

УДК 581.1

**ВЛИЯНИЕ СТРЕСС-ФАКТОРОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА
ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА СВF У РАСТЕНИЙ ОГУРЦА**© 2008 г. В. В. Таланова, член-корреспондент РАН А. Ф. Титов,
Л. В. Топчиева, И. Е. Мальшева

Поступило 02.06.2008 г.

Реакция растений на действие различных по своей природе стресс-факторов связана с целым комплексом однотипных изменений в их клетках, включая дерепрессию определенных генов [1, 2]. Например, экспрессия генов семейства транскрипционных факторов СВF/DREB (C-repeated binding factor/dehydration response elements binding protein) индуцируется у растений арабидопсиса под влиянием обезвоживания [3, 4], низких температур [3, 4] и кадмия [5]. В свою очередь транскрипционные факторы СВF активируют экспрессию генов ряда стрессовых белков и таким образом могут участвовать в повышении устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды [6, 7]. Учитывая это, мы изучили экспрессию гена транскрипционного фактора СВF у растений огурца при действии низкой и высокой закалывающих температур, хлорида натрия, а также гормона стресса – абсцизовой кислоты (АБК).

Опыты проводили с проростками огурца (*Cucumis sativus* L.) сорта Зозуля, выращенными в течение 7 сут в рулонах фильтровальной бумаги на питательном растворе Кнопа с добавлением микроэлементов при температуре воздуха 25°C, его относительной влажности 60–70%, освещенности 10 клк, фотопериоде 14 ч. Проростки подвергали воздействию низкой (10°C) или высокой (38°C) закалывающей температуры и хлорида натрия (120 мМ). Часть проростков за 1 сут до их воздействия обрабатывали экзогенной АБК (0.1 мМ). Прочие условия эксперимента сохраняли неизменными.

Холодо- и теплоустойчивость проростков оценивали по температуре (LT_{50}), вызывающей гибель 50% палисадных клеток листа после их тестирующего промораживания в термоэлектрическом термостате ТЖР-02/-20 (“Интерм”) или прогрева в водном термостате [8]. Устойчивость растений к засолению оценивали по величине осмотического давления раствора NaCl (LOD_{50}),

вызывающего гибель 50% палисадных клеток листа [9]. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью светового микроскопа МБИ-15 (“ЛОМО”) по деструкции хлоропластов и коагуляции цитоплазмы.

Для выделения РНК навеску листьев гомогенизировали в жидком азоте с добавлением буфера для экстракции (“Bio-Rad”). Тотальную РНК выделяли с помощью набора “AquaPure RNA Isolation Kit” (“Bio-Rad”) и обрабатывали ДНКазой (“Силекс”). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в режиме реального времени проводили на приборе iQ5 (“Bio-Rad”), используя набор “iScript One-Step RT-PCR Kit”, в котором ПЦР совмещена с обратной транскрипцией. Амплификацию фрагмента СВF1 размером 104 п.н. проводили с помощью прямого (5'-TGTTTGGGATGCCGACTTTGT-TG-3') и обратного (5'-GTCACCATCTCSTTCGSCGTCAT-3') праймеров. Условия ПЦР: синтез кДНК 10 мин при 50°C, инактивация обратной транскриптазы 5 мин при 95°C; 45 циклов ПЦР: денатурация при 95°C 10 с, отжиг праймеров и элонгация цепи при 55°C 30 с. Специфичность продукта проверяли плавлением амплифицированных фрагментов ДНК.

На рис. 1 и 2 приведены средние арифметические значения из двух независимых опытов и их стандартные ошибки.

Установлено, что действие температуры 10°C в течение 1 сут вызывает повышение холодоустойчивости клеток листьев проростков огурца и уровня экспрессии в них гена транскрипционного фактора СВF1 (табл. 1). Предобработка проростков АБК приводила к увеличению холодоустойчивости проростков как в условиях обычной температуры, так и при холодом закаливании. Отметим, что экзогенная АБК стимулировала экспрессию гена СВF1 только при температуре 25°C, а при холодом закаливании в ее присутствии дополнительного увеличения уровня экспрессии гена по сравнению с вариантом “холодовое закалывание без АБК” не происходило.

В условиях высокой (38°C) закалывающей температуры увеличение теплоустойчивости клеток

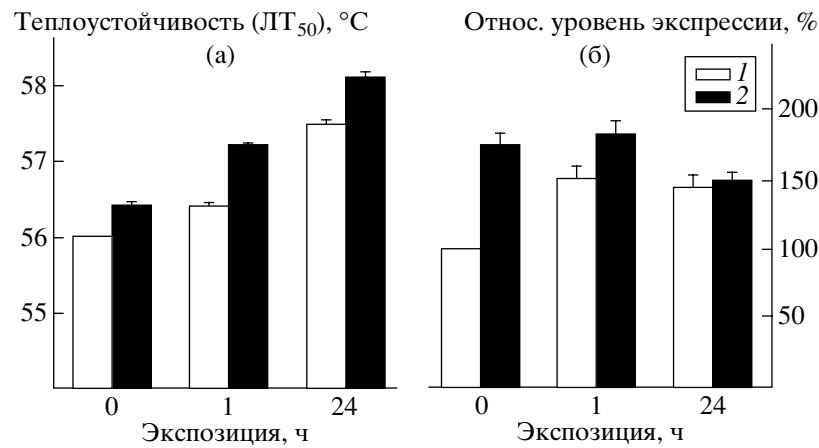


Рис. 1. Влияние температуры 38°C и АБК (0.1 мМ) на теплоустойчивость (а) и экспрессию гена (б) транскрипционного фактора CBF1 в листьях проростков огурца. 1 – 38°C, 2 – 38°C + АБК.

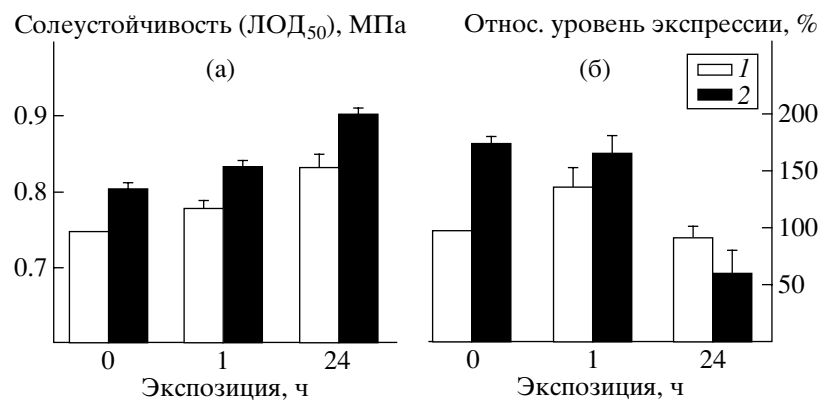


Рис. 2. Влияние NaCl (120 мМ) и АБК (0.1 мМ) на солеустойчивость (а) и экспрессию гена (б) транскрипционного фактора CBF1 у проростков огурца. 1 – NaCl, 2 – NaCl + АБК.

листа огурца как при непродолжительном (1 ч), так и более длительном (24 ч) действии также сопровождалось повышением уровня экспрессии гена транскрипционного фактора CBF1 (рис. 1). Предобработка проростков АБК способствовала дополнительному повышению теплоустойчивости,

но практически не сказывалась на экспрессии данного гена при тепловом закаливании.

Таблица 1. Влияние температуры 10°C и АБК (0.1 мМ) на холодоустойчивость и экспрессию гена транскрипционного фактора CBF1 в листьях проростков огурца

Вариант	Прирост холодоустойчивости (ΔLT_{50}), °C*	Относительный уровень экспрессии гена CBF1, %**
25°C	–	100
25°C + АБК, 1 сут	0.5 ± 0.1	175 ± 8
10°C, 1 сут	0.4 ± 0.1	175 ± 5
10°C + АБК, 1 сут	0.9 ± 0.1	180 ± 5

* Разница в устойчивости по сравнению с вариантом 25°C.
** За 100% принят уровень экспрессии гена в варианте 25°C.

Аналогично влиянию высокой закалывающей температуры непродолжительное (1 ч) воздействие на проростки огурца NaCl в неповреждающей концентрации вызывало усиление экспрессии гена транскрипционного фактора CBF1, при этом возрастала и их солеустойчивость (рис. 2). Однако более длительное (24 ч) воздействие NaCl приводило к снижению уровня экспрессии этого гена. Экзогенная АБК способствовала увеличению солеустойчивости проростков, но практически не оказывала влияния на экспрессию данного гена в условиях засоления.

Таким образом, в наших экспериментах обнаружена активация экспрессии гена транскрипционного фактора CBF1 под влиянием непродолжительного действия низкой и высокой закалывающих температур, а также хлорида натрия. Известно, что транскрипционный фактор CBF1 способен усиливать экспрессию *Cor*-генов (cold

regulated genes) и синтез соответствующих белков холодового шока, участвующих в низкотемпературной адаптации, у растений арабидопсиса и пшеницы [3, 4]. Причем быстрою активацию его экспрессии у арабидопсиса наблюдали не только под влиянием низкой температуры, но и обезвоживания, а также засоления [10, 11]. Учитывая это, можно предположить, что наблюдаемое нами возрастание холодо-, тепло- и солеустойчивостей растений огурца при действии соответствующих стресс-факторов было связано с повышением уровня транскриптов гена CBF1. По-видимому, усиление экспрессии этого гена является неспецифической адаптивной реакцией растений огурца на действие различных по своей природе стресс-факторов.

Как известно, активность многих генов и синтез стрессовых белков регулируются гормоном АБК [12, 13]. В то же время считается, что семейство транскрипционных факторов CBF/DREB включено в АБК-независимые пути регуляции экспрессии генов [3, 14]. Однако обнаружено, что экзогенная АБК способна индуцировать экспрессию генов CBF, хотя и в меньшей степени, чем, например, низкая температура [7]. В проведенных нами экспериментах АБК индуцировала экспрессию гена транскрипционного фактора CBF1 при обычных условиях, но слабо влияла на нее при совместном действии с тем или иным из изученных нами стресс-факторов. Тем не менее обработка экзогенным гормоном приводила к повышению холодо-, тепло- и солеустойчивостей проростков огурца как при обычных, так и в стрессовых условиях. По-видимому, один из возможных механизмов неспецифического действия АБК в отношении устойчивости растений при обычных условиях связан с ее способностью активизировать экспрессию данного гена, тогда как в условиях стресса ее влияние реализуется прежде всего через другие механизмы, не связанные с транскрипционным уровнем.

В целом, обнаруженное нами увеличение уровня экспрессии гена транскрипционного фактора CBF1 под влиянием непродолжительного действия низкой и высокой закалывающих температур, а также хлорида натрия позволяет предполагать не только его участие, но и важную роль в процессах адаптации и повышения устойчивости растений огурца к указанным стресс-факторам.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 06-04-49107а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс. М.: Наука, 2007. 54 с.
2. Bhatnagar-Mathur H., Vades V., Sharma K.K. // Plant Cell Rept. 2008. V. 27. P. 411–424.
3. Thomashow M.F. // Annu. Rev. Plant Mol. Biol. 1999. V. 50. P. 571–599.
4. Kume S., Kobayashi F., Ishibashi M. et al. // Genes Genet. Syst. 2005. V. 80. P. 185–197.
5. Suzuki N., Koizumi N., Sano H. // Plant Cell Environ. 2001. V. 24. P. 1177–1188.
6. Zarka D.G., Vogel J.T., Cook D., Thomashow M.F. // Plant Physiol. 2003. V. 133. P. 910–918.
7. Knight H., Zarka D.G., Okamoto H. et al. // Plant Physiol. 2004. V. 135. P. 1710–1717.
8. Дроздов С.Н., Курец В.К. Некоторые аспекты экологической физиологии растений. Петрозаводск: ПетрГУ, 2003. 172 с.
9. Балагурова Н.И., Акимова Т.В., Тумов А.Ф. // Физиология растений. 2001. Т. 48. С. 113–118.
10. Kreps J.A., Wu Y., Chang H.-S. et al. // Plant Physiol. 2002. V. 130. P. 2129–2141.
11. Seki M., Narusaka M., Ishida J., Najo T. // Plant J. 2002. V. 31. P. 279–292.
12. Gusta L.V., Trischuk R., Weiser C.J. // J. Plant Growth Regul. 2005. V. 24. P. 308–318.
13. Egawa C., Kobayashi F., Ishibashi M. et al. // Genes Genet. Syst. 2006. V. 81. P. 77–91.
14. Chinnusamy V., Zhu J., Zhu J.-K. // Physiol. Plant. 2006. V. 126. P. 52–61.