

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ  
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ КАРЕЛЬСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
(ИБ КарНЦ РАН)

На правах рукописи

НИЛОВА Ирина Александровна  
НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

по результатам научно - квалификационной работы (диссертации)  
тема: «Устойчивость растений пшеницы к высокотемпературному  
воздействию разной интенсивности: физиолого-биохимические и  
молекулярно-генетические аспекты»,

выполненной в соответствии с требованиями  
Федерального государственного образовательного стандарта  
высшего образования по направлению 06.06.01. Биологические науки  
(уровень подготовки кадров высшей квалификации)

Научный руководитель:  
*Член-корреспондент РАН,  
профессор,  
доктор биологических наук,  
А.Ф. Титов*

Петрозаводск – 2017

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность.** Несмотря на многочисленные исследования устойчивости растений к действию неблагоприятных температур, проблема адаптации растений до сих пор остается актуальной (Дроздов и др., 1984; Топчиева, 1994; Чиркова, 2002; Титов и др., 2006; Kotak, 2007; Колупаев, Карпец, 2010, Hasanuzzaman et al., 2013; Bahyghana, 2015). Прежде всего, это связано с большим разнообразием механизмов, участвующих в повышении устойчивости растений к изменениям условий внешней среды, а также наблюдаемой в настоящее время нестабильной климатической ситуацией в разных регионах мира, которая может приводить к существенным потерям урожая сельскохозяйственных культур (Ortiz et al., 2008; Miraglig et al., 2009). Известно, что не только недостаток тепла, но и его избыток наносят существенный вред растениям. Как оказалось, высокие температуры переносятся растениями гораздо хуже, чем низкие (Чиркова, 2002). В связи с этим, вопрос о механизмах формирования теплоустойчивости растений представляет большой интерес для исследователей.

Как показывают исследования, растения очень быстро реагируют на действие высоких температур (Титов и др., 2006, Hasanuzzaman et al., 2013). Отклонения температуры окружающей среды от оптимальной для роста растений вызывают физиологические, биохимические и молекулярные изменения в растительном организме (Wahid et al., 2007; Bita and Gerats, 2013), значительная часть которых носит адаптивный характер и направлена, в конечном счете, на его выживание. Благодаря наличию широкого спектра защитно-приспособительных реакций и адаптивных механизмов, растения могут переносить высокие температуры. Более того, даже в случае действия на растения высокой повреждающей температуры, растения способны в начальный момент быстро мобилизовывать свои защитные силы, что в частности выражается в повышении их теплоустойчивости (Титов, 1989; Топчиева, 1994) и обеспечивает их выживание, если температурное воздействие не оказывается достаточно продолжительным.

В последние годы при изучении устойчивости растений к действию высоких температур особое внимание уделяется молекулярным механизмам, и прежде всего механизмам, затрагивающим функциональную активность генома. Во многих работах показано, что повышение устойчивости растений в условиях гипертермии, непосредственно связано с изменениями в экспрессии достаточно большого числа

генов, результатом чего, в частности, является активация синтеза стрессовых белков (Rizhsky et al., 2002; Volkov et al., 2003; Лутова и др., 2010). Однако, несмотря на, казалось бы, очевидные успехи в изучении молекулярных основ формирования устойчивости растений к действию высоких температур, до сих пор многие аспекты этой проблемы еще до конца не изучены. Это касается механизмов формирования ответных реакций растений на температурные воздействия разной интенсивности. В литературе пока мало сведений относительно динамики теплоустойчивости растений, о развитии окислительного стресса и активизации антиоксидантной системы, экспрессии стрессовых генов в клетках растений, испытывающих действие разных по значению высоких температур. На данный момент, основываясь на ранее полученных результатах, мы можем высказать только предположение, что механизмы формирования устойчивости растений в ответ на действие разных по значению высоких температур могут носить как общий, так и специфический характер. Тем не менее, изучение особенности ответных реакций растений на высокотемпературный стресс разной интенсивности позволит выявить именно те механизмы, которые обеспечивают им долговременную адаптацию и выживание в условиях гипертермии, а также поможет понять, недостаток каких из них приводит к снижению теплоустойчивости и последующей гибели растений.

**Цель и задачи исследования.** Изучить ряд физиолого-биохимических и молекулярно-генетических механизмов повышения устойчивости растений пшеницы к высокотемпературным воздействиям разной интенсивности.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- 1) провести сравнительный анализ реакции растений пшеницы на высокотемпературные воздействия разной интенсивности.
- 2) изучить развитие окислительного стресса в клетках растений пшеницы на высокотемпературные воздействия разной интенсивности.
- 3) исследовать особенности активизации ключевого фермента антиоксидантной системы – супероксиддисмутазы (СОД).
- 4) выявить особенности изменения уровня транскриптов генов, кодирующих белки теплового шока (БТШ) *TaHSP90*, *TaHSP70*, *TaHSP19*, *TaHSP16,9*.
- 5) изучить изменения уровня транскриптов генов, кодирующих белки, участвующих в защите клеток от ЭР стресса *TaBIP* и *TaBI-1*.

**Научная новизна работы.** В работе впервые проведено сравнительное исследование реакции растений пшеницы на высокотемпературные воздействия разной

интенсивности (от 33 до 45°C). Впервые подробно описана динамика теплоустойчивости листьев проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39 и выявлены особенности её формирования при действии температур от 33 до 45°C. Впервые проанализирован характер развития окислительного стресса и показаны различия генерации супероксид радикала и перекиси водорода, а также в содержании малонового диальдегида в листьях растений пшеницы при высокотемпературных воздействиях. Впервые исследована динамика изменения уровня экспрессии генов *TaBIP* и *TaBI-1* при высокотемпературных воздействиях разной интенсивности.

**Практическая значимость работы.** Полученные данные позволяют выявить взаимосвязь между физиолого-биохимическими и молекулярно-генетическими процессами, происходящими в растении при высокотемпературных воздействиях разной интенсивности и дают возможность более глубоко и полно описать механизмы, участвующие в формировании теплоустойчивости растений. Результаты исследований могут быть полезны для создания новых сельскохозяйственных культур пшеницы с повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды. Основные результаты данной работы могут быть использованы в курсах лекций для студентов эколого-биологических, агротехнических и сельскохозяйственных факультетов.

**Личный вклад автора.** Автор лично принимал участие в составлении планов экспериментов, в сборе экспериментальных данных, обработке литературных данных по теме работы, в написании статей и квалификационной работы.

**Апробация работы.** Основные результаты квалификационной работы представлены на международных и российских симпозиумах и конференциях: на II Всероссийской научной интернет-конференции с международным участием «Ботаника и природное многообразие растительного мира» (Казань, 2014 г.), на VIII съезде Общества физиологов растений России «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015 г.), на III (XI) международной ботанической конференции молодых ученых в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург, 2015 г.), на XI международном симпозиуме «Plant signaling and behavior» (Санкт-Петербург, 2016 г.), на годичном собрании Общества физиологов растений России «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма» (Санкт-Петербург, 2016 г.).

**Публикации.** По материалам квалификационной работы опубликовано 13 работ, в том числе 4 статьи из списка ВАК.

**Структура и объем работы.** Квалификационная работа изложена на 75 страницах, содержит 7 рисунка, 5 таблиц, включает в себя 115 литературных источника, в том числе 96 на иностранном языке. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследования, описания результатов и их обсуждения, заключения и списка литературы.

## ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования выступали семидневные проростки озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39.

Растения выращивали в рулонах фильтровальной бумаги на питательном растворе в течение 7 суток с добавлением микроэлементов (рН 6,2 – 6,4) в камере искусственного климата при температуре воздуха 22°C, его относительной влажности 60 – 70%, ФАР 100 мкмоль/(м<sup>2</sup>·с) и фотопериоде 14 ч. Затем проростки подвергали действию высоких температур от 31 до 45°C, сохраняя неизменными прочие условия. Продолжительность высокотемпературного воздействия составляла от 15 минут до 72 часов.

Об оводненность тканей судили с помощью весового метода, высушивая растительные образцы до постоянного веса при температуре 105°C (Аринушкина, 1970).

Рост растений определяли, используя общепринятые методы.

Теплоустойчивость растений оценивали после 5-минутного прогрева листовых высечек в водном термостате при последовательном повышении температуры с интервалом в 0,4°C (Александров, 1963). В качестве критерия устойчивости использовали температуру гибели 50% палисадных клеток листа, определяемую с помощью светового микроскопа Микмед 2 («ЛОМО», Россия) объектив 40х по деструкции хлоропластов и коагуляции цитоплазмы.

Содержание малонового диальдегида (МДА) оценивали спектрофотометрическим методом по накоплению продукта его реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) (Kumar, Knowles, 1993; Сибгатуллина и др., 2011).

Супероксид радикал определяли *in situ* путем восстановления нитросинего тетразолия с образованием фиолетового преципитата формазана методом описанным Джабсом и др (Jabs et al., 1996).

Содержание перекиси водорода оценивали спектрофотометрическим методом описанным Беллинкампи и др. (Bellincampi et al., 2000) с использованием спектрофотометра СФ-2000 (Спектр, Россия). Метод основан на окислении ионов железа  $Fe^{+2}$  перекисью водорода до ионов железа  $Fe^{+3}$ , которые образуют окрашенные соединения с ксиленоловым оранжевым (Сибгатуллина и др., 2011).

Общую активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли спектрофотометрическим методом, основанным на способности фермента ингибировать фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия (Beauchamp, Fridovich, 1971).

Содержание белка определяли по методу, описанному Брэдфордом (Bradford, 1976). Метод основан на сдвиге спектра поглощения в сторону значений 595 нм красителя Кумасси ярко-голубого при связывании его с белком, прямо пропорционально концентрации последнего.

Накопление транскриптов генов определяли с помощью ПЦР-анализа в режиме реального времени. Тотальную РНК выделяли с помощью набора Extract RNA (Евроген, Россия). Количество и качество тотальной РНК определяли методом капиллярного электрофореза на системе Experion (Bio-Rad, США). Тотальную РНК обрабатывали ДНКазой (1 единица активности ЕА). С помощью набора для обратной транскрипции (Евроген, Россия) синтезировали кДНК, используя очищенный на колонках CleanRNA Standart (Евроген, Россия) препарат РНК. Количество и качество выделенной кДНК определяли спектрофотометрически на приборе SmartSpec Plus (Bio-Rad, США). ПЦР в режиме реального времени проводили на приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 (Bio-Rad, США), используя набор для амплификации с интеркалирующим красителем SYBR Green (Евроген, Россия).

Повторности и статистическая обработка данных. Повторность в пределах одного опыта 3-6 кратная, каждый опыт повторялся не менее трех раз. Обработку экспериментальных данных проводили с использованием общепринятых статистических методов. На рисунках и в таблицах представлены средние значения и их стандартные ошибки. Достоверность различий между вариантами опытов оценивали с помощью критерия Стьюдента (при  $P \leq 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

### **Влияние высокотемпературных воздействий разной интенсивности на рост и оводненность тканей листа растений**

Результаты наших исследований показали, что воздействие высоких температур (33 – 39°C) приводит к торможению роста растений пшеницы. Ростовые показатели проростков, находящихся при температурах 33, 35 и 37°C, были значительно ниже чем те, которые регистрировали у контрольных растений, в среднем на 6, 8, 13, 27 и 39% через 1, 2, 3, 4 и 5 суток, соответственно. Температура 39°C в наибольшей степени тормозила роста растений. Относительно контроля он сократился на 10, 18, 25, 39 и 52% на 1 – 5 сутки эксперимента, соответственно. Прирост длины 1-ого листа пшеницы при действия на растения температур 33, 35 и 37°C изменялся относительно контроля в среднем на 3, 6, 7, 7 и 6% на 1 – 5 сутки, соответственно. Прирост длины 1-ого листа был значительно ниже при температуре 39°C. Относительно контроля он сокращался на 11, 23, 25, 26 и 26% на 1 – 5 сутки эксперимента. Наибольший негативный эффект изученные температуры оказывали на рост 2-го листа: чем выше была температура, тем меньше был прирост длины 2-ого листа растений. Так, при действии температуры 33°C прирост 2-го листа испытуемых растений был ниже, чем прирост 2-го листа контрольных растений на 19, 27, 81, 135 и 170%, при 35°C – на 23, 49, 85, 134, 172%, при 37°C – на 30, 72, 103, 159, 196%, при 39°C – на 34, 79, 133, 195, 250% на 1-5 сутки эксперимента, соответственно.

Оводненность тканей листа растений не изменялась при действии температур 33 и 37°C. Значимое понижение оводненности (на 6, 22 и 30% через 1 – 3 сут, соответственно) наблюдалось только при 43°C

Следует отметить, в нормальных условиях высота 7-10-дневных проростков пшеницы определяется длиной 1-ого листа. У 10-11-дневных проростков рост 1-ого листа замедляется, и высота растений в большей степени зависит от длины 2-ого листа. Высокие температуры в диапазоне 33-37°C одинаково влияют на прирост высоты растений и длины 1-ого листа. Таким образом, прирост высоты растений и длины 1-ого листа тормозится при температурах 33-37°C, но не зависит от действующей температуры. Наоборот, прирост 2-ого листа зависит от действующей температуры: чем выше температура, тем сильнее тормозится его рост. Так, как при действии высоких температур деление клеток замедляется (Schuppler, et al., 1998; Commuri, Jones, 2001), торможение роста второго листа выражено более ярко. Температуры

выше 39°C вызывают полную остановку роста. Возможно, это связано не только с нарушением деления клеток, но и со снижением оводненности тканей, что влияет на рост растений растяжением клеток. В целом полученные результаты подтверждают данные литературы о том, что температуры выше по значению оптимальных для роста растений, вызывают его торможение. Это является неспецифической ответной реакцией на изменения условий среды (Чиркова, 2002).

#### **Характер изменения теплоустойчивости листьев пшеницы при высокотемпературных воздействиях разной интенсивности**

Известно, что теплоустойчивость растений зависит от интенсивности и продолжительности температурного воздействия (Дроздов и др., 1984; Титов и др., 2006).

В наших опытах теплоустойчивость проростков пшеницы при температуре 33°C также как и при температуре 35°C достоверно повышалась через сутки, достигая максимума через двое суток и в дальнейшем оставалась неизменной. Динамика теплоустойчивости при указанных температурных воздействиях была схожей, за тем исключением, что при температуре 35°C абсолютные значения теплоустойчивости были выше, чем при температуре 33°C. Под влиянием температуры 37°C теплоустойчивость повышалась через 1 час, а её максимум достигал спустя двое суток. При 39°C теплоустойчивость возрастала уже через 30 минут. Максимальное значение теплоустойчивости при этой температуре зафиксировано через 1 сутки. Дальнейшее увеличение экспозиции проростков при указанных температурах не приводило к изменению их теплоустойчивости.

Следует отметить, что температуры 33, 35, 37 и 39°C оказывали однотипное влияние на устойчивость растений, но ее количественные характеристики были различны. Так, при 33, 35 и 37°C повышение теплоустойчивости проростков происходило медленнее, а её максимальный уровень был заметно ниже, чем при температуре 39°C, которая согласно полученным данным вызывала максимальный закаливающий эффект.

Характер ответной реакции растений на действие температуры 41°C был иным. Повышение теплоустойчивости клеток листьев наблюдали через 30 минут начала прогрева. Причем устойчивость продолжала увеличиваться в течение первых суток эксперимента, а на 2-е сутки – снижалась. Более высокие температуры (43°C и 45°C) оказывали сходное действие на теплоустойчивость пшеницы; под их влиянием



зафиксирован быстрый рост теплоустойчивости уже в первые минуты воздействия, а затем - резкое её снижение. Отметим, что реакция растений на действие температур 43 и 45°C, как и в случае с температурами 33, 35, 37 и 39°C, различалась по своим количественным характеристикам. В частности, при температуре 43°C теплоустойчивость возрастала и снижалась более плавно, чем при 45°C. Максимальный прирост теплоустойчивости при 43°C также был выше, чем при 45°C.

На основе всего вышеизложенного, можно сделать вывод, что разные по интенсивности воздействия высокой температуры могут вызывать неодинаковые как в количественном, так и в качественном отношении изменения в теплоустойчивости растений.

Для дальнейшего исследования механизмов теплоустойчивости растений были выбраны температуры 33, 37 и 43°C.

#### **Развитие признаков окислительного стресса и активизация антиоксидантной системы в листьях пшеницы при высокотемпературных воздействиях разной интенсивности**

Как известно, действие высоких температур приводит к развитию окислительного стресса в клетках растений (Колупаев, Карпец, 2009; Mori, Schroeder, 2004; Sharma et al, 2012). Одним из показателей окислительного стресса является усиление генерации активных форм кислорода (АФК). В отсутствие стрессового воздействия АФК образуются в ходе нормального метаболизма, но при действии стрессоров их концентрация в клетках и тканях резко возрастает (Mori, Schroeder, 2004; Колупаев, Карпец, 2009; Sharma et al., 2012). Повышение их уровня в клетках растений играет двойственную роль (Gill, Tuteja, 2010; Suzuki et al., 2011): в высоких концентрациях АФК наносят вред (Scandalios, 2005; Halliwell, 2006), а при умеренном содержании в клетке они выполняют сигнальную функцию (Bhattacharjee, 2012). Избыточная генерация АФК приводит к перекисному окислению липидов (ПОЛ), одним из продуктов ПОЛ является малоновый диальдегид (МДА).

Результаты наших исследований показали, что температура 33°C приводит к генерации супероксидного радикала в листьях пшеницы через 6 часов от начала эксперимента, а в дальнейшем происходит его снижение. Генерация супероксидного радикала в листьях пшеницы при действии на них температуры 37°C происходила через 15 мин от начала воздействия, а затем, через час, она снижалась. При этом температура 43°C не вызывала накопление супероксидного радикала.

Гипертермия приводила к накоплению в листьях растений другой формы АФК - перекиси водорода. Было показано, что при температуре 33°C содержание перекиси водорода не изменялось. В первые 15 минут закаливания проростков при 37°C наблюдали увеличение содержания перекиси водорода примерно на 44% относительно контрольных растений, но через час этот показатель снижался. При температуре 43°C содержание  $H_2O_2$  становилось ниже в первые минуты опыта, через час повышалось до исходного уровня и далее снова снижалось.

Действие высоких неблагоприятных температур приводило к накоплению МДА в листьях проростков пшеницы. У растений, закаливаемых при температуре 33°C не наблюдали достоверного повышения содержания МДА. В то же время, при действии температуры 37°C достоверное повышение концентрации МДА в листьях проростков наблюдалось через сутки от начала эксперимента. Важно, что и через двое суток она была выше, чем у контрольных растений. Температура 43°C также как и 37°C индуцировала накопление МДА в листьях проростков. Однако в этом случае его содержание значительно выше, чем при действии температуры 37°C.

Чтобы предотвратить негативное воздействие АФК на клетки у растений активизируется антиоксидантная система (АС), важным компонентом которой является фермент супероксиддисмутаза (СОД), катализирующая дисмутацию супероксидного анион-радикала в перекись водорода (Бараненко, 2006).

В ходе исследования было выявлено, что активность СОД в их листьях проростков пшеницы при 33°C не изменяется. При 37°C активность СОД достоверно возрастает на вторые сутки опыта. В отличие от этого, при действии температуры 43°C активность СОД повышается уже в первые минуты и достигает максимума на третьи сутки.

Результаты, полученные в исследовании, показывают, что признаки окислительного стресса у проростков пшеницы наблюдались при действии всех исследуемых температур (33, 37 и 43°C), однако характер их проявления зависел от действующей на растения температуры. При 33°C в листьях пшеницы зафиксирована только кратковременная генерация супероксидного радикала. При температуре 37°C в начальный момент (15 мин) её действия отмечено усиление генерация супероксидного радикала и накопление перекиси водорода, а более продолжительное воздействие приводило к накоплению МДА. Действие температуры 43°C не вызывало генерацию АФК, а её более продолжительное воздействие (1 – 3 сут) вызывало многократное повышение уровня МДА. Эти данные могут свидетельствовать в пользу гипотезы о

важной роли этих молекул в формировании индуцированной теплом устойчивости растений. Принимая во внимание предположение о сигнальной роли АФК в клетках (Bhattacharjee, 2012), можно заключить, что накопление супероксидного радикала на фоне неактивной СОД при температурах 33 и 37°C и перекиси водорода при 37°C, вероятно, запускает каскад реакций, конечным итогом которого является повышение теплоустойчивости растений. Нами также отмечено повышение активности СОД и снижение содержания перекиси водорода при действии на растения температуры 43°C, вызывают повреждение растений.

**Динамика уровня транскриптов генов БТШ (*TaHSP70*, *TaHSP90*,  
*TaHSP16,9*, *TaHSP19*) в листьях пшеницы при высокотемпературных  
воздействиях разной интенсивности**

В настоящее время считается, что синтез шоковых белков необходим растениям для приобретения высокой теплоустойчивости и он является завершающим этапом клеточного ответа на высокотемпературные воздействия (Usman, 2014).

Нами было показано, действие температуры 33°C вызывало небольшое повышение содержания транскриптов гена *TaHSP90* уже через 15 минут от начала воздействия. Через 1 час был отмечен их максимальный уровень, а затем его снижение. При температуре 37°C изменения в содержание мРНК этого гена также происходили через 15 мин от начала эксперимента. Максимальный уровень транскриптов при 37°C наблюдали после часовой экспозиции проростков. При более продолжительном действии данной температуры содержание мРНК гена *TaHSP90* в листьях проростков снижалось, достигая через сутки исходных значений. Следует отметить, что при температуре 37°C максимальный уровень экспрессии гена был в 2 раза выше, чем при температуре 33°C. При температуре 43°C накопление транскриптов этого гена также происходило уже в первые минуты эксперимента. Максимум экспрессии гена *TaHSP90* в листьях проростков зафиксирован уже через 30 минут от начала эксперимента. Причем, он был приблизительно равен максимальному уровню транскриптов при температуре 37°C.

Динамика экспрессии генов, кодирующих БТШ с молекулярной массой 90, 70 и 16,9 (*TaHSP90*, *TaHSP70* и *TaHSP16,9*), при действии на растения температур 33, 37 и 43°C в целом была схожа. В частности, отмечено увеличение содержания транскриптов указанных генов уже в первые минуты теплового воздействия, а затем - постепенное их снижение. Характер накопления транскриптов гена *TaHSP70* в листьях

проростков при 33°C был аналогичен таковому при 37°C. В обоих случаях увеличение содержания мРНК этого гена наблюдали уже через 15 минут от начала теплового воздействия. Но после достижения максимального уровня через 1 час происходило его снижение. При температуре 43°C уровень транскриптов данного гена постепенно увеличивался уже с первых минут эксперимента, достигая максимума через 2 часа, а затем также снижался. При этом, экспрессия *TaHSP70* была многократно выше при 43°C, чем при 33 и 37°C.

Нами также отмечено различное влияние температур 33, 37 и 43°C на уровень транскриптов гена *TaHSP19*. В первые часы экспозиции проростков при 33°C в листьях регистрировали уменьшение содержания мРНК гена *TaHSP19*. Через сутки наблюдали увеличение уровня его экспрессии, а через трое суток – снижение до исходного значения. При действии температуры 37°C через 30 минут от начала опыта в листьях проростков пшеницы отмечен постепенный рост уровня экспрессии данного гена. Температура 43°C вызывала быстрое накопление транскриптов гена *TaHSP19* с максимумом уже через 30 мин от начала эксперимента. Транскрипционная активность этого гена была высокой на протяжении 4 часов теплового воздействия, а затем снижалась.

Температура 33°C индуцировала накопление транскриптов гена *TaHSP16,9* уже через 15 мин от начала эксперимента. Максимальное содержание мРНК *TaHSP16,9* в листьях отмечено после суточной экспозиции проростков в этих условиях. Закаливание растений пшеницы при 37°C также способствовало повышению транскриптов этого гена уже в первые минуты опыта. Максимальное содержание мРНК *TaHSP16,9* было зафиксировано уже через час после переноса растений из обычных условий в условия теплового закаливания (37°C). Следует отметить, что уровень экспрессии этого гена при действии температуры 37°C был значительно выше, чем при действии температуры 33°C. У растений, находившихся при температуре 43°C наблюдали значительное повышение содержания транскриптов *TaHSP16,9*, с максимумом через 2 часа от начала теплового воздействия. Интересно, что уровень экспрессии гена *TaHSP16,9* в листьях проростков при температуре 43°C в сотни раз превышал таковой, наблюдаемый при других тепловых воздействиях.

Таким образом, в ответ на действие высоких температур в клетках растений изменяется транскрипционная активность генов, кодирующих БТШ. Изменение транскрипционной активности генов *TaHSP90*, *TaHSP70*, *TaHSP19* и *TaHSP16,9* в начальный период действия температур 33, 37 и 43°C происходило на фоне повышения

теплоустойчивости клеток листьев. Следует отметить, что накопление мРНК генов *TaHSP19* и *TaHSP16,9* может быть не только в начальный период действия этих температур, но и при их продолжительном воздействии. Это может свидетельствовать об участии *TaHSP19* и *TaHSP16,9* в ответной реакции растений на высокие температуры, как в начальный момент их действия, так и при более продолжительных воздействиях.

**Динамика уровня транскриптов генов системы контроля качества белка  
(*TaBiP* и *TaBAXI-1*) в листьях пшеницы при высокотемпературных воздействиях  
разной интенсивности**

Действие на растения высоких температур может приводить к накоплению в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) и цитозоле клеток большого количества неправильно упакованных белков, что вызывает развитие стресса ЭР (ЭР-стресса) и даже гибель клеток (Deng et al., 2013; Wan, Jiang, 2016). Поэтому усиление контроля за качеством упаковки белка является важной составляющей формирования теплоустойчивости растений. В ответ на ЭР-стресс в растительной клетке активируется защитный механизм – UPR (unfolded protein response) (Li, 2012). Основным регулятором UPR выступает белок BiP (binding protein). [Iwata, Koizumi, 2012; Kørner et al., 2015]. Кроме того, активация защитного механизма UPR может индуцировать экспрессию гена *BAXI-1* (Watanade, Lam, 2008). Белок, кодируемый этим геном локализован в ЭР и участвует в защите клетки от ЭР-стресса (Watanade, Lam, 2008).

В экспериментах обнаружено изменение транскрипционной активности гена *BiP*. В частности, при действии на проростки температуры 33°C в клетках листьев уже через 15 мин зафиксировано снижение содержания мРНК этого гена. Низкий уровень экспрессии *BiP* был отмечен вплоть до окончания закаливания (3 сут) растений при данной температуре. Экспонирование проростков при 37°C, напротив, вызывало многократное повышение содержания транскриптов этого гена уже через 15 мин с максимальным уровнем после 30-минутного прогрева. При более продолжительном воздействии температуры 37°C отмечено снижение уровня экспрессии *BiP*, а затем (через 1 сут) его повторное повышение. Под влияние температуры 43°C в листьях проростков уже через 15 мин зафиксировано увеличение содержания транскриптов этого гена, которое через 1 ч сменялось его резким падением. Отметим также, что при температуре 37°C содержание мРНК гена *BiP* было значительно выше, чем при 43°C.

Воздействие высоких температур на проростки пшеницы приводило к значительному увеличению содержания транскриптов *TaBI-1* в клетках листьев. При температурах 33 и 37°C уже через 15 мин происходило повышение содержания транскриптов гена *TaBI-1* до максимального уровня (примерно в 3 раза), который в дальнейшем сохранялся практически неизменным в течение всего периода теплового воздействия. Под влиянием температуры 43°C также через 15 мин было зафиксировано трехкратное повышение уровня транскриптов гена *TaBI-1*. В последующие 2 ч высокотемпературного воздействия содержание транскриптов этого гена увеличивалось почти в 25 раз, затем оно резко снижалось относительно максимума, но даже спустя 6 ч было в пять раз выше исходного уровня.

Таким образом, все исследуемые температуры вызывали изменения в экспрессии генов *TaBIP* и *TaBI-1*. Следует отметить, что максимальный уровень экспрессии *TaBIP* наблюдался при действии температуры 37°C, при этой температуре также отмечен максимальный прирост теплоустойчивости. Это может быть свидетельством того, что клетки растения успешно справляются с ЭР-стрессом за счет работы UPR. При температуре 43°C экспрессия *TaBIP* было ниже, чем при 37°C, однако многократно повышает экспрессию *TaBI-1*. Можно предположить, что эффективность UPR при температуре 43°C снижается, накапливается большое количество неправильно упакованных белков, что приводит к гибели клетки. Как известно, *BI-1* может участвовать в супрессии программируемой клеточной гибели (Chea et al., 2003; Matsumura et al., 2003; Kawai-Yamada et al., 2004), что и может объяснить увеличение содержания транскриптов этого гена на фоне относительно невысокой экспрессии *TaBIP*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что высокотемпературные воздействия разной интенсивности могут оказывать разнонаправленные эффекты как в отношении устойчивости клеток к прогреву, так и ряда молекулярно-биохимических показателей.

Были выявлены некоторые закономерности роста растений при действии высоких температур разной интенсивности. Установлено, что прирост высоты проростков пшеницы и их 1-ого листа замедляется при действии высоких температур (в диапазоне 33-37°C), при этом степень торможения его роста не зависит от интенсивности температурного воздействия в этом диапазоне. Прирост 2-го листа

пшеница также снижается относительно контрольных растений, но зависит от интенсивности температурного воздействия: с увеличением температуры прирост 2-ого листа пшеницы снижается.

Показано, что характер динамики теплоустойчивости растений изменяется в зависимости от интенсивности температурного воздействия. В диапазоне температур 33 – 39°C теплоустойчивость постепенно возрастает, достигает максимума и в дальнейшем не изменяется. Температуры 41 – 45°C первоначально приводят к повышению теплоустойчивости, но затем теплоустойчивость резко снижается. Следовательно, температуры 33 – 39°C можно отнести к закаливающим, а 41 – 45°C к повреждающим.

В ходе исследования развития окислительного стресса было показано, что его признаки проявляются при действии всех исследуемых температур (33, 37 и 43°C). Однако генерация АФК была выявлена только при действии закаливающих температур (33 и 37°C), при действии повреждающей температуры (43°C), наоборот, зафиксировано снижение содержания перекиси водорода. Кроме того, действие температуры 43°C приводит к активации фермента СОД. В целом эти данные свидетельствуют в пользу гипотезы об участии АФК в переносе сигнала о стрессовом воздействии, в том числе и о тепловом воздействии.

Установлено, что действие высоких температур влияет на экспрессию генов *TaHSP90*, *TaHSP70*, *TaHSP19* и *TaHSP16,9*. На основе полученных результатов об экспрессии этих генов можно предположить, что первичный ответ растений на действие исследуемых температур (33, 37 и 43°C), проявляющийся в повышении теплоустойчивости листьев пшеницы, связан с увеличением транскрипционной активности исследуемых генов и, соответственно, с усилением синтеза кодируемых ими белков. Тем не менее их накопления, очевидно, недостаточно для сохранения жизнедеятельности растений при пролонгированном действии повреждающей температуры (43°C), о чем свидетельствует снижение теплоустойчивости проростков уже после часового прогрева растений при 43°C, а затем и их гибель.

В своих опытах мы также наблюдали изменения экспрессии генов (*TaBIP* и *TaBI-1*) белки, которых участвуют в контроле качества белка. На основе полученных данных можно предположить, что индукция экспрессии гена *TaBIP* у растений пшеницы при действии температуры 37°C является одним из этапов активации защитного механизма UPR, предотвращающего развитие ЭР-стресса. Следует отметить, что многократное увеличение экспрессии *BI-1* при более высокой

температуре (43°C) может также являться частью другого защитного механизма, который направлен на предотвращение развития гибели клетки.

## ВЫВОДЫ

1) Выявлено разнокачественное влияние высоких неблагоприятных температур 33, 35 37, 39, 41, 43 и 45°C на устойчивость растений пшеницы. Температуры 33-39°C индуцируют стабильное повышение теплоустойчивости клеток, в то время как температуры 41 - 45°C сначала вызывает рост устойчивости, а затем ее снижение. Указанные температуры оказывают негативный эффект на ростовые показатели растений и оводненность их листьев. Причем с увеличением действующих на растения температур этот эффект только усиливается.

2) Закаливающие температуры (33 и 37°C) индуцируют генерацию АФК (при 33°C генерируется супероксид анион-радикал, при 37°C – супероксид анион-радикал и перекись водорода). Повреждающая температура (43°C) не вызывает подобного эффекта. С увеличением интенсивности прогрева возрастает уровень содержания МДА, что свидетельствует об усилении окислительного стресса в клетках растений с ростом температуры.

3) С увеличением действующих на растения температур активность СОД в тканях листьев увеличивается, что указывает на активацию механизмов устранения избытка АФК в условиях теплового стресса разной интенсивности.

4) Показано вовлечение генов *TaHSP90*, *TaHSP70*, *TaHSP19*, *TaHSP16,9* в повышение устойчивости растений при действии на них разных по значению высоких температур. Уровень экспрессии этих генов зависит от интенсивности и продолжительности теплового воздействия.

5) Гипертермия вызывает изменения в уровне транскриптов генов, участвующих в защите клеток от стресса эндоплазматического ретикулума - *TaBIP* и *TaBI-1*. Изменения в уровне транскриптов *TaBIP* и *TaBI-1* наблюдаются уже в первые часы действия неблагоприятных высоких температур, что совпадает по времени с началом роста теплоустойчивости проростков пшеницы. Показано, что содержание мРНК этих генов в клетках листьев зависит от интенсивности теплового воздействия.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института биологии Карельского научного центра Российской академии наук с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования ИБ КарНЦ



РАН «Комплексные фундаментальные и прикладные исследования особенностей функционирования живых систем в условиях Севера» (ЦКП НО ИБ КарНЦ РАН).  
Научный руководитель: доктор биологических наук, член-корреспондент РАН Титов Александр Федорович.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

#### ***Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ***

- 1) **Нилова И. А.**, Титов А. Ф. Динамика теплоустойчивости проростков пшеницы в зависимости от интенсивности высокотемпературного воздействия // Труды КарНЦ РАН, сер. Экспериментальная биология. 2014. № 5. С. 214 – 217
- 2) **Нилова И. А.**, Топчиева Л. В., А. Ф. Титов. Экспрессия генов БТШ пшеницы при действии высоких температур // Труды КарНЦ РАН, сер. Экспериментальная биология. 2015. № 11. С. DOI: 10.17076/eb240
- 3) Топчиева Л. В., Таланова В. В., Титов А. Ф., **Нилова И. А.**, Репкина Н. С., Венжик Ю. В.. Влияние низких и высоких закаливающих и повреждающих температур на уровень транскриптов генов VI-1 у пшеницы // Труды КарНЦ РАН, сер. Экспериментальная биология. 2015. № 11. С. 55 – 65. DOI: 10.17076/eb240.
- 4) Топчиева Л. В., **Нилова И. А.**, Титов А. Ф. Динамика содержания транскриптов генов проапоптотических белков в листьях растений пшеницы при действии высоких неблагоприятных температур // Доклады Академии наук. 2017. Т. 472, № 1. С. 102 – 105. DOI: 10.7868/S086956521701025X.

#### ***Публикации в других изданиях***

- 5) **Нилова И. А.**, Топчиева Л. В., Репкина Н. С. Влияние низкой и высокой закаливающей температур на содержание супероксид радикала в листьях проростков пшеницы // Ботаника и природное многообразие растительного мира: Сб. тез. II Всероссийской научной интернет-конференции с международным участием (Казань, 16 декабря 2014 г.). Сервис виртуальных конференций RaX Grid, 2014. С. 89 – 90.
- 6) **Нилова И. А.**, Репкина Н. С. Влияние высоких температур на некоторые физиологические биохимические показатели растений озимой пшеницы // Биология – наука XXI века: Сб. тез. 19-ой международной Пущинской школа-конференции молодых ученых (Пущино, 20 – 24 апреля 2015 г.). Пущино, 2015. С. 400 – 401.

- 7) **Nilova I. A.**, Repkina N.S., Titov A.F., Talanova V.V. Comparative study of moderate cold and heat stress effect on wheat seedlings // Plant abiotic stress tolerance III: Abstracts of International conference (Vienna, 29 of June – 01 of July 2015). Vienna, Austria, 2015. С. 75.
- 8) **Нилова И. А.**, Топчиева Л. В. Экспрессия генов БТШ при действии высоких температур на проростки пшеницы // Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий: Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием и школы для молодых ученых (21 – 26 сентября 2015 г.). Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2015. С. 382.
- 9) Топчиева Л. В., Таланова В. В., Титов А. Ф., Репкина Н. С., **Нилова И. А.**, Венжик Ю. В. Уровень транскриптов генов про- и антиапоптотических белков при действии на растения неблагоприятных температур // Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий: Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием и школы для молодых ученых (21 – 26 сентября 2015 г.). Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2015. С. 533.
- 10) Фенько А. А., Репкина Н. С., **Нилова И. А.**, Таланова В. В. Влияние низких температур на содержание низкомолекулярных антиоксидантов у различающихся по холодоустойчивости растений // Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий: Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием и школы для молодых ученых (21 – 26 сентября 2015 г.). Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2015. С. 554.
- 11) **Нилова И. А.**, Титов А. Ф., Топчиева Л. В. Влияние высоких температур на экспрессию генов белков теплового шока у растений пшеницы // Тезисы докладов III (XI) международной ботанической конференции молодых ученых в Санкт-Петербурге (4 – 9 октября 2015 г.) СПб: БИН РАН, 2015. С. 79.
- 12) **Nilova I. A.**, Topchieva L. V., Titov A.F. The influence of high temperatures of different intensity on gene expression is responsible for programmed cell death development in wheat plants // Proceedings of Fourth International Symposium on Plant Signaling and Behavior (St. Petersburg 19 – 24 June 2016). St. Petersburg, Russia, 2016. P. 113
- 13) **Нилова И. А.**, Топчиева Л. В., Титов А. Ф. Изменение содержания транскриптов генов TaHSP70, TaHSP90 и BI-1 в листьях проростков пшеницы при действии высоких температур // Годичное собрание общества физиологов растений России. Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма. 21–24 июня 2016, С.-Петербург, Россия / Медведев С.С. Изд-во Санкт-Петербургского государственного университета, 2016. – 245 с.