

СОЗІНОВА О.І.¹, КОЗУБ Н.О.^{1,2✉}, СОЗІНОВ І.О.¹, БЛЮМ Я.Б.²¹ Інститут захисту рослин НААН,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 33, e-mail: sia1@i.com.ua, natalkozub@gmail.com

² ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України»,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а

✉ natalkozub@gmail.com, (097) 212-40-89, (044) 257-22-58

ГЕНОМНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ ПРАЙМЕРІВ ДО ПУРОІНДОЛІНОВИХ ГЕНІВ

Мета. Метою було дослідження геномної специфічності праймерів для ампліфікації повних кодуючих послідовностей пуруіндолінових генів. **Методи.** Проводили ПЛР з ген-специфічними праймерами для ампліфікації повних кодуючих послідовностей пуруіндолінових генів пшениці і споріднених видів. **Результати.** Пара праймерів PinaDH не є ген-специфічною, оскільки дає два продукти ампліфікації генів *Pina-1* і *Gsp-1*. Ця пара праймерів не є специфічною для гена *Pina-1* геному *V. D. villosum*. Пари праймерів, позначені PinaCM та Pinb, є ген-специфічними, оскільки дають один продукт ампліфікації з відповідною довжиною. Нами показано, що праймер PinaCM є також специфічним для геномів D, E і V, а пара праймерів Pinb не є специфічною для геному V. **Висновки.** Уточнено генну і геномну специфічність праймерів до пуруіндолінових генів. Відібрано праймери, придатні для подальшого секвенування кодуючих послідовностей пуруіндолінових генів пшениці та споріднених видів.
Ключові слова: пуруіндолін, *Triticum aestivum*, *Aegilops*, *Dasyphyrum*.

Пуруіндоліни (пуруіндолін а та пуруіндолін б) – низькомолекулярні білки зернівки пшениці *Triticum aestivum* L., які відіграють важливу роль у визначенні твердозерності, а також мають антимікробну і антигрибкову дію [1–5]. Твердозерність впливає на вихід борошна і його характеристики [3]. Особливістю цих білків є високий вміст триптофану та цистеїну. Довжина поліпептидного ланцюга зрілого білка пуруіндоліну а складає 120 амінокислотних залишків, пуруіндоліну б – 119 амінокислотних залишків [1]. Гени, що кодують пуруіндоліни у *T. aestivum* L. – пуруіндолін а (*Pina-D1*) і пуруіндолін б (*Pinb-D1*), зчеплені між собою і знаходяться в локусі твердозерності *Ha* на короткому плечі хромосоми 5D [3]. У цьому ж локусі знаходиться ген, що кодує GSP-1 (grain softness protein 1),

хоча його роль у визначенні твердозерності ставиться під сумнів [4, 6]. М'яка текстура зерна пшениці визначається присутністю обох алелів генів пуруіндолінів дикого типу *Pina-D1a* і *Pinb-D1a*. Мутація в гені *Pina-D1* або *Pinb-D1* призводить до твердої текстури зерна [7]. Кодуюча послідовність генів пуруіндолінів має довжину 450 п. н. і не містить інтронів. Гени *Pina-D1* і *Pinb-D1* мають рівень гомології 70 % у кодуючій ділянці і 50 % в 3'-нетрансльованій ділянці [5].

Серед злаків пуруіндоліни відсутні в рису, кукурудзи, сорго і є в різних видах пшениці, егілопсів, вівса, ячменю, жита та тритикале, де м'яка текстура ендосперму є домінуючою рисою. Гени пуруіндолінів відсутні у тетраплоїдних пшениць [8, 9]. У гексаплоїдній пшениці *T. aestivum* L. функціонально активні алелі, які контролюють ці білки, з'явилися від *Ae. tauschii* – донора геному D [9]. Для ампліфікації повних кодуючих послідовностей пуруіндолінових генів пшениці м'якої *Pina-D1*, *Pinb-D1* та пуруіндолінових генів споріднених видів Massa et al. [10, 11] були розроблені ген-специфічні праймери. Завданням нашої роботи було дослідження геномної специфічності цих праймерів для подальшого секвенування кодуючих послідовностей пуруіндолінових генів пшениці та інших видів.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження слугували зернівки сортів пшениці м'якої *T. aestivum* L. та зразків споріднених видів: екстра-м'якозерний сорт *T. aestivum* Білява; твердозерні сорти *T. aestivum* Антонівка, Миронівська-67, Золото-колоса, Істра-1; сорти пшениці твердої *T. durum* Ізольда, Дельфін; тритикале сорту Волемир; зразки пирію *Thinopyrum* (за морфологічними ознаками попередньо визначеного як *Thinopyrum bessarabicum*, далі *Thinopyrum*); зразки *Aegilops biuncialis* Vis.; *Dasyphyrum villosum* L.,

Ae. cylindrica.

ДНК виділяли із відібраної наважки подрібненого зерна масою 25 мг за стандартною методикою за допомогою набору NeoPrep¹⁰⁰ DNA_plant (Neogene). Для ампліфікації використовували послідовності праймерів для пуроіндолінових генів, наведені в статтях Massa et al. [10, 11] (табл.). ПЛР проводили на ампліфікаторі 2720 GeneAMP System із використанням набору GenPak[®] PCR Core (Neogene). Умови ПЛР для всіх пар праймерів: початкова денатурація за 94°C 6 хв.; 35 циклів (денатурація – 94°C 1 хв., відпал – 58°C 90 сек., елонгація за 72°C 2 хв.); кінцева елонгація за 72°C 10 хв.

Результати ПЛР візуалізували шляхом електрофорезу на 2% агарозному гелі та 1×трис-боратному буфері із додаванням у якості фарбника бромистого етидію [12]. Продукти ПЛР наносили в лунки в об'ємі 3–5 мкл. Електрофорез проводили протягом 1 год. 10 хв. – 1 год. 40 хв. за робочої різниці потенціалів 130 В. Гель візуалізували під ультрафіолетом за допомогою системи для гел-документації VISION Gel.

Результати та обговорення

Для ампліфікації повних кодуєчих послідовностей пуроіндолінових генів пшениці м'якої *Pina-D1*, *Pinb-D1* та пуроіндолінових генів споріднених видів були випробувані ген-специфічні праймери, розроблені Massa et al. [10, 11]. За даними Massa et al. [11] ці праймери ампліфікують кодуєчу ділянку пуроіндолінових генів довжиною 447 п. н.

Для ампліфікації послідовності гена *Pina-D1* та гомеологічних генів спочатку використовували праймери, наведені в статті Massa et al. [11], для зручності позначені PinaDH (табл.). В іншій роботі [10] ці ж праймери PinaDH наводяться як специфічні для геномів D (*Ae. tauschii*, *T. aestivum*), A^m (*T. monococcum*), A^u (*T. urartu*), H (ячмінь *H. vulgare*), R (жито *S. cereale*). На рис. 1 показано електрофореграму продуктів ампліфікації з праймерами PinaDH пшениці м'якої *T. aestivum* (м'якозерний сорт Білява та твердозерний сорт Антонівка) та споріднених видів. У результаті ПЛР було одержано по два амплікони у пірію *Thinopyrum* (геноми EE), двох зразків *Ae. biuncialis* NK 13-2-1 і NK B1-1 (геномна формула UUM^bM^b), тритикале (AABBRR) та сортів пшениці Білява і Антонівка (AABBDD). У твердої пшениці *T. durum* (AABB) та у дикорослого виду *Dasyphyrum villosum*

L (VV) ампліфікувався один фрагмент довжиною приблизно 520 п. н. Відомо, що у твердої пшениці *T. durum* відсутні гени пуроіндолінів. Фрагмент довжиною близько 520 п. н., очевидно, є продуктом ампліфікації спорідненого гена – *Gsp-1*, що кодує білок GSP-1 – компонент фріабіліну [6]. На відміну від пуроіндолінових генів, гени *Gsp-1* присутні у *T. durum* на відповідних хромосомах геномів A і B – 5A і 5B. У *T. aestivum* є три гени *Gsp-1* – на хромосомах 5A, 5B, 5D [4]. Отже, за нашими результатами (рис. 1), праймери PinaDH ампліфікують гомеологічні гени *Gsp-1* у всіх проаналізованих нами видів злаків. Нижній фрагмент довжиною приблизно 490 п. н. є продуктом ампліфікації гена *Pina-D1* і гомеологічних генів. У тетраплоїдного виду *Ae. biuncialis* цей фрагмент, можливо, охоплює продукти ампліфікації двох генів – *Pina-U1* і *Pina-M1*.

Таким чином, пара праймерів PinaDH дозволяє ампліфікувати послідовність гена *Pina-D1* у *T. aestivum*, гомеологічних генів *Pina-U1* і *Pina-M1* у *Ae. biuncialis*, *Pina-R1* у тритикале і *Pina-E Thinopyrum*. У той же час праймери PinaDH не придатні для ампліфікації послідовності гена *Pina-V1 D. villosum*. Оскільки пара праймерів PinaDH дає два продукти ампліфікації *Pina-1* і *Gsp-1*, очевидно, що вона не є ген-специфічною і не підходить для прямого секвенування після очистки продуктів ПЛР без додаткових маніпуляцій (вирізання відповідної смуги з гелю).

Для ампліфікації послідовності гена, що кодує пуроіндолін а, *Pina-D1* та гомеологічних генів, була випробовувана інша пара праймерів – праймери, розроблені Massa et al. [10] як специфічні для геномів C, M, N, S, S^b, S^l, S^s, U: далі цю пару праймерів позначали PinaCM (табл.). Один продукт ампліфікації з цією парою праймерів виявлено у *Thinopyrum*, двох зразках *Ae. biuncialis* NK 13-2-1 і NK B1-1, сортах пшениці Білява, Істра-1 і Антонівка, *Ae. cylindrica* L. (геномна формула CCDD), а також *D. villosum* (рис. 2).

Продуктів ампліфікації з праймерами PinaCM не одержано у *T. durum* і у тритикале. Якщо для *T. durum* такий результат був очікуваним, то у випадку тритикале можна зробити висновок, що ці праймери не є специфічними для геному R. Довжина одержаного продукту ампліфікації у решти зразків – приблизно 500 п. н., що відповідає очікуваній довжині продукту ампліфікації гена, що кодує пуроіндолін а.

Таблиця. Послідовності використаних праймерів до пуроіндолінових генів [10, 11]

| Ген | Назва праймера | Нуклеотидна послідовність праймера |
|-------------|----------------|------------------------------------|
| <i>Pina</i> | PinaDH-F | 5'-GGTGTGGCCTCATCTCATCT-3' |
| | PinaDH-R | 5'-AAATGGAAGCTACATCACCAGT-3' |
| | PinaCM-F | 5'-CCAAAACACACTGACAACATGA-3' |
| | PinaCM-R | 5'-CGCAGTGGTATGTGACAGTTT-3' |
| <i>Pinb</i> | Pinb-F | 5'-AATAAAGGGGAGCCTCAACC-3' |
| | Pinb-R | 5'-CGAATAGAGGCTATATCATCACCA-3' |

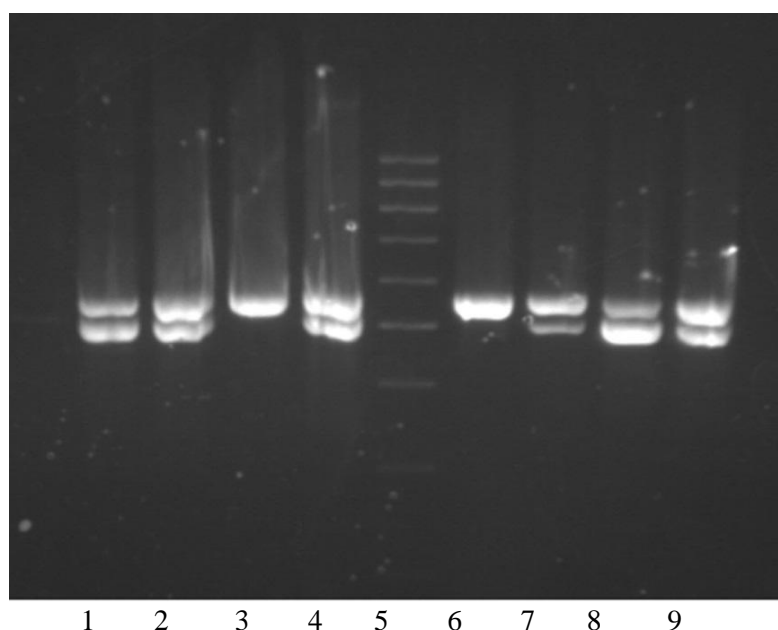


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ПЛР з ген-специфічними праймерами PinaDH [11]: 1 – пирій *Thinopyrum*; 2 – *Ae. biuncialis* NK 13-2; 3 – *T. durum*, сорт Ізольда; 4 – *Ae. biuncialis* NK B1-1; 5 – маркер довжин 100 bp DNA ladder; 6 – *D. villosum* L.; 7 – тритикале, сорт Волемир; 8 – *T. aestivum*, сорт Білява; 9 – *T. aestivum*, сорт Антонівка.

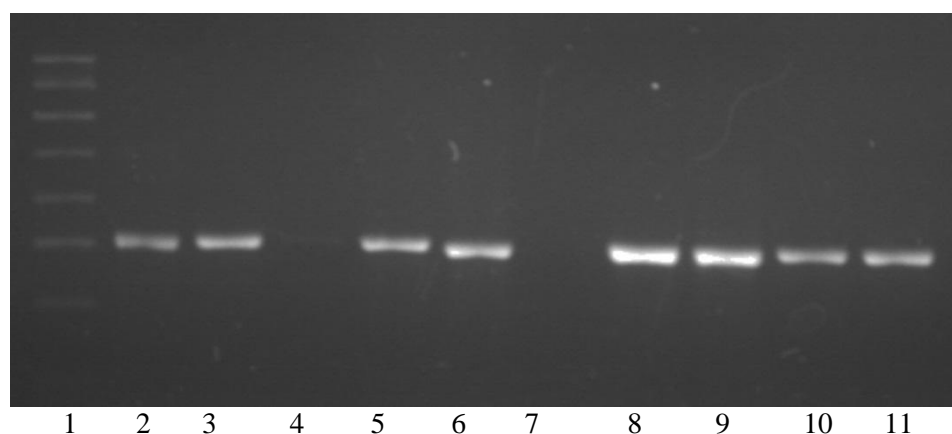


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР з ген-специфічними праймерами PinaCM [10]: 1 – маркер довжин 100 bp DNA ladder; 2 – пирій *Thinopyrum*; 3 – *Ae. biuncialis* NK 13-2; 4 – *T. durum*, сорт Ізольда; 5 – *Ae. biuncialis* NK B1-1; 6 – *D. villosum* L.; 7 – тритикале, сорт Волемир; 8 – *T. aestivum*, сорт Білява; 9 – *T. aestivum*, сорт Істра 1; 10 – *Ae. cylindrica*; 11 – *T. aestivum*, сорт Антонівка.

Отже, пара праймерів PinaCM дозволяє ампліфікувати послідовність гена *Pina-D1* у *T. aestivum*, гомеологічних генів *Pina-U1* і *Pina-M1* у *Ae. biuncialis*, *Pina-D1* і *Pina-C1* у *Ae. cylindrica*, *Pina-E1* *Thinopyrum*, *Pina-V1* *D. villosum*. Тому ці праймери є специфічними не тільки для геномів С, М, N, S, S^b, S^l, S^s, U, як зазначено у [10], а також для геномів D, E і V. Виявлено поліморфізм довжин продуктів ампліфікації з використанням пари праймерів PinaCM. Продукти ампліфікації з праймерами PinaCM у *Ae. biuncialis* мають більшу довжину, ніж продукти ампліфікації гена, що кодує пуринолінін а пшениці м'якої, пирію, *D. villosum*, *Ae. cylindrica*.

Для ампліфікації послідовності гена *Pinb-D1* та гомеологічних генів спочатку використовували праймери, наведені в статті Massa et al.

[11], далі ці праймери називали Pinb (табл.). Згідно з Massa et al. [10, 11], цей праймер є специфічним для гена *Pinb-1* геномів D, A^m, A^u, H, R, C, M, N, S, S^b, S^l, S^s, U.

У зразків пирію, *T. aestivum* та тритикале спостерігався один продукт ампліфікації (Рис. 3). Очікувано були відсутні продукти ампліфікації у *T. durum*. У зразка *D. villosum* також не одержано ампліконів. Очевидно, використана пара праймерів Pinb не є специфічною для геному V. У зразків *Ae. biuncialis* виявлено поліморфізм за числом ампліконів – у зразка НК 13-2-1 було два продукти ампліфікації, а у зразка НК В1-1 – один. У зразка НК 13-2-1 амплікони генів *Pina-U1* і *Pina-M1* мають різну довжину, тоді як у зразка НК В1-1 – однакову, або ампліфікується один ген.

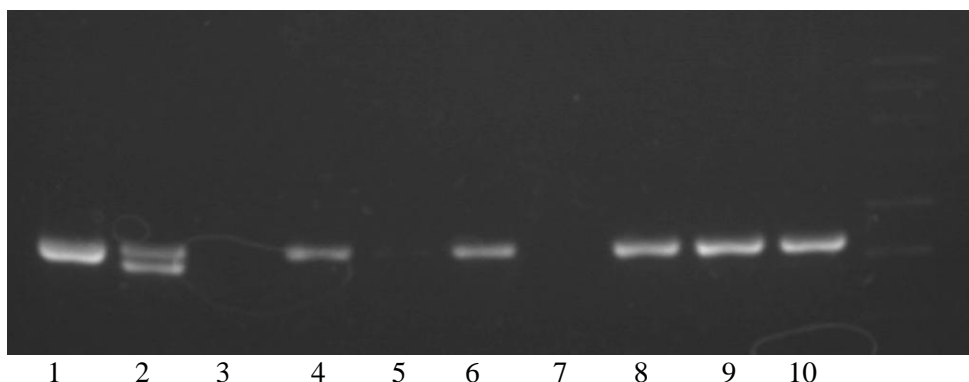


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ПЛР з ген-специфічними праймерами Pinb [47] (2 % агарозний гель): 1 – пирій *Thinopyrum*; 2 – *Ae. biuncialis* НК 13-2; 3 – *T. durum*, сорт Ізольда; 4 – *Ae. biuncialis* НК В1-1; 5 – *D. villosum* L.; 6 – тритикале, сорт Волемир; 7 – *T. aestivum*, сорт Істра-1; 8 – *Ae. cylindrica*; 9 – *T. aestivum*, сорт Антонівка; 10 – маркер довжин 100 bp DNA ladder.

Висновки

Уточнено генну і геномну специфічність праймерів до пуринолінових генів. Пара праймерів PinaDH не є ген-специфічною, оскільки дає два продукти ампліфікації генів *Pina-1* і *Gsp-1*. Ця пара праймерів не є специфічною для гена *Pina-1* геному V *D. villosum*. Пари прайме-

рів, позначені PinaCM та Pinb, є ген-специфічними, оскільки дають один продукт ампліфікації з відповідною довжиною. Нами з'ясовано, що праймер PinaCM є також специфічним для геномів D, E і V, а пара праймерів Pinb не є специфічною для геному V.

Література

1. Douliez J.P., Michon T., Elmorjani K., Marion D. Minireview: Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels. *J. Cereal Sci.* 2000. Vol. 32, № 1. P. 1–20. doi: 10.1006/jcrs.2000.0315.
2. Dubreil L., Gaborit T., Bouchet B., Gallant D.J., Broekaert W.F., Quillien L., Marion D. Spatial and temporal distribution of the major isoforms of puroindolines (puroindoline-a and puroindoline-b) and nonspecific lipid transfer protein (ns-LTPle1) of *Triticum aestivum* seeds. Relationships with the *in vitro* antifungal properties. *Plant Sci.* 1998. Vol. 138. P. 121–135. doi: 10.1016/S0168-9452(98)00121-6.
3. Pauly A., Pareyt B., Fierens E., Delcour J.A. Wheat (*Triticum aestivum* L. and *T. turgidum* L. ssp. *durum*) kernel hardness: I. Current view on the role of puroindolines and polar lipids. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2013. Vol. 12. P. 413–426. doi: 10.1111/1541-4337.12018.

4. Morris C.F. Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness. *Plant Mol. Biol.* 2002. Vol. 48. P. 633–647. doi: 10.1023/A:1014837431178.
5. Gautier M.F., Aleman M.E., Guirao A., Marion D., Joudrier P. *Triticum aestivum* puroindolines, two basic cystine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. *Plant Mol. Biol.* 1994. Vol. 25. p. 43–57. doi: 10.1007/BF00024197.
6. Elmorjani K., Geneix N., Dalgarrondo M., Branlard G., Marion D. Wheat grain softness protein (Gsp1) is a puroindoline-like protein that displays a specific post-translational maturation and does not interact with lipids. *J. Cereal Sci.* 2013. Vol. 58. P. 117–122. doi: 10.1016/j.jcs.2013.03.012.
7. Giroux J., Morris C.F. Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b. *PNAS USA.* 1998. Vol. 95. P. 6262–6266.
8. Gautier M.F., Cosson P., Guirao A., Alary R., Joudrier P. Puroindoline genes are highly conserved in diploid ancestor wheats and related species but absent in tetraploid *Triticum* species. *Plant Sci.* 2000. Vol. 153, № 1. P. 81–91. doi: 10.1016/S0168-9452(99)00258-7.
9. Charles M., Tang H., Belcram H., Paterson A., Gornicki P., Chalhou B. Sixty million years of evolution of soft grain trait in grasses: emergence of the softness locus from the common ancestor of *Pooideae* and *Ehrhartoideae*, after their divergence from *Panicoideae*. *Mol. Biol. Evol.* 2009. Vol. 26, No. 7. P. 1651–1661. doi: 10.1093/molbev/msp076.
10. Massa A., Morris C.F. Molecular evolution of the puroindoline-a, puroindoline-b, and grain softness protein-1 genes in the tribe *Triticeae*. *J. Mol. Evol.* 2006. Vol. 63, № 4. P. 526–536. doi: 10.1093/molbev/msp076.
11. Massa A.N., Morris C.F., Gill B.S. Sequence diversity of puroindoline-a, puroindoline-b, and the grain softness protein genes in *Aegilops tauschii* Coss. *Crop. Sci.* 2004. Vol. 44. P. 1808–1816.
12. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.

References

1. Doulliez J.P., Michon T., Elmorjani K., Marion D. Minireview: Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels. *J. Cereal Sci.* 2000. Vol. 32, № 1. P. 1–20. doi: 10.1006/jcsc.2000.0315.
2. Dubreil L., Gaborit T., Bouchet B., Gallant D.J., Broekaert W.F., Quillien L., Marion D. Spatial and temporal distribution of the major isoforms of puroindolines (puroindoline-a and puroindoline-b) and nonspecific lipid transfer protein (ns-LTP1) of *Triticum aestivum* seeds. Relationships with the *in vitro* antifungal properties. *Plant Sci.* 1998. Vol. 138. P. 121–135. doi: 10.1016/S0168-9452(98)00121-6.
3. Pauly A., Pareyt B., Fierens E., Delcour J.A. Wheat (*Triticum aestivum* L. and *T. turgidum* L. ssp. *durum*) kernel hardness: I. Current view on the role of puroindolines and polar lipids. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2013. Vol. 12. P. 413–426. doi: 10.1111/1541-4337.12018.
4. Morris C.F. Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness. *Plant Mol. Biol.* 2002. Vol. 48. P. 633–647. doi: 10.1023/A:1014837431178.
5. Gautier M.F., Aleman M.E., Guirao A., Marion D., Joudrier P. *Triticum aestivum* puroindolines, two basic cystine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. *Plant Mol. Biol.* 1994. Vol. 25. p. 43–57. doi: 10.1007/BF00024197.
6. Elmorjani K., Geneix N., Dalgarrondo M., Branlard G., Marion D. Wheat grain softness protein (Gsp1) is a puroindoline-like protein that displays a specific post-translational maturation and does not interact with lipids. *J. Cereal Sci.* 2013. Vol. 58. P. 117–122. doi: 10.1016/j.jcs.2013.03.012.
7. Giroux J., Morris C.F. Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b. *PNAS USA.* 1998. Vol. 95. P. 6262–6266.
8. Gautier M.F., Cosson P., Guirao A., Alary R., Joudrier P. Puroindoline genes are highly conserved in diploid ancestor wheats and related species but absent in tetraploid *Triticum* species. *Plant Sci.* 2000. Vol. 153, № 1. P. 81–91. doi: 10.1016/S0168-9452(99)00258-7.
9. Charles M., Tang H., Belcram H., Paterson A., Gornicki P., Chalhou B. Sixty million years of evolution of soft grain trait in grasses: emergence of the softness locus from the common ancestor of *Pooideae* and *Ehrhartoideae*, after their divergence from *Panicoideae*. *Mol. Biol. Evol.* 2009. Vol. 26, No. 7. P. 1651–1661. doi: 10.1093/molbev/msp076.
10. Massa A., Morris C.F. Molecular evolution of the puroindoline-a, puroindoline-b, and grain softness protein-1 genes in the tribe *Triticeae*. *J. Mol. Evol.* 2006. Vol. 63, № 4. P. 526–536. doi: 10.1093/molbev/msp076.
11. Massa A.N., Morris C.F., Gill B.S. Sequence diversity of puroindoline-a, puroindoline-b, and the grain softness protein genes in *Aegilops tauschii* Coss. *Crop. Sci.* 2004. Vol. 44. P. 1808–1816.
12. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Moscow: Mir, 1984. 480 p.

SOZINOVA O.I.¹, KOZUB N.A.^{1,2}, SOZINOV I.A.¹, BLUME Ya.B.²

¹ *Institute of Plant Protection, NAAS of Ukraine,*

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 33, e-mail: natalkozub@gmail.com

² *Institute of Food Biotechnology and Genomics, NAS of Ukraine,*

Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskogo str., 2a

GENOME SPECIFICITY OF PRIMERS TO PUROINDOLINE GENES

Aim. Genome specificity of primers for amplification of complete coding sequences of puroindoline genes was studied.

Methods. PCR with gene-specific primers was performed for amplification of puroindoline genes of wheat and related

species. **Results.** The primer pair designated PinaDH is not gene-specific as it yields two products of amplification of

the genes *Pina-1* and *Gsp-1*. This primers pair is not specific for the *Pina-1* gene of the genome V of *D. villosum*. The

primer pairs designated PinaCM and Pinb are gene-specific as they produce one amplification product of respective

length. We have demonstrated that the PinaCM primer pair is also specific for the genomes D, E and V, and the Pinb

primer pair is not specific for the genome V. **Conclusions.** Gene and genomic specificity of primers for puroindoline

genes was refined. Primers suitable for further direct sequencing of coding parts of puroindoline genes of wheat and

related species were chosen.

Keywords: puroindoline, *Triticum aestivum*, *Aegilops*, *Dasypyrum*, genome specificity.