

УДК 574.3+575.17:582.736

**Мартынов В.В.<sup>1</sup>, Дорохов Д.Б.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Центр «Биоинженерия» РАН (г. Москва)

<sup>2</sup>Московский государственный областной университет

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНА *MIPS1* У РАСТЕНИЙ РОДА *GLYCINE*

**V. Martynov<sup>1</sup>, D. Dorokhov<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Bioengineering Center of the Russian Academy of Sciences, Moscow

<sup>2</sup>Moscow State Regional University

### IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF *MIPS1* GENE IN THE GENUS *GLYCINE*

**Аннотация.** На основании литературных данных и изучения базы данных нуклеотидных последовательностей NCBI были подобраны праймеры для полимеразной цепной реакции (ПЦР) амплификации у растений, принадлежащих к роду *Glycine*, фрагмента гена *MIPS1*, продукт которого принимает участие в биосинтезе фитиновой кислоты. В результате были клонированы и секвенированы 15 ампликонов. Анализ полученных последовательностей показал, что все они принадлежат гену *MIPS1* видов *Glycine max*, *G. soja* и *G. gracilis*. Сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей выявил полиморфизм их первичной структуры. Данные о нуклеотидной последовательности гена *MIPS1* и его полиморфизме у видов *G. soja* и *G. gracilis* были получены впервые.

**Ключевые слова:** дикорастущая соя, *Glycine soja*, генетическое разнообразие, фитиновая кислота, ген *MIPS1*, молекулярные маркеры.

**Abstract.** Based on the literature data and the study of nucleotide database of NCBI, the part of gene *MIPS1*, involved in the biosynthesis of phytic acid, was PCR amplified in plants belonging to the genus *Glycine*. The resulting amplicons (15 amplicons) were cloned and sequenced. Analysis of the sequences showed that they all belong to a gene *MIPS1* in species *Glycine max*, *G. soja* and *G. gracilis*. Comparative analysis of obtained nucleotide sequences revealed a polymorphism of their primary structure. Furthermore, data about the nucleotide sequence of gene *MIPS1* and its polymorphism in species *G. soja* and *G. gracilis* were obtained for the first time.

**Key words:** wild soybean, *Glycine soja*, genetic diversity, phytic acid, *MIPS1* gene, molecular markers.

Генетике биосинтеза фитиновой кислоты растениями уделяется большое внимание в связи с важностью этого химического соединения с диетологической и хозяйственно-экологической точек зрения. Проблема снижения содержания фитиновой кислоты в семенах культурных растений, и в частности сои, стоит очень остро. Однако естественных мутантов с пониженным содержанием фитиновой кислоты у культурных растений до сих пор не обнаружено. Поэтому для создания форм растений с пониженным содержанием фитиновой кислоты широко применяется искусственный мутагенез. В результате, за последние годы искусственные мутанты с пониженным содержанием фитиновой кислоты были получены у кукурузы (*Zea mays*) [8; 10], риса (*Oryza sativa*) [7], ячменя (*Hordeum vulgare*) [2; 6; 9], пшеницы (*Triticum aestivum*) [5], фасоли (*Phaseolus vulgaris*) [4] и сои (*Glycine max*) [11].

С использованием подхода прямой генетики у этих растений были идентифицированы гены, мутации в которых приводят к уменьшению содержания фитиновой кислоты в тканях растений. В частности у *G. max* было идентифицировано шесть генов, мутации в которых приводили к снижению уровня фитиновой кислоты в семенах. Первые четыре гена относятся

к семейству генов, кодирующих мио-инозитолфосфатсинтазы (MIPS) – ферменты, катализирующие первый этап синтеза фитиновой кислоты. Эти четыре гена (*MIPS1-MIPS4*) экспрессируются в разных тканях растения и картированы на четырех различных хромосомах В1, G, А1 и А2, соответственно [12]. Пятый ген кодирует белок, относящийся к семейству белков множественной лекарственной устойчивости (MRPs). Он картирован на хромосомах N и L. Шестой ген кодирует инозитолфосфаткиназу (IPK), и он был картирован на хромосоме В2.

Однако природный полиморфизм этих генов у культурной и дикой сои совершенно не изучен. Между тем искусственный мутагенез часто сопряжен с потерей хозяйственно ценных признаков, всхожести и жизнеспособности у мутантов и их потомства, поэтому использование традиционной селекции при создании новых сортов с пониженным содержанием фитиновой кислоты является предпочтительным, но для этого необходимы знания о существующем в природе разнообразии генов, вовлеченных в процесс биосинтеза фитиновой кислоты. Поэтому целью данной работы было изучение полиморфизма гена биосинтеза фитиновой кислоты *MIPS1* в естественных популяциях *G. soja*, произрастающих на территории юга Дальнего Востока России и юга Китая, а также у сортов культурной сои *G. max* и вида *G. gracilis*.

## Материалы и методы

**Растительный материал.** Образцы культурной *Glycine max* (L.) Merr. и полудикуой *Glycine gracilis* Skvortz сои были получены из коллекции ВИР, а образцы дикой сои *Glycine soja* Sieb. & Zucc. были собраны сотрудниками Центра «Биоинженерия» РАН во время экспедиций на Дальний Восток России. Для целей исследования было отобрано два стародавних китайских сорта культурной сои (номера 5341 и 5382 по каталогу ВИР), два современных сорта культурной сои – Марината (российской селекции) и Штайн (селекции США); два образца полукультурной

сои *G. gracilis* (номера, 5675 и 5776 по каталогу ВИР); четыре образца дикой сои из естественной популяции дикой сои вблизи села Екатериновка Приморского края, и три образца дикой сои, собранных вблизи поселка Камень Рыболов Приморского края. Кроме того, китайскими коллегами из Университета провинции Чжэцзян (КНР) нам была передана коллекция образцов геномной ДНК дикой сои из провинции Чжедзян (юг Китая), состоящая из 90 образцов, из которой в рабочую коллекцию были включены два образца. Таким образом, была составлена выборка образцов, относящихся к трем различным видам рода *Glycine* и происходящих из разных географических регионов. Семена растений дикой и культурной сои проращивали на чашках Петри. Проростки были высажены в почву в теплице. Растения выращивались в течение трех недель при температуре 23-25°C, влажности окружающего воздуха 20-40%, и шестнадцатичасовом искусственном освещении (с 7 до 23 часов).

**Выделение ДНК.** Геномную ДНК выделяли из настоящих листьев при помощи набора реагентов «SILICA plant» производства ООО компании «Биоком» по протоколу фирмы производителя. Для выделения геномной ДНК брали фрагмент настоящего листа растения площадью примерно 1 см<sup>2</sup> (масса около 0,1 г).

**Условия ПЦР.** Препараты геномной ДНК амплифицировали с праймерами MIPS-F (TG GGAACAATGATGGTATGAATCTT) и MIPS-R (AGAATCATGT-TATTCTCTGGGGCC), подобранными на основании множественного выравнивания обнаруженных в базе данных NCBI нуклеотидных последовательностей, гомологичных гену *MIPS1*. Эти праймеры амплифицировали фрагмент размером 911 п.н., включающий в себя часть экзона 7, экзон 8, экзон 9 и часть экзона 10 и, соответственно, интроны 8, 9 и 10, гена *MIPS1* (рис. 1). Программа для амплификации была следующей: 94°C – 5 мин. (первичная денатурация), затем 35 циклов, состоящих из следующих этапов: 94°C – 30 сек., 60°C – 30 сек. и 72°C – 1 мин., и финальный синтез:

72°C – 5 мин. Объем реакционной смеси составлял 25 мкл. На одну реакцию брали 50 нг геномной ДНК. Амплификацию проводили с помощью прибора GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Inc., USA). Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в 1% агарозном геле в 0,5X TBE буфере.

**Клонирование и секвенирование.** ПЦР-продукты клонировали в вектор pAL-TA (Евроген) по протоколу фирмы производителя. Секвенирование полученных ПЦР-продуктов проводили по методу Сэнгера с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Inc., USA) на автоматическом секвенаторе ABI PRIZM 3730 (Applied Biosystems, Inc., USA) согласно инструкциям производителя.

**Математическая обработка данных.** Для анализа полученных последовательностей и построения дендрограммы использовали компьютерные программы ClustalW 1.83, GeneDoc и Treecon.

## Результаты и обсуждение

В результате выполнения настоящей работы впервые были получены данные о нуклеотидной последовательности и полиморфизме гена *MIPS1* у растений видов *G. soja* и *G. gracilis*, а для *G. max* полученные данные расширяют существующие представление о полиморфизме гена *MIPS1* у этого вида. Все полученные последовательности были зарегистрированы в базе данных NCBI под

номерах JQ397312 – JQ397326. Сравнение полученных сиквентов с нуклеотидными последовательностями гена *MIPS1* сои и последовательностями других генов этого семейства *MIPS2*, *MIPS3* и *MIPS4* сои показало, что они принадлежат именно гену *MIPS1* (рис. 2). При этом все полученные последовательности обладают одинаковой длиной и идентичной экзонно-интронной структурой между собой и с геном *MIPS1*.

В общей сложности во всех 15 последовательностях гена *MIPS1*, полученных при выполнении данного исследования, была выявлена 31 нуклеотидная замена по сравнению с консенсусной последовательностью этого гена, полученной на основе множественного выравнивания ранее известных его последовательностей (табл. 1). Распределение выявленного полиморфизма не носит видоспецифичного характера, т. е. при анализе нуклеотидных последовательностей данного участка гена *MIPS1* у видов *G. max*, *G. soja* и *G. gracilis* не выявлены межвидовые различия между ними. Это наглядно видно на дендрограмме на рис. 2, где последовательности, полученные из *G. max*, *G. soja* и *G. gracilis*, не образовали видоспецифичных кластеров. Все это свидетельствует об эволюционном консерватизме гена *MIPS1* у рода *Glycine*, который может быть обусловлен важностью данного гена для жизнеспособности растения (фитиновая кислота является основной формой фосфорсодержащих запасных веществ в семенах [1]), в силу чего мутации, нарушающие экспрессию гена *MIPS1*, элиминируются

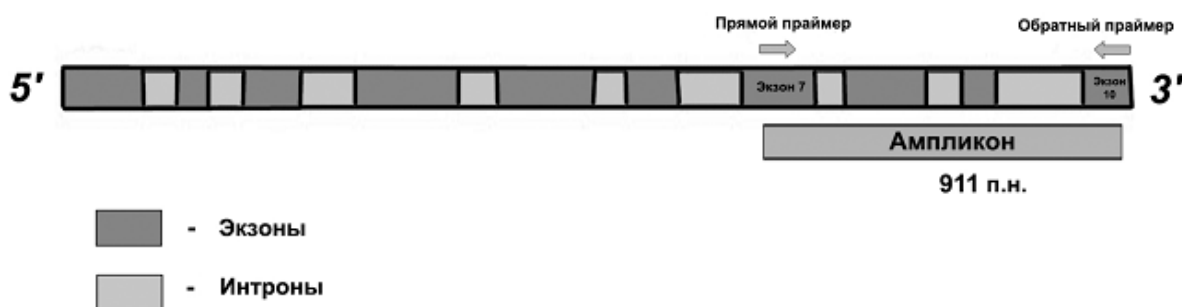


Рис. 1. Экзонно-интронная структура гена *MIPS1* сои и стратегия амплификации его фрагмента

Таблица 1

**Полиморфизм нуклеотидных последовательностей гена *MIPS1*, полученных при выполнении данной работы**

	Ген <i>MIPS1</i>																															
	Положение																															
	3	3	4	4	4	5	6	7	7	9	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	5	5	6	6	7	8	8	8	8			
3	5	4	7	9	0	3	3	4	6	0	1	4	0	1	4	5	0	1	2	3	6	5	7	0	8	3	1	2	3	8		
										6	4	2	8	5	3	0	4	9	4	6	1	7	7	2	9	4	6	8	7	2		
Консенсус	C	A	C	T	C	C	A	T	T	A	T	C	T	T	T	G	A	G	A	A	T	T	A	T	T	A	T	T	G	G	T	
Seq1 JQ397312 <i>G. max</i> ВИР 5341	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	
Seq2 JQ397313 <i>G. max</i> ВИР 5382	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Seq3 JQ397314 <i>G. soja</i> Чжедзян	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	
Seq4 JQ397315 <i>G. max</i> сорт Марината	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Seq5 JQ397316 <i>G. max</i> сорт Штайн	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Seq6 JQ397317 <i>G. soja</i> Камень Рыболов	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	*	*	*	G	*	*	*	*	*	G	*	C	*	*	*		
Seq7 JQ397318 <i>G. soja</i> Камень Рыболов	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Seq8 JQ397319 <i>G. soja</i> Камень Рыболов	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C	
Seq9 JQ397320 <i>G. soja</i> Екатеринбург	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	*
Seq10 JQ397321 <i>G. soja</i> Екатеринбург	*	*	T	A	A	*	*	A	*	*	*	T	C	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Seq11 JQ397322 <i>G. soja</i> Екатеринбург	*	G	*	*	A	A	G	*	A	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	
Seq12 JQ397323 <i>G. soja</i> Екатеринбург	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Seq13 JQ397324 <i>G. soja</i> Чжедзян	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Seq14 JQ397325 <i>G. gracilis</i> ВИР 5675	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Seq15 JQ397326 <i>G. gracilis</i> ВИР 5776	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C	*	*	C	*	A	*	*	*	

\* - обозначает нуклеотид, совпадающий с нуклеотидом в консенсусной последовательности.

естественным отбором. Также о консерватизме гена *MIPS1* у образцов дикой сои из географически удаленных мест произрастания свидетельствует тот факт, что последовательности гена *MIPS1* у образцов дикой сои с юга Китая обладают минимальными отличиями между собой и от консенсусной последовательности по сравнению образцами юга Дальнего Востока (табл. 1).

Тем не менее у сортов культурной сои *G. max* впервые был выявлен полиморфизм 319 A/C (табл.1). Эта замена присутствует у образца сорт Марината (JQ397315), но, кроме этого, она присутствует в двух образцах гена

*MIPS1* культурной сои, описанных китайскими исследователями (EF155568 и EF155569 в базе данных NCBI), а в других последовательностях гена *MIPS1* культурной сои, известных на сегодняшний день (7 последовательностей), она отсутствует. Таким образом, наличие этой замены у трех независимых образцов, отсеквенированных в разных лабораториях, свидетельствует о том, что она не является артефактной. Эта замена является несинонимической и приводит к изменению аминокислоты в соответствующем положении с гистидина на пролин, что, в свою очередь, может приводить к изменению ак-

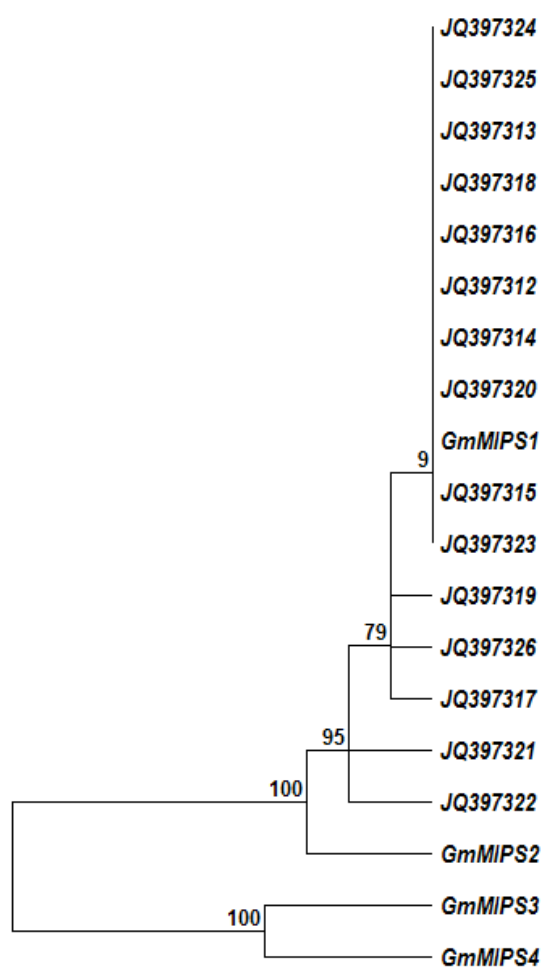


Рис. 2. Дендрограмма по результатам множественного выравнивания генов семейства MIPS сои и полученных последовательностей.

*GmMIPS1* – *GmMIPS4* – гены *MIPS1*-*MIPS4* *G. max* (EF155568, DQ323906, DQ323907 и DQ323908, соответственно); JQ397312, JQ397313, JQ397315 и JQ397316 – последовательности, клонированные из *G. max*; JQ397314, JQ397317, JQ397318, JQ397319, JQ397320, JQ397321, JQ397322, JQ397323 и JQ397324 – последовательности, клонированные из *G. soja*; JQ397325 и JQ397326 – последовательности, клонированные из *G. gracilis*.

тивности кодируемого фермента. Это делает целесообразным создание на основе этого полиморфизма ДНК маркера для изучения степени распространенности данной нуклеотидной замены у различных сортов культурной сои.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Andaya C.B., Tai T.H. Fine mapping of the rice low phytic acid (*Lpa1*) locus // *Theor. Appl. Genet.* – 2005. – V. 111. – P. 489-495.
2. Bowen D.E. A low phytic acid Barley mutation alters seed gene expression / D.E. Bowen, E.J. Souza, M.J. Guttieri, V. Raboy, Fu J // *Crop Sci.* – 2007. – V. 47(S2). – P. 149-159.
3. Chappell A.S. Characterization of the MIPS gene family in *Glycine max* / A.S. Chappell, A.M. Scaboo, X. Wu, V.R. Pantalone, K.D. Bilyeu // *Plant Breed.* – 2006. – V. 125. – P. 493-500.
4. Fileppi M. Characterisation of structural genes involved in phytic acid biosynthesis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) / M. Fileppi, I. Galasso, G. Tagliabue, M.G. Daminati, B. Campion, E. Doria, F. Sparvoli // *Mol. Breed.* – 2010. – V. 25. – P. 453-470.
5. Guttieri M. Identification of a low phytic acid wheat / M. Guttieri, D. Bowen, J.A. Dorsch, E. Souza, V. Raboy // *Crop Sci.* – 2004. – V. 44. – P. 418-424.
6. Larson S.R. Linkage mapping 2 mutations that reduce phytic acid content of barley grain / S.R. Larson, K.A. Young, A. Cook, T.K. Blake, V. Raboy // *Theor. Appl. Genet.* – 1998. – V. 97. – P. 141-146.
7. Larson S.R. Isolation and genetic mapping of a non-lethal rice (*Oryza sativa* L.) low phytic acid 1 mutation / S.R. Larson, J.N. Rutger, K.A. Young, V. Raboy // *Crop. Sci.* – 2000. – V. 40. – P. 1397-1405.
8. Raboy V. Origin and seed phenotype of maize low phytic acid 1-1 and low phytic acid 2-1 / V.Raboy, P.F.Gerbasi, K.A. Young, S.D. Stoneberg, S.G. Pickett, A.T. Bauman, P.P.N. Murthy, W.F. Sheridan, D.S. Ertl // *Plant Physiol.* – 2000. – V. 124. – P. 355-368.
9. Rasmussen S.K., Hatzack F. Identification of two low-phytate barley (*Hordeum vulgare* L.) grain mutants by TLC and genetic analysis // *Hereditas.* – 1998. – V. 129. – P. 107-112.
10. Shi J.R. The maize lowphytic acid mutant *lpa2* is caused by mutation in an inositol phosphate kinase gene / J.R. Shi, H.Y. Wang, Y.S. Wu, R.B. Meeley, D.S. Ertl // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 131. – P. 507-515.
11. Wilcox J.R. Isolation of high seed inorganic P, low-phytate soybean mutants / J.R. Wilcox, G.S. Premachandra, K.A. Young, V. Raboy // *Crop. Sci.* – 2000. – V. 40. – P. 1601-1605.
12. Yuan F.J. Generation and characterization of two novel low phytate mutations in soybean (*Glycine max* L. Merr.) / F.J. Yuan, H.J. Zhao, X.L. Ren, S.L. Zhu, X.J. Fu, Q.Y. Shu // *Theor. Appl. Genet.* – 2007. – V. 115. – P. 945-957.