

СЛІЩУК Г. І.[✉], ВОЛКОВА Н. Е.

Інститут кліматично орієнтованого сільського господарства НААН,

Україна, 67667, Одеська область, Одеський район, смт Хлібодарське, вул. Маяцька дорога, 24;

ORCID: 0000-0002-9333-4872, 0000-0003-4245-8557

[✉] heorhii.slishchuk@icsanaas.com.ua**ДИФЕРЕНЦІЙНА ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ ПРОТЕЇНІВ ТЕПЛООВОГО ШОКУ У НУТУ
(*CICER ARIETINUM* L.) ПРИ ВІДПОВІДІ НА ПОСУХУ**

Мета. Визначення генів, які кодують протеїни теплового шоку, що є потенційно придатними як молекулярні маркери для селекції на посухостійкість нуту. **Методи.** Аналізували 12 транскриптомів з двох генотипів нуту (*Cicer arietinum* L.) – Desi PI598080 (чутливий до посухи) та Kabuli Flip07 318C (стійкий) – у контрольних і стресових (імітація посухи) умовах. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей проводили за допомогою програми Bowtie2. За використання двофакторного дисперсійного аналізу оцінювали вплив чинників «генотип» і «умови» та їх взаємодію на рівень експресії HSP-генів. **Результати.** Досліджено диференційну експресію HSP-генів нуту за різних умов зволоження. Частина HSP-генів (зокрема, 17.4 kDa class III HSP, 22.7 kDa class IV HSP, HSP2) проявили статистично значущі зміни експресії. Найбільш перспективним є 17.4 kDa class III HSP (LOC101511085), що продемонстрував залежність і від генотипу, і від умов, а також тенденцію до взаємодії «генотип × умови». Інші HSP-гени (18.2 kDa class I HSP, 18.5 kDa class I HSP тощо) переважно реагували на фактор «умови», не проявляючи істотних відмінностей між генотипами. **Висновки.** Поодинокі HSP-гени можуть слугувати маркерами стійкості нуту до посухи, оскільки їхня експресія залежить від генотипу. Водночас реакція більшості HSP-генів зумовлена передусім наявністю стресу. Результати дають підґрунтя для селекційних програм, спрямованих на виведення високопродуктивних і стресостійких сортів нуту, здатних забезпечувати стабільні врожаї в умовах обмеженого зволоження.

Ключові слова: нут, посухотолерантність, транскриптоміка, протеїни теплового шоку, HSP-гени.

Україна посідає 24-те місце у світі за обсягами експорту нуту, причому основними покупцями є Туреччина, Саудівська Аравія та Ізра-

їль. Попит на нут у світі зростає завдяки тенденціям до вегетаріанства та здорового харчування, що відкриває перспективи для розширення українського експорту [1]. Нут є стійким до посухи й добре росте в кліматичних умовах України, зокрема в зоні Західного Лісостепу та Південного Степу. Як бобова культура, нут сприяє підвищенню родючості ґрунту завдяки здатності фіксувати азот, що зменшує потребу у використанні хімічних добрив [2–3]. Стійкість нуту до посухи є багатогранною ознакою, яка залежить від генетичних, фізіологічних та екологічних факторів. Сучасні досягнення в галузі геноміки та фенотипування відкривають нові можливості для ефективніших селекційних стратегій, що є вкрай важливим для розробки сортів нуту, здатних витримувати посушливі умови та забезпечувати стабільні врожаї.

Стійкість нуту до посухи зумовлена складними генетичними ознаками. Дослідження асоціацій на рівні всього геному (англ. Genome-Wide Association Studies GWAS) та геномний добір дали змогу виявити ключові гени й однонуклеотидні заміни (англ. single nucleotide polymorphisms SNP), пов'язані зі стійкістю до посухи, зокрема гени, залучені в регуляцію ауксину, та гени з «цинковими пальцями» (англ. zinc finger knuckle). Ці результати можуть бути використані в селекційних програмах для створення сортів нуту, стійких до посухи [4–5].

Протеїни теплового шоку (англ. heat shock proteins, HSP) відіграють вирішальну роль у підвищенні стійкості рослин до посухи, оскільки вони діють як молекулярні шаперони, підтримуючи стабільність та функціонування протеїнів за стресових умов. Вони залучені до низки механізмів, що сприяють кращій витривалості рослин під час посух. Протеїни теплового шоку сприяють осмотичній адаптації шляхом посилення накопичення осмопротектантів, таких як пролін, що допомагає рослинам утримувати воду й підтримувати тургор клітин під час посу-

хи [6–7]. Також ключова роль їх полягає у забезпеченні посухостійкості стійкості рослин через їхні функції в регулюванні активних форм кисню, осмотичній адаптації, стабілізації протеїнів і взаємодії зі стресовими сигнальними шляхами. Вони підвищують здатність рослин витримувати посушливі умови, підтримуючи клітинний гомеостаз і активуючи механізми реагування на стрес.

Мета досліджень полягала у визначення генів, які кодують протеїни теплового шоку, що є потенційно придатними як молекулярні маркери для селекції на посухостійкість нуту.

Матеріали і методи

Для аналізу диференційної експресії використано 12 транскриптомів із двох генотипів нуту [8]: Desi PI598080, який не має стійкості до посухи, та Kabuli Flip07 318C, стійкий до посухи (табл. 1). Обидва генотипи – як стійкий, так і нестійкий – проаналізовані в контрольних умовах та за умов імітованої посухи.

Як мішені для аналізу диференційної експресії використано такі послідовності мРНК: XM_004516489.3| PREDICTED: *Cicer arietinum* 18.2 kDa class I heat shock protein (LOC101505773), XM_004505026.3| PREDICTED: *C. arietinum* 18.5 kDa class I heat shock protein (LOC101514603), mRNA, XM_004487564.3| PREDICTED: *C. arietinum* 21.7 kDa class VI heat shock protein (LOC101488805), mRNA, XM_004495380.3| PREDICTED: *C. arietinum* 22.7 kDa class IV heat shock protein (LOC101497389), mRNA, XM_004491097.3| PREDICTED: *C. arietinum* 22.7 kDa class IV heat shock protein (LOC101504441), mRNA, XM_004491473.2| PREDICTED: *C. arietinum* Heat shock protein 90-4 (LOC101491735), mRNA, XM_004514699.2| PREDICTED: *C. arietinum* heat shock protein 90-5, chloroplastic (LOC101513028), mRNA, XM_004491520.2| PREDICTED: *C. arietinum* heat shock protein 90-6, mitochondrial (LOC101505628), mRNA, XM_004490766.3| PREDICTED: *C. arietinum* 15.7 kDa heat shock protein, peroxisomal (LOC101500914), transcript variant X1, mRNA, XM_027331621.1| PREDICTED: *C. arietinum* 15.7 kDa heat shock protein, peroxisomal (LOC101500914), transcript variant X2, mRNA, XM_004510495.3| PREDICTED: *C. arietinum* 17.4 kDa class III heat

shock protein (LOC101511085), transcript variant X1, mRNA, XM_027336622.1| PREDICTED: *C. arietinum* 17.4 kDa class III heat shock protein (LOC101511085), transcript variant X2, mRNA, XM_004496410.3| PREDICTED: *C. arietinum* 18.1 kDa class I heat shock protein (LOC101493944), mRNA, XM_004497827.3| PREDICTED: *C. arietinum* activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1-like (LOC101511432), mRNA, XM_004516815.3| PREDICTED: *C. arietinum* heat shock protein 83 (LOC101511551), mRNA, KJ808803.1| *Cicer arietinum* isolate HSP1 heat shock protein gene, complete cds, KJ808804.1| *C. arietinum* isolate HSP2 heat shock protein gene, complete cds, KJ808805.1| *C. arietinum* isolate HSP3 heat shock protein gene, complete cds, KJ808806.1| *C. arietinum* isolate HSP4 heat shock protein gene, complete cds, KJ808807.1| *C. arietinum* isolate HSP5 heat shock protein gene, complete cds, KJ808808.1| *C. arietinum* isolate HSP6 heat shock protein gene, complete cds, KJ808809.1| *C. arietinum* isolate HSP7 heat shock protein gene, complete cds, KJ808810.1 *C. arietinum* isolate HSP8 heat shock protein gene, complete cds, NM_001364899.1| *C. arietinum* heat shock protein HSP17.6-II-like (LOC101504707), mRNA, XM_004500038.3| PREDICTED: *C. arietinum* small heat shock protein, chloroplastic-like (LOC101493847), mRNA. Послідовність NM_001365163.1 *C. arietinum* elongation factor 1-alpha (EF1A) слугувала еталонним геном для нормалізації підрахунків. Для побудови індексів мРНК, а також для вирівнювання послідовностей сиквенування з референтним геномом використано програмне забезпечення Bowtie2 (ліцензія не потрібна) [9].

Двофакторний дисперсійний аналіз (англ. analysis of variance, ANOVA) виконано з використанням мови програмування R, щоб визначити, чи існують статистично значущі відмінності у рівнях експресії мРНК між різними генотипами та умовами для обраних мішеней. Тест ANOVA проводили з метою оцінити основні ефекти генотипу та умов, а також їхню взаємодію, при цьому значення $p < 0,05$ вважали статистично значущими.

Усі статистичні аналізи виконували у середовищі програмного забезпечення R (версія 4.3.1) [10]. Використовували пакети stats для проведення ANOVA.

Таблиця 1. Транскриптоми нуту, що використано для проведення дослідження

Транскриптом ID	Генотип	Умови
ERR11526165	Desi PI598080	Контроль
ERR11526166	Desi PI598080	Контроль
ERR11526167	Desi PI598080	Контроль
ERR11526168	Desi PI598080	Посуха
ERR11526169	Desi PI598080	Посуха
ERR11526170	Desi PI598080	Посуха
ERR11526171	Kabuli Flip07 318C	Контроль
ERR11526172	Kabuli Flip07 318C	Контроль
ERR11526173	Kabuli Flip07 318C	Контроль
ERR11526174	Kabuli Flip07 318C	Посуха
ERR11526175	Kabuli Flip07 318C	Посуха
ERR11526176	Kabuli Flip07 318C	Посуха

Результати та обговорення

За результатами обчислення диференційної експресії для всіх HSP-генів відмічено відмінні значення рівня експресії в залежності від генотипу та умов, крім 21.7 kDa class VI heat shock protein (LOC101488805), для якого значення невизначеності перекривали середні значення (рис.).

При аналізі результатів використовували наступні критерії прийняття рішень. Якщо на ген суттєво впливає лише фактор «Умова» (відсутня взаємодія), це означає, що він однаково

реагує на стрес в обох генотипах. Якщо ген має суттєвий вплив фактору «Генотип», але не впливає «Умова», це означає, що обидва генотипи відрізняються конститутивно (як у контрольних, так і за стресових умов), проте стрес не змінює рівень експресії. Якщо ж взаємодія факторів є статистично значущою, це вказує на те, що вплив стресу відрізняється у генотипів: в одного генотипу експресія може підвищуватися більш різко, або навіть змінюватися у протилежному напрямку (табл. 2).

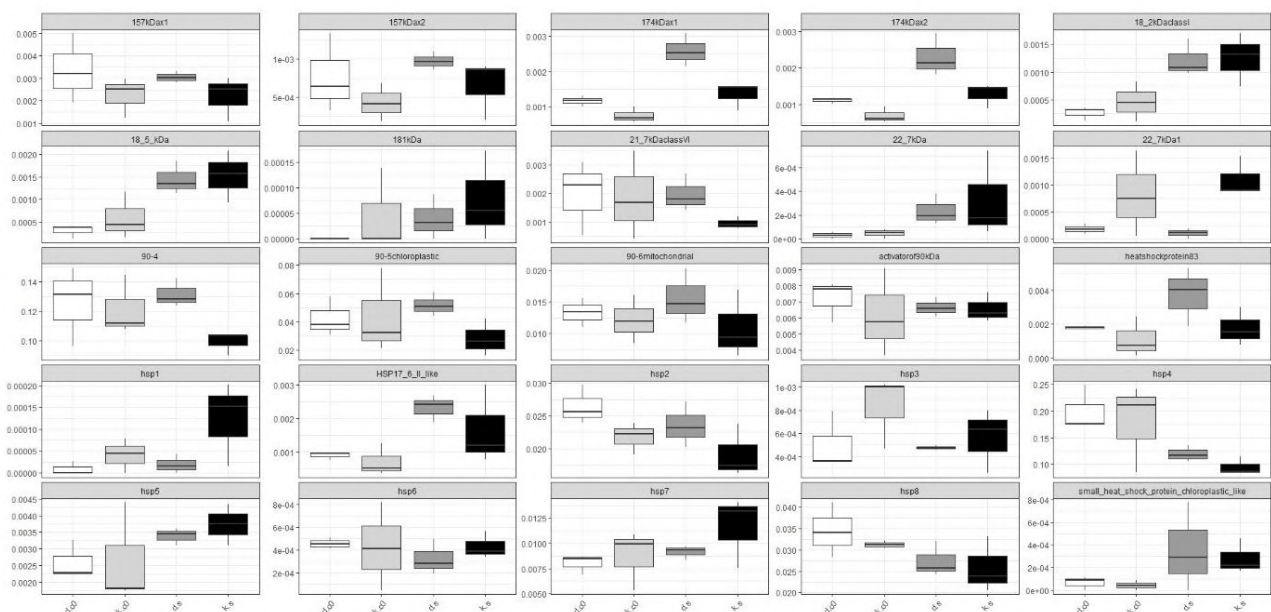


Рис. Нормалізовані рівні експресії генів протеїнів теплового шоку.

Таблиця 2. Результати двофакторного аналізу ANOVA для факторів: генотип, умови та взаємодія двох факторів

Ген	р для фактору		
	генотип	умови	взаємодія
17.4 kDa class III heat shock protein (LOC101511085)	0,002636940	0,000819605	0,06214491
17.4 kDa class III heat shock protein (LOC101511085)	0,008140796	0,002547949	0,17280526
15.7 kDa heat shock protein, peroxisomal (LOC101500914), transcript variant X1	0,133145472	0,773532403	0,82112435
15.7 kDa heat shock protein, peroxisomal (LOC101500914), transcript variant X2	0,142621392	0,31727395	0,96810911
18.1 kDa class I heat shock protein (LOC101493944)	0,291639719	0,37124239	0,89930018
Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1-like (LOC101511432)	0,568483097	0,943440923	0,62677412
Heat shock protein 90-4 (LOC101491735)	0,114606513	0,450801564	0,21070067
Heat shock protein 90-5, chloroplastic (LOC101513028)	0,326400976	0,773719379	0,26793451
Heat shock protein 90-6, mitochondrial (LOC101505628)	0,251102913	0,826744489	0,48117386
heat shock protein 83 (LOC101511551)	0,093064351	0,098466827	0,38488972
18.2 kDa class I heat shock protein (LOC101505773)	0,576319259	0,002544148	0,68825689
18.5 kDa class I heat shock protein (LOC101514603)	0,484832207	0,003218293	0,69190097
21.7 kDa class VI heat shock protein (LOC101488805)	0,390923687	0,474812939	0,48635235
22.7 kDa class IV heat shock protein (LOC101497389)	0,645159542	0,062869594	0,74263076
22.7 kDa class IV heat shock protein (LOC101504441)	0,012189722	0,686063551	0,49144123
Small heat shock protein, chloroplastic-like (LOC101493847)	0,709570417	0,063967968	0,84949249
Heat shock protein HSP17.6-II-like (LOC101504707)	0,307245672	0,015625284	0,5481233
HSP1 heat shock protein gene	0,060166348	0,174107561	0,28348276
HSP2 heat shock protein gene	0,04298380	0,181091477	0,93506938
HSP3 heat shock protein gene	0,182071406	0,332167554	0,42360164
HSP4 heat shock protein gene	0,433868740	0,01709046	0,94819166
HSP5 heat shock protein gene	0,695702604	0,102077341	0,78534272
HSP6 heat shock protein gene	0,769116313	0,624856594	0,59408439
HSP7 heat shock protein gene	0,284009810	0,187259188	0,53496877
HSP8 heat shock protein gene	0,445902042	0,063341557	0,77775557

Для фактору «генотип» значення $p < 0,05$ отримані лише для 17.4 kDa class III heat shock protein (LOC101511085), 22.7 kDa class IV heat shock protein (LOC101504441), HSP2 heat shock protein gene. Це свідчить про те, що експресія даних генів залежить від генотипу, у той час як для інших генів не відмічено статистично зна-

чущої різниці. Для фактору «умови» значення $p < 0,05$ отримані для 17.4 kDa class III heat shock protein (LOC101511085), 17.4 kDa class III heat shock protein (LOC101511085), 22.7 kDa class IV heat shock protein (LOC101504441), HSP2 heat shock protein gene, 18.2 kDa class I heat shock protein (LOC101505773), 18.5 kDa

class I heat shock protein (LOC101514603), heat shock protein HSP17.6-II-like (LOC101504707), HSP4 heat shock protein gene, тобто для більшої кількості протеїнів теплового шоку можна відмітити зміну рівня експресії в умовах посухи, у той час як для інших генів протеїнів теплового шоку рівень експресії не показав статистично значущих відмінностей. Для взаємодії двох факторів значення $p < 0,05$ не отримані, лише для 17.4 kDa class III heat shock protein (LOC101511085), відмічено значення p на границі прийняття рішення 0,06214491.

Найбільш перспективними для подальшого дослідження є 17.4 kDa class III heat shock protein (LOC101511085), 22.7 kDa class IV heat shock protein (LOC101504441), HSP2 heat shock protein gene, які показали залежність рівня експресії від генотипу, особливо 17.4 kDa class III heat shock protein (LOC101511085), що продемонстрував залежність як від генотипу, так й від умов та залежність від взаємодії генотипу та умов, в той час як 22.7 kDa class IV heat shock protein (LOC101504441), HSP2 heat shock protein gene, 18.2 kDa class I heat shock protein (LOC101505773), 18.5 kDa class I heat shock protein (LOC101514603), heat shock protein HSP17.6-II-like (LOC101504707), HSP4 heat shock protein gene показали залежність лише від умов, що говорить про їх залученість у реакції на посуху, але не робить перспективними цілями для дослідження з метою створення маркерної системи для селекції нуту на посухотолерантність.

Висновки

Залежність від генотипу. Статистично значущу ($p < 0,05$) зміну рівня експресії під впливом фактора «генотип» виявлено лише для трьох генів: 17.4 kDa class III heat shock protein (LOC101511085); 22.7 kDa class IV heat shock protein (LOC101504441); HSP2 heat shock protein gene. Це свідчить про наявність генотипової залежності у регуляції цих HSP-генів, що може

бути корисним для відбору перспективних зразків нуту з підвищеною стійкістю до посухи.

Залежність від умов. Умови вирощування (наявність/відсутність посухи) статистично впливали ($p < 0,05$) на експресію більшої кількості генів: 17.4 kDa class III heat shock protein (LOC101511085), 22.7 kDa class IV heat shock protein (LOC101504441), HSP2 heat shock protein gene, 18.2 kDa class I heat shock protein (LOC101505773), 18.5 kDa class I heat shock protein (LOC101514603), heat shock protein HSP17.6-II-like (LOC101504707), HSP4 heat shock protein gene. Таким чином, більшість досліджених HSP-генів беруть участь у захисній реакції на посуху, змінюючи рівень експресії залежно від умов вирощування.

Взаємодія факторів «генотип» та «умови». Для жодного гена не отримано достовірної ($p < 0,05$) залежності від взаємодії двох факторів одночасно. Винятком є 17.4 kDa class III heat shock protein (LOC101511085), для якого значення p наблизилось до порогового рівня (0,06214491), що свідчить про можливий, але недостовірний вплив поєднання обох факторів.

Перспективні гени для подальших досліджень. Найбільш цікавими для розробки маркерних систем у селекції нуту на посухостійкість є гени, що виявили залежність експресії від генотипу: 17.4 kDa class III heat shock protein (LOC101511085) (демонструє також тенденцію до взаємодії «генотип × умови»), 22.7 kDa class IV heat shock protein (LOC101504441), HSP2 heat shock protein gene. Вони мають вищий потенціал як маркери стійкості до посухи.

Решта проаналізованих HSP-генів (18.2 kDa class I HSP, 18.5 kDa class I HSP, HSP17.6-II-like, HSP4) продемонстрували лише залежність від умов вирощування й не показали чіткої генотипової специфічності. Відповідно, ці гени можуть бути важливими для розуміння механізмів реакції на стрес, проте менш перспективні з погляду створення маркерної системи для селекції.

References

1. Tomashevskaya O. Analysis of global chickpeas trade: prospects for ukrainian agribusiness in the context of production and export of niche crops. *Bioeconomics and agrarian business*. 2024. Vol. 15, No. 2. P. 91–102. [https://doi.org/10.31548/economics15\(2\).2024.079](https://doi.org/10.31548/economics15(2).2024.079).
2. Chernik I., Tryhuba O. Common chickpea (*Cicer arietinum* L.) – a prospective legume culture of the western forest steppe of Ukraine. *Scientific Issue Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University*. Series: Biology. 2023. Vol 83, No 3–4. P. 117–126. <https://doi.org/10.25128/2078-2357.23.3-4.13>.
3. Kovalenko O. Culture of chickpea: elements of cultivation under irrigation conditions of the southern steppe of Ukraine. *Monograph : Innovation in modern science*. 2023. P. 118–136. <https://doi.org/10.30890/2709-2313.2023-20-02-016>.

4. Li Y., Ruperao P., Batley J., Edwards D., Khan T., Colmer T., Pang J., Siddique K., Sutton T. Investigating drought tolerance in chickpea using Genome-Wide Association Mapping and genomic selection based on whole-genome resequencing data. *Frontiers in Plant Science*. 2018. Vol. 9. Article 190. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00190>.
5. Khassanova G., Oshergina I., Ten E., Jatayev S., Zhanbyrshina N., Gabdola A., Gupta, N., Schramm C., Pupulin A., Philp-Dutton L., Anderson P., Sweetman C., Jenkins C., Soole K., Shavrukov Y. Zinc finger knuckle genes are associated with tolerance to drought and dehydration in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Frontiers in Plant Science*. 2024. Vol. 15. Article 1354413. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1354413>.
6. Xiang J., Chen X., Hu W., Xiang Y., Yan M., Wang J. Overexpressing heat-shock protein OsHSP50.2 improves drought tolerance in rice. *Plant Cell Reports*. 2018. Vol. 37. P. 1585–1595. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2331-4>.
7. Ni Z., Liu N., Yu Y., Bi C., Chen Q., Qu Y. The cotton 70-kDa heat shock protein GhHSP70-26 plays a positive role in the drought stress response. *Environmental and Experimental Botany*. 2021. Vol. 191. Article 104628. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2021.104628>.
8. Negussu M., Karalija E., Vergata C. Drought tolerance mechanisms in chickpea (*Cicer arietinum* L.) investigated by physiological and transcriptomic analysis. Retrieved from: www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0098847223002836.
9. Langmead B., Salzberg S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*. 2012. Vol. 9 (4). P. 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
10. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Retrieved from: <https://www.R-project.org>.

SLISHCHUK H. I., VOLKOVA N. E.

Institute of Climate-Smart Agriculture of the National Academy of Agrarian Sciences of Odesa, Ukraine, 67667, Odesa Region, Khlibodarske, Maiaksa doroha str., 24

DIFFERENTIAL EXPRESSION OF HEAT SHOCK PROTEIN GENES IN CHICKPEA (*CICER ARIETINUM* L.) IN RESPONSE TO DROUGHT

Aim. To identify genes encoding heat shock proteins that are potentially suitable as molecular markers for the selection of drought-tolerant chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Methods.** Twelve transcriptomes of two chickpea genotypes – Desi PI598080 (drought-sensitive) and Kabuli Flip07 318C (drought-tolerant) – under control and stress (drought simulation) conditions were analyzed. Nucleotide sequence alignment was performed using Bowtie2 software. A two-factor ANOVA was used to assess the effects of the factors «genotype» and «conditions», as well as their possible interaction, on HSP gene expression levels. **Results.** The differential expression of heat shock protein (HSP) genes in chickpea under different watering regimes was studied. Some heat shock protein genes (in particular, 17.4 kDa class III HSP, 22.7 kDa class IV HSP, HSP2) showed statistically significant changes in expression. The most promising was the 17.4 kDa class III HSP (LOC101511085), which demonstrated dependence on both genotype and conditions, as well as a trend toward a «genotype × conditions» interaction. Other HSP genes (18.2 kDa class I HSP, 18.5 kDa class I HSP, etc.) mainly responded to the «conditions» factor without showing significant differences between genotypes. **Conclusions.** It was found that certain HSP genes can serve as markers of chickpea drought tolerance, as their expression depends on genotype. At the same time, the response of most heat shock protein genes is primarily determined by the presence of stress. These findings provide a basis for breeding programs aimed at developing high-yielding and stress-tolerant chickpea varieties capable of producing stable yields under limited watering conditions. **Keywords:** chickpea, drought tolerance, transcriptomics, heat shock proteins, HSP-genes.