -амилазы у представителей трибы *Triticeae*

Исследование внутривидового полиморфизма генов β -амилазы проводили для сортов ржи и тритикале, а также у линий *Triticum dicoccoides* и разновидностей *Aegilops speltoides*. Интерес к изучению генов *VAMY1* и *VAMY2* этих злаков обусловлен тем, что данные виды считаются донорами геномов культурной пшеницы. Дикая пшеница эммер или полба (*Triticum dicoccoides*) является тетраплоидным предком культурной гексаплоидной мягкой пшеницы *Triticum aestivum* ($2n=6x=42$, AABBDD) [29]. Разновидности *Aegilops speltoides* ($2n=2x=14$ геном BB или SS) являются носителями ряда ценных признаков, которые используются при искусственной гибридизации с культурными сортами пшеницы [30].

Тритикале получен путем объединения хромосомных комплексов двух разных ботанических родов – пшеницы (*Triticum ssp.*, AA, AABB, AABBDD) и ржи (*Secale cereale*, RR) – данная культура объединяет в себе ценные свойства этих родов [31, 32].

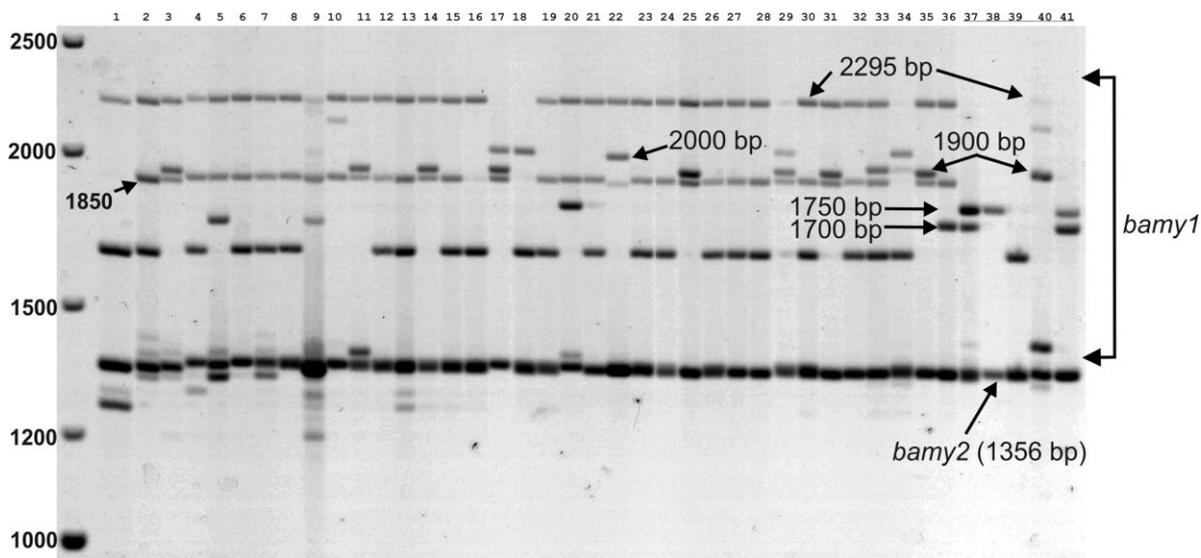
При сопоставлении полученных результатов выявились три фрагмента амплифицированной ДНК, общие для всех четырех исследованных видов – с размером 2295 п.н. (продукт ожидаемого размера для гена *BAMY1*), приблизительно 1900 п.н. (входит в спектр аллелей гена *BAMY1*) и 1365 п.н. (ассоциирован с геном общей β -амилазы *BAMY2*) (рисунок 2). ПЦР-продукты с размерами 2295 и 1365 п.н. присутствовали в спектре аллелей *Hordeum* (образцы 1-6) и *Triticum durum* (10) (рисунок 1).

Анализ полиморфизма *BAMY1* у тритикала и ржи показал, что их уровень общего полиморфизма выше, чем у сортов ячменя (рисунок 2), у которого было выявлено только два аллеля гена *BAMY1*. Сравнение частот генотипов тритикале и ржи показало, что большая часть спектра аллелей тритикале совпадала с таковыми у ржи (в том числе фрагменты размером 2295 и 1356 п.н.). Кроме того, в составе аллельных спектров озимого и ярового тритикале присутствовали ПЦР-фрагменты с размером приблизительно 2000 п.н. (на рисунке 2 – образцы №9, 17, 18, 22, 30, 35). Данные фрагменты отсутствуют у ржи и, возможно, получены пшенично-ржаным гибридом от пшеницы. Выявленный у образцов тритикале ампликон длиной в 1850 п.н., возможно, является видоспецифичным.

Для образцов озимого тритикале детектируется до 8 полиморфных ПЦР-продуктов (от 2 до 4 фрагментов ДНК в исследуемом образце) для генов *BAMY1* и 3 варианта (от одного до двух ампликонов) для гена *BAMY2*.

У образцов ярового тритикале выявлено 6 полиморфных ПЦР-продуктов (от 2 до 3 фрагментов) для гена *BAMY1* и 2 варианта (единственный фрагмент) для гена *BAMY2*. Универсальный среди сортов тритикале детектируется фрагмент в 1356 п.н. гена *BAMY2*.

Разнообразие вариантов гена *BAMY1* с размером фрагмента 2295 п.н. зависит от типа развития тритикале – у озимых сортов данный фрагмент встречается в 86% случаев, а у яровых он выявлен у 48% образцов. Фрагмент в 2000 п.н. наиболее распространен среди сортов ярового тритикале – 52%, чем среди озимого – 13%. Фрагмент в 1900 п.н. присутствует у 56% сортов из исследуемой выборки ярового тритикале и у 27% озимого (рисунки 2 и 3). ПЦР-продукты с приблизительными размерами 1700 п.н. (сорта *Plains* и *Constant*) и 1800 п.н. (сорт *Tatra*) выявлены только у озимого тритикала (рисунок 2).



1-37 – сорта озимого тритикале: 1 – *Benetto*; 2 – *NE 422T*; 3 – *UCRTCL1*; 4 – *Greneder*; 5 – *Plains*; 6 – *Terreland 22*; 7 – *Mungis*; 8 – *Leontino*; 9 – *Constant*; 10 – *Trizeps*; 11 – *Tribeca*; 12 – *Dusi*; 13 – *Alekto*; 14 – *Cosinus*; 15 – *Kandar*; 16 – *Largus*; 17 – *Magistral*; 18 – *Noe*; 19 – *Pletomax*; 20 – *Tatra*; 21 – *Massimo*; 22 – *Nutriseeds 1-18*; 23 – *Bienvenu*; 24 – *Trigold*; 25 – *Trismart*; 26 – *Trimmer*; 27 – *Wilfried*; 28 – *Pizarro*; 29 – *Aprim*; 30 – *Innoval*; 31 – *Amarillo 105*; 32 – *Blenio*; 33 – *Kinerit*; 34 – *UCRTCL3*; 35 – *Algozo*; 36 – *UCRTCL2*; 37 – *Flavius*; 38-42 – сорта ржи: 38 – *Riihi*; 39 – *Akusti*; 40 – *Issavaara*; 41 – *Loppi*; 42 – *Hirvessalmi*.

Рис. 2. Молекулярно-генетический полиморфизм генов *BAMY1* и *BAMY2* в сортах озимого тритикале и ржи

1-37 – varieties of winter triticale: 1 – *Benetto*; 2 – *NE 422T*; 3 – *UCRTCL1*; 4 – *Greneder*; 5 – *Plains*; 6 – *Terreland 22*; 7 – *Mungis*; 8 – *Leontino*; 9 – *Constant*; 10 – *Trizeps*; 11 – *Tribeca*; 12 – *Dusi*; 13 – *Alekto*; 14 – *Cosinus*; 15 – *Kandar*; 16 – *Largus*; 17 – *Magistral*; 18 – *Noe*; 19 – *Pletomax*; 20 – *Tatra*; 21 – *Massimo*; 22 – *Nutriseeds 1-18*; 23 – *Bienvenu*; 24 – *Trigold*; 25 – *Trismart*; 26 – *Trimmer*; 27 – *Wilfried*; 28 – *Pizarro*; 29 – *Aprim*; 30 – *Innoval*; 31 – *Amarillo 105*; 32 – *Blenio*; 33 – *Kinerit*; 34 – *UCRTCL3*; 35 – *Algozo*; 36 – *UCRTCL2*; 37 – *Flavius*; 38-42 – varieties of rye: 38 – *Riihi*; 39 – *Akusti*; 40 – *Issavaara*; 41 – *Loppi*; 42 – *Hirvessalmi*.

Fig. 2. Molecular genetic polymorphisms of genes and *BAMY1*, *BAMY2* in varieties of winter triticale and rye

При анализе общего полиморфизма пяти исследованных по локусам *BAMY1* и *BAMY2* сортов ржи суммарно выявлено 6 полиморфных ПЦР-продуктов амплификации гена *BAMY1* (от 1 до 3 продуктов амплификации на сортах) и 2 (от 1 до 2) для гена *BAMY2*.

Изучение полиморфизма генов β -амилазы пшеницы двузернянки показало, что линии *T. dicoccoides* гетерогенны по локусу *BAMY1*. В совокупности были выявлены следующие фрагменты ДНК: длиной около 1900 п. н. – характерен для всех исследованных образцов *T. dicoccoides*; длиной приблизительно 2000 п.н. – встречался в 77% случаев (выявлен также у тритикала) и 2295 п.н. фрагмент – 15% образцов из исследуемой выборки несли данный продукт амплификации.

Среди продуктов амплификации, полученных для генов *BAMY1* и *BAMY2* форм *Aegilops speltoides*, выявили 3 и 2 ампликона, соответственно. Помимо двух фрагментов ДНК с размерами 2295 и 1900 п.н., имеющих также у *Triticum turgidum*, тритикале, ржи и ячменя, у эгилопса обнаружен фрагмент длиной приблизительно 2600 п.н., который не наблюдался у перечисленных выше видов. Данный фрагмент встречается у 60% исследованных образцов *Aegilops speltoides*. При сопоставлении молекулярных профилей линий *T. dicoccoides* с образцами разновидностей *Aegilops speltoides* выяснилось, что у этих видов есть общие нуклеотидные последовательности – с размерами 2295 и 1900 п.н.

Филогенетический анализ генов β -амилаз

Филогенетический анализ значительно «выигрывает» при использовании одно- или малокопийных «универсальных» ядерных генов в дополнение к известным стандартным генам. Настоящее исследование проводилось с целью изучения генов β -амилаз для филогенетических реконструкций в растительном царстве.

Гены β -амилазы не были тщательно изучены в качестве филогенетического маркера, хотя в нескольких работах исследовались гены β -амилазы последовательности у злаковых [3].

Исследованные нами гены β -амилаз состоят из 7 экзонов. У различных видов могут быть в наличии несколько (две и более) изоформ β -амилазы. Например, у видов пшеничной трибы (пшеница, ячмень, рожь) один фермент накапливается в эндосперме и кодируется геном *BAMY1*, а второй присутствует во всех тканях и кодируется гомологичным геном *BAMY2* – данные гены являются паралогами. Ген *BAMY2* присутствует у всех остальных «не пшеничных» видов. Различия в ДНК-последовательностях обоих β -амилазных генов находятся в интронных участках и промоторе. Последовательности экзонов практически идентичны. Для изучения генов β -амилаз видов из одного порядка (например, злаковые) была использована последовательность экзонов и интронов или последовательности только экзонов, а также аминокислотные последовательности. Для отдаленных видов из разных

классов были использованы последовательности экзонов и аминокислотная последовательность (рисунок 3).

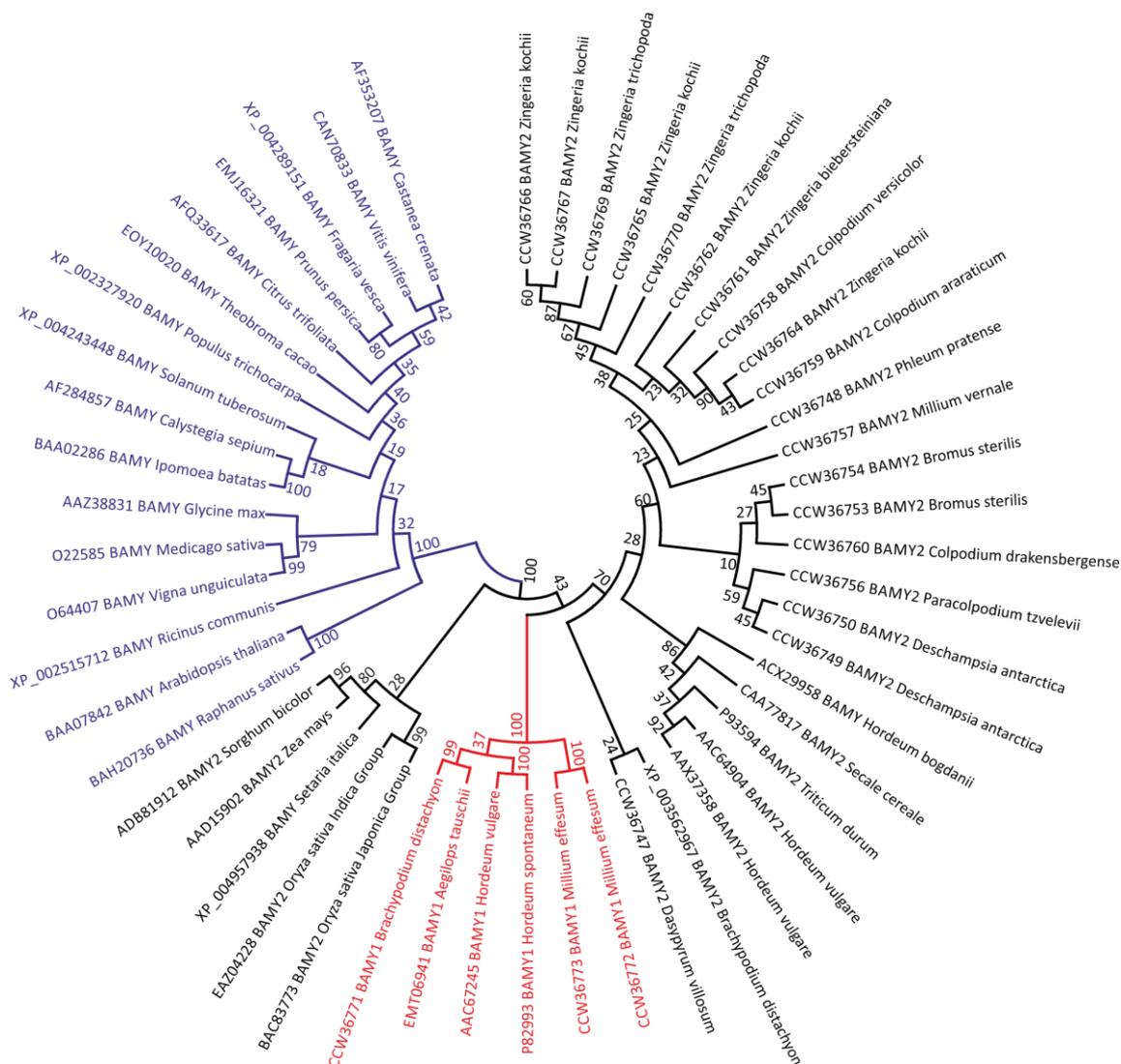


Рис. 3. Дендрограмма филогенетических взаимоотношений для некоторых однодольных и двудольных видов на основе аминокислотных последовательностей β -амилаз, построенная с использованием метода минимума эволюции

Fig. 3. A phylogenetic tree for some monocotyledonous and dicotyledonous species, based on the amino acid sequence of β -amylase genes, constructed using the method of minimum evolution

На основе полученных данных выведена реконструкция филогении генов β -амилаз (рисунок 3), осуществленная при помощи анализа аминокислотных последовательностей. Аналогичный результат был получен и для нуклеотидной последовательности генов β -амилаз. Родственные отношения между классами однодольных и двудольных соответствуют эволюционным связям между исследуемыми видами. Следует подчеркнуть, что кластер для гена *BAMY1*, который кодирует эндоспермальную форму для пшеничных видов, отделяется от остальных видов злаков, содержащих только ген *BAMY2*.

Дендрограмма, построенная на основе аминокислотных последовательностей β -амилаз различных видов растений, разделена на два кластера – один составили β -амилазы двудольных видов (выделены черным цветом), и отдельной группой в этом кластере – β -амилазы бобовых (зеленый цвет); второй – β -амилазы злаков, которые образовали отдельный

кластер, четко разделен на две обособленные группы – β -амилаз1 (синий) и β -амилаз2 (красный).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Злаки (*Poaceae*) – очень большое семейство, занимающее во флоре четвертое место после сложноцветных, орхидных и бобовых. Семейство насчитывает, по данным разных авторов, от 650 до 900 родов и от 10 до 11 тыс. видов [33] и играет особую роль как в природе, в составе растительных группировок на планете, так и в жизни человека. Злаки распространены повсеместно и уже одно это делает семейство весьма разнообразным.

Происхождение семейства, вероятно, следует относить к началу или середине юры, и эволюция их до начала мела протекала в высокогорьях [34]. Проблемы формирования и эволюции геномов, редукции и увеличения хромосомных наборов злаков – предмет интенсивных исследований и дискуссий. При разных основных числах в геноме разных видов злаков порядок расположения генов в группах сцепления оказался удивительно консервативным. Результаты сравнительного картирования геномов пшеницы ($2n=14, 28, 42, x=7$), риса ($2n=24, x=6$), кукурузы ($2n=20, x=5$), сорго ($2n=20, x=5$), сахарного тростника ($2n=60, 80, 90, x=5$) и других видов злаков показали значительную консервативность набора генов и групп их сцепления в хромосомах в течение более 60 млн. лет эволюции в семействе *Poaceae* [35].

Выбранные нами для исследования роды *Zingeria* P. A. Smirn. и *Colpodium* принадлежат к трибе *Poeae* R. Br. [33] и демонстрируют разные этапы эволюционного преобразования кариотипа у злаков. Они уникальны тем, что образуют полиплоидный ряд, кратный не семи хромосомам, как у преобладающего большинства злаков, а двум. Н.Н. Цвелев [33] считает уменьшение основного числа хромосом до $x=2$ результатом далеко зашедшей редукции первичного для злаков $x=7$.

Наше исследование было направлено на выявление направлений молекулярной эволюции ди-, тетра- и гексаплоидных видов: *Zingeria biebersteiniana* (Claus) P. A. Smirn. ($2n=2x=4$), *Z. picidica* (Boiss.) Tutin ($2n=4x=8$), *Z. trichopoda* (Boiss.) Tutin ($2n=4x=8$), *Z. kochii* (Mez) Tzvel. ($2n=6x=12$), *Z. verticilata*=*Zingeriopsis verticilatam* Prob. ($2n=?$), *Colpodium versicolor* ($2n=2x=4$), *C. araraticum* ($2n=4x, 6x=28, 42$), и *C. drakensbergense* ($2n=4x=8$). Были выдвинуты предположения о возможном гибридном происхождении тетра- и гексаплоидной цингерии с участием видов рода *Milium* L. [36] или *Colpodium* (Stev.) Schmalh. [23]. Внести ясность в эти вопросы помогают современные цитогенетические и молекулярные методы исследования кариотипов и геномов, такие как молекулярный анализ последовательностей общих генов, которые мы и использовали в нашем исследовании.

Используемый нами гены β -амилаз позволяют анализировать сходство и различие близкородственных видов по ДНК полиморфизму экзонных и интронных последовательностей, полученных на основе амплификации последовательности генов β -амилаз для консервативных последовательностей экзонов 1 и 6. Проведя анализ результатов, мы выявили наличие общей последовательности у *Zingeria kochii* и *Colpodium versicolor*, которая не выявляется у других видов рода *Zingeria*. Это дополнительно доказывает участие *C. versicolor* в видообразовании гексаплоидной цингерии [37].

На примере некоторых видов злаковых исследован внутри- и межвидовой полиморфизм генов β -амилазы *VAMY1* и *VAMY2*. Анализ последовательностей этих генов показал, что, будучи выравненными, эти последовательности имеют участки с высокой гомологией в экзонных областях. В результате были подобраны праймеры для амплификации фрагментов генов *VAMY1* и *VAMY2* представителей семейства *Poaceae*. Показана возможность применения полученных праймеров для анализа широкого таксономического диапазона – данные праймеры родо- и видоспецифичны, так как комплиментарны наиболее консервативным участкам ДНК злаков – эксонам. ПЦР-праймеры подбирались к

фланкирующим последовательностям экзонов для детекции полиморфизма в интронных участках исследуемых генов. Этот подход (EPIC-ПЦР) эффективен при исследовании внутри- и межвидового полиморфизма генов β -амилаз.

Проведен молекулярно-генетический сравнительный анализ, который выявил идентичные по молекулярной массе фрагменты в аллельных спектрах выборки видов *Poaceae*, а также при изучении полиморфизма таких представителей трибы *Triticeae*, как двузернянка, эгилопс, тритикале и рожь. Скрининг коллекции видов семейства *Poaceae* позволил получить первичную информацию, которая может быть использована для маркерной селекции сортов хлебных злаков.

В ходе проведенного исследования показано, что спектры, получаемые при использовании EPIC-метода, информативны и подходят для оценки межвидовых различий и установления внутривидовой вариабельности представителей такой обширной таксономической группы как злаки. Таким образом, геномные данные модельного организма могут эффективно использоваться для разработки EPIC-маркеров для видов, не являющихся модельными.

ВЫВОДЫ

Нами был исследован новый молекулярный маркер – ядерный ген *VAMU*, кодирующий фермент β -амилазу, осуществляющую гидролиз α -(1,4)-гликозидной связи в мальтоолигосахаридах для однодольных и двудольных растительных видов.

Определены нуклеотидные последовательности генов *VAMU* для злаковых видов, а также соответствующие им аминокислотные последовательности β -амилаз. На основе полученных данных о последовательностях ДНК *VAMU*, а также аминокислотных последовательностей β -амилаз показаны филогенетические взаимоотношения между родами, семействами, порядком и классами растений. В филогенетическом анализе для однодольных и двудольных растительных видов были использованы ДНК последовательности экзонов и аминокислотная последовательность. Филогенетический анализ полученных данных соответствует современным представлениям о систематике анализируемых видов.

Изученный ген *VAMU* перспективен для дальнейшего исследования и использования в качестве маркера молекулярной идентификации при анализе близких и отдаленных видов растительного царства.

Получены родо- и видоспецифичные EPIC-праймеры из экзонов для амплификации фрагментов генов *VAMU* представителей семейства *Poaceae*, которые дают возможность применения их для анализа широкого таксономического диапазона. При помощи полученных праймеров проведен скрининг коллекции видов злаков и установлена их меж- и внутривидовая вариабельность.

Данный подход позволяет предсказать принадлежность неизвестной геномной ДНК последовательности к известным видам, родам, семействам или классам растений.

Финансирование

Работа выполнялась по грантам «Разработка новой технологии генетической идентификации сортов пшеницы с хозяйственно ценными признаками» и «Изоляция генов и поиск новых аллелей генома пшеницы» Комитета науки МОН РК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vroh B., McMullen, M.D., Sanchez-Villeda H., Schroeder S., Gardiner J., Soderlund C., Wing R., Fang Z., Coe Jr. E.H. Single nucleotide polymorphisms and insertion-deletions for genetic

markers and anchoring the maize fingerprint contig physical map // *Crop Science*. – 2006. – Vol. 46. – C. 12-21.

2. Braglia L., Manca A., Mastromauro F. et al. cTBP: A Successful Intron Length Polymorphism (ILP)-Based Genotyping Method Targeted to Well Defined Experimental Needs // *Diversity*. – 2010. – Vol. 2, №4. – C. 572-585.

3. Morello L., Breviaro D. Plant spliceosomal introns: not only cut and paste // *Curr Genomics*. – 2008. – Vol. 9, №4. – C. 227-238.

4. Yang L., Jin G., Zhao X., et al. PIP: a database of potential intron polymorphism markers // *Bioinformatics*. – 2007. – Vol. 23, №16. – C. 2174-2177.

5. Ludwig M. Functional evolution of noncoding DNA // *Current Opinion in Genetics & Development*. – 2002. – Vol. 12, №6. – C. 634-639.

6. Wang X., Wang K., Radovich M. et al. Genome-wide prediction of cis-acting RNA elements regulating tissue-specific pre-mRNA alternative splicing // *BMC Genomics*. – 2009. – Vol. 10, Suppl 1. – C. S4.

7. Solis A.S. Splicing fidelity, enhancers, and disease // *Frontiers in Bioscience*. – 2008. – Vol. 13, №13. – C. 1926.

8. Rose A.B., Beliakoff J.A. Intron-mediated enhancement of gene expression independent of unique intron sequences and splicing // *Plant Physiol*. – 2000. – Vol. 122, №2. – C. 535-42.

9. Jeon J.S., Lee S., Jung K.H. et al. Tissue-preferential expression of a rice α -tubulin gene, OsTubA1, mediated by the first intron // *Plant Physiol*. – 2000. – Vol. 123, №3. – C. 1005-1014.

10. Holland J.B., Helland S.J., Sharopova N. et al. Polymorphism of PCR-based markers targeting exons, introns, promoter regions, and SSRs in maize and introns and repeat sequences in oat // *Genome*. – 2001. – Vol. 44, №6. – C. 1065-1076.

11. Fridman E., Pleban T., Zamir D. A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2000. – Vol. 97, №9. – C. 4718-4723.

12. Chetelat R.T., Deverna J.W., Bennett A.B. Introgression into tomato (*Lycopersicon esculentum*) of the *L. chmielewskii* sucrose accumulator gene (sucr) controlling fruit sugar composition // *Theor Appl Genet*. – 1995. – Vol. 91, №2. – C. 327-333.

13. Hongtrakul V.S.M., Knapp S.J. DFLP, SSCP, and SSR markers for delta 9-stearoyl-acyl carrier protein desaturases strongly expressed in developing seeds of sunflower: intron lengths are polymorphic among elite inbred lines // *Molecular breeding*. – 1998. – Vol. 4, №3. – C. 195-203.

14. Gardes M.B.T. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes--application to the identification of mycorrhizae and rusts // *Molecular Ecology*. – 1993. – Vol. 2. – C. 113-118.

15. Palumbi S.R., Baker C.S. Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales // *Mol Biol Evol*. – 1994. – Vol. 11, №3. – C. 426-35.

16. Bierne N., Lehnert S.A., Bedier E. et al. Screening for intron-length polymorphisms in penaeid shrimps using exon-primed intron-crossing (EPIC)-PCR // *Molecular Ecology*. – 2000. – Vol. 9, №2. – C. 233-235.

17. Lessa E.P. Rapid surveying of DNA sequence variation in natural populations // *Molecular Biology and Evolution*. – 1992. – Vol. 9, №2. – C. 323-330.

18. Li C., Riethoven J.J., Ma L. Exon-primed intron-crossing (EPIC) markers for non-model teleost fishes // *BMC Evol Biol*. – 2010. – Vol. 10. – C. 90.

19. Ishikawa G., Yonemaru J., Saito M. et al. PCR-based landmark unique gene (PLUG) markers effectively assign homoeologous wheat genes to A, B and D genomes // *BMC Genomics*. – 2007. – Vol. 8. – C. 135.

20. James M.G., Denyer K., Myers A.M. Starch synthesis in the cereal endosperm // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2003. – Vol. 6, №3. – C. 215-222.

21. Briggs D.E. *Malts and Malting*.: Blackie Academic and Professional. – New York, 1998.

22. Mason-Gamer R.J. The β -amylase genes of grasses and a phylogenetic analysis of the Triticeae (Poaceae) // *Am J. Bot*. – 2005. – Vol. 92, №6. – C. 1045-1058.

23. Kotseruba V., Gernand D., Meister A. et al. Uniparental loss of ribosomal DNA in the allotetraploid grass *Zingieria trichopoda* ($2n = 8$) // *Genome*. – 2003. – Vol. 46, №1. – С. 156-163.
24. Soltis D.E., Soltis P.S. The dynamic nature of polyploid genomes. // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 1995. – Vol. 29. – С. 8089-8091.
25. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering // *Nucleic Acids Res.* – 1988. – Vol. 16, №22. – С. 10881-90.
26. Kalendar R., Lee D., Schulman A. FastPCR Software for PCR, *In Silico* PCR, and Oligonucleotide Assembly and Analysis / S.Valla, R. Lale: Humana Press // *DNA Cloning and Assembly Methods*. – 2014. – Vol. 1116. – С. 271-302.
27. Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // *Mol Biol Evol.* – 2013. – Vol. 30, №12. – С. 2725-2729.
28. Erkkila M.J. Intron III-specific markers for screening of β -amylase alleles in barley cultivars // *Plant Molecular Biology Reporter*. – 1999. – Vol. 17, №2. – С. 139-147.
29. Peng J., Sun D., Nevo E. Wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*, occupies a pivotal position in wheat domestication process // *Australian Journal of Crop Science*. – 2011. – Vol. 5, №9. – С. 1127-1143.
30. Mujeeb-Kazi A., Rajaram S., eds. Transferring alien genes from related species and genera for wheat improvement. FAO Plant Production and Protection Series, <http://www.fao.org/docrep/006/y4011e/y4011e0e.htm#bm14>. 2002.
31. Yang E.N., Yang Z.J., Zhang J.F. et al. Molecular cytogenetic characterization of a new leaf rolling triticale // *Genet Mol Res.* – 2011. – Vol. 10, №4. – С. 2953-2961.
32. Lukaszewski A.J. Cytogenetically Engineered Rye Chromosomes 1R to Improve Bread-making Quality of Hexaploid Triticale // *Crop Science*. – 2006. – Vol. 46, №5. – С. 2183.
33. Tzvelev N.N. The system of grasses (Poaceae) and their evolution // *The Botanical Review*. – 1989. – Vol. 55, №3. – С. 141-203.
34. Цвелев Н.Н. Проблемы теоретической морфологии и эволюции высших растений. Сборник избранных трудов // http://www.rfbr.ru/rffi/portal/books/o_61519: Т-во науч. изд. КМК, 2005.
35. Gale M.D., Devos K.M. Comparative genetics in the grasses // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1998. – Vol. 95, №5. – С. 1971-1974.
36. Цвелев Н.Н., Жукова П.Г. О наименьшем основном числе хромосом в сем. Poaceae // *Ботанический журнал*. – 1974. – Т. 59, №2. – С. 265-269.
37. Цвелев Н.Н. Злаки СССР. Федоров А.А. – Л.: Наука, 1976.

REFERENCES

1. Vroh B., McMullen M.D., Sanchez-Villeda H., Schroeder S., Gardiner J., Soderlund C., Wing R., Fang Z., Coe Jr. E.H. Single nucleotide polymorphisms and insertion-deletions for genetic markers and anchoring the maize fingerprint contig physical map. *Crop Science*, 2006, vol. 46, pp. 12-21.
2. Braglia L. et al. cTBP: A Successful Intron Length Polymorphism (ILP)-Based Genotyping Method Targeted to Well Defined Experimental Needs. *Diversity*, 2010, vol. 2, no. 4, pp. 572-585. doi:10.3390/d2040572.
3. Morello L., Breviario D. Plant spliceosomal introns: not only cut and paste. *Curr Genomics*, 2008, vol. 9, no. 4, pp. 227-238. doi:10.2174/138920208784533629.
4. Yang L. et al. PIP: a database of potential intron polymorphism markers. *Bioinformatics*, 2007, vol. 23, no. 16, pp. 2174-2177. doi:10.1093/bioinformatics/btm296.
5. Ludwig M. Functional evolution of noncoding DNA. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, vol. 12, no. 6, pp. 634-639. doi:10.1016/s0959-437x(02)00355-6.

6. Wang X. et al. Genome-wide prediction of cis-acting RNA elements regulating tissue-specific pre-mRNA alternative splicing. *BMC Genomics*, 2009, vol. 10, Suppl 1, pp. S4. doi:10.1186/1471-2164-10-S1-S4.
7. Solis A.S. Splicing fidelity, enhancers, and disease. *Frontiers in Bioscience*, 2008, vol. 13, no. 13, pp. 1926. doi:10.2741/2812.
8. Rose A.B., Beliakoff J.A. Intron-mediated enhancement of gene expression independent of unique intron sequences and splicing. *Plant Physiol*, 2000, vol. 122, no. 2, pp. 535-542. doi:10.1104/pp.122.2.535.
9. Jeon J.S. et al. Tissue-preferential expression of a rice α -tubulin gene, OsTubA1, mediated by the first intron. *Plant Physiol*, 2000, vol. 123, no. 3, pp. 1005-1014. doi:10.1104/pp.123.3.1005.
10. Holland J.B. et al. Polymorphism of PCR-based markers targeting exons, introns, promoter regions, and SSRs in maize and introns and repeat sequences in oat. *Genome*, 2001, vol. 44, no. 6, pp. 1065-1076.
11. Fridman E. et al. A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, vol. 97, no. 9, pp. 4718-4723. doi:10.1073/pnas.97.9.4718.
12. Chetelat R.T. et al. Introgression into tomato (*Lycopersicon esculentum*) of the *L. chmielewskii* sucrose accumulator gene (sucr) controlling fruit sugar composition. *Theor Appl Genet*, 1995, vol. 91, no. 2, pp. 327-333. doi:10.1007/BF00220895.
13. Hongtrakul V.S.M., Knapp S.J. DFLP, SSCP, and SSR markers for delta 9-stearoyl-acyl carrier protein desaturases strongly expressed in developing seeds of sunflower: intron lengths are polymorphic among elite inbred lines. *Molecular Breeding*, 1998, vol. 4, no. 3, pp. 195-203.
14. Gardes M.B.T. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes--application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 1993, vol. 2, pp. 113-118.
15. Palumbi S.R., Baker C.S. Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. *Mol Biol Evol*, 1994, vol. 11, no. 3, pp. 426-435.
16. Bierne N. et al. Screening for intron-length polymorphisms in penaeid shrimps using exon-primed intron-crossing (EPIC)-PCR. *Molecular Ecology*, 2000, vol. 9, no. 2, pp. 233-235. doi:10.1046/j.1365-294x.2000.00842.x.
17. Lessa E.P. Rapid surveying of DNA sequence variation in natural populations. *Molecular Biology and Evolution*, 1992, vol. 9, no. 2, pp. 323-330.
18. Li C. et al. Exon-primed intron-crossing (EPIC) markers for non-model teleost fishes. *BMC Evol Biol*, 2010, vol. 10, pp. 90. doi:10.1186/1471-2148-10-90.
19. Ishikawa G. et al. PCR-based landmark unique gene (PLUG) markers effectively assign homoeologous wheat genes to A, B and D genomes. *BMC Genomics* 2007, vol. 8, pp. 135. doi:10.1186/1471-2164-8-135.
20. James M.G. et al. Starch synthesis in the cereal endosperm. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, vol. 6, no. 3, pp. 215-222. doi:10.1016/s1369-5266(03)00042-6.
21. Briggs D.E. Malts and Malting. Blackie Academic and Professional. New York, 1998.
22. Mason-Gamer R.J. The β -amylase genes of grasses and a phylogenetic analysis of the Triticeae (Poaceae). *Am J Bot*, 2005, vol. 92, no. 6, pp. 1045-1058. doi:10.3732/ajb.92.6.1045.
23. Kotseruba V. et al. Uniparental loss of ribosomal DNA in the allotetraploid grass *Zingieria trichopoda* (2n = 8). *Genome*, 2003, vol. 46, no. 1, pp. 156-163. doi:10.1139/g02-104.
24. Soltis D.E., Soltis P.S. The dynamic nature of polyploid genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1995, vol. 29, pp. 8089-8091.
25. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*, 1988, vol. 16, no. 22, pp. 10881-10890.
26. Kalendar R. et al. FastPCR Software for PCR, In Silico PCR, and Oligonucleotide Assembly and Analysis. In: S.Valla, R. Lale (eds). *DNA Cloning and Assembly Methods*, 2014, vol. 1116. Methods in Molecular Biology. Humana Press, pp. 271-302. doi:10.1007/978-1-62703-764-8_18.

27. Tamura K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 2013, vol. 30, no. 12, pp. 2725-2729. doi:10.1093/molbev/mst197.
28. Erkkila M.J. Intron III-specific markers for screening of β -amylase alleles in barley cultivars. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1999, vol. 17, no. 2, pp. 139-147. doi:10.1023/A:1007595821379.
29. Peng J. et al. Wild emmer wheat, '*Triticum dicoccoides*', occupies a pivotal position in wheat domestication process. *Australian Journal of Crop Science*, 2011, vol. 5, no. 9, pp. 1127-1143.
30. Mujeeb-Kazi A., Rajaram S. (eds) Transferring alien genes from related species and genera for wheat improvement. *FAO Plant Production and Protection Series*, 2002, vol. 30.
31. Yang E.N. et al. Molecular cytogenetic characterization of a new leaf rolling triticale. *Genet Mol Res*, 2011, vol. 10, no. 4, pp. 2953-2961. doi:10.4238/2011.November.29.6.
32. Lukaszewski A.J. Cytogenetically Engineered Rye Chromosomes 1R to Improve Bread-making Quality of Hexaploid Triticale. *Crop Science*, 2006, vol. 46, no. 5, pp. 2183. doi:10.2135/cropsci2006.03.0135.
33. Tzvelev N.N. The system of grasses (Poaceae) and their evolution. *The Botanical Review*, 1989, vol. 55, no. 3, pp. 141-203. doi:10.1007/bf02858328.
34. Tzvelev N.N. Problemy teoreticheskoy morfologii i evoljucii vysshih rastenij [The problems of theoretical morphology and evolution of higher plants]. Sbornik izbrannyh trudov. T-vo nauch. izd. KMK.
35. Gale M.D., Devos K.M. Comparative genetics in the grasses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, vol. 95, no. 5, pp. 1971-1974.
36. Tzvelev N.N., Zhukova P.G. O naimen'shem osnovnom chisle hromosom v sem Poaceae [The smallest basic chromosome number in genera Poaceae]. *Botanicheskij zhurnal*, 1974, vol. 59, no. 2, pp. 265-269.
37. Tzvelev N.N. Zlaki SSSR [Cereals of USSR]. L., Nauka, 1976.

ТҮЙІН

Біржарнақты және даражарнақты өсімдіктер түрлері мысалында мальтоолигосахаридтерде α -(1,4)-гликозидті байланыстардың гидролизін қамтамасыз ететін, β -амилаза ферментін кодтайтын, жаңа молекулалық маркер – ядролық ген *VAMU* зерттелінді. Астық түрлері үшін *VAMU* гендерінің нуклеотидті тізбектері, сонымен қатар оларға сәйкес β -амилаза аминқышқылды тізбектері анықталды. ДНК *VAMU* тізбектері, сонымен бірге β -амилаза аминқышқылдары тізбектері жөнінен алынған мәліметтер негізінде өсімдіктер кластары, қатарлары, тұқымдастары мен туыстары арасында филогенетикалық байланыстар көрсетілді. Алынған мәліметтердің филогенетикалық талдауы талданатын түрлердің заманауи систематикасына сәйкес келеді. Өсімдіктер патшалығының жақын және алыс түрлерін талдау кезінде молекулалық идентификациялау маркері ретінде пайдалануға болатын *VAMU* гені зерттелінді. *Poaceae* тұқымдасы өкілдерінің *VAMU* гендері фрагменттерін амплификациялау үшін экзондардан туыс және тұраралық ЕРІС-праймерлер алынды, бұл оларды кең таксономиялық диапозонда талдау мен пайдалануға мүмкіндік береді. Алынған праймерлер көмегімен астық түрлері коллекциясының скринингі өткізілді және түрішілік және тұраралық өзгергіштік анықталды. Бұл әдіс белгісіз геномды ДНК тізбегінің өсімдіктердің белгілі бір түріне, туысына, класқа жататынын болжауға мүмкіндік береді.

Кілтті сөздер: β -амилаза, филогения, жабықтұқымды, *Poaceae*, *Triticeae*.