

А. С. Кочевенко, А. Р. Ферні

Аналіз алельних варіантів гена фруктокінази двох інбредних ліній томата

(Представлено академіком НАН України Ю. Ю. Глебою)

Клоновано ген фруктокінази із вишневидної та звичайної форм культурного томата. Проведено порівняльну характеристику нуклеотидної послідовності гена FRK3 та ензиматичних властивостей ізоформи фруктокінази, що ним кодується, у двох лініях культурного томата. Аналіз рівня транскриптів FRK3 за допомогою нозерн-блот гібридизації не виявив відмінностей у типі експресії гена для двох даних алелей.

Томат *Solanum lycopersicum* є однією з найважливіших сільськогосподарських культур. За обсягами споживання у всьому світі томат займає другу позицію після картоплі серед овочів. На сучасному етапі зусилля селекціонерів значною мірою сконцентровано на отриманні сортів з високою стійкістю до захворювань, врожайністю, розміром плодів та високими органолептичними якостями, як-то смак, запах, колір, текстура плодів та ін. Смак плодів томата переважно залежить від вмісту кислот, насамперед лимонної та яблучної, і цукрів, а також їх співвідношення. Серед цукрів найбільше значення мають глюкоза і фруктоза; вважається, що остання відіграє головну роль у виникненні солодкого присмаку плодів томата [1, 2]. Більшість комерційних сортів томата мають низький вміст цукрів у плодах, тому збільшення їх рівня, особливо фруктози, є одним із головних підходів покращення смакових властивостей плодів [3]. Сорти культурного томата з дрібними плодами (вишневидні томати), а також деякі види диких томатів, зокрема *S. chmielewskii*, *S. habrochaites*, *S. pimpinellifolium*, можуть бути використані як потенційні донори генів, що містять високий рівень цукрів у плодах.

Фруктокіназа (FRK, EC 2.7.1.4) відіграє важливу роль у вуглеводному метаболізмі рослин. FRK забезпечує фосфорилування фруктози, що утворюється внаслідок розщеплення основного транспортного цукру сахарози сахарозосинтазою або інвертазою, і таким чином уможливує її подальший метаболізм. Чотири гени FRK1–FRK4, що кодують фруктокіназу в томаті, було клоновано і картовано. FRK гени мають відмінно-специфічний тип експресії, крім цього, ізоформи фруктокінази, що ними кодуються, відрізняються за біохімічними характеристиками, а саме спорідненістю до субстрату, нуклеотидною специфічністю та інгібуванням іонами магнію [4, 5]. FRK3 є одним з найбільш експресованих генів з родини фруктокіназ у томата. Найбільшу кількість FRK3 транскрипту виявлено в листках, апікальних меристемах та плодах томата. FRK3 ген було локалізовано на нижньому кінці другої хромосоми між маркерами CD66 і TG154 у геномному регіоні, що становить 22,4 сМ [6]. У попередніх дослідженнях із використанням інтрогресивних ліній (IL) культурного томата, отриманих від схрещування з культурними або дикими родичами, також встановлено, що на хромосомі 2 локалізовано три окремих локуси кількісних ознак (QTLs) Sugs2.1, Sugs2.2 і Sugs2.3, які контролюють загальний вміст цукрів у плодах томата [7]. Таким чином, колокалізація QT локусу Sugs2.2 із геном FRK3 вказує на важливу роль останнього в контролі вмісту цукрів у перикарпі томата.

© А. С. Кочевенко, А. Р. Ферні, 2013

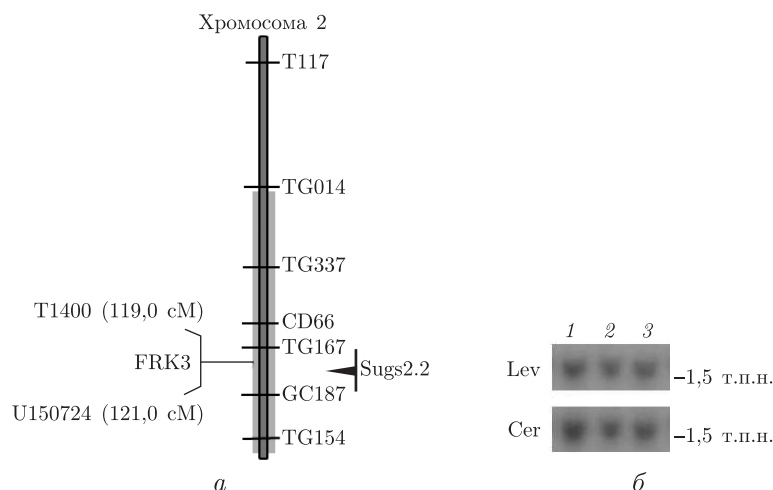


Рис. 1. Локалізація гена FRK3 на хромосомній карті культурного томата (а) та аналіз його експресії (б). Lev — інbredна лінія Levovil; Cer — інbredна лінія Cervil; сірий прямокутник — інтрогресивний хромосомний сегмент в лінії IL-L2. б — результати нозерн-блотингу: 1 — листки; 2 — зелені плоди; 3 — червоні плоди

Завданням даного дослідження було клонування гена FRK3 із вишневидної (Cervil) і великоплідної (Levovil) ліній томата, вивчення алельних відмінностей експресії цього гена та кінетичних характеристик ізоформи фруктокінази FRKIII, що ним кодується.

Оскільки геном томата було сиквененовано, то, використовуючи публічно доступну нуклеотидну послідовність геному *S. lycopersicum*, спочатку нами було проведено уточнення локалізації гена FRK3. За результатами аналізу, геномний регіон було зменшено до сегмента у 3 сМ (рис. 1, а), який включає локуси T1400 і U150724. Встановлено добрий збіг місцезнаходження гена FRK3 із локалізацією QT локусу Sugs2.2, який було картовано на хромосомі 3 між маркерами TG167 і GC187 [8]. Таким чином, ген FRK3 дійсно може розглядатися як ген-кандидат, що відповідає за виникнення QTL Sugs2.2 у інтрогресивних лініях томата.

Як рослинний матеріал використовували рослини інтрогресивної лінії томата IL-L2, одержаної від схрещування двох інbredних ліній Levovil (рекурентна батьківська форма) і Cervil (донорна батьківська форма). Cervil (*Solanum lycopersicum* var *cerasiforme*) є вишневидною формою томата з дрібними плодами масою 8–10 г, тоді як Levovil (*Solanum lycopersicum* L.) формує плоди, які досягають 120–150 г.

Нами було проведено аналіз вмісту розчинних цукрів у червоних плодах рослин IL-L2 та батьківських ліній томата. Для цього перикарпну тканину (120 мг) спочатку заморожували в рідкому азоті і гомогенізували в 1 мл 100% етанолу. Екстракт інкубували 90 хв при 70 °С, центрифугували (11000 g, 10 хв). Вміст сахарози, фруктози та глюкози в супернатанті вимірювали за допомогою ензиматичного методу згідно з [9]. За отриманими даними, вміст розчинних цукрів у плодах рослин лінії Cervil був досить високим і сягав 50–60 мг/г сирої речовини. Натомість вміст цукрів у плодах другої батьківської лінії Levovil був удвічі меншим (див. рис. 1, а). Рослини IL-L2 характеризувалися підвищеним вмістом цукрів у плодах порівняно з Levovil, що обумовлюється наявністю генетичного регіону донора (Cervil), який містить TG167 і GC187 локуси і становить приблизно 11 сМ. У цілому ж ефект заміни алеля по цьому QTL становив 19–20%.

Сумарну РНК з плодів IL-L2 і Levovil ізолювали за допомогою Trizol реагенту (“Invitrogen”, Німеччина). Реакції зворотної транскрипції та ампліфікації повнорозмірної коду-

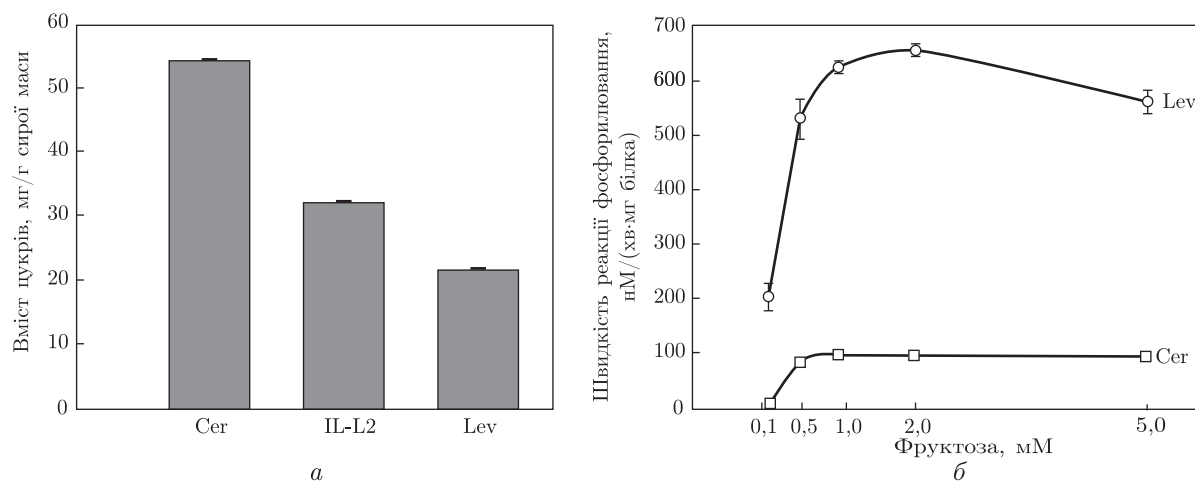


Рис. 2. Вміст розчинних цукрів у перикарпі на стадії повної стиглості (а) на ензиматична активність FRK3 (б). Lev — інbredна лінія Levovil; Cer — інbredна лінія Cervil; IL-L2 — інтрогресивна лінія томата

ючої послідовності обох алелів гена FRK3 проводили відповідно до раніше опублікованих методик [10]. Для ампліфікації використовували такі геноспецифічні праймери:

прямий — CACCATGGCTCTTCATGCTACTGCTTTC,

зворотний — TGCAACTGACTTGAGCAAGG.

ПЛР ампліфіковані продукти розміром 1167 п. н. було клоновано у вектор pYES-DEST52 (“Invitrogen“, Німеччина) і сиквеновано. За результатами аналізу нуклеотидних послідовностей виявлено декілька одонуклеотидних поліморфізмів (SNP) між алельними варіантами Cervil і Levovil гена FRK3.

Деякі з виявлених нуклеотидних замін, наприклад, у складі кодонів 223 і 383 призводили до змін амінокислотного складу протеїнів. Так, для FRKIII, що кодується Cervil алелем, було характерно заміщення аспарагінової кислоти на гістидин (D → H) та аланіну на треонін (A → T) у положеннях 223 і 383 відповідно.

Експресію рекомбінантних протеїнів проводили в мутантному штамі дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*) DFY632 із втраченою здатністю до фосфорилування гексоз. Очищення цільових протеїнів здійснювали методом металоафінної хроматографії на Ni²⁺-NTA агарозі (“Qiagen“, Німеччина) згідно з рекомендаціями фірми-виробника. Активність очищеного протеїну визначали спектрофотометрично за методом [4].

Графік залежності швидкості реакції від концентрації субстрату наведено на рис. 2. Активність ферментів обох алелей зростає з підвищенням концентрації фруктози від 0,1 до 2,0 мМ. Максимальна активність FRK3 спостерігається при 2 мМ фруктози і становить 94,9 та 652,7 нМ/хв на 1 мг білка для ферментів, що кодуються Cervil і Levovil алелями відповідно. Слід також зазначити, що для Levovil ферменту було характерно явище субстратного інгібування. Зокрема, при підвищенні концентрації фруктози в середовищі інкубації від 2 до 5 мМ активність ферменту знижувалася. На відміну від Levovil для Cervil FRKIII ензиму такого пригнічення активності ферменту не відмічено. За даними трьох незалежних експериментів проводили розрахунок кінетичних параметрів реакції (K_M , V_{max}) за рівнянням Міхаеліса–Ментен (табл. 1). Розраховані величини істотно відрізнялися між собою для двох алелів. Для ферментів, що кодуються Levovil та Cervil алелями, величини K_M для фруктози становили 0,16 і 0,30 мМ відповідно. Це вказує на те, що спо-

Таблиця 1. Кінетичні параметри реакції фосфорилування фруктози Levovil та Cervil FRKIII ензимів; $M \pm m$, $n = 6$

Алель	K_M , мМ	V_{max} , нМ/(хв · мг білка)	V_{max}/K_M
Cervil	$0,30 \pm 0,12$	$111,50 \pm 10,68$	0,38
Levovil	$0,16 \pm 0,05$	$665,80 \pm 36,56$	4,04

рідненість ферменту FRKIII Levovil до фруктози перевищує таку для Cervil у два рази (див. табл. 1).

Оскільки молекулярні основи алельних варіацій QTL можуть полягати не тільки у зміні функції протеїнів, але й у зміні експресії генів, то додатково нами проведено аналіз експресії гена FRK3 за допомогою нозерн-блот гібридизації в листках, а також зелених та червоних плодах томата (див. рис. 1, б). Отримані дані виявили, що ген FRK3 має транскрипційну активність у перикарпі томата, яка незначно нижча, ніж у листовій тканині. Разом з тим будь-яких відмінностей у рівні експресії між алелями Cervil і Levovil не виявлено.

Отримані результати аналізу транскрипційної активності FRK3 гена, а також досліджені біохімічні особливості Cervil і Levovil алелей свідчать на користь того, що ген FRK3 відіграє ключову роль у підвищенні рівня цукрів у плодах інтрогресивних ліній томата. Таким чином, беручи до уваги результати наших досліджень, можна зробити висновок, що внутрішньовидові схрещування можуть успішно застосовуватися з метою поліпшення якісних показників, зокрема отримання солодкого присмаку у промислових сортів томата. До того ж внутрішньовидові схрещування дають можливість уникнути проблем, пов'язаних зі стерильністю гібридів, що виникають у випадку використання диких видів як донорів.

1. Malundo T. M., Shewfelt R. L., Scott J. W. Flavor quality of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as affected by sugar and acid levels // Postharvest Biol. Technol. – 1995. – **6**. – P. 103–110.
2. Stevens M. A. Tomato quality: Potential for developing cultivars with improved flavor // Acta Hort. – 1979. – **93**. – P. 317–329.
3. Baldwin E. A., Scott J. W., Einstein M. A. et al. Relationship between sensory and instrumental analysis for tomato flavor // J. Am. Hort. Sci. – 1998. – **123**. – P. 906–915.
4. Petreikov M., Dai N., Granot D., Schaffer A. Characterization of native and yeast expressed tomato fructokinases enzymes // Phytoch. – 2001. – **58**. – P. 841–847.
5. German M. A., Dai N., Chmelnitsky I. et al. LeFRK4, a novel tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fructokinase specifically expressed in stamens // Plant Sci. – 2002. – **163**. – P. 607–613.
6. German M. A., Asher I., Petreikov M. et al. Cloning, expression and characterization of *LeFRK3*, the fourth tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) gene encoding fructokinase // Plant Sci. – 2004. – **166**. – P. 285–291.
7. Fulton T. M., Bucheli P., Voirol E. et al. Quantitative trait loci (QTL) affecting sugars, organic acids and other biochemical properties possibly contributing to flavor, identified in four advanced backcross populations of tomato // Euphytica. – 2002. – **127**. – P. 163–177.
8. Lecomte L., Saliba-Colombani V., Gautier A. et al. Fine mapping of QTLs of chromosome 2 affecting the fruit architecture and composition of tomato // Mol. Breed. – 2004. – **13**. – P. 1–14.
9. Gomez L., Bancel D., Rubio E., Vercambre G. The microplate reader: an efficient tool for the separate enzymatic analysis of sugars in plant tissues – validation of a micro-method // J. Sci. Food. Agric. – 2007. – **87**. – P. 1893–1905.
10. Кочевенко А. С., Ферні А. Р. Характеристика гена IPMD-SSU1 *Lycopersicon esculentum* та його роль у біосинтезі лейцину // Доп. НАН України. – 2011. – № 9. – С. 153–158.

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

Надійшло до редакції 04.01.2013

А. С. Кочевенко, А. Р. Ферни

Анализ аллельных вариантов гена фруктокиназы двух инбредных линий томата

Клонирован ген фруктокиназы из вишневидной и обычной форм культурного томата. Проведена сравнительная характеристика нуклеотидной последовательности гена FRK3 и энзиматических свойств изоформы фруктокиназы, которая им кодируется, в двух линиях культурного томата. Анализ уровня транскриптов FRK3 с помощью нозерн-блот гибридизации не выявил различий в типе экспрессии гена для двух данных аллелей.

A. S. Kochevenko, A. R. Fernie

Analysis of allelic variants of the fructokinase gene in two tomato inbred lines

Allelic variants of the tomato fructokinase gene are cloned from a cherry tomato line and a large fruit line. Comparative analyses of the nucleotide sequences of FRK3 gene from two tomato lines and the enzymatic properties of encoded fructokinase isoforms are performed. Northern blot hybridization has revealed no differences in the types of expression for two studied alleles.