

УДК 581.2;577.21

*И. Н. ДОМАНСКАЯ<sup>1</sup>, Е. А. БУДАКОВА<sup>1</sup>, С. Н. КУЛИНКОВИЧ<sup>2</sup>, Н. В. ШАЛЫГО<sup>1</sup>*

**УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ БЕЛКОВ ТЕРМОГЕНЕЗА  
КАК ПОКАЗАТЕЛЬ УСТОЙЧИВОСТИ ПРОРОСТКОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ  
(*TRITICUM AESTIVUM*) К НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМУ СТРЕССУ**

<sup>1</sup>*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, e-mail: domanin07@mail.ru,*

<sup>2</sup>*Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию, Минск*

*(Поступила в редакцию 11.12.2014)*

**Введение.** Современная стратегия селекции пшеницы направлена на повышение устойчивости сортов к абиотическим и биотическим стрессам при поддержании высокого уровня урожайности и качества зерна. Среди зерновых культур особое значение имеет озимая пшеница, из зерна которой вырабатывают высшие сорта муки, манную крупу, макароны и другие изделия. Наряду с этим зерно озимой пшеницы представляет большую ценность как техническое сырье для спиртового производства. При возделывании озимой пшеницы сельскохозяйственные производители регулярно несут материальные потери, поскольку ежегодно 2–4 % посевов гибнет в зимне-весенний период из-за низкотемпературного стресса и от ледяной корки. Особенно актуальна данная проблема для северной части нашей Республики, где преобладающим типом почвы являются тяжелые и средние суглинки. В результате ежегодные потери денежных средств составляют 2,5–3,5 млрд руб. и более. Проблему устойчивости растений к факторам внешней среды и к низкотемпературному стрессу в частности можно решить с помощью ДНК-технологий, которые позволяют получать новые высокопродуктивные сорта с детерминированным высоким уровнем адаптации к действию стрессоров.

Ответ растений на низкотемпературный стресс начинается непосредственно с момента начала охлаждения и протекает при участии стрессовых белков. Среди многочисленных механизмов, защищающих растения от низкотемпературного стресса, следует отметить механизм, связанный с термогенезом в митохондриях. Электрон-транспортная цепь митохондрий является одним из источников образования активных форм кислорода (АФК) в растительных клетках. В нормальных условиях содержание АФК в митохондриях поддерживается на низком уровне благодаря антиоксидантным системам, призванным постоянно их удалять [1–4]. Однако в условиях низкотемпературного стресса содержание АФК в клетках начинает увеличиваться и развивается окислительный стресс, который приводит к активации как антиоксидантной системы, участвующей непосредственно в детоксикации АФК, так и других компонентов защитной системы [2, 3]. К защитным компонентам относятся белки термогенеза – альтернативная цианидрезистентная оксидаза (АОХ) и АДФ/АТФ-антипортер. При термогенезе температура растения становится на несколько градусов выше температуры окружающей среды, что дает возможность растению адаптироваться к действию низких температур [1]. В литературе имеются сведения, что избыточное образование АФК предотвращается при помощи АОХ [1]. Активация АОХ позволяет растению эффективно переключать поток электронов в митохондриях на путь тепловой диссипации энергии. Переключение процесса дыхания на альтернативный путь при холодовом воздей-

ствии до конца не выяснен. Показано, что под действием низких положительных температур повышается уровень транскриптов АОХ, кодируемых геном *АОХ1*, в растениях риса, пшеницы, арабидопсиса [5–8]. В индукции экспрессии генов *АОХ1* могут принимать участие АФК [9, 10].

При более значимом повышении количества АФК к регуляции их уровня подключаются другие компоненты – разобщающие белки, функционирование которых также препятствует образованию АФК дыхательной цепью митохондрий [1]. У растений обнаружен белок (АДФ/АТФ-антипортер, который также называют АДФ/АТФ-переносящим белком митохондрий), участвующий в разобщении окислительного фосфорилирования жирными кислотами. В результате конкурентного блокирования АДФ/АТФ-антипортера жирными кислотами транспорт АДФ и АТФ через внутреннюю мембрану митохондрий ингибируется, повышается активность альтернативного пути транспорта электронов и усиливается рассеивание энергии в виде тепла. Значительное повышение уровня экспрессии гена *ANT*, ответственного за синтез АДФ/АТФ-антипортера, отмечено в работах [11, 12] при изучении проростков кукурузы и клубней картофеля, выращенных при пониженных температурах.

Цель работы – изучение влияния низкой температуры на экспрессию гена *АОХ1*, кодирующего альтернативную цианидрезистентную оксидазу, а также гена *ANT*, ответственного за синтез белка термогенеза – АДФ/АТФ-переносящего белка митохондрий, в проростках коллекционных и селекционных сортов озимой пшеницы.

**Объекты и методы исследования.** Объектом исследования были листья зеленых проростков озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) коллекционных сортов (Капылянка, Диканька, Безостая-1) и сортообразцов (Паненка-1, Паненка-2, Соната×Bussard-1, Соната×Bussard-2, Контур×Былина, Ритмо×Гелиос и Легенда×Гелиос), выращенных при температуре 22 °С в режиме 10 ч темноты и 14 ч света (люминесцентные лампы ЛД-40, 130 мкМ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>). Растения выращивали на водопроводной воде в специальных кюветах, имеющих отверстия для корней. При моделировании условий низкотемпературного стресса зеленые проростки пшеницы, выращенные до 7-дневного возраста, помещали в морозильную камеру с температурой –4 °С на 5 ч (стрессовый период). В ходе низкотемпературного стресса часть растений вымерзала, а другая часть оставалась неповрежденной. Из выживших растений составляли пробы. Контролем служили растения, выращенные при +22 °С в ходе всего эксперимента.

Для определения уровня экспрессии генов, кодирующих АДФ/АТФ-антипортер и АОХ, из листьев проростков озимой пшеницы выделяли общую РНК с помощью реагента *TRISOL* (Sigma, США) по протоколу фирмы. Для получения кДНК на матрице РНК использовали реакцию обратной транскрипции с применением обратной транскриптазы. Реакцию проводили по стандартному протоколу фирмы с помощью набора реагентов Revert Aid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo scientific, Литва). Расчет и дизайн праймеров для белка термогенеза и разобщающих белков проводили самостоятельно с использованием программы Vector NTI, используя последовательности клонированной ДНК, найденные в базе данных Nucleotide (NCBI) (табл. 1). Праймеры для *18S* рибосомальной РНК взяты из работы [13].

Т а б л и ц а 1. Нуклеотидная последовательность прямых (F) и обратных (R) праймеров, используемых в работе

Название белка	Ген	Праймеры
АДФ/АТФ-антипортер	<i>ANT</i>	F – GACAAGGATGGCTACTGGAA R – CCAAAGTAGAGACCAAGG
АОХ	<i>АОХ1</i>	F – GCGATGATGCTGGAGACGGT R – TCAAGAAGACGCCCTGGACG
18S рибосомальная РНК	<i>18S rRNA</i>	F – ATGATAACTCGACGGATCGC R – CTTGGATGTGGTAGCCGTTT

Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси. Условия амплификации для каждой пары праймеров подбирали экспериментально (табл. 2).

Таблица 2. Условия проведения ПЦР-анализа

Ген	Температура отжига праймеров, °С	Концентрация праймеров, пмоль	К-во циклов ПЦР	Размер продукта, п. н.
<i>ANT</i>	53,4	5	32	275
<i>AOXI</i>	64,0	20	32	220
<i>18S rRNA</i>	55,0–59,0	20	32	150

ПЦР-анализ проводили согласно методике, описанной в работе [14], на приборе MJ Mini Cycler (Bio-Rad, США) в следующих условиях: предварительная денатурация – при 95 °С, 3 мин; плавление – при 94 °С, 30 с; отжиг – при 53–64 °С, 45 с; элонгация – при 72 °С, 45 с, 32 цикла; конечная элонгация – при 72 °С, 10 мин; при 10 °С, 20 мин. Анализ полученных фрагментов проводили методом электрофореза в 2 %-ном агарозном геле, в ТАЕ (0,04 М Трис-ацетат, pH 8,0, 1 mM ЭДТА) буфере при постоянном напряжении 110 В и силе тока 144 мА в течение 35–40 мин. Продукты амплификации выявляли после прокрашивания 10×SYBR Green (Sigma-Aldrich) на приборе гель-документирования под УФ-светом (GelDoc 2000). Используемый метод может обеспечивать не только качественный, но и количественный анализ биологического материала, если параллельно с амплификацией соответствующих участков исследуемого гена проводить амплификацию с геном-нормализатором, экспрессия которого не изменяется при различных условиях роста растения (в наших опытах показано, что это ген *18S* рибосомальной РНК). Количественный анализ полученных продуктов ПЦР проводили в программе TotalLab TL120.

В работе представлены данные трех независимых опытов, проведенных в трехкратной биологической повторности со статистической обработкой результатов в программе Office Excel 2010.

**Результаты и их обсуждение.** На первом этапе работы с использованием проростков сорта Капылянка (стандарт) были подобраны температура и время действия стрессового фактора. Установлено, что оптимальная продолжительность действия стрессора составляет 5 ч при температуре –4 °С. При таких условиях выживаемость растений у сорта Капылянка составляет в среднем 70 %. Помещение в стрессовые условия (–4 °С, 5 ч) растений сортов Диканька и Безостая-1 показало, что проростки сорта Диканька более устойчивы (выживаемость выше в 1,23 раза), а сорта Безостая-1 менее устойчивы к моделируемому низкотемпературному стрессу (выживаемость ниже в 1,19 раза), чем проростки стандартного сорта Капылянка (рис. 1).

Уровень экспрессии генов *ANT* и *AOXI* в изученных сортах озимой пшеницы различался как в контроле, так и в условиях действия низкотемпературного стресса (рис. 2), что указывает на сортоспецифичность этого показателя. Так, контрольные проростки сорта Диканька имели более высокий уровень экспрессии гена *ANT* ( $140 \pm 12$  %) по сравнению с сортом Капылянка. Для растений сорта Безостая-1 исходный уровень экспрессии гена *ANT* был на 52 % ниже, чем у стандарта. При низкотемпературном стрессе (–4 °С, 5 ч) растения сорта Диканька сохраняли повы-

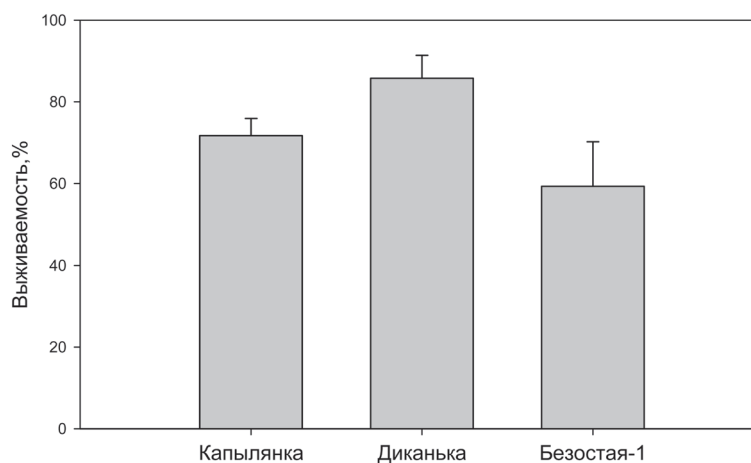


Рис. 1. Выживаемость проростков озимой пшеницы сортов Капылянка, Диканька и Безостая-1 в условиях низкотемпературного стресса (–4 °С в течение 5 ч)

шенный уровень экспрессии АДФ/АТФ-антипортера, который составил  $162 \pm 12$  % по сравнению с таковым у сорта Капылянка. Сорт Безостая-1 в стрессовый период по изучаемому параметру был на уровне стандарта (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Экспрессия генов *ANT* и *AOXI* в проростках озимой пшеницы в контроле и в условиях действия низкотемпературного стресса ( $-4$  °С, 5 ч)

Сорт	Экспрессия гена <i>ANT</i> , %		Экспрессия гена <i>AOXI</i> , %	
	Контроль	$-4$ °С, 5 ч	Контроль	$-4$ °С, 5 ч
Капылянка	100	100	100	100
Диканька	$140 \pm 12$	$162 \pm 12$	$263 \pm 20$	$251 \pm 17$
Безостая-1	$48 \pm 13$	$99 \pm 25$	$10 \pm 5$	$221 \pm 18$

Результаты исследования особенностей экспрессии гена *AOXI* в проростках коллекционных сортов озимой пшеницы при низкотемпературном стрессе отражены в табл. 3. У сорта Диканька в контрольных растениях уровень экспрессии гена *AOXI* был выше ( $263 \pm 20$  %), чем у сорта Капылянка, у которого он практически не изменялся в условиях низкотемпературного стресса. Для сорта Безостая-1 в контрольных проростках зафиксировано незначительное количество ампликонов гена *AOXI* по сравнению со стандартом ( $10 \pm 5$ %), в то время как после низкотемпературного стресса экспрессия этого гена была выше по сравнению со стандартом практически в 2 раза.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что в условиях низкотемпературного стресса уровень экспрессии генов *ANT* и *AOXI* в растениях возрастает, однако корреляции этих показателей с выживаемостью растений не наблюдается. В то же время показатель уровня экспрессии генов *ANT* и *AOXI* в контрольных проростках без моделирования стрессовых условий согласуется с выживаемостью растений озимой пшеницы при низкотемпературном стрессе (см. рис. 1, табл. 3). Мы предположили, что этот показатель может быть использован в селекционном процессе для выявления генотипов озимой пшеницы с повышенной устойчивостью к действию низких температур. Для подтверждения данного предположения нами проведен анализ уровня экспрессии генов *ANT* и *AOXI* в селекционных образцах озимой пшеницы, выращенных в нормальных условиях. За 100 % принят уровень экспрессии генов *ANT* и *AOXI* в сорте Капылянка.

Установлено (табл. 4), что из 7 изученных сортообразцов проростки Паненка-1 и Ритмо×Гелиос характеризовались наиболее высоким уровнем экспрессии обоих генов по сравнению со стандартом (сорт Капылянка). В растениях других сортообразцов уровень экспрессии генов *ANT* и *AOXI* был либо ниже, либо незначительно выше стандарта, либо повышенный уровень экспрессии был отмечен только для одного гена. Полученные данные свидетельствуют о том, что проростки сортообразцов Паненка-1 и Ритмо×Гелиос более устойчивы к низкотемпературному стрессу по срав-

Т а б л и ц а 4. Экспрессия генов *ANT* и *AOXI* в проростках селекционных образцов озимой пшеницы, выращенных в нормальных условиях, и выживаемость растений при моделировании низкотемпературного стресса ( $-4$  °С, 5 ч)

Образец озимой пшеницы	Уровень экспрессии гена <i>ANT</i> , %	Уровень экспрессии гена <i>AOXI</i> , %	Выживаемость растений, %
Капылянка	100	100	$64 \pm 8$
Паненка-1	$125 \pm 10$	$117 \pm 12$	$76 \pm 14$
Паненка-2	$77 \pm 9$	$157 \pm 30$	$48 \pm 17$
Соната×Bussard-1	$93 \pm 15$	$101 \pm 7$	$48 \pm 16$
Соната×Bussard-2	$95,0 \pm 7$	$155 \pm 25$	$50 \pm 6$
Контур×Былина	$118 \pm 10$	$106 \pm 2$	$51 \pm 25$
Ритмо×Гелиос	$122 \pm 3$	$127 \pm 12$	$75 \pm 9$
Легенда×Гелиос	$92 \pm 5$	$93 \pm 11$	$30 \pm 20$

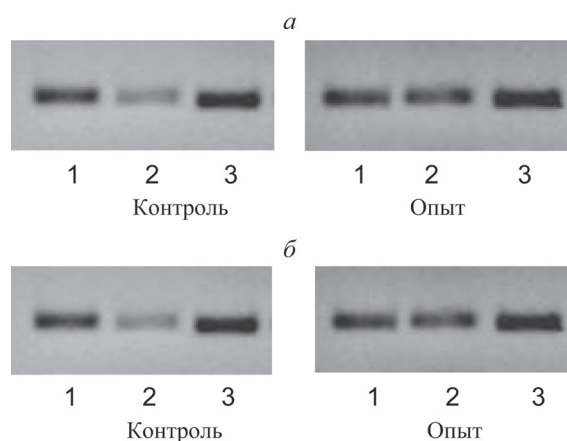


Рис. 2. Экспрессия генов *AOXI* (а) и *ANT* (б) в проростках озимой пшеницы сортов Капылянка (1), Безостая-1 (2), Диканька (3) в контроле и в условиях низкотемпературного стресса ( $-4$  °С в течение 5 ч)

нению с другими изученными образцами. Правильность такого вывода была подтверждена экспериментально в модельных опытах с использованием низкотемпературного стресса ( $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 ч). Действительно, выживаемость проростков сортообразцов Паненка-1 и Ритмо×Гелиос в условиях стресса оказалась более высокой, чем у других сортообразцов (табл. 4).

**Заключение.** Установлена прямая зависимость между уровнем экспрессии генов *ANT* и *AOXI* (кодирующих АДФ/АТФ-переносимый белок и альтернативную цианидрезистентную оксидазу митохондрий соответственно), зарегистрированным в проростках озимой пшеницы в нормальных условиях выращивания, и повышенной устойчивостью растений к низкотемпературному стрессу. С помощью показателя уровня экспрессии генов *ANT* и *AOXI* выявлены перспективные сортообразцы озимой пшеницы с повышенной устойчивостью к действию низких температур, что указывает на перспективность его использования в селекционном процессе озимой пшеницы.

## Литература

1. Колесниченко А. В., Войников В. К. // Белки низкотемпературного стресса растений. Иркутск, 2003. – 196 с.
2. Шалыго Н. В., Доманская И. Н., Радюк М. С. и др. // Физиол. раст. 2012. Т. 9, № 6. С. 746–755.
3. Радюк М. С., Доманская И. Н., Щербаков Р. А. и др. // Физиол. раст. и генетика. 2013. Т. 45, № 5. С. 442–450.
4. Navrot N., Rouhier N. et al. // *Physiol. Plant.* 2007. Vol. 129. P. 185–195.
5. Юрина Н. П., Одинцова М. С. // Физиол. раст. 2010. Т. 57. С. 9–22.
6. Ito Y., Saisho D., Nakazono M. et al. // *Gene.* 1997. Vol. 203. P. 121–129.
7. Takumi S., Tomioka M. et al. // *Gen. Genet. Syst.* 2002. Vol. 77. P. 81–88.
8. Mizuno N., Sugie A. et al. // *Plant Physiol.* 2008. Vol. 165. P. 462–467.
9. Blokhina O. B., Fagerstedt K. V. // *Plant Physiol.* 2010. Vol. 138. P. 447–462.
10. Smith A. M., Kristensen B. K. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004. Vol. 3. P. 730–735.
11. Grabelnych O. I. // *J. of Stress Physiol.* 2013. Vol. 9, N 4. P. 319–328.
12. Попов В. Н., Епринцев А. В. и др. // Физиол. раст. 2011. Т. 58, № 5. С. 758–765.
13. Walia H., Wilson C. et al. // *Funct. Integr. Genomics.* 2006. Vol. 2. P. 143–156.
14. Технология ДНК-типирования генов устойчивости ячменя к засухе: метод. указания. Минск, 2011.

I. N. DOMANSKAJA, E. A. BUDAKOVA, E. A. KULINKOVICH, N. V. SHALYGO

### THE THERMOGENESIS PROTEINS GENE EXPRESSION LEVEL AS AN INDICATOR OF THE WINTER WHEAT SEEDLINGS (*TRITICUM AESTIVUM*) LOW TEMPERATURE STRESS TOLERANCE

#### Summary

The expression of *AOXI* and *ANT* genes encoding ADP/ATP-transporting protein and cyanide-resistant oxidase respectively in seedlings of different winter wheat varieties under low temperature stress is studied. It is shown that under normal conditions the expression levels of genes encoding ADP/ATP-antiporter (*ANT*) and mitochondrial cyanide-resistant oxidase is higher in winter wheat varieties more tolerant to low temperature stress. With the help of the «level of *ANT* and *AOXI* gene expression» parameter promising accessions of winter wheat with increased resistance to the low temperatures were revealed, which indicates the prospects of usage of this parameter in the selection process of winter wheat.