



УДК 576.311.348.7

**ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА РІВНІВ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА АЛЬФА-  
ТУБУЛІНУ (TUBA-2-3) У СОРТІВ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ДЕМЕТРА  
ТА ЕЛЕГІЯ ЗА УМОВ ХОЛОДОВОГО СТРЕСУ**

**Д. Д. БУЙ**, аспірант \*

**А. Є. ДЕМКОВИЧ**, кандидат біологічних наук

**Я. В. ПІРКО**, кандидат біологічних наук

**В. І. КОРХОВИЙ**, кандидат біологічних наук

**Я. Б. БЛЮМ**, доктор біологічних наук, професор

*Державна установа «Інститут харчової біотехнології*

*та геноміки НАН України»*

E-mail: denisbuy90@gmail.com

***Анотація.** Проведено порівняння відносних рівнів експресії гена альфа-тубуліну *Ta\_TUBA-2-3* під час перших 10 діб холодової аклімації у двох сортів м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) Деметра (озимий) та Елегія (ярий). Встановлено, що на початкових етапах (1 доба) відбувається підвищення експресії в обох сортів, а після 2-10 діб підвищений рівень експресії зберігається у озимого сорту Деметра.*

***Ключові слова:** *Triticum aestivum*, холодова аклімація, тубулін, TUBA-2-3*

Холодо- та морозостійкість є одними з важливих характеристик для сортів озимої м'якої пшениці. Стійкість до низьких температур забезпечується цілою низкою механізмів [9], з'ясування яких залишається актуальним питанням для створення нових сортів культурних рослин. Відомо, що під час холодової аклімації може різко змінюватись експресія певних генів, відбувається перебудова метаболічних шляхів, залучаються в роботу специфічні сигнальні системи, що призводить до кардинальних клітинно-біологічних та фізіологічних змін. Як наслідок з'являється або підвищується стійкість до низьких температур [2, 3, 5, 8, 10].

---

\*Науковий керівник – академік НАН України, доктор біологічних наук, професор Я. Б. Блюм



Припускають, що одним з механізмів формування холодо-морозостійкості є перебудова мікротрубочок [4], 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 (*Triticum aestivum* L.) змінюється рівень експресії різних ізотипів генів  $\alpha$ -тубуліну [7]. Показано, що між озимими та ярими сортами пшениці є певна відмінність в силі і строках змін експресії генів окремих представників родини альфа-тубуліну [10]. На цей час геном м'якої пшениці повністю сіквеновано, анотовано 15 генів альфа-тубуліну [7].

Відмічено, що за низьких температур рівень експресії гена *TUBA-2-3* різко зростає в перші дні холодової аклімації на кілька порядків відносно контролю у одного з озимих сортів м'якої пшениці [1], що може свідчити про важливість експресії цього гена в формуванні холодостійких мікротрубочок. Аналогічні відомості стосуються одного з ярих сортів [7]. Проте використання різних методів оцінки експресії генів альфа-тубуліну позбавляє можливості прямого порівняння озимих та ярих сортів, а також не дає змоги оцінити зв'язок експресії гена *TUBA-2-3* з рівнем стійкості рослин до низьких температур.

**Метою досліджень** було порівняння рівнів експресії гена *TUBA-2-3* під час довготривалої холодової аклімації у озимого та ярого сортів м'якої пшениці.

**Матеріали та методика досліджень.** Об'єктами експериментів були два вітчизняні сорти м'якої пшениці: озимий сорт Деметра та ярий сорт Елегія. Насіння обох сортів пшениці поверхнево стерилізували шляхом експозиції у 3 %-вому розчині гіпохлориту натрію впродовж 15 хв. Насіння пророщували на вологому фільтрувальному папері за температури 20 °С, далі 7 днів проростки вирощували за 20 °С та довжині світлового дня 16 год, а потім за температури 4 °С та довжині світлового дня 8 год впродовж наступних 10 днів. Для освітлення використовували люмінесцентні лампи потужністю 16 Вт.



Перед початком експерименту і через 1, 2, 3, 7, 10 днів відбирали зріз тканин (надземна частина рослин), заморожували їх у рідкому азоті та зберігали для подальшого аналізу при  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . РНК виділяли з використанням набору GeneJET Plant RNAPurification Mini Kit (Thermo Scientific, США). Чистоту та концентрацію виділеної РНК визначали за допомогою електрофоретичного аналізу та спектрофотометрії (Eppendorf Biophotometer, США). Отриману РНК обробляли ДНКазою (DNase I, RNase-free, Fermentas, США) за стандартним протоколом.

Для отримання кДНК використовували набір RevertAid<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase (Fermentas, США). Реакцію проводили за стандартним протоколом. Оцінку відносного рівня експресії гена *TUBA-2-3* проводили за допомогою кількісної ПЛР (ΔΔCt метод). Ампліфікацію специфічного фрагмента гена здійснювали з використанням набору SYBR<sup>®</sup> Green JumpStart<sup>TM</sup>Taq ReadyMix<sup>TM</sup> (Sigma-Aldrich, США). Реакційна суміш загальним об'ємом 25 мкл містила 2 мкл кДНК, 1 мкл прямого та зворотнього праймерів. ПЛР проводили з інтеркалюючим барвником SybrGreen (490 нм) з використанням ампліфікатора iQ5 (Bio-Rad, США) за наступним температурним протоколом: початкова денатурація –  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 2 хв; 40 циклів: денатурація –  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 с; відпал праймерів при  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$  – 30 с, синтез ДНК при  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  – 1 хв, заключний етап елонгації –  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 2 хв. Рівень флюоресценції вимірювали на стадії синтезу ампліконів.

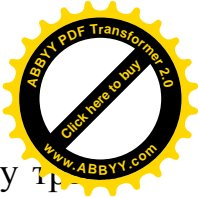
Було використано праймери до кДНК *TUBA-2-3*:

Прямий 5` GAGTATTAAGCCTGCCTCCT 3`;

Зворотній 5` CAAGGTCTTACAACAACAG 3`.

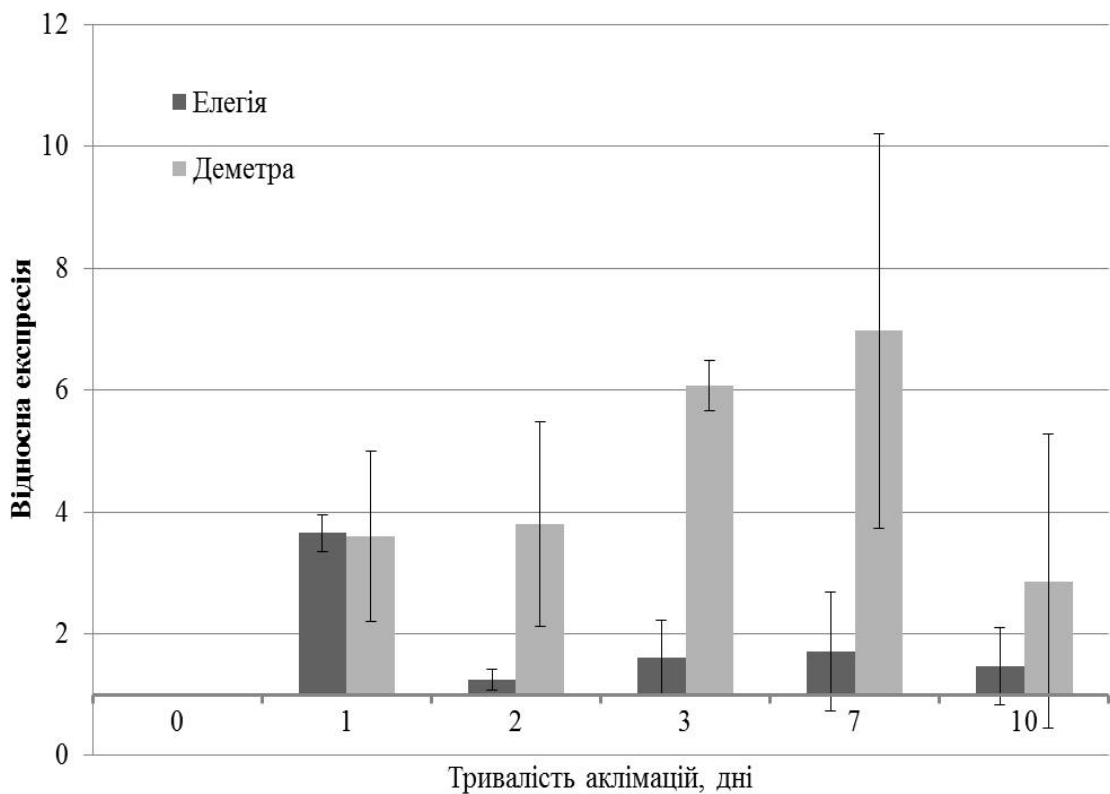
Як референтні гени використовували гени убіхітину та актину.

Після ампліфікації якість продукту перевіряли, досліджуючи криву плавлення продуктів ПЛР та візуально за допомогою електрофорезу в 1,5 %-му агарозному гелі з додаванням бромистого етидію в ультрафіолетовому світлі. Рівень експресії оцінювали окремо для кожної пари праймерів. Для оцінки



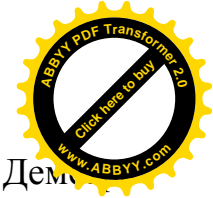
якості та відтворюваності результатів реакції експеримент проводили у трьох повторях.

**Результатидосліджень та їх обговорення.** За умови використання як референтного гена убіхітину спостерігаються схожі профілі експресії гена *TUBA-2-3* у випадку обох сортів. На початковому етапі відбувається підвищення рівня експресії цього гена у кілька разів у порівнянні з початковим рівнем. Після перших 24 год. аклімації рівень експресії гена *TUBA-2-3* у озимого сорту Деметра поступово зростає, досягаючи піку на 7-й день, а у випадку ярого сорту Елегія рівень експресії цього ж гена знижується і надалі залишається на майже початковому рівні (рис.1).

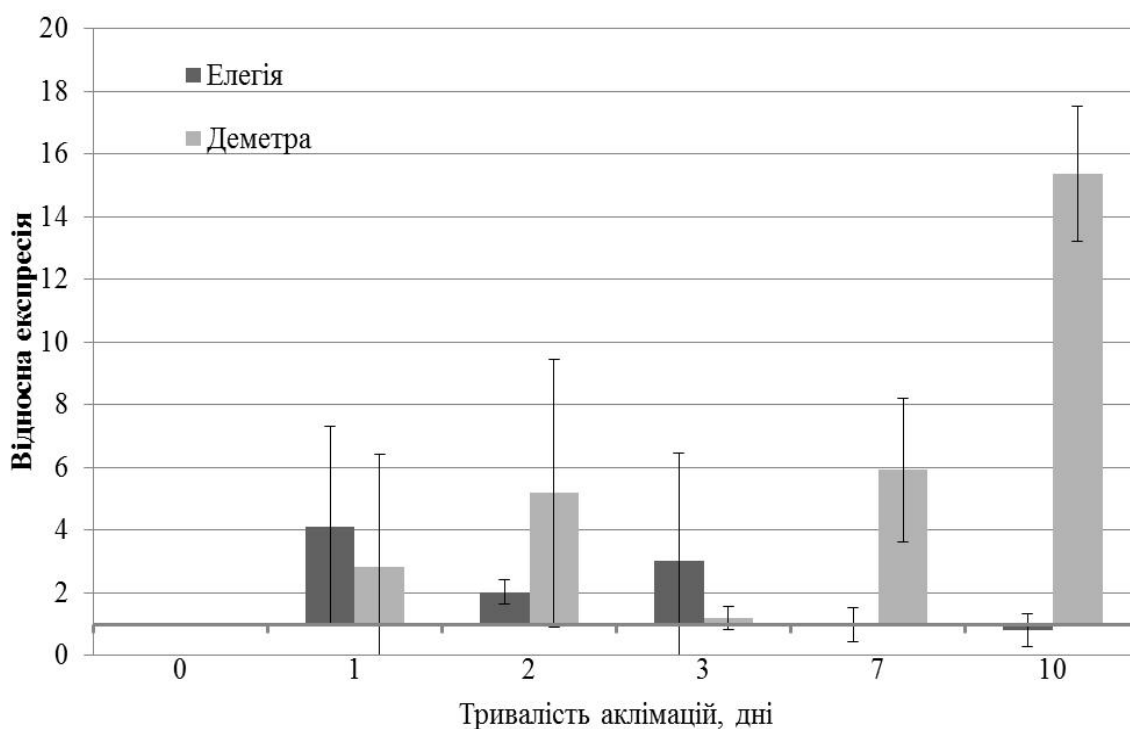


**Рис. 1. Відносні рівні експресії гена *TUBA-2-3* (референтний ген - убіхітин)**

За умов використання як референтного гена актину на початковому етапі відбувається підвищення рівня експресії гена *TUBA-2-3* у кілька разів від початкового рівня у випадку обох сортів. Впродовж наступних дев'яти днів рівень експресії у ярого сорту Елегія знижується, досягаючи початкових



значень на 7-й день. Рівень експресії гена *TUBA-2-3* у озимого сорту Деметра продовжує підвищуватись після 2-х днів аклімації, після чого знижується на 3-й день та знову зростає на 7-10 день (рис. 2).



**Рис. 2. Відносні рівні експресії гена *TUBA-2-3* (референтний ген - актин)**

Таким чином, знайдено відмінності в паттерні експресії гена альфа-тубуліну *TUBA-2-3* між ярим сортом Елегія та озимим сортом Деметра м'якої пшениці. Після 2 днів холодової аклімації відмічені значимо вищі рівні експресії гена *TUBA-2-3* у озимого сорту в порівнянні з ярим, що може свідчити про його роль в процесі відповіді на холодний стрес. Отримані результати частково підтверджуються літературними відомостями щодо характеру змін рівня експресії гена *TUBA-2-3* під дією низьких температур у пшениці [1,7], проте в даному дослідженні не спостерігається початкового пригнічення рівня відносної експресії після перших 24 год холодової аклімації. Для виявлення можливої ролі інших ізоформ гена альфа-тубуліну в холодо- та морозостійкості постає необхідність дослідження їх паттерну експресії у сортів з різним рівнем стійкості до низьких температур.



## Висновки

Виявлено загальну тенденцію до збільшення рівня експресії гена *TUBA-2-3* під дією низьких температур. На початкових етапах холодової аклімації (1 день) у обох сортів відбувається підвищення рівня експресії гена *TUBA-2-3* в 3-4 рази в порівнянні з контролем. Подальше збільшення експресії та її збереження на високому рівні виявлено у озимого сорту Деметра, у ярого сорту Елегія рівень експресії протягом 2-10 днів холодової аклімації значимо не відрізняється від контролю. Високі рівні експресії гена *TUBA-2-3* у озимого сорту в порівнянні з ярим може свідчити про зв'язок між рівнем холодостійкості та рівнем експресії гена *TUBA-2-3*.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Christov N.K. Differential expression of two winter wheat alpha-tubulin genes during cold acclimation / N.K. Christov, R. Imai, Y.B. Blume // Cell Biol. Int. – 2008. – Vol. 32. – P. 574–578.
2. Cold acclimation and freezing tolerance: a complex interaction of light and temperature / G.R. Gray // Plant Physiol. – 1997. – Vol. 114. – P. 467–474.
3. Interaction network of proteins associated with abiotic stress response and development in wheat / G. Tardif [et al.] // Plant Mol. Biol. – 2007. – Vol. 63. – P. 703–718.
4. Is microtubule disassembly a trigger for cold acclimation? / A. Abdrakhamanova [et al.] // Plant Cell Physiol. – 2003. – Vol. 44. – P. 676–686.
5. Jian L.C. Studies on microtubule cold stability in relation to plant cold hardiness / L.C. Jian, L.H. Sun, Z.P. Liu // Acta Bot. Sinica. – 1989. – Vol. 31. – P. 737–741.
6. Kerr G.P., Carter J.V. Tubulin isotypes in rye roots are altered during cold acclimation / G.P. Kerr, J.V. Carter // Plant Physiol. – 1990. – Vol. 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 / M. Farajalla Ridha, P.J. Gulick // Genome. – 2007. – Vol. 50. – P. 502–519.



8. The influence of light quality, circadian rhythm, and photoperiod on CBF-mediated freezing tolerance / P. Maibam [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – Vol. 14. – P. 11527–11543.

9. Xiong L. Cell signaling during cold, drought, and salt stress / L. Xiong, K.S. Schumaker, J.K. Zhu // Plant Cell. – 2002. – V. 14. – P. 165–183.

10. Буй Д. Д. Аналіз рівнів експресії генів альфа-тубуліну під час холодової акліматії у ярої та озимої пшениці / Д. Д. Буй, Я. В. Пірко, Я. Б. Блюм // Фактори Експериментальної Еволюції Організмів. – 2015. – Т. 17. – С. 27–30.

## АНАЛИЗ УРОВНЕЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА АЛЬФА-ТУБУЛИНА (TUBA-2-3) ВО ВРЕМЯ ХОЛОДОВОЙ АККЛИМАЦИИ У СОРТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ДЕМЕТРА И ЭЛЕГИЯ

Д. Д. Буй, А. Е. Демкович, Я. В. Пірко, В. И. Корховой, Я. Б. Блюм

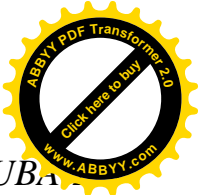
*Аннотация.* Проведено сравнение относительных уровней экспрессии гена альфа-тубулина *Ta\_TUBA-2-3* во время первых 10 суток холодовой акклиматации у двух сортов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Установлено, что на начальных этапах (1 сутки) происходит увеличение экспрессии у обоих сортов, а после 2-10 суток повышенный уровень экспрессии сохраняется у озимого сорта Деметра.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum*, холодовая акклиматация, тубулин, TUBA-2-3

## ANALYSIS OF GENE EXPRESSION OF TUBA-2-3 DURING COLD ACCLIMATION IN VARIETIES OF SOFT WHEAT DEMETRA AND ELEGIYA

D. D. Buy, A. E. Demkovich, Ya. V. Pirko, V.I. Korkhovoy, Ya. B. Blume

*Abstract.* A comparison of the relative levels of gene expression of alpha-tubulin *Ta\_TUBA-2-3* during the first 10 days of cold acclimation of two varieties of wheat (*Triticum aestivum* L.) Demetra and Elegiya was studied. It was established that in the initial stages of acclimation (1-st day) the expression of *Ta\_TUBA-2-3* in both varieties are increased, and after 2-10 days the high level of expression of the *Ta\_TUBA-2-3* is stored in the variety of winter wheat Demetra.



**Key words:** *Triticum aestivum*, cold acclimation, tubulin, gene *TUBA*  
expression