

БОБРОВНИЦЬКИЙ Ю. А. 
КОЗЕКО Л. Є. 

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України,
Україна, 01601, м. Київ, вул. Терещенківська, 2
✉ bobrownzyky9@hotmail.com

СТВОРЕННЯ ВИРОДЖЕНИХ ПРАЙМЕРІВ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ АЛКОГОЛЬДЕГІДРОГЕНАЗИ ПСАМОФІТА *ALYSSUM DESERTORUM*

Мета. Для вирішення питання, як псамофіти (рослини піщаних ґрунтів) здатні переносити затоплення, нами обрано представника флори України *Alyssum desertorum* Stapf. Важливим компонентом стійкості рослин до надлишку води у ґрунті є швидка активація анаеробного метаболізму, ключовим ферментом якого є алкогольдегідрогеназа (АДГ). Генетична послідовність гена *ADH* у цього виду невідома. Метою роботи було конструювання та оцінка ефективності вироджених праймерів для дослідження експресії *ADH* методом кількісної ЗТ-ПЛР. **Методи.** Праймери підібрані на основі аналізу літератури і біоінформаційних баз даних. **Результати.** Проаналізовано положення *A. desertorum* з позицій молекулярної систематики і з'ясовано структуру *ADH* у споріднених видів. Створено консенсусну послідовність консервативної ділянки гена та праймери. Окремим завданням було конструювання вироджених праймерів для референтних генів *ACT2* і *APRT*. Перевірка праймерів за допомогою ЗТ-ПЛР з використанням двох видів Brassicaceae: *A. desertorum* і *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., показала їх ефективність. **Висновки.** Зроблено висновок, що сконструйовані вироджені праймери можуть бути використані для кількісного ЗТ-ПЛР-аналізу експресії *ADH* *A. desertorum* при ґрунтовому затопленні.

Ключові слова: *Alyssum desertorum*, затоплення, алкогольдегідрогеназа, вироджені праймери, ЗТ-ПЛР.

Alyssum desertorum Stapf (буряк пустельний) є представником родини Brassicaceae псамофітної флори України, малодослідженим у молекулярному відношенні. Вид з коротким

вегетаційним періодом, переважно зростає на піщаних ґрунтах у рівнинних степах, на сухих схилах гір і пагорбів, у соснових лісах (Пуйська, 2005). Таким ґрунтам не притаманне надлишкове зволоження, тому відомості щодо здатності псамофітів переносити тимчасове затоплення залишаються вкрай обмеженими. Проте внаслідок змін клімату збільшується частота екстремальних, за інтенсивністю, опадів, що може призводити до тимчасового затоплення ґрунту і виникнення загроз для рослинності у неадаптованих до таких явищ екосистемах, зокрема територій з піщаними ґрунтами і псамофітною рослинністю. Важливим компонентом стійкості рослин до затоплення є здатність до швидкої активації анаеробного метаболізму, ключову роль в якому відіграють два ферменти гліколізу: піруватдекарбоксилаза перетворює піруват у токсичний формальдегід і алкогольдегідрогеназа (АДГ) перетворює формальдегід в етанол. Численними дослідженнями на представниках різних систематичних груп рослин у природі та експериментально, доведено важливу роль АДГ в адаптації до анаеробних умов і продемонстровано, що індукція синтезу АДГ може слугувати маркером активації анаеробного метаболізму (Kordyum et al., 2017, Ventura et al., 2020).

Раніше за допомогою ізоферментного аналізу нами показано, що *A. desertorum* відповідає на кореневе затоплення швидко (протягом доби) системною індукцією синтезу АДГ (Kordyum et al., 2024). Послідовностей *ADH* у даного виду в молекулярних базах даних і публікаціях інших авторів нами не виявлено. Отже, для подальшого дослідження цієї реакції на рівні генної експресії постало питання конструювання праймерів на основі аналізу послідовнос-



© 2026 Бобровницький Ю. А., Козеко Л. Є. This work is licensed under CC BY 4.0. To view a copy of this license, visit <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

тей цього гена у систематично споріднених видів. У даній роботі представлені алгоритм підбору праймерів і перевірка їх ефективності для аналізу експресії *ADH* методом ЗТ-ПЛР. Окремим завданням було конструювання вироджених праймерів для референтних генів.

Матеріали і методи

Конструювання праймерів для аналізу експресії *ADH* та потенційних референтних генів актину *ACT2* і аденінфосфорибозилтрансферази *APRT* проводили на основі аналізу відомих послідовностей відповідних генів у 9 видів Brassicaceae: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., *Arabidopsis griffithiana* (Boiss.) N. Busch, *Arabis lyallii* S. Watson, *Arabis alpina* L., *Arabis blepharophylla* Hook. & Arn., *Arabis procurrens* Waldst. & Kit., *Arabis gemmifera* (Matsum.) Kadota, *Halimolobos perplexus* (L. F. Hend.) Rollins, *Cardamine amara* L. Консенсусну послідовність, використану при конструюванні праймерів, створювали за допомогою онлайн програми <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/kalign?stype=dna>. Послідовність ДНК і кДНК видів Brassicaceae знаходили за допомогою онлайн програми https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome. Аналіз праймерів на утворення димерів здійснювали за допомогою онлайн програми <https://www.thermofisher.com/ua/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>. Всі використані програми наявні у вільному доступі.

Для перевірки ефективності праймерів використовували *A. desertorum* і *A. thaliana* (Col-0). *A. desertorum* вирощували з насіння, зібраного з рослин природних популяцій на сухих піщаних ділянках яружних лісів у степовій зоні Дніпропетровської області (48.438965, 35.121684). Субстратом служила суміш пісок : ґрунт (1,5 : 1). Рослини вирощували при $22 \pm 4^\circ\text{C}$, вмісті води у ґрунті 40% (на сиру вагу), фотоперіоді 16 / 8 год (світло / темрява) при інтенсивності світла 100 ± 20 мкмоль·м⁻²·с⁻¹. Тритижневі рослини *A. desertorum* піддавали ґрунтовому затопленню протягом 10 діб (S10); контрольні рослини (K10) залишали за нормальних умов. *A. thaliana* вирощували за нормальних умов протягом трьох тижнів (K0).

РНК виділяли із надземної частини рослин за допомогою набору Zymoresearch Quick-

RNA Plant Kit (Zymoresearch Corp., США) з обробкою ДНКазою I (New England Biolabs, США). У негативному контролі використовували бідисцильовану воду. Зворотну транскрипцію (ЗТ) проводили за допомогою набору RevertAid RT Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific, США), ПЛР – за допомогою NEB Taq PCR Kit (New England Biolabs, США), температурний режим ПЛР був наступним: 94°C 5 хв. (початкова денатурація), 35 циклів – 94°C 30 с, крок відпау (специфічна температура для кожного праймера) 30 с, 72°C 1 хв. Електрофорез проводили у неденатуруючому поліакриламідному гелі із забарвленням сріблом. Застосовували маркер молекулярної ваги ДНК Invitrogen Low DNA Mass Ladder (смуги 100, 200, 400, 800, 1200, 2000 п. н.). Розмір амплікона оцінювали за допомогою програми Gel Analyzer 23.1, наявної у вільному доступі (GelAnalyzer 23.1.1 (www.gelanalyzer.com) by Istvan Lazar Jr., PhD and Istvan Lazar Sr., PhD, Csc).

Результати та обговорення

Теоретичне підтрнуття. Завданням даної частини роботи був підбір праймерів для *ADH A. desertorum*, послідовність якого невідома, для подальшого аналізу експресії цього гена методом ЗТ-ПЛР у реальному часі. У випадках, коли структура гена несекованованого виду і його послідовність ДНК невідомі, підбір праймерів можна провести із застосуванням наступних підходів: використання праймерів відповідного гена у систематично споріднених видів з робіт інших дослідників; шляхом власного аналізу послідовностей цільового гена у систематично споріднених видів. Далі створюються праймери у консервативних ділянках гена відповідно до загальних підходів до конструювання праймерів для ЗТ-ПЛР у реальному часі (Farrell, 2009) і перевіряється їх функціонування за допомогою ЗТ-ПЛР з подальшим електрофорезом продуктів реакції. Критерієм успішності вибору пари праймерів є наявність єдиної чіткої смуги з молекулярною вагою, що відповідає теоретично розрахованій. Поява смуг з іншою молекулярною вагою свідчить про неспецифічну ампліфікацію (Czajka, 2018).

Згідно з молекулярною систематикою родини Brassicaceae, створеної на підставі аналізу понад 1000 генів, найбільш систематично близькими до роду *Alyssum* є представники триб Arabidae (*Draba*, *Arabis*, *Drabella*) та Alyssae (*Irania*, *Clastopus*, *Physostychis* та ін.) (Hendriks et al., 2023). Відзначається високий ступінь спо-

рідності *A. desertorum* із модельними *Brassica* sp. – *Ar. alpina* та *A. thaliana*.

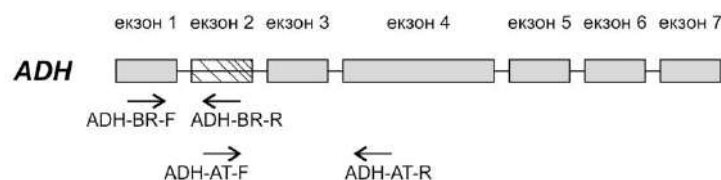
ADH A. thaliana має довжину 1143 п. н. і містить сім екзонів (рис. 1 А). Консервативність за нуклеотидною послідовністю екзонів складає 63% всередині Brassicaceae, тоді як за амінокислотною послідовністю білка цей показник значно вищий навіть між віддаленими видами з різних родин (80% між *A. thaliana* та *Zea mays* L.). У деяких видів Brassicaceae частина інтронів відсутня, і водночас відносно положення наявних інтронів зберігається. Зустрічаються і варіанти *ADH* без інтронів (Koch et al., 2000).

Важливим питанням також є кількість локусів й алельних варіантів гена. У рослин активно відбуваються генні дуплікації, що призводить до утворення цілих родин генів (Charlesworth et al., 1998). Якщо є підстави очікувати на наявність кількох локусів, бажано конструювати праймери, специфічні до кожного з них, оскільки відповідні білкові ізоформи можуть відрізнятися за функцією та експресуватися у різних органах рослини (Tanksley and Jones, 1981). За даними літературних джерел, багато видів рослин мають кілька генів *ADH*, які утворюють генну родину (до 6–10). Наприклад, у *Z. mays* є два основних і кілька додаткових генів *ADH* (Su et al., 2020). Проте більшість видів Brassicaceae, зокрема *A. thaliana* та *Ar. alpina*, мають єдиний *ADH*. Нечисленними винятками є окремі види Brassicaceae з 2–3 і більше *ADH*, проте додаткові *ADH* позбавлені всіх або частини інтронів і не експресуються, отже, їх продукти не будуть утворюватися у результаті ЗТ-ПЛР (Koch et al., 2000).

Вибір праймерів до *ADH A. desertorum*. У деяких роботах по *ADH* родини Brassicaceae використовуються праймери до послідовностей всередині коротких консервативних ділянок на кінцях гена з метою пошуку наявності у геномі

всіх можливих варіантів *ADH* шляхом ПЛР і подальшого секвенування (Koch et al., 2000, Charlesworth et al., 1998, Miyashita et al., 1998). Оскільки такі праймери забезпечують синтез великого амплікону, а праймери для ПЛР у реальному часі мають охоплювати фрагмент невеликого розміру (70–250 п. н.) (Fartell, 2009), нами було взято послідовність «прямого» праймера, специфічного до послідовності екзону 1 *ADH*, консервативної всередині видів Brassicaceae (рис. 1 А) (Koch et al., 2000, Miyashita et al., 1998). Зворотні праймери конструювали всередині консенсусної послідовності екзону 2 (рис. 1 Б). Консенсусну послідовність створювали на основі аналізу послідовностей *ADH* у *Ar. lyallii*, *Ar. alpina*, *Ar. blepharophylla*, *Ar. procurrens*, *Ar. gemmifera*, *A. thaliana*, *A. griffithiana*, *H. perplexus*, *C. amara*.

Зі створеної консенсусної послідовності екзону 2 *ADH* (рис. 1 Б) видно, що кількість варіабельних позицій відносно невелика і вони рівномірно розміщені вздовж послідовності, що не дає можливості сконструювати невироджений праймер. При конструюванні варіантів виродженого праймеру ми намагалися отримати послідовність з найменшим ступенем виродженості (фактичний коефіцієнт виродженості склав 2). Для цього уникали найбільш варіабельних послідовностей, особливо на 3' кінці праймера. Варіанти створених праймерів перевіряли на можливу кросреактивність з неспецифічними послідовностями ДНК, використовуючи як запит у пошуку ДНК і кДНК *A. thaliana*, а також видів, які можуть співізолюватися (напр., *Peronospora brassicae* Gäm. і ґрунтові грибки сапротрофи). Крім того, перевірено і виключено утворення парою праймерів потенційних шпильок, само- і гетеродимерів.



Б

CT/G GCTGTG/AG/TCA/GT GGGAAGCC/A/TGG AAAG/ACCAC/TTG GTG/TATG/CGAG/AG AAGTG/A/CGAGGT
TGCTCCA/GCCG/T CAG/AAAACAC/TG AAGTTCGTAT T/CAAGATT/CCTC TTCATTCTC TC/TTGTACAC
C/TGAT/CGTTTAC TTCTGGGAAG C/TC/T/AAAG

Рис. 1. (А) Схематична структура *ADH* Brassicaceae, стрілками вказано розташування праймерів. Для екзону 2 створювали консенсусну послідовність. (Б) Консенсусна послідовність екзону 2 *ADH*. Жирним шрифтом виділено позиції з варіабельністю за двома нуклеотидами, жирним з підкресленням – за трьома.

Отже, праймери, які найкраще відповідали поставленим критеріям, охоплюють фрагмент розміром 255 п. н. у кДНК і 289 п. н. у ДНК. Вони отримали назву ADH-BR. Крім того, враховуючи філогенетичну близькість *A. desertorum* до *A. thaliana*, друга пара праймерів була обрана з дослідження *A. thaliana* (Yu et al., 2025) і отримала назву ADH-AT. Ці праймери розташовані в екзонах 2 і 4 та охоплюють фрагмент розміром 153 п. н. у кДНК і 392 п. н. у ДНК (табл. 1). Розмір амплікону кДНК в обох випадках відповідає критеріям ЗТ-ПЛР у реальному часі.

Вибір праймерів для референтних генів A. desertorum. Референтними називають гени, чия експресія стабільна за різних умов вирощування у даному досліді. За рівнем експресії референтних генів (РГ) можна контролювати концентрацію кДНК у зразку. Вибір РГ є критичним етапом у дослідженні з генної експресії. При цьому для різних експериментальних впливів можна підбирати різні РГ.

Один з підходів до вибору праймерів РГ у немодельних видів полягає у наступному: спочатку визначають РГ, які використовують при відповідному впливі у споріднених модельних видів; підбирають праймери для цих генів; проводять ЗТ-ПЛР із цими праймерами на кДНК немодельного виду; продукти реакції аналізують електрофоретично. Праймери вважають придатними до використання, якщо вони дають одну чітку смугу відповідного розміру на гелі (Czajka, 2018).

За даними літературних джерел, у дослідженнях генної експресії у видів родини Brassicaceae при впливі затоплення використовуються наступні гени: фактор елонгації α -1; актин 1, 2, 7, 11; тубулін β -6; убіквітинлігаза; субодиниця 2а протеїнофосфатази; кінезин, асоційований з хромосомами; аденінфосфорибозилтрансфераза 1 (van Veen et al., 2016, Neri-Silva et al., 2023, Peláez-Vico et al., 2023). Найбільший інтерес для нашого дослідження становили гени, які утворюють амплікони різного розміру на ДНК і кДНК. Крім того, були вибрані гени, послідовність яких по сайту гібридизації праймерів має значну варіабельність між *A. thaliana* і деякими іншими видами Brassicaceae (*Brassica*

rapa L., *Brassica oleracea* L., *Brassica napus* L., *Capsella rubella* Medik., *Raphanus sativus* L., *Arabidopsis lyrata* (L.) O'Kane & Al-Shehbaz, *Camelina sativa* (L.) Crantz, *Eutrema salsugineum* (Pall.) Al-Shehbaz & Warwick). У результаті обрано гени актину 2 (Neri-Silva et al., 2023) та аденінфосфорибозилтрансферази 1 (van Veen et al., 2016).

Далі ми дослідили варіабельність послідовностей ДНК і кДНК *A. thaliana* та інших видів Brassicaceae (див. Матеріали і методи) по сайтах гібридизації праймерів для обраних РГ, використовуючи як пошуковий запит послідовності праймерів з робіт (van Veen et al., 2016, Neri-Silva et al., 2023). Після аналізу варіабельності послідовності праймерів для актину 2 (*ACT2*) залишилася незмінною, тоді як зворотній праймер для аденінфосфорибозилтрансферази 1 (*APRT-BR*) було змінено за однією однонуклеотидною позицією, яка виявилася варіабельною. Амплікони, отримані з використанням праймерів *ACT2*, мали розмір 167 п. н. у кДНК і 245 п. н. у ДНК; з використанням *APRT-BR* – 159 п. н. у кДНК і 215 п. н. у ДНК (табл. 1).

ЗТ ПЛР A. desertorum з праймерами до ADH та РГ. Перевірка сконструйованих праймерів за допомогою ЗТ-ПЛР виявила єдині чіткі смуги відповідного розміру для кожної пари у *A. desertorum* і відсутність таких у негативному контролі (табл. 2, рис. 2). При цьому продуктів реакції розміру, характерного для ДНК, а також неспецифічних продуктів не було, що свідчить про відсутність домішок ДНК у зразках. На відміну від цього, у зразку кДНК *A. thaliana*, окрім смуг специфічного розміру, виявлено також неспецифічні смуги масою близько 255 і 145 п. н., утворені з праймерами ADH-AT і ADH-BR, відповідно. Відзначено також, що рівень транскриптів РГ у *A. desertorum* був достатньо стабільним за контрольних умов і затоплення (як приклад, результат аналізу *ACT2*, рис. 2).

Можливою причиною появи неспецифічних ампліконів у зразку кДНК *A. thaliana* може бути наявність забруднення зразка ґрунтовими мікроорганізмами сапротрофами, оскільки для цього виду, на відміну від *A. desertorum*, притаманне приземне розташування розетки.

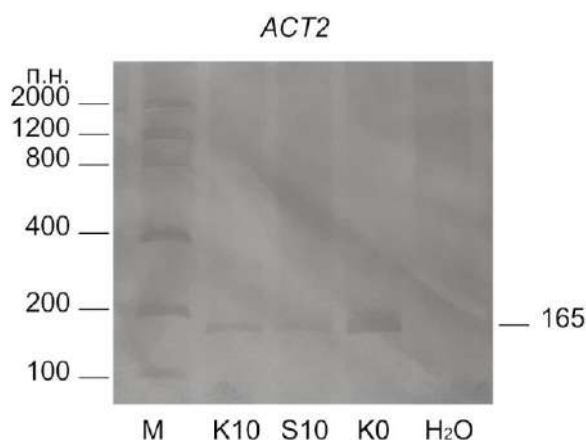
Таблиця 1. Праймери для ЗТ-ПЛР-аналізу *ADH* та референтних генів *ACT2* і *APRT*

Назва праймерів	Ген	Білок	Послідовність	t плав., °C	Фрагмент кДНК/ДНК, п.н.
ACT2	<i>ACT2</i>	Актин 2	TCT CCC GCT ATG TAT GTC GC (F) GTC ACG TC AGC AAG GTC AA (R)	60	167/245
APRT-BR	<i>APRT</i>	Аденін фосфорибозилтрансфераза	AAT GGC GAC TGA AGA TGT GC (F) TCA GTG TCS AGA AGA AGC GT (R)	58	159/215
ADH-AT	<i>ADH</i>	АДГ	TGT GGG GAG TGT CGT CAT TG (F) TGA ACG TGG AAG TCC CAA GG (R)	60	153/392
ADH-BR	<i>ADH</i>	АДГ	CCA CCG GAC AGA TTA TTC G (F) AGT GAA GAG YAT CTT TAT ACG (R)	57	255/289

Таблиця 2. Результати ЗТ-ПЛР з праймерами ACT2, APRT-BR, ADH-AT та ADH-BR на зразках *A. desertorum* та *A. thaliana*

Зразок/Праймери	ACT2	APRT-BR	ADH-AT	ADH-BR
<i>A. desertorum</i> K10	165 (+)	160 (+)	150 (+)	260 (+)
<i>A. desertorum</i> S10	165 (+)	160 (+)	150 (+)	260)
<i>A. thaliana</i> K0	165 (+)	160 (+)	150 (+); 255 (нс)	260 (+); 145 (нс)
H ₂ O	–	–	–	–

Примітки: цифрами позначена молекулярна вага амплікона, п. н.; (+) наявність чіткого специфічного фрагмента; (–) відсутність фрагмента; (нс) наявність неспецифічного фрагмента.

Рис. 2. Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР з праймерами ACT2. Зразки зліва направо: М – маркер молекулярної ваги ДНК; *A. desertorum* K10; *A. desertorum* S10; *A. thaliana* K0; H₂O.

Висновки

Таким чином, праймери ADH-AT і ADH-BR можуть бути використані для дослідження експресії *ADH* *A. desertorum* методом ЗТ-ПЛР у реальному часі. При цьому як референтні можуть бути використані гени актину 2 та аденін-

фосфорибозилтрансферази (праймери ACT2 і APRT-BR, відповідно).

Інформація про фінансову підтримку, подяки: відсутня.

Конфлікт інтересів: автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Список використаних джерел

- Charlesworth D., Liu F. L., Zhang L. The evolution of the alcohol dehydrogenase gene family by loss of introns in plants of the genus *Leavenworthia* (Brassicaceae). *Molecular Biology and Evolution*. 1998. Vol. 15. P. 552–559. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025955>.

2. Czajka K. M. Effects of nickel toxicity on seed germination and expression of genes associated with nickel resistance in *Populus tremuloides*: Doctoral dissertation. Laurentian University, Sudbury, Ontario, Canada, 2018. 70 p.
3. Farrell Jr R. E. RNA Methodologies: laboratory guide for isolation and characterization. York, PA, United States : Academic Press, 2009. 833 p.
4. Hendriks K. P., Kiefer C., Al-Shehbaz et al. Global Brassicaceae phylogeny based on filtering of 1,000-gene dataset. *Current Biology*. 2023. Vol. 33. P. 4052–4068. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.08.026>.
5. Ilyinska A. P. Species of a genus *Alyssum* L. (Section *Alyssum*) in Ukrainian flora. *Ukrainian Botanical Journal*. 2005. Vol. 62. P. 223–234. [in Ukrainian]
6. Koch M. A., Haubold B., Mitchell-Olds T. Comparative evolutionary analysis of chalcone synthase and alcohol dehydrogenase loci in *Arabidopsis*, *Arabis*, and related genera (Brassicaceae). *Molecular Biology and Evolution*. 2000. Vol. 17. P. 1483–1498. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026248>.
7. Kordyum E., Akimov Y., Polishchuk O., Panas I., Stepanov S., Kozeko L. Psammophytes *Alyssum desertorum* Stapf and *Secale sylvestre* Host are sensitive to soil flooding. *Plants*. 2024. Vol. 13. 413. <https://doi.org/10.3390/plants13030413>.
8. Kordyum E., Kozeko L., Ovcharenko Y., Brykov V. Assessment of alcohol dehydrogenase synthesis and aerenchyma formation in the tolerance of *Sium* L. species (Apiaceae) to water-logging. *Aquatic Botany*. 2017. Vol. 142. P. 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2017.07.001>.
9. Miyashita N. T., Kawabe A., Innan H., Terauchi R. Intra- and interspecific DNA variation and codon bias of the alcohol dehydrogenase (*Adh*) locus in *Arabis* and *Arabidopsis* species. *Molecular Biology and Evolution*. 1998. Vol. 15. P. 1420–1429. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025870>.
10. Neri-Silva R., Monteiro-Batista R. D. C., Fonseca-Pereira P., DNunes M.D., Viana-Silva A. L., Ribeiro T. P., Pérez-Díaz J. L., Medeiros D. B., Araújo W. L., Fernie A. R., Nunes-Nesi A. On the significance of the ADNT1 carrier in *Arabidopsis thaliana* under waterlogging conditions. *Biomolecules*. 2023. Vol. 13. 731. <https://doi.org/10.3390/biom13050731>.
11. Peláez-Vico M. Á., Tukuli A., Singh P., Mendoza-Cózatl D. G., Joshi T., Mittler R. Rapid systemic responses of *Arabidopsis* to waterlogging stress. *Plant Physiology*. 2023. Vol. 193. P. 2215–2231. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad433>.
12. Su W., Ren Y., Wang D., Su Y., Feng J., Zhang C., Tang H., Xu L., Muhammad K., Que Y. The alcohol dehydrogenase gene family in sugarcane and its involvement in cold stress regulation. *BMC Genomics*. 2020. Vol. 21. 521. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06929-9>.
13. Tanksley S. D., Jones R. A. Effects of O₂ stress on tomato alcohol dehydrogenase activity: description of a second ADH coding gene. *Biochemical Genetics*. 1981. Vol. 19. P. 397–409. <https://doi.org/10.1007/BF00504283>.
14. Van Veen H., Vashisht D., Akman M., Girke T., Muroph A., Reinen E., Hartman S., Kooiker M., van Tienderen P., Schranz M. E., Bailey-Serres J., Voesenek L. A., Sasidharan R. Transcriptomes of eight *Arabidopsis thaliana* accessions reveal core conserved, genotype- and organ-specific responses to flooding stress. *Plant Physiology*. 2016. Vol. 172. P. 668–689. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00472>.
15. Ventura I., Brunello L., Iacopin S., Valeri M. C., Novi G., Dornbusch T., Perata P., Loreti E. *Arabidopsis* phenotyping reveals the importance of alcohol dehydrogenase and pyruvate decarboxylase for aerobic plant growth. *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10. 16669. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73704-x>.
16. Yu H., Lv H., Lu F., Yang Q., Duan H., Li W., Fu F. Expression evaluation of exogenous and endogenous alcohol dehydrogenase genes in transgenic *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*. 2025. Vol. 15. 1476754. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1476754>.

BOBROWNYZKY J. A., KOZEKO L. Ye.

*M. G. Kholodny Institute of Botany of Natl. Acad. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 01601, Kyiv, Tereshchenkivska str. 2*

DESIGN OF DEGENERATE PRIMERS FOR STUDYING THE EXPRESSION OF ALCOHOL DEHYDROGENASE IN THE PSAMMOPHYTE *ALYSSUM DESERTORUM*

Aim. To address the question of how psammophytes (plants of sandy soils) can tolerate waterlogging, we chose a representative of the flora of Ukraine, *Alyssum desertorum* Stapf. An important component of plant resistance to excess water is rapid activation of anaerobic metabolism, the key enzyme of which is alcohol dehydrogenase (*ADH*). The genetic sequence of *ADH* gene in this species is unknown. The aim of the research was to design and evaluate efficiency of degenerate primers for studying *ADH* expression by RT-qPCR. **Methods.** Primers were selected based on an analysis of the literature and bioinformatic databases. **Results.** The position of *A. desertorum* was analysed taking into account molecular systematics, and the structure of *ADH* in related species was elucidated. A consensus sequence of the conserved region of the gene and primers have been created. A separate task was to design degenerate primers for the reference genes *ACT2* and *APRT*. Testing of the primers by RT-PCR using two Brassicaceae species: *A. desertorum* and *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., showed their effectiveness. **Conclusions.** It was concluded that the designed degenerate primers can be used for RT-qPCR analysis of *ADH* expression in *A. desertorum* under waterlogging.

Keywords: *Alyssum desertorum*, waterlogging, alcohol dehydrogenase, degenerate primers, RT-PCR.

Надходження статті: 26 лютого 2026 р.

Прийняття до друку після рецензування: 6 квітня 2026 р.

Публікація: 30 червня 2026 р.