УДК 575.116.4:577.112.382

© 2011

А. С. Кочевенко, А. Р. Ферні

Картування генів томата, задіяних у метаболізмі амінокислот з розгалуженим ланцюгом

(Представлено академіком НАН України Ю. Ю. Глебою)

28 генів, які кодують 24 ферменти, асоційовані з метаболізмом амінокислот з розгалуженим ланцюгом лейцину, валіну та ізолейцину, було картовано шляхом аналізу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів у популяції інтрогресивних ліній томата. Жоден із них не був локалізований на хромосомі 4, тоді як на хромосомах 1, 6, 7, 8, 9, 11 та 12 було картовано щонайменше по три гени. Порівняльний аналіз хромосомного розташування цих генів та місцезнаходження ЛКО для амінокислот з розгалуженим ланцюгом виявив декілька випадків їх колокалізації. Із семи ідентифікованих ЛКО, які впливають на вміст відразу трьох амінокислот з розгалуженим ланцюгом, тільки для п'яти була відмічена колокалізація зі структурними генами даного метаболічного шляху, тоді як поява інших двох ЛКО найімовірніше була зумовлена іншими генами.

Більшість господарсько-цінних ознак, наприклад, таких як розмір, маса плодів, вміст первинних метаболітів у плодах тощо, є кількісними ознаками, що контролюються багатьма генами, експресія яких значною мірою залежить від умов навколишнього середовища. Використання різноманітних типів молекулярних маркерів ДНК, як-от: поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів (RFLP), довільно ампліфіковані поліморфні ДНК (RAPD), поліморфізми довжини ампліфікованих фрагментів (AFLP), та STS-маркерів забезпечило нові підходи для вивчення кількісних ознак. Наприклад, із застосуванням молекулярних маркерів стало можливим розділити ознаки на окремі локуси кількісних ознак (ЛКО, QTLs-quantitative trait loci) та локалізувати їх на генетичній карті.

Культурний томат *Lycopersicon esculentum* (за новою класифікацією *Solanum lycopersicum*) є унікальною модельною системою для вивчення комплексних генетичних ознак завдяки наявності великої кількості інтрогресивних ліній у роді *Lycopersicon* та існуванню детальних молекулярних та класичних генетичних карт.

Метою проведеного нами дослідження було виявити молекулярні основи ідентифікованих раніше ЛКО, які впливають на вміст амінокислот з розгалуженим ланцюгом у перикарпі томата. Також нами виконано картування генів, задіяних у метаболізмі лейцину, валіну та ізолейцину, і аналіз можливої косегрегації місцезнаходження цих генів з локалізацією виявлених ЛКО.

Досліджували популяцію, яка складалася з 75 інтрогресивних ліній томата, отриманих від схрещування культурного томата *L. esculentum* (сорту M82) з його диким зеленоплідним родичем *L. pennellii* (LA 716) [1, 2]. Кожна лінія містила один інтрогресивний хромосомний сегмент від дикого виду на генетичному фоні культурного томата. Кожний сегмент становив приблизно 12 сМ і був детально охарактеризований шляхом аналізу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ) [3], http://www.sgn.cornell.edu. Усі разом інтрогресивні лінії забезпечували повне покриття геному томата та його розподіл на 107 окремих сховищ (bins). Сховище являє собою певний хромосомний регіон, з обох кінців обмежений молекулярними маркерами.

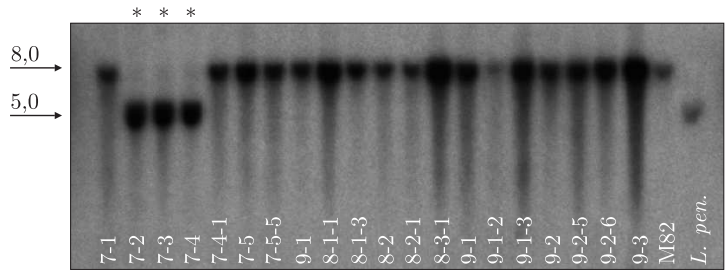

Рис. 1. Саузерн-блот-гібридизація з використанням як зонда кДНК гена кетол-кислої редуктоізомерази. Кожен трек містить 15 мкг тотальної ДНК окремої інтрогресивної лінії культурного томата сорту M82 або *L. pennellii*, розщепленої за допомогою ферменту Xba I. Стрілки вказують на розмір ДНК фрагментів у т. п. н. Зірочками відмічені лінії, які успадкували даний ген від дикого виду *L. pennellii*

За результатами попереднього дослідження 26 хромосомних регіонів були ідентифіковані як ЛКО, що впливають на вміст амінокислот з розгалуженим ланцюгом в плодах томата [4]. Встановлено, що 7 із них справляли значний вплив на накопичення всіх трьох амінокислот — лейцину, валіну та ізолейцину, тоді як решта 19 регіонів призводили до варіацій у складі тільки однієї або двох амінокислот. Також треба відзначити, що наявність дикого алеля спричиняла як позитивний, так і негативний ефект.

Для подальшої характеристики ЛКО ми використовували метод гена-кандидата, який полягає у пошуку генів, які сегрегують разом із локусом, що відповідає за варіацію певної ознаки [5, 6]. Гени, що кодують ферменти біосинтезу або катаболізму амінокислот з розгалуженим ланцюгом є найбільш очевидними кандидатами для ЛКО, що змінюють кількісний та якісний вміст амінокислот. Картування цих генів здійснювали шляхом аналізу ПДРФ у популяції інтрогресивних ліній томата. Для цього спочатку у публічно доступній колекції EST [7] був проведений пошук нуклеотидних послідовностей, які відповідають 24 ферментам, асоційованим із метаболізмом амінокислот з розгалуженим ланцюгом. Відповідні кДНК культурного томата були клоновані, і в подальшому їх використовували як зонди. Тотальну ДНК ізолювали з листків батьківських та інтрогресивних ліній томата як було описано раніше [8]. 10–15 мкг ізольованої ДНК обробляли рестрикційними ендонуклеазами за рекомендаціями фірми-виробника (“Roche”, Німеччина).

Після рестрикції отримані рестрикційні фрагменти розділяли шляхом електрофорезу в 0,8% агарозі, після чого переносили на мембрану Porablot (“Macherey Nagel”, Німеччина) за допомогою капілярного методу [9]. ДНК вставки з EST клонів мітили P32 за допомогою довільного гексамерного методу [10]. Оскільки деякі з даних ферментів, наприклад амінотрансферази, кодуються невеликими сімействами генів, то для того, щоб виключити можливість крос-гібридизації пробами з високим рівнем гомології і точніше визначити локалізацію локусів, гібридизацію проводили за жорстких умов (65 °C) у розчині, який містив 0,9 M NaCl, 0,05 M NaH_2PO_4, pH 7,7, 0,5 мМ Na_2-EDTA, 1% SDS, 100 мкг/мл денатурованої ДНК лосося та 50–100 нг радіоактивно міченого зонда.

Поліморфізм послідовностей ДНК *L. esculentum* і *L. pennellii* виявлявся як варіювання довжини фрагментів ДНК, гомологічних до радіактивно міченої кДНК (рис. 1). Для виявлення поліморфізму між батьківськими видами по кожному гену було протестовано більше 40 різних ендонуклеаз. Загалом було картовано 28 генів, які кодують 24 ферменти, асоційованих із синтезом або деградацією лейцину, валіну та ізолейцину. Жоден із цих 28 генів не був локалізований на хромосомі 4, тоді як на хромосомах 1, 6, 7, 8, 9, 11 та 12 було

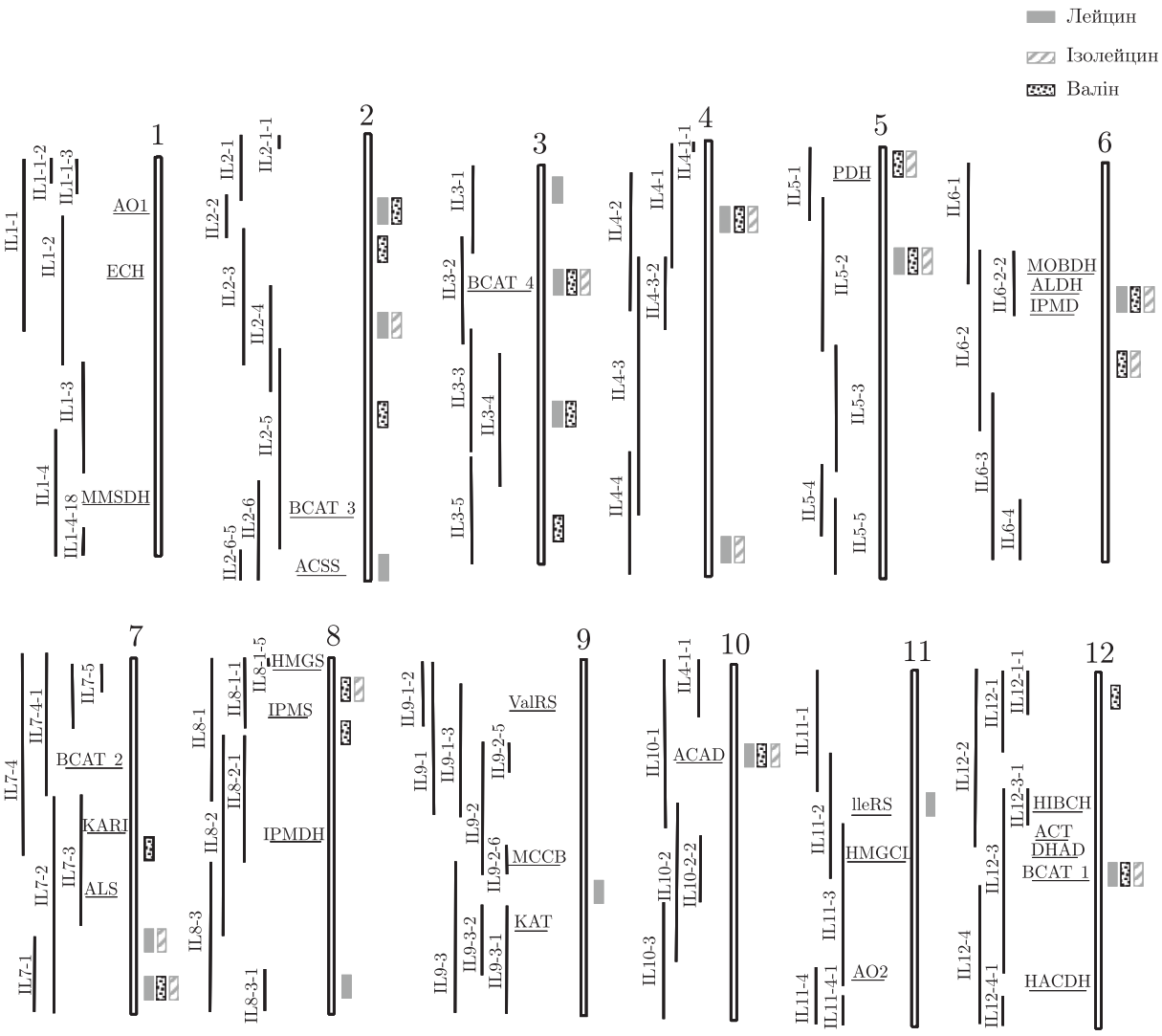

Рис. 2. Знаходження на хромосомній карті томата ЛКО і генів, пов'язаних з метаболізмом амінокислот з розгалуженим ланцюгом. Інтрогресовані фрагменти для кожної лінії, а також гени вказані зліва від хромосом. Виявлені ЛКО наведені справа від хромосом

картовано щонайменше по три гени, асоційованих із метаболізмом амінокислот з розгалуженим ланцюгом (рис. 2, табл. 1).

Порівняльний аналіз хромосомного розташування цих генів з ЛКО для амінокислот з розгалуженим ланцюгом виявив 16 випадків їх колокалізації. Так, було виявлено 13 Ізол, 17 Лей та 18 Вал ЛКО. У семи випадках були відмічені координовані зміни всіх трьох амінокислот. Встановлено, що два із семи ЛКО колокалізувались з різними ізоформами амінотрансфераз (BCAT1 — хромосома 12, BCAT4 — хромосома 3), задіяними в метаболізмі амінокислот з розгалуженим ланцюгом. Також встановлено збіг місцезнаходження цих ЛКО з локалізацією генів, які кодують дигідрокси-кислу дегідратазу та 3-гідроксиізобутирил-КоА-гідролазу. Три ЛКО, розташовані на хромосомах 5, 6 та 10, колокалізувались із структурними генами, які кодують такі ферменти даного метаболічного шляху, як піруватдегідрогеназа, 3-метил-2-оксобутаноатдегідрогеназа, альдегіддегідрогеназа, 3-ізопропілма-

Таблиця 1. Ідентифікація розташування генів, які кодують ферменти біосинтезу і деградації валіну, лейцину та ізолейцину у культурному томаті, за допомогою аналізу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів

Ген	Фермент, що ним кодується	Ідентифікаційний номер вірогідної послідовності	Ідентифікаційний номер клону	Сховище[1]	Рестрикційний фермент[2]
ACSS	Ацетил-КоА-синтетаза	TC165635	cTOE14H4	2-L	Hind III
ALS	Ацетолактатсинтетаза	TC154185	cTOF30A24	7-F	Eco RI
KARI	Кетол-кисла редуктоізомераза	TC162067	cLEN3B13	7-E	Xba I
DHAD	Дигідрокси-кисла дегідратаза	TC154979	cTOF29C14	12-E	Xba I
BCAT1	Амінотрансфераза 1	TC185974	cLEN12H13	12-F	Eco NI
BCAT2	Амінотрансфераза 2	TC179761	cLEC38O16	7-D	Xba I
BCAT3	Амінотрансфераза 3	TC179169	cTOF24N6	2-K	Hind III
BCAT4	Амінотрансфераза 4	TC175453	cLEC37H2	3-C	Bfr I
ValRS	Валін-тРНК-лігаза	TC163648	cTOF31A15	9-B	Alu I
IPMS	2-ізопропілмалатсинтаза	TC179996	cLEM1B21	8-B	Hind III
IPMD	3-ізопропілмалатдегідратаза	TC223373	cTOC24D10	6-C	EcoR I
IPMDH	3-ізопропілмалатдегідрогеназа	TC170664	cTOF32G6	8-E	Xba I
PDH	Піруватдегідрогеназа	TC162427	cTOF33A1	5-A	EcoR I
IleRS	Ізолейцин-тРНК-лігаза	TC163785	cLER20M19	11-C	Alu I
ACAD	Ацил-КоА-дегідрогеназа	TC154996	cTOF9B11	10-B	EcoN I
HMGCL	Гідроксиметилглютарил-КоА-ліаза	TC155960	cLEW25K8	11-D	Hind III
AO1	Альдегідоксидаза 1	TC169815	cLED28A11	1-C	EcoR V
AO2	Альдегідоксидаза 2	TC169816	cLEX4L24	11-F	Xba I
ALDH	Альдегіддегідрогеназа	TC162363	cTOF13O6	6-C	Bfr I
HMGS	Гідроксиметилглютарил-КоА-синтаза	TC153674	cLEI14B17	8-A	Hind III
HIBCH	3-гідроксіізобутирил-КоА-гідролаза	TC163476	cLET38H17	12-D	EcoR V
KAT	3-кетоацил-КоА-тіолаза	TC161957	cLEG26E6	9-J	EcoN I
ACT	Ацилтрансфераза (відповідає за перенесення груп інших, ніж аміноацильні групи)	TC171921	cLER16J12	12-E	Xba I
MMSDH	Метилмалонат-семіальдегіддегідрогеназа	TC162910	cTOF32D7	1-I	EcoR I
MCCB	Метилкротоніл-КоА-карбоксилаза	TC156006	cTOF19D1	9-G	Hind III
MOBDH	3-метил-2-оксобутаноатдегідрогеназа	TC171279	cLER8C3	6-C	EcoR V
HACDH	3-гідроксіацил-КоА-дегідрогеназа	TC154493	cTOF33K17	12-H	Dra I
ECH	Еноїл-КоА-гідратаза	TC159643	cTOB15N14	1-D	EcoN I

[1]Розташування сховищ на хромосомній карті томата згідно з [3].
[2]Поліморфізм між *L. esculentum* (сорт M82) і *L. pennellii* виявлено за допомогою відповідної рестрикційної ендонуклеази.

латдегідратаза та ацил-КоА-дегідрогеназа (див. рис. 2). Також не виявлено колокалізації двох координованих ЛКО, розташованих на хромосомах 4 і 7, з жодним із картованих генів. Таким чином, поява цих двох ЛКО не пов'язана з функцією структурних генів, а скоріше за все обумовлена впливом регуляторних генів.

1. *Eshed Y., Abu-Abied M., Saranga Y., Zamir D. Lycopersicon esculentum lines* containing small overlapping introgressions from L. pennellii // Theor. and Appl. Genet. – 1992. – **83.** – P. 1027–1034.
2. *Eshed Y., Zamir D.* A genomic library of *Lycopersicon pennellii* in L. *esculentum*: A tool for fine mapping of genes // Euphytica. – 1994. – **79**. – P. 175–179.
3. *Pan Q., Liu Y. S., Budai-Hadrian O. et al.* Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: tomato and Arabidopsis // Genetics. – 2000. – **155**. – P. 309–322.

4. *Schauer N., Semel Y., Roessner U. et al.* Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement // Nat. Biotech. – 2006. – **24**. – P. 447–454.
5. *Pflieger S., Lefebvre V., Causse M.* The candidate gene approach in plant genetics // Mol. Breeding. – 2001. – **7**. – P. 275–291.
6. *Etienne C., Rothan C., Moing A. et al.* Candidate genes and QTLs for sugar and organic acid content in peach (Prunus persica L. Batsch) // Theor. and Appl. Genet. – 2002. – **105**. – P. 145–159.
7. *Van der Hoeven R., Ronning C., Giovannoni J. et al.* Deductions about the Number, Organization, and Evolution of Genes in the Tomato Genome Based on Analysis of a Large Expressed Sequence Tag Collection and Selective Genomic Sequencing // Plant. Cell. – 2002. – **14**. – P. 1441–1456.
8. *Doyle J. J., Doyle J. L.* Isolation of Plant DNA from fresh tissue // Focus. – 1990. – **12**. – P. 13–15.
9. *Southern E. M.* Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis // J. Mol. Biol. – 1975. – **98**. – P. 503–517.
10. *Feinberg A. P., Vogelstein B.* A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity // Anal. Biochem. – 1983. – **132**. – P. 6–13.

Інститут клітинної біології
та генетичної інженерії НАН України, Київ
Макс-Планк-Інститут молекулярної
фізіології рослин, Гольм, Німеччина

Надійшло до редакції 03.11.2010

A. S. Kochevenko, A. R. Fernie

Mapping the genes associated with metabolism of branched chain amino acids in tomato

28 genes encoding 24 enzymes involved in the metabolism of the branched chain amino acids (leucine, valine, and isoleucine) are mapped by the RFLP method on the population of tomato introgression lines. Of 28 genes mapped, none was mapped on chromosome 4, whereas chromosomes 1, 6, 7, 8, 9, 11, and 12 harbored three genes each. When the chromosome positioning of these genes was compared to the previously determined quantitative trait loci (QTL) for the branched chain amino acids, several colocations were apparent. Five of the seven QTL, in which the coordinate changes for all three amino acids were observed, were found to co-localize with distinct structural genes of the branched chain metabolic pathway. Two of the coordinate QTL did not co-locate with any of the mapped enzymes. Hence, their appearence may depend on the function of other genes.