

## ГЕНЫ ХОЛОДОВОГО ОТВЕТА *COR/LEA* УЧАСТВУЮТ В РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ НА ДЕЙСТВИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

© 2013 г. В. В. Таланова, член-корреспондент РАН А. Ф. Титов,  
Н. С. Репкина, Л. В. Топчиева

Поступило 15.10.2012 г.

DOI: 10.7868/S0869565213020308

В природных условиях растения довольно часто подвергаются действию не одного, а двух и более стресс-факторов (например, высокой температуры и дефицита воды, неблагоприятной температуры и засоления или тяжелых металлов). Однако механизмы комбинированного (одновременного или последовательного) действия разных стресс-факторов на растения изучены пока очень слабо. Известно, что в адаптации растений к действию низких температур важную роль играют гены *COR/LEA* (cold responsive/ late embryogenesis abundant) [1, 2], которые кодируют *COR/LEA*-белки, участвующие не только в повышении морозоустойчивости, но и защите клеток от обезвоживания [3]. Более того, усиление экспрессии многих *LEA*-генов и синтеза кодируемых ими белков происходит также в условиях действия на растения засухи [4] и засоления [5]. В то же время сведения относительно возможного участия *COR/LEA*-генов в ответных реакциях растений на действие тяжелых металлов отсутствуют. Как известно, в регуляции экспрессии многих *COR*-генов участвует фитогормон абсцизовая кислота (АБК) [2]. В частности, у растений пшеницы обнаружены АБК-зависимые пути трансдукции низкотемпературного сигнала и регуляции *COR*-генов, в том числе *WRAB15* и *WRAB18* [2]. Учитывая это, нами изучено изменение уровня экспрессии генов *WRAB15* и *WRAB18* при действии на растения пшеницы низкой положительной (закаливающей) температуры и одного из наиболее токсичных тяжелых металлов — кадмия, а также при их совместном действии.

В работе впервые показано существование положительной корреляции между уровнем экспрессии генов холодного ответа *WRAB15* и *WRAB18* в клетках листьев проростков пшеницы и их устойчивостью к действию отдельно низкой

температуры, и кадмия, и их одновременному действию.

Эксперименты проводили с проростками озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39, выращенными в рулонах фильтровальной бумаги на питательном растворе Кнопа с добавлением микроэлементов (рН 6.2) в камере искусственного климата при температуре воздуха 22°C, его относительной влажности 60–70%, освещенности 10 клк и фотопериоде 14 ч. По достижении недельного возраста проростки в течение 7 сут подвергали воздействию температуры 4°C или сульфата кадмия (100 мкМ), а также их совместному действию, сохраняя прочие условия неизменными.

О морозоустойчивости проростков судили по температуре, вызывающей гибель 50% палисадных клеток листа ( $LT_{50}$ ) после 5-минутного тестирующего промораживания в термостате ТЖР-02/-20 (“Интерм”, Россия) [6]. При этом жизнеспособность клеток оценивали с помощью светового микроскопа Микмед-2 (“ЛОМО”, Россия) по деструкции хлоропластов и коагуляции цитоплазмы.

Для выделения РНК навеску листьев пшеницы растирали в жидком азоте. Тотальную РНК выделяли с помощью набора YellowSolve (“Силекс”, Россия). кДНК синтезировали, используя набор для обратной транскрипции с M-MLV обратной транскриптазой и случайными (random) гексапраймерами (“Силекс”). Количество и качество кДНК проверяли спектрофотометрически на приборе SmartSpec Plus (“Bio-Rad”, США). Уровень транскриптов генов анализировали с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. В качестве флуорофора для детекции продуктов применяли интеркалирующий краситель SYBR Green (“Синтол”, Россия). Амплификацию проводили в приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 (“Bio-Rad”), используя набор для проведения ПЦР РВ (“Синтол”). Для ПЦР в режиме реального времени применяли праймеры (“Синтол”), представ-

**Таблица 1.** Праймеры для проведения ПЦР в режиме реального времени

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность праймера 5'... 3'	Номер доступа в базе данных NCBI
<i>WRAB15</i>	Прямой	GAAGGAACCGCAACGCCGACGCC	AB115913
<i>WRAB18</i>	Обратный	CTTACGACAGATACAAGATACAC	AB115914.1
	Прямой	ATTTGCTTCCTTTACTCGTTTGG	
<i>Actin</i>	Обратный	TTTTTTGTCCTCGTTATCCATTT	AB181991
	Прямой	GGGACCTCACGGATAATCTAATG	
	Обратный	AACCTCCACTGAGAACAACATTAC	

**Таблица 2.** Динамика устойчивости к промораживанию клеток листа проростков пшеницы под влиянием температуры 4°C, кадмия и при их совместном действии

Вариант	Устойчивость клеток листа к 5-минутному промораживанию (ЛТ <sub>50</sub> ), °C							
	экспозиция, ч							
	0	0.5	1	5	24	48	72	168
4°C	-5.8 ± 0.1	-6.5 ± 0.1	-6.5 ± 0.1	-7.0 ± 0.1	-7.5 ± 0.1	-8.5 ± 0.1	-8.5 ± 0.1	-8.7 ± 0.1
Cd	-5.8 ± 0.1	—	-6.2 ± 0.1	-6.2 ± 0.1	-6.2 ± 0.1	—	-5.5 ± 0.1	—
4°C + Cd	-5.8 ± 0.1	-5.8 ± 0.1	-6.2 ± 0.1	-6.6 ± 0.1	-6.4 ± 0.1	-6.4 ± 0.1	-5.9 ± 0.1	-5.7 ± 0.1

ленные в табл. 1. В качестве референтного гена использовали актин. На рисунках приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

Исследование показало, что уже через 0.5–5 ч от начала действия температуры 4°C устойчивость листьев проростков пшеницы к промораживанию достоверно возрастала, а на вторые сутки она достигала своего максимума и в дальнейшем практически не менялась (табл. 2). Под влиянием кадмия также происходило быстрое, но меньшее, увеличение устойчивости листьев к промораживанию, однако при более длительном (3 сут и более) воздействии отмечено ее снижение к исходному уровню. Совместное действие низкой температуры и кадмия в течение 3 сут также приводило к повышению холодоустойчивости, хотя ее прирост по сравнению с исходным уровнем был несколько ниже, чем при действии только холода.

В начальный период действия (0.5–5 ч) температуры 4°C уровень экспрессии генов *WRAB15* и *WRAB18* в листьях проростков пшеницы не изменялся (рис. 1, 2), но через 1 сут происходило резкое его возрастание (примерно в 10 раз), сохраняющееся и при 2–3-суточном действии холода. В дальнейшем (7 сут) отмечено некоторое снижение уровня экспрессии генов *WRAB15* и *WRAB18*, хотя и в этом случае он значительно превышал исходные значения.

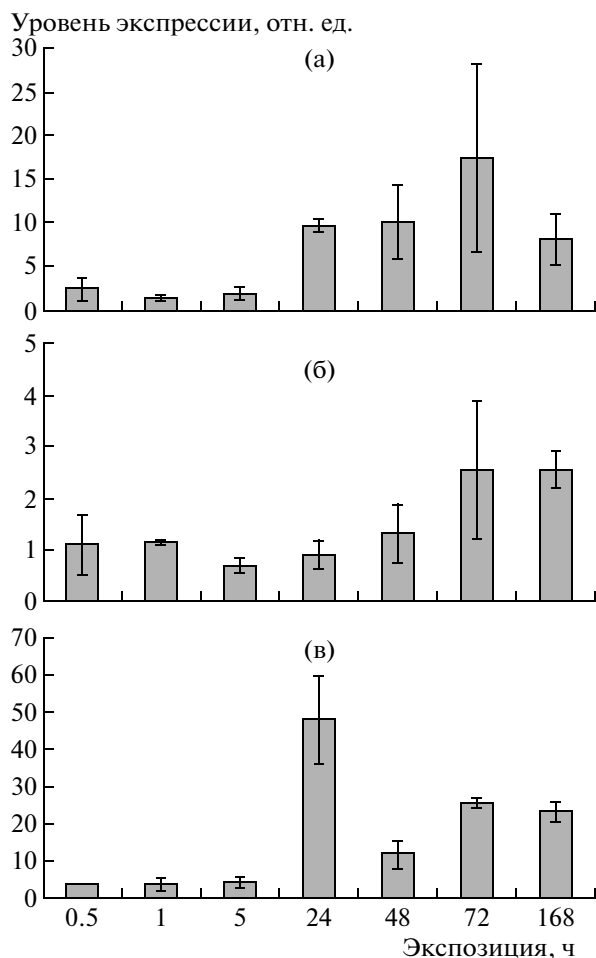
Сходная динамика изменения уровня экспрессии АБК-зависимых генов холодного ответа

*WRAB15* и *WRAB18* при тех же температурных условиях (4°C) отмечена и у других сортов пшеницы – Мироновская 808 [2] и Chihoku [7]. В отличие от этого у других сортов озимой пшеницы (97003 и 97014) уровень накопления транскриптов генов *WRAB15* и *WRAB18* в ответ на действие температуры 5/2°C в течение 2 сут повышался лишь через 3 ч от его начала, а затем возвращался к исходным значениям, в то время как устойчивость продолжала возрастать [8].

Воздействие кадмия на проростки в течение первых суток практически не сказывалось на экспрессии гена *WRAB15* в листьях, но при увеличении экспозиции (2–7 сут) происходило усиление накопления транскриптов этого гена (рис. 1). В случае кратковременного воздействия (1 ч) кадмия на проростки изменений в экспрессии другого гена – *WRAB18*, так же как и при действии холода, не наблюдалось, хотя в дальнейшем (5 ч) она заметно усиливалась и сохранялась на повышенном уровне в течение всего периода воздействия металла (рис. 2).

Совместное действие кадмия и низкой температуры приводило к значительному повышению уровня экспрессии генов *WRAB15* и *WRAB18*, который сохранялся в течение всего эксперимента.

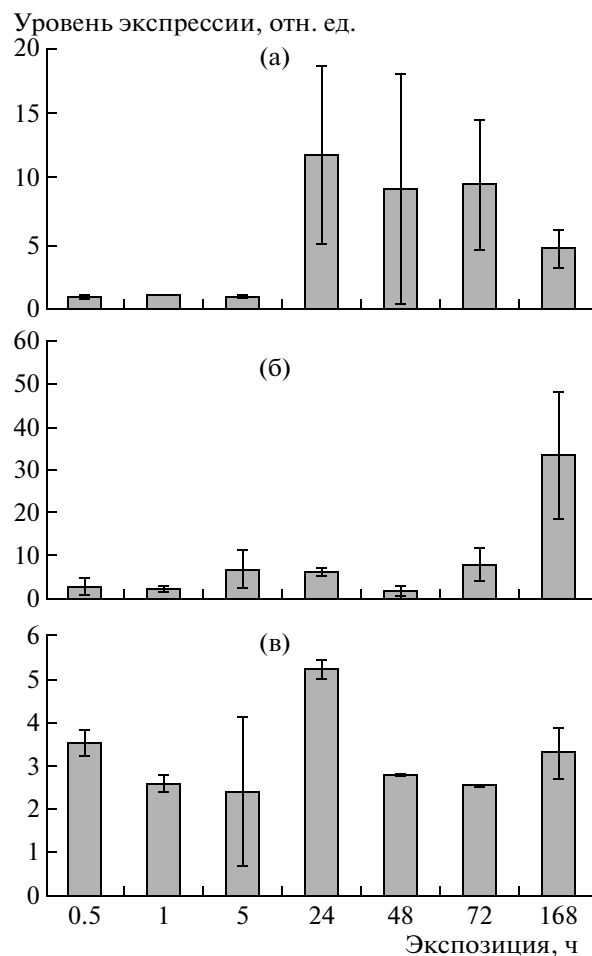
Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что уровень экспрессии генов *WRAB15* и *WRAB18* значительно возрастает не только под влиянием низкой закалывающей температуры, но и кадмия, а также при совместном действии этих двух стресс-факторов. Учитыв-



**Рис. 1.** Динамика экспрессии гена *WRAB15* в листьях проростков пшеницы при температуре 4°C (а), действии 100 мкМ кадмия (б) и совместном действии температуры 4°C и кадмия (в). Здесь и на рис. 2: уровень экспрессии генов при температуре 22°C принят за единицу.

вая, что кодируемые этими генами COR/LEA-белки защищают клеточные структуры от обезвоживания и выполняют функции молекулярных шаперонов [3], логично предполагать, что отмеченное нами усиление экспрессии генов является частью адаптивного ответа растений на действие стресс-факторов разной природы.

Важно также отметить, что повышение уровня экспрессии генов *WRAB15* и *WRAB18* в листьях пшеницы происходило в тот период действия низкой температуры, кадмия или при их совместном действии, когда уровень холодоустойчивости растений существенно увеличивался. Способность растений реагировать в определенных случаях на действие одного стресс-фактора повышением устойчивости к другим стресс-факторам (явление “кросс-адаптации”) подтверждается в последние годы все большим количеством данных [9–12]. Например, ранее нами было установ-



**Рис. 2.** Динамика экспрессии гена *WRAB18* в листьях проростков пшеницы при температуре 4°C (а), действии 100 мкМ кадмия (б) и совместном действии температуры 4°C и кадмия (в).

лено, что действие на растения одного из тяжелых металлов (свинца) приводит к повышению их устойчивости к низкой температуре [13]. Такого рода экспериментальные данные подтверждают наличие и функционирование в растениях общих систем устойчивости, обеспечивающих неспецифическую (общую) устойчивость к двум или нескольким стресс-факторам разной природы [14].

Таким образом, полученные в настоящей работе данные об усилении экспрессии генов *WRAB15* и *WRAB18* в листьях пшеницы под влиянием низкой закалывающей температуры и кадмия, а также при их совместном действии позволяют говорить об участии этих генов в защитно-приспособительных реакциях растений на действие стресс-факторов разной природы.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 10–04–00650а) и ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” (грант № 14.132.21.1321).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Thomashow M.F.* // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1999. V. 50. P. 571–599.
2. *Kobayashi F., Takumi S., Nakata M., et al.* // Physiol. Plantarum. 2004. V. 120. № 4. P. 585–594.
3. *Winfield M.O., Chungui L., Wilson I.D., et al.* // Plant Biotech. J. 2010. V. 8. № 7. P. 749–771.
4. *Maruyama K., Todaka D., Mizol J., et al.* // DNA Res. 2012. V. 19. № 2. P. 37–49.
5. *Wang W., Vinocur B., Altman A.* // Planta. 2003. V. 218. № 2. P. 1–14.
6. *Дроздов С.Н., Курец В.К.* Некоторые аспекты экологической физиологии растений. Петрозаводск: ПетрГУ, 2003. 172 с.
7. *Kobayashi F., Takumi S., Nakamura C.* // J. Plant Physiol. 2008. V. 165. P. 224–232.
8. *Sun X., Hu C., Tan Q., et al.* // Ann. Bot. 2009. V. 104. P. 345–356.
9. *Banti V., Loreti E., Novi G., et al.* // Plant. and Cell Environ. 2008. V. 31. № 7. P. 1029–1037.
10. *Iqbal M., Ashraf M.* // J. Agr. Crop Sci. 2010. V. 196. № 6. P. 440–454.
11. *Zhong-Guang L., Gong M.* // J. Plant Biol. 2011. V. 54. № 6. P. 358–364.
12. *Радюкина Н.Л., Тоайма В.И.М., Зарипова Н.Р.* // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 1. С. 80–88.
13. *Титов А.Ф., Таланова В.В.* Устойчивость растений и фитогормоны. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2009. 206 с.
14. *Кузнецов В.В., Хыдыров Б.Т., Рошупкин Б.В., Борисова Н.Н.* // Физиология растений. 1990. Т. 37. № 6. С. 987–996.