

УДК 633.111.1:577.21

UDC 633.111.1:577.21

4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений (биологические науки, сельскохозяйственные науки)

4.1.2. Plant breeding, seed production and biotechnology (biological sciences, agricultural sciences)

СОЗДАНИЕ НОВОГО KASP-МАРКЕРА НА АЛЛЕЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ГЕНА *PARG-2A* У ПШЕНИЦЫ

CREATION OF A NEW KASP MARKER FOR THE ALLELIC STATE OF THE *PARG-2A* GENE IN WHEAT

Кочешкова А.А.¹, Баженов М.С.¹, Крупин П.Ю.¹, Мохов Т.Д.¹, Меглицкая Я.С.¹, Архипов А.В.¹, Беспалова Л.А.², Пузырная О.Ю.², Агаева Е.В.², Яновский А.С.², Карлов Г.И.¹, Дивашук М.Г.¹

Kocheshkova A.A.¹, Bazhenov M.S.¹, Krupin P.Yu.¹, Mokhov T.D.¹, Meglitskaya Ya.S.¹, Arkhipov A.V.¹, Bespalova L.A.², Puzyrnaya O.Yu.², Agaeva E.V.², Yanovsky A.S.², Karlov G.I.¹, Divashuk M.G.¹

1 ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, Россия

1 All-Russian Scientific Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

2 ФГБНУ «Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко», Краснодар, Россия

2 FSBI "National Grain Center named after P.P. Lukyanenko", Krasnodar, Russia

Суперсемейство транскрипционных факторов AP2/EREBP считается важным регулятором роста и развития растений. Новый ген *PARG* (plant architecture related gene - ген, связанный с архитектурой растений), член семейства генов факторов транскрипции AP2/EREBP, и его промотор и терминатор были выделены в пшенице (*Triticum aestivum* L.). Его функции включают регулирование признаков, связанных с архитектурой растений и урожайностью. На полиморфизм во втором экзоне гена, приводящей к замене аминокислот в белке нами был разработан молекулярный KASP-маркер позволяющей детектировать два разных аллеля гена. Скрининг коллекций мягкой пшеницы и тритикале выявил лишь один сорт, мягкой пшеницы и один селекционный образец тритикале, несущие аллель «С»

The superfamily of transcription factors AP2/EREBP is considered an important regulator of plant growth and development. A new gene *PARG* (plant architecture related gene - a gene associated with plant architecture), a member of the AP2/EREBP transcription factor gene family, and its promoter and terminator were isolated in wheat (*Triticum aestivum* L.). Its functions include the regulation of traits related to plant architecture and yield. We have developed a molecular KASP marker for polymorphism in the second exon of the gene, which leads to the replacement of amino acids in the protein, allowing us to detect two different alleles of the gene. Screening of collections of soft wheat and triticale revealed only one variety, soft wheat and one breeding sample of triticale bearing the "C" allele

Ключевые слова: ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР, ГЕН, ПЦР, KASP-МАРКЕР, ПШЕНИЦА, TRITICUM AESTIVUM

Keywords: TRANSCRIPTION FACTOR, GENE, PCR, KASP MARKER, WHEAT, TRITICUM AESTIVUM

<http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-190-005>

Введение

Пшеница является важной культурой, одной из лидеров по распространению в мире среди сельскохозяйственных культур. Мягкая пшеница приносит много пользы для здоровья человека - как и источник крахмала, белка, витаминов, особенно витаминов группы В и минеральных элементов.

<http://ej.kubagro.ru/2023/06/pdf/05.pdf>

Замедление роста урожая продовольственных культур и при этом активный рост населения планеты требует совершения прорыва в производстве пшеницы. И в первую очередь создания новых сверхпродуктивных сортов, устойчивых к абиотическим стрессам в условиях изменяющегося климата окружающей среды. Для этого необходимо производить поиск и внедрение в селекционные программы новых генов, в том числе оказывающих комплексный положительный эффект на рост, качество и урожайность. К таким генам можно отнести транскрипционные факторы, часто оказывающие плеiotропный эффект [1].

Факторы транскрипции, являясь сложными белками способны регулировать экспрессию генов. В целом, они могут быть использованы в селекции сельскохозяйственных культур, в частности пшеницы, в качестве инструментов для повышения урожайности, путем регуляции экспрессии генов, развития хлоропластов и улучшения архитектуры растений, фотосинтеза и устойчивости к стрессу.

Семейство транскрипционных факторов AP2/EREBP (этилен-чувствительные элементы-связывающие белки) играют важную роль в росте и развитии растений. Гены суперсемейства AP2/EREBP принадлежат к надсемейству специфических только для растений факторов транскрипции, характеризующихся наличием ДНК-связывающего домена AP2 из 60 аминокислот. Предыдущие исследования показали, что члены подсемейства APETALA2 (AP2) играют роль в контроле процессов развития цветков и семян. У арабидопсиса AP2 также участвует в определении размера семян, веса семян и накоплении белка в семенах [2].

Были проведены обширные исследования семейства транскрипционных факторов AP2/EREBP у пшеницы, но основное внимание было сосредоточено на подсемействах DREB (dehydration responsive element binding proteins – белки связывания чувствительного к

обезвоживанию элемента) и ERF (ethylene responsive factors - факторы, реагирующие на этилен), поскольку их сверхэкспрессия повышает устойчивость к абиотическим и биотическим стрессам [3]. Однако некоторые гены семейства были изучены и показаны их функции в росте и развитии растений.

Li и соавторы (2016) [4] выявили и охарактеризовали у пшеницы (*Triticum aestivum* L.) совершенно новый ген суперсемейства AP2/EREBP обозначенный как *TaPARG* - связанный с архитектурой растений ген. У мягкой пшеницы были выявлены два гена гомеолога *TaPARG* - на хромосоме 2A (*TaPARG-2A*) и на хромосоме 2D (*TaPARG-2D*). Исследователи продемонстрировали, что ген *TaPARG-2A* вносит свой вклад, как в рост, так и в развитие пшеницы. А именно затрагивает регуляцию признаков, связанных с архитектурой растений, таких как высота растений, кустистость и в урожайность, включая массу 1000 зерен.

Исследования экспрессии генов показали, что *TaPARG* экспрессируются во многих тканях на трех стадиях роста, что указывает на роль плейотропного гена во многих процессах развития. Сверхэкспрессия *TaPARG* в рисе вызвала ряд изменений, включая уменьшение высоты растения, скорости завязывания семян и массы 1000 зерен, но увеличение количества побегов на растение.

Современные биотехнологические подходы с использованием молекулярных маркеров в селекции растений за последние десятки лет позволили достигнуть больших результатов, как в фундаментальных исследованиях генетического разнообразия, картирования генов и локусов количественного признака. Так и в практически значимых исследованиях генов и участков, сцепленных с генами, контролирующими хозяйственно-значимые признаки и создании новых сортов. Одной из наиболее эффективных и быстрых технологий является KASP-маркеры

(Конкурентная аллель-специфичная ПЦР / Competitive Allele Specific PCR).

В настоящем исследовании нами был разработан молекулярный KASP-маркер на плейотропный ген *TaPARG-2A*, с целью молекулярного тестирования и изучения коллекции мягкой пшеницы и тритикале.

Материалы и методы

Растительный материал. Для исследования нами были использованы коллекция мягкой пшеницы, включающая в себя 202 образца, в первую очередь Российской селекции, и коллекция тритикале, состоящая из 81 образцов.

Выделение ДНК. Для выделения ДНК использовали высушенные листья зрелых растений, с последующим их измельчением с помощью гомогенизатора, а также свежие трехдневные проростки, с последующим измельчением ручным методом. Тотальную геномную ДНК выделяли СТАВ методом с модификациями [5].

Биоинформатический анализ и секвенирование. Нуклеотидные последовательности гена *TaPARG-2A* (TraesCS2A02G267600) и его фланкирующие регионы, промотора и терминатора, были найдены в референсном геноме пшеницы IWGSC RefSeq1.0 (<https://www.wheatgenome.org/>). Гомеологи из двух других субгеномов пшеницы мягкой для каждого гена были найдены с использованием базы данных Ensembl Plants (<http://plants.ensembl.org/>). Последовательности гена и его гомеологов были выравнены в программе GeneDoc2.7. Подбор субгеном-специфичных праймеров осуществлялся с помощью онлайн-сервиса Primer-BLAST NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih/tools/primer-blast/>). Настройки Primer-BLAST отличались от стандартных: для проверки специфичности праймеров использовалась база данных не избыточных последовательностей (nr) для рода *Triticum*, минимальная длина праймера составляла 20 нуклеотидов, а оптимальная – 23 нуклеотида. Проверка

специфичности праймеров проводилась также путем визуализации их на выравнивании гомеологов из трех субгеномов (А, В и D). Праймеры подбирались таким образом, чтобы длина единичного ПЦР-продукта не превышала 2500 пар оснований, чтобы ПЦР-продукты перекрывались друг с другом и охватывали вместе всю последовательность гена и, если это возможно, от 500 до 1000 пар оснований, фланкирующих последовательностей с каждого конца, захватывающих область промотора и терминатора.

Секвенирование коротких фрагментов проводилось на платформе Illumina MiSeq в ООО «Геномед». Для создания ДНК-библиотеки использовали набор реактивов Swift 2S™ Turbo DNA Library Kits. Ампликоны разных сортов исследуемой нами мягкой пшеницы, метили индивидуальными баркодами. С помощью баркодов после секвенирования возможно разделить прочтения по сортам.

Разработка молекулярного KASP-маркера. На диагностические полиморфные сайты были разработаны праймеры KASP. К аллель-специфическим праймерам присоединяются стандартные «хвосты» для флуорофоров FAM и HEX. Целевой однонуклеотидный полиморфизм располагается на 3'-конце. Общий праймер был сконструирован таким образом, чтобы общая длина ампликона была менее 120 п.н. [6]. Нами были подобраны праймеры, отвечающие всем требованиям KASP-анализа (Табл. 1).

Таблица 1. Последовательность праймеров для KASP-анализа

Название праймера	Нуклеотидная последовательность
<i>TaPARG-2A-A</i>	5'- CCTGGTGACGCCACGGTA -3'
<i>TaPARG-2A-B</i>	5'- CCTGGTGACGCCACGGTG -3'
<i>TaPARG-2A-Common</i>	5'- GCAAGTCCATCGACACGTTTC

KASP-анализ. Рабочая ПЦР-смесь содержала 5 мкл мастер-микс (LCG Biosearch Technology, KASP 2X Mmix KBS-1050–102 с присутствием красителей (FAM, HEX, ROX); 5 мкл ДНК-матрицы в концентрации 50 нг/мкл и 0,14 мкл праймеров, при общем объеме смеси 10 мкл. Условия амплификации смеси: один цикл - 94°C в течении 15; девять циклов - 94°C в течении 20 с, 60 С в течении 1 мин, с понижением температуры на 0,6°C каждый цикл; тридцать пять циклов - 94°C в течении 20 с, 55°C в течении 1 мин; 37°C в течении 1 мин – на этом этапе производилось считывание сигнала. Для проведения ПЦР с KASP-маркером использовались прибор амплификатор BIO-RAD CFX96 и программное обеспечение CFX Manager.

Результаты и обсуждение

Нами была секвенирована нуклеотидная последовательность гена *TaPARG-2A* у 10 сортов мягкой пшеницы разного географического происхождения. При биоинформатическом анализе были выявлены ряд не значимых полиморфизмов. Однако в кодирующем участке гена *TaPARG-2A* были выявлены полиморфизм в втором экзоне гена, но у большинства сортов данный фрагмент попал в область с низкой глубиной секвенирования (Рис. 1). При выравнивании области с интересующим нас полиморфизмом у референсных последовательностей пшениц из базы данных IWGSC RefSeq1.0 (<https://www.wheatgenome.org/>) был четко детектирован однонуклеотидный полиморфизм во 2-ом экзоне с.793C>T (Рис. 2). Данный SNP связан с заменой аминокислоты гистидина на уроцил р.(H265Y) у двух сортов Norin61 и Chinese Spring. При этом вариант белка у сорта Chinese Spring по прогнозу PROVEAN, вероятно нефункционален (PROVEAN score = -4.749).

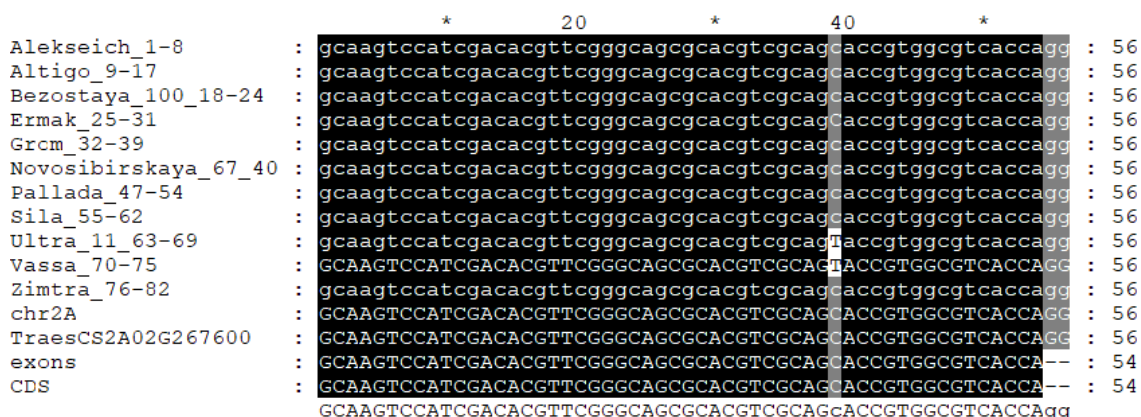


Рисунок 1. Выравнивание нуклеотидных последовательностей второго экзона гена *TaPARG-2A* (TraesCS2A02G267600) у секвенированных нами сортов мягкой пшеницы

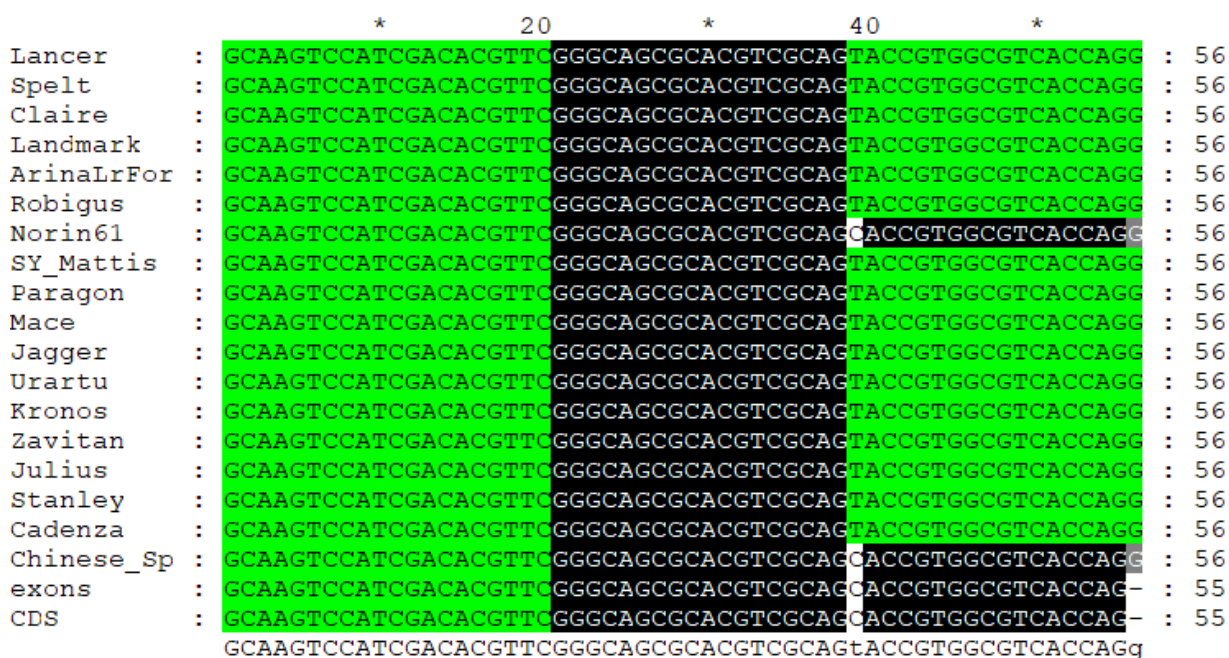


Рисунок 2. Выравнивание референсных последовательностей второго экзона гена *TaPARG-2A* (TraesCS2A02G267600) у пшеницы

На данный полиморфизм с.793C>T был разработан KASP-маркер. В качестве праймеров подобраны следующие нуклеотидные последовательности: *TaPARG-2A-A* 5'- cctggtgacgccacggtA -3'; *TaPARG-2A-B* 5'- cctggtgacgccacggtG -3'; *TaPARG-2A-Common* 5'- gcaagtccatcgacacggttc - 3'. Длина ампликона была 56 п.н. Обратные праймеры *TaPARG-2A-A* и *TaPARG-2A-B* специфичны А-субгеному

мягкой пшеницы, общий прямой праймер не специфичен для субгенома А и амплифицируется со всех трех субгеномов мягкой пшеницы.

Маркер был апробирован, сорт Chinese Spring, ожидаемо, отличался у него был детектирован аллель «С», в то время, как у других пшениц амплифицировался аллель «Т» (Рис. 3).

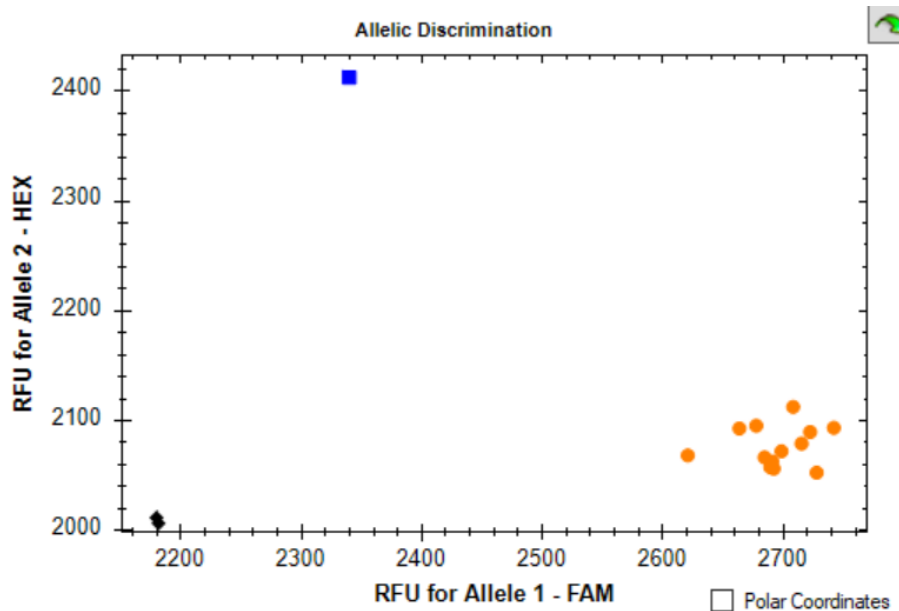


Рисунок 3. Пример работы системы KASP на ген *TaPARG-2A*. Синий квадрат – сорт пшеницы Chinese Spring, несущий аллель «С»; оранжевые круги – сорта Васса, Алтиго, Сила, Вид, Новосибирская 67, Старшина, несущие аллель «Т»; черный ромб – отрицательный контроль (вода).

После апробации на разработанный KASP-маркер были проанализированы коллекции мягкой пшеницы и тритикале, включающей сорта российской селекции. Среди 204 сортов выявлен единственный сорт, несущий аллель «С»: сорт Ермак. Процент встречаемости в анализируемой коллекции мягкой пшеницы составляет всего 0,5% (Рис. 4). В анализируемой коллекции тритикале также был выявлен единственный селекционный образец 0-113t12, несущий редкий аллель «С», что составляет 1,2% коллекции (Рис. 5).

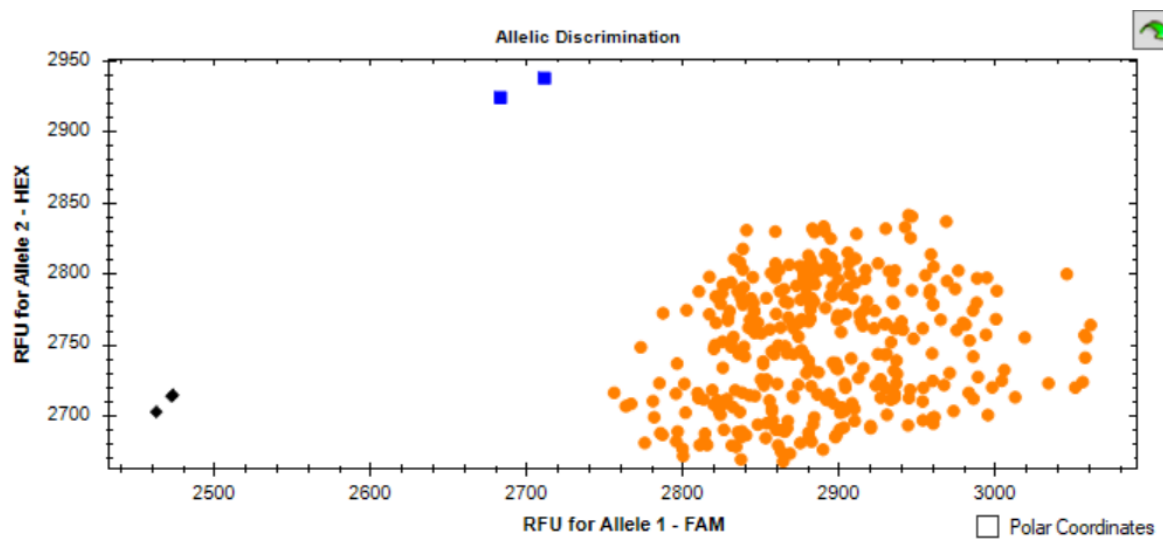


Рисунок 4. Результаты KASP-анализа аллельного состояния гена *TaPARG-2A* на коллекции мягкой пшеницы: оранжевый круг – аллель «Т», синий квадрат – аллель «С»; черный цвет – отрицательный контроль (вода).

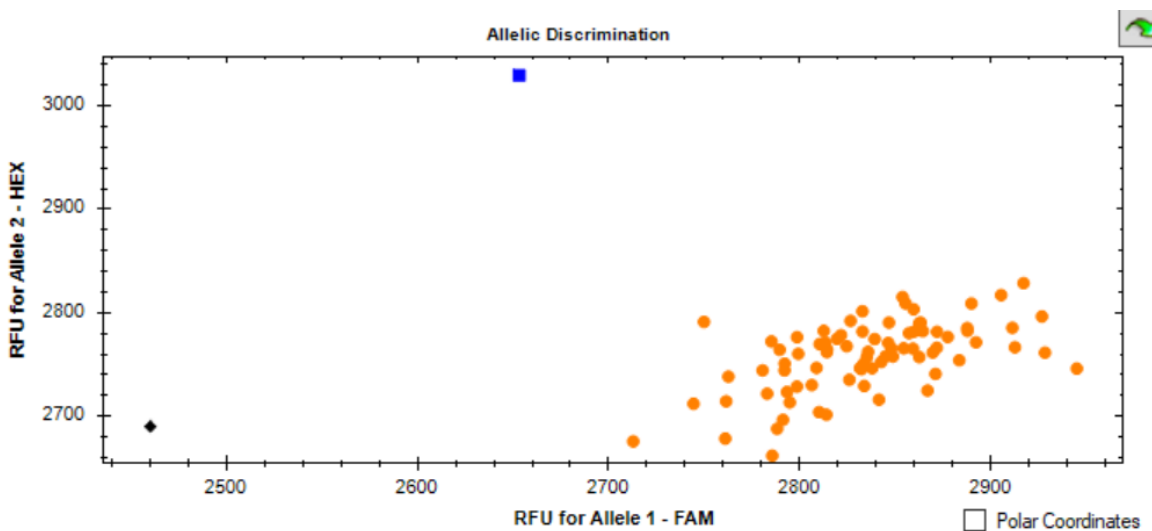


Рисунок 5. Результаты KASP-анализа аллельного состояния гена *TaPARG-2A* коллекции тритикале: оранжевый круг – аллель «Т», синий квадрат – аллель «С»; черный цвет – отрицательный контроль (вода).

Обсуждение

Сорт Ермак, несущий аллель «С», является высокопродуктивным сортом с урожайностью от 76 до 105 ц/га и достаточно высокой массой 1000 семян – 42-46 г. При этом сорт обладает высокой зимостойкостью,

высокой засухоустойчивостью, устойчивостью к полеганию. Что делает его перспективным для использования в селекции.

Сверхэкспрессия гена *TaPARG* у риса привела к уменьшению высоты растения, уменьшению скорости завязывания семян и уменьшению массы 1000 зерен и увеличению кущения. Поскольку вариант белка аллеля «С» по прогнозу PROVEAN приводит к потере функциональности гена, это может, как следствие, купировать негативного влияния гена на хозяйственно-ценные признаки. Что, в свою очередь, может являться причиной высокой продуктивности сорта Ермак, в комплексе с положительным влиянием других хозяйственно-значимых генов.

Анализ влияния столь редкого полиморфизма, обнаруженный лишь у одного сорта возможен при создании расщепляющейся популяции. В том числе в условиях лаборатории, с использованием современных методов ускоренной селекции и цифрового фенотипирования.

В свою очередь KASP-технология является наиболее подходящей системой детектирования аллельного состояния генов для массового анализа большого числа образцов, как как для получения результата не требует дополнительной трудозатратой постановки электрофореза в агарозном геле. Разработанный нами молекулярный KASP-маркер позволяет производить массовые анализы для быстрой и достоверной детекции аллеля гена *TaPARG-2A*. В том числе подойдет для генотипирования расщепляющейся популяции с использованием генетического материала близкородственных видов пшеницы.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ №21-76-00043 и государственного задания FGUM-2023-0005

Литература

1. Baillo E. H. et al. Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement //Genes. – 2019. – Т. 10. – №. 10. – С. 771.
2. Jofuku K. D. et al. Control of seed mass and seed yield by the floral homeotic gene APETALA2 //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2005. – Т. 102. – №. 8. – С. 3117-3122.
3. Xu Z. S. et al. Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement F //Journal of integrative plant biology. – 2011. – Т. 53. – №. 7. – С. 570-585.
4. Li B. et al. Two novel AP2/EREBP transcription factor genes TaPARG have pleiotropic functions on plant architecture and yield-related traits in common wheat //Frontiers in Plant Science. – 2016. – Т. 7. – С. 1191.
5. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi // Plant Molecular Biology Manual. – Dordrecht: Springer Netherlands, 1994. – Pp. 183–190
6. Никитина Е. А. и др. Конкурентная аллель-специфичная ПЦР (KASP): особенности, интерпретация результатов //Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2023. – Т. 1. – №. 6. – С. 79-93.

References

1. Baillo E. H. et al. Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement //Genes. – 2019. – Т. 10. – №. 10. – S. 771.
2. Jofuku K. D. et al. Control of seed mass and seed yield by the floral homeotic gene APETALA2 //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2005. – Т. 102. – №. 8. – S. 3117-3122.
3. Xu Z. S. et al. Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement F //Journal of integrative plant biology. – 2011. – Т. 53. – №. 7. – S. 570-585.
4. Li B. et al. Two novel AP2/EREBP transcription factor genes TaPARG have pleiotropic functions on plant architecture and yield-related traits in common wheat //Frontiers in Plant Science. – 2016. – Т. 7. – S. 1191.
5. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi // Plant Molecular Biology Manual. – Dordrecht: Springer Netherlands, 1994. – Pr. 183–190
6. Nikitina E. A. i dr. Konkurentnaja allel'-specifichnaja PCR (KASP): osobennosti, interpretacija rezul'tatov //Izvestija Timirjazevskoj sel'skohoz'jajstvennoj akademii. – 2023. – Т. 1. – №. 6. – S. 79-93.