

УДК 581.1

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *ci7* В ЛИСТЬЯХ КАРТОФЕЛЯ ПРИ ДЕЙСТВИИ КРАТКОВРЕМЕННЫХ ЕЖЕСУТОЧНЫХ СНИЖЕНИЙ ТЕМПЕРАТУРЫ

**В. В. Лаврова, М. И. Сысоева, Е. Г. Шерудило, Л. В. Топчиева,
Е. М. Матвеева**

Институт биологии Карельского научного центра РАН

На растениях картофеля (*Solanum tuberosum* L., с. Сударыня и с. Невский) изучено влияние ежесуточных кратковременных и постоянных низкотемпературных воздействий на холодоустойчивость и экспрессию COR гена *ci7*. Показано, что прирост холодоустойчивости у растений, подвергнутых ежесуточным кратковременным снижениям температуры, был в 5–6 раз выше, чем при постоянном действии низкой температуры. При этом уровень экспрессии гена *ci7* в листьях картофеля был одинаковым при разных типах низкотемпературных воздействий. Предполагается, что повышение устойчивости растений картофеля к кратковременному воздействию низких температур опосредовано не только изменением экспрессии COR гена *ci7*, но и иными механизмами.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum* L., температура, устойчивость, COR гены, ген *ci7*.

V. V. Lavrova, M. I. Sysoeva, E. G. Sherudilo, L. V. Topchieva, E. M. Matveeva. EXPRESSION OF *ci7* GENE IN POTATO LEAVES UNDER SHORT-TERM TEMPERATURE DROP

The effects of daily short-term and constant low-temperature treatments on cold resistance and expression of the COR gene *ci7* in potato plants (*Solanum tuberosum* L., cv. Sudarynya & Nevskiy) has been studied. The rise in cold resistance of the plants daily exposed to short-term temperature drop was 5-6 times higher than in the plants constantly exposed to low temperature. The level of *ci7* gene expression in potato leaves was the same at different modes of exposure to cold. It is suggested that the rise in potato plant resistance to short-term low temperature drop is achieved not only by means of change in expression of the COR gene *ci7* but also through other mechanisms.

Key words: *Solanum tuberosum* L., temperature, resistance, COR genes, *ci7* gene.

Введение

В природе широко распространены кратковременные падения температур в суточном цикле, которые согласно одному из сценариев изменения климата будут значительно усили-

ваться, особенно в ранневесенний период [Филатов и др., 2003]. Наряду с этим кратковременные снижения температуры широко используются в современном растениеводстве в качестве одного из приемов выращивания компактных растений [Мое, Heins, 2000]. Как

показано ранее, они оказывают влияние на биологическую продуктивность и скорость развития растений, а также способствуют увеличению их холодоустойчивости [Марковская и др., 2008]. Причем механизмы формирования устойчивости при постоянных и кратковременных низкотемпературных воздействиях различны [Марковская и др., 2007].

Известно, что важную роль в механизмах повышения устойчивости растений к действию неблагоприятных температур играют гены холодового шока, в частности COR гены, кодирующие белки, которые могут контролировать в растительном организме биологические и физиологические изменения, необходимые для роста и развития при низких температурах [Колесниченко, Войников, 2003; Трунова, 2007; Thomashow, 1998]. В настоящее время активно изучается экспрессия COR генов при действии постоянной низкой положительной температуры [Kirch et al., 1997; Thomashow, 1998; Wanner, Junttila, 1999]. В то же время информация об экспрессии COR генов при кратковременном периодическом действии низкой закалывающей температуры в доступной нам литературе отсутствует. В связи с этим целью настоящей работы было изучение влияния кратковременных ежесуточных снижений температуры на экспрессию COR гена *ci7* в листьях растений картофеля.

Материалы и методы

Опыты проводили с двумя сортами картофеля (*Solanum tuberosum* L.) Сударыня и Невский, районированными на территории Республики Карелия. Мини-клубни картофеля, полученные в ГНУ «Карельская ГСХОС Россельхозакадемии», проращивали стандартным способом на свету в течение трех недель, высаживали в пластиковые сосуды с песком при поливе питательным раствором Кнопа с добавлением микроэлементов (рН 5,5–5,6) и помещали в камеру искусственного климата при температуре 23°C, фотопериоде (день/ночь) 16/8 ч и освещенности 10 клк. По достижении фазы 3-х листьев часть растений оставляли при 23°C (вариант контроль), а остальные либо подвергали в течение 6 суток ежесуточным снижениям температуры (с 23 до 5°C) на 2 ч в конце ночного периода (вариант ДРОП, от англ. drop – падение), либо выращивали в течение 6 суток при постоянной низкой температуре 5°C (вариант ПНТ). На следующий день после завершения температурных обработок анализировали холодоустойчивость и исследовали экспрессию COR гена у растений всех вариантов.

Холодоустойчивость растений определяли по температуре (LT_{50}), вызывающей гибель

50% палисадных клеток паренхимы высечек из листа площадью 0,5 см² после их 5-минутного тестирующего промораживания в термоэлектрическом термостате ТЖР-02/-20 («Интерм», Россия) в интервале температур от -6 до -10°C с шагом 0,4°C [Дроздов и др., 1976].

Для выделения РНК навеску листьев картофеля (50 мг) растирали в жидком азоте. Тотальную РНК выделяли с помощью набора Yellow Solve («Силекс», Россия). Степень чистоты и концентрацию РНК определяли спектрофотометрически на приборе SmartSpec Plus (Bio-Rad, США). Для удаления остатков ДНК препарат РНК обрабатывали ДНКазой (10 ед./мл) («Силекс», Россия). 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 (Bio-Rad, США), используя набор для амплификации («Синтол», Россия). Смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала 2 мкл (100 нг) тотальной РНК, 5 мкл реакционной смеси, по 0,5 мкл прямого и обратного праймеров, 16 мкл воды, свободной от нуклеаз, 1 мкл MgCl₂. Для ПЦР в режиме реального времени использовали праймеры («Синтол», Россия): прямой – 5' CAC AAT CAT AAC ATC CCA AA 3', обратный – 5' GCG GAC ATA AGA AGA CG 3'. Протокол ПЦР: 40 циклов – 10 с при 95°C и 30 с при 55°C. Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР фрагментов: 1 мин при 95°C, 1 мин при 55°C, 10 с при 55°C (80 циклов, в каждом из которых температура повышалась на 0,5°C). Уровень экспрессии гена *ci7* растений, подвергнутых низкотемпературному воздействию, был рассчитан относительно уровня экспрессии этого гена у растений контрольного варианта (не подвергнутых низкотемпературному воздействию).

Средние арифметические значения из двух независимых опытов и их стандартные ошибки представлены на рис. 1, 2. Повторность при оценке холодоустойчивости – 6-кратная, при ПЦР-анализе – 2-кратная. Данные обработаны статистически с использованием пакета программ Statgraphics for Windows 7.0. В статье обсуждаются величины, достоверно различающиеся при $P \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ холодоустойчивости растений картофеля показал, что при кратковременном ежесуточном снижении температуры (вариант ДРОП) прирост холодоустойчивости относительно контроля для с. Сударыня соста-

вил 2,7°C, для с. Невский – 2,9°C (см. рис. 1). В то же время постоянное действие низкой закалывающей температуры (вариант ПНТ) вне зависимости от сорта вызвало значительно меньшее по сравнению с ДРОП увеличение холодоустойчивости, прирост которой достигал только 0,5°C (см. рис. 1). Ранее подобный эффект отмечался и на других видах растений (огурце, петунии, кукурузе, пшенице, капусте белокочанной), что дало возможность высказать предположение о разных механизмах формирования устойчивости в ответ на постоянное и кратковременное действие низкой температуры [Марковская и др., 2007].

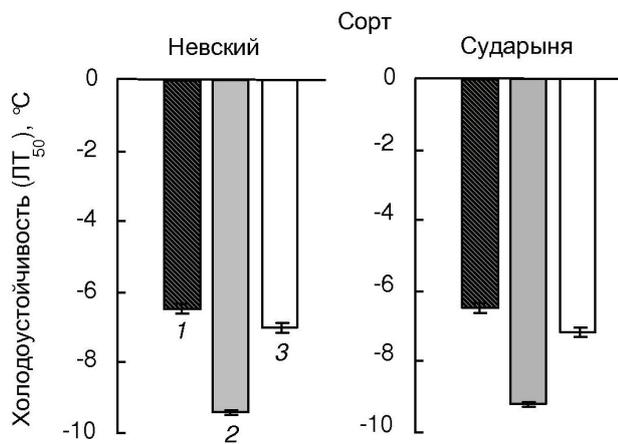


Рис. 1. Холодоустойчивость растений картофеля при кратковременном (ДРОП) и постоянном (ПНТ) действии низкой закалывающей температуры (5°C) 1 – контроль, 2 – ДРОП, 3 – ПНТ

Из литературы известно, что постоянное действие низкой (4°C) температуры индуцировало экспрессию COR гена *ci7* в клубнях и листьях картофеля [Kirch et al., 1997]. Нами также выявлено увеличение экспрессии данного гена в листьях растений, подвергнутых постоянному действию низкой закалывающей температуры (см. рис. 2). Вместе с тем, как показали результаты нашего эксперимента, не только постоянные, но и кратковременные снижения температуры вызвали экспрессию гена *ci7* в листьях картофеля (см. рис. 2), причем у обоих изученных сортов уровень экспрессии был одинаковым при разных типах низкотемпературных воздействий. Интересно, что, если для достижения максимального уровня экспрессии гена *ci7* при ПНТ требовалось 72 ч низкотемпературного воздействия [Berkel et al., 1994; Kirch et al., 1997], то при периодической кратковременной низкотемпературной обработке в нашем эксперименте подобный эффект достигался уже при 12 ч

суммарного действия низкой температуры (6 сут по 2 ч).

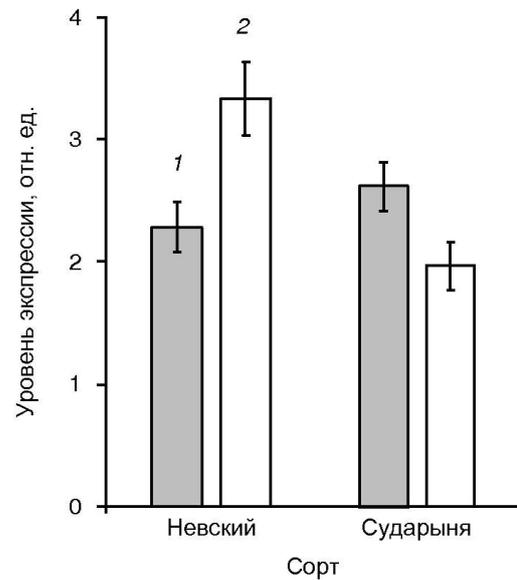


Рис. 2. Изменение уровня экспрессии гена *ci7* при кратковременном (ДРОП) и постоянном (ПНТ) действии низкой закалывающей температуры (5°C) в листьях растений картофеля

1 – ДРОП, 2 – ПНТ. Уровень экспрессии гена у контрольных растений (при 23°C) принят за единицу

Таким образом, как кратковременное низкотемпературное воздействие, так и постоянное действие низкой температуры индуцировали практически одинаковый уровень экспрессии COR гена *ci7* в листьях картофеля, однако величина прироста холодоустойчивости листьев в вариантах ДРОП и ПНТ существенно различалась. Выявленные различия в величине холодоустойчивости при двух видах низкотемпературного воздействия позволяют предположить, что значительно более высокий уровень устойчивости к низкой температуре в варианте ДРОП по сравнению с вариантом ПНТ может быть обусловлен не только экспрессией COR гена *ci7*, но и иными механизмами. Ранее нами было показано, что при периодических низкотемпературных воздействиях растения находятся в функционально активном состоянии, характеризующимся стимуляцией метаболических процессов, увеличением продуктивности, ускорением развития, в то время как постоянное действие низкой температуры вызывает снижение метаболической активности у растений [Марковская и др., 2008]. Было высказано предположение о том, что немаловажную роль в повышении холодоустойчивости растений при кратковременных низкотемпературных воздействиях играют фотоассимиляты [Марковская и др., 2008]. Об этом свидетельствуют, в частности, результаты анализа ком-

понентов водорастворимой фракции углеводов, выявившие существенные различия двух видов низкотемпературного воздействия – ДРОП и ПНТ [Марковская и др., 2010]. Растения варианта ДРОП характеризовались наличием двух пулов сахаров, участвующих как в формировании устойчивости, так и в активации метаболизма, что и обеспечивало нахождение таких растений в состоянии повышенной функциональной активности и высокого уровня холодоустойчивости. Именно это играет большую роль при адаптации растений к условиям нестабильного суточного температурного режима в период активной вегетации, являясь одной из составляющих онтогенеза растений в норме.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 10-04-00097) и проекта ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (№ г.к. П1299).

Литература

Дроздов С. Н., Курец В. К., Будыкина Н. П., Балагурова Н. И. Определение устойчивости растений к заморозкам // Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды. Л.: Колос, 1976. С. 222–228.

Колесниченко А. В., Войников В. К. Белки низкотемпературного стресса растений. Иркутск: Арт-Пресс, 2003. 196 с.

Марковская Е. Ф., Шерудило Е. Г., Галибина Н. А., Сысоева М. И. Роль углеводов в реакции теплолюбивых растений на кратковременные и длительные низ-

котемпературные воздействия // Физиология растений. 2010. Т. 57, № 5. С. 687–694.

Марковская Е. Ф., Сысоева М. И., Шерудило Е. Г., Толчьева Л. В. Дифференциальная экспрессия генов в растении огурца в ответ на многократные кратковременные низкотемпературные воздействия // Физиология растений. 2007. Т. 54, № 5. С. 686–691.

Марковская Е. Ф., Сысоева М. И., Шерудило Е. Г. Феномен ежесуточного кратковременного влияния низких закалывающих температур на жизнедеятельность растения // Онтогенез. 2008. Т. 39, № 5. С. 323–332.

Трунова Т. И. Растение и низкотемпературный стресс. М.: Наука, 2007. 54 с.

Филатов Н. Н., Назарова Л. Е., Сало Ю. А., Семенов А. В. Динамика и прогноз изменения климата Восточной Финноскандии // Гидроэкологические проблемы Карелии и использования водных ресурсов. Петрозаводск: изд-во Карельского научного центра РАН, 2003. С. 33–39.

Berkel J., Salamini F., Gebhardt C. Transcripts accumulating during cold storage of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers are sequence related to stress-responsive genes // Plant Physiology. 1994. Vol. 104. P. 445–452.

Kirch H. H., Berkel J., Glaczinski H., Salamini F., Gebhardt C. Structural organization, expression and promoter activity of a cold-stress-inducible gene of potato (*Solanum tuberosum* L.) // Plant Mol. Biol. 1997. Vol. 33. P. 897–909.

Moe R., Heins R. D. Thermo- and photomorphogenesis in plants // Adv. Floriculture Res. Agric. Univ. of Norway. 2000. Rep. N 6. P. 52–64.

Thomashow M. F. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance // Plant Physiol. 1998. Vol. 118. P. 1–7.

Wanner L. A., Junttila O. Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 1999. Vol. 120. P. 391–399.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Лаврова Виктория Витальевна

аспирант
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: vicandra@mail.ru
тел. (8142) 762706

Сысоева Марина Ивановна

главный научный сотрудник, д.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: sysoeva@krc.karelia.ru
тел. (8142) 762706

Шерудило Елена Георгиевна

старший научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: sherudil@krc.karelia.ru
тел. (8142) 762706

Lavrova, Victoria

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: vicandra@mail.ru
tel. (8142) 762706

Sysoeva, Marina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: sysoeva@krc.karelia.ru
tel. (8142) 762706

Sherudilo, Elena

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science 11 Pushkinskaya St.,
185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: sherudil@krc.karelia.ru
tel. (8142) 762706

Топчиева Людмила Владимировна

старший научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: topchieva@krc.karelia.ru
тел. (8142) 571879

Матвеева Елизавета Михайловна

старший научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: matveeva@krc.karelia.ru
тел. (8142) 783622

Topchieva, Lyudmila

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: topchieva@krc.karelia.ru
tel. (8142) 571879

Matveeva, Elizaveta

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: matveeva@krc.karelia.ru
tel. (8142) 783622