УДК 575.22:633.15 https://doi.org/10.7124/FEEO.v28.1373

ГАЛАЄВА М. В.✉, ФАЙТ В. І.
Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення, НААН України,
Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дорога, 3, e-mail: mariagal1@ukr.net
✉ *mariagal1@ukr.net, (098) 267-35-37*

ІДЕНТИФІКАЦІЯ АЛЕЛІВ ГЕНІВ ДЕГІДРИНІВ *Dhn1* ТА *ZmDhn13* У СОРТІВ ТА ЛІНІЙ КУКУРУДЗИ

Мета. Визначення молекулярно-генетичного поліморфізму сортів і ліній кукурудзи (*Zea mays* L.) української та світової селекції за генами дегідринів *Dhn1* та *ZmDHN13*. ***Методи.*** Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), електрофорез у поліакриламідному гелі. ***Результати.*** Сорти та лінії кукурудзи різного географічного походження та різних років створення проаналізовано за генами дегідринів *Dhn1* та *ZmDhn13*. ***Висновки.*** Використання спрямованих праймерів дозволило виявити п'ять різних алелів локусу *Dhn1*, що розрізнялися за розміром продукту ампліфікації: 186, 190, 194, 196 та 200 п. н. Найбільш розповсюдженою була алель 196 п. н. (46,2 %). Виявлено дві алелі локуса *ZmDhn13*: 86 п. н. і 82 п. н. Частота алелі 86 п. н. становила 61,5 %, а частота алелі 82 п. н. – 38,5 %. Послідовності генів дегідринів *Dhn1* та *ZmDhn13* не є консервативними, спостерігаються делеції та / або інсерції всередині цих генів. Тому структура та функціональна активність білків-дегідринів, які кодують зазначені гени, у різних генотипів можуть дуже відрізнятися.

Ключові слова: *Zea mays* L., дегідрини, гени, посухостійкість.

Рослини пристосовуються до життя в умовах навколишнього середовища, яке постійно змінюється. Зміни доступності води або температурні зміни призводять до пошкоджень клітинних мембран та білків, цілісність та властивості яких є важливими для функціонування та виживання рослин. Із метою протидії несприятливим факторам середовища в рослин у процесі еволюції виникли складні механізми адаптації, що надають можливість їм швидко реагувати на абіотичні стреси та протистояти таким. Одним із механізмів протидії впливу абіотичних факторів є накопичення специфічних білків та зміни метаболізму рослин під час стресового навантаження [1, 2]. Дегідрини, що належать до 2 групи білків LEA (Late Embryogenesis Abundant – білки пізнього ембріогенезу), є родиною стресових білків, унікальних для рослинної клітини, експресія яких інтенсивно зростає у відповідь на висихання або зниження температури [2 – 4]. Дегідрини накопичуються також у відповідь на сольовий або осмотичний стрес [5] та на стрес, викликаний токсичними важкими металами, зокрема такими, як Ni^{2+}, Zn^{2+} та Cu^{2+}[6 – 8].

На сьогодні дегідрини виявлено та досліджено у значної кількості як покрито-, так і голонасінних рослин [9]. Важливу роль відіграють білки-дегідрини і у рослин кукурудзи (*Zea mays* L.). Проводяться численні дослідження функціонування цих генів під час дії стресових чинників. Експресія гена *Dhn1* кукурудзи, що кодує відповідний білок-дегідрин, значно збільшується під час дії посухи. Показано, що рівень експресії цього гена під час зневоднення у посухотолерантних генотипів значно вищий порівняно з посухочутливими генотипами [10].

Нещодавно Liu et al. було ідентифіковано і згодом охарактеризовано ген дегідрину кукурудзи *ZmDHN13* [11]. Показано, що *ZmDHN13* експресується конститутивно, але його експресія значно змінюється за осмотичного стресу, низьких температур, окислювального стресу та обробки абсцизовою кислотою.

На сучасному етапі більша частина досліджень генів дегідринів кукурудзи спрямована на вивчення рівнів експресії цих генів за дії різних стресових чинників. Водночас відмінності (або мутації) в послідовностях ДНК генів дегідрінів можуть значною мірою впливати на збільшення або зменшення експресії та на функціональну активність відповідних білків.

Мета нашого дослідження полягала у визначенні молекулярно-генетичного поліморфізму сортів і ліній кукурудзи (*Zea mays* L.) української та світової селекції за генами дегідринів *Dhn1* та *ZmDHN13*.

© **ГАЛАЄВА М. В., ФАЙТ В. І.**

Матеріали і методи

Матеріалом для молекулярно-генетичних досліджень слугували сорти та лінії кукурудзи (*Zea mays* subsp. *mays*) різного географічного походження та з різним рівнем посухотолерантності, насіння яких було отримане з National Plant Germplasm System (http://www.arsgrin.gov) та з відділу селекції та насінництва кукурудзи СГІ-НЦНС.

ДНК виділяли з 5-денних проростків за допомогою CTAB-буфера [12]. Досліджували ДНК десяти індивідуальних рослин кожного сорту або лінії. ПЛР з використанням спрямованих пар праймерів (табл. 1) до певних ділянок генів *Dhn1* та *ZmDhn13* проводили на ампліфікаторах T100 Thermal Cycler («Bio-Rad», США) та PeqStar 96x Universal Gradient («PEQLab», Великобританія). Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила буфер (67 мМ трис-HCl pH 8,4; 16,6 мМ (NH4)2SO4; 2,0 мМ MgCl2; 0,03% Tween-20); 0,2 мМ кожного dNTP; 0,25 мкМ праймера; 40 нг ДНК; 1 од. Taq-полімерази. Температурний режим ампліфікації такий: початкова денатурація – 5 хв за 95 ^{0}C; 40 циклів: денатурація – 20 сек за 95 ^{0}C; відпалювання праймерів – 30 сек за 58 ^{0}C; елонгація – 30 сек за 72 ^{0}C, фінальна елонгація – 2 хв за 72 ^{0}C. Продукти ампліфікації (10 мкл аліквоту ПЛР-суміші) фракціонували у 12 % неденатуруючому поліакриламідному гелі (ПААГ) у 1xTBE. Електрофорез у поліакриламідному гелі проводили за постійної напруги 400 V в апараті для вертикального гель-електрофорезу VE-3 «Helicon» (РФ). Візуалізацію продуктів електрофоретичного розподілу проводили імпрегнуванням гелів нітратом срібла. Калібрування молекулярної маси отриманих ампліконів здійснювали з використанням стандарту pUC19/MspI та 10 bp DNA Ladder. Статистичну обробку отриманих результатів виконували за загальноприйнятими методиками [13].

Для уникнення псевдо-позитивних чи псевдо-негативних результатів за використання кожного праймера використовували негативний контроль (замість ДНК у пробірку вносили 5 мкл стерильної дистильованої води (К-).

Результати та обговорення

У дослідженнях Badicean і співавт. [13] п'ять кДНК, що кодують індуковані посухою гени кукурудзи, були ідентифіковані та охарактеризовані. Було показано, що рівні експресії цих генів відрізнялись у толерантних та чутливих генотипів. Праймери до одного з вищезазначених генів, а саме до гена *Dhn1* (MZ00025109), ми залучили до наших молекулярно-генетичних досліджень.

Нами було проаналізовано ряд зразків кукурудзи різного географічного походження за геном *Dhn1* (рис. 1). Використання спрямованих праймерів дозволило виявити у вибірці генотипів, що вивчали, п'ять різних алелів локусу *Dhn1*, що розрізнялися за розміром продукту ампліфікації: 186, 190, 194, 196 та 200 п. н. (табл. 2).

Для більшості досліджених зразків (49,2 %) характерна присутність у генотипі алелі 196 п. н. Частота алелі 190 п. н. складала вже тільки 20,5 %. Ще меншою була частота алелей 194 п. н. і 200 п. н. (12,9 і 10,6 %, відповідно). Алель 186 п. н. є найбільш рідкісною (6,8 %) та була виявлена лише у двох зразках – Mojave Tribe і ПСТ 169/13.

Посухостійкі сорти-популяції, залучені до наших досліджень, були створені ще в середині минулого сторіччя та слугували джерелом для отримання багатьох сучасних посухостійких ліній кукурудзи. Це такі сорти, як Hays golden, Pride of Saline, Golden Republic, Bowmans Cole Creek, Mojave Tribe. Слід відзначити, що у цих сортах кукурудзи ідентифікували чотири з п'яти виявлених алелей локусу *Dhn1*. Здебільшого зазначені сорти були неоднорідними за алелями *Dhn1*. Сорти Pride of Saline та Golden Republic мали в своєму складі рослини з алелями 196, 194 та 190 п. н. як в гомо-, так і в гетерозиготному стані. Сорт Bowmans Cole Creek характеризувався алелями 200, 196 та 194 п. н. Всі зазначені алелі збереглися також у сучасних сортах та лініях кукурудзи.

Отже, послідовність гена *Dhn1* не є консервативною, для різних генотипів спостерігаються делеції та / або інсерції всередині цього гена. Тому структура та функціональна активність білка-дегідрину, який кодує ген *Dhn1*, у різних генотипів можуть дуже відрізнятися, що може призводити до значних змін у рівні посухостійкості кукурудзи та / або в рівні стійкості до інших абіотичних стресових факторів.

Можливо, більш сприятливим для розвитку посухостійкості є один з алелей гена *Dhn1*. Проте для більш чітких висновків необхідно провести детальніші дослідження з посухостійкості та залучити до роботи значно більшу кількість контрастних зразків кукурудзи.

Ідентифікацію алелей гена *ZmDhn13* проводили з використанням праймерів ZmDHN13F

і ZmDHN13R. Усього було проаналізовано за алелями локуса *ZmDhn13* 26 зразків кукурудзи різного географічного походження (Україна, Болгарія, США, Мексика, Китай, Нігерія, Зімбабве). Виявлено дві алелі локуса *ZmDhn13*: 86 п. н. і 82 п. н. (рис 2). Обидві алелі були широко розповсюджені серед зразків кукурудзи різного географічного походження (табл. 2). В дослідженому наборі зразків частота алелі 86 п. н. становила 61,5 %, а частота алелі 82 п. н. дещо менше – 38,5 %. Для значної частини зразків була характерною наявність обох алелей зазначеного локусу. Певної переваги однієї з алелей гена *ZmDHN13* у посухостійких генотипів кукурудзи виявлено не було. Як серед посухостійких, так і серед посухочутливих (за даними http://www.arsgrin.gov) зразків виявлялись обидві алелі зазначеного гена. Тому більш детальні дослідження з посухостійкості великої кількості зразків у різних географічних регіонах дозволять зрозуміти, чи мають певні алелі перевагу в розвитку посухостійкості (або стійкості до інших стресових чинників) рослинами кукурудзи.

Використання молекулярно-генетичних маркерів до генів дегідринів у MAS та добір генотипів кукурудзи за певними алелями генів *Dhn1* та *ZmDHN13* сприятиме поліпшенню селекційних програм, спрямованих на підвищення стійкості рослин кукурудзи до абіотичних стресових факторів, зокрема таких, як посухостійкість, холодостійкість, а також сольовий та осмотичний стрес.

Таблиця 1. ПЛР-праймери для ідентифікації алелей генів дегідринів *Dhn1* та *ZmDhn13* у сортів та ліній кукурудзи

Ген	Праймер	Послідовність праймера	Розмір продукту ампліфікації, п. н.	Алель
Dhn1	DHN1F DHN1R	gcgagaagaaaggcattatg ggaaactgtccctgtccctg	186	1
			190	2
			194	3
			196	4
			200	5
ZmDhn13	ZmDHN13F ZmDHN13R	cgcatagcattctcttcc cgctcctggatcttgtc	82	1
			86	2

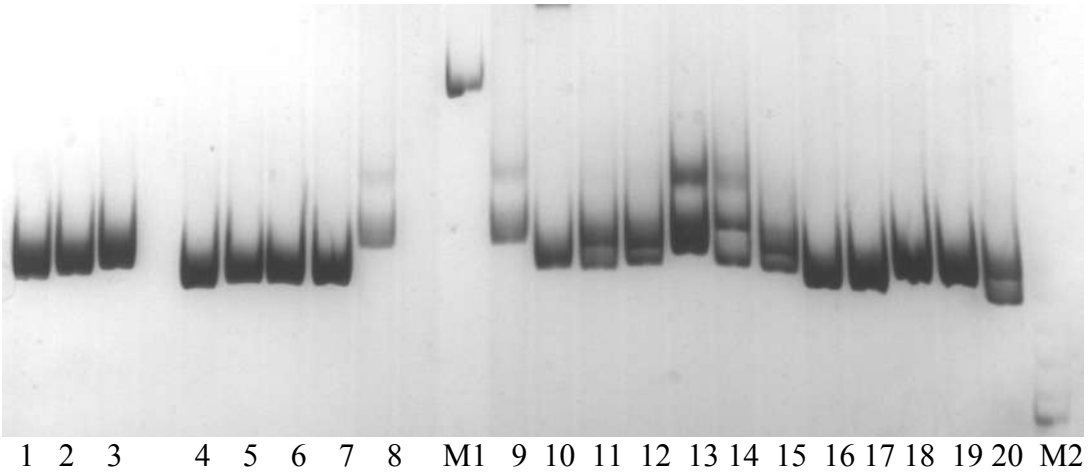

Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК індивідуальних рослин зразків кукурудзи з використанням пари праймерів до гена *Dhn1*: TZEI 1 (1–3), TZEI 12 (4–7), Hays golden (8, 9), Golden Republic (10–12), Bowmans Cole Creek (13, 14), Chikaranga (15–17), Guerero 200 (18–20), M1 – маркер молекулярної маси 1 kb ladder, M2 – маркер молекулярної маси 10 bp ladder.

Таблиця 2. Результати ідентифікації зразків кукурудзи за алелями генів дегідринів *Dhn1* та *ZmDhn13*, п. н.

№	Назва зразка	Країна	***Dhn1***	***ZmDhn13***
1	Hays golden	США, Канзас	200	82
2	Pride of Saline	США, Канзас	196, 194, 190	86, 82
3	Golden Republic	США, Канзас	196, 194, 190	86, 82
4	Bowmans Cole Creek	США, Канзас	200, 196, 194	82
5	Red Cob	Зімбабве	196	86
6	Chikaranga	Зімбабве	196, 194, 190	86, 82
7	Guerero 200	Мексика	196, 194	86, 82
8	TZEI 1	Нігерія	196	86
9	TZEI 12	Нігерія	190	86
10	TZEI 11	Нігерія	-	86
11	TZEI 8	Нігерія	-	86
12	W 83	США, Вісконсін	190	82
13	W 703	США, Вісконсін	196, 194	86
14	ПСТ 159/13	Україна (СГІ)	196	86
15	ПСТ 166/13	Україна (СГІ)	196	86, 82
16	ПСТ 169/13	Україна (СГІ)	186	86, 82
17	ПСТ 170/13	Україна (СГІ)	196	86
18	Kosara 191	Болгарія	-	86, 82
19	Rubrat 175	Болгарія	-	86, 82
20	Китай 1-13	Китай	-	86, 82
21	H Poll 34 CO 23	Мексика	-	86
22	Blue Corn	США	-	86
23	Butter and Sugar Corn	США	-	82
24	Crème Pulf Corn	США	-	86, 82
25	Stewells Evergrin Corn	США	-	86, 82
26	Rainbow Ornamental Corn	США	-	86, 82
27	TZEI 3	Нігерія	196	-
28	136	Буркіна Фасо	196, 190	-
29	TZEI 13	Нігерія	190	-
30	ВК 64	Україна	196	-
31	Tcherni vrah 202	Болгарія	196, 194	-
32	Mojave Tribe	США, Арізона	196, 186	-
33	N 201	США, Небраска	200	-

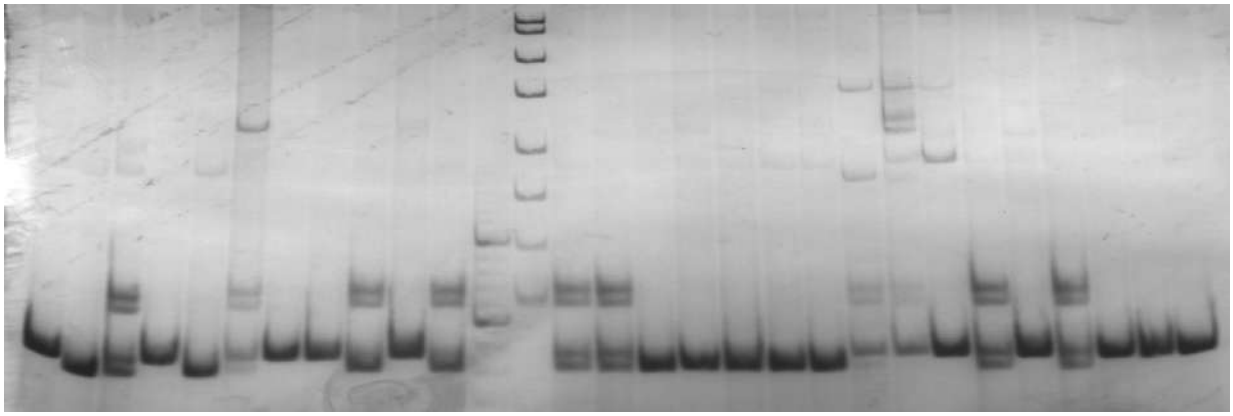

Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК індивідуальних рослин зразків кукурудзи з використанням пари праймерів до гена *ZmDhn13*: Crème Pulf Corn (1–6), Stewells Evergrin Corn (7–11), Kosara 191 (12, 13), Butter and Sugar Corn (14–18), Китай 1–13 (19–22), Guerero 200 (23, 24), Blue Corn (25–27); M1 – маркер молекулярної маси 10 bp DNA Ladder; M2 – маркер молекулярної маси pUC19/MspI.

Висновки

1. Використання спрямованих праймерів дозволило виявити п’ять різних алелей локусу *Dhn1* кукурудзи, що розрізнялися за розміром продукту ампліфікації: 186, 190, 194, 196 та 200 п. н. Більша частина досліджених зразків (49,2 %) характеризувалась алелю 196 п. н. Алель 190 п. н. виявлялася з меншою частотою – 20,5 %. Ще меншою була частота алелей 194 п. н. і 200 п. н. (12,9 і 10,6 % відповідно). Алель 186 п. н. найбільш рідкісна (6,8 %).

2. У результаті використання спрямованих праймерів до ділянки гена *ZmDhn13* було виявлено дві алелі локуса: 86 п. н. і 82 п. н. В дослідженому наборі зразків частота алелі 86 п. н. становила 61,5 %, а частота алелі 82 п. н. – 38,5 %.

3. Отже, послідовності генів дегідринів *Dhn1* та *ZmDhn13* не є консервативними, для різних генотипів спостерігаються делеції та / або інсерції всередині генів. Тому структура та функціональна активність білків-дегідринів, які кодують зазначені гени, у різних генотипів можуть дуже відрізнятися, що може призводити до значних відмінностей генотипів кукурудзи в рівні посухостійкості та / або в рівнях стійкості до інших абіотичних стресових факторів.

References

1. Thomashow M.F. Plant cold acclimation: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1999. Vol. 50. P. 571–599. doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.571.
2. Tunnacliffe A., Wise M.J. The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*. 2007. Vol. 94 (10). P. 791–812. doi: 10.1007/s00114-007-0254-y.
3. Graether S.P., Boddington K.F. Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. *Frontiers in plant science* 2014. Vol. 5. P. 576. doi: 10.3389/fpls.2014.00576.
4. Liu Y., Liang J.N., Sun L.P., Yang X.H., Li D.Q. Group 3 LEA protein, ZmLEA3, is involved in protection from low temperature stress. *Front. Plant Sci*. 2016. Vol. 7. P. 1011. doi: 10.3389/fpls.2016.01011.
5. Liu H., Yu C., Li H., Ouyang B., Wang T., Zhang J., Wang X., Ye Z. Overexpression of *ShDHN*, a dehydrin gene from *Solanum habrochaites* enhances tolerance to multiple abiotic stresses in tomato. *Plant Sci.* 2015. Vol. 231. P. 198–211. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.12.006.
6. Lin C.H., Peng P.H., Ko C.Y., Markhart A.H., Lin T.Y. Characterization of a novel Y_2K-type dehydrin VrDhn1 from *Vigna radiate*. *Plant and Cell Physiology*. 2012. Vol. 53 (5). P. 930–942. doi: 10.1093/pcp/pcs040.
7. Hara M., Shinoda Y., Tanaka Y., Kuboi T. DNA binding of citrus dehydrin promoted by zinc ion. *Plant Cell Environ*. 2009. Vol. 32. P. 532–541. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.01947.x.
8. Liu Y., Li D., Song Q., Zhang T., Li D., Yang X. The maize late embryogenesis abundant protein ZmDHN13 positively regulates copper tolerance in transgenic yeast and tobacco. *The crop Journal*. 2019. Vol. 7. P. 403–410. doi: 10.1016/j.cj.2018.09.001.
9. Riley A.C., Ashlock D.A., Graether S.P. Evolution of the modular, disordered stress proteins known as dehydrins. *PLoS ONE*. 2019. 14 (2). e0211813. doi: 10.1371/journal.pone.0211813.
10. Badicean D., Scholten S., Jacota A. Transcriptional profiling of *Zea mays* genotypes with different drought tolerances – new perspectives for gene expression markers selection. *Maydica*. 2011. Vol. 56. P. 61–69.

11. Liu Y., Wang L., Zhang T., Yang X., Li D. Functional characterization of KS-type dehydrin ZmDHN13 and its related conserved domains under oxidative stress : Scientific Reports. 2017. Vol. 7. P. 1–10. doi: 10.1038/s41598-017-07852-y.

HALAIEVA M. V., FAIT V. I.
Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigations of NAAS of Ukraine, Ukraine, 65036, Odesa, Ovidiopolskaya road, 3, e-mail: mariagal1@ukr.net

IDENTIFICATION OF DEHYDRIN GENES *Dhn1* AND *ZmDhn13* ALLELES IN MAIZE VARIETIES AND LINES

Aim. Determination of molecular genetic polymorphism of maize varieties and lines (*Zea mays* L.) of Ukrainian and world selection by *Dhn1* and *ZmDHN13* dehydrin genes. ***Methods.*** Polymerase chain reaction (PCR), PAAgel-electrophoresis. ***Results.*** Maize varieties and lines of different geographical origin and different years of creation were analyzed by *Dhn1* and *ZmDhn13* dehydrin genes. ***Conclusions.*** The use of directional primers revealed five different alleles of the *Dhn1* locus, which differed in the size of the amplification product: 186, 190, 194, 196 and 200 bp. The most common allele was 196 bp (46.2%). Two alleles of the *ZmDhn13* locus were detected: 86 bp and 82 bp. Allele frequency 86 bp was 61.5% and the allele frequency 82 bp was 38.5%. The sequences of the dehydrin genes *Dhn1* and *ZmDhn13* are not conservative, deletions and / or insertions within these genes are observed. Accordingly, the structure and functional activity of the dehydrin proteins that encode these genes in different genotypes can vary greatly.
Keywords: *Zea mays* L., dehydrins, genes, drought resistance.