

РОЗРОБЛЕННЯ ILP-МАРКЕРІВ ДЛЯ ГЕНІВ *PFKFB4* *ТА RAS* У *AEGILOPS TAUSCHII*

С.О. ГОРДИНСЬКИЙ,

аспірант

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки

Національної академії наук України»

ORCID: 0009-0005-7369-3359, E-mail: serhiy_hordinskiy@ukr.net

Анотація. Актуальність дослідження зумовлена поширеністю зернових культур, зокрема пшениці м'якої, одним з предків якої є *Aegilops tauschii*. Розробка нових маркерів, які можуть бути використані для дослідження генетичного різноманіття злаків є актуальною проблемою сьогодення. Метою роботи було розробити ILP (intron length polymorphism) маркери для вивчення поліморфізму довжини інтронів *PFKFB4* та *RAS*-генів у *Aegilops tauschii*, перевірити можливість використання розроблених маркерів для генетичної диференціації *Ae. tauschii* та *Ae. biuncialis*. Для отримання EST послідовностей було використано базу даних NCBI, онлайн інструменти CD-HIT, BLAST та Primer3Plus (для розроблення праймерів). Було розроблено молекулярні маркери *Aet_ILP_1.1*, *Aet_ILP_1.2* і *Aet_ILP_2* та перевірено ефективність їхнього застосування на зразках *Ae. tauschii* та *Ae. biuncialis*. Ампліфіковані фрагменти розділяли за допомогою електрофорезу у неденатуруючому поліакриламідному гелі та фарбували сріблом. За використання маркера *Aet_ILP_1.1* п'ятнадцять зразків *Ae. biuncialis* диференційовано на дві групи. Використовуючи маркер *Aet_ILP_1.2* встановлено, що певні зразки *Ae. tauschii* та *Ae. biuncialis* мали додатковий амплікон на електрофореграмі. За використання маркерної системи *Aet_ILP_2* візуалізувалися амплікони лише у зразків *Ae. biuncialis*. Загалом отримані результати вказують на невисокий рівень внутрішньовидової генетичної мінливості *Ae. tauschii* за розробленими маркерами, натомість, вони можуть бути ефективно використані для оцінки міжвидової диференціації *Ae. tauschii* та *Ae. biuncialis*.

Ключові слова: *Aegilops tauschii*, *Aegilops biuncialis*, генетичні маркери, поліморфізм довжини інтронів.

Вступ.

Пшениця м'яка (*Triticum aestivum*) є однією з найбільш поширених зернових культур в світі, через що вона має велике значення для харчової промисловості (Konev, R. Yu., 2014). Однак, природні та антропогенні зміни, які впливають на розвиток культури, створюють необхідність в постійному виведенні нових сортів пшениці м'якої з високою продуктивністю та стійкістю до різноманітних шкідників та захворювань (Ashfaq, M. et al., 2011).

Aegilops tauschii є одним із найбільш важливих джерел генетичних ресурсів для покращення пшениці. Висока генетична різноманітність цього виду дає можливість створювати нові сорти пшениці з покращеними властивостями (Luo, M.C. et al., 2017). Дослідження *Ae. tauschii* також може допомогти зрозуміти механізми, що забезпечують високу стійкість цього виду до різних факторів середовища, зокрема до хвороб, шкідників та абіотичних стресів (Jafarzadeh J, et al., 2016).

Гени PFKFB4 кодують фруктозо-2,6-біфосфатазу, яка є ключовим регулятором гліколізу та глюконеогенезу в рослинах (Geigenberger, P., 2011). У злаків, таких як пшениця та кукурудза, експресія PFKFB4 виявлена в багатьох органах, включаючи листя, колоски та зерна (Nielsen, T.H. et al., 2004). Деякі дослідження показали, що експресія PFKFB4 може бути посиленою відповідно до стресових умов, таких як посуха або підвищена температура (Cen, W. et al., 2018). Це може свідчити про те, що гени PFKFB4 можуть бути задіяні в адаптації злаків до несприятливих умов навколишнього середовища. Також

дослідження на рисі показали, що збільшення експресії генів PFKFB4 може підвищити вміст цукрів в зерні та покращити якість рису (Li, C. et al., 2020).

Сімейство RAS-генів у злаків відіграє важливу роль у регуляції росту і розвитку рослин, а також у відповіді на стресові умови (Swarup, R., & Bhosale, R., 2019). Ці гени кодують малі білки GTP-ази, які перемикаються між активним та неактивним станом залежно від наявності пов'язаного з ними гуанін-нуклеотиду (Van Ha. et al., 2013). Гени сімейства RAS є ключовими компонентами різних сигнальних каскадів, пов'язаних з метаболізмом, ростом, поділом клітин та іншими біологічними процесами (Zhang, H. et al., 2020). Наприклад, мутації в генах сімейства RAS можуть призводити до різних порушень росту та розвитку у злаків (Tiwari M. et al., 2021). Цікаво, що деякі дослідження показали, що зміна експресії генів сімейства RAS може підвищити стійкість рослин до стресових умов, таких як посуха або солоність ґрунту (Mao, X. et al., 2010). Це пов'язано з тим, що сигнальні каскади, в яких беруть участь RAS-гени, можуть активувати захисні механізми рослин, спрямовані на подолання стресових умов.

Розробка маркерів, що базуються на оцінці поліморфізму довжини інтронів (ILP) різноманітних генів, зокрема PFKFB4 та RAS – один з перспективних напрямків дослідження для оцінки генетичної різноманітності та адаптаційного потенціалу рослин, зокрема *Aegilops tauschii* (Wei, S., Peng, Z., & Yang, Z., 2015). ILP-маркери є економічно вигідними та швидкими для розробки і застосування, оскільки вони не потребують

використання спеціальних реагентів та обладнання (Wang, X., et al., 2005). З огляду на те, що один з геномів пшениці походить від *Ae. tauschii*, перспективним може стати використання розроблених маркерів для генетико-селекційних досліджень *Triticum aestivum* L.

Мета роботи – розробити ІЛР-маркери для PFKFB4 та RAS-генів *Aegilops tauschii* і проаналізувати ефективність їхнього застосування для внутрішньо- та міжвидової диференціації представників роду *Aegilops*.

Матеріали і методи дослідження.

Було проаналізовано вибірку з 30-ти зразків *Aegilops tauschii* та 15-ти зразків *Aegilops biuncialis*. Для отримання інформації щодо екзон-інтронної структури генів використані EST послідовності *Ae. tauschii* з публічної бази даних NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). За застосування онлайн інструменту CD-HIT (Cluster Database at High Identity with Tolerance) (http://weizhong-lab.ucsd.edu/cdhit_suite/cgi-bin/index.cgi) EST були перевірені для видалення повторів. За допомогою BLAST (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/bblast-search>) здійснено порівняння з геномом *Oryza sativa* для ідентифікації положення інтронів, оскільки геном рису повністю анотований. Праймери для ампліфікації інтронів генів підбиралися за використання програми Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

ДНК з насіння виділяли за допомогою ЦТАБ методу. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) здійсню-

вали в ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США), використовуючи 10 мкл реакційної суміші, що містила: 5x ПЛР-буфер із сульфатом амонію, 2,5 ммоль MgCl₂, 50 нг ДНК, 1 мкМ кожного з праймерів, 0,2 ммоль кожного дНТФ, 0,5 од. Taq-полімерази («Thermo Fisher Scientific», США)). Якість отриманої ДНК перевіряли за допомогою електрофорезу в 1 % агарозному гелі, а також визначенням її концентрації спектрофотометрично на біофотометрі «Eppendorf» (США). Умови проведення ПЛР були такими: початкова денатурація – 95°C упродовж 5 хв, 35-40 - циклів ампліфікації (денатурація – 95°C – 30 с, гібридизація праймерів – 59,7 – 60,2° С – 30 с, елонгація – 72°C – 30 с), заключна елонгація - 72°C – 7 хв. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу у 6 %-му неденатуруючому поліакриламідному гелі в 1xTBE-буфері. Фарбування фрагментів ДНК здійснювали нітратом срібла з подальшою фотодокументацією гелів. Електрофореграми аналізували за використання програми GelAnalyzer (<http://www.gelalyzer.com/>). Довжину відтворюваних і чітких фрагментів визначали за допомогою ДНК-маркера (O'Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; «Thermo Fisher Scientific», США).

Результати дослідження та їх обговорення.

У результаті біоінформатичного аналізу з використанням вище зазначених онлайн інструментів було відібрано 181 EST послідовність *Ae. tauschii*, серед яких CX244641.1 (має високий ступінь гомології з генами *O. sativa* PFKFB4) та CX244633.1 (що має

1. Маркери та їхня характеристики

Назва маркеру	Тип праймера	Послідовність	Tm (°C)	Розмір продукту*(п. н.)
Aet_ILP_1.1	F	AAGCTGGATTGCAGGACTTC	60	109
	R	CCCTCCCCTTTTACCATATCA		
Aet_ILP_1.2	F	CTACGAGCCAGTGCAGGAAG	60.5	136
	R	TGCGTACCAATTCACCAAGA		
Aet_ILP_2	F	CCCATTAGGGGTCAATGCTA	59.5	204
	R	CCTCCGTGCTTTCATTTTCT		

* без урахування розміру інтрону

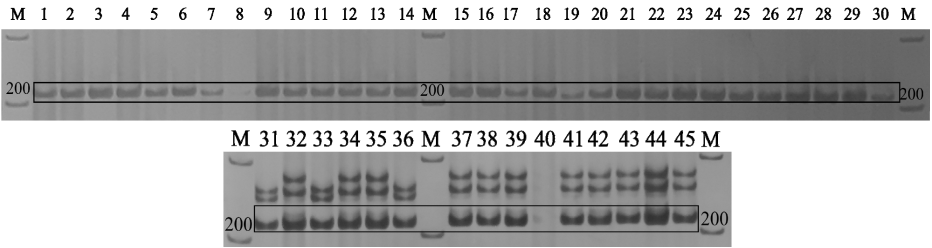


Рис. 1. Електрофореграма, що демонструє результати ПЛР-аналізу зразків егілопсів з використанням маркеру Aet_ILP_1.1. Зразки *Ae. tauschii* - 1-30, *Ae. biuncialis* – 31-45, М – ДНК-маркер «100pb Plus Ladder»

високий ступінь гомології з RAS-генами). У подальшому на підставі аналізу консенсусних послідовностей EST *Ae. tauschii* та *O. sativa* було розроблено молекулярно-генетичні маркери (Aet_ILP_1.1, Aet_ILP_1.2, Aet_ILP_2), що дають можливість оцінити поліморфізм інтронів PFKFB4 та RAS-генів у *Aegilops tauschii*. Їх в подальшому планується використати для генетичної паспортизації і диференціації генотипів *Ae. tauschii* та інших близькосторідних видів культурних та дикорослих злаків. Коротку інформацію щодо маркерів наведено у таблиці 1.

На електрофореграмі (рис.1) зображено результати ПЛР з вико-

ристанням пари праймерів до маркеру Aet_ILP_1.1. На рисунку видно, що фрагменти мають більшу довжину, ніж очікувана (розрахована) довжина продуктів ПЛР без урахування інтрону – 109 п.н., а саме 210 п.н., що може вказувати на наявність інтронів в ампліконах. Також добре видно, що зразки *Ae. tauschii* значно не відрізняються один від одного за цим маркером, виключення хіба-що складають зразки 8 та 19. Проте зразки *Ae. biuncialis*, крім цільового фрагменту (210 п.н.), також мають додаткову зону, яка представлена двома синхронно мігруючими фрагментами у гелях, за якими у досліджених зразків виявлено поліморфізм (250 та 260

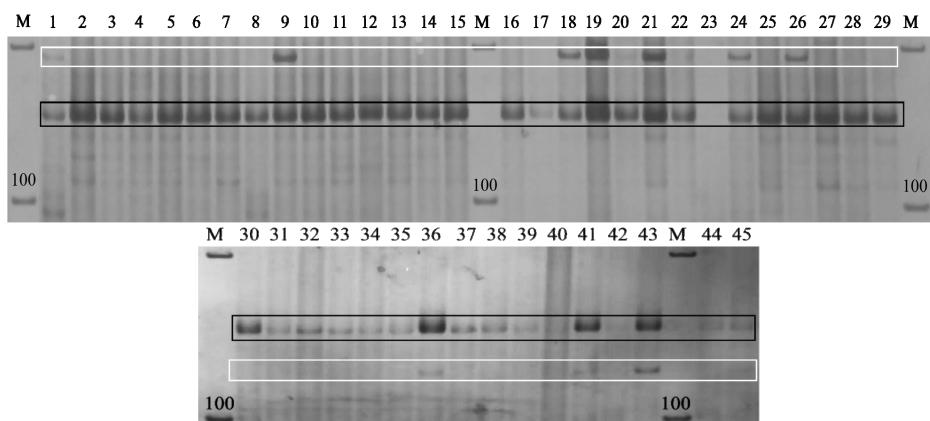


Рис. 2. Електрофореграма, що демонструє результати ПЛР-аналізу зразків егілопсів з використанням маркеру *Aet_ILP_1.2*. Зразки *Ae. tauschii* - 1-30, *Ae. biuncialis* – 31-45, М – ДНК-маркер «100pb Plus Ladder»

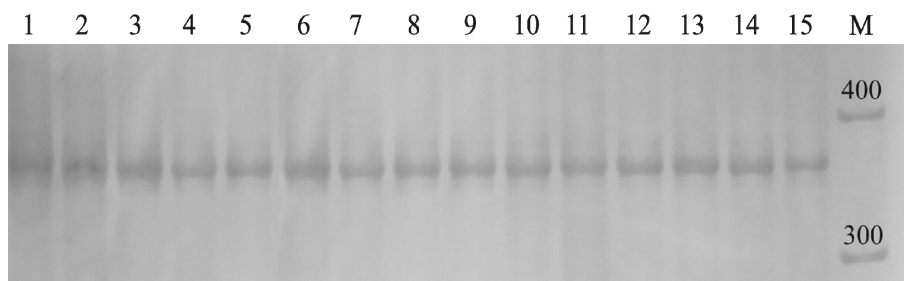


Рис. 3. Електрофореграма, що демонструє результати ПЛР-аналізу зразків егілопсів з використанням маркеру *Aet_ILP_2*. Зразки *Ae. biuncialis* 1-15, М – ДНК-маркер «100pb Plus Ladder»

п.н., 255 та 265 п.н. відповідно). У такий спосіб, цей маркер може бути використаний для міжвидової диференціації *Ae. tauschii* та *Ae. biuncialis*, а також для внутрішньовидової диференціації *Ae. biuncialis*.

На рисунку 2 зображено електрофореграму продуктів ПЛР з використанням праймерів до маркеру *Aet_ILP_1.2*. У кожного зразка *Ae. tauschii* та *Ae. biuncialis* добре видно спільний фрагмент завдовжки 155 п.н., що свідчить взагалом про невелику дов-

жину досліджуваного інтрона гена. Також зразки 1, 9, 18, 19, 21, 24 та 26 мають додатковий фрагмент завдовжки 194 п.н. Поодинокі фрагменти ще виявлялися під час аналізу зразків *Ae. biuncialis*, проте вони мають довжину 127 п.н. та присутні лише в трьох зразків: 36, 41 та 43.

Результати електрофоретичного аналізу фрагментів ДНК, отриманих з використанням праймерів *Aet_ILP_2*, представлені на рис. 3. Не дивлячись на те, що пара праймерів

була розроблена для *Ae. tauschii* на основі EST CX244633.1, під час ПЛР було отримано фрагменти лише для *Ae. biuncialis*. Ймовірною причиною відсутності продукту для *Ae. tauschii* може бути недостатній рівень подібності між EST CX244633.1 і відповідною їй кодуючою послідовністю гена білка Rab7 *Ae. tauschii* (XM_020339732.3) у області підбору одного з праймерів. Водночас, за використання тієї ж пари праймерів були отримані ПЛР продукти для зразків *Ae. biuncialis*. Довжина отриманих фрагментів у *Ae. biuncialis* склала 363 п.н. за маніміально очікуваної довжини 204 п.н., що так само може свідчити про можливу наявність інтрону в цільовій послідовності.

Висновки та перспективи.

Було розроблено генетичні маркери Aet_ILP_1.1, Aet_ILP_1.2 та Aet_ILP_2, які можуть бути використані для оцінки генетичної диференціації представників роду *Aegilops*. Зокрема маркер Aet_ILP_1.1 успішно розділив зразки *Ae. biuncialis* на дві чіткі групи. Маркер Aet_ILP_1.2 також виявився ефективним для виокремлення певних зразків *Ae. tauschii*, незважаючи на те, що обидва маркери відносяться до одного EST CX244641.1. Щодо маркера Aet_ILP_2, дискусійною залишається причина, за якою використання маркера не призвело до отримання ампліконів для *Ae. tauschii*. Подальші дослідження можуть допомогти з'ясувати причину цього явища. Однак, цей маркер може бути корисним для диференціації генотипів *Ae. biuncialis*.

Загалом отримані результати свідчать про потенційну можливість застосування цих генетичних маркерів для вивчення внутрішньо- та між-

видової диференціації рослин роду *Aegilops*. Подальші дослідження з використанням більшої кількості видів роду *Aegilops*, а також інших близьких видів злаків, зокрема пшениці, можуть допомогти отримати більше інформації стосовно генетичної структури, еволюції та оцінювання адаптаційного потенціалу цих видів рослин.

References

1. Konev, R. Yu. (2014). Ukraine on the world wheat market: export potential and its realization. The youth scientific bulletin of the UABS of the NBU. - Series: Economic Sciences. – 2014; 7: 615-626.
2. Ashfaq, M., Zulfiqar, F., Sarwar, I., Quddus, M. A., & Baig, I. A. (2011). Impact of climate change on wheat productivity in mixed cropping system of Punjab. Soil & Environment, 30(2). 12026–12034.
3. Luo, M. C., Gu, Y. Q., Puiu, D., Wang, H., Twardziok, S. O., Deal, K. R., ... & Dvořák, J. (2017). Genome sequence of the progenitor of the wheat D genome *Aegilops tauschii*. Nature, 551(7681), 498-502. DOI:10.1038/nature24486
4. Jafarzadeh J, Bonnett D, Jannink J-L, Akdemir D, Dreisigacker S, Sorrells ME (2016) Breeding Value of Primary Synthetic Wheat Genotypes for Grain Yield. PLoS ONE 11(9): e0162860. DOI: 10.1371/journal.pone.0162860
5. Geigenberger, P. (2011). Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment. Plant physiology, 155(4), 1566-1577. DOI: 10.1104/pp.110.170399
6. Nielsen, T. H., Rung, J. H., & Villadsen, D. (2004). Fructose-2, 6-bisphosphate: a traffic signal in plant metabolism. Trends in plant science, 9 (11), 556-563. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.09.004
7. Cen, W., Liu, J., Lu, S., Jia, P., Yu, K., Han, Y., ... & Luo, J. (2018). Comparative proteomic

- analysis of QTL CTS-12 derived from wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.), in the regulation of cold acclimation and de-acclimation of rice (*Oryza sativa* L.) in response to severe chilling stress. *BMC Plant Biology*, 18, 1-17. DOI: 10.1186/s12870-018-1381-7
8. Li, C., Li, N., Huang, R., Chen, C., Guo, J., Yang, X., ... & Wang, P. (2020). A single nucleotide substitution at the 3'-end of SBPase gene involved in Calvin cycle severely affects plant growth and grain yield in rice. *BMC Plant Biology*, 20(1), 1-14. DOI:10.1186/s12870-020-02541-x
 9. Swarup, R., & Bhosale, R. (2019). Developmental roles of AUX1/LAX auxin influx carriers in plants. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1306. DOI: 10.3389/fpls.2019.01306
 10. Van Ha, C., Le, D. T., Nishiyama, R. I. E., Watanabe, Y. A. S. U. K. O., Sulieman, S., Tran, U. T., ... & Tran, L. S. P. (2013). The auxin response factor transcription factor family in soybean: genome-wide identification and expression analyses during development and water stress. *DNA research*, 20(5), 511-524. DOI:10.1093/dnares/dst027
 11. Zhang, H., Zhang, J., Xu, Q., Wang, D., Di, H., Huang, J., ... & Zhou, Y. (2020). Identification of candidate tolerance genes to low-temperature during maize germination by GWAS and RNA-seq approaches. *BMC plant biology*, 20, 1-17. DOI: 10.1186/s12870-020-02543-9
 12. Tiwari, M., Kumar Trivedi, P., & Pandey, A. (2021). Emerging tools and paradigm shift of gene editing in cereals, fruits, and horticultural crops for enhancing nutritional value and food security. *Food and Energy Security*, 10(1), e258. DOI:10.1002/fes3.258
 13. Mao, X., Zhang, H., Tian, S., Chang, X., & Jing, R. (2010). TaSnRK2. 4, an SNF1-type serine/threonine protein kinase of wheat (*Triticum aestivum* L.), confers enhanced multistress tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, 61(3), 683-696. DOI:10.1093/jxb/erp331
 14. Wei, S., Peng, Z., & Yang, Z. (2015). A simple approach based on intron length polymorphism (ILP) for chromosomal localization of gene WAG-2. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 75(3), 314-317. DOI: 10.5958/0975-6906.2015.00049.8
 15. Wang, X., Zhao, X., Zhu, J., & Wu, W. (2005). Genome-wide investigation of intron length polymorphisms and their potential as molecular markers in rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research*, 12(6), 417-427. DOI: 10.1093/dnares/dsi019

Hordynskyi S.O. (2023).

DEVELOPMENT OF ILP MARKERS FOR PFKFB4 AND RAS GENES OF AEGILOPS TAUSCHII

BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION, 14(1-2): 45-52.

<http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Biologiya/article/view/42712>

[http://dx.doi.org/10.31548/biologiya14\(1-2\).2023.005](http://dx.doi.org/10.31548/biologiya14(1-2).2023.005)

Abstract. The relevance of this research is determined by the prevalence of cereal crops, particularly common wheat, one of the ancestors of which is *Aegilops tauschii*. The development of new markers that can be used to study the genetic diversity of cereals is a current issue today. The aim of this study was to develop intron length polymorphism (ILP) markers to investigate the intron length polymorphism of PFKFB4 and RAS genes in *Aegilops tauschii*, and to assess the potential use of the developed markers for genetic differentiation of *Ae. tauschii* and *Ae. biuncialis*. EST sequences were obtained using the NCBI database, and online tools such as CD-HIT, BLAST, and Primer3Plus were employed for primer design. Molecular markers, Aet_ILP_1.1,

Aet_ILP_1.2, and Aet_ILP_2, were developed and their efficiency was tested on samples of Ae. tauschii and Ae. biuncialis. Amplified fragments were separated using denaturing polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining was performed. The Aet_ILP_1.1 marker differentiated fifteen Ae. biuncialis samples into two groups. The use of the Aet_ILP_1.2 marker revealed additional amplicons in certain Ae. tauschii and Ae. biuncialis samples on electropherograms. The Aet_ILP_2 marker visualized amplicons only in Ae. biuncialis samples. Overall, the results indicate a low level of intraspecific genetic variability in Ae. tauschii using the developed markers, however, they can be effectively utilized for assessing interspecific differentiation between Ae. tauschii and Ae. biuncialis.

Keywords: *Aegilops tauschii, Aegilops biuncialis, genetic markers, intron length polymorphism.*
