

БУЙ Д.Д.✉, ДЕМКОВИЧ А.Є., ПІРКО Я.В., БЛЮМ Я.Б.

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України,

Україна, 04123, м. Київ, ул. Осиповського, 2а, e-mail: denisbuy90@gmail.com

✉ Denisbuy90@gmail.com, (050) 967-89-07

## АНАЛІЗ РІВНІВ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ АЛЬФА-ТУБУЛІНУ *TRITICUM AESTIVUM* У ОЗИМОГО СОРТУ ДЕМЕТРА ПІД ВПЛИВОМ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР

Холодо- та морозостійкість є одними з важливих характеристик для сортів озимої м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.). Загибель озимих культур внаслідок вимерзання особливо характерна для південних та східних областей України, де в зимовий період часто не формується достатній сніжний покрив, що в окремих випадках призводить до значної смертності посівів. Стійкість до низьких температур забезпечується низкою механізмів [9], з'ясування яких залишається актуальним питанням для створення нових сортів культурних рослин. Відомо, що під час холодової аклімації можуть різко змінюватися рівні експресії певних генів, відбувається перебудова метаболічних шляхів, до роботи залучаються специфічні сигнальні системи, що призводить до кардинальних фізіологічних змін. Як наслідок – індукується підвищення стійкості до низьких температур [2, 3, 5, 8, 10].

Відомо, що одним із проявів холодового ураження рослин на клітинному рівні є деполімеризація мікротрубочок [4]. Припускають, що одним із механізмів формування холодо- та морозостійкості є зміна співвідношення окремих ізотипів тубуліну в їх складі [5, 6], що призводить до формування мікротрубочок, здатних зберігати полімеризований стан за низьких температур. Встановлено, що під час холодової аклімації у пшениці змінюється рівень експресії різних ізотипів генів  $\alpha$ -тубуліну [7]. При цьому є певна відмінність у рівнях та строках змін експресії генів окремих представників родини  $\alpha$ -тубуліну між озимими та ярими сортами пшениці [10]. За результатами повного сіквенування геному м'якої пшениці на цей час повністю анотовано 15 генів  $\alpha$ -тубуліну [7]. Але наразі повна інформація про характер експресії представників родини  $\alpha$ -тубуліну у м'якої пшениці під час холодової аклімації відсутня.

Характерні зміни рівнів експресії гена *Ta\_Tuba-2-3*, які в перші дні холодової аклімації

зростають на кілька порядків відносно контрольних рослин, можуть свідчити про важливість цього ізотипу в формуванні холодостійких мікротрубочок [1, 7]. Проте використання різних методів оцінки експресії генів  $\alpha$ -тубуліну позбавляє можливості прямого порівняння озимих та ярих сортів, а також не дає змоги оцінити зв'язок експресії гена *Ta\_Tuba-2-3* та інших ізотипів із рівнем стійкості рослин до низьких температур. З'ясування особливостей експресії різних ізотипів альфа-тубуліну може допомогти в розкритті внутрішньоклітинних механізмів забезпечення холодостійкості.

### Матеріали і методи

Насіння озимого сорту м'якої пшениці Деметра після 15-хвилинної поверхневої стерилізації 3 %-вим розчином гіпохлориту натрію пророщували 7 днів на вологому фільтрувальному папері при температурі 20°C. 10 днів проростки вирощували при 20°C та тривалості світлового дня 16 год. Надалі рослини утримувалися при температурі 4–6°C та тривалості світлового дня 8 год. Матеріалом для аналізу слугувала надземна частина рослин, яку відбирали та піддавали негайній заморозці в рідкому азоті та зберігали для подальшого дослідження при температурі -80°C. Відбір зразків проводили один раз на добу.

Виділення РНК проводили з використанням набору GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific, США). Отриману РНК піддавали обробці ДНКазою (DNase I, RNase-free, Fermentas, США) за стандартним протоколом виробника. Чистоту та концентрацію виділеної РНК визначали за допомогою електрофоретичного аналізу та спектрофотометрично на біофотометрі (Eppendorf Biophotometer, США). Концентрації РНК для подальших досліджень вирівнювали шляхом розведення. Для отримання кДНК було використано набір RevertAid™

Reverse Transcriptase (Fermentas, США) за стандартним протоколом виробника.

До кожного з генів  $\alpha$ -тубуліну були підібрані праймери (загалом – 15 пар) з використанням програмного забезпечення PrimerBlast. Кодуючі ділянки генів, до яких було підібрано праймери, були отримані за використання бази даних GenBank. Для дослідження рівня експресії *Ta\_Tuba-2-3* було використано праймери, наведені в попередніх дослідженнях [1, 7].

Оцінку відносного рівня експресії генів  $\alpha$ -тубуліну було проведено за допомогою кількісної ПЛР ( $\Delta\Delta C_t$  метод). Ампліфікацію проводили з використанням набору SYBR<sup>®</sup> Green Jump Start<sup>™</sup> Taq Ready Mix<sup>™</sup> (Sigma-Aldrich, США). Реакційна суміш загального об'єму 10 мкл на пробу містила 0,5 мкл отриманої кДНК, по 0,5 мкл прямого та зворотного праймерів. ПЛР проводили з інтеркалюючим барвником SybrGreen 490 з використанням ампліфікатора iQ5 (Bio-Rad, США) за таким протоколом: початкова денатурація – 94°C, 2 хв; 40 циклів денатурації – 94°C, 30 с; відпал праймерів при 58°C – 30 с, синтез ДНК при 72°C – 1 хв, заключний етап елонгації – 72°C, 2 хв. Рівень флюоресценції вимірювали на стадії синтезу ампліконів.

Після ампліфікації якість продукту перевіряли, досліджуючи криву плавлення продуктів ПЛР, та за допомогою електрофорезу в 1,5 %-вому агарозному гелі з додаванням бромистого етидію в ультрафіолетовому світлі. Рівень експресії досліджуваних ізотипів альфа-тубуліну оцінювали окремо для кожної пари праймерів. Для оцінки якості та відтворюваності результатів реакції експерименти проводили у трьох повторах. Як референтний ген використовували ген убіхітину. У викладених результатах рівень відносної експресії наведено в умовних одиницях, 1 ум. од. відповідає 100 %-вому рівню експресії на момент початку дії холододового фактора.

### Результати та обговорення

Загалом досліджено рівень експресії 15 генів альфа-тубуліну протягом 28 діб. Досліджувана родина генів складається з п'яти підродин [7]. Наведені нижче результати згруповані згідно з цією класифікацією за підродинами. Для ряду досліджуваних генів профілі експресії отримані вперше (*Tuba\_1-1*, *1-2*, *2-1*, *2-2*, *4-1*, *4-2*, *5-1*, *5-2*), для інших представників (*Tuba\_1-3*; *-2-3*; *-3-1*; *-3-2*; *-3-3*; *-4-3*; *-5-3*) є певні відомості

стосовно профілів їх експресії у ярого сорту м'якої пшениці [7]. Найбільш дослідженим на сьогодні є ген *Tuba\_2-3* [1, 7, 10], зважаючи на його вірогідну участь у механізмах забезпечення холодостійкості [3]. Профіль його експресії за умов дії низьких температур вивчено як для ярих [7, 10], так і для озимих сортів [1, 10].

*Перша підродина* генів альфа-тубуліну. Рівень експресії представників підродини коливається в межах 0,02–3,7 ум. од., слід відзначити, що характерним є зростання рівня експресії генів протягом перших 2–3 днів із подальшим різким зниженням (рис. 1). З 10-ї до 28-ї доби спостерігається коливання рівнів експресії генів у межах 0,1–0,4 ум. од. Для гена *1-3* відомий профіль експресії для ярого сорту Quantum [7], де було виявлено незначне зростання рівня експресії на 3-ю добу з подальшим поступовим його зниженням до 36-ї доби. Ця закономірність підтверджується отриманими нами результатами, проте пряме порівняння результатів неможливе через використання різних методів (літературні дані базуються на аналізі електрофореграм без наведення числових значень рівнів експресії).

*Друга підродина*. Встановлено, що рівень експресії представників підродини коливається в межах 0,3–4,6 ум.од., характерним є зростання рівнів експресії генів протягом перших 7 – 10 днів із подальшим зниженням до значень контролю (рис. 2). Найбільш повно дослідженим представником підродини альфа-тубуліну є ген *Tuba\_2-3*, для ярого сорту Quantum відмічено зростання рівня експресії на 3-ю добу, подальше зниження до 14-ї доби та стійке підвищення після 36-ї доби [7]. Для озимого ж сорту Chihoku зафіксовано різке початкове зниження рівня експресії з поступовим його зростанням до 10 ум.од. після 14-ї доби [1].

*Третя підродина*. Для генів альфа-тубуліну цієї підродини рівні експресії коливалися в межах 0,1–3,3 ум.од. Для представників цієї підродини характерні флуктуації рівнів експресії з поступовим їх зниженням (рис. 3). Це єдина підродина генів альфа-тубуліну, для всіх представників якої було раніше отримано профілі експресії [7]. Для ярого сорту Quantum відмічено подібні профілі для всіх представників: початкове зниження після першої доби, зростання протягом 3–6 доби та зниження на 14–36 добу.

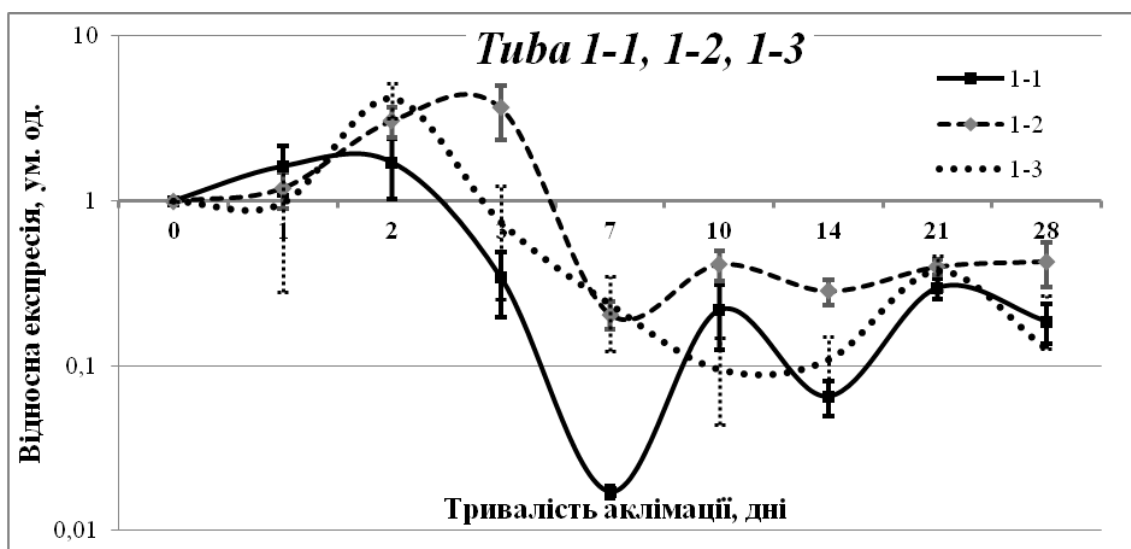


Рис. 1. Рівень експресії першої підродини генів альфа-тубуліну (*Tuba\_1-1, 1-2, 1-3*).

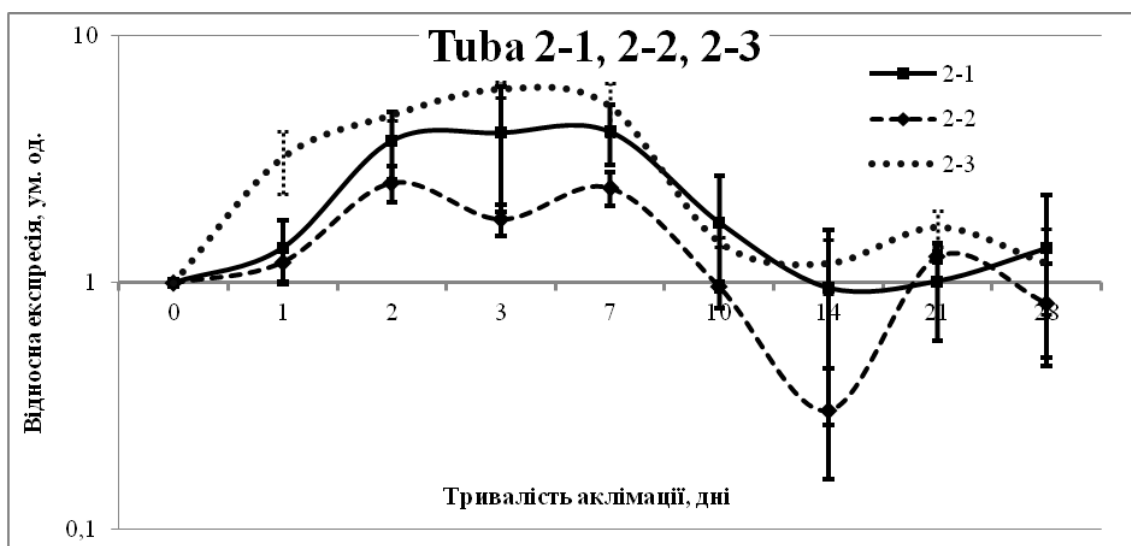


Рис. 2. Рівень експресії другої підродини генів альфа-тубуліну (*Tuba\_2-1, 2-2, 2-3*).

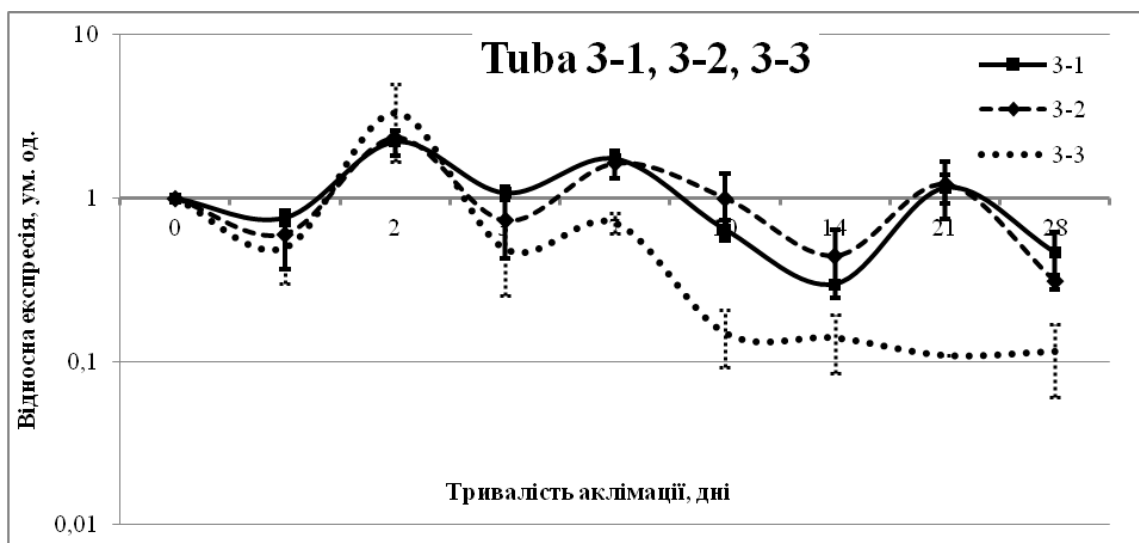


Рис. 3. Рівень експресії третьої підродини генів альфа-тубуліну (*Tuba\_3-1, 3-2, 3-3*).

*Четверта підродина.* Результати проведених експериментів свідчать про те, що рівні експресії досліджуваних генів коливалися в межах 0,4–18,7 ум. од. Для представників цієї підродини генів характерні подібні профілі експресії: різке початкове зростання протягом першої доби та зниження після 10-ї доби до початкових та знижених значень (рис. 4). Слід зазначити, що аналогічні результати було отримано для ярого сорту Quantum, де підвищений рівень експресії зберігався до 14-ї доби [7].

*П'ята підродина.* Із даних, наведених на рис. 5, видно, що рівні експресії генів підродини коливалися в межах 0,4–3,9 ум.од. Для представників підродини характерним є початкове зростання рівнів експресії протягом 1–7-ї доби та зниження на 10-у добу. Для гена *Tuba\_5-3* у ярого сорту Quantum також характерні коливання рівня експресії, проте в межах, що не перевищують значень контролю, з піками на 3-ю та 36-у добу.

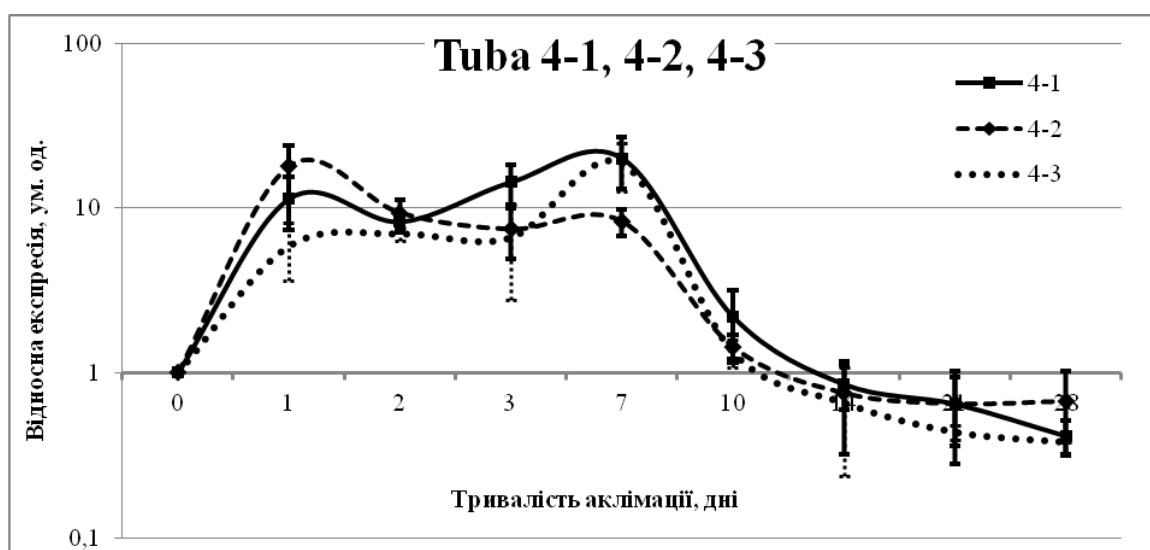


Рис. 4. Рівень експресії четвертої підродини генів альфа-тубуліну (*Tuba\_4-1, 4-2, 4-3*).

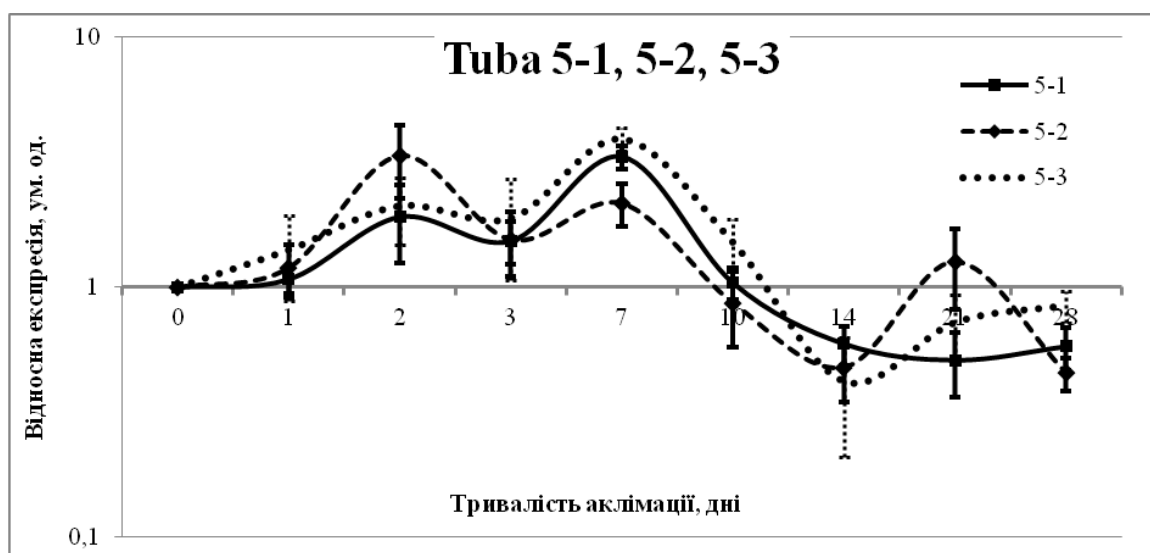


Рис. 5. Рівень експресії п'ятої підродини генів альфа-тубуліну (*Tuba\_5-1, 5-2, 5-3*).

Загалом завдяки проведеним дослідженням було встановлено, що в межах підродин генів альфа-тубуліну профілі експресії часто

подібні між собою. Найвищі рівні експресії отримано для представників четвертої підродини генів альфа-тубуліну, де високі їх значення

зберігалися протягом перших 10 днів після початку дії холододового фактора. Оскільки для забезпечення холодостійкості необхідною складовою є перебудова цитоскелета, зокрема мікротрубочок, високі значення рівнів експресії представників цієї підродини можуть свідчити про їх роль у забезпеченні цих механізмів. Для гена *Tuba\_2-3* не зафіксовано значно вищих показників рівня експресії в порівнянні з іншими представниками підродини, проте профіль його експресії характеризується дещо вищими середніми значеннями експресії та є подібним до профілів експресії представників четвертої підродини.

### Література

1. Christov N.K., Imai R., Blume Y.B. Differential expression of two winter wheat alpha-tubulin genes during cold acclimation // *Cell Biol. Int.* – 2008. – V. 32. – P. 574–578.
2. Gray G.R. Cold acclimation and freezing tolerance: a complex interaction of light and temperature // *Plant Physiol.* – 1997. – V. 114. – P. 467–474.
3. Tardif G., Kane N.A., Adam H., Labrie L., Major G., Gulick P., Sarhan F., Lalibert J.F. Interaction network of proteins associated with abiotic stress response and development in wheat // *Plant Mol. Biol.* – 2007. – V. 63. – P. 703–718.
4. Abdrakhamanova A., Wang Q.Y., Khokhlova L., Nick P. Is microtubule disassembly a trigger for cold acclimation? // *Plant-CellPhysiol.* – 2003. – V. 44. – P. 676–686.
5. Jian L.C., Sun L.H., Liu Z.P. Studies on microtubule cold stability in relation to plant cold hardiness // *Acta Bot. Sinica.* – 1989. – V. 31. – P. 737–741.
6. Kerr G.P., Carter J.V. Tubulin isotypes in rye roots are altered during cold acclimation // *Plant Physiol.* – 1990. – V. 93. – P. 83–88.
7. Ridha Farajalla M., Gulick P.J. The alpha-tubulin gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.) and differential gene expression during cold acclimation // *Genome.* – 2007. – V. 50. – P. 502–519.
8. Maibam P., Nawkar G.M., Park J.H., Sahi V.P., Lee S.Y., Kang C.H. The influence of light quality, circadian rhythm, and photoperiod on the CBF-mediated freezing tolerance // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – V. 14. – P. 11527–11543.
9. Xiong L., Schumaker K.S., Zhu J.K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress // *Plant Cell.* – 2002. – V. 14. – P. 165–183.
10. Буй Д.Д., Пірко Я.В., Блюм Я.Б. Аналіз рівнів експресії генів  $\alpha$ -тубуліну під час холододової аклімації у ярої та озимієї пшениці // *Фактори експериментальної еволюції.* – К.: Логос, 2015. – Т. 17. – С. 27–30.

**BUY D.D., DEMKOVICH A.E., PIRKO Ya.V., BLUME Ya.B.**

*Institute of Food Biotechnology and Genomics,*

*Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskiy str., 2A, e-mail: denisbuy90@gmail.com*

### EXPRESSION ANALYSIS OF ALPHA-TUBULIN GENES DURING COLD ACCLIMATION IN WINTER WHEAT DEMETRA

**Aim.** Wheat (*Triticum aestivum* L.) display significant increase in freezing tolerance during a period of cold acclimation (CA). Functions and regulations unraveling of CA-associated genes can help in cold-resistant cultivars receiving using biotechnology methods. Cytoskeleton reorganization is an important element of the cold resistance mechanism associated with tubulin expression level alterations. **Methods.** Cold acclimation during 28 days was carried out. The expression level of 15 members of alpha-tubulin genes was measured using RT Real-time PCR with specific primers. **Results.** Similar patterns of expression alterations were observed within subfamilies. The highest levels of expression were recorded for the fourth subfamily members (*Tuba\_4-1*, *4-2*, *4-3*) and *Tuba\_2-3* gene. These 4 alpha-tubulin genes may be involved in the vital functions maintenance during the first days of the low temperature influence. **Conclusions.** It is likely that four of the fifteen genes are related to cold tolerance mechanisms since they have significantly higher expression levels during cold acclimation.

**Keywords:** *Triticum aestivum*, winter wheat, tubulin, cold acclimation.

### Висновки

Досліджено профілі експресії 15 генів альфа-тубуліну протягом 28 днів під впливом низьких температур. Виявлено, що в межах підродин профілі експресії окремих представників подібні між собою. Для різних підродин зафіксовано різнонаправлені зміни експресії, що свідчить про участь генів у забезпеченні різних функцій та їх незалежну регуляцію. Для представників четвертої підродини та гена *Tuba\_2-3* характерним є значне та стійке початкове зростання рівнів експресії, що може свідчити про їх участь у контролі життєво важливих функцій рослин на початкових етапах дії низьких температур.