

УДК 581.143.6:58.085

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГЕНІВ *Dreb1* У РОСЛИН-РЕГЕНЕРАНТІВ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ, ОТРИМАНИХ ЗІ СТІЙКИХ ДО МОДЕЛЬОВАНОГО ВОДНОГО ДЕФІЦИТУ КАЛЮСНИХ ЛІНІЙ

А.В. БАВОЛ¹, О.В. ДУБРОВНА¹, Б.В. МОРГУН^{1,2}

¹Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17
e-mail: bavol1@rambler.ru

²Інститут клітинної біології і генетичної інженерії Національної академії наук
України
03680 Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

Проведено ідентифікацію генів *Dreb1* за допомогою функціональних маркерів у рослинах-регенерантах пшениці, індукованих зі стійких до модельованого водного дефіциту калюсних ліній та отриманих на контрольному середовищі без селективного чинника. Показано, що амплікони розміром 596 і 717 пн — продукти ампліфікації відповідно генів *Dreb-A1* і *Dreb-B1*, наявні у стійких до водного дефіциту рослинах-регенерантах і відсутні у нестійких формах.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., гени *Dreb1*, водний дефіцит, функціональні маркери стійкості до посухи.

Абіотичні стресори, такі як екстремальні температури, посуха, засолення ґрунтів, пригнічують ріст і розвиток рослин, обмежують географічне поширення та їх використання. Адаптація рослин до цих стресорів включає низку фізіологічних і біохімічних змін, що потребує системного регулювання великої кількості генів у відповідь на ці впливи [14]. Згідно з дослідженнями [2, 3], у процесах адаптації рослин важливу роль відіграє пригнічення експресії генів, й отже, гальмування синтезу білків, характерних для життєдіяльності клітини за звичайних умов, а також активування генів, що кодують білки, які беруть участь в адаптивних реакціях. В останні роки такі дані з'явилися у літературі, присвяченій вивченню впливу на рослини різних за своєю природою стресорів, зокрема посухи. В активуванні генів і синтезі стресових білків під впливом несприятливих чинників ключовими є транскрипційні фактори, наприклад, продукти генів *CBF1*, *DREB1*—*CBFs* (C-repeat binding factors) і *DREB1s* (dehydration responsive element binding factors) [13]. На модельному генетичному об'єкті *Arabidopsis thaliana* L. доведено роль цих генів в індукції транскрипції внаслідок зв'язування з регуляторним елементом *CRT/DRE* (C-repeat/dehydration responsive element), розміщеним у промоторній ділянці багатьох генів, регульованих стрес-чинниками [11]. Зокрема встановлено участь генів *CBF1*, *DREB1* у процесах адаптації рослин до дії холоду [6, 15] й посухи [4, 7]. Показано також, що транскрипція інших генів цієї родини транскрипційних факторів (*AP2/ERF*), таких як *DREB2A* та *DREB2B*, регулюється засоленням [5, 10], високими температурами [9] і зневодненням [12].

© А.В. БАВОЛ, О.В. ДУБРОВНА, Б.В. МОРГУН, 2014

Різними генетичними й біохімічними методами вивчено ключові гени, відповідальні за посухостійкість [16, 17]. У літературі є дані про те, що ген *Dreb1* у третій хромосомі геному *A Triticum aestivum* L. може відповідати за формування толерантності до абіотичних стресових чинників, у тім числі до посухи [4]. Результати цих досліджень, доповнені новою порівняльною і функціональною геномікою, є детальними даними про експресію генів, індукованих посухою, що приводить до накопичення специфічних білків, які забезпечують посухостійкість. Автори праці [17] виділили з геному *A* полінуклеотидну ділянку гена *DrebA1* завдовжки 1670 пн, що кодує 261 амінокислоту, виявили специфічну для пшениці заміну амінокислоти та розробили специфічні праймери для *A*, *B* і *D* геномів пшениці. За допомогою цих функціональних маркерів вже почали аналізувати різні генотипи пшениці для ідентифікації генів *Dreb1* [8].

Ми вперше методом клітинної селекції отримали калюсні лінії пшениці з перехресною стійкістю до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі та водного дефіциту [1], з яких індуковано рослини-регенеранти. Метою цієї роботи була ідентифікація генів *Dreb1* за допомогою функціональних маркерів у рослинах-регенерантах пшениці, індукованих зі стійких калюсних ліній та отриманих на контрольних середовищах без селективних чинників.

Методика

Матеріалом досліджень були рослини-регенеранти пшениці сорту Зимоярка, індуковані зі стійких до модельованого водного дефіциту калюсних ліній, отриманих методом клітинної селекції [1]. Аналізували також рослини-регенеранти того ж сорту, які отримували на контрольному середовищі без селективного чинника. Селективним агентом для моделювання водного дефіциту слугував маніт у різних концентраціях, який додавали до модифікованого середовища МС. Умови проведення експериментів, схеми прямої та ступінчастої клітинної селекції наведено у праці [1].

ДНК екстрагували з листків рослин-регенерантів/проростків за допомогою комплекту реагентів «ДНК-сорб-С» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Росія). Концентрацію та чистоту ДНК визначали спектрофотометрично. Додатково проводили ПЛР з праймерами до референтного гена пшениці *GAPDH*.

В дослідженні використовували геномспецифічні праймери для генів *Dreb1* [17] *Triticum aestivum* L. (табл. 1). Ампліфікацію проводили за такою програмою: для P21F/P21R початкова денатурація при 94 °С — 3 хв;

ТАБЛИЦЯ 1. Геномспецифічні праймери до генів *Dreb1* м'якої пшениці, застосовані в дослідженні [17]

Праймер	Послідовність (5'→3')	Локалізація	Очікуваний розмір амплікона, пн
P21F	CGGAACCACTCCCTCCATCTC	3A	1113
P21R	CGGTTGCCCCATTAGACGTA		
P25F	CTGGCACCTCCATTGCTGCC		596
P18F	CCCAACCCAAGTGATAAATCT	3B	717; 789
P18R	TTGTGCTCCTCATGGGTA		
P20F	TCGTCCCTCTTCTCGCTCCAT	3D	1193
P22F	CTGGCACCTCCATTGCCGCT		596
PR*	AGTACATGAACTCAACGCACAGGACAAC		

*PR — спільний реверс-праймер для P22F і P25F.

35 циклів (денатурація при 94 °С — 30 с, відпал при 63 °С — 30 с, елонгація при 72 °С — 70 с) та фінальна елонгація при 72 °С — 7 хв; для P25F/PR, P22F/PR початкова денатурація при 94 °С — 3 хв; 34 цикли (денатурація при 94 °С — 30 с, відпал при 57 °С — 30 с, елонгація при 72 °С — 39 с) та фінальна елонгація при 72 °С — 7 хв; для P18F/P18R початкова денатурація при 94 °С — 3 хв; 34 цикли (денатурація при 94 °С — 30 с, відпал при 54 °С — 30 с, елонгація при 72 °С — 46 с) та фінальна елонгація при 72 °С — 7 хв; для P20F/P20R початкова денатурація при 94 °С — 3 хв; 34 цикли (денатурація при 94 °С — 30 с, відпал при 59 °С — 30 с, елонгація при 72 °С — 75 с) та фінальна елонгація при 72 °С — 7 хв.

Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила: 10 нг ДНК, 2,5 мкл 10× буфера, 1,5 мкл 2,5 мМ MgCl₂, по 0,2 мМ кожного dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0,2 мкМ праймера та 1 од. Таq-полімерази.

Продукти ампліфікації розділяли методом електрофорезу в 1,4 %-му агарозному гелі з додаванням бромистого етидію. Розділення проводили за напруги 2 В/см у *трис*-ацетатному буфері. Електрофоретичні спектри візуалізували під УФ-променями. Розміри продуктів ампліфікації оцінювали за допомогою маркера GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Розмір продуктів ПЛР визначали за допомогою пакета прикладних програм TotalLab v.2.01 (Nonlinear Dynamics). Стабільність прояву ампліконів перевіряли триразовим повторенням ампліфікації з однією й тією самою парою праймерів на тому ж рослинному матеріалі.

Результати та обговорення

Ми проводили ідентифікацію генів *Dreb1* рослин-регенерантів пшениці, індукованих зі стійких до модельованого водного дефіциту калюсних ліній та отриманих на контрольних середовищах без селективних чинників, за допомогою функціональних маркерів, спеціально синтезованих для А, В і D геномів пшениці. Аналізували зразки вихідного сорту Зимоярка (зразок 1), рослин-регенерантів, стійких до дії модельованого водного дефіциту (зразки 2—5) та нестійких рослин-регенерантів (зразки 6—8). Негативним контролем слугував зразок, що не містив ДНК (ТЕ-буфер) — зразок 9.

Пара праймерів P25F/PR специфічна для гена *Dreb-A1*, що розміщений у третій хромосомі геному А. До цього ж гена специфічна також пара праймерів P21F/P21R. За їх використання в ході ампліфікації ДНК синтезуються фрагменти розміром відповідно 596 і 1113 пн. За допомогою цих праймерів виявлено тільки один амплікон завдовжки 596 пн у вихідному сорті та рослинах-регенерантах, стійких до дії модельованого водного дефіциту (рис. 1).

Водночас ми не виявили цього амплікона в нестійких рослинах-регенерантах. Очікуваного амплікона завдовжки 1113 пн не знайдено в жодному з проаналізованих зразків. Його відсутність в ПЛР-профілях досліджуваних зразків, а також значний вміст неспецифічних фрагментів можуть бути пов'язані з неоптимальними умовами ПЛР або відсутністю відповідних послідовностей в ДНК вихідного сорту.

Гени *Dreb1* у геномі В виявляли за допомогою специфічної пари праймерів P18F/P18R. Отримані спектри продуктів ПЛР наведено на рис. 2.

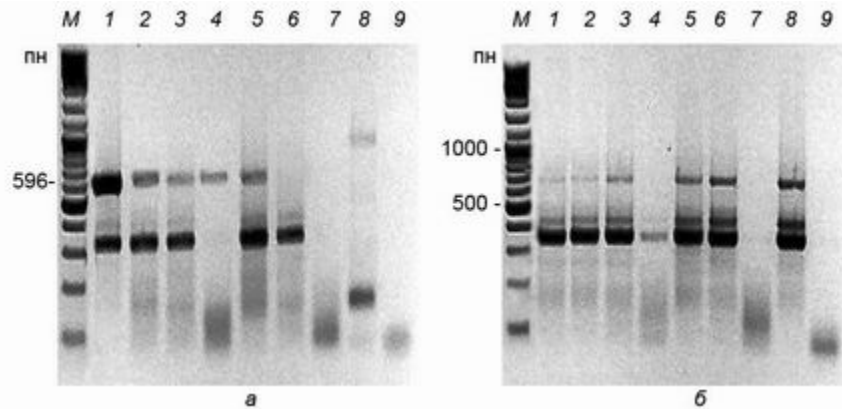


Рис. 1. Продукти ампліфікації ДНК з праймерами P25F/PR (а) та P21F/P21R (б). Тут і на рис. 2, 3:

M — маркер молекулярної маси (100 bp DNA Ladder); *1* — сорт Зимоярка (контроль); 2–5 — рослини-регенеранти, стійкі до дії модельованого водного дефіциту; 6–8 — нестійкі рослини-регенеранти; 9 — негативний контроль (без ДНК)

На спектрах ПЛР як у вихідному генотипі, так і у стійких формах є обидва очікувані амплікони завдовжки 717 і 789 пн. У нестійких формах вони відсутні: у зразку 6 немає амплікона завдовжки 717 пн, у зразках 7 і 8 — обох. Отже, в умовах проведення експерименту встановлено зв'язок між наявністю/відсутністю в спектрах ПЛР фрагмента завдовжки 717 пн та стійкістю рослин-регенерантів до модельованого водного дефіциту. Цікаво, що автори праці [8] у своєму дослідженні, присвяченому оцінюванню посухостійкості різних генотипів пшениці, також вказували на наявність цього амплікона тільки у стійкого сорту Баракатлі-95 та його відсутність в усіх нестійких сортів. Вони пояснили можливу відсутність очікуваних фрагментів у спектрах ПЛР високою варіабельністю зазначеної ділянки геному В. Експериментально підтвердили це припущення автори праці [17]. Порівнявши амінокислотні послідовності *Dreb1* білків, вони виявили найбільш специфічні варіації саме в генотипі В. Зокрема встановлено втрату 24 амінокислот (делеція відповідної ділянки ДНК геному), що може призводити до зміни рівня експресії чи активності гена *Dreb-1*. Описані дані підтверджують ці висновки, оскільки принаймні в одному зразку (6) ми спостерігали втрату одного з очікуваних ампліконів, що може свідчити про перебудову в полінуклеотидних послідовностях цього гена. З огляду на це можна припустити нестабільність гена *Dreb-1*, що може бути причиною описаної в літературі високої варіабельності зазначеної ділянки геному.

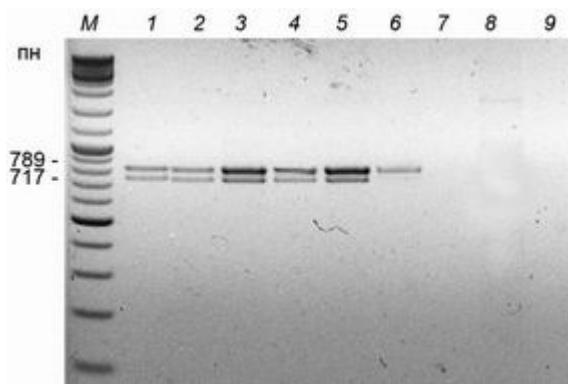


Рис. 2. Продукти ампліфікації ДНК з праймерами P18F/P18R

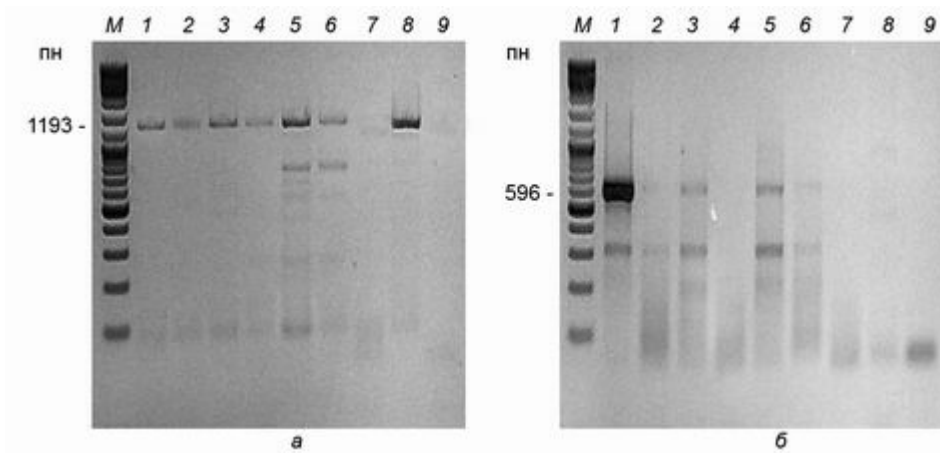


Рис. 3. Продукти ампліфікації ДНК з праймерами P20F/P20R (а) та P22F/PR (б)

Особливістю *Triticum aestivum* L. порівняно з іншими видами є наявність геному D. Тому виявлення генів *Dreb1* на 3D-хромосомі саме в цього гексаплоїдного виду може становити інтерес для подальших досліджень. Ми провели ПЛР-аналіз із використанням пар праймерів P20F/P20R та P22F/PR, специфічних до 3D-хромосомі (рис. 3).

Так, із парою праймерів P20F/P20R виявлено очікуваний амплікон завдовжки 1193 пн у вихідному сорті та всіх отриманих стійких формах, а також у двох зразках (6 і 8) нестійких рослин. У зразку 7 цього фрагмента не було (див. рис. 3, а). За використання праймерів P22F/PR (див. рис. 3, б) чіткий позитивний результат отримано тільки в контрольному варіанті. Слід зазначити, що у стійких форм (зразки 3 і 5) інтенсивність прояву очікуваного фрагмента низька, у решти досліджуваних зразків його не виявлено. Узагальнений результат за використання п'яти пар праймерів наведено в табл. 2.

Отримані дані підтвердили, що добір в умовах *in vitro* може бути ефективною модельною системою для вивчення генетичних особливос-

Таблиця 2. Підсумкова таблиця аналізу наявності генів *Dreb1* у рослинах-регенерантах м'якої пшениці за допомогою геномспецифічних праймерів

Геном	Пара праймерів	Очікуваний розмір амплікона, пн	Контроль	Стійка форма				Нестійка форма		
				1	2	3	4	1	2	3
A	P21F/P21R	1113	—	—	—	—	—	—	—	—
	P25F/PR	596	+	+	+	+	+	—	—	—
B	P18F/P18R	717	+	+	+	+	+	—	—	—
		789	+	+	+	+	+	+/-	—	—
D	P20F/P20R	1193	+	+	+	+	+	+	—	+
	P22F/PR	596	+	—	+/-	—	+/-	—	—	—

П р и м і т к а: «+» — наявність фрагмента, «—» відсутність фрагмента, «+/-» низька інтенсивність прояву амплікона.

тей набуття стійкості до стресових чинників. Ми виявили гени *Dreb-B1* (амплікон 717 пн) і *Dreb-A1* (амплікон 596 пн) у вихідному генотипі та в стійких рослинах-регенерантах, однак вони були відсутні в отриманих нестійких формах, що можна пояснити генетичними перебудовами цієї ділянки геному. Тому ми припустили, що вказані гени необхідні для формування стійкості до модельованого водного дефіциту.

Отже, в результаті дослідження з використанням п'яти пар праймерів, специфічних до генів *Dreb1* пшениці, показано, що тільки чотири з них ефективні для аналізу рослин-регенерантів. Можна припустити, що стійкість до водного дефіциту отриманих форм пов'язана з генетичною мінливістю, яка зачіпає регуляторні гени, зокрема *Dreb1*, та очевидно зумовлена зміною їх експресії. Амплікони розмірами 596 і 717 пн — продукти відповідно генів *Dreb-A1* та *Dreb-B1*, виявлено тільки у стійких до водного дефіциту рослинах-регенерантах, у нестійких формах їх не знайдено.

Робота підтримана грантом спільних наукових проєктів: НАН України (16.05. 2012) та Сибірського відділення РАН (№ 11).

1. Зінченко М.О., Дубровна О.В., Бавол А.В. Селекція in vitro м'якої пшениці на комплексну стійкість до метаболітів збудника офіобольозу та водного дефіциту // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2012. — **10**, № 1. — С. 28—36.
2. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. — Киев: Основа, 2010. — 352 с.
3. Титов А.Ф., Акимова Т.В., Таланова В.В., Топчиева Л.В. Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. — М.: Наука, 2006. — 143 с.
4. De Leonardis A.M., Marone S., Mazzucotelli E. et al. Durum wheat genes upregulated in the early phases of cold stress are modulated by drought in a developmental and genotype dependent manner // Plant Sci. — 2007. — **172**. — P. 1005—1016.
5. Dubouzet J.G., Sakuma Y., Ito Y. et al. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-, salt- and cold-responsive gene expression // Plant J. — 2003. — **33**. — P. 751—763.
6. Fowler S., Thomashow M.F. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway // Plant Cell. — 2002. — **14**. — P. 1675—1690.
7. Haake V., Cook D., Riechmann J.L. et al. Transcription factor CBF4 is regulator of drought adaptation in *Arabidopsis* // Plant Physiol. — 2002. — **130**. — P. 639—648.
8. Huseynova I.M., Rustamova S.M. Screening for drought stress tolerance in wheat genotypes using molecular markers // Proceedings of ANAS (Biol. Sci.) — 2011. — **65**, N 5—6. — P. 132—139.
9. Kang H.G., Kim J., Kim B. et al. Overexpression of FTL1/DDF1, AN AP2 transcription factor, enhances tolerance to cold, drought, and heat stresses in *Arabidopsis thaliana* // Plant Sci. — 2011. — **180**. — P. 634—641.
10. Matsui A., Ishida J., Morosawa T. et al. Arabidopsis transcriptome analysis under drought, cold-, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array // Plant Cell Physiol. — 2008. — **49**. — P. 1135—1149.
11. Medina J., Catala R., Salinas J. The CBFs: Three Arabidopsis transcription factors to cold acclimate // Plant Sci. — 2011. — **180**. — P. 3—11.
12. Nakashima K., Shinwari Z.K., Sakuma Y. et al. Organization and expression of two Arabidopsis DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression // Plant Mol. Biol. — 2000. — **42**. — P. 657—665.
13. Purdy S.J., John D.B., Nelson D.C. et al. A nuclear localized protein, COLD SENSITIV 1, affects the expression of cold-responsive genes during prolonged chilling in *Arabidopsis* // J. Plant Physiol. — 2011. — **168**. — P. 263—269.
14. Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance // J. Exp. Bot. — 2007. — **58**. — P. 221—227.
15. Van Buskirk H.A., Thomashow M.F. Arabidopsis transcription factors regulating cold acclimation // Physiol. plant. — 2006. — **126**, N 1. — P. 72—80.
16. Wang W.S., Pan Y.J., Zhao X.Q. et al. Drought-induced site-specific DNA methylation and its association with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) // J. Exp. Bot. — 2011. — **62**, N 6. — P. 1951—1960.

17. Wei B., Jing R., Wang Ch. et al. *Dreb1* genes in wheat (*Triticum aestivum* L.): development of functional markers and gene mapping based on SNPs // Mol. Breed. — 2009. — 23. — P. 13—22.

Отримано 08.01.2014

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ *Dreb1* У РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ УСТОЙЧИВЫХ К МОДЕЛИРУЕМОМУ ВОДНОМУ ДЕФИЦИТУ КАЛЛЮСНЫХ ЛИНИЙ

А.В. Бавол¹, О.В. Дубровная¹, Б.В. Моргун^{1,2}

¹Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

²Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины, Киев

Проведена идентификация генов *Dreb1* с помощью функциональных маркеров у растений-регенерантов пшеницы, индуцированных из устойчивых к моделируемому водному дефициту каллюсных линий и полученных на контрольной среде без селективного фактора. Показано, что ампликоны размером 596 и 717 пн — продукты амплификации соответственно генов *Dreb-A1* и *Dreb-B1*, выявляются у устойчивых к водному дефициту растений-регенерантов и отсутствуют у неустойчивых форм.

THE IDENTIFICATION OF *Dreb1* GENES IN WHEAT REGENERANTS OBTAINED FROM RESISTANT TO SIMULATED WATER DEFICIT CALLI LINES

A.V. Baval¹, O.V. Dubrovna¹, B.V. Morgun^{1,2}

¹Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

²Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine
148 Acad. Zabolotnogo St., Kyiv, 03143, Ukraine

The *Dreb1* genes in wheat regenerants induced from resistant to simulated water deficit calli lines and received on the control medium without selective factor were identified using functional markers. It is shown that the amplicons 596 and 717 bp — products of genes *Dreb-A1* and *Dreb-B1* respectively, are detecting in resistant to water deficit plants-regenerants and absent in sensitive forms.

Key words: *Triticum aestivum* L., genes *Dreb1*, water deficit, functional markers of resistance to drought.