

УДК 581.1

## **ВЛИЯНИЕ КАДМИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ CBF1 И DREB1 В ЛИСТЯХ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ**

**Н. С. Репкина, В. В. Таланова, Л. В. Топчиева,  
Ю. В. Батова, А. Ф. Титов**

*Институт биологии Карельского научного центра РАН*

В условиях контролируемой среды изучали влияние кадмия на экспрессию генов, кодирующих транскрипционные факторы CBF1 и DREB1, в листьях проростков озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с. Московская 39. Установлено, что в первые 5 ч воздействия кадмия (100 мкМ) на корни проростков его содержание в листьях практически не увеличивается, но через 1 сут резко возрастает, продолжая повышаться в течение всего опыта (7 сут). В отличие от этого, уровень экспрессии генов *CBF1* и *DREB1* существенно увеличивался уже через 15 мин воздействия кадмия на проростки и достигал максимума через 1 ч. В дальнейшем (через 5 ч) экспрессия гена *DREB1* несколько снижалась, но оставалась на повышенном уровне до конца эксперимента (7 сут). Содержание транскриптов гена *CBF1* снижалось через 5–48 ч воздействия кадмия, а затем вновь возрастало и сохранялось на достигнутом уровне (3–7 сут). Высказано предположение об участии генов транскрипционных факторов *CBF1* и *DREB1* в неспецифических защитно-приспособительных реакциях растений пшеницы на действие ионов кадмия.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum* L., содержание кадмия, экспрессия генов, транскрипционный фактор.

### **N. S. Repkina, V. V. Talanova, L. V. Topchieva, Yu. V. Batova, A. F. Titov. EFFECT OF CADMIUM ON GENE EXPRESSION OF THE TRANSCRIPTION FACTORS CBF1 AND DREB1 IN WHEAT SEEDLING LEAVES**

We studied the effect of cadmium on the expression of genes encoding the transcription factors CBF1 and DREB1 in leaves of cv. Moscovskaya 39 winter wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings in a controlled environment. In the first 5 h of cadmium impact (100 µM) on the roots of the seedlings its content in the leaves remained nearly unchanged, but after 1 day of the impact it rose sharply and continued to grow throughout the experiment (7 full days). Contrastingly, the level of *CBF1* and *DREB1* gene expression rose significantly after just 15 min of the cadmium impact on the seedlings, and peaked in an hour. Further on (in 5 h) *DREB1* gene expression decreased somewhat, but remained elevated until the end of the experiment (7 full days). The content of *CBF1* gene transcripts decreased in the 5<sup>th</sup>–48<sup>th</sup> h of the cadmium impact, and then rose again to remain at the level reached thereafter (3–7 full days). The assumption was made that CBF1/DREB1 transcription factor genes take part in nonspecific protective and adaptive responses of wheat plants to cadmium ion impact.

**Key words:** *Triticum aestivum* L., cadmium content, gene expression, transcription factor.

## Введение

Исследования многих авторов показывают, что важную роль в процессах адаптации растений к неблагоприятным факторам внешней среды играют подавление экспрессии генов и соответственно торможение синтеза белков, характерных для жизнедеятельности клетки в обычных условиях, и активизация генов, кодирующих белки, которые принимают участие в адаптивных реакциях [Титов и др., 2006; Колупаев, Карпец, 2010]. В последние годы такие данные появились в литературе, посвященной воздействию на растения различных по своей природе стрессоров, включая тяжелые металлы. В них, в частности, рассматривается влияние тяжелых металлов на экспрессию генов, кодирующих транспортные белки [Morel et al., 2009], металлотионеины [Cobett, Goldsbrough, 2002], ферменты синтеза фитохелатинов [Wojas et al., 2008] и глутатиона [Bogs et al., 2003].

Как показывают подобные исследования, ключевую роль в активации генов и синтезе стрессовых белков под влиянием тех или иных стресс-факторов, в том числе тяжелых металлов, играют транскрипционные факторы. К ним, например, относятся и продукты генов *CBF1* и *DREB1* – CBFs (C-repeat-binding factors) и DREB1s (dehydration-responsive element-binding factors 1) [Purdy et al., 2011]. На модельном генетическом объекте *Arabidopsis thaliana* L. установлена роль этих генов в индукции транскрипции за счет связывания с регуляторным элементом CRT/DRE (C-repeat/dehydration responsive element), расположенным в промоторном участке многих регулируемых стресс-факторами генов [Medina et al., 2011]. В частности, появились данные об участии генов *CBF1* и *DREB1* в процессах адаптации растений к действию холода [Gilmour et al., 1998; Fowler, Thomashow, 2002; Van Buskirk, Thomashow, 2006] и засухи [Haake et al., 2002; De Leonardis et al., 2007]. Показано также, что транскрипция других генов этого семейства транскрипционных факторов (AP2/ERF), таких как *DREB2A* и *DREB2B*, регулируется засолением [Dubouzet et al., 2003; Matsui et al., 2008], высокими температурами [Kang et al., 2011] и обезвоживанием [Nakashima et al., 2000]. Однако сведения об экспрессии генов этого семейства, в том числе транскрипционных факторов *CBF1* и *DREB1* в условиях действия на растения тяжелых металлов, в известной нам литературе отсутствуют.

Исходя из этого целью нашей работы являлось исследование влияния кадмия на экспрессию генов транскрипционных факторов *CBF1* и *DREB1* у проростков пшеницы.

## Материал и методы

Эксперименты проводили с проростками озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39, выращенными в рулонах фильтровальной бумаги на питательном растворе Кнопа (рН 6,2–6,4) в камере искусственного климата при температуре воздуха 25 °С, его относительной влажности 60–70 %, освещенности 10 клк и фотопериоде 14 ч. По достижении недельного возраста проростки подвергали действию сульфата кадмия (100 мкМ) в течение 7 сут при сохранении прочих условий неизменными.

Реакцию растений на действие кадмия оценивали по изменению ростовых параметров, таких как длина побега и длина 1-го листа.

Содержание кадмия в листьях растений определяли методом инверсионной вольтамперометрии с использованием полярографа ABC-1.1. («Вольт», Россия). Разложение растительных образцов проводили в смеси  $\text{HNO}_3$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  в соотношении 4 : 1 с использованием микроволновой системы пробоподготовки MC-6 («Вольта»).

Для выделения РНК навеску листьев пшеницы (50 мг) растирали в жидком азоте. Тотальную РНК выделяли с помощью набора Yellow Solve («Силекс», Россия). кДНК синтезировали, используя набор для обратной транскрипции с M-MLV обратной транскриптазой и случайными (random) гексапраймерами («Силекс»). Количество и качество кДНК проверяли спектрофотометрически на приборе SmartSpec Plus («Bio-Rad», США). Уровень экспрессии генов в листьях пшеницы анализировали методом ПЦР в режиме реального времени. Амплификацию проводили в приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 («Bio-Rad», США), используя набор для амплификации с интеркалирующим красителем SYBR Green («Синтол», Россия). Смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала 1 мкл кДНК (100 нг), 10 мкл реакционной смеси, по 1 мкл прямого и обратного праймера, 1 мкл  $\text{MgCl}_2$  и 17 мкл деионизованной воды, свободной от нуклеаз. Для ПЦР в режиме реального времени использовали праймеры («Синтол», Россия), представленные в табл. 1. В качестве референсного гена использовали актин. Протокол ПЦР: 5 мин при 95 °С, 30 с при 56 °С, 30 с при 72 °С (40 циклов). Специфичность продуктов амплификации

проверяли плавлением ПЦР фрагментов: 1 мин при 95 °С, 1 мин при 56 °С, 10 с при 56 °С (80 циклов, повышая в каждом цикле температуру на 0,5 °С). Относительный уровень экспрессии генов растений, подвергнутых воздействию кадмия (100 мкМ), вычисляли по формуле:

$$OUЭ = 2^{\frac{St(контрольный) - St(тестовый образец)}{C}}$$

где *OUЭ* – относительный уровень экспрессии; *St* – значение пороговых циклов.

В качестве контрольных образцов были выделены кДНК, выделенные из растений, не подвергнутых воздействию металла.

Таблица 1. Праймеры для проведения ПЦР в режиме реального времени

Ген	Нуклеотидная последовательность	
	прямого праймера 5' ...3'	обратного праймера 5' ...3'
<i>DREB1</i>	GTGGСТААТСТСАГГАА	GCCCGАТААТААГСАСАТА
<i>CBF1</i>	TCGCCАТАСТGCCGTTC	CCTGAАТСАСТGCCAC
<i>Actin</i>	GGACCCACGGATAАТСТААТG	AACTCCACTGAGAACAACАТТАС

На рисунках приведены средние арифметические значения из двух независимых опытов и их стандартные отклонения. Повторность при анализе ростовых показателей 50-кратная, при химическом анализе – 3-кратная, а при проведении ПЦР-анализа – 2-кратная. В статье обсуждаются величины, достоверные при  $P \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Исследования показали, что кадмий в концентрации 100 мкМ отрицательно влияет на рост проростков пшеницы. Так, за 7 сут эксперимента прирост побега у обработанных кадмием проростков составил всего 7 %, в то время как у проростков контрольного варианта – 26 % (табл. 2). Увеличение длины 1-го листа составило в опытном варианте 9 %, а в контрольном – 12 %. Таким образом, кадмий ингибировал рост проростков пшеницы, хотя их видимого повреждения при этом не происходило.

Таблица 2. Влияние кадмия на рост проростков пшеницы

Концентрация кадмия, мкМ	Прирост по отношению к исходному уровню, %					
	Экспозиция, сут					
	0	1	2	3	6	7
	Длина побега					
0	100	100	101	101	125*	126*
100	100	100	101	101	106*	107*
	Длина 1-го листа					
0	100	100	100	103*	111*	112*
100	100	100	100	101	109*	109*

Примечание. \* – различия с исходным уровнем достоверны при  $P \leq 0,05$ .

Анализ содержания кадмия в листьях показал следующее. В первые 1–5 ч воздействия кадмия на корни проростков его концентрация в листьях практически не повышалась. Спустя 1 сут содержание кадмия в листьях возрастало с 0,03 до 0,2 мкг/г сырой массы (рис. 1) и в дальнейшем продолжало нарастать, достигая максимального значения (2,59 мкг/г сырой массы) на 7-е сутки эксперимента.

Крайне важно, что уже 15-минутное воздействие кадмия на проростки пшеницы приводило к существенному усилению (в 1,5–2 раза по сравнению с исходным уровнем) экспрессии как *CBF1*, так и *DREB1* генов в листьях (рис. 2). Через 1 ч уровень экспрессии гена *CBF1* возрастал в 4 раза, а гена *DREB1* – в 5,5 раза и достигал максимального уровня. В дальнейшем (через 5 ч) содержание транскриптов гена *DREB1* несколько снижалось, но даже через 6–7 сут от начала эксперимента оно примерно в 3 раза превышало исходные значения. Содержание транскриптов гена *CBF1* в последующие 5–48 ч действия кадмия снижалось, однако на третьи сутки вновь возрастало до максимального уровня и в дальнейшем оставалось неизменным до конца опыта.

Установленный нами при воздействии кадмия на проростки пшеницы сходный характер изменения экспрессии генов *CBF1* и *DREB1* может объясняться тем, что они относятся к одной подгруппе (*DREB1/CBF*) генов *AP2/ERF* семейства транскрипционных факторов. Как показывает геномный анализ *A. thaliana*, *CBF* гены организованы в тандемы (*DRB1A/CBF3*, *DREB1B/CBF1* и *DREB1C/CBF2*) на 4-й хромосоме [Medina et al., 2011]. Полученные нами результаты о повышении уровня экспрессии генов транскрипционных факторов *CBF1* и *DREB1* уже в самый начальный период действия кадмия (15–30 мин) и достижении его максимального значения через 1 ч согласуются с данными, полученными на растениях *A. thaliana*, подвергнутых охлаждению. В частности, у *A. thaliana* гены *CBF1* и *DREB1* также экспрессируются уже через 15 мин от начала действия температуры 4 °С, достигая максимального значения через 2 ч [Fowler, Thomashow, 2002]. Как известно, *CBF* транскрипционные факторы арабидопсиса играют ключевую роль в процессах адаптации к низким температурам, контролируя экспрессию более 100 генов, обеспечивающих повышение морозоустойчивости [Canella et al., 2010].

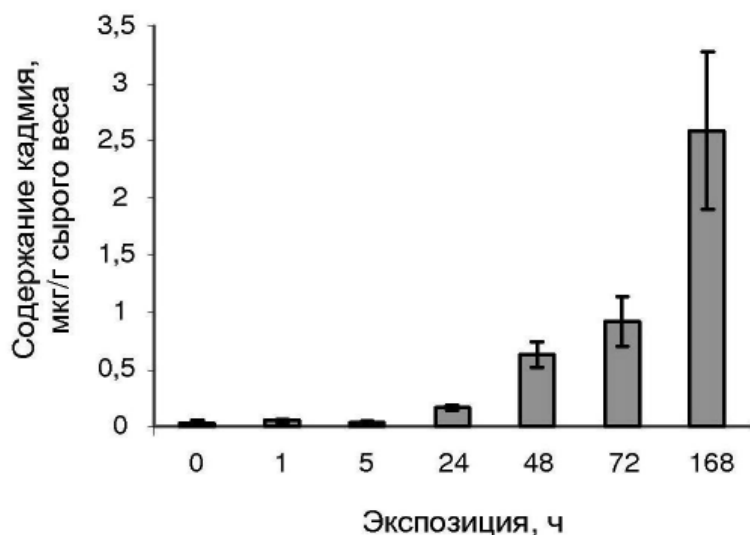


Рис. 1. Влияние продолжительности воздействия кадмия (100 мкМ) на его содержание в листьях проростков пшеницы

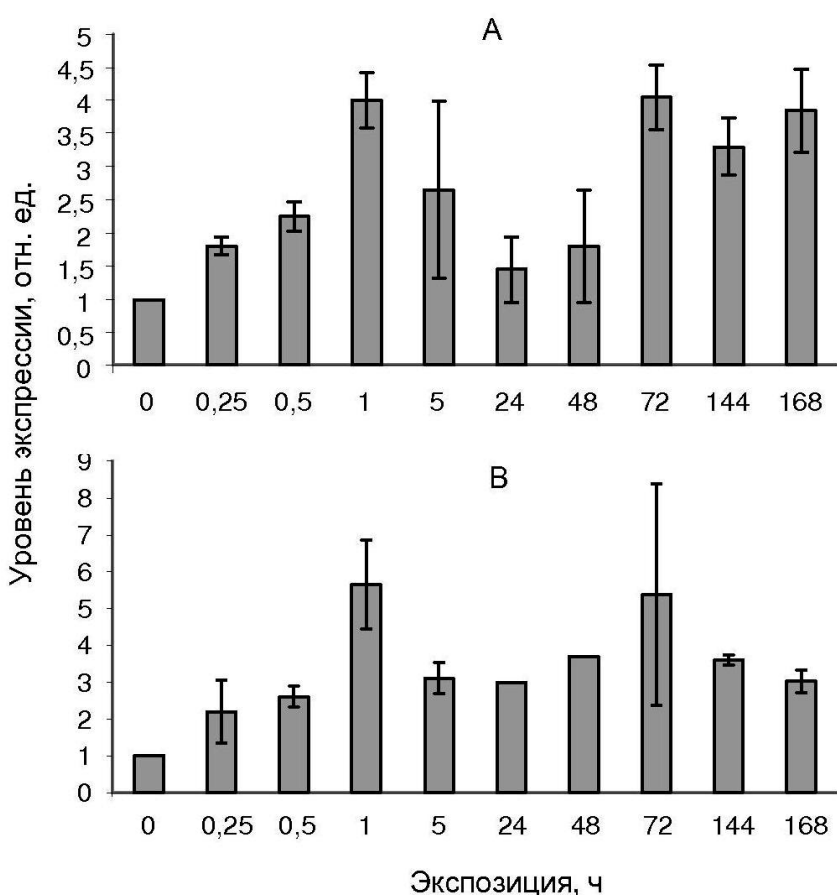


Рис. 2. Влияние продолжительности воздействия кадмия (100 мкМ) на экспрессию генов, кодирующих транскрипционные факторы *CBF1* (A) и *DREB1* (B) в листьях проростков пшеницы

Уровень экспрессии генов у растений контрольного варианта (без обработки кадмием) принят за единицу

Обнаружено, что транскрипционные факторы, кодируемые генами *CBF1* и *DREB1*, содержат AP2/ERF DNA-binding домены, которые распознаются CRT/DRE элементом, находящимся в промоторном участке *COR* генов (cold-regulated), продуктами которых являются COR белки, участвующие в процессе формирования высокой морозоустойчивости [Gilmour al., 1998; Purdy et al., 2011].

Следует отметить, что нами было выявлено повторное значительное повышение содержания транскриптов гена *CBF1* на третьи сутки воздействия кадмия. Учитывая это, можно предположить, что увеличение экспрессии гена *CBF1* в листьях проростков пшеницы связано с их реакцией не только на кратковременное (минуты, часы) воздействие кадмия, но и на более продолжительное (сутки), когда за ука-

занный период времени происходит значительное накопление металла в листьях. Не исключено, что в дальнейшем это может привести к усилению экспрессии генов COR белков. Подчеркнем, однако, что в известной нам литературе данные, касающиеся динамики экспрессии гена *CBF1* при длительных (суточных) воздействиях стресс-факторов, включая низкую температуру, отсутствуют.

Отметим также, что имеющиеся в литературе данные о роли генов *CBF1* и *DREB1* в адаптивных реакциях растений на действие низких температур [Gilmour et al., 1998; Van Buskirk et al., 2006] и засухи [Haake et al., 2002; Matsui et al., 2008] касаются в основном *A. thaliana*. Между тем гены *AP2/ERF* семейства и гомологи *CBF* генов обнаружены и у других видов растений, например *CBF1* – у картофеля [Pennycooke et al., 2008], *HvCBF2* – у ячменя [Xue, 2003], *DREB1/CBF* – у риса [Dubouzet et al., 2003], *DREB1A* – у пшеницы [De Leonardis et al., 2007], *CBF* – у огурца [Таланова и др., 2008].

Таким образом, анализ полученных нами результатов и данных других авторов позволяет заключить, что возрастание уровня экспрессии генов транскрипционных факторов *CBF1* и *DREB1* можно рассматривать как свидетельство их участия в неспецифических защитно-приспособительных реакциях растений пшеницы на действие ионов кадмия.

## Литература

Колупаев Ю. Е., Карпец Ю. В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. Киев: Основа, 2010. 352 с.

Таланова В. В., Титов А. Ф., Топчиева Л. В., Малышева И. Е. Влияние стресс-факторов на экспрессию гена транскрипционного фактора CBF у растений огурца // Докл. АН. 2008. Т. 423, № 2. С. 283–285.

Титов А. Ф., Акимова Т. В., Таланова В. В., Топчиева Л. В. Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. М.: Наука, 2006. 143 с.

Bogs J., Bourbonloux A., Cagnac O. et al. Functional characterization and expression analysis of a glutathione transporter, BjGT1 from *Brassica jincea*: evidence for regulation by heavy metal exposure // Plant Cell Environ. 2003. Vol. 26. P. 1703–1711.

Canella D., Gilmour S. J., Kuhn L. A., Thomashow M. F. DNA binding by the Arabidopsis CBF1 transcription factor requires the KKP/RAGRxFxTRHP signature sequence // Biochim. Biophys. Acta. 2010. Vol. 1799. P. 454–462.

Cobett C., Goldsbrough P. Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis // Annu. Rev. Plant Biol. 2002. Vol. 53. P. 159–182.

De Leonardis A. M., Marone S., Mazzucotelli E. et al. Durum wheat genes up-regulated in the early phases of cold stress are modulated by drought in a developmental and genotype dependent manner // Plant Sci. 2007. Vol. 172. P. 1005–1016.

Dubouzet J. G., Sakuma Y., Ito Y. et al. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold – responsive gene expression // Plant J. 2003. Vol. 33. P. 751–763.

Fowler S., Thomashow M. F. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway // Plant Cell. 2002. Vol. 14. P. 1675–1690.

Gilmour S. J., Zarka D. G., Stockinger E. J., Salazar M. P., Houghton J. M., Thomashow M. F. Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression // Plant J. 1998. Vol. 16, N 6. P. 433–442.

Haake V., Cook D., Riechmann J. L. et al. Transcription factor CBF4 is regulator of drought adaptation in Arabidopsis // Plant Physiol. 2002. Vol. 130. P. 639–648.

Kang H.-G., Kim J., Kim B. et al. Overexpression of *FTL1/DDF1*, AN AP2 transcription factor, enhances tolerance to cold, drought, and heat stresses in *Arabidopsis thaliana* // Plant Sci. 2011. Vol. 180. P. 634–641.

Matsui A., Ishida J., Morosawa T. et al. Arabidopsis transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array // Plant Cell Physiol. 2008. Vol. 49. P. 1135–1149.

Medina J., Catala R., Salinas J. The CBFs: Three Arabidopsis transcription factors to cold acclimate // Plant Sci. 2011. Vol. 180. P. 3–11.

Morel M., Crouzet., Gravot A. et al. AtHMA3, a P<sub>1B</sub>-ATPase Allowing Cd/Zn/Co/Pb Vacuolar Storage in Arabidopsis<sup>TM</sup> // Plant Physiol. 2009. Vol. 149. P. 894–904.

Nakashima K., Shinwari., Sakuma Y. et al. Organization and expression of two Arabidopsis *DREB2* genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression // Plant Mol. Biol. 2000. Vol. 42. P. 657–665.

Pennycooke J. C., Cheng H., Roberts S. M. et al. The low temperature-responsive, *Solanum CBF1* genes maintain high identity in their upstream regions in genomic environment undergoing gene duplications, deletions, and rearrangements // Plant. Mol. Biol. 2008. Vol. 67. P. 483–497.

Purdy S. J., John D. B., Nelson D. C. et al. A nuclear-localized protein, KOLD SENSITIV-1, affects the expression of cold-responsive genes during prolonged chilling in Arabidopsis // J. Plant Physiol. 2011. Vol. 168. P. 263–269.

Van Buskirk H. A., Thomashow M. F. Arabidopsis transcription factors regulating cold acclimation // Physiol. Planta. 2006. Vol. 126, N 1. P. 72–80.

Wojas S., Clemens S., Hennig J. et al. Overexpression of phytochelatin synthase in tobacco: distinctive effects of AtPCS1 and CePCS genes on plant

response to cadmium // J. Exp. Bot. 2008. Vol. 59, N. 8. P. 2205–2219.

Xue G. P. The DNA-binding activity of an AP2 transcriptional activator HvCBF2 involved in regulation

of low-temperature responsive genes in barley is modulated by temperature // Plant J. 2003. Vol. 33. P. 373–383.

#### **СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:**

##### **Репкина Наталья Сергеевна**

аспирант  
Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: nrt9@ya.ru  
тел.: (8142) 762712

##### **Таланова Вера Викторовна**

ведущий научный сотрудник, д. б. н.  
Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: talanova@krc.karelia.ru  
тел.: (8142) 762712

##### **Топчиева Людмила Владимировна**

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

##### **Батова Юлия Валерьевна**

научный сотрудник, к. б. н.  
Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: batova@krc.karelia.ru  
тел.: (8142) 762706

##### **Титов Александр Федорович**

председатель КарНЦ РАН, чл.-корр. РАН, д. б. н.  
Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: krcras@krc.karelia.ru  
тел.: (8142) 769710

##### **Repkina, Natalia**

Institute of Biology, Karelian Research Centre,  
Russian Academy of Sciences  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: nrt9@ya.ru  
tel.: (8142) 762712

##### **Talanova, Vera**

Institute of Biology, Karelian Research Centre,  
Russian Academy of Sciences  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: talanova@krc.karelia.ru  
tel.: (8142) 762712

##### **Topchieva, Lyudmila**

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

##### **Batova, Yulia**

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

##### **Titov, Alexandr**

Institute of Biology, Karelian Research Centre,  
Russian Academy of Sciences  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: krcras@krc.karelia.ru  
tel.: (8142) 769710