

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ГЕНОВ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ WRKY У ГРУШИ ОБЫКНОВЕННОЙ И РАЗРАБОТКА ПРАЙМЕРОВ IN SILICO

С.А. Вишняков, студент
Волгоградский государственный университет
(Россия, г. Волгоград)

DOI:10.24412/2500-1000-2024-4-4-13-15

Аннотация. В ходе данного исследования были идентифицированы гены транскрипционных факторов WRKY57, WRKY32, WRKY3 в геноме груши обыкновенной. Также были разработаны наборы праймеров для анализа ПЦР в реальном времени. Проведённый биоинформатический анализ обеспечил основу для дальнейшего функционального анализа и молекулярной эволюции генов WRKY у груши. Это особенно актуально для повышения засухоустойчивости груши путем манипулирования генами WRKY и молекулярной селекции.

Ключевые слова: засухоустойчивость, WRKY, транскрипционный фактор, груша обыкновенная, ПЦР in silico.

Транскрипционная регуляция экспрессии генов опосредуется факторами транскрипции, которые являются важнейшими регуляторными механизмами. Семейство WRKY является одним из ключевых семейств транскрипционных факторов у высших растений. Белки WRKY можно классифицировать по количеству доменов WRKY и особенностям их мотива цинковых пальцев. Белки WRKY связываются с ДНК мотивом T(T)TGAC(C/T), известным как W box, через консервативный мотив WRKYGQK на N-конце и мотив цинкового пальца C2H2 или C2HC на C-конце [1].

Экспрессия транскрипционных факторов WRKY индуцируется, когда растения подвергаются различным стрессовым воздействиям или защитным сигналам, таким как салициловая и жасмоновые кислоты. Кроме того, экспрессия WRKY является быстрой и обладает тканеспецифичностью. Белки WRKY играют разнообразные функции в защите растений от различных стрессовых факторов, включая засуху, тепловой стресс, стресс от холода, повышенная засоленность почвы и различные инфекции. Изменение темпов роста и развития растений, метаболизм, трихомный и эмбриональный морфогенез, старение, биосинтез и регуляция гормональных сигналов не обходится без участия семейства белков WRKY [2, 3]. Растущие данные о секвенировании геномов различных видов растений предоставляют отличную плат-

форму для общегеномного анализа генов семейства WRKY.

Груша (*Pyrus communis*.) – одна из важнейших плодовых культур, широко употребляемый в свежем и переработанном виде, например, в виде пюре, джемов, сухофруктов и т.д. Существует большое разнообразие сортов груши, поскольку она коммерчески выращивается в многих странах по всему миру. В России, в соответствии с указом Президента Российской Федерации от 21.01.2020 г. № 20, груша входит в перечень видов сельскохозяйственных культур, выращивание которых направлено на обеспечение продовольственной безопасности РФ.

В полевых условиях груша часто испытывает абиотические стрессы, такие как засуха, засоленность почвы или повышенная температура воздуха, которые являются ключевым фактором, влияющим на рост, развитие и урожайность растения.

Целью данного исследования было идентифицировать хромосомное расположение генов транскрипционных факторов WRKY57, WRKY32, WRKY3 положительно регулирующих ответную реакцию на засуху у растений [4, 5, 6]. А также разработать наборы праймеров для ПЦР в реальном времени для возможности дальнейшей идентификации и оценки экспрессии генов у груши обыкновенной в экспериментальных условиях.

Материалы и методы

Для обнаружения последовательности генов в геноме груши, были поэтапно использованы сервисы HMMER, BLASTP и InterProScan. Первым этапом производился поиск предсказанных белков, содержащих домен WRKY Pfam PF03106. Далее был проведён бласт анализ, при помощи которого в дальнейшем удалось обнаружить хромосомное расположение искомым последовательностей.

В качестве референсного генома груши был взят Genome assembly ASM3717761v1 reference из базы данных NCBI Genome.

Результаты и их обсуждение

С помощью методов биоинформатического анализа было обнаружено хромосомное расположение трёх генов транскрипционных факторов, принимающих участие в ответе растения на стресс от засухи (табл. 1).

Таблица 1. Предсказанные гены WRKY

| Probable Gene | Gene ID | Evalue | Chromosome | Start | End | Len |
|---------------|------------|--------|------------|---------|---------|------|
| WRKY 57 | CM073990.1 | 0.0 | 16 | 3670088 | 3672696 | 2611 |
| WRKY 32 | CM073989.1 | 0.0 | 15 | 9673592 | 9675706 | 2115 |
| WRKY 3 | CM073983.1 | 4e-135 | 9 | 2895883 | 2898643 | 2760 |

Используя предсказанные последовательности были смоделированы 3 набора праймеров и зондов к участкам, которые предположительно являются кодирующими (табл. 2). Такой подход позволит в бу-

дущем оценивать экспрессию транскрипционных факторов WRKY груши для изучения резистентности растения на влияние абиотических факторов.

Таблица 2. Наборы праймеров для WRKY57, WRKY32 и WRKY3

| Набор праймеров для WRKY57 | | | | | | |
|----------------------------|----------------|-----------------------------|--------|-------|-----------------------|--------------------|
| № | | Последовательность | Tm, °C | GC, % | Самокомплиментарность | Длина продукта, нк |
| 1 | Forward | TCGTAGACGCGGACTGATTG | 59.90 | 55.00 | 4.00 | 259 |
| | Reverse | AGTACCACCCACGACAGAGA | 59.89 | 55.00 | 4.00 | |
| | Internal oligo | CGATGGGGTCGAGGCAGGGG | 61.02 | 75.00 | | |
| 2 | Forward | ACTTCATCGGGTTTGGAGGC | 60.32 | 55.00 | 3.00 | 75 |
| | Reverse | CCACGACAGAGACAGCAACA | 60.25 | 55.00 | 3.00 | |
| | Internal oligo | TCCGGGTTGAAGTCCAGCCGA | 60.11 | 59.09 | | |
| 3 | Forward | CAGCCGAAGTCGCTGAGTAT | 59.90 | 55.00 | 6.00 | 70 |
| | Reverse | GCTCCGACAGCGTCTACTTC | 60.52 | 60.00 | 4.00 | |
| | Internal oligo | TGCTGTCTCTGTCGTGGGTGGT | 59.79 | 59.09 | | |
| Набор праймеров для WRKY32 | | | | | | |
| 1 | Forward | CTTCGAGAACCTTGAGGGCT | 59.39 | 55.00 | 4.00 | 238 |
| | Reverse | TGGCAAGTGCAATGAACCAAG | 59.93 | 47.62 | 5.00 | |
| | Internal oligo | CCGCCAGTTGTAACCATCTGAAGCA | 59.50 | 52.00 | | |
| 2 | Forward | TCCGCCAGTTGTAACCATCT | 59.02 | 50.00 | 4.00 | 196 |
| | Reverse | TTGGCAAGTGCAATGAACCA | 58.88 | 45.00 | 5.00 | |
| | Internal oligo | TGGGCTTGGAGCAGATGAAATGGATTG | 59.59 | 48.15 | | |
| 3 | Forward | TTCCGCCAGTTGTAACCATCT | 60.22 | 45.45 | 4.00 | 196 |
| | Reverse | GGCAAGTGCAATGAACCAAGATA | 59.81 | 43.48 | 5.00 | |
| | Internal oligo | TGGGCTTGGAGCAGATGAAATGGATTG | 59.59 | 48.15 | | |
| Набор праймеров для WRKY3 | | | | | | |
| 1 | Forward | GAGATGCCTCTGGGGATTGC | 60.54 | 60.00 | 6.00 | 202 |
| | Reverse | CCTTGGCACAGGTTACTGCT | 60.25 | 55.00 | 5.00 | |
| | Internal oligo | GTGGCTCTGTCTGGGGCTGCT | 61.16 | 70.00 | | |
| 2 | Forward | TGCCATATTTCCGCCAGTT | 60.03 | 50.00 | 4.00 | 95 |
| | Reverse | CAATCCCCAGAGGCATCTCA | 59.16 | 55.00 | 6.00 | |
| | Internal oligo | TGCAGGCCTATCAGTGGATGAAGGT | 59.48 | 52.00 | | |
| 3 | Forward | GGTTGGGGGACTTCATGGTT | 59.89 | 55.00 | 4.00 | 241 |
| | Reverse | CCCAGAGGCATCTCATTCT | 58.86 | 55.00 | 6.00 | |
| | Internal oligo | CCAGCTTCTGCCATATTTCCGCC | 60.17 | 58.33 | | |

Библиографический список

1. Eulgem T., Rushton P. J., Robatzek S., Somssich I. E. The WRKY superfamily of plant transcription factors // Trends in plant science. – 2000. – Т. 5, № 5. – С. 199-206.
2. Chen X., Li, C., Wang H., Guo Z. WRKY transcription factors: evolution, binding, and action // Phytopathology Research. – 2019. – Т. 1, № 1. – С. 1-15.
3. Phukan U. J., Jeena G. S., Shukla R. K. WRKY transcription factors: molecular regulation and stress responses in plants // Frontiers in plant science. – 2016. – Т. 7. – С. 760.
4. Jiang Y., Qiu Y., Hu Y., Yu D. Heterologous expression of AtWRKY57 confers drought tolerance in *Oryza sativa* // Frontiers in Plant Science. – 2016. – Т. 7. – С. 145.
5. Zhang J., Huang D., Zhao X. et al. Drought-responsive WRKY transcription factor genes IgWRKY50 and IgWRKY32 from *Iris germanica* enhance drought resistance in transgenic *Arabidopsis* // Frontiers in Plant Science. – 2022. – Т. 13. – С. 983600.
6. Khoso M. A., Hussain A., Ritonga F. N. et al. WRKY transcription factors (TFs): Molecular switches to regulate drought, temperature, and salinity stresses in plants // Frontiers in plant science. – 2022. – Т. 13. – С. 1039329.

LOCALIZATION OF WRKY TRANSCRIPTION FACTOR GENES IN COMMON PEAR AND PRIMER DESIGN IN SILICO

S.A Vishnyackov, Student
Volgograd State University
(Russia, Volgograd)

***Abstract.** In this study, WRKY57, WRKY32, WRKY3 transcription factor genes were identified in the genome of *Pyrus communis*. Primer sets for real-time PCR analysis were also designed. The analysis provided a basis for further functional analysis and molecular evolution of WRKY genes in pear. This is particularly relevant for improving drought tolerance in pear by manipulating WRKY genes.*

***Keywords:** drought tolerance, WRKY, transcription factor, common pear, in silico PCR.*