

## МЕТОДЫ ТРАСКРИПТОМИКИ В ИЗУЧЕНИИ ЗЕРНОВЫХ КОЛОСОВЫХ КУЛЬТУР

Казакова А.С., Галаян А.Г.

Донской государственный аграрный университет, п. Персиановский, Российская Федерация

**Аннотация.** Пшеница – культура, кормящая миллионы, ее урожайность предопределена экономическими, климатическими и генетическими факторами. К сожалению, продуктивность зерна по факту не всегда соответствует желаемому результату. Транскриптомика – универсальный и современный метод решения сложных и актуальных вопросов, стоящих перед учеными уже многие столетия. Анализ экспрессии генов, связанных с состоянием покоя и прорастанием зерна у зародышей пшеницы, представляет огромный агрономический интерес, поскольку этот процесс связан напрямую с ухудшением качества зерна и снижением урожайности перед сбором урожая. Трудность выделения РНК из небольшого количества ткани являлась препятствием для анализа экспрессии генов. Разработанные новые методы анализа транскриптов в зародыше индивидуального семени позволяют планировать создание сортов с.-х. культур с заданными признаками.

**Ключевые слова.** Транскриптомика, экспрессия генов, РНК. Пшеница, продуктивность.

## METHODS OF TRANSCRIPTOMICS FOR CEREALS' STUDY

Kasakova A.S., Galayan A.G.

Don State Agrarian University, Persianovsky, Russian Federation

**Annotation.** Wheat is a crop that feeds millions, and its yield is determined by economic, climatic, and genetic factors. Unfortunately, the productivity of grain in fact does not always correspond to the desired result. Transcriptomics is a universal and modern method of solving complex and topical issues facing scientists for many centuries. Analysis of the expression of genes associated with the state of rest and germination of grain in wheat embryos is of great agronomic interest, since this process is directly related to the deterioration of the quality and decrease in the yield of grain before harvest. The difficulty of isolating RNA from a small amount of tissue is an obstacle to analyzing gene expression. Difficulty isolating RNA from a small amount of tissue. The developed new methods for the analysis of transcripts in an individual family make it possible to plan the creation of cultivars of agricultural crops. crops with specified traits.

**Keywords.** Transcriptomics, gene expression, RNA. Wheat, productivity.

Актуальной проблемой для современного сельского хозяйства было и остается получение высокого и стабильного урожая зерновых культур, а также качественной продукции. Состояние покоя и прорастание семени - важный фактор формирования урожая.

Биотехнология – это уникальный путь решения этого вопроса. Экспрессия многих генов может по-разному регулироваться в ответ на изменение элементов окружающей среды, стадий развития, химической обработки и генотипов. Анализ экспрессии генов очень важен в биологических исследованиях. Транскрипт представляет собой набор экспрессированной РНК в изучаемом организме или группе клеток или тканей в заданных условиях. Транскриптомика является не только парадигмой, но и комплексом методов и путей для тотального анализа экспрессии генов. Цель транскриптомики - детерминация, анализ и наблюдение механизмов координации экспрессии генов (Derera N. F., 1993).

Существует много доступных протоколов для извлечения РНК из различных растительных материалов, но для этого требуется большое количество исходного материала. Трудность выделения РНК из небольшого количества ткани долго служила препятствием для анализа экспрессии генов, например, в твердых зародышах покоящихся семян пшеницы, которые имеют массу 3-5 мг. Для такого небольшого материала метод выделения РНК с высоким выходом имеет важное значение.

Эффективный лизис клеток и минимальная потеря образца имеют решающее значение для такого метода. Невозможно хорошо гомогенизировать зародыши твердой пшеницы в экстракционном буфере. Чтобы решить эту проблему, была разработана «оболочка» из жидкого азота, обеспечено тщательное измельчение эмбриона в мелкий порошок, и проходила процедура осаждения этанолом для сбора РНК (White R J., 2001).

Ученые упростили процедуру доступных методов (Maniatis et al., 1989), минимизировали потерю РНК и получили очищенную без ДНК общую РНК от одного зародыша пшеницы (рисунок 1).

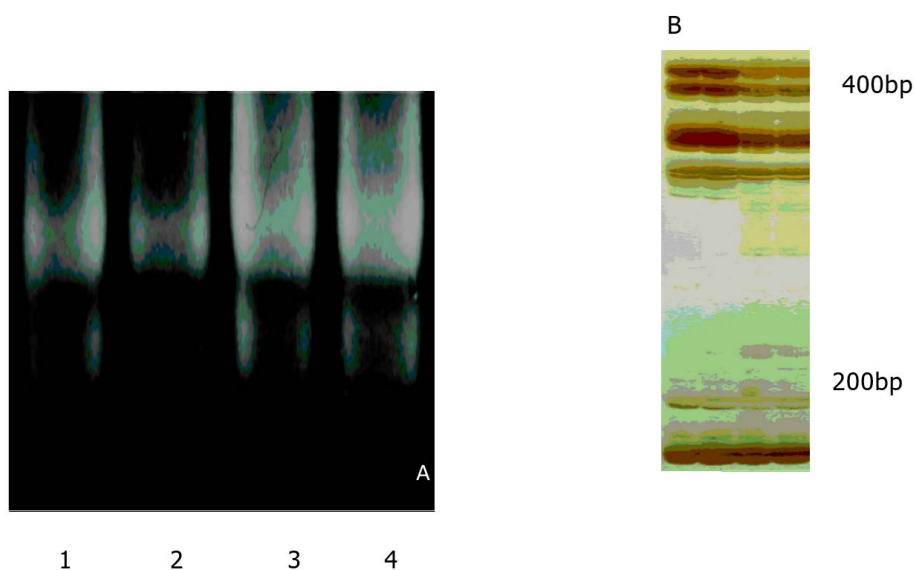


Рисунок 1 — Обнаружение тотальной РНК и продукты ПЦР. А. Общая РНК, выделенная из индивидуального зародыша пшеницы. В. Показаны продукты ПЦР от общей РНК, выделенной из зародыша (Maniatis et al., 1989)

РНК стала пригодна для дифференциальной демонстрации ПЦР с обратной транскрипцией, которая стала полезным методом анализа экспрессии генов.

В результате проведенных исследований (Maniatis et al., 1989) стало ясно, что репродуктивное развитие злаков на ранних этапах (генерирование зерна) имеет решающее значение для формирования числа зерен в колосе и, следовательно, для урожайности. Однако до настоящего времени систематический анализ профилей экспрессии генов в ходе этого важного процесса не проводился для обыкновенной пшеницы (*Triticum aestivum*). Изучение профилей транскриптома на четырех стадиях раннего репродуктивного развития пшеницы, от инициации до дифференцировки органов растения, а также кластеризация и идентификация транскрипта на специфической стадии позволило выявить динамически экспрессируемые гомеологи важных регуляторов транскрипции в меристемах, которые могут быть вовлечены в инициацию колоска, спецификацию меристемы цветкового растения и паттерны цветочных органов, как это следует из их гомологов в растениях. Секвенирование малых РНК-транскриптомов обнаружило ключевые микроРНК, которые были дифференциально экспрессированы во время развития соцветия пшеницы вместе с их генами-маркерами, что позволяет предположить, что микроРНК, обеспечивающие регуляторные механизмы для развития цветов, могут быть сохранены у злаков и *Arabidopsis*. Ген, который первоначально экспрессировался вначале формирования растения, затем идентифицировал себя в соответствии со специфическим для его стадии паттерном экспрессии. Генные регуляторные сети в развитии соцветия пшеницы имеют решающее значение для развития зерен и дают потенциал для генетических манипуляций для улучшения будущих урожаев пшеницы.

Количество зерна в колосе является одним из ключевых компонентов урожайности зерновых. Это многофакторный признак, в первую очередь определяемый на ранних стадиях репродуктивного развития, следовательно, правильное развитие генных манипуляций имеет решающее значение для максимизации потенциала урожайности. Развитие колоса начинается с перехода меристемы из вегетативного в репродуктивное состояние и начала формирования зерна и заканчивается, когда зерно созревает. Во время этого процесса инициации меристемы и дифференциация клеток являются двумя ключевыми моментами, которые определяют окончательный комплекс формирования семени (Feng N., 2017).

Для мониторинга возможного отклонения, вызванного изменением состояния семян, необходимо анализировать отдельные зародыши семян, помимо анализа объединенных зародышей в сухом и проросшем виде (Feng N., 2017).

*Исследования по данной тематике.* Окончание проекта ENCODE (The Encyclopedia of DNA Elements) стало основой для дальнейшего изучения транскрипции генов, так как ученые пришли к выводу, что большинство генов транскрибируются не одним способом. Ген теперь понимается как часть генома, его можно рассматривать как единицу транскрипции, которая транскрибирует в различные варианты транскрипции, среди прочего, благодаря альтернативному сплайсингу. В этом контексте

задачи транскриптомики включают в себя: идентификацию всех единиц транскрипции, включая мРНК, некодирующие РНК и малые РНК; секвенирование транскрипционной структуры генов - сайтов инициации транскрипции, 5' и 3' концов генов; анализ тенденций сплайсинга и других посттранскрипционных модификаций. Смысл исследований, теперь является, то, что гены, экспрессируемые или смещенные в одно и то же время, связанные функционально можно комбинировать или корректировать (Levy S. E., 2019). Можно условно разделить геномные транскриптомные технологии по методам анализа: - микрочипы, с уже известными последовательностями данных; - алгоритм, который позволяет проводить анализ транскриптома (сиквенный подход) (рисунок 2). RNA-Seq сегодня играет огромную роль среди последовательных подходов. Сегодня благодаря появлению и совершенствованию методов транскриптомика получила множество данных о тенденциях контроля экспрессии генов. Была получена обширная информация о влиянии различных факторов на активность генома, и сегодня такие данные доступны в базах данных. Стало возможно получение все больше и больше информации о тканеспецифичных уровнях экспрессии всех генов во всех тканях не только людей и других животных, но и растений, как диких форм, так и сельскохозяйственных культур (рисунок 2).

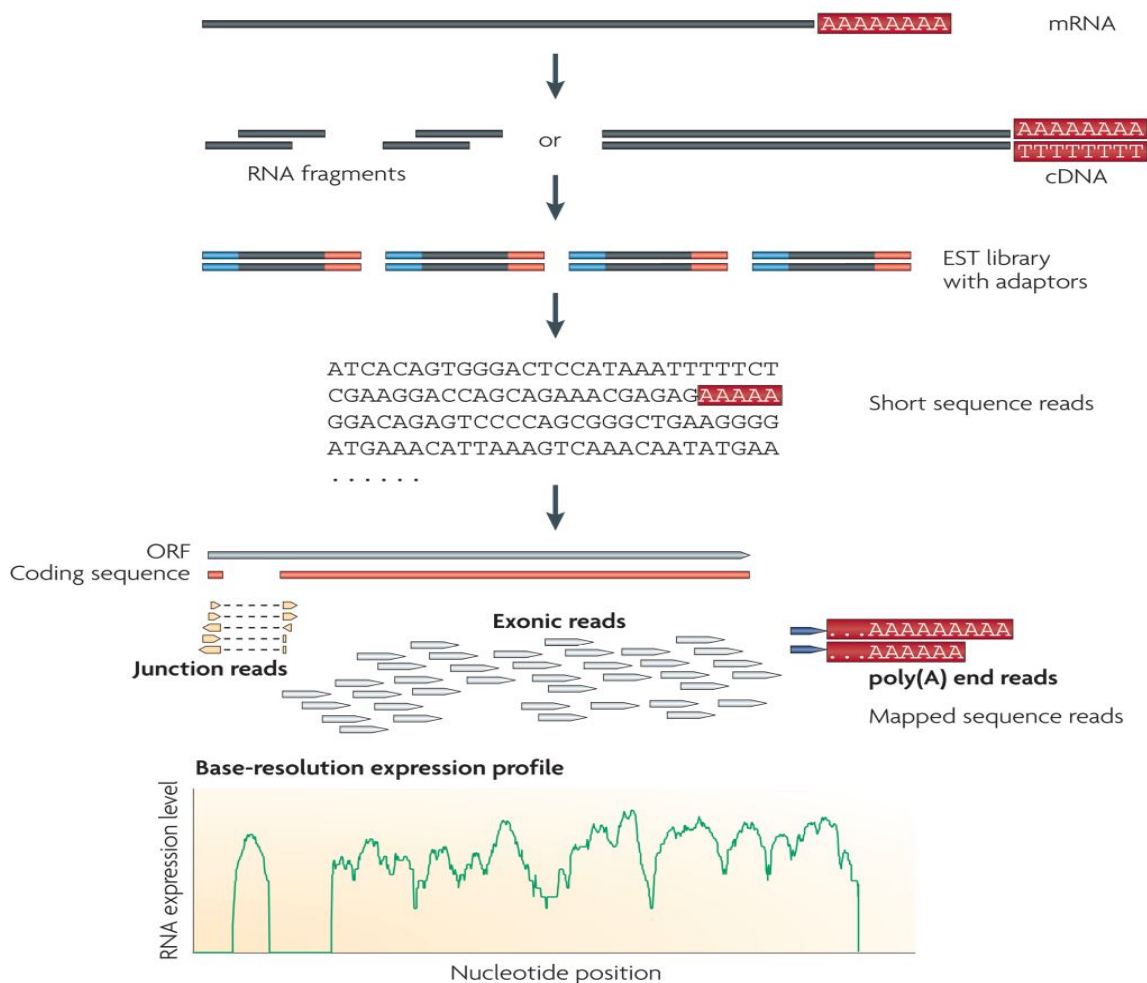


Рисунок 2 — Метод RNA-Seq (Levy S. E., 2019)

В связи, с чем в дальнейшем на основе новой прогрессивной методики есть возможность получения сортов с желаемыми признаками (устойчивостью к болезням, достижение оптимального максимального урожая и других требований относительно созданных и селективируемых в будущем сортов).

В основном, развитие транскриптомных методов позволяет нам углубиться и понять не только онтогенез и структуру РНК, но и ее характеристики в клетках разных тканей и организмов.

Изначально в 2012 году проект ENCODE идентифицировал геном в организмах *Drosophila melanogaster* и *Caenorhabditis elegans*. Внимание акцентировалось на секвенирование экспрессии мРНК и нкРНК; модификации и замене гистонов; транскрипции ДНК.

В начале 2015 года был начат новый проект "Геномика генной регуляции" (GGR). Цель и задача данной программы: изучение генных сетей и путей в различных системах организма, с надеждой на дальнейшее понимание механизмов, контролирующих экспрессию генов.

Создание Энциклопедии элементов ДНК растительного материала (Fruit ENCODE) - это проект по кодированию растений, который направлен на создание наборов данных метилирования ДНК, модификаций гистонов, экспрессии генов, связывания факторов транскрипции для всех растительных организмов на разных стадиях развития (ENCODE).

**Выводы.** При получении все большей информации о тканеспецифичных уровнях экспрессии всех генов во всех тканях на основе новой прогрессивной методики есть возможность получения сортов с желаемыми признаками (устойчивостью к болезням, достижение оптимального максимального урожая и других требований относительно созданных и селективируемых в будущем сортов). Прогресс в области данных исследований даст возможность для решения продовольственных проблем, именно изучение геномов сельскохозяйственных растений (озимая пшеница, ячмень, просо, сорго, рис и др.).

#### **Список использованных источников**

1. Derera N. F. The effects of preharvest rain. In Preharvest Field Sprouting in Cereals. /N. F. Derera. - Boca Raton, Florida: CRC Press. – 1993 - P. 3-14
2. ENCODE [Электронный ресурс]. – <https://en.wikipedia.org/wiki/ENCODE> – Опубликовано: 31.07.2019.
3. Levy S. E., Boone B. E. Next-Generation Sequencing Strategies / S. E. Levy, B. E. Boone /Cold Spring Harbor perspectives in medicine. – 2019. – Т. 9. – №. 7. – С. a025791.
4. Maniatis T., Fritsch E. F. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor. / T. Maniatis, E. F. Fritsch - NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press – 1989 - P. 7.19-7.45.
5. White R. J. Gene Transcription: Mechanisms and control. / R. J. White Oxford, UK: Blackwell Science - 2001- P. 1-25.
6. Feng N. Transcriptome Profiling of Wheat Inflorescence Development from Spikelet Initiation to Floral Patterning Identified Stage-Specific Regulatory Genes / N. Feng, G. Song- Plant Physiol. Vol. 174, 2017 -P. 1779-1784.