

**АНАЛІЗ ЛОКУСІВ, АСОЦІЙОВАНИХ З ВІДНОВЛЕННЯМ  
ФЕРТИЛЬНОСТІ ЦЧС ТЕХАСЬКОГО ТИПУ КУКУРУДЗИ**

**Г.І. СЛІЩУК, молодший науковий співробітник,**

**Н.Е. ВОЛКОВА, доктор біологічних наук**

***Селекційно-генетичний інститут – Національний центр  
насіннезнавства та сортовивчення, Україна***

*Проведений біоінформатичний аналіз генів Rf1 і Rf2 кукурудзи. На основі даних глобального вирівнювання досліджена філогенія, встановлена належність гена Rf1 до родини генів, що кодують білки з пентатрикопептидним мотивом. До поліморфних регіонів генів добрано праймери, проведений in silico ПЛР аналіз. Розроблені маркери дозволяють диференціювати рецесивні і домінантні алелі генів-відновників фертильності у кукурудзи з ЦЧС техаського типу.*

***ЦЧС, гени-відновники фертильності, кукурудза, біоінформатика,  
філогенетика, ПЛР in silico***

Вивчення генів-відновників фертильності кукурудзи має велике значення як у практичному плані, так і у теоретичному, через те, що ці гени мають унікальні характеристики порівняно з генами-відновниками фертильності інших рослин.

Кукурудза з техаським типом цитоплазматичної чоловічої стерильності (ЦЧС) відновлюється трьома генами-відновниками фертильності: Rf1, Rf2 та Rf8, серед яких Rf1 та Rf2 комплементарно взаємодіють. Домінантний алель гена Rf1 змінює рівень експресії химерної послідовності T-urf13 за рахунок того, що продукт цього гена працює як білок процесінгу або як допоміжний фактор транскрипції. Але точний механізм зниження рівня експресії токсичного

білка залишається невідомим; у клітинах рослин, що несуть домінуючий алель цього гена, на відміну від чоловічостерильних рослин, спостерігається транскрипт розміром 1600 п.н. [1].

Ген *Rf2* кодує розчинну альдегіддегідрогеназу, що є необхідною у тому числі і для розвитку андроцею у нормальної кукурудзи з мітохондріями дикого типу, субстратами для неї є як мінімум три альдегіди. Цей ген не знижує концентрацію специфічного для кукурудзи з техаським типом чоловічої стерильності транскрипту, однак він необхідний для відновлення фертильності кукурудзи з Т-типом ЦЧС. У кукурудзи з *rf2* алелем втрачається функція мітохондріальної альдегіддегідрогенази, що кодується геном *Rf2*. Також *Rf2* знижує концентрацію токсичного протеїну URF13 [2].

Враховуючи відсутність даних щодо поліморфізму та філогенії генів-відновників фертильності ЦЧС техаського типу у кукурудзи та відсутність молекулярних маркерів для дослідження їх поліморфізму, метою нашої роботи був біоінформатичний аналіз поліморфізму генів *Rf1* та *Rf2*, дослідження філогенії цих генів та створення ДНК маркерів для диференціації алелів цих генів.

**Матеріал і методи дослідження.** Використовували нуклеотидні послідовності *Rf1* гена – VT039010 і NM\_001158391 та 19 нуклеотидних послідовностей *Rf2* гена кукурудзи (повних та часткових AF215823, AF269064, AF318130S1-AF318130S3, AF318133-AF318135, AF318136S1, AF318136S2, AF318138, AF318139S1 - AF318139S3, AF318142S1-AF318142S3, EU965908, NM\_001112421), отримані з генетичної бази даних National Center for Biotechnology Information, (NCBI) [3]. Для вирівнювання використовували нуклеотидні послідовності регіонів гену *Rf2*, наявні в базі даних NCBI, а саме: 12 нуклеотидних послідовностей регіону екзонів 3-4, три – екзонів 6-8 та чотири – екзонів 8-10. Вирівнювання нуклеотидних та амінокислотних послідовностей (як трансльованих, так й безпосередньо отриманих з бази даних NCBI) проводили локальне за алгоритмом Сміта-Уотермана [5] з

використанням он-лайн програми «blastn» [3] та глобальне – за алгоритмом Нідлмана-Вунша [4] за допомогою програми «MEGA». Трансляцію нуклеотидних послідовностей здійснювали *in silico*. Трансльовані амінокислотні послідовності також вирівнювали за допомогою програми «MEGA» для пошуку певного паттерну амінокислотних змін. Реконструкцію філогенетичної дендрограми за результатами вирівнювання проводили за UPGMA методом [6]. Філогенетичну дендрограму будували за програмою «MEGA 5.2» [7].

Дизайн праймерів проводили за допомогою програми «FastPCR» за результатами глобального вирівнювання нуклеотидних послідовностей генів-відновників фертильності кукурудзи. Праймери добирали до ділянок, що виявили найбільший рівень поліморфізму. *In silico* полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили також в програмі «FastPCR».

**Результати дослідження.** Для вивчення поліморфізму гена *Rf1*, який є одним із генів-відновників фертильності техаського типу, проведено біоінформатичний аналіз його нуклеотидних та трансльованих послідовностей та реконструкцію філограм за результатами вирівнювання трансльованих через незначну кількість секвенованих послідовностей гена *Rf1* у генетичній базі даних NCBI на відміну від амінокислотних.

У результаті вирівнювання двох нуклеотидних послідовностей *Rf1* гена розроблений дизайн пари праймерів VSGIRf1 (5' – 3'): прямий – ctcagaaggtttctttgtgc, зворотний – cggagacgacgcggcagagg. При проведенні *in silico* ПЛР отримано продукти ампліфікації розмірами 385 (BT039010, *rf2*) та 414 (NM\_001158391, *Rf2*) п.н. Поліморфізм гена *Rf1* полягав у різниці в кількості мікросателітів складної будови у позиціях 110-117 п.н., 130-140 п.н., 196-234 п.н. (рис. 1).

Для вивчення еволюції гена *Rf1* здійснено філогенетичний аналіз. Трансльовану нуклеотидну послідовність гена *Rf1* кукурудзи (NM\_001158391) використано для проведення локального вирівнювання за алгоритмом BLAST

проти бази даних протеїнів. Знайдено 250 гомологів протеїну; всі належали до родини протеїнів з пентатрикопептидним мотивом. Дерево філогенетичних відносин продуктів трансляції гена *Rf1* та його гомологів показано на рис. 2.

					Section 3	
	(79)	79	90	100	117	
PCR Product of Rf1BT039010(1)	(79)	TCAACGGTCACTGCCTTGTCCAGTAAAGTAAACCGTACGA				
PCR Product of Rf1NM_001158391(1)	(79)	TCAACGGTCACTGCCTTGTCCAGTAA-----CACGGCCGA				
					Section 4	
	(118)	118	130	140	156	
PCR Product of Rf1BT039010(1)	(118)	GACGCCGCATGGCGG---GCAACAAGTTCTCGTCGTAC				
PCR Product of Rf1NM_001158391(1)	(114)	GACGCCGCATGGCGGCGGCAACAAGTTCTCGTCGTAC				
					Section 5	
	(157)	157	170	180	195	
PCR Product of Rf1BT039010(1)	(154)	CACCTCGCCGCGCCCTCCGCGCGAGCCGACCCCGCC				
PCR Product of Rf1NM_001158391(1)	(153)	CACCTCGCCGCGCCCTCCGCGCGAGCCGACCCCGCC				
					Section 6	
	(196)	196	210	220	234	
PCR Product of Rf1BT039010(1)	(193)	GC-----CGCGCTC				
PCR Product of Rf1NM_001158391(1)	(192)	GGGCCCTCCGCGCGAGCCGACCCCGCCCGCGCTC				
					Section 7	
	(235)	235	240	250	260	273
PCR Product of Rf1BT039010(1)	(202)	GGCCTTTCCTCAACCTCCCGCATCCGCCACCCCGTTT				
PCR Product of Rf1NM_001158391(1)	(231)	GGCCTTTCCTCAACCTCCCGCATCCGCCACCCCGTTT				
					Section 8	
	(274)	274	280	290	300	312
PCR Product of Rf1BT039010(1)	(241)	CGCTATTCCTCCGCTGCTACGACCTCATCATCTCCAGG				
PCR Product of Rf1NM_001158391(1)	(270)	CGCTATTCCTCCGCTGCTACGACCTCATCATCTCCAGG				

Рис. 1. Результат вирівнювання фрагментів *Rf1* гена, отриманих в *in silico* ПЛР. Консервативні ділянки позначені сірим, поліморфні мікросателіти є на ділянках 110-117, 130-140 та 196-234

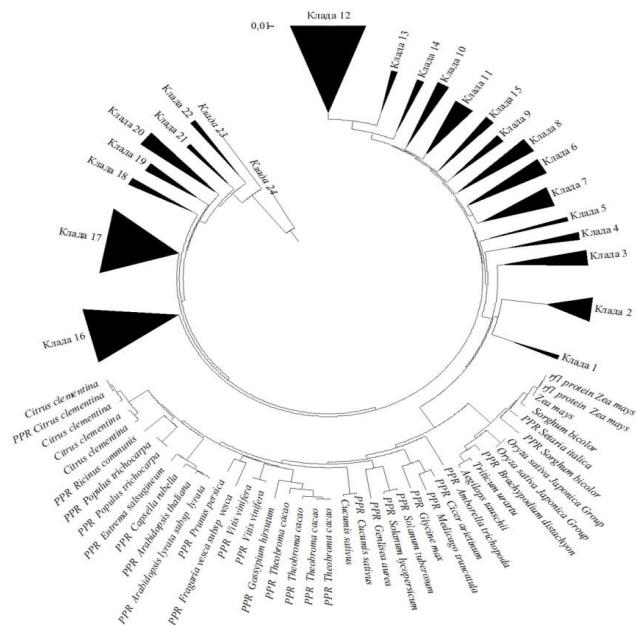


Рис. 2. Філогенетичні взаємовідносини рослин за результатами вирівнювання протеїнів RF1. У розкритому вигляді представлений лише кластер, що містив ген *Rf1* кукурудзи, інші кластери закриті

Продукт трансляції гена *Rf1* належав до родини пентатрикопептидів, відомих своєю участю в регуляції у експресії генів рослин. Окрім гілки, що містила гомологи гена *Rf1*, на кладограмі чітко відрізнялися 24 кластери. Філогенетичні дані можна інтерпретувати так, що для цих генів характерний диверсифікуючий відбір, спрямований на підвищення різноманітності цих білків, у той час як пентатрикопептидний мотив виявився досить консервативним. Таким чином, щонайменше один з генів відновників фертильності кукурудзи кодує пентатрикопептидний білок. Знайдено певне число ортологів та паралогів гена *Rf1*. Це можна використати як для створення штучної ЦЧС системи, подібної до ЦЧС техаського типу у кукурудзи, у рису, сорго, пшениці та інших злакових на основі ортологів гена *Rf1* кукурудзи, знайдених у цих таксонах, так і для визначення нових типів ЦЧС у кукурудзи в майбутньому. Вивчення ж паралогів гена *Rf1* кукурудзи в майбутньому дозволить вирішити як практичні питання створення нових ЦЧС-систем кукурудзи, так і вивчити теоретичні аспекти взаємодії ядерного генома з мітогеномом, опосередковані генами, що кодують пентатрикопептидні білки.

Для вивчення внутривидового поліморфізму кукурудзи за геном *Rf2*, а також створення молекулярних маркерів, які можна використовувати для диференціації ліній кукурудзи на основі ПЛР, провели біоінформатичний аналіз. Вирівнено 19 нуклеотидних послідовностей *Rf2* гена кукурудзи. Лише для регіону екзонів 8-10 знайдено сайти, за якими можлива диференціація алелів *Rf2* та *rf2*. Для регіону екзонів 8-10 рівень гомології становив 93,6 %, відзначено наявність однонуклеотидних замін.

Вирівнювання нуклеотидних послідовностей екзонів 8-10 дозволило диференціювати рецесивні і домінантні алелі. За результатами вирівнювання нуклеотидних послідовностей розроблено дизайн праймерів. Добрано пару праймерів VSGI4 до регіону екзонів 8-10 гена *Rf2* (5' – 3'): прямиий VSGI4SP: – gtcgtgactgcatccaagta, зворотній VSGI4ASP: – cttgcattttgatgggtgta, за допомогою яких диференційовано ген *Rf2* кукурудзи на домінантні та рецесивні алелі в

ПЛР *in silico*. Нуклеотидні послідовності, що належали до рецесивного алеля *rf2*, ампліфікували продукт розміром 216 п.н., у той час як нуклеотидні послідовності доміантного алеля *Rf2* не продукували фрагментів ампліфікації за рахунок наявності специфічних для рецесивних ліній однонуклеотидних замінів у сайтах праймування, що унеможливило гібридизацію праймерів з гомологічними сайтами нуклеотидних послідовностей доміантного алеля.

### **Висновки**

За результатами дослідження генів-відновників фертильності кукурудзи з техаським типом ЦЧС, ген *Rf1* виявився таким, що кодує білок з пентатрикопептидним мотивом, який поєднує його з більшістю інших відомих генів-відновників фертильності в інших рослин, тоді як ген *Rf2* є унікальним у цьому сенсі, бо кодує не пентатрикопептидний білок, а мітохондріальну альдегіддегідрогеназу. Для обох генів проведений комплексний аналіз з використанням методів біоінформатики, досліджена філогенія гена *Rf1* та їх поліморфізм, добрано праймери, що дозволяли диференціювати рецесивні та доміантні алелі цих генів.

### **Список літератури**

1. Dewey R. E. A mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the T cytoplasm of maize / R. E. Dewey, D. H. Timothy, C. S. Levings // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 1987. - Vol. 15, № 84. - P. 5374–5378.
2. Liu F. Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase Activity Is Required for Male Fertility in Maize / F. Liu, X. Cui, H. T. Horner [et al.] // The Plant Cell. - 2001. - Vol. 13. - P. 1063–1078.
3. National Center for Biotechnology Information [Електронний ресурс] // Режим доступу: [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)

4. Needleman S. B. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins / S. B. Needleman, C. D. Wunsch // Journal of Molecular Biology. - 1970. - Vol. 3, № 48. - P. 443–453.
5. Smith T. F. Identification of Common Molecular Subsequences / T. F. Smith, M. S. Waterman // Journal of Molecular Biology. - 1981. - Vol. 147. - P. 195–197.
6. Sneath P. H. A. Numerical taxonomy: The principles and practices of numerical classification / P. H. A. Sneath, R. R. Sokal // San-Francisco: Freeman, 1973. - P. 573.
7. Tamura K. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method / K. Tamura, M. Nei, S. Kumar // Proceedings of the National Academy of Sciences. - 2004. - Vol. 101. - P. 11030-11035.

АНАЛИЗ ЛОКУСОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ВОССТАНОВЛЕНИЕМ  
ФЕРТИЛЬНОСТИ ЦМС ТЕХАССКОГО ТИПА КУКУРУЗЫ

Г.И. СЛИЩУК, Н.Э. ВОЛКОВА

*Проведен биоинформатический анализ генов Rf1 и Rf2 кукурузы. По данным глобального выравнивания исследована филогения, установлена принадлежность гена Rf1 к семье генов, кодирующих белки с пентатрикопептидным мотивом. К полиморфным регионам генов разработаны праймеры, проведен in silico ПЦР анализ. Разработанные маркеры позволили дифференцировать рецессивные и доминантные аллели генов-восстановителей фертильности у кукурузы с ЦМС техасского типа.*

**Ключевые слова:** ЦМС, гены-восстановители фертильности, кукуруза, биоинформатика, филогенетика, ПЦР in silico

MAIZE TEXAS TYPE CMS RESTORER OF FERTILITY-ASSOCIATED LOCI  
ANALYSIS

G.I. SLISCHUK, N.E. VOLKOVA

*Maize Rf1 and Rf2 genes bioinformatics analysis have been conducted. Genes phylogenies were reconstructed in virtue of nucleotide alignment, Rf1 belonging to pentatricopeptide motif-coding genes family has been showed. Primers, specific to polymorphic regions were designed; in silico PCR analysis has been conducted. Developed markers allowed Texas-type CMS maize restorer of fertility recessive and dominant allele differentiation.*

***Keywords: CMS, restorers of fertility, maize, bioinformatics, phylogenetics, PCR in silico***