

СИДОРОВ А.В.¹✉, КРАТ В.Ю.¹, СМІРНОВА В.А.^{1,3}, ПАРІЙ Я.Ф.², СИМОНЕНКО Ю.В.³,
ПАРІЙ М.Ф.^{1,2}

¹ Національний університет біоресурсів і природокористування України,
Україна, 03041, м. Київ, вул. Героїв оборони, 15, e-mail: a.v_sidorov@mail.ru

² Всеукраїнський науковий інститут селекції,
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 30

³ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

✉ a.v_sidorov@mail.ru, (066) 718-14-79

БІОІНФОРМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПОТЕНЦІЙНИХ ALS/ANAS-БІЛКІВ МОРКВИ (*DAUCUS CAROTA* L.)

Ацетолактат синтаза (ALS, або ацетогідроксикислотосинтаза ANAS) – фермент білкової природи, що каталізує перший етап синтезу амінокислот sz розгалуженим ланцюгом – валіну, лейцину та ізолейцину. ALS каталізує синтез ацето-гідроксибутирату та ацетолактату і є цільовим ферментом для багатьох гербіцидів суцільної дії родин сульфонілсечовин, імідазолінонів, триазолопіримідинів, піримідинілтіобензоатів, сульфоніламінокарбонілтриазолінів. Усі ці гербіциди зв'язуються з ALS і викликають зупинку синтезу амінокислот із розгалуженим ланцюгом, що призводить до загибелі рослин. Гербіциди, що інгібують ацетолактат синтазу, використовуються для пригнічення багатьох видів бур'янів, мають слабку токсичність для ссавців і є селективними для основних сільськогосподарських культур. Завдяки таким привабливим якостям гербіциди цієї родини широко використовуються по всьому світу на різних сільськогосподарських культурах та на великих площах.

Після масової появи бур'янів, стійких до дії ANAS-інгібіторів, було встановлено, що в них наявний мутантний, несприйнятливий до інгібіторів фермент ANAS. На сьогоднішній день відомо 26 можливих варіантів заміщення амінокислот у восьми сайтах генів ANAS (табл. 1). Найчастіше для виникнення мутації, що призводить до стійкості, достатньо одноклеотидної заміни [1].

Окрім виникнення мутацій у генах ANAS, стійкі до гербіцидів рослини можуть виникати і внаслідок ампліфікації цільових генів, що кодуєть білки (ANAS, EPSPS), з якими зв'язуються гербіциди. Такий механізм стійкості було детально розглянуто в одній із робіт [3], де було застосовано покрокову селекцію на стійкість до хлорсульфурону (представник групи сульфонілсечовин) суспензійної культури клітин моркви. Ця ж

Таблиця 1

Амінокислотні заміщення, що викликають стійкість рослин до дії гербіцидів ANAS-інгібіторів

#	Амінокислота та її позиція*	Заміщення, що викликає стійкість	Посилання
1.	Ala-122	Thr; Tyr;	1, 2, 5;
2.	Pro-197	His; Thr; Arg; Leu; Gln; Ser; Ala; Ile; Met; Lys; Trp;	1, 2, 5;
3.	Ala-205	Val;	1, 2, 5;
4.	Asp-376	Glu;	1, 2, 5;
5.	Arg-377	Немає даних;	2, 5;
6.	Trp-574	Leu; Arg;	1, 2, 5;
7.	Ser-653	Thr; Asn; Ile	1, 2, 5;
8.	Gly-654	Glu; Asp;	1, 2, 5;

Примітка. * – За основу нумерації взято амінокислотну послідовність білку ANAS *Arabidopsis thaliana* [2].

сама група авторів пізніше встановила наявність у досліджуваних ліній клітин моркви двох різних білків ANAS, які відрізнялися за ступенем стійкості до дії хлорсульфурону та впливу лейцину (який також пригнічує ANAS-фермент) [4].

Інша група вчених отримала рослини, стійкі до дії гербіциду імазетапіру, за допомогою генетичної трансформації мутантним геном ANAS арабідопсису. Необхідно відмітити цікавий та важливий факт, що для розмноження насінням деякі отримані регенеранти довелося запилювати пилком дикого типу в зв'язку з чоловічою стерильністю отриманих трансформантів [5].

Отримання рослин, стійких до дії ANAS-інгібіторів та інших гербіцидів суцільної дії, є одним із пріоритетних напрямків у селекції сільськогосподарських культур. А морква є дуже вдалим модельним об'єктом для вивчення дії стресових факторів на рослинний організм. Це пов'язано з її високою, порівняно з іншими сіль-

ськогогосподарськими культурами, регенераційною здатністю та добре відпрацьованою технологією культивування *in vitro*. Таким чином, оперуючи даними біоінформатичного аналізу білків ALS/AHAS моркви та генів, що їх кодують, можна відпрацьовувати ефективні методи отримання рослин, стійких до дії гербіцидів ALS-інгібіторів.

Матеріали і методи

Для аналізу було обрано два гени-кандидати, що, ймовірно, кодують фермент ацетолактат синтазу. Дані нуклеотидних послідовностей потенційних AHAS генів було отримано від професора P.W. Simon (особисте повідомлення). Для порівняльного аналізу ДНК-послідовностей генів, що включав трансляцію, дані нуклеотидних послідовностей, порівняння цих послідовностей із уже вивченими гомологами цих генів у інших культур, занесеними до баз даних NCBI, використовувалося програмне забезпечення «Vector NTI Advance 11.5.1» [6]. За результатами порівняльного аналізу було побудовано філогенетичні дерева ДНК- та білкових послідовностей ALS/AHAS. Для побудови філогенетичних дерев було використано онлайн ресурс «Phylogeny.fr» [7, 8]. Для аналізу висококонсервативних білкових доменів – онлайн ресурс NCBI «Search for Conserved Domains within a protein or coding nucleotide sequence» [10, 11].

Результати та обговорення

Порівняльний аналіз потенційних AHAS-білків моркви з відомими гомологами ін-

ших сільськогосподарських культур та модельних об'єктів.

За результатами секвенування генома моркви групою вчених на чолі з P.W. Simon було виявлено 2 нуклеотидні послідовності, гомологічні генам, що кодують AHAS-ферменти в інших видів рослин (особисте повідомлення). Нами був проведений порівняльний аналіз нуклеотидних та відповідних їм амінокислотних послідовностей генів-кандидатів AHAS моркви та інших важливих сільськогосподарських культур (табл. 2).

Як видно з вищенаведеної таблиці, ДНК-послідовності AHAS-кодуючих генів суттєво відрізняються в рамках геномів вивчених сільськогосподарських та модельних рослин. Також було проведено аналогічний порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей, за результатами якого встановлено набагато сильнішу спорідненість білкових молекул різних видів, навіть тих, що належать до різних класів. Це свідчить про високу консервативність білків AHAS, особливо це стосується сайтів, мутації в яких призводять до стійкості рослин до дії AHAS-інгібіторів. Таким чином, ми маємо можливість індукувати однакові мутації, що викликають таку ж стійкість рослин до дії ALS-інгібіторів для багатьох господарсько-важливих видів рослин.

Використовуючи інформацію про нуклеотидні та амінокислотні послідовності генів та білків AHAS моркви та інших модельних та сільськогосподарських видів рослин, було побудовано дендрограми філогенетичних зв'язків цих послідовностей (рис. 1 та 2).

Таблиця 2

Порівняльний аналіз нуклеотидних та відповідних амінокислотних послідовностей генів-кандидатів AHAS моркви з іншими відомими гомологами

№ п/п	Порівняльний набір	Ідентичність,%	Консенсусних позицій,%
Нуклеотидні послідовності			
1.	<i>Daucus carota</i> AHAS candidate 1 і 2	81,2	81,2
2.	Однодольні (пшениця м'яка, кукурудза, ячмінь, рис)	61,2	88,1
3.	Дводольні (арабідопсис, тютюн, ріпак, нут, морква, соя, соняшник)	40,6	80,2
4.	Усі разом	35,5	74,5
Амінокислотні послідовності			
1.	<i>Daucus carota</i> AHAS candidate 1 і 2	83,1	87,7
2.	Однодольні (пшениця м'яка, кукурудза, ячмінь, рис)	76,3	95,4
3.	Дводольні (арабідопсис, тютюн, ріпак, нут, морква, соя, соняшник)	61,2	91,2
4.	Усі разом	51,8	86,9

Доменний аналіз білка AHAS

Наступний етап роботи – доменний аналіз білка AHAS. Хоча амінокислотні послідовності гомологічних білків можуть не виявляти високої консервативності, вторинна структура залишається практично незмінною в процесі еволюції. В результаті аналізу нуклеотидних та амінокислотних послідовностей досліджуваних потенційних білків було отримано подібні результати [8]. Ці білки складаються з трьох доменів (рис. 3). Домен 1 – піримідин-зв'язуючий домен піруват оксидази та споріднених білків. Цей домен трапляється в багатьох основних метаболічних ферментах, які використовують тіамін пірофосфат як кофактор. До цієї підродини консервативних білкових доменів належить велика каталітична субодиниця ацетолактат синтази. Домен 2 – центральний домен білків родини тіамін пірофосфатів, домен 3 – тіамін пірофосфат, який зв'язує модуль ацетолактат синтази.

У ході аналізу перевірялася наявність у потенційних AHAS-білків відповідних досліджених на інших рослинах амінокислотних послідовностей, мутації в яких сприяють виникненню стійкості до дії AHAS-інгібіторів. Усі 8 наявні у досліджених генах-кандидатах (рис. 3). Виявлено одну цікаву закономірність: мутації в сайтах, розміщених у першому домені, частіше викликають стійкість рослин до дії гербіцидів групи сульфонілсечовин, а ті, що розташовуються в третьому домені, усі призводять до стійкості до дії імідазолінонів. Мутації, що викликають замі-

ну триптофану в положенні 574 на лейцин або аргінін, сприяють виникненню стійкості до обох груп гербіцидів.

Висновки

Досліджувані амінокислотні послідовності AHAS-білків виявляють високий ступінь подібності (в середньому 87 %) до уже відомих AHAS-білків інших видів сільськогосподарських рослин. Цій родині ферментів притаманна значна консервативність вторинної структури, що дозволяє легко ідентифікувати ці білки. Враховуючи вище сказане, можна припустити, що мутації, які призводять до стійкості рослин до дії гербіцидів на основі AHAS-інгібіторів, під час виникнення у моркви призведуть до аналогічної реакції на такі препарати.

В обох ймовірних AHAS-білках моркви наявні всі 8 відомих амінокислотних замінів, які призводять до виникнення стійкості до дії AHAS-інгібіторів.

Амінокислотні заміщення у різних доменах білка ацетолактат синтази викликають стійкість до різних груп гербіцидів, що пов'язано з різними молекулярними механізмами зв'язування ацетолактат синтази з різними гербіцидами.

Колектив авторів висловлює подяку професору Philipp Simon (University of Wisconsin-Madison, Department of Horticulture) за люб'язно надані дані нуклеотидних послідовностей ймовірних генів ALS/AHAS.

ЛІТЕРАТУРА

1. Powles SB, Yu Q. 2010. Evolution in action: Plants resistant to herbicides. // Annual Review of Plant Biology. – 2010. – № 61. – P. 317–347.
2. Heap, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. Thursday, February 18, 2016. – Режим доступу: www.weedscience.com
3. Caretto S., Giardina M.C., Nicolodi C., Mariotti D. Chlorsulfuron resistance in *Daucus carota* cell lines and plants: involvement of gene amplification // Theor Appl Genet. – 1994. – № 88. – P. 520–524.
4. Caretto S., Giardina M.C., Macagnano A., Bray E., Nicolodi C., Mariotti D. Biochemical evidence for two forms of acetohydroxyacid synthase in *Daucus carota* L. Cell lines selected for chlorsulfuron resistance // Pesticide Biochemistry and Physiology. – 1999. – № 64. – P. 76–84.
5. Aviv D., Amsellem Z., Gressel J. Transformation of carrots with mutant acetolactate synthase for Orobanche (broomrape) control // Pest management science. – 2002. – 58, № 12. – P. 1187–1193.
6. Vector NTI® Software режим доступу <https://www.thermofisher.com/ua/en/home/life-science/cloning/vector-nti-software.html>
7. Dereeper A., Guignon V., Blanc G., Audic S., Buffet S., Chevenet F., Claverie J.M. Phylogeny. fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist // Nucleic acids research. – 2008. – 36, № suppl 2. – P. W465–W469.
8. Dereeper A., Audic S., Claverie J.M., Blanc G. BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis // BMC evolutionary biology. – 2010. – 10, № 1. – P. 8.
9. Liu W., Yuan G., Du L., Guo W., Li L., Bi Y., Wang J. A novel Pro197Glu substitution in acetolactate synthase (ALS) confers broad-spectrum resistance across ALS inhibitors // Pesticide biochemistry and physiology. – 2015. – 117. – P. 31–38.
10. Ingolfsson H., Yona G. Protein domain prediction // Structural Proteomics: High-Throughput Methods. – 2008. – P. 117–143.
11. Marchler-Bauer A. et al. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins // Nucleic acids research. – 2011. – 39, № suppl 1. – P. D225–D229.

SYDOROV A.V.1, KRAT V.YU.1, SMIRNOVA V.A.1,3, PARIИ YA.F.2, SYMONENKO YU.V.3, PARIИ M.F.1,2

¹ *National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Ukraine, 03041, Kyiv, Heroyiv Oborony str., 15, e-mail: a.v_sidorov@mail.ru*

² *Ukrainian Science institute of plant breeding, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 30*

³ *Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnoho str., 148*

BIOINFORMATICS ANALYSIS OF POTENTIAL CARROT (*DAUCUS CAROTA* L.) ACETOLACTATE SYNTHASE GENES

Aim. One of the main challenges in plant breeding is creating of herbicide resistant cultivars and hybrids. Carrot is a very useful model plant for optimization of new plant breeding methods to create ALS-inhibitor-resistant plants due to its regeneration rate and well developed methods of *in vitro* cultivation. **Methods.** Using Vector NTI software and NCBI online resources we have analyzed two ALS-candidates genes of carrot. **Results.** We found high similarity of carrot ALS-candidates with another known ALS genes from other plant species. Using online resource «Phylogeny.fr» we obtained phylogenetic trees for nucleotide and amino acid sequences of ALS genes and their predicted proteins. **Conclusions.** Both carrot ALS-candidates have all 8 sites, point mutations in which causes ALS-inhibitor resistance in other plants, so the same mutations in carrot could result in herbicide resistance.

Keywords: *Daucus carota*, acetolactate synthase, mutations, herbicide resistance.