

УДК: 575.113:581.821:633.111

ДНК-МАРКЕРИ ДЛЯ ДЕТЕКЦІЇ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ БІОГЕНЕЗУ ПРОДИХІВ *EPF1*, *EPF2* ТА *MUTE* ПШЕНИЦІ

Римар Юлія Юріївна

yulia-r@i.ua

Лашнеко Ольга Романівна

olhashnurenko@gmail.com

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
м. Київ, Україна

Анотація – ДНК-маркери є інформативним молекулярним методом для відбору генотипів й значно пришвидшують селекційний процес. Через це розробка молекулярних маркерів є важливим етапом створення селекційних ліній сортів з важливими агрономічними ознаками. Однією з таких ознак є посухостійкість, яка безпосередньо пов'язана із випаровуванням води рослиною. Зважаючи на те, що продихова транспірація займає найбільший відсоток від загальних витрат води рослиною, в дослідженні особлива увага приділяється генам біогенезу продихів. Метою цієї роботи було розробити ДНК-маркери на виявлення поліморфізму в промоторних і кодуючих послідовностях генів біогенезу продихів *EPF1*, *EPF2* та *MUTE* й провести скринінг колекції пшениці для пошуку цінних алелей генів. В результаті роботи розроблено 12 відтворювальних ДНК-маркерів, а саме 5 ДНК-маркерів на визначення поліморфізму в промоторній області генів *EPF1*, *EPF2* та 7 ДНК-маркерів на визначення поліморфізму в кодуючих ділянках генів *EPF1*, *EPF2* та *MUTE*. За допомогою розроблених маркерів проведений скринінг вибірки зразків пшениці м'якої міжнародної колекції СІММУТ. У такий спосіб визначено, що найчастіше зустрічалися дві SNP (в позиції -1223 A→G; в позиції -1221 A→C) в промоторній ділянці гена *EPF1* з субгеному А серед досліджуваних зразків. Низьку частоту поширення серед вибраних зразків СІММУТ мала описана інсерція в промоторній частині гена *EPF1* з субгеному В. Також часто детектувалася серед досліджуваних зразків 4-пн делеція (в позиції -9) гена *EPF1-D1*, а однонуклеотидний поліморфізм Т на G в положенні +274 гена *EPF1-A1* мав низьку частоту поширення. Крім того, 297-пн інсерція в промоторі гена *EPF2* субгеному В, яка описана для українських сортів, зовсім не виявлена серед міжнародної колекції. Так, створені системи ДНК-маркерів доцільно використовувати як у фундаментальних дослідженнях генетичного різноманіття сортів пшениці, так і в питаннях захисту прав інтелектуальної власності та молекулярної паспортизації.

Ключові слова: ДНК-маркери, поліморфізм, гени біогенезу продихів *EPF1*, *EPF2*, *MUTE*, пшениця м'яка

І. ВСТУП

Пшениця м'яка (*Triticum aestivum* L.) є важливою злаковою продовольчою культурою. Разом з тим, посуха, спричинена швидкими небажаними змінами клімату та глобальним потеплінням, має негативний вплив на врожайність і продуктивність цієї культури. Найбільш негативний вплив посуха спричиняє на вегетативний і репродукційні етапи розвитку рослин [1]. Адаптація рослин до умов зниження вологості й розробка заходів щодо ефективного використання води рослиною є необхідною стратегією для підвищення посухотолерантності рослин.

Одним із перспективних підходів є залучення молекулярних маркерів до відбору потенційних донорів селекційного матеріалу та проведення маркер-допоміжної селекції (marker-assisted selection MAS) [2].

Хоча традиційна селекція має успіхи у проведенні відбору ліній з необхідними агрономічними ознаками, але цей процес вимагає досить багато часу і є трудомістким. Наразі існують та успішно використовуються для MAS молекулярні маркери, які пов'язані із врожайністю, із кількістю зерен в колосі, морфологічними характеристиками, стійкістю до хвороб, стресу, посухи тощо [3 - 5]. За останніми даними для пшениці налічується 157 молекулярних маркерів для понад 100 локусів [6]. Зручність, інформативність молекулярних методів – дозволяють виявити найдетальніші зміни генетичної інформації у відібраних селекціонерами фенотипах (комерційних сортів), які підтвердили свій ефективний прояв у формуванні величини і якості збіжжя [2, 5].

Найбільша втрата вологи рослиною відбувається через продихи – клітинні утворення на поверхні листків, які забезпечують транспірацію [7]. Морфологія продихів, щільність на листовій поверхні можуть безпосередньо впливати на процеси газообміну, а також на ефективність використання води рослиною [8]. Продихи формуються з меристиміодних клітин у результаті асиметричного поділу. Цей процес контролюють гени біогенезу продихів – *EPF1*, *EPF2*, *FLP*, *SCR/SHR*, а також гени *MUTE*, *FAMA*, *SPCH* та інші гени-регулятори клітинного циклу [9, 10]. Вперше ці генетичні детермінанти були охарактеризовані для рослини *Arabidopsis thaliana* [11]. Продукти генів біогенезу продихів *EPF1*, *EPF2* через взаємодію з клітинними рецепторами регулюють диференціацію продихових клітин. Таким чином, ці протеїни впливають на патерн продихів та регулюють їх кількість на листку. Також важливим генетичним регулятором виступає транскрипційний фактор *MUTE*, який регулює асиметричний поділ клітин при утворенні замикаючих клітин продихового апарату й відповідає за перехід від проліферації до диференціації клітин [12]. Транскрипційний фактор *MUTE* починає експресуватися в меристиміодних клітинах і забезпечує утворення спершу материнських замикаючих клітин, а потім замикаючих клітин продихів. Також транскрипційний фактор *MUTE* безпосередньо контролює ключові гени біогенезу продихів та гени клітинного циклу [9, 12, 13].

На модельних рослинах *A. thaliana* показано, що надекспресія генів *EPF1* та *EPF2* призводить до зменшення кількості продихів на одиницю площі листової пластини [14, 15]. Для того, щоб підвищити ефективність використання води рослиною може бути достатня надмірна експресія лише одного гена *EPF2* [15]. Враховуючи сказане та необхідність забезпечувати врожайність сільськогосподарських культур на фоні підвищення посухостійкості були охарактеризовані гомологи генів *EPF1* та *EPF2* для ячменю *Hordeum vulgare*.

Дослідження надекспресії гена *EPF1* у генномодифікованих рослин *H. vulgare* продемонструвало зменшення кількості продихів, що відповідно призвело до підвищення стійкості до посухи й при цьому зберігався рівень врожайності [16]. З огляду на ці дані детальне дослідження генів біогенезу продихів *EPF1*, *EPF2* та *MUTE* у пшениці *Triticum aestivum* L. та створення систем молекулярних маркерів є перспективним в контексті підвищення посухотолерантності.

II. МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ

Метою роботи було розробити ДНК-маркери на виявлення поліморфізму в промоторних і кодуючих послідовностях генів біогенезу продихів *EPF1*, *EPF2* і *MUTE* та провести скринінг колекції пшениці для пошуку цінних алелей генів.

III. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Пари праймерів конструювали на основі вирівнювання нуклеотидних послідовностей українських сортів ‘Астарта’, ‘Одеська 267’, ‘Дарунок Поділля’, ‘Поліська 90’, ‘Подільська’ та ‘Наталка’, отриманих в результаті секвенування [17, 18]. В якості референтної послідовності використовували геном сорту ‘Chinese Spring’ (отримана з бази даних міжнародного консорціуму із секвенування геному пшениці IWGSC_ref_V1.0). Досліджувані сорти є інтенсивного та високоінтенсивного типу вирощування, але мають відмінності за агрономічними характеристиками (за даними Державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення в Україні). Високою посухотолерантністю відзначаються сорти ‘Астарта’, ‘Одеська 267’, ‘Подільська’, а менш посухотолерантні – ‘Дарунок Поділля’, ‘Поліська 90’ та ‘Наталка’. Для аналізу отриманих нуклеотидних послідовностей промоторів генів *EPF1*, *EPF2* та *MUTE* з трьох гомеологічних геномів пшениці сортів ‘Наталка’ та ‘Подільська’ [17, 18] на рахунок впливу змін між сортами на *cis*-регуляторні елементи було використано спеціалізований біоінформатичний ресурс

NewPLACE

[<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>].

Праймери для створення систем ДНК-маркерів були сконструйовані за допомогою Інтернет-ресурсу Primer-BLAST (NCBI) [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?GROUP_TARGET=on].

Праймери синтезувалися на замовлення компанією Metabion (Німеччина). Для оптимізації умов полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використовували розчин загальної ДНК. Загальну ДНК для аналізу виділяли з двох зернівок за адаптованою методикою [19, 20] та розчиняли у ТЕ-буфері рН 8,0 (10 мМ Tris-HCl рН 8,0, 1 мМ ЕДТА) до 30 нг/мкл.

Типова ПЛР включала 20 мкл реакційної суміші, до якої входили наступні компоненти: 1 одиниця полімерази FIREPol® DNA polymerase (Solis BioDyne, Естонія), у реакційному буфері Reaction Buffer B (Mg²⁺-free, 0,8 М Tris-HCl, 0,2 М (NH₄)₂SO₄, 0,2% w/v Tween-20), 1,5–2 мМ MgCl₂, по 0,5 мкМ прямого та зворотного праймерів, 0,2 мкМ кожного dNTP (Solis BioDyne, Естонія), та 30 нг виділеної загальної ДНК пшениці, стерильна деіонізована вода до повного об'єму 20 мкл [20], а також у деяких випадках для GC багатих ділянок буфер S (Solis BioDyne, Естонія).

Для оптимізації та підбору умов ампліфікації досліджуваних фрагментів використовували градієнтну ПЛР. Реакції проводили в ампліфікаторах Eppendorf Mastercycler gradient 5330 та Thermo Fisher Scientific 5020.

Електрофорез загальної ДНК і візуалізацію ампліконів здійснювали в 1 %

(для загальної) та 1,2 % (для продуктів ампліфікації) агарозному гелі із додаванням 5 мкг/мл етидій броміду. Для електрофоретичного розділення використовували LB-буфер (10 мМ Li₂B₄O₇, рН 8,5) при напрузі 6 В/см.

Для оцінки поширеності частоти алелей використовували колекцію зразків пшениці CIMMYT (Global Wheat Program of the International Maize and Wheat Improvement Center). Для обрахування частот алелей згідно із загальноприйнятою методикою [21].

IV. РЕЗУЛЬТАТИ

4.1. З'ясування нуклеотидної послідовності та структура генів *EPF1*, *EPF2* і *MUTE*

На основі нуклеотидних послідовностей генів *EPF1*, *EPF2* та *MUTE* для *Hordeum vulgare* знайдені гомологічні ділянки у геномі *Triticum aestivum* та спрогнозовано структуру генів для *T. aestivum* [17]. Характеристика гомологічних нуклеотидних послідовностей наведена в таблиці 1. Досліджувані гени *EPF1*, *EPF2* та *MUTE* у *T. aestivum* мають подібну структурну організацію (рис. 1) і знаходяться у хромосомі 2. Так, гени мають 2 екзони, які розділені інтроном. Ген *EPF1* з субгеному А має розмір 936 пар нуклеотидів (пн), а з субгеному В – 831 пн, субгеному D – 857 пн. Ген *EPF2*-А має розмір 819 пн, *EPF2*-В – 1064 пн, а *EPF2*-D – 950 пн. Ген *MUTE* є трохи більшим у порівнянні з двома попередніми генами. Для субгеному А розмір його становить 1056 пн, для субгеному В – 1111 пн, а для субгеному D – 1044 пн.

Таблиця 1. Характеристика нуклеотидних послідовностей генів *EPF1*, *EPF2*, *MUTE* за даними Генетичного банку NCBI (IWGSC CS RefSeq v2.1)

Ген	Хромо-сома	Ген, координати	Розмір гена, пн	мРНК, пн	Промотор, координати	CDS, координати	Довжина протеїна, аа	GenBank Accession
<i>EPF1</i> -A	2A	750612312-750612786	936	851	750612731-750614872	1 екзон: 37...331 2 екзон: 417...694	190	NC_057797

<i>EPF1-B</i>	2B	759580160- 759580626	831	743	759580313- 759582788	1 екзон: 120...234 2 екзон: 356...591	127	NC_057798
<i>EPF1-D</i>	2D	619453074- 619453493	857	773	619453227- 619455103	1 екзон: 160...271 2 екзон: 356...594	116	NC_057799
<i>EPF2-A</i>	2A	559434971- 559435789	819	699	559432659- 559435223	1 екзон: 135...240 2 екзон: 361...677	140	NC_057797
<i>EPF2-B</i>	2B	494252050- 494253113	1064	943	518026462- 518027390	1 екзон: 310...421 2 екзон: 543...877	148	NC_057798
<i>EPF2-D</i>	2D	415102168- 415102671	950	829	415102225- 415100599	1 екзон: 235...340 2 екзон: 462...799	147	NC_057799
<i>MUTE-A</i>	2A	75461634- 75462689	1056	934	75459816- 75461777	1 екзон: 47...592 2 екзон: 715...819	216	NC_057797
<i>MUTE-B</i>	2B	115574279- 115575389	1111	936	115572709- 115573750	1 екзон: 3...617 2 екзон: 793...894	238	NC_057798
<i>MUTE-D</i>	2D	74109312- 74110355	1044	924	74106782- 74107672	1 екзон: 56...601 2 екзон: 722...823	215	NC_057799

4.2. Розробка *in silico* систем ДНК-маркерів і їх апробація для виявлення поліморфізму промоторних послідовностей генів *EPF1*, *EPF2* та *MUTE*

Промотори є важливими елементами регуляції експресії генів, тому будь-які зміни в цих нуклеотидних послідовностях можуть мати безпосередній вплив на функціональність генів. Через це, звертається увага на варіативні ділянки промоторів досліджуваних генів біогенезу продохів. Вивчення міжсортового поліморфізму промоторних нуклеотидних послідовностей генів біогенезу продохів *EPF1*, *EPF2* та *MUTE* дало можливість розробити ДНК-маркери для виявлення інсерцій та одонуклеотидного поліморфізму (single nucleotide polymorphism, SNP) в зазначених послідовностях. На основі секвенованих послідовностей промоторних ділянок генів

EPF1-A1, *EPF1-B1*, *EPF1-D1*, *EPF2-B1*, *MUTE-A1* пшениці м'якої сортів 'Подільянка' та 'Наталка' [18] розроблено сім ДНК-маркерів. Використані сорти української селекції є досить поширеними за обсягами посівних площ в Україні, а також відрізняються за чутливістю до посухи. Більшою стійкістю до посухи відзначається 'Подільянка', а менш стійка – 'Наталка'. Саме тому вони були обрані для нашого дослідження.

Для виявлення поліморфізмів у промоторній ділянці гена *EPF1* створені маркери – prE1A1, prE1B1, prE1D1, prE1D2; гена *EPF2* – prE2B1; гена *MUTE* – prMA1 та prMA2. Послідовності та коротка характеристика праймерів наведені в таблиці 2. Схематичне зображення детектованого поліморфізму наведено на рисунку 1. Приклад проведення оптимізації роботи праймерів до створених маркерів наведено на рисунку 2.

Таблиця 2. Характеристика розроблених пар праймерів на виявлення поліморфізму генетичних послідовностей промоторів генів *EPF1*, *EPF2* та *MUTE*.

Промотор на ділянка гена	Назва праймерів	Нуклеотидна послідовність (5'→3')	Tm, °C	Довжина ампліфікованого фрагменту, пн		Детектований поліморфізм
				‘Подольанка’	‘Наталка’	
EPF1-A1	prE1A1 F	GAT TGC TGA AGT AGT AAA GAC	55	-	380	-1223 A→G; -1221 A→C
	prE1A1 R	TCA GGT TCA GTT CTT GGC AT	56			
EPF1-B1	prE1B1 F	GAA ACC CTA ACC CTA GCG CA	60	353	480	127 пн інсерція (-1486...-1487)
	prE1B1 R	TTT TCG TGC AAA GAG TGC CG	58			
EPF1-D1	prE1D1 F	GCT CTT TTG ACC ACT ACT TAG	57	-	280	11 пн інсерція (-1584...-1585)
	prE1D1 R	GCA ACC GAG CAT CCA ACT AT	58			
	prE1D2 F	TCC GTG TGA TGG AAT TCG AG	58	334	-	6 пн делеція в позиції -268...-273
	prE1D2 R	AGA AGA AGA CGA GCG TGG TG	60			
EPF2-B1	prE2B1 F	ATT GGT TCC TAT CCT CCG CA	58	-	267	297 пн інсерція (-963...-964)
	prE2B1 R	TGG GAA GGG GGC TAT GAA CT	60			
MUTE-A1	prMA1 F	GCA GTA AAG TGG ACA CGC A	58	716	-	276 пн інсерція (-1865...-2140)
	prMA1 R	TGT GGC AAG ACA ATT AAG AGA ACA G	60			
	prMA2 F	GCA GTA AAG TGG ACA CGC A	58	693	417	
	prMA2 R	AGA GAT TGA TTT GGT AAC CCC G	58			

ДНК-маркер prE1A1 розроблявся для виявлення двох SNP (в позиції -1223 A→G; в позиції -1221 A→C) в промоторній ділянці гена *EPF1* з субгеному А на основі нуклеотидної послідовності сорту ‘Наталка’. Однонуклеотидна заміна A→G (-1223) виявлена у сорті ‘Наталка’ за даними біоінформатичного ресурсу NewPLACE призводить до утворення сайту зв'язування

білків, а також утворюється елемент ТАААГ регуляції експресії генів, який характерний для замикаючих клітин продихів [22]. Заміна A→C в сорті ‘Наталка’ призводить до елімінації ТАТА-боксу [23]. Для сорту ‘Наталка’ довжина очікуваного ампліфікованого фрагмента становить 380 пн, а в сорті ‘Подольанка’ не очікується ампліфікації.

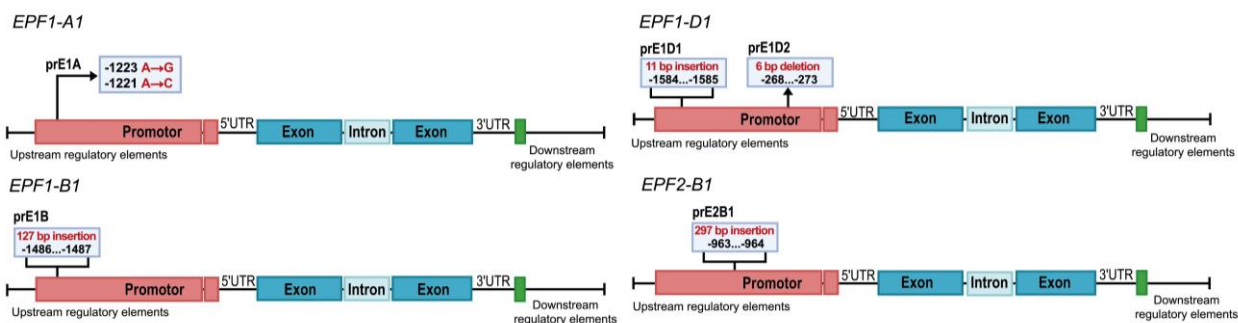


Рис. 1. Схематичне зображення детектованого поліморфізму в промоторних ділянках генів *EPF1* та *EPF2* для розроблених ДНК-маркерів.

ДНК-маркер prE1B1 розроблений на виявлення варіабельності в промоторній частині гена *EPF1* з субгеному В. Завдяки цій системі можна детектувати інсерцію розміром 127 пн в позиції -1486...-1487 від старту транскрипції. Ця інсерція сприяє утворенню ряду регуляційних елементів експресії, таких як елемент світлозалежної експресії MgProto, елемент ранньої реакції на зневоднення та водний стрес, консенсусна послідовність промотора СААТ та інші [24]. Для сорту 'Наталка' розмір очікуваного амплікона становить 480 пн, а для сорту 'Подольанка' – 353 пн.

Також на виявлення поліморфізму в промоторному регіоні гена *EPF1* субгеному D синтезовано ДНК-маркер prE1D1, який виявляє інсерцію у сорті 'Наталка' в позиції -1584...-1585 від старту транскрипції. Ця інсерція розміром 11 пн нуклеотидів сприяє утворенню елементу мезофіл-специфічної експресії, елементу, який реагує на еліситори та WB-боксу, який є елементом зв'язування WRKY протеїнів [25]. Також утворюється регуляторний елемент W-бокс, який відповідає за реакцію на саліцилову кислоту

і є елементом патоген-залежної експресії в сигнальному шляху гібереліна. Для позитивного контролю (сорт 'Наталка') розмір синтезованого фрагмента становить 280 пн, а для сорту 'Подольанка' не очікується ампліфікації.

Інший ДНК-маркер prE1D2 був розроблений для виявлення делеції в позиції -268...-273 від початку транскрипції в сорті 'Подольанка'. Біоінформатичний аналіз показав, що ця делеція довжиною 6 пн призводить до елімінації елементу CO₂-залежної транскрипційної активності [26]. Для сорту 'Подольанка' розмір очікуваного фрагмента становить 334 пн, а для сорту 'Наталка' – ампліфікація не характерна. Через наявність неспецифічних ампліконів концентрацію іонів Mg²⁺ визначали емпіричним шляхом. Також щоб зменшити синтез неспецифічних фрагментів використовували низхідну ПЛР (touchdown PCR).

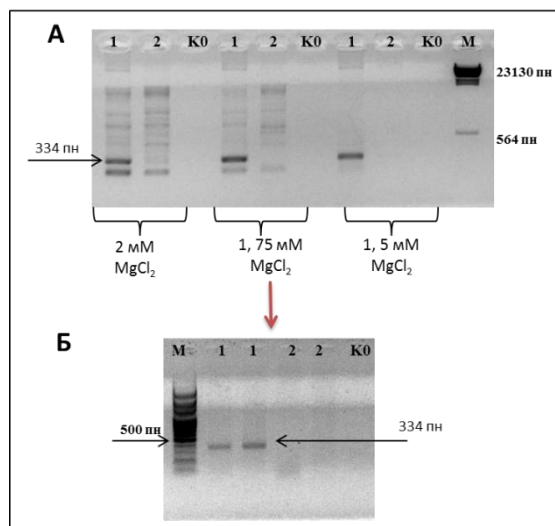


Рис. 2. Електрофореграма прикладу підбору (раціоналізації) умов ПЛР для маркеру EPF1-D2. А – оптимізація концентрації іонів Mg^{2+} Б – підтвердження отриманих результатів. Доріжка 1 – сорт ‘Подольська’ ; доріжка 2 – сорт ‘Наталка’; K0 – контроль без ДНК; М – маркер молекулярної маси Lambda DNA/HindIII (А) / маркер молекулярної маси 100 bp DNA Ladder Solis Biodyne (Б)

Щоб виявляти інсерцію довжиною 297 пн (в положенні -963...-964) в промоторному регіоні гена *EPF2* створений один ДНК-маркер – prE2B1. Описана інсерція сприяє утворенню 21 регуляторного елементу за даними біоінформатичного ресурсу NewPLACE. Серед них є Dof-сайт зв'язування протеїнів, елементи світло- та тканинноспецифічної експресії, елементи, які пов'язані зі стійкістю до хвороб і відповідають за реакцію на дію патогенів. Також утворюється нуклеотидна послідовність TAAAG, яка є специфічним елементом регуляції експресії генів у замикаючих клітинах продихів [22]. Крім того, виявлено елемент ССАТ-бокс, який підвищує активність промотора, елемент консенсусної послідовності промотора СААТ, що необхідний для активації транскрипції й також ТАТА-бокс [23]. В цьому випадку розмір очікуваного ампліфікованого фрагмента становить 267 пн (сорт ‘Наталка’), а для сорту ‘Подольська’ не очікується ампліфікації.

Через підвищений вміст (38–44 %) GC-пар визначити оптимальні відтворювані умови проведення ПЛР на промоторну послідовність гена *MUTE* для ДНК-маркерів prMA1 та prMA2 не вдалося.

4.3. Розробка *in silico* систем ДНК-маркерів для оцінки поліморфізму в нуклеотидних послідовностях генів *EPF1* та *EPF2* у кодуючих ділянках

На відміну від попередніх етапів, кодуючі послідовності відповідають за формування структури поліпептидів і успішності подальшого функціонування продуктів ампліфікації описаних генів біогенезу продихів. Тому, було розроблено сім систем ДНК-маркерів для кодуючих нуклеотидних послідовностей генів *EPF1*, *EPF2* і *MUTE*. Ці відтворювані функціональні маркери було позначено як E1A1, E1B1, E1B2, E1D1, E1D2, E2A1 і MD1. Для кожної системи ДНК-маркерів було підібрано раціональні умови ампліфікації (температурні та часові режими ПЛР) (табл. 3).

Таблиця 3. Характеристика розроблених систем праймерів для виявлення поліморфізму кодуючих послідовностей генів *EPF1*, *EPF2* та *MUTE* методом ПЛР

Ген	Назви праймерів	Нуклеотидна послідовність, від 5' до 3' кінця	Довжина ампліфікованого фрагменту, пн	Детектований поліморфізм
<i>EPF1-A1</i>	E1A1 F	AGCCG CATGA TCTCT ACGTG	173	+274 T→G (сорт 'Подільська', 'Chinese Spring')
	E1A1 R	CCGAC ACATC CTCTCT TCTCC		
<i>EPF1-B1</i>	E1B1 F	CGTTC ACCCC CTCTCT TCTCC	254	+273 C→T (сорт 'Одеська 267', 'Поліська 90')
	E1B1 R	CAGGA ACCCC TTCTCT CTCCA		
	E1B2 F	ATGAT GCTGA TGCGA AACCG	88	+273 T→C (сорт 'Одеська 267', 'Поліська 90') / +276...+281 інсерція 6 пн
	E1B2 R	AGGAA CCCCT TCTCC TCCGT		
<i>EPF1-D1</i>	E1D1 F	GCTCT TTTGA CCACT ACTTAG	281	-9...-6 інсерція 4 пн (сорт 'Наталка', 'Астарта')
	E1D1 R	GCAAC CGAGC ATCCA ACTAT		
	E1D2 F	GGAGA AGGAG GATGG GTCGG	183	+250...+262 інсерції 12 пн (сорт 'Наталка', 'Астарта')
	E1D2 R	TAGCA CTTGC CCTTG CACAT		
<i>EPF2-A1</i>	E2A1 F	GCCGT GCAAG CGGGT CATGA	140	+451 G→A (сорт 'Поліська 90')
	E2A1 R	GGGGT ACGTT GCGGA GCACG		
<i>MUTE-D1</i>	MD1 F	GCAGT AAAGT GGACA CGCA	182	+273 T→C (сорт 'Одеська 267')
	MD1 R	TGTGG CAAGA CAATT AAGAG AACAG		

ДНК-маркер E1A1 визначає одонуклеотидний поліморфізм T→G в позиції +274 гена *EPF1-A*, який характерний для сортів 'Chinese Spring' та 'Подільська'. Ця одонуклеотидна заміна виявлена в другому екзоні гена *EPF1-A1* сортів 'Подільська', що призводить до зміни в складі амінокислотної послідовності (місценс-мутація). Сорт 'Подільська' використовували як позитивний контроль реакції з ампліфікованим фрагментом розміром 173 пн.

Система ДНК-маркера E1B1 розроблена для детекції одонуклеотидну заміну C→T в положенні +273 гена *EPF1-B1*. Для сорту 'Одеська 267' розмір очікуваного фрагмента ампліфікації був 254 пн, а для сорту 'Дарунок Поділля' – відсутність будь-яких ампліфікованих фрагментів.

Інший ДНК-маркер E1B2, який також розроблений для гена *EPF1-B1*. Цей маркер дозволяє детектувати одонуклеотидну заміну T→C в положенні +273, або інсерцію довжиною 6 пн в положенні +276. Для сорту 'Chinese Spring' прогнозувалось проходження ампліфікації та отримання фрагмента 88 пн, а для сорту 'Одеська 267' – відсутність ампліфікації.

Дві системи розроблено для ідентифікації варіабельності послідовностей гена *EPF1-D1* – E1D1 та E1D2. За допомогою ДНК-маркера E1D1 можна визначити делецію довжиною 4 пн в промоторі гена *EPF1-D1* (в положенні -9 від старту транскрипції), яка була виявлена в нуклеотидних послідовностях сортів 'Астарта' та 'Наталка'. Для сорту 'Дарунок Поділля' очікуваний розмір ампліфікованого фрагмента 281 пн. На відміну від сорту 'Наталка', який виконував роль негативного контролю реакції.

ДНК-маркер E1D2 розроблений для детекції інсерції гена *EPF1-D1* в положенні +250 від початку транскрипції. Позитивним контролем для реакції був сорт 'Наталка', а зразок сорту 'Дарунок Поділля' був негативним контролем. Розмір очікуваного фрагмента становив 183 пн. Для цього ДНК-маркера визначено, що оптимальна концентрація $MgCl_2$ для успішного проходження ПЛР становить 1,5 мМ.

Для генів *EPF2* та *MUTE* створено по одному відтворюваному ДНК-маркеру (E2A1, MD1). Система E2A1 розроблена для визначення одонуклеотидної заміни G→A гена *EPF2-A1* в положенні +451, яка є

характерною для генетичної послідовності сорту 'Поліська 90'. Для сорту 'Поліська 90' передбачуваний розмір ампліфікованого фрагмента становить 140 пн. Для негативного контролю використовували сорт 'Дарунок Поділля'.

ДНК-маркер MD1 детектує SNP A→T *MUTE-D1* в позиції +652 від старту транскрипції. Розмір очікуваного продукту ампліфікації для сорту 'Одеська 267' становить 182 пн, а для сорту 'Chinese Spring' не очікувалося ампліфікації.

Розроблені для кодуєчих ділянок 7 ДНК-маркерів (E1A1, E1B1, E1B2, E1D1, E1D2, E2A1 та MD1) є інформативними для характеристики та молекулярно-генетичного скринінгу вибірок зразків пшениці та дозволяють визначати нуклеотидні послідовності, які мають прив'язку до функціональності продихів рослин.

4.4. Скринінг колекції сортів і визначення частот поліморфних алелей

4.4.1. Для промоторів

Описані вище системи ДНК-маркерів на виявлення поліморфізмів нуклеотидних послідовностей в промоторах генів біогенезу продихів *EPF1* та *EPF2* пройшли успішну апробацію і були використані для скринінгу колекції сортів пшениці CIMMYT (табл. 4). В цілому колекція CIMMYT та база даних GRIS налічує 171 тисячу сортів та ліній пшениці з інформацією про географічне походження, відомі алелі, стійкість до збудників хвороб, чутливість до різних абіотичних факторів тощо. Наша вибірка включає 74 зразки пшениці м'якої з різних континентів, які відрізняються за типом розвитку та морфологічними ознаками. Результати поширеності частот досліджених поліморфізмів занотовано у таблиці 4 візуалізовано у вигляді діаграм (рис. 3а).

Таблиця 4. Виявлений поліморфізм промоторних послідовностей генів *EPF1*, *EPF2* серед зразків міжнародної колекції пшениці CIMMYT.

№ п/п	Назва сорту/гібриду	prE1A	prE1B	prE1D1	prE2B
1	INIA-F-66	380	353	-	-
2	AC VISTA	380	353	-	-
3	ANZA	380	353	-	-
4	D-12	380	353	-	-
5	GRANDE-DEL-MONTE	380	353	-	-
6	KLEIN FAVORITO	-	353	-	-
7	ZAMBESI	380	353	-	-
8	SAKHA 69	380	353	-	-
9	MILLALEAU INIA	-		280	-
10	SAFED LERMA	380	353	280	-
11	TSELINNAYA-YUBILEINAYA	380	353	280	-
12	ZERDAKIA	-	353	-	-
13	KIMMO	380	353	-	-
14	CARIBO	380	353	-	-
15	CENAD-512	380	353	-	-
16	EXCALIBUR	380	353	-	-
17	JANZ	380	353	-	-
18	KULIN	-	353	-	-
19	GLENLEA	-	353	-	-
20	COMANCHE	-	353	-	-
21	TOBARITO M 97	-	353	280	-
22	V-17	-	353	-	-
23	MANITAL	-		-	-
24	SVENNO	380	353	-	-
25	ALBIS	380	353	-	-
26	TALIMKA	-	353	-	-
27	ISKAMISH-K-2-LIGHT	-	480	-	-
28	KE FENG 2	380	353	-	-

29	RECITAL	380	480	-	-
30	ROKYCANSKA SAMETKA	380	353	-	-
31	ZIRKA	-	480	-	-
32	BOLESLAVSKA BELKA	-	353	-	-
33	GODOLLOI 15	380	353	280	-
34	PI 610750/SASIA	380	353	-	-
35	RICHMOND	380	353	-	-
36	CHIBIA/4/PGO//CROC_1/ AE.SQUARROSA (224)/3/2*BORL95	380	353	-	-
37	BRUNETA	380	353	280	-
38	W-67	380	353	-	-
39	NING CHUN20/3/MYNA/VUL//JUN/6/ FILIN/IRENA/5/CNDO/R143//ENTE/MEXI_2/3/ AEGILOPS SQUARROSA (TAUS)/4/WEAVER	380	353	-	-
40	VALDOR	380	353	-	-
41	ZEMUNKA	380	353	-	-
42	GRAY JD1447	380	353	-	-
43	CHEN/AE.SQ//2*OPATA/3/FINSI	380	353	-	-
44	PRINCE-LEOPOLD	380	353	-	-
45	PI 610750/SASIA	380	353	-	-
46	HGO94.9.2.29	380	353	280	-
47	Cltr 4901	380	353	-	-
48	RUFUS	-	353	-	-
49	JENKIN	380	353	-	-
50	KING-HING-1	380	353	-	-
51	CAROL	380	353	-	-
52	RED SCHLANSTETTER RIMPAU	380	353	-	-
53	NORM.2-A BC178/3/ CHEN/AE.SQ//2*OPATA	380	353	-	-
54	BLANC-PRECOCE	380	353	280	-
55	GRAY JD1032	380	353	-	-
56	BJY/COC//PRL/BOW/3/MILAN/KAUZ/ 4/BAV92	380	353	-	-
57	ADMIRAL	380	353	-	-
58	RUMSKA-CERVENKA	380	353	-	-
59	MURAS	380	353	-	-
60	NL90.15.2.11	380	353	280	-
61	HXL7573/2*BAU	380	353	-	-
62	B-262	380	353	-	-
63	FALCIN/AE.SQUARROSA (312)/3/ THB/CEP7780//SHA4/LIRA/4/	380	353	-	-
64	HOLDFAST	380	353	-	-
65	ARENDANY	380	353	-	-
66	OTOFTE-56	380	353	-	-
67	VAL	380	353	-	-
68	RUPERT J CAR 882 (26882)	380	353	280	-
69	CHAPEI KILASHIKA	380	353	-	-
70	MUNIA/3/RUFF/FGO//YAV79/4/PASTOR	380	353	-	-
71	WW425	380	353	-	-
72	ROI-ALBERT	380	353	-	-
73	LAMMAS	380	353	-	-
74	VIERNY	380	353	-	-

У результаті проведеного скринінгу міжнародної колекції зразків пшениці CIMMYT виявлено, що дві SNP (A→G -

1223 пн від старту транскрипції; в позиції - 1221 A→C) у промоторній ділянці гена *EPF1* з субгеному A є досить поширеним

поліморфізмом. Висока частота спостерігається серед зразків CIMMYT досягаючи 0,81. Серед зразків, які не мають цих замін, є сорти та селекційні лінії з північно- й південноамериканського походження, декілька зразків з Європи, у тому числі український сорт 'Zirka', а також два зразки із Західної та Центральної Азії. Частота поширеності інсерції в промоторі гена *EPF1* з субгеному В, на яку спрямована система маркеру EPF1-B1 (prE1B) серед зразків колекції CIMMYT є досить низькою – 0,03. Серед проаналізованих 74 зразків лише 3 мали цю інсерцію, а саме одна селекційна лінія з Афганістану, сорт французького походження 'Recital' й

український сорт 'Zirka'. За допомогою ДНК-маркеру prE1D1 визначено поширення 11-пн інсерції в субгеномі D гена *EPF1*. Частота зустрічання для пшениць колекції CIMMYT становить 0,14. Серед 10 зразків, для яких характерна ця інсерція, три зразки мають європейське походження, два сорти з Азії, а також один сорт з Чилі й один сорт з Мексики. Для дослідження частоти поширеності інсерції в промоторі гена *EPF2* субгеному В використовували розроблений маркер prE2B. Виявлено, що ця інсерція зовсім не зустрічається серед міжнародної колекції CIMMYT, але є типовою для українських сортів.

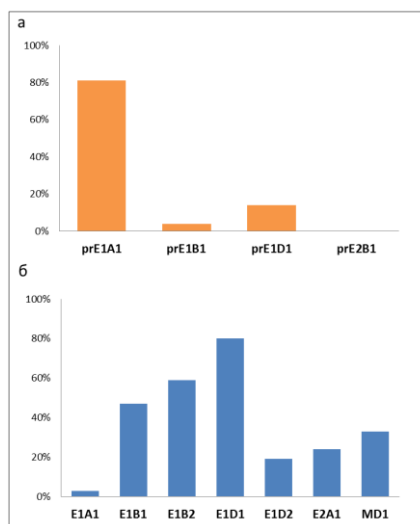


Рис 3. Розподіл частоти поширеності детектованого поліморфізму серед досліджуваних зразків міжнародної колекції пшениць CIMMYT. а – детектований поліморфізм для промоторів генів; б – детектований поліморфізм для кодуєчих ділянок генів.

4.4.2. Для кодуєчої послідовності

Описані вище ДНК-маркери для детекції поліморфізму генів *EPF1*, *EPF2* та *MUTE* були успішно апробовані для скринінгу вибірки зразків з міжнародної колекції CIMMYT. Отримані результати ПЛР-аналізу зафіксовано у вигляді визначених розмірів ампліконів (рис. 5). Для оцінки інформативності маркерних систем розраховували показник частот зустрічання кожного ампліфікованого фрагмента та резюмовано / візуалізовано у вигляді діаграм (рис. 3б).

За допомогою розробленому ДНК-маркеру E1A1 виявлено, що детектована однонуклеотидна заміни в гені *EPF1-A1* має низьку поширеність для колекції CIMMYT –

0,03. Заміну T→G має сорт 'Rufus' (Бельгія) та старовинний місцевий сорт з кінця 19 століття, який був поширений на території Чехословаччини ('ROKYCANSKA SAMETKA'). Однонуклеотидну заміну в гені *EPF1-B1*, визначену системою маркера E1B1, має приблизно половина зразків колекції CIMMYT (частота становить 0,47). Частота поширення поліморфізму, детектованого ДНК-маркером E1B2 становить 0,59. Також спостерігалася висока частота зустрічання делеції в гені *EPF1*, який детектується системою E1D1. Серед досліджуваних зразків колекції міжнародних сортів частота поширення становила 0,8. Для 15 зразків не є характерним детектований поліморфізм, це

зразки з Євразії, Північної та Південної Америки, а також один зразок з Єгипту. Частота зустрічання детектованої інсерції, визначена за допомогою ДНК-маркера E1D2 становила 0,19. Частота зустрічання для системи E1D2 відрізнялись від частоти системи E1D1 не дивлячись на розміщення в одному і тому ж гені. Це факт свідчить про те, що у вибірці є генотипи з відмінною комбінацією поліморфізму, що потенційно складає новий алель і поводить себе як незалежні події. Поширеність SNP,

характерне для українського сорту 'Поліська 90', гена *EPF2-B1* становила – 0,24. Частота розповсюдження детектованого SNP гена *MUTE-D1* серед досліджуваних зразків становило 0,33.

З молекулярно-генетичного скринінгу зрозуміло, що SNP T→G в положенні +274 гена *EPF1-A1* є найбільш рідкісним поліморфізмом у кодуючій ділянці гена серед міжнародних сортів пшениці. Найбільш часто детектується 4-пн делецію в положенні -9 гена *EPF1-D1*.

Таблиця 5. Виявлений поліморфізм генів *EPF1*, *EPF2*, *MUTE* CIMMYT серед зразків міжнародної колекції пшениці.

№	Назва сорту/гібриду	E1A1	E1B1	E1B2	E1D1	E1D2	E2A1	MD1
1	AC VISTA	-	254	-	281	-	-	-
2	ADMIRAL	-	254	-	281	-	-	182
3	ALBIS	-	-	94	281	-	-	-
4	ANZA	-	254	-	281	-	140	-
5	ARENDANY	-	254	94	-	-	-	-
6	B-262	-	-	94	281	-	-	-
7	BJY/COC//PRL/BOW/3/MILAN/KAUZ /4/BAV92	-	-	94	281	-	-	-
8	BLANC-PRECOCE	-	-	94	-	183	-	-
9	BOLESLAVSKA BELKA	-	254	-	281	-	140	182
10	BRUNETA	-	254	-	-	183	-	182
11	CARIBO	-	-	94	281	-	140	-
12	CAROL	-	-	94	281	-	-	-
13	CENAD-512	-	254	94	281	-	140	182
14	CHAPEI KILASHIKA	-	-	94	281	-	-	-
15	CHEN/AE.SQ//2*OPATA/3/FINSI	-	-	94	281	183	-	-
16	CHIBIA/4/PGO//CROC_1/ AE.SQUARROSA (224)/3/2*BORL95	-	254	94	281	-	140	182
17	CITR 4901	-	-	94	281	-	-	182
18	COMANCHE	-	-	94	281	-	-	182
19	D-12	-	254	-	281	-	-	182
20	EXCALIBUR	-	-	94	281	-	140	-
21	FALCIN/AE.SQUARROSA (312)/3/THB/ CEP7780//SHA4/LIRA/4/FRET2	-	254	-	281	-	-	-
22	GLENLEA	-	-	94	-	183	-	-
23	GODOLLOI 15	-	-	94	-	183	140	-
24	GRANDE-DEL-MONTE	-	-	94	281	-	140	-
25	GRAY JD1032	-	-	94	281	-	-	-
26	GRAY JD1447	-	254	94	281	-	-	-
27	HGO94.9.2.29	-	254	-	-	183	-	-
28	HOLDFAST	-	254	-	281	-	140	182
29	HXL7573/2*BAU	-	254	-	281	-	-	-
30	INIA-F-66	-	254	-	281	-	-	-
31	ISKAMISH-K-2-LIGHT	-	-	94	281	-	-	182

32	JANZ	-	254	-	281	-	-	-
33	JENKIN	-	254	-	281	-	-	-
34	KE FENG 2	-	-	94	-	183	-	182
35	KIMMO	-	254	-	281	-	140	-
36	KING-HING-1	-	254	-	281	-	-	182
37	KLEIN FAVORITO	-	254	-	281	-	-	182
38	KULIN	-	-	94	281	-	-	-
39	LAMMAS	-	254	-	281	-	-	-
40	MANITAL	-	-	-	-	183	-	-
41	MILLALEAU INIA	-	-	94	-	183	-	182
42	MUNIA/3/RUFF/FGO// YAV79/4/PASTOR	-	254	-	281	-	-	-
43	MURAS	-	-	94	281	-	140	182
44	NING CHUN 20/3/MYNA/VUL//JUN/6/FILIN/IREN A/5/CNDO/R143//ENTE/MEXI_2/3/AE GILOPS SQUARROSA (TAUS)/4/WEAVER	-	-	94	281	-	-	-
45	NL90.15.2.11	-	254	-	-	183	-	-
46	NORM.2-A BC178/3/CHEN/AE.SQ//2*OPATA	-	-	94	281	-	140	-
47	OTOFTE-56	-	-	94	281	-	140	-
48	PI 610750/SASIA	-	254	-	281	-	-	182
49	PRINCE-LEOPOLD	-	-	94	281	-	-	182
50	RECITAL	-	-	94	281	-	-	-
51	RED SCHLANSTETTER RIMPAU	-	254	-	281	-	-	182
52	RICHMOND	-	-	94	281	-	140	-
53	ROI-ALBERT	-	254	94	281	-	140	182
54	ROKYCANSKA SAMETKA	173	-	94	281	-	-	-
55	RUFUS	173	-	94	281	-	-	-
56	RUMSKA-CERVENKA	-	-	94	281	-	140	182
57	RUPERT J CAR 882 (26882)	-	254	-	-	183	-	182
58	SAFED LERMA	-	-	94	-	183	-	-
59	SAKHA 69	-	254	-	281	-	-	-
60	SPARTA	-	-	94	281	-	140	182
61	SVENNO	-	-	94	281	-	-	-
62	TALIMKA	-	254	-	281	-	-	-
63	TOBARITO M 97	-	254	-	-	183	-	-
64	TSELINNAYA-YUBILEINAYA	-	-	94	-	183	-	-
65	V-17	-	-	94	281	-	-	-
66	VAL	-	-	94	281	-	140	182
67	VALDOR	-	-	94	281	-	-	182
68	VIERNY	-	254	-	281	-	-	-
69	W-67	-	-	94	281	-	-	-
70	WW425	-	254	-	281	-	-	-
71	ZAMBESI	-	254	-	281	-	-	-
72	ZEMUNKA	-	254	-	281	-	-	-
73	ZERDAKIA	-	-	94	-	-	-	-
74	ZIRKA	-	-	94	281	-	-	-

Отримані нами дані порівнювали з відомими поліморфними локусами у цих генах за даними порталу Esembl https://plants.ensembl.org/Triticum_aestivum/Info/Index. Для гена *EPF1-A1* в базі даних 274 гена (нуклеотидна послідовність сорту 'Подолянка') не описано. Нуклеотидна послідовність гена *EPF1-B1* має більше відомих алельних локусів. Всього нараховується 5 SNP, з яких дві заміни є синонімічним в другому екзоні гена, дві місценс заміни в першому та другому екзоні й 1 заміна в інtronі. Для нуклеотидної послідовності гена *EPF1* субгеному D спостерігався високий рівень внутрішньосортного поліморфізму серед досліджуваних українських сортів пшениці. Також багато відомих поліморфних локусів для цього знайдено в базі даних EnsemblPlants. Ці дані можуть вказувати, що нуклеотидна послідовність гена *EPF1* субгеному D є більш варіабельною в порівнянні з нуклеотидними послідовностями *EPF1-A1* та *EPF2-B1*. Для гена *EPF1* в базі даних не знайдені наразі ДНК-маркери, які можна використовувати для генотипування.

Ідентифікована одонуклеотидна заміна G→A в другому екзоні гена *EPF2-A1* в українському сорті 'Поліська 90' також описана в базі даних EnsemblPlants. Завдяки розробленому нами ДНК-маркеру, який детектує цей поліморфізм можна порівняти частоту поширення SNP з іншими відомими колекціями пшениці. Серед проаналізованих нами зразків міжнародної колекції CIMMYT частота алеля А становить 0,24, що є вищим ніж для колекції Watkins (0,16) [21] та Cornell (0,08) [22]. Серед представлених колекцій є невелика частота гетерозиготного генотипу A|G, для колекції Watkins їх частота становить 0,006 (6 зразків з 1069) [21], для Cornell 0,007 (6 зразків з 868) [22]. Для цієї нуклеотидної послідовності відомий ще один поліморфний алель в другому екзоні C→G за даними бази даних EnsemblPlants. Також описані 21 SNP, які є EMS індуковані отримані в проєкті TILLING, який включав цілеспрямоване сиквенування EMS

описані лише 2 відомих SNP, один з них в другому екзоні гена (місценс варіант), а один варіант. Виявленого в українських сортах заміну Т на G в положенні +

“мутантів” тетраплоїдної пшениці 'Kronos' та гексаплоїдної пшениці 'Candeza' [23]. Для нуклеотидних послідовностей генів *EPF2-B1* та *EPF2-D1* представлені поліморфні локуси лише EMS “мутантів”. Для гена *MUTE* знайдені відомі поліморфні локуси серед баз даних, але найбільше поліморфізмі описано для субгеному D. Серед них 10 поліморфізмів, які описані на відомому онлайн порталі функціональних SNP – CerealsDB. Велика кількість даних про наявність поліморфних алелей вказує на важливість досліджень генів біогенезу продихів та транскрипційних факторів пшениці [30].

Для генів *EPF2*, *MUTE* в базі даних опубліковані ДНК маркери для виявлення лише EMS індукованих варіантів. Розроблені нами ДНК-маркери доповнюють наявні колекції молекулярних маркерів для визначення поліморфізму генів біогенезу продихів *EPF1*, *EPF2* та *MUTE* в комерційних сортах і селекційних лініях пшениці.

V. ВИСНОВКИ

1. Гомологічні гени *EPF1*, *EPF2* та *MUTE* пшениці м'якої знаходяться у другій хромосомі та мають подібну структуру – 2 екзони й 1 інtron.

2. Розроблено 5 відтворювальних ДНК-маркерів на виявлення поліморфізму в промоторах генів *EPF1* та *EPF2* й 7 відтворювальних ДНК-маркерів для детекції поліморфних алелей у кодуючій частині гена.

3. Інсерція в промоторній частині гена *EPF1* з субгеному В рідко зустрічається серед досліджуваної колекції CIMMYT. Найчастіше зустрічалися дві SNP (в позиції -1223 A→G; в позиції -1221 A→C) в промоторній ділянці гена *EPF1* з субгеному А серед досліджуваних зразків. Інсерція в промоторі гена *EPF2* субгеному В (в положенні -963...-964), яка характерна для

українських сортів, зовсім не виявлена серед міжнародної колекції.

4. Серед виявлених поліморфізмів у кодуючих послідовностях генів біогенезу продохів найчастіше зустрічається у досліджуваній вибірці колекції СІММУТ 4-пн делеція (в позиції -9) гена *EPF1-D1*. Навпаки рідко зустрічається серед міжнародної вибірки сортів пшениці одонуклеотидний поліморфізм Т на Г в положенні +274 гена *EPF1-A1*.

5. Створені системи ДНК-маркерів доцільно використовувати як у фундаментальних дослідженнях генетичного різноманіття сортів пшениці, так і в питаннях захисту прав інтелектуальної власності та молекулярної паспортизації.

Фінансування. Роботу виконано згідно відомчої теми НАН України 2025–2027 рр. «Молекулярно-генетичний супровід селекційного поліпшення рослин» (номер Держреєстрації 0125U002197) Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

Подяки. Автори публікації висловлюють глибоку вдячність д-р. Антону Степаненку та проф. Миколі Борисюку за науковий супровід й обговорення результатів.

Конфлікт інтересів. Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів.

ORCID ID та внесок авторів.

[0000-0003-3051-3774](https://orcid.org/0000-0003-3051-3774) (A,B,C) Rymar

Yuliia

[0000-0002-6460-1724](https://orcid.org/0000-0002-6460-1724) (A,D,E) Lakhneko

Olha

А – концепція роботи та дизайн; В – аналіз інформації; С – написання статті; D – критичний огляд; Е – остаточне схвалення статті.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Effect of climate change on spring wheat yields in North America and Eurasia in 1981–2015 and implications for breeding / A. Morgounov та ін. PLOS ONE. 2018. Т. 13, № 10. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204932>.
2. Nezhadahmadi A., Prodhan Z. H., Faruq G. Drought Tolerance in Wheat. The Scientific World Journal. 2013. Т. 2013. С. 1–12. URL: <https://doi.org/10.1155/2013/610721>.

3. Identification of molecular markers and candidate regions associated with grain number per spike in Pubing3228 using SLAF-BSA / J. Wang та ін. Frontiers in Plant Science. 2024. Т. 15. URL: <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1361621>.
4. The development and validation of new DNA markers linked to the thousand-grain weight QTL in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) / C. C. Yang та ін. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding. 2020. Т. 56, No. 2. С. 52–61. URL: <https://doi.org/10.17221/35/2019-cjgpb>.
5. Sivolap Y. M. Molecular markers and plant breeding. Cytology and Genetics. 2013. Т. 47, № 3. С. 188–195. URL: <https://doi.org/10.3103/s0095452713030080>.
6. Genomics-assisted breeding: The next-generation wheat breeding era / C. Sun та ін. Plant Breeding. 2023. URL: <https://doi.org/10.1111/pbr.13094>.
7. Hetherington A. M., Woodward F. I. The role of stomata in sensing and driving environmental change. Nature. 2003. Т. 424, № 6951. С. 901–908. URL: <https://doi.org/10.1038/nature01843>.
8. Nunes T. D. G., Zhang D., Raissig M. T. Form, development and function of grass stomata. The Plant Journal. 2019. Т. 101, № 4. С. 780–799. URL: <https://doi.org/10.1111/tpj.14552>.
9. Richardson L. G. L., Torii K. U. Take a deep breath: peptide signalling in stomatal patterning and differentiation. Journal of Experimental Botany. 2013. Vol. 64, no. 17. P. 5243–5251. URL: <https://doi.org/10.1093/jxb/ert246>.
10. Guo X., Wang L., Dong J. Establishing asymmetry: stomatal division and differentiation in plants. New Phytologist. 2021. Т. 232, № 1. С. 60–67. URL: <https://doi.org/10.1111/nph.17613>.
11. An ancestral stomatal patterning module revealed in the non-vascular land plant *Physcomitrella patens* / R. S. Caine та ін. Development. 2016. Т. 143, № 18. С. 3306–3314. URL: <https://doi.org/10.1242/dev.135038>.
12. MUTE Directly Orchestrates Cell-State Switch and the Single Symmetric Division to Create Stomata / S.-K. Han та ін. Developmental Cell. 2018. Т. 45, № 3. С. 303–315.e5. URL: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.04.010>.
13. Serna L. The Role of Grass MUTE Orthologs in GMC Progression and GC Morphogenesis. Frontiers in Plant Science. 2021. Т. 12. URL: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.678417>.
14. The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule / K. Hara та ін. Genes & Development. 2007. Т. 21, № 14. С. 1720–1725. URL: <https://doi.org/10.1101/gad.1550707>.
15. Epidermal cell density is autoregulated via a secretory peptide, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2 in arabidopsis leaves / K. Hara та ін. Plant and Cell Physiology. 2009. Т. 50, № 6. С. 1019–1031. URL: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp068>.
16. Reducing Stomatal Density in Barley Improves Drought Tolerance without Impacting on Yield / J. Hughes та ін. Plant Physiology. 2017. Т. 174, № 2. С. 776–787. URL: <https://doi.org/10.1104/pp.16.01844>.
17. Overexpression of the TaSHN1 transcription factor in bread wheat leads to leaf surface modifications, improved drought tolerance, and no yield penalty under controlled growth conditions / H. Bi та ін. Plant, Cell & Environment. 2018. Т. 41, № 11. С. 2549–2566. URL: <https://doi.org/10.1111/pce.13339>.
18. Sequence comparison of mute promoters between two wheat cultivars revealed both conservative and diverged regions / O. Lakhneko та ін. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2024. URL: <https://doi.org/10.55251/jmbfs.9662>.

19. Murray M. G., Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*. 1980. T. 8, № 19, C. 4321–4326. URL: <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>
20. Stewart, C. N., Jr, & Via, L. E. (1993). A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *BioTechniques*, 14(5), 748–750.
21. Акініна Г. Е., Дударь Ю. Н., Попов В. Н. Статистический анализ генетических данных с использованием компьютерных программ ARLEQUIN, PHILYP, CLANN, STRUCTURE : Метод. рек. Харків : Нац. аграрна акад. наук України Ін-т рослинництва ім. В.Я. Юр., 2014. 100 с.
22. Plesch G., Ehrhardt T., Mueller-Roeber B. Involvement of TAAAG elements suggests a role for Dof transcription factors in guard cell-specific gene expression. *The Plant Journal*. 2002. T. 28, № 4, C. 455–464. URL: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.2001.01166.x>
23. Tjaden G., Edwards J. W., Coruzzi G. M. Cis elements and trans-acting factors affecting regulation of a nonphotosynthetic light-regulated gene for chloroplast glutamine synthetase. *Plant Physiology*. 1995. T. 108, № 3, C. 1109–1117. URL: <https://doi.org/10.1104/pp.108.3.1109>
24. Identification of a plastid response element that acts as an enhancer within the *Chlamydomonas* HSP70A promoter / E. D. von Gromoff та ін. *Nucleic Acids Research*. 2006. T. 34, № 17, C. 4767–4779. URL: <https://doi.org/10.1093/nar/gkl602>
25. The WRKY superfamily of plant transcription factors / T. Eulgem та ін. *Trends in Plant Science*. 2000. T. 5, № 5, C. 199–206. URL: [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(00\)01600-9](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(00)01600-9)
26. The novel Myb transcription factor LCR1 regulates the CO₂-responsive gene *Cah1*, encoding a periplasmic carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii* / S. Yoshioka та ін. *The Plant Cell*. 2004. T. 16, № 6, C. 1466–1477. URL: <https://doi.org/10.1105/tpc.021162>
27. Harnessing landrace diversity empowers wheat breeding / S. Cheng та ін. *Nature*. 2024. T. 632, C. 823–831. URL: <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07682-9>
28. High-density genotyping of the A.E. Watkins Collection of hexaploid landraces identifies a large molecular diversity compared to elite bread wheat / M. O. Winfield та ін. *Plant Biotechnology Journal*. 2017. T. 16, № 1, C. 165–175. URL: <https://doi.org/10.1111/pbi.12757>
29. Integrating genomic resources to present full gene and putative promoter capture probe sets for bread wheat / L.-J. Gardiner та ін. *GigaScience*. 2019. T. 8, № 4. URL: <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz018>
30. Survey of drought-associated TAWRKY2-D1 gene diversity in bread wheat and wheat relatives / O. Lakhneko та ін. *Molecular Biotechnology*. 2021. T. 63, № 10, C. 953–962. URL: <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00350-7>
31. SLAF-BSA”, *Frontiers Plant Sci.*, vol. 15, 2024. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1361621>
4. C. C. Yang et al., “The development and validation of new DNA markers linked to the thousand-grain weight QTL in bread wheat (*Triticum aestivum* L.)”, *Czech J. Genetics Plant Breeding*, vol. 56, no. 2, p. 52–61, 2020. <https://doi.org/10.17221/35/2019-cjgpb>
5. Y. M. Sivopal, “Molecular markers and plant breeding”, *Cytol. Genetics*, vol. 47, no. 3, p. 188–195, 2013. <https://doi.org/10.3103/s0095452713030080>
6. C. Sun et al., “Genomics-assisted breeding: The next-generation wheat breeding era”, *Plant Breed.*, 2023. <https://doi.org/10.1111/pbr.13094>
7. A. M. Hetherington та F. I. Woodward, “The role of stomata in sensing and driving environmental change”, *Nature*, vol. 424, no. 6951, p. 901–908, 2003. <https://doi.org/10.1038/nature01843>
8. T. D. G. Nunes, D. Zhang та M. T. Raissig, “Form, development and function of grass stomata”, *Plant J.*, vol. 101, no. 4, p. 780–799, 2019. <https://doi.org/10.1111/tpj.14552>
9. X. Guo, L. Wang та J. Dong, “Establishing asymmetry: stomatal division and differentiation in plants”, *New Phytol.*, vol. 232, no. 1, p. 60–67, 2021. <https://doi.org/10.1111/nph.17613>
10. L. G. L. Richardson та K. U. Torii, “Take a deep breath: peptide signalling in stomatal patterning and differentiation”, *J. Exp. Botany*, vol. 64, no. 17, p. 5243–5251, 2013 <https://doi.org/10.1093/jxb/ert246>
11. R. S. Caine et al., “An ancestral stomatal patterning module revealed in the non-vascular land plant *Physcomitrella patens*”, *Development*, vol. 143, no. 18, p. 3306–3314, 2016. <https://doi.org/10.1242/dev.135038>
12. S.-K. Han et al., “MUTE Directly Orchestrates Cell-State Switch and the Single Symmetric Division to Create Stomata”, *Develop. Cell*, vol. 45, no. 3, p. 303–315.e5, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.04.010>
13. L. Serna, “The Role of Grass MUTE Orthologs in GMC Progression and GC Morphogenesis”, *Frontiers Plant Sci.*, vol. 12, 2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.678417>
14. K. Hara, R. Kajita, K. U. Torii, D. C. Bergmann та T. Kakimoto, “The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule”, *Genes & Develop.*, vol. 21, no. 14, p. 1720–1725, 2007. <https://doi.org/10.1101/gad.1550707>
15. K. Hara et al., “Epidermal Cell Density is Autoregulated via a Secretory Peptide, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2 in Arabidopsis Leaves”, *Plant Cell Physiol.*, vol. 50, no. 6, p. 1019–1031, 2009. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp068>
16. J. Hughes et al., “Reducing Stomatal Density in Barley Improves Drought Tolerance without Impacting on Yield”, *Plant Physiol.*, vol. 174, no. 2, p. 776–787, 2017. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01844>
17. H. Bi et al., “Overexpression of the TaSHN1 transcription factor in bread wheat leads to leaf surface modifications, improved drought tolerance, and no yield penalty under controlled growth conditions”, *Plant, Cell & Environ.*, vol. 41, no. 11, p. 2549–2566, 2018. <https://doi.org/10.1111/pce.13339>
18. O. Lakhneko, A. Stepanenko, Y. Rymar, M. Borysyuk та B. Morgun, “Sequence comparison of mute promoters between two wheat cultivars revealed both conservative and diverged regions”, *J. microbiol., biotechnol. food sci.*, 2024. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.9662>
19. M. G. Murray та W. F. Thompson, “Rapid isolation of high molecular weight plant DNA”, *Nucleic Acids Res.*,

REFERENCES

1. A. Morgounov et al., “Effect of climate change on spring wheat yields in North America and Eurasia in 1981–2015 and implications for breeding”, *PLOS ONE*, vol. 13, no. 10, 2018, p. e0204932. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204932>
2. A. Nezhadadhamadi, Z. H. Prodhan та G. Faruq, “Drought Tolerance in Wheat”, *Scientific World J.*, vol. 2013, c. 1–12, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/610721>
3. J. Wang, E. Wang, S. Cheng та A. Ma, “Identification of molecular markers and candidate regions associated with grain number per spike in Pubing3228 using

- vol. 8, no. 19, p. 4321–4326, 1980. <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>
20. Stewart, C. N., Jr, & Via, L. E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *BioTechniques*, 14(5), 748–750, 1993.
21. Akinina G. E., Dugar V. N. Popov V. N. Statistical analysis of genetic data using software ARLEQUIN, PHILYP, CLANN, STRUCTURE. Kharkiv: The Plant Production Institute named by V. Ya. Yuryev, NAAS. 2014, 100 p. (In Russian)
22. G. Plesch, T. Ehrhardt та B. Mueller-Roeber, “Involvement of TAAAG elements suggests a role for Dof transcription factors in guard cell-specific gene expression”, *Plant J.*, vol. 28, no. 4, p. 455–464, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.2001.01166.x>
23. G. Tjaden, J. W. Edwards та G. M. Coruzzi, “cis Elements and trans-Acting Factors Affecting Regulation of a Nonphotosynthetic Light-Regulated Gene for Chloroplast Glutamine Synthetase”, *Plant Physiol.*, vol. 108, no. 3, p. 1109–1117, 1995. <https://doi.org/10.1104/pp.108.3.1109>
24. E. D. von Gromoff, M. Schroda, U. Oster та C. F. Beck, “Identification of a plastid response element that acts as an enhancer within the *Chlamydomonas* HSP70A promoter”, *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, no. 17, p. 4767–4779, 2006. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl602>
25. T. Eulgem, P. J. Rushton, S. Robatzek та I. E. Somssich, “The WRKY superfamily of plant transcription factors”, *Trends Plant Sci.*, vol. 5, no. 5, p. 199–206, 2000. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(00\)01600-9](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(00)01600-9)
26. S. Yoshioka, F. Taniguchi, K. Miura, T. Inoue, T. Yamano та H. Fukuzawa, “The Novel Myb Transcription Factor LCR1 Regulates the CO₂-Responsive Gene *Cah1*, Encoding a Periplasmic Carbonic Anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*”, *Plant Cell*, vol. 16, no. 6, p. 1466–1477, <https://doi.org/10.1105/tpc.021162>
27. S. Cheng et al., “Harnessing landrace diversity empowers wheat breeding”, *Nature*, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07682-9>
28. M. O. Winfield et al., “High-density genotyping of the A.E. Watkins Collection of hexaploid landraces identifies a large molecular diversity compared to elite bread wheat”, *Plant Biotechnol. J.*, vol. 16, no. 1, p. 165–175, 2017. <https://doi.org/10.1111/pbi.12757>
29. L.-J. Gardiner et al., “Integrating genomic resources to present full gene and putative promoter capture probe sets for bread wheat”, *GigaScience*, vol. 8, no. 4, 2019 <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz018>
30. O. Lakhneko, A. Stepanenko, Y. Kuzminskiy, N. Borisjuk та B. Morgun, “Survey of Drought-Associated TAWRKY2-D1 Gene Diversity in Bread Wheat and Wheat Relatives”, *Mol. Biotechnol.*, vol. 63, no. 10, p. 953–962, 2021. <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00350-7>

UDC: 575.113:581.821:633.111

DNA MARKERS FOR DETECTION OF POLYMORPHISM IN *EPF1*, *EPF2* AND *MUTE* GENES OF WHEAT STOMATA BIOGENESIS

Yuliia Rymar

yulia-r@i.ua

Olha Lakhneko

olhashnurenko@gmail.com

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Abstract – DNA markers are an informative molecular method for selecting genotypes and significantly speed up the breeding process. For this reason, the development of molecular markers is an important step in creating breeding lines of varieties with important agronomic traits. One of these traits is drought tolerance, which is directly related to the evaporation of moisture by the plant. In view of this, this study focuses on the genes of stomatal biogenesis, since stomatal transpiration accounts for the largest percentage of total plant moisture consumption. The aim of this work was to develop DNA markers for detecting polymorphisms in the promoter and coding sequences of the stomatal biogenesis genes *EPF1*, *EPF2*, and *MUTE* and to screen the wheat collection for valuable gene alleles. As a result of the work, 12 reproducible DNA markers were developed, namely 5 DNA markers for detecting polymorphism in the promoter region of *EPF1*, *EPF2* genes and 7 DNA markers for detecting polymorphism in the coding regions of *EPF1*, *EPF2* and *MUTE* genes. The developed markers were used to screen a sample of wheat samples from the international collection CIMMYT. Thus, it was determined that two SNPs (at position -1223 A→G; at position -1221 A→C) in the promoter region of the *EPF1* gene from subgenome A were most common among the studied samples. The described insertion in the promoter region of the *EPF1* gene from subgenome B had a low frequency of distribution among the selected CIMMYT samples. A 4-bp deletion (at position -9) of the *EPF1*-D1 gene was also frequently detected among the studied samples, and a single nucleotide polymorphism T to G at position +274 of the *EPF1*-A1 gene had a low frequency of distribution. In addition, the 297-bp insertion in the *EPF2* gene promoter of the B subgenome, which was described for Ukrainian varieties, was not found in the international collection at all. Thus, it is advisable to use the developed DNA marker systems both in fundamental studies of wheat genetic diversity and in the protection of intellectual property rights and molecular certification.

Keywords – DNA markers, polymorphism, stomata biogenesis genes *EPF1*, *EPF2*, *MUTE*, bread wheat