

СРАВНЕНИЕ РАЗНЫХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА ЭКСПРЕССИИ НА ПРИМЕРЕ ГЕНА «ССНС-ЦИНКОВЫЙ ПАЛЕЦ (ZF-ССНС)», РЕГУЛИРУЮЩЕГО ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТЬ У РАСТЕНИЙ НУТА (*CICER ARIETINUM* L.)

Хасанова Г.Ж.^{1,2*}, Кузбакова М.М.¹, Джатаев С.А.¹, Габдола А.Ж.¹, Ошергина И.П.², Тен Е.А.²

¹ Казахский агротехнический исследовательский университет им. С.Сейфуллина, 010000, г. Астана, Казахстан¹

² Научно-производственный центр зернового хозяйства имени А.И. Бараева, 020000, п. Научный, Казахстан²

*khasanova-gulmira@mail.ru

АННОТАЦИЯ

В данном исследовании были проанализированы 6 генов цинкового пальца с доменом ССНС (ZF-ССНС) у растений нута в условиях засухи на четырех сортообразцах нута из казахстанской и зарубежной коллекции. В результате выделили и проверили три гена с высоким уровнем экспрессии: А3-1084, В-6505 и Е-0714, а также ген А2-6319 с низким уровнем экспрессии в ответ на засуху у растений нута. При сравнении двух методов оценки экспрессии выделенных генов – полуколичественного и количественного ПЦР в реальном времени – обнаружили большое сходство между значениями средних показателей экспрессии с коэффициентом корреляции $r = 0,91$. Эти данные свидетельствуют о полном соответствии результатов, полученных двумя разными методами. Однако, только метод количественного ПЦР в реальном времени позволяет оценить уровень экспрессии генов в каждом генотипе, в то время как полуколичественный метод основан на средних значениях для всех изученных генотипов. Таким образом, на примере нута при анализе четырех генов ZF-ССНС, контролирующих реакцию растений на засуху, показано высокое сходство результатов по средним показателям экспрессии генов у всех изученных генотипов. В тоже время, показаны преимущества метода количественного ПЦР в реальном времени для анализа экспрессии генов у каждого генотипа на примере изученных образцов нута. Два из изученных гена – А3-1084 и Е-0714 – являются наиболее перспективными для создания новых сортов нута, устойчивых к засухе, т.к. они показали достоверное повышение экспрессии у растений сортов Камила 1255 и Луч, которые характеризуются высокой засухоустойчивостью.

Ключевые слова: засуха; засухоустойчивость; количественная ПЦР в реальном времени; нут; полуколичественный метод анализа экспрессии; экспрессия гена

ВВЕДЕНИЕ

В связи с экологическими проблемами, такими как парниковые газы и загрязнение почвы, абиотические стрессы становятся все более распространенными [1]. Стрессы, такие как засуха, жара и засоление почв, могут ограничить рост и урожайность сельскохозяйственных культур. Эти явления имеют глубокие последствия для сельского хозяйства и являются проблемами глобальной продовольственной безопасности. Однако растения развили множество регуляторных способностей, включающих семейства транскрипционных факторов, для реагирования на сигналы стресса [2,3]. Белки из различных семейств способны регулировать физиологические процессы растений воздействием на экспрессию генов и биосинтез полипептидов, меняя, тем самым, передачу сигналов для улучшения адаптивности растений [4-7].

Большое и разнообразное семейство белков цинкового пальца (ZF) играет решающую роль в различных аспектах роста и развития растений. Белки ZF обладают различными структурными доменами, состоящими примерно из 30 аминокислот [8,9]. Являясь важным мотивом, ZF участвует в физиологических процессах связывания белков с ДНК и РНК [10]. Геном растения кодирует большое количество белков ZF и, в дополнение к их роли в прорастании семян и развитии органов, многие исследования показали, что ZF тесно связаны с физиологическими и метаболическими процессами растений при различных реакциях на абиотические стрессы [11-13]. Эти белковые факторы активируются при стрессе и, тем самым, меняют устойчивость растений через сложные взаимо-

действия молекулярных механизмов [11]. Например, ZF-ССНС у *Arabidopsis thaliana* повышает выживаемость за счет увеличения уровня экспрессии осморегулирующих веществ при взаимодействии с другими родственными генами [14]. Белки С2Н2-типа ZF-245 и ZF-179 у риса *Oryza sativa* увеличивали содержание свободного пролина и растворимых сахаров, повышали экспрессию генов, реагирующих на стресс, и улучшали устойчивость растений к засолению и засухе [15]. Таким образом, ZF играют важную роль в развитии растений и устойчивости к абиотическим стрессам. Поэтому необходимы углубленные исследования для лучшего понимания их функций и механизмов. В связи с большим вниманием к роли ZF в физиологической регуляции устойчивости растений многие семейства генов, в том числе ZF-ССНС, были идентифицированы и исследованы у различных видов [16-20].

Нут (*Cicer arietinum* L.) - очень важное бобовое культурное растение [21] и, благодаря своей высокой питательной ценности, полезный для здоровья продукт питания [22]. Несмотря на растущий спрос и высокий потенциал, урожайность нута нестабильна, а продуктивность остается на низком уровне из-за абиотических стрессов, в первую очередь засуха и засоление, а также болезней (аскохитоз и фузариозное увядание). Поэтому, в последнее время большое внимание уделяется изучению засухоустойчивости нута, у которого на образцах из различных генетических коллекций выделили и описали гены, контролирующие реакции растений на недостаток влаги [23-25]. Секвенирование и изучение генома нута позволяет проводить современные исследования на ге-

номном уровне [26], что может значительно ускорить разработку методов молекулярной селекции для обнаружения генов стрессоустойчивости. Однако, гены цинкового пальца с доменом ССНС (*ZF-CCHC*) у нута практически не изучены. Известно только одно исследование по изучению роли генов *ZF-CCHC* на устойчивость растений нута к аскохитозу [27]. Поэтому, изучение генов *ZF-CCHC* на засухоустойчивость у нута представляется весьма важной и актуальной задачей.

Представленная работа имела следующие цели: (1) выделить и описать гены из семейства *ZF-CCHC* у растений нута с высокой и низкой экспрессией в ответ на засуху; (2) сравнить два метода – полуколичественный и ПЦР в реальном времени – для адекватного анализа экспрессии генов; и (3) выделить гены *ZF-CCHC* с дифференцированной экспрессией у различных образцов нута в условиях засухи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали шесть генов нута *ZF-CCHC* на основе их строения и их сиквенсы представлены в Базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Гены и их

сиквенсы обозначены следующим образом: (1) *A2-6319* = XM_012716319; (2) *A3-1084* = XM_004491084; (3) *B-6505* = XM_004496505; (4) *D1-9307* = XM_004509307; (5) *D2-9712* = XM_004499712; и (6) *E-0714* = XM_004500714.

В опыте использовали 4 генотипа нута из генетической коллекции нута в КАТИУ им. С.Сейфуллина, предварительно отобранные по реакции на засуху и обезвоживание: два сорта, Камила 1255 и Луч, казахстанской селекции [28] и два образца из Международной коллекции ICRISAT (Индия) – ICC-1083 и ICC-10945.

Растения нута выращивали в вазонах объемом 5 л с почвой в течение 1 месяца с ежедневным поливом. В опыте с засухой, растения не поливали в течение 15 дней, а контрольные растения продолжали поливать в прежнем режиме. В опыте и в контроле использовали по 5 растений каждого генотипа. Общий вид растений, подверженных засухе, представлен на рисунке 1. Через 15 дней после начала опыта, с каждого растения в контроле и при обработке засухой собирали по одному листу, помещали в пластиковую 10-мл пробирку, немедленно замораживали в жидком азоте и затем хранили при температуре -80°C до выделения РНК.

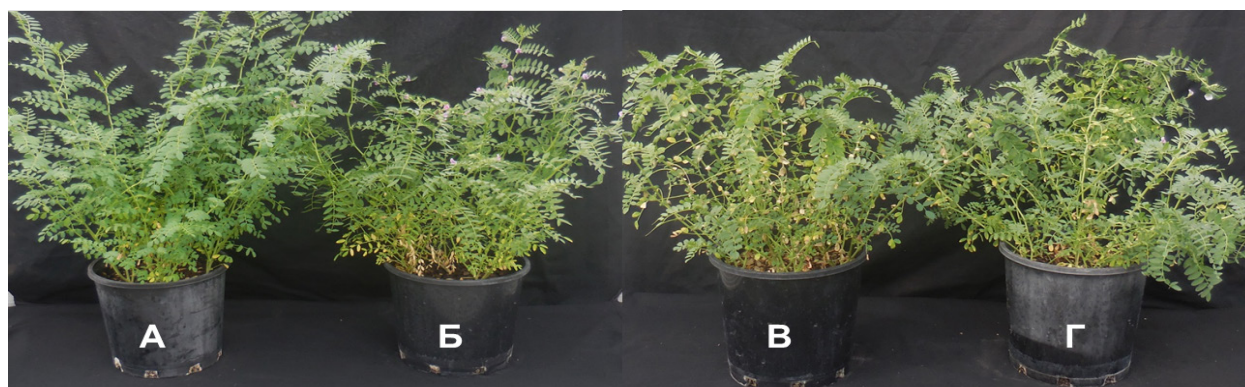


Рисунок 1 – Общий вид растений нута в опыте с засухой. А – Камила 1255; Б – Луч; В – ICC-1083; и Г – ICC-10945.

Таблица 1 – Сиквенс праймеров, использованных в работе, и размер их ампликона

№	Название	F/R	Сиквенс (5'-3')	Ампликон (п.н.)
1	<i>A2-6319</i>	F	AGGTCTCCAGGGACACCATCTG	111
		R	TTGTTGACCCTGCCACCCCTGA	
2	<i>A3-1084</i>	F	GAGGATCAGCCAGGTCTTTTCA	74
		R	CTCAAAACCATCACTACTCGCG	
3	<i>B-6505</i>	F	CTGCTAAAGGGCCTGTTCACAA	101
		R	CGTGAAGTCATCCTCCATATCG	
4	<i>D1-9307</i>	F	GATCGGACACATAGCGAGAGAT	79
		R	GACTTCGCCGCACTTATAACAG	
5	<i>D2-9712</i>	F	TGCATGCTACAAGTGTGGTGAG	140
		R	CTCTCGAAAATGTCCAGACTC	
6	<i>E-0714</i>	F	CGGTTATCGAGATGTTGTGTGC	74
		R	ACTAGGGTAGCGATCCACAAAC	
7	<i>EF1a</i> (Референтный)	F	TCCACCACTTGGTCGTTTTG	64
		R	CTTAATGACACCGACAGCAACAG	

Выделение РНК из образцов листьев проводили методом с использованием Тризола [29] с предварительным размалыванием замороженных образцов листьев с двумя 8-мм шариками из нержавеющей стали и встряхивателя 'Vortex' (Китай). Выделенные образцы РНК проверяли на электрофорезе с 1% агарозным гелем и концентрацию РНК измеряли на микроспектрофотометре 'NanoDrop' (США). Для дальнейших опытов отбирали по 2 мкг РНК каждого образца и инкубировали с 1 мкл ДНКазы (NEBiolab, США) в течение 15 мин при комнатной температуре для удаления примеси геномной ДНК. Синтез кДНКовой библиотеки проводили с использованием набора реагентов 'NEBiolab ProtoScript' (США), согласно инструкции производителя.

Для проведения полуколичественной ПЦР готовили 'Bulk-смесь' образцов кДНК – отбирали и объединяли по 1 мкл из всех синтезированных образцов кДНК. Реакционная смесь для проведения полуколичественной ПЦР объемом 15 мкл содержала 1 мкл 'Bulk-смеси' кДНК и следующие компоненты в их конечной концентрации: 1×ПЦР буфер, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM каждого монофосфата, 0,25 mM прямого и обратного праймера (Таблица 1) и 0,5 единицы активности Taq-ДНК полимеразы (GoTaq, Promega, США). ПЦР проводили на приборе Thermal iCycler (Bio-Rad, США), используя программу со следующими этапами: Начальная денатурация 95°C – 3 мин; 35 циклов, включая денатурацию, 95°C – 15 с; отжиг, 55°C – 15 с; и удлинение, 72°C – 20 с; с заключительным удлинением, 72°C – 3 мин. После проведения ПЦР продукты амплификации разделяли в 1.5% агарозном геле с добавлением красителя 'GelRed' (Biotium, США) для визуализации в УФ свете на приборе 'GelDoc' (BioRad, США) и со сканированием интенсивности бендов на геле при их сравнении с маркером.

По результатам полуколичественной ПЦР отобрали 4 гена для проведения количественного анализа экспрессии, который проводили на основе ПЦР в реальном времени с использованием красителя SYBR-Green (КАРА, США). Количественную ПЦР проводили в планшетах на 96 образцов на приборе Real-Time qPCR CFX96 (BioRad, США). Каждая реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 3 мкл образца кДНК, предварительно разбавленного стерильной водой (1:5), по 0,25 mM прямого и обратного праймера и 5 мкл 2×КАРА qPCR Master Mix (КАРА,

США). Условия реакции: Начальная денатурация, 95°C – 3 мин; 40 циклов, включая денатурацию, 95°C – 3 с и отжиг, 56°C – 30 с; с последующим анализом кривой плавления синтезированных ПЦР продуктов с этапа отжига при 56°C с постепенным увеличением на 0,5°C до денатурации при 95°C – 10 с. Для нормализации полученных данных экспрессии анализируемых генов использовали дополнительный референтный ген *EF1a*, Elongation factor 1-alpha (AJ004960) [30], информация о праймерах которого представлена в таблице 1. Относительную экспрессию гена анализировали при сравнении образцов после обработки стрессом и контролей, как описано ранее [31]. В каждом опыте использовали среднее и разброс значений, как минимум, трех биологических повторностей и анализ повторяли дважды (две технические повторности).

Статистическую обработку результатов и достоверность их сравнения проводили с использованием *t*-теста Стьюдента. Для вычисления коэффициента корреляции использовали Microsoft-Excel программу.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты полуколичественной ПЦР с шестью отобранными генами ZF-CCNC, полученные на основе суммарной 'Bulk-смеси' кДНКовой библиотеки представлены на рисунке 2.

Амплификация образцов 2, 3 и 6 показала наличие четкого бенда ожидаемого размера и они соответствовали отобранным генам A3-1084, B-6505 и E-0714. У образца 1 (A2-6319) амплификация оказалась чрезвычайно слабой. Из дальнейшей работы исключили образец 4, соответствующий гену D1-9307. Продукт его амплификации был представлен двумя различными бендами, что свидетельствовало о недостаточной специфичности разработанных праймеров для проведения анализа экспрессии данного гена. Дополнительно, продукт амплификации отсутствовал у образца 5 (D2-9712), который также пришлось исключить из дальнейшего анализа.

Таким образом, по итогам полуколичественного метода анализа для дальнейшей работы отобрали три гена с высоким уровнем экспрессии: A3-1084, B-6505 и E-0714, а также ген A2-6319 с низким уровнем экспрессии. При анализе сканирования интенсивности бендов на геле они оказались примерно одинаковыми у генов A3-1084

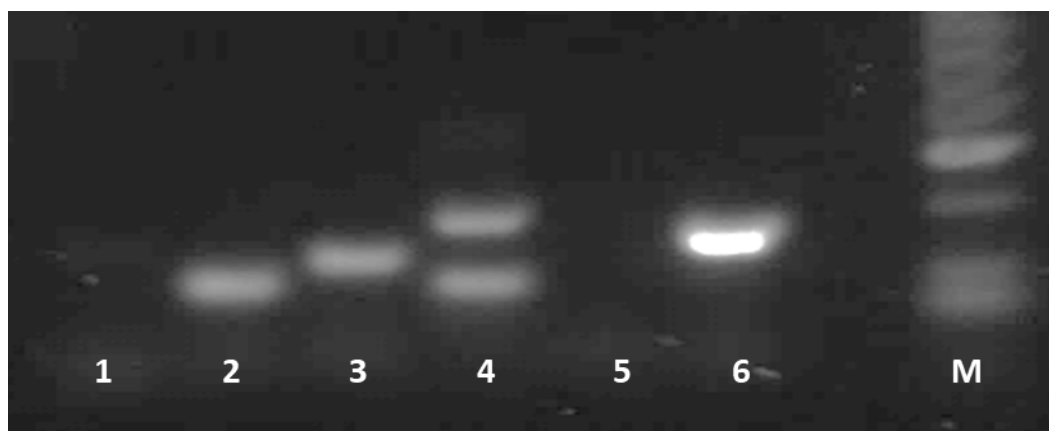


Рисунок 2 – Результаты амплификации при полуколичественном методе определения экспрессии генов у растений нута: 1 - A2-6319; 2 - A3-1084; 3 - B-6505; 4 - D1-9307; 5 - D2-9712; 6 - E-0714; M – маркер молекулярного веса

и B-6505 (1,25 и 1,30 единицы) при сравнении с использованным маркером размера бендов. Интенсивность бенда была существенно выше у образца гена E-0714 (2,20 единицы) и чрезвычайно низкой у бенда амплификации образца A2-6319 (0,25 единицы).

Результаты анализа экспрессии четырех отобранных генов методом количественной ПЦР в реальном времени представлены на рисунке 3. Три гена – A3-1084, B-6505 и E-0714, подтвердили высокий уровень экспрессии. Однако, повышение экспрессии достоверно отличалось не у всех изученных образцов нута. Например, у растений из сортов Камила 1255 и Луч на засухе при сравнении

с контролями экспрессия гена A3-1084 достоверно увеличилась в 3,3 и 2,6 раза, соответственно. В тоже время, повышение экспрессии данного гена у растений коллекционных образцов ICC-1083 и ICC-10945 оказалось статистически недостоверным. Сходную картину наблюдали при анализе увеличения экспрессии гена E-0714, которая оказалась на уровне 4,2, существенно выше у растений обоих сортов Камила 1255 и Луч, но достоверно не отличалась у образцов ICC-1083 и ICC-10945. В тоже время, экспрессия гена B-6505 достоверно отличалась у растений всех изученных образцов нута – Камила 1255, Луч, ICC-1083 и ICC-10945, в условиях засухи по сравнению с

Таблица 2 – Сравнение результатов количественного и полуколичественного метода определения уровня экспрессии генов у растений нута при засухе (15 дней) при сравнении с контролями

Ген	Исследуемые образцы нута	Уровень экспрессии генов по сравнению с контролями в количественной ПЦР	Уровень интенсивности бенда в полуколичественной ПЦР при сравнении с маркером
A2-6319	Камила 1255	0,47	0,25
	Луч	0,29	
	ICC-1083	0,38	
	ICC-10945	0,34	
	Среднее	0,37	
A3-1084	Камила 1255	3,25	1,25
	Луч	2,64	
	ICC-1083	1,08	
	ICC-10945	1,34	
	Среднее	2,08	
B-6505	Камила 1255	2,21	1,30
	Луч	4,05	
	ICC-1083	1,79	
	ICC-10945	2,44	
	Среднее	2,62	
E-0714	Камила 1255	4,23	2,20
	Луч	4,25	
	ICC-1083	1,56	
	ICC-10945	1,14	
	Среднее	2,80	

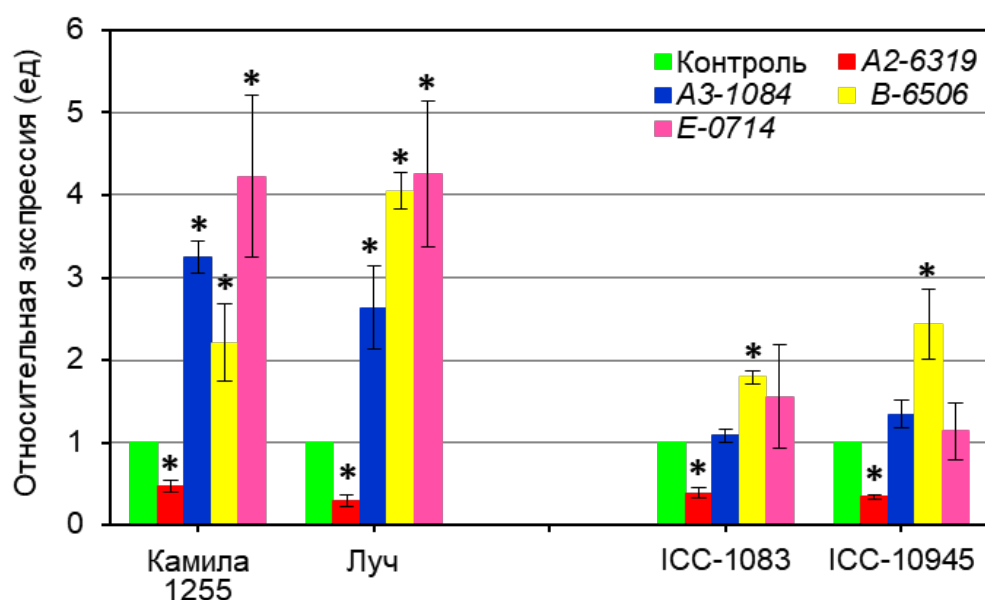


Рисунок 3 – Результаты анализа экспрессии четырех генов *ZF-CCHC* в ответ на засуху (15 дней) при сравнении с контролями методом количественной ПЦР в реальном времени. Для нормализации данных экспрессии каждого образца использовали относительную экспрессию с референтным геном *EF1a*. Данные экспрессии представлены в виде средних (столбцы) и разброса значений, обозначенных стандартной ошибкой. Уровень экспрессии в контролях у каждого генотипа принят за единицу. Достоверные различия экспрессии каждого гена при сравнении с контролями, по результатам анализа *t*-теста Стьюдента, отмечены звездочками ($p < 0,05$). Все вычисления основаны на трех биологических повторностях и анализ экспрессии повторяли дважды (две технические повторности)

контролями и варьировала в пределах от 4,1 до 1,8 единиц экспрессии. Ген *A2-6319*, специально выбранный с низким уровнем экспрессии, подтвердил данные достоверного снижения экспрессии у растений всех четырех изученных образцов нута в условиях засухи по сравнению с контролями (Рисунок 3).

Сравнение результатов количественного и полуколичественного методов оценки экспрессии генов представлено в таблице 2.

При количественном методе вычисления представлены как уровень экспрессии каждого генотипа, так и их средние значения по изученным генам, в то время как только средние значения характеризуют генотипы при использовании полуколичественного метода оценки экспрессии генов. При сравнении средних значений анализа экспрессии четырех генов у растений нута в ответ на засуху коэффициент корреляции оказался очень высоким: $r = 0.91$. Это свидетельствует в пользу того, что оба метода оценки экспрессии генов имеют очень сходные значения. Однако, только метод количественной ПЦР в реальном времени оценивает каждый из изученных генотипов отдельно, в то время как полуколичественный метод основан на анализе средних значений для всех изученных генотипов на примере растений нута.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для создания новых сортов нута необходимы современные молекулярные методы, применение которых переводит селекцию на новый уровень модернизации. Для этого необходим выбор и анализ потенциальных генов, которые активно участвуют в реакции растений на абиотические стрессы, такие как засуха. В представленной работе описана группа генов транскрипционных факторов – *ZF-CCHC*, которые широко распространены как у вирусов, так и у высших организмов, включая растения. В результате проведенной работы выделили и провели изучение шести генов из данной группы, три из которых (*A3-1084*, *B-6505* и *E-0714*) показывали высокий уровень экспрессии, в то время как экспрессия гена *A2-6319* существенно снижалась у растений после воздействия засухи при сравнении с контролями. Эти результаты указывают на различную роль данных генов в реакции растений нута на засуху.

Однако, более важно значение имеет ответ на вопрос, какой из методов анализа экспрессии генов является наиболее приемлемым, а также как полуколичественный метод и количественная ПЦР в реальном времени соотносятся друг с другом. Представленные результаты дают однозначный ответ, что оба метода имеют строгую корреляцию ($r = 0,91$) и практически полностью совпадают по анализу средних значений экспрессии изученных генов. В тоже время оба метода имеют различные разрешающие способности. Генотипы индивидуальных растений можно проанализировать по экспрессии генов только с применением метода количественной ПЦР в реальном времени, а метод полуколичественной ПЦР оперирует только со средними значениями всех растений в каждом опыте. Это принципиальное различие имеет огромное значение для анализа таких генов, как *ZF-CCHC*. Например, экспрессия генов *A3-1084* и *E-0714* была достоверно выше у рас-

тений сортов Камила 1255 и Луч после обработки засухой при сравнении с контролями, в то время как у образцов ICC-1083 и ICC-10945 увеличение уровня экспрессии данных генов было недостоверным. В отличие от этого, экспрессия гена *B-6505* показывала достоверное превышение у растений всех четырех сортообразцов нута, а для гена *A2-6319*, наоборот, экспрессия достоверно снижалась у всех четырех сортообразцов при обработке засухой по отношению к контролям. Эту информацию невозможно получить с помощью полуколичественного метода определения экспрессии генов, что указывает на ограничение его применения.

В заключение можно также сделать вывод, что увеличение экспрессии двух генов (*A3-1084* и *E-0714*) имеет наиболее важное значение для улучшения засухоустойчивости растений нута, т.к. оба сорта Камила 1255 и Луч хорошо адаптированы к засушливым условиям выращивания и отличаются высокой устойчивостью к засухе. В отличие от этого, два сортообразца из международной коллекции (ICC-1083 и ICC-10945) отличались недостоверным повышением экспрессии генов *A3-1084* и *E-0714*, и они являются более чувствительными к засухе. Поэтому, поиск и анализ генотипов нута с высокой экспрессией генов *A3-1084* и *E-0714* в ответ на засуху должен быть достоверно связан с возможностью ее улучшения и использования в селекции при создании новых засухоустойчивых сортов нута в Казахстане.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

(1) Три из шести изученных генов *ZF-CCHC* – *A3-1084*, *B-6505* и *E-0714* характеризовались высокой экспрессией, а один ген (*A2-6319*) – низкой экспрессией у растений нута при воздействии засухой в течении 15 дней.

(2) При сравнении двух методов – полуколичественной экспрессии и количественной ПЦР в реальном времени – оба метода показали высокий уровень сходства ($r = 0,91$) по средним показателям экспрессии у всех образцов. Однако, индивидуальный анализ каждого генотипа возможен только с помощью метода количественной ПЦР в реальном времени, что исключено в полуколичественном методе анализа.

(3) Два из изученных генов – *A3-1084* и *E-0714* – показали достоверное повышение экспрессии у растений сортов Камила 1255 и Луч, которые характеризуются высокой засухоустойчивостью, а у сортообразцов ICC-1083 и ICC-1094, которые являются более чувствительными к засухе, повышение уровня экспрессии данных генов было недостоверным. Таким образом, данные гены можно использовать для улучшения устойчивости к засухе при создании новых сортов нута в Казахстане с применением современных молекулярных методов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данное исследование проведено в рамках грантового финансирования Комитетом науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан. КН МНВО РК ИРН: AP14869777 «Разработка и применение простых методов SNP-генотипирования для создания новых засухоустойчивых и высокоурожайных селекционных линий

нута с высоким содержанием белка».

ЛИТЕРАТУРА

- Ahuja, I.; de Vos, R.C.H.; Bones, A.M.; Hall, R.D. Plant molecular stress responses face climate change //Trends in plant science. – 2010. – Vol.15. – №. 12. – P. 664-674
- Miryeganeh M. Plants' epigenetic mechanisms and abiotic stress //Genes. – 2021. – Vol.12. – №. 8. – P. 1106.
- Rehaman A. et al. Melatonin in plant defense against abiotic stress //Forests. – 2021. – Vol. 12. – №. 10. – P. 1404.
- Muhammad N. et al. The *Solanum melongena* COP1LIKE manipulates fruit ripening and flowering time in tomato (*Solanum lycopersicum*) //Plant Growth Regulation. – 2022. – Vol. 96. – №. 3. – P. 369-382.
- Han G. et al. RING zinc finger proteins in plant abiotic stress tolerance //Frontiers in plant science. – 2022. – Vol. 13. – P. 877011.
- Ayaz A. et al. Molecular Cloning and Functional Analysis of GmLACS2-3 Reveals Its Involvement in Cutin and Suberin Biosynthesis along with Abiotic Stress Tolerance //International journal of molecular sciences. – 2021. – Vol. 22. – №. 17. – P. 9175.
- Rathour M. et al. Investigation of roles of TaTALE genes during development and stress response in bread wheat //Plants. – 2022. – Vol. 11. – №. 5. – P. 587.
- Bollier N. et al. Zinc Finger-Homeodomain and Mini Zinc Finger proteins are key players in plant growth and responses to environmental stresses //Journal of Experimental Botany. – 2022. – Vol. 73. – №. 14. – P. 4662-4673.
- Han G. et al. Advances in the regulation of epidermal cell development by C2H2 zinc finger proteins in plants //Frontiers in Plant Science. – 2021. – Vol. 12. – P. 754512.
- Wang K. et al. The role of C2H2 zinc finger proteins in plant responses to abiotic stresses //Physiologia plantarum. – 2019. – Vol. 165. – №. 4. – P. 690-700.
- Han G. et al. C2H2 zinc finger proteins: master regulators of abiotic stress responses in plants //Frontiers in plant science. – 2020. – Vol. 11. – P. 115.
- Jiao, Z.; Wang, L.; Du, H.; Wang, Y.; Wang, W.; Liu, J.; Huang, J.; Huang, W.; Ge, L. Genome-wide study of C2H2 zinc finger gene family in *Medicago truncatula* //BMC Plant Biology. – 2020. – Vol. 20. – P. 1-17
- Dutta S. K., Nimmakayala P., Reddy U. K. Genome-wide identification, characterisation, and expression of C3HC4-type RING finger gene family in *Capsicum annuum* L //The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. – 2022. – Vol. 97. – №. 5. – P. 603-614.
- Kim, D.H.; Yamaguchi, S.; Lim, S.; Oh, E.; Park, J.; Hanada, A.; Kamiya, Y.; Choi, G. SOMNUS, a CCCH-type zinc finger protein in *Arabidopsis*, negatively regulates light-dependent seed germination downstream of PIL5 //The Plant Cell. – 2008. – Vol. 20. – №. 5. – P. 1260-1277.
- Xu, D.-Q.; Huang, J.; Guo, S.-Q.; Yang, X.; Bao, Y.-M.; Tang, H.-J.; Zhang, H.-S. Overexpression of a TFIIIA-type zinc finger protein gene ZFP252 enhances drought and salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) //FEBS letters. – 2008. – Vol. 582. – №. 7. – P. 1037-1043.
- Aceituno-Valenzuela U., Micol-Ponce R., Ponce M. R. Genome-wide analysis of CCHC-type zinc finger (ZCCHC) proteins in yeast, *Arabidopsis*, and humans //Cellular and Molecular Life Sciences. – 2020. – Vol. 77. – P. 3991-4014.
- Chaikam V., Karlson D. Functional characterization of two cold shock domain proteins from *Oryza sativa* // Plant, Cell and Environment. - 2008. - Vol. 31. - P. 995-100. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2008.01811.x
- Kumar K.R.R., Kirti P.B. Novel role for a serine/arginine-rich splicing factor, AdRSZ21 in plant defense and HR-like cell death // Plant Molecular Biology. - 2012. - Vol. 80. - P. 461-476. DOI: 10.1007/s11103-012-9960-8
- Park S.J., Kwak K.J., Jung H.J., Lee H.J., Kang H. The C-terminal zinc finger domain of *Arabidopsis* cold shock domain proteins is important for RNA chaperone activity during cold adaptation // Phytochemistry. - 2010. - Vol.71. - P.543-547. DOI:10.1016/j.phytochem.2009.12.006
- Xu T., Lee H., Sy N.D., Kang H. Wheat (*Triticum aestivum*) zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein TaRZ1 affects plant growth and defense response in *Arabidopsis thaliana* // Plant Growth Regulation.-2015.- Vol. 76.-P. 243-250. DOI: 10.1007/s10725-014-9994-9
- R.K. Varshney, T.J. Close, N.K. Singh, D.A. Hoisington, D.R. Cook, Orphan legume crops enter the genomics era! //Current opinion in plant biology. – 2009. – Vol. 12. – №. 2. – P. 202-210.
- Jukanti A. K. et al. Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review //British Journal of Nutrition. – 2012. – Vol. 108. – №. S1. – P. S11-S26.
- Arriagada O., Cacciuttolo F., Cabeza R.A., Carrasco B., Schwember A.R. A comprehensive review on chickpea (*Cicer arietinum* L.) breeding for abiotic stress tolerance and climate change resilience // International Journal of Molecular Sciences. - 2022. - Vol. 23. 6794. DOI: 10.3390/ijms23126794
- Asati R., Tripathi M.K., Tiwari S., Yadav R.K., Tripathi N. Molecular breeding and drought tolerance in chickpea // Life. - 2022.- Vol. 12. 1846. DOI: 10.3390/life12111846
- Karalija E., Vergata C., Basso M.F., Negussu M., Zaccari M., Grossi-de-Sa M.F., Martinelli F. Chickpeas' tolerance of drought and heat: Current knowledge and next steps // Agronomy. - 2022. - Vol. 12. 2248. DOI: 10.3390/agronomy12102248
- Varshney RK, Song C, Saxena RK, Azam S, Yu S, Sharpe AG, et al. Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement //Nature biotechnology. – 2013. – Vol. 31. – №. 3. – P. 240-246.
- Iruela M., Pistón F., Cubero J.I., Millán T., Barro F., Gil J. The marker SCK13603 associated with resistance to ascochyta blight in chickpea is located in a region of a putative retrotransposon // Plant Cell Reports. - 2009.- Vol. 28. - P. 53-60. DOI:10.1007/s00299-008-0609-7
- Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию в Республике Казахстан / РГУ «Государственная комиссия по сортоиспытанию сельскохозяйственных культур» МСХ РК. - Нур-Султан, 2021 – С.125
- Shavrukov Y., Bovill J., Afzal I. et al. HVP10 encoding

V-PPase is a prime candidate for the barley HvNax3 sodium exclusion gene: evidence from fine mapping and expression analysis //Planta. – 2013. – Vol. 237. – P. 1111-1122.

30. Garg R., Sahoo A., Tyagi A.K., Jain M. Validation of internal control genes for quantitative gene expression studies in chickpea (*Cicer arietinum* L.) //Biochemical and biophysical research communications. – 2010. – Vol. 396. – №. 2. – P. 283-288.

31. Sweetman C., Khassanova G., Miller T.K., et al. Salt-induced expression of intracellular vesicle trafficking genes, CaRab-GTP, and their association with Na⁺ accumulation in leaves of chickpea (*Cicer arietinum* L.) //BMC Plant Biology. – 2020. – Vol. 20. – P. 1-12.

REFERENCES

1. Ahuja, I.; de Vos, R.C.H.; Bones, A.M.; Hall, R.D. Plant molecular stress responses face climate change //Trends in plant science. – 2010. – Vol.15. – №. 12. – P. 664-674

2. Miryeganeh M. Plants' epigenetic mechanisms and abiotic stress //Genes. – 2021. – Vol.12. – №. 8. – P. 1106.

3. Rehaman A. et al. Melatonin in plant defense against abiotic stress //Forests. – 2021. – Vol. 12. – №. 10. – P. 1404.

4. Muhammad N. et al. The *Solanum melongena* COP1LIKE manipulates fruit ripening and flowering time in tomato (*Solanum lycopersicum*) //Plant Growth Regulation. – 2022. – Vol. 96. – №. 3. – P. 369-382.

5. Han G. et al. RING zinc finger proteins in plant abiotic stress tolerance //Frontiers in plant science. – 2022. – Vol. 13. – P. 877011.

6. Ayaz A. et al. Molecular Cloning and Functional Analysis of GmLACS2-3 Reveals Its Involvement in Cutin and Suberin Biosynthesis along with Abiotic Stress Tolerance //International journal of molecular sciences. – 2021. – Vol. 22. – №. 17. – P. 9175.

7. Rathour M. et al. Investigation of roles of TaTALE genes during development and stress response in bread wheat //Plants. – 2022. – Vol. 11. – №. 5. – P. 587.

8. Bollier N. et al. Zinc Finger-Homeodomain and Mini Zinc Finger proteins are key players in plant growth and responses to environmental stresses //Journal of Experimental Botany. – 2022. – Vol. 73. – №. 14. – P. 4662-4673.

9. Han G. et al. Advances in the regulation of epidermal cell development by C2H2 zinc finger proteins in plants //Frontiers in Plant Science. – 2021. – Vol. 12. – P. 754512.

10. Wang K. et al. The role of C2H2 zinc finger proteins in plant responses to abiotic stresses //Physiologia plantarum. – 2019. – Vol. 165. – №. 4. – P. 690-700.

11. Han G. et al. C2H2 zinc finger proteins: master regulators of abiotic stress responses in plants //Frontiers in plant science. – 2020. – Vol. 11. – P. 115.

12. Jiao, Z.; Wang, L.; Du, H.; Wang, Y.; Wang, W.; Liu, J.; Huang, J.; Huang, W.; Ge, L. Genome-wide study of C2H2 zinc finger gene family in *Medicago truncatula* //BMC Plant Biology. – 2020. – Vol. 20. – P. 1-17

13. Dutta S. K., Nimmakayala P., Reddy U. K. Genome-wide identification, characterisation, and expression of C3HC4-type RING finger gene family in *Capsicum annuum*

L //The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. – 2022. – Vol. 97. – №. 5. – P. 603-614.

14. Kim, D.H.; Yamaguchi, S.; Lim, S.; Oh, E.; Park, J.; Hanada, A.; Kamiya, Y.; Choi, G. SOMNUS, a CCCH-type zinc finger protein in *Arabidopsis*, negatively regulates light-dependent seed germination downstream of PIL5 //The Plant Cell. – 2008. – Vol. 20. – №. 5. – P. 1260-1277.

15. Xu, D.-Q.; Huang, J.; Guo, S.-Q.; Yang, X.; Bao, Y.-M.; Tang, H.-J.; Zhang, H.-S. Overexpression of a TFIIIA-type zinc finger protein gene ZFP252 enhances drought and salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) //FEBS letters. – 2008. – Vol. 582. – №. 7. – P. 1037-1043.

16. Aceituno-Valenzuela U., Micol-Ponce R., Ponce M. R. Genome-wide analysis of CCHC-type zinc finger (ZCCHC) proteins in yeast, *Arabidopsis*, and humans //Cellular and Molecular Life Sciences. – 2020. – Vol. 77. – P. 3991-4014.

17. Chaikam V., Karlson D. Functional characterization of two cold shock domain proteins from *Oryza sativa* // Plant, Cell and Environment. - 2008. - Vol. 31. - P. 995-100. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2008.01811.x

18. Kumar K.R.R., Kirti P.B. Novel role for a serine/arginine-rich splicing factor, AdRSZ21 in plant defense and HR-like cell death // Plant Molecular Biology. - 2012. - Vol. 80. - P. 461-476. DOI: 10.1007/s11103-012-9960-8

19. Park S.J., Kwak K.J., Jung H.J., Lee H.J., Kang H. The C-terminal zinc finger domain of *Arabidopsis* cold shock domain proteins is important for RNA chaperone activity during cold adaptation // Phytochemistry. - 2010. - Vol.71. - P.543-547. DOI:10.1016/j.phytochem.2009.12.006

20. Xu T., Lee H., Sy N.D., Kang H. Wheat (*Triticum aestivum*) zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein TaRZ1 affects plant growth and defense response in *Arabidopsis thaliana* // Plant Growth Regulation.-2015.- Vol. 76.-P. 243-250. DOI: 10.1007/s10725-014-9994-9

21. R.K. Varshney, T.J. Close, N.K. Singh, D.A. Hoisington, D.R. Cook, Orphan legume crops enter the genomics era! //Current opinion in plant biology. – 2009. – Vol. 12. – №. 2. – P. 202-210.

22. Jukanti A. K. et al. Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review //British Journal of Nutrition. – 2012. – Vol. 108. – №. S1. – P. S11-S26.

23. Arriagada O., Cacciuttolo F., Cabeza R.A., Carrasco B., Schwember A.R. A comprehensive review on chickpea (*Cicer arietinum* L.) breeding for abiotic stress tolerance and climate change resilience // International Journal of Molecular Sciences. - 2022. - Vol. 23. 6794. DOI: 10.3390/ijms23126794

24. Asati R., Tripathi M.K., Tiwari S., Yadav R.K., Tripathi N. Molecular breeding and drought tolerance in chickpea // Life. - 2022.- Vol. 12. 1846. DOI: 10.3390/life12111846

25. Karalija E., Vergata C., Basso M.F., Negussu M., Zaccari M., Grossi-de-Sa M.F., Martinelli F. Chickpeas' tolerance of drought and heat: Current knowledge and next steps // Agronomy. - 2022. - Vol. 12. 2248. DOI: 10.3390/agronomy12102248

26. Varshney RK, Song C, Saxena RK, Azam S, Yu S, Sharpe AG, et al. Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement //Nature

biotechnology. – 2013. – Vol. 31. – №. 3. – P. 240-246.

27. Iruela M., Pistón F., Cubero J.I., Millán T., Barro F., Gil J. The marker SCK13603 associated with resistance to ascochyta blight in chickpea is located in a region of a putative retrotransposon // *Plant Cell Reports*. - 2009.- Vol. 28. - P. 53-60. DOI:10.1007/s00299-008-0609-7

28. Gosudarstvennyj reestr selekcionnyh dostizhenij, dopushennyh k ispol'zovaniju v Respublike Kazahstan / RGU «Gosudarstvennaja komissija po sortoispytaniju sel'skohozjajstvennyh kul'tur» MSH RK. - Nur-Sultan, 2021 – S. 125

29. Shavrukov Y., Bovill J., Afzal I. et al. HVP10 encoding V-PPase is a prime candidate for the barley HvNax3 sodium exclusion gene: evidence from fine mapping and expression analysis // *Planta*. – 2013. – Vol. 237. – P. 1111-1122.

30. Garg R., Sahoo A., Tyagi A.K., Jain M. Validation of internal control genes for quantitative gene expression studies in chickpea (*Cicer arietinum* L.) // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2010. – Vol. 396. – №. 2. – P. 283-288.

31. Sweetman C., Khassanova G., Miller T.K., et al. Salt-induced expression of intracellular vesicle trafficking genes, CaRab-GTP, and their association with Na⁺ accumulation in leaves of chickpea (*Cicer arietinum* L.) // *BMC Plant Biology*. – 2020. – Vol. 20. – P. 1-12.

COMPARISON OF DIFFERENT METHODS FOR EXPRESSION ANALYSIS ON THE EXAMPLE OF
“CCHC-ZINC FINGER (ZF-CCHC)” GENE, REGULATING DROUGHT TOLERANCE IN CHICKPEA
PLANTS (*CICER ARIETINUM* L.)

Khassanova G.Z.^{1,2*}, Kuzbakova M.M.¹, Jatayev S.A.¹, Gabdola A.Z.¹, Oshergina I.P.², Ten E.A.²

¹ S.Seifullin Kazakh Agrotechnical Research University, 010000, Astana, Kazakhstan

² A.I.Baraev Research and Production Center for Grain Farming, 021601, Shortandy, Kazakhstan

*khasanova-gulmira@mail.ru

ABSTRACT

In this study, six zinc finger genes with CCHC domain (*ZF-CCHC*) were analyzed in chickpea plants under drought conditions in four accessions from Kazakhstan and International germplasm collections. In the result, three genes with high levels of expression were identified and analyzed: *A3-1084*, *B-6505* and *E-0714*, as well as lower levels of the expression gene *A2-6319* in response to drought in chickpea plants. Semi-quantitative and quantitative real-time PCR - two methods were assessed and compared for the expression analysis of isolated genes. A strong similarity was found between average values of expression, and with $r = 0.91$ correlation coefficient. The results obtained by two different methods showed a full consensus. However, only the quantitative real-time PCR is suitable for the analysis of gene expression levels in each genotype, while the semi-quantitative method is based on average values for all studied genotypes. Thus, based on an example chickpea, a high similarity between results of average gene expression rates in all studied genotypes was found in the analysis of four *ZF-CCHC* genes involved in plant response to drought. At the same time, the advantages of the quantitative real-time PCR method for gene expression analysis in each genotype are shown in the studied chickpea accessions. Two studied genes, *A3-1084* and *E-0714*, were most promising for the analysis to produce new drought tolerant chickpea varieties. These genes had significantly increased expression levels in plants of cultivars Kamila 1255 and Louch with a high tolerance to drought.

Keywords: drought; drought tolerance; quantitative real-time PCR; chickpeas; semi-quantitative method of expression analysis; gene expression.

НОҚАТ (*CICER ARIETINUM* L.) ӨСІМДІГІНДЕГІ ҚҰРҒАҚҚА ТӨЗІМДІЛІГІН РЕТТЕЙТІН «ССНС-
ZINC FINGER (*ZF-CCHC*)» ГЕНІНІҢ МЫСАЛЫНДАҒЫ ЭКСПРЕССИЯЛЫҚ ТАЛДАУДЫҢ ТҮРЛІ
ӘДІСТЕРІН САЛЫСТЫРУ

Хасанова Г.Ж.^{1,2*}, Кузбакова М.М.¹, Джатаев С.А.¹, Ғабдoла Ә.Ж.¹, Ошергина И.П.², Тен Е.А.²

¹ С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университеті, 010000, Астана қ., Қазақстан¹

² А.И. Бараев атындағы астық шаруашылығы ғылыми-өндірістік орталығы., 020000, Научный кенті, Қазақстан²

*khasanova-gulmira@mail.ru

ТҮЙІН

Бұл зерттеуде ССНС домені (*ZF-CCHC*) бар алты мырыш саусақ гендері құрғақшылық жағдайында ноқат өсімдіктерінде қазақстандық және шетелдік коллекциялардан алынған төрт ноқат сортүлгілерінде талданды. Нәтижесінде экспрессия деңгейі жоғары үш ген бөлініп: *A3-1084*, *B-6505* және *E-0714*, сонымен қатар ноқат өсімдіктеріндегі құрғақшылыққа жауап ретінде экспрессия деңгейі төмен *A2-6319* гені сыңалған. Оқшауланған гендердің экспрессиясын бағалаудың екі әдісін салыстыру кезінде - жартылай сандық және нақты уақыттағы сандық ПТР - $r = 0,91$ корреляциялық коэффициенті бар орташа экспрессиялық индекстердің мәндері арасында үлкен ұқсастықты таптық. Бұл деректер екі түрлі әдіспен алынған нәтижелер арасындағы толық сәйкестікті көрсетеді. Дегенмен, тек нақты уақыт режиміндегі сандық ПТР әрбір генотиптегі геннің экспрессия деңгейін бағалауға мүмкіндік береді, ал жартылай сандық әдіс барлық зерттелген генотиптер үшін орташа мәндерге негізделген. Осылайша, мысал ретінде ноқатты пайдалана отырып, өсімдіктің құрғақшылыққа реакциясын бақылайтын төрт *ZF-CCHC* генін талдау барлық зерттелген генотиптердегі гендердің орташа экспрессия жылдамдығы бойынша нәтижелердің жоғары ұқсастығын көрсетті. Бұл ретте әрбір генотипте ген экспрессиясын талдау үшін нақты уақыт режиміндегі сандық ПТР әдісінің артықшылықтары зерттелген ноқат үлгілерінің мысалында көрсетілген. Зерттелген екі ген, *A3-1084* және *E-0714*, жаңа құрғақшылыққа төзімді ноқат сорттарын жасау үшін ең перспективалы болып табылады, өйткені олар құрғақшылыққа төзімділігі жоғары Камила 1255 және Луч сорттарының өсімдіктерінде экспрессияның айтарлықтай өскенін көрсетті.

Негізгі сөздер: құрғақшылық; құрғақшылыққа төзімділік; нақты уақыт режиміндегі сандық ПТР; ноқат; талдаудың жартылай сандық әдісі; ген экспрессиясы.