

БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА,
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 581.1

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ТРАНСКРИПТОВ ГЕНОВ
ПРОАПОПТОТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ
ПРИ ДЕЙСТВИИ ВЫСОКИХ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ТЕМПЕРАТУР

© 2017 г. Л. В. Топчиева*, И. А. Нилова,

член-корреспондент РАН А. Ф. Титов

Поступило 12.09.2016 г.

При действии на растения пшеницы высоких температур (33, 37, 43°C) в клетках листьев происходило повышение уровня транскриптов генов проапоптотических белков: *TaMCAII* (кодирует метакаспазу типа II) и *TaBAX* (функциональный гомолог гена *CDF1 Arabidopsis thaliana*). Этот процесс при действии температур 37 и 43°C опережал (в случае мРНК гена *TaBAX*) или сопровождался (в случае мРНК гена *TaMCAII*) появлением в листьях признаков нуклеосомной деградации ДНК. Накопление малонового диальдегида в листьях проростков, находящихся в условиях температур 37 и 43°C совпадало по времени с изменением уровня экспрессии гена *TaMCAII* и появлением признаков программируемой гибели клеток.

DOI: 10.7868/S086956521701025X

Неблагоприятные факторы внешней среды, в том числе и высокие температуры, способны активизировать в растениях процессы, приводящие к программируемой клеточной смерти (ПКС) [1, 2]. Однако ее роль в ответных реакциях растений на действие абиотических стрессоров еще не вполне ясна. В развитии ПКС у растений участвуют гидролитические ферменты, а также некоторые проапоптотические белки, аналогичные по своим функциям белкам животных [1]. Немного численные данные о развитии ПКС в растениях при действии неблагоприятных температур получены в основном на культурах клеток или протопластах. Вопросы о том, какие значения температур способны индуцировать ПКС у растений и как развивается данный процесс в интактном растении, остаются малоизученными. Также крайне мало сведений относительно экспрессии генов, кодирующих проапоптотические белки, при действии неблагоприятных факторов среды с одновременным выявлением признаков деградации клеток растений.

Учитывая это, в настоящей работе с помощью научного оборудования ЦКП ИБ КарНЦ РАН мы исследовали динамику изменений уровня транскриптов генов проапоптотических белков и процесс возникновения признаков деградации

ДНК у растений пшеницы при высокотемпературных воздействиях разной интенсивности.

Исследования проводили на проростках озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Московская 39, которые выращивали в течение 7 сут в рулонах фильтровальной бумаги на питательном растворе (рН 6.2–6.4) и далее в течение 7 сут при добавлении микроэлементов в камере искусственного климата при температуре воздуха 22°C, относительной влажности 60–70%, освещенности 10 клк и фотопериоде 14 ч. Проростки подвергали воздействию температур 33, 37 и 43°C в диапазоне времени от 15 мин до 3 сут. Из 50 мг листьев с помощью набора Extract RNA (“Евроген”, Россия) выделяли тотальную РНК, обрабатывали ДНКазой (1 единица активности, ЕА). С помощью набора для обратной транскрипции (“Евроген”) синтезировали кДНК, используя очищенный на колонках CleanRNA Standart (“Евроген”) препарат РНК. Количество и качество нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрически на приборе SmartSpec Plus (“Bio-Rad”, США). Уровень экспрессии генов растений оценивали с помощью ПЦР в режиме реального времени на приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 (“Bio-Rad”), используя набор для амплификации с красителем SYBR Green (“Евроген”). Праймеры (“Евроген”) для проведения ПЦР указаны в табл. 1. Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР фрагментов. Эффективность ПЦР, оцениваемая по стандартной кривой, достигала 98%. Уровень транскриптов генов вычисляли по $\Delta\Delta C_T$ [3]. В качестве контрольных об-

Институт биологии

Карельского научного центра

Российской Академии наук, Петрозаводск

*E-mail: topchieva67@mail.ru

Таблица 1. Характеристика праймеров для ОТ-ПЦР

Ген	Номер доступа в базе NCBI	Праймер	Последовательность праймера 5'→3'	Длина фрагмента ПЦР, п.о.
β -actin <i>Triticum aestivum</i>	AB181991	Прямой	tgctatccttcggttgacctt	133
		Обратный	aagcgagcttctcctttatgtct	
<i>TaBAH</i>	FJ747647	Прямой	ccgccgtcgccttgagccaga	104
		Обратный	gcagcagcacggcatcatccg	
<i>TaMCAH</i>	GU130248	Прямой	tccttcctcaaagagaccgttcg	170
		Обратный	ctcctcaatgtcatccttccag	

Температура отжига праймеров – 58°C.

разцов брали кДНК растений, не подвергнутых воздействию стресс-факторов. В качестве референсного гена использовали ген β -actin *Triticum aestivum*. Анализ транскриптов проводили в трех биологических повторностях, ПЦР проводили не менее трех раз. ДНК выделяли из средней части первого листа, используя набор для выделения ДНК из растений (“Синтол”, Россия). Раствор обрабатывали РНКазой (“Синтол”) в течение 2 ч при 37°C. Для электрофоретического разделения ДНК в лунки 1.5%-го агарозного геля вносили 5 мкг ДНК.

Содержание МДА оценивали по степени накопления продукта его реакции с тиобарбитуровой кислотой [4]. Содержание МДА анализировали в трех биологических и четырех аналитических повторностях.

О достоверности различий между вариантами судили с помощью критерия Вилкоксона–Манна–Уитни.

В работе использовали температуры, которые ранее по их влиянию на устойчивость клеток листа к прогреву были отнесены к закаливающим температурам (33 и 37°C) и повреждающей температуре (43°C) [5]. Одним из доказательств развития ПКС служит фрагментация ядерной ДНК. В нашем случае в варианте с температурой 33°C признаки нуклеосомной деградации ДНК (наличие так называемой “лестницы” на электрофореграмме) у проростков пшеницы мы не выявили. Их появление зафиксировали в образцах ДНК, выделенной из листьев проростков, экспонированных при температуре 37°C в течение 24 и 72 ч (рис. 1) и при 43°C в течение 6 и последующих часов воздействия (рис. 1). Следовательно, разные по интенсивности воздействия температуры вы-

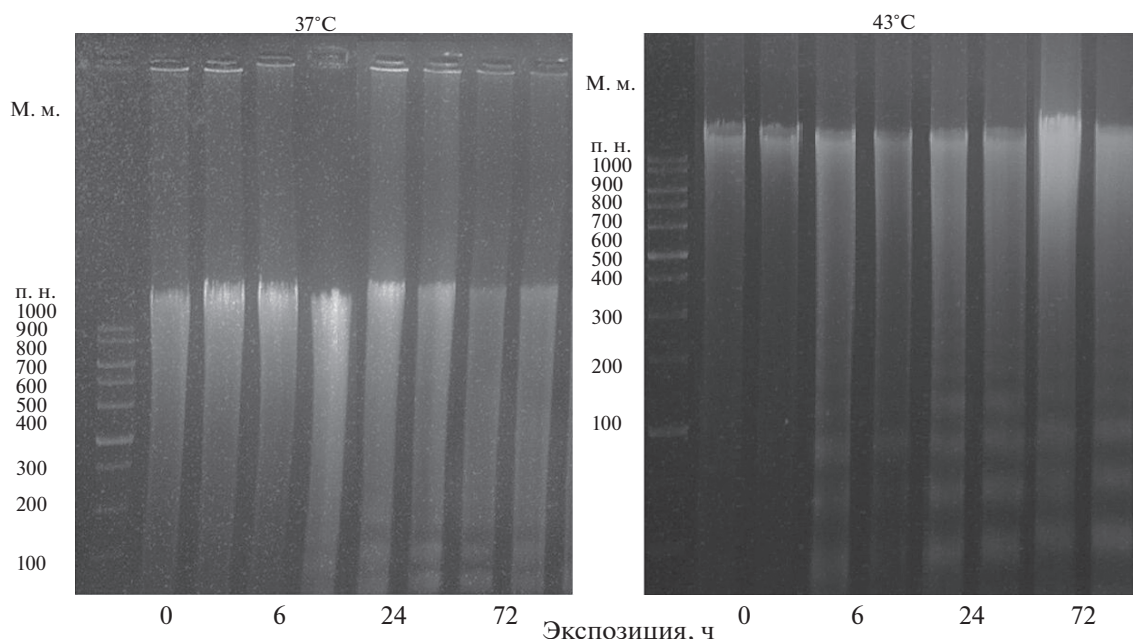


Рис. 1. Электрофореграмма ДНК, выделенной из листьев проростков пшеницы, подвергнутых действию температуры 37 и 43°C. М.м. — маркер молекулярного веса ДНК (1000–100 п.н.).

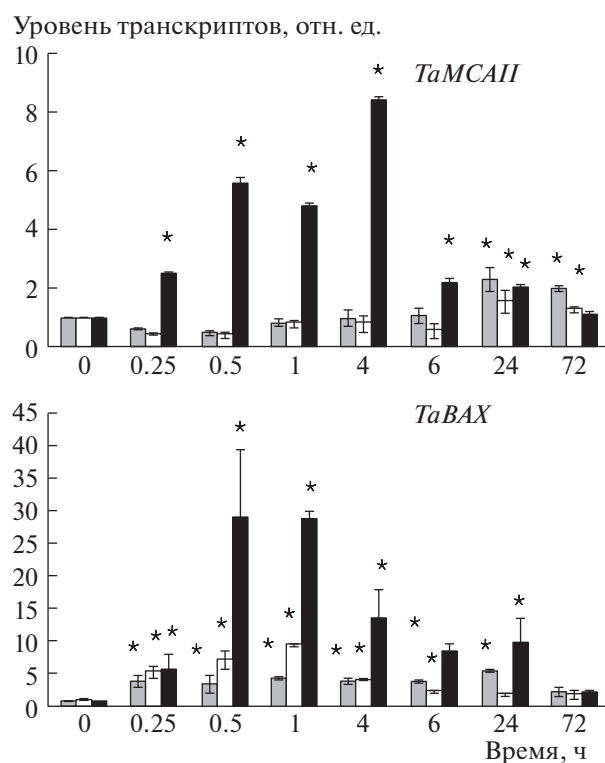


Рис. 2. Относительный уровень транскриптов генов *TaBAH* и *TaMCAII* в клетках листьев пшеницы при действии температур 33, 37 и 43°C. ■ – 33°C; □ – 37°C; ■ – 43°C. $M \pm m$, $n = 9$.

зывали неодинаковый эффект в отношении индукции ими ПКС.

Белок ВАН (функциональный гомолог проапоптотического белка CDF1 растений *Arabidopsis thaliana*) и метакаспазы относятся к позитивным регуляторам ПКС у растений [6, 7]. Мы обнаружили, что уже через 15 мин от начала действия всех исследуемых температур происходит достоверный рост содержания транскриптов гена *TaBAH* в клетках листьев (рис. 2). При продолжительном действии высоких температур содержание мРНК гена *TaBAH* снижалось, но тем не менее превосходя уровень контрольных растений. Уве-

личение уровня транскриптов гена *TaBAH* при 37 и 43°C значительно опережало появление признаков деградации ДНК в тканях листьев. Это может быть связано с тем, что ПКС у растений – относительно длительный процесс, требующий определенного времени для активации нуклеаз и деградации ДНК. Например, в протопластах моркови, подвергнутых тепловому шоку (55°C), фрагментация ДНК обнаруживалась только после 3–5 ч тепловой обработки [8].

В наших опытах мы обнаружили, что в ответ на действие высоких температур в клетках листьев пшеницы происходит изменение уровня транскриптов гена *TaMCAII*. Но если при закалывающих температурах (33 и 37°C) повышение уровня транскриптов гена *TaMCAII* в листьях проростков отмечено через сутки от начала эксперимента, то при действии температуры 43°C – уже в течение первого часа с последующим (после 4 ч) его снижением (рис. 2). Интересно, что появление признаков деградации ДНК в клетках при действии температур 37 и 43°C практически совпадало с повышением уровня транскриптов этого гена. Вполне вероятно, что это связано с развитием окислительного стресса в клетках растений при действии указанных температур. Так, температуры 37 и 43°C индуцировали накопление в тканях листьев проростков малонового диальдегида (табл. 2). Повышение его концентрации при действии 37°C совпадало с ростом содержания мРНК гена *TaMCAII*. Логично предположить, что при действии температуры 37°C появление признаков ПКС в тканях листьев проростков пшеницы может быть связано с развитием окислительного стресса и усилением экспрессии *TaMCAII*. При действии повреждающей температуры 43°C в этот процесс, вероятно, вносит вклад усиление экспрессии гена *TaBAH* и гена *TaMCAII*. Отсутствие признаков фрагментации ДНК в листьях проростков, испытывающих действие температуры 33°C, можно объяснить тем, что в клетках растений в условиях действия неблагоприятных факторов внешней среды могут активизироваться также процессы, направленные на предотвращение запуска ПКС, например, усиливаться синтез

Таблица 2. Содержание малонового диальдегида (МДА) в листьях проростков пшеницы, подвергнутых высокотемпературному воздействию

Температура, °C	МДА, мкМ/г сырого веса						
	Время, ч						
	0	0.25	0.5	1	6	24	48
33	12.7 ± 1.7	13.0 ± 2.1	13.1 ± 2.2	14.6 ± 2.2	15.8 ± 3.4	11.5 ± 1.6	10.3 ± 0.1
37	12.7 ± 1.7	11.6 ± 1	12.9 ± 2	12.2 ± 1.2	13.2 ± 0.1	19.3 ± 1.7*	20.5 ± 0.5*
43	12.7 ± 1.7	12.9 ± 0.1	13.3 ± 1.6	12.8 ± 1.3	21.4 ± 1.3	42.3 ± 1.9*	103.3 ± 8.7*

Здесь и на рис. 2 $M \pm m$, * $p < 0.05$ по сравнению с контролем; $n = 12$.

антиапоптотических белков, таких как Вах-ингибитор I [5].

В целом результаты наших экспериментов позволяют высказать предположение об участии генов, кодирующих метакаспазу II и ВАХ, в формировании ответа проростков пшеницы на действие высоких закаливающих и повреждающих температур. Возможно, при действии температуры 37°C развитие процессов ПКС в листьях проростков пшеницы носит адаптивный характер, поскольку их устойчивость в этом случае возрастает. В отличие от этого, развитие ПКС в тканях листьев при температуре 43°C отражает, как нам представляется, повреждающий эффект данного воздействия на проростки.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение Государственного задания (тема № 51.2, № госрегистрации 01201358737).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ванюшин Б.Ф. // Успехи биол. химии. 2001. Т. 41. С. 3–38.
2. Watanabe N., Lam E. // Plant J. 2011. V. 66. P. 969–982.
3. Livak K.J., Schmittgen T.D. // Methods. 2001. V. 25. P. 402–408.
4. Stewart R.R.C., Bewley J.D. // Plant Physiol. 1980. V. 65. P. 245–248.
5. Тончиева Л.В., Таланова В.В., Тумов А.Ф. и др. // Тр. КарНЦ РАН. 2015. № 12. С. 45–54.
6. Kawai-Yamada M., Saito Y., Jin L., et al. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 39468–39473.
7. Watanabe N., Lam E. // Plant J. 2011. V. 66. P. 969–982.
8. McCabe P.F., Levine A., Meijer P.J., et al. // Plant J. 1997. V. 12. P. 267–280.