

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА WRKY И БЕЛКОВ ХОЛОДОВОГО ШОКА У РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ХОЛОДОВОЙ АДАПТАЦИИ

© 2008 г. В. В. Таланова, член-корреспондент РАН А. Ф. Титов, Л. В. Топчиева, И. Е. Малышева, Ю. В. Венжик, С. А. Фролова

Поступило 08.07.2008 г.

Адаптация растений к низким температурам связана с многочисленными структурными и функциональными изменениями в их клетках и тканях, включая экспрессию довольно большого числа генов стрессовых (шоковых) белков и транскрипционных факторов [1]. В частности, установлено, что низкие закалывающие температуры индуцируют экспрессию *cor*-генов (cold regulated genes), кодирующих COR-белки, участвующие в повышении морозоустойчивости растений [2, 3]. При действии пониженных температур происходит активация протеинкиназ, приводящая к фосфорилированию ряда транскрипционных факторов, которые активируют регуляторные гены, вызывающие экспрессию генов холодового шока и синтез соответствующих белков [4]. Получены сведения о том, что повышение уровня транскриптов этих генов может иметь важное значение для повышения устойчивости растений, например, арабидопсиса [2]. Учитывая вышесказанное, нами проведено изучение экспрессии генов недавно открытого транскрипционного фактора WRKY [5] и белков холодового шока у растений пшеницы при действии низкой закалывающей температуры.

В данной работе установлено, что повышение устойчивости растений пшеницы к низкой температуре связано с активацией экспрессии гена транскрипционного фактора WRKY, а также показано участие генов белков холодового шока *Wcs120*, *Wcor15*, *Wrab17* и *Wrab19* в увеличении устойчивости не только в начальный, но и в более поздние периоды холодовой адаптации.

Опыты проводили с проростками озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39, выращенными в течение 7 сут в рулонах фильтровальной бумаги на питательном растворе Кнопа с добавлением микроэлементов (рН 6.2–6.4) в камере искусственного климата при температуре воз-

духа 22°C, его относительной влажности 60–70%, освещенности 10 клк, фотопериоде 14 ч. Проростки в течение 7 сут подвергали воздействию низкой закалывающей температуры (4°C), сохраняя прочие условия эксперимента неизменными.

Холодоустойчивость проростков оценивали по температуре (LT_{50}), вызывающей гибель 50% палисадных клеток листа после тестирующего промораживания в термоэлектрическом термостате ТЖР-02/-20 (“Интерм”, Россия) [6]. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью светового микроскопа Микмед-2 (“ЛОМО”, Россия) по деструкции хлоропластов и коагуляции цитоплазмы.

Тотальную РНК выделяли с помощью набора AquaPure RNA Isolation Kit (“Био-Рад”). Определение качества и количества выделенной РНК проводили с помощью капиллярного электрофореза на микрочипах (Exregion, “Био-Рад”). Для удаления остатков ДНК препарат РНК обрабатывали ДНКазой (“Силекс”). Уровень экспрессии генов оценивали методом ПЦР в режиме реального времени. В качестве флуорофора для детекции продуктов использовали интеркалирующий краситель SYBR Green. Амплификацию проводили в приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 (“Био-Рад”), используя наборы для амплификации, совмещенные с обратной транскрипцией. Нуклеотидные последовательности праймеров (“Синтол”) представлены в табл. 1.

На рисунках приведены средние арифметические значения из двух независимых опытов и их стандартные ошибки. В статье обсуждаются величины, достоверные при $P \leq 0.05$.

Установлено, что под влиянием температуры 4°C устойчивость проростков пшеницы начинает возрастать уже через 0.5–1 ч от начала холодового воздействия, на третьи сутки она достигает своего максимального значения и в дальнейшем не изменяется (рис. 1).

В начальный период холодового закалывания проростков происходило быстрое (уже через 15 мин) и очень значительное (в десятки раз) уве-

Таблица 1. Праймеры для проведения ПЦР в режиме реального времени

Ген	5'-праймер	3'-праймер	Температура отжига, °С	Размер ПЦР-фрагмента, п.о.
<i>Wcor15</i>	GGG AGC AAC CTC TTC CAT AGT GT	CCA ACC ATC ACA ACC CTT CAC TA	55	180
<i>Wrab17</i>	CGG GAT GGG AGG AGA CAA GTG AG	GGA ATA GCG AAA CAG AAG GAG GG	55	119
<i>Wrab19</i>	CAA CCA GAA CCA GGC GAG CTA CG	CGG CTG TCT CTA CGG CCT TCT GCT T	55	94
<i>Wcs120</i>	CAC GGC ACT GGC GAG AAG AAA GG	TGA TGT TCT CCA TGA CGC CCT TC	55	175
<i>WRKY</i>	CCG TTC AAG CCC AAC AAG AAG AGG	CGA GGA TGT CCT TCT GGC CGT AC	55	110

личение уровня экспрессии гена транскрипционного фактора *WRKY* в клетках листьев (рис. 2). В дальнейшем он постепенно снижался в течение первых двух суток низкотемпературного воздействия, а через 3–7 сут практически возвращался к уровню контроля (22°C).

Под влиянием закаливания также происходили значительные изменения уровня экспрессии генов холодостойкости *Wcor15*, *Wrab17*, *Wrab19* и *Wcs120*. В частности, уровень экспрессии гена белка *Wcs120* резко повышался через 15 мин действия температуры 4°C на проростки пшеницы (рис. 2). Максимум его экспрессии отмечен через 30 мин, а затем она снижалась и на 3–7-е сутки практически не отличалась от контроля (рис. 2). Уровень экспрессии гена *Wcor15* в листьях проростков пшеницы при действии температуры 4°C возрастал постепенно, достигая максимума на вторые сутки (рис. 2). Дальнейшая экспозиция проростков в условиях закаливания приводила к снижению экспрессии этого гена до уровня контроля. Экспрессия генов *Wrab17* и *Wrab19* также увеличивалась через 15 мин от начала холодостойкости, однако ее повышенный уровень со-

хранялся в течение всего низкотемпературного воздействия.

Таким образом, обнаруженное нами быстрое и значительное увеличение (в десятки раз по сравнению с контролем) под влиянием низкой температуры экспрессии генов транскрипционного фактора *WRKY* и белка *Wcs120* предшествовало росту холодоустойчивости проростков пшеницы. Это указывает на их возможное участие в процессах адаптации растений к низкой температуре. Можно, в частности, предполагать, что повышение холодоустойчивости в начальный период закаливания связано с активацией экспрессии этих генов, которая наиболее выражена в первые минуты и часы действия закаливающей температуры. Когда холодоустойчивость заметно повышалась, изменения их экспрессии становились менее значительными. Данные литературы показывают, что повышение уровня экспрессии генов транскрипционных факторов, как правило, предшествует увеличению концентрации в клетках мРНК генов, кодирующих стрессовые белки [4, 7, 8], что, вероятнее всего, связано с регуляцией их транскрипции в начальный период неблагоприятного воздействия. Результаты наших исследований также свидетельствуют о том, что значительное повышение количества транскриптов *WRKY* имеет транзитный характер и опережает по времени увеличение экспрессии *cor*-генов.

Наибольшее количество транскриптов гена *Wcor15* отмечено на вторые сутки закаливания, когда холодоустойчивость еще не достигала максимального уровня, а в дальнейшем уровень его экспрессии резко снижался и практически не отличался от контрольного варианта. Экспрессия же генов *Wrab17* и *Wrab19* продолжалась в течение всего закаливания. Следовательно, повышение устойчивости растений пшеницы к низкой температуре происходило на фоне очень значительного, но транзитного, повышения экспрессии одних генов холодостойкости и длительного ответа – других. Поэтому логично думать, что гены, экспрессия которых индуцируется пониженной температурой, участвуют в регуляции процессов, направленных на повышение устойчивости не

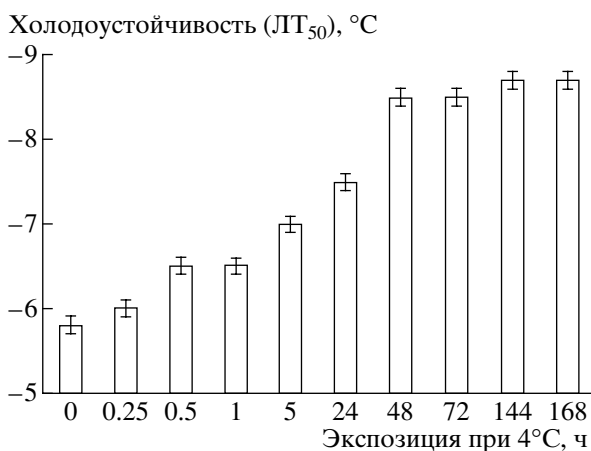


Рис. 1. Динамика холодоустойчивости проростков пшеницы при действии низкой закаливающей температуры (4°C).

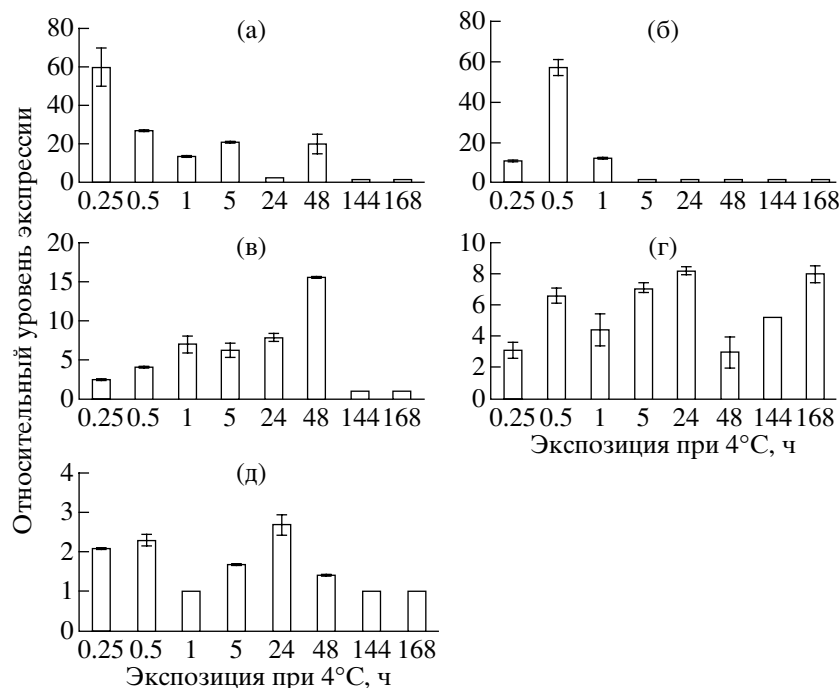


Рис. 2. Динамика уровня экспрессии генов *WRKY* (а), *Wcs120* (б), *Wcor15* (в), *Wrab17* (г) и *Wrab19* (д) при действии низкой закалывающей температуры (4°C). Уровень экспрессии генов у растений контрольного варианта (22°C) принят за единицу.

только в начальный, но и в более поздние периоды холодовой адаптации.

В целом обнаруженное нами увеличение уровня экспрессии генов транскрипционного фактора *WRKY*, *Wcs120*, *Wcor15*, *Wrab17* и *Wrab19* при действии низкой закалывающей температуры на растения пшеницы позволяет предполагать их важную роль в повышении холодоустойчивости.

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. Thomashow M.F. // Annu. Rev. Plant Mol. Biol. 1999. V. 50. P. 571–599.
3. Ohno R., Takumi S., Nakamura C. // J. Exp. Bot. 2001. V. 52. P. 2367–2374.
4. Fowler S., Thomashow M.F. // Plant Cell. 2002. V. 14. P. 1675–1690.
5. Euglem T., Rushton P.J., Robatzek S., Somssich I.E. // Trends Plant Sci. 2000. V. 5. P. 199–206.
6. Дроздов С.Н., Курец В.К. Некоторые аспекты экологической физиологии растений. Петрозаводск: ПетрГУ. 2003. 172 с.
7. Mare C., Mazzotelli E., Crosatti C. et al. // Plant Mol. Biol. 2004. V. 55. P. 399–416.
8. Sarhan F., Oulett F., Vazquez-Tello A. // Physiol. Plant. 1997. V. 101. P. 439–445.