ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК, 2010, том 435, № 4, с. 571–573

ОБЩАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 581.1

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ ЛИСТЬЕВ ПШЕНИЦЫ ПРИ ЛОКАЛЬНОМ ДЕЙСТВИИ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА КОРНЕВУЮ СИСТЕМУ РАСТЕНИЙ

© 2010 г. **В. В. Таланова, член-корреспондент РАН А. Ф. Титов, Л. В. Топчиева, И. Е. Малышева, Ю. В. Венжик, Е. А. Назаркина**

Поступило 22.06.2010 г.

Температурные условия, в которых растения произрастают в природе, крайне неоднородны, поэтому они часто подвергаются как общему, так и локальному воздействию неблагоприятных температур, в частности, охлаждению корней [1–3]. Последнее приводит к различным структурно-функциональным изменениям не только в клетках корня, но и в клетках надземных органов, не испытавших влияния холода. Например, низкая (но не повреждающая) температура в зоне корней может индуцировать довольно значительные изменения в водном обмене [2], гормональной системе [3], фотосинтетическом аппарате листьев [4], а также увеличение их холодоустойчивости [4–6]. Однако конкретные механизмы повышения холодоустойчивости клеток листа в этом случае пока не изучены. Известно, что рост холодоустойчивости клеток листа под действием низкой закаливающей температуры на целые растения связан с изменениями в экспрессии довольно большого числа генов [7, 8]. Сведения же о возможных изменениях в экспрессии генов в клетках листьев в случае локального охлаждения корней растений пока отсутствуют.

В данной работе на примере озимой пшеницы впервые показано, что механизмы повышения холодоустойчивости клеток листа при локальном охлаждении корневой системы непосредственно связаны с изменениями в экспрессии генов, в частности, с усилением экспрессии гена транскрипционного фактора *WRKY*, генов низкотемпературного стресса *Wcor15* и *Wcs120*, а также АБК-зависимого гена *Wrab19*.

Эксперименты 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 (pH 6.2–6.4) в камере искусственного климата при температуре воздуха 22°C, его относительной влажности 60–70%, освещенности 10 клк, фотопериоде 14 ч. Корневую систему проростков в течение 7 суток подвергали воздействию низкой закаливающей температуры (2°C) в специально сконструированной установке [9]. Надземная часть проростков находилась при этом в условиях температуры 22°C.

Холодоустойчивость клеток листа оценивали по температуре ($ЛТ_{50}$), вызывающей гибель 50% палисадных клеток после 5-минутного тестирующего промораживания в термоэлектрическом микрохолодильнике ТЖР–02/–20 (“Интерм”, Россия) [10]. 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 (Experion, “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 и их стандартные ошибки. В статье обсуждаются только величины, достоверные при $P \leq 0.05$.

Установлено, что под влиянием охлаждения корней проростков пшеницы устойчивость клеток листьев начинает возрастать через 5 ч от начала холодового воздействия, на третьи сутки она достигает максимума и в дальнейшем не изменяется (рис. 1).

Институт биологии
Карельского научного центра
Российской Академии наук, Петрозаводск

Таблица 1. Праймеры для проведения ПЦР в режиме реального времени

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность праймера 5'...3'
Wcor15	прямой	GGGAGCAACCTCTTCCATAGTGT
	обратный	CCAACCATCACAACCCTTCACTA
Wrab17	прямой	CGGGATGGGAGGAGACAAGTGAG
	обратный	GGAATAGCGAAACAGAAGGAGGG
Wrab19	прямой	CAACCAGAACCAGGCGAGCTACG
	обратный	CGGCTGTCTCTACGGCCTTCTGCTT
Wcs120	прямой	CACGGCACTGGCGAGAAGAAAGG
	обратный	TGATGTTCTCCATGACGCCCTTC
WRKY	прямой	CCGTTCAAGCCCAACAAGAAGAGG
	обратный	CGAGGATGTCCTTCTGGCCGTAC

Важно, что уже в начальный период действия холода на корни проростков в клетках листьев происходило быстрое (в первые 15–60 мин) усиление экспрессии гена транскрипционного фактора *WRKY* (рис. 2). В дальнейшем она постепенно снижалась и на шестые–седьмые сутки практически возвращалась к уровню контроля (22°С).

Под влиянием охлаждения корней в листьях проростков также отмечены значительные изменения в уровне экспрессии регулируемых холодом генов *Wcor15* и *Wcs120*. Так, уровень экспрессии гена *Wcs120* резко повышался через 15 мин действия на корни температуры 2°С, затем достигнутый уровень сохранялся в течение 1 ч действия холода, после чего он снижался и практически не отличался от контроля (рис. 2). Уровень экспрессии гена *Wcor15* в листьях проростков пшеницы при действии на корни температуры 2°С также возрастал уже через 15 мин и оставался повышенным в течение 1 ч, затем постепенно снижался, но через 4 суток отмечено его повторное повышение (рис. 2). Дальнейшая экспозиция проростков в этих условиях приводила к снижению экспрессии данного гена до уровня контроля.

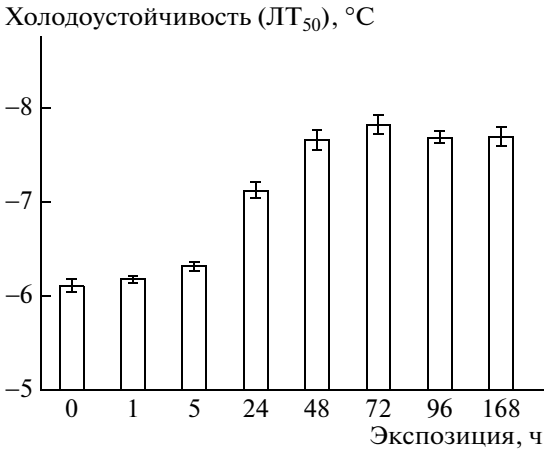

Рис. 1. Изменение холодоустойчивости листьев проростков пшеницы под влиянием локального воздействия температуры 2°С на их корни. На оси ординат температура гибели 50% клеток листа.

Необходимо отметить, что уровень экспрессии АБК-зависимого гена *Wrab19* также увеличивался через 15 мин от начала воздействия холода, однако в дальнейшем в течение всего эксперимента он оставался неизменным (на уровне контроля) (рис. 2). В отличие от этого уровень экспрессии другого АБК-зависимого гена – *Wrab17* – оставался при этих условиях неизменным.

Сопоставление этих данных с полученными нами ранее [11] выявляет очевидное сходство в характере реакции проростков пшеницы на общее и локальное действие низкой закаливающей температуры: и в том, и в другом случае наблюдается повышение холодоустойчивости клеток листьев. Однако в первом из них оно происходило значительно быстрее (уже через 1 ч от начала действия холода), а максимальный прирост устойчивости был заметно большим, чем при охлаждении только корней [11]. В обоих случаях этот процесс происходил на фоне усиления экспрессии генов *WRKY*, *Wcs120*, *Wcor15*, *Wrab19* уже в начальный период (в первые 15–30 мин) действия низкой температуры. Но так же как и в отношении холодоустойчивости, наиболее выраженные изменения экспрессии генов обнаруживались при воздействии холода на все растение [11].

Вполне очевидно, что при действии низкой температуры на весь проросток изменения в экспрессии генов в клетках листьев возникают непосредственно под влиянием холода, при локальном же охлаждении корня – в ответ на поступивший из корня дистанционный сигнал о холодовом воздействии. Вместе с тем однотипный характер выявленных изменений в экспрессии генов при действии холода на все растение или на часть его позволяет предполагать, что именно эти гены участвуют в механизмах формирования повы-

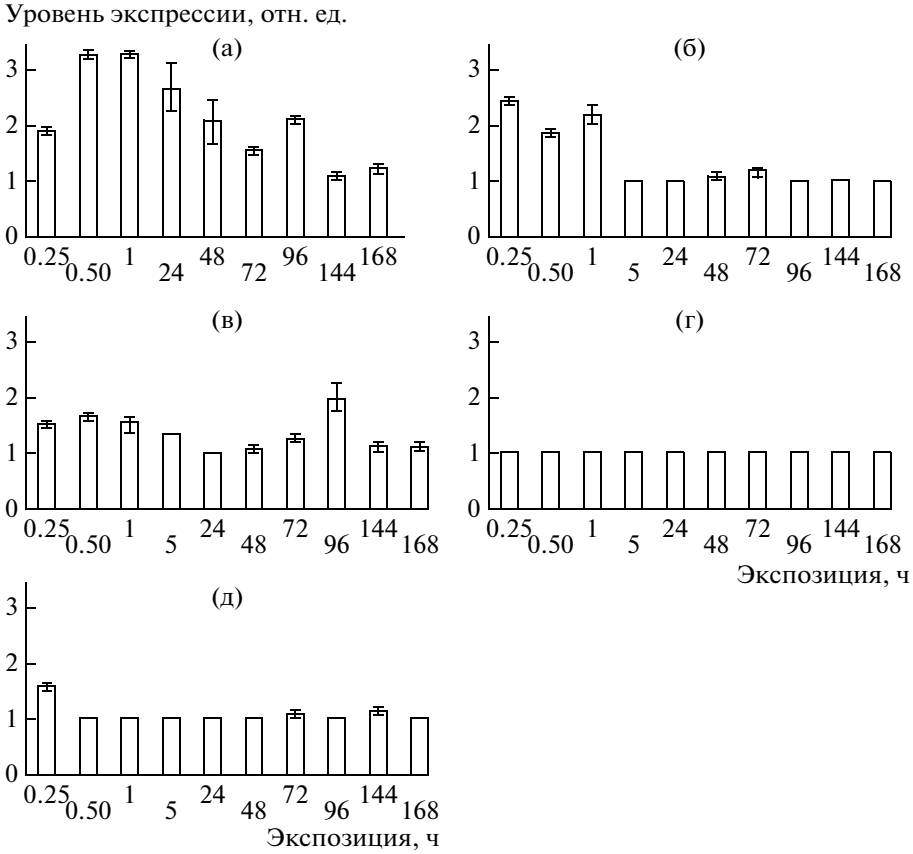

Рис. 2. Изменения в экспрессии генов *WRKY* (а), *Wcs120* (б), *Wcor15* (в), *Wrab17* (г), *Wrab19* (д) в листьях проростков пшеницы под влиянием локального воздействия температуры 2°С на их корни. Уровень экспрессии генов у растений контрольного варианта (22°С) принят за единицу.

шенной холодоустойчивости клеток листьев. При этом наибольшие изменения в экспрессии генов отмечены именно в начальный период действия холода, предшествуя и/или сопровождая процесс повышения холодоустойчивости клеток листьев. Когда же их холодоустойчивость существенно повышалась, изменения в экспрессии генов становились не столь значительными.

Итак, можно заключить, что рост холодоустойчивости клеток листа при локальном охлаждении корней пшеницы сопряжен с возрастанием экспрессии генов *WRKY*, *Wcs120*, *Wcor15*, *Wrab19*, и это позволяет предположить важную их роль в механизмах повышения холодоустойчивости.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (10–04–00650а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Радченко С.И.* Температура и растение. Иркутск: Восточно-Сибир. кн. изд-во, 1967. 142 с.
2. *Malone M.* // J. Exp. Bot. 1993. V. 44. № 11. P. 1663–1670.
3. *Веселова С.В., Фархутдинов Р.Г., Веселов Д.С., Кудоярова Г.Р.* // Физиология растений. 2006. Т. 53. № 6. С. 857–862.
4. *Венжик Ю.В., Титов А.Ф., Таланова В.В., Назаркина Е.А.* // ДАН. 2009. Т. 427. № 3. С. 414–416.
5. *Балагурова Н.И., Акимова Т.В., Титов А.Ф.* // Физиология растений. 2001. Т. 48. № 1. С. 113–118.
6. *Титов А.Ф., Таланова В.В., Акимова Т.В.* // Физиология растений. 2003. Т. 50. № 1. С. 94–99.
7. *Thomashow M.F.* // Annu. Rev. Plant Mol. Biol. 1999. V. 50. P. 571–599.
8. *Трунова Т.И.* Растение и низкотемпературный стресс. М.: Наука, 2007. 54 с.
9. *Балагурова Н.И., Акимова Т.В., Титов А.Ф.* // Физиология растений. 1994. Т. 41. № 5. С. 749–753.
10. *Дроздов С.Н., Курец В.К.* Некоторые аспекты экологической физиологии растений. Петрозаводск: ПетрГУ, 2003. 172 с.
11. *Таланова В.В., Титов А.Ф., Топчиева Л.В. и др.* // ДАН. 2008. Т. 423. № 4. С. 567–569.