

УДК 58.02:577.2

И. А. ДРЕМУК, Н. В. ШАЛЫГО

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ЗАЩИТНЫХ БЕЛКОВ МИТОХОНДРИЙ И АКТИВНОСТЬ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ В ПРОРОСТКАХ ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE*) ПРИ СОВМЕСТНОМ ДЕЙСТВИИ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ И ИЗБЫТОЧНОГО УВЛАЖНЕНИЯ

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, e-mail: irinadremuk@yandex.ru

(Поступила в редакцию 14.11.2013)

Введение. В настоящее время большой научный и практический интерес вызывает проблема устойчивости сельскохозяйственных растений к повреждающему действию абиотических факторов внешней среды. Большинство исследований в этом направлении посвящено влиянию на растения одного стрессора, например, засухи, высокой или низкой температуры, избыточного увлажнения и др. Однако в реальных условиях на растения влияет сразу несколько стрессовых факторов, совместное действие которых может отличаться от их действия по отдельности.

В литературе имеются данные, посвященные комплексному влиянию на растительные организмы засухи и теплового шока [1], солевого стресса и гипертермии [2]. Однако работ по совместному действию стрессовых факторов, таких как низкая температура (НТ) и избыточное увлажнение (ИУ) почвы (подтопление), крайне мало. Следует отметить, что в весенний период сельскохозяйственные растения все чаще находятся под влиянием НТ и ИУ. Одной из причин повреждающего действия этих стрессоров является образование активных форм кислорода, что приводит к интенсификации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [3–5]. Данные последних лет свидетельствуют о том, что одним из клеточных компартментов, в котором накапливаются активные формы кислорода при низкотемпературном стрессе и стрессе, вызванном ИУ, являются митохондрии [6]. Митохондрии имеют мощную антиоксидантную систему, позволяющую растительной клетке регулировать уровень активных форм кислорода и контролировать интенсивность процессов ПОЛ. Кроме того, компонентами защитной системы митохондрий являются стрессовые белки, среди которых важную роль играют альтернативная оксидаза (АО) и АТФ/АДФ-антипортер [7, 8].

Основной функцией АТФ/АДФ-антипортера является обмен цитозольного АДФ на внутримитохондриальный АТФ [9]. Обнаружено, что в митохондриях гороха, подсолнечника [10], клубней картофеля [11] АТФ/АДФ-антипортер участвует в индуцированном жирными кислотами разобщении окислительного фосфорилирования. При этом субстраты окисляются, однако АТФ не синтезируется, а избыточная энергия рассеивается в виде тепла, что позволяет растению поддерживать более высокую внутриклеточную температуру по сравнению с температурой окружающей среды [12], что очень важно в условиях низкотемпературного стресса.

АО – белок ядерного кодирования, активация которого позволяет растению при дыхании эффективно переключать поток электронов с основной электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) на альтернативный путь, при котором энергия рассеивается в виде тепла [13]. Установлено, что *in vivo* активность фермента сильно зависит от содержания белка и, следовательно, от уровня экспрессии его гена [14].

Известно, что в условиях НТ активность альтернативного пути дыхания с участием АО и НАДФН-дегидрогеназ возрастает [13], тогда как при гипоксии, вызванной подтоплением, определяющим оказывается основной путь дыхания с участием цитохромоксидазы (ЦО) [15]. ЦО – основ-

ной фермент митохондриальной ЭТЦ, который участвует в переносе электронов от НАДН к O_2 . Этот фермент имеет очень высокое сродство к кислороду (K_m (для O_2) – примерно 0,14 мкМ) [16].

Цель данной работы – изучение особенностей функционирования защитных белков митохондрий (АТФ/АДФ-антипортера и АО) и фермента основного дыхательного пути (ЦО), при совместном действии НТ и ИУ.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования служили проростки ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Гонар, выращенные при температуре +23 °С (± 2 °С) в режиме 14 ч света (интенсивность 150 мкмоль квантов/м²·с) и 10 ч темноты. Для моделирования совместного действия НТ и ИУ 5-дневные растения ячменя на 3 сут (стрессовый период) помещали в холодильную камеру с температурой +4 °С и указанным выше фотопериодом и заливали водой до середины coleoptilya. Затем растения возвращали на 3 сут в нормальные условия выращивания (постстрессовый период). Навески листьев, срезанных выше coleoptilya, брали для исследования перед началом действия стрессоров, через 1 и 3 сут после начала действия стрессовых факторов, а также через 3 сут в постстрессовый период. В качестве основного контроля были выбраны растения ячменя, выращенные при нормальных условиях. Растения, находившиеся в условиях НТ (+4 °С) с нормальным водоснабжением, а также растения, находившиеся в условиях ИУ при температуре +23 °С, использовали как дополнительные контроли.

Выделение суммарной РНК из проростков ячменя с помощью реактива TRI Reagent (Sigma-Aldrich, Германия), а также синтез комплементарной ДНК проводили согласно методу, подробно описанному в [17]. Уровень экспрессии генов *ANT* и *AOXI*, кодирующих АТФ/АДФ-антипортер и АО соответственно, определяли методом ПЦР-анализа с использованием ген-специфичных праймеров, а также гена-нормализатора (*18S rRNA*) с последующей визуальной идентификацией полученных продуктов амплификации после разделения в агарозном геле. Праймеры, используемые в работе, представлены в таблице. Праймеры для генов *ANT* и *AOXI* подбирали самостоятельно, праймеры для гена *18S rRNA* взяты из работы [18].

Активность ЦО определяли спектрофотометрическим методом, основанном на измерении скорости снижения оптической плотности при длине волны 550 нм, обусловленной окислением цитохрома *c* (Цит *c*) [19].

Нуклеотидная последовательность прямых (F) и обратных (R) праймеров, специфичных к генам *ANT*, *AOXI* и *18S rRNA*

Название	Ген	Праймеры
АТФ/АДФ-антипортер	<i>ANT</i>	F-GACAAGGATGGCTACTGGAA R-CCAAAGTAGAGACCACGG
Альтернативная оксидаза	<i>AOXI</i>	F-CGCGCAGGGCGTCTTCTTCA R-TCGGCTGGAAGGCCGACAGTA
18S рибосомальная РНК	<i>18S rRNA</i>	F-ATGATAACTCGACGGATCGC R-CTTGGATGTGGTAGCCGTTT

Для получения грубого ферментного препарата навеску растительного материала (0,3 г) растирали в ступке при 4 °С в 1,5 мл охлажденного 0,1 М К,Na-фосфатного буфера с рН 7,4, содержащего тритон Х-100. Полученный гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 13 000 g, используя центрифугу с охлаждением (Sigma, Германия). Далее в опытах использовали супернатант. Среда измерения содержала 1 мл 0,1 М К,Na-фосфатного буфера рН 7,4 и 0,3 мл полученного супернатанта. Реакцию запускали добавлением 10 мкл 4 мМ раствора восстановленного Цит *c* и спустя 20 с регистрировали кинетику окисления Цит *c* в течение 1 мин на спектрофотометре Uvikon 931 (Kontron Instruments, Германия). Активность ЦО рассчитывали используя коэффициент экстинкции 29,5 мМ⁻¹·см⁻¹ [20].

В работе представлены данные 3 независимых экспериментов, проведенных в 3-кратной биологической повторности. Для статистической обработки данных использовалась программа SigmaPlot 11.0.

Результаты и их обсуждение. Анализ экспрессии генов *ANT* и *AOX1* в условиях стресса (НТ, ИУ, НТ+ИУ) и в постстрессовый период показал, что уровень экспрессии данных генов изменяется по сравнению с контролем. Это отчетливо видно при разделении продуктов амплификации (рис. 1). Использование гена-нормализатора *18S rRNA* позволило количественно оценить эти изменения. Через 1 сут совместного действия НТ и ИУ, а также при их отдельном влиянии уровень экспрессии гена *ANT*, отвечающего за синтез АТФ/АДФ-антипортера, еще оставался на уровне контроля. Однако в последующие 2 сут в варианте НТ+ИУ, а также в условиях действия одной НТ уровень экспрессии *ANT* увеличивался на 29 ± 5 и 26 ± 6 % соответственно (рис. 2, а). После переноса растений в нормальные условия выращивания уровень экспрессии *ANT* снижался, тем не менее к концу постстрессового периода он оставался выше контроля на 4 ± 2 % в варианте с использованием НТ и на 7 ± 3 % в варианте при действии НТ+ИУ. В то же время, как в условиях действия ИУ, так и в постстрессовый период, степень экспрессии *ANT* не изменялась по сравнению с контролем. Полученные результаты согласуются с литературными данными об увеличении уровня экспрессии *ANT* в митохондриях риса и картофеля при низкотемпературном стрессе [21, 22] и указывают на то, что повышение экспрессии гена *ANT* при НТ+ИУ связано исключительно с влиянием НТ.

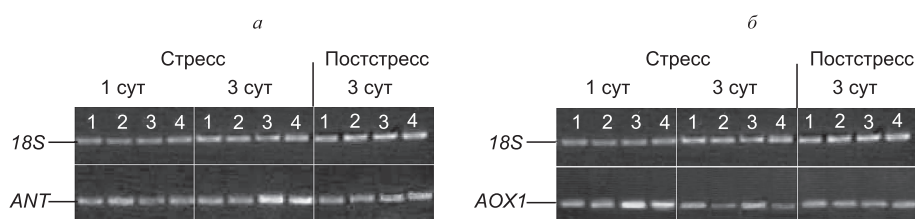


Рис. 1. Внешний вид агарозного геля после разделения продуктов амплификации кДНК с ген-специфичными праймерами для *ANT* (а) и *AOX1* (б). кДНК синтезирована на матрице РНК, выделенной из листьев ячменя в стрессовый и постстрессовый периоды при действии ИУ (2), НТ (3), при совместном действии НТ и ИУ (4), а также из листьев контрольных растений (1)

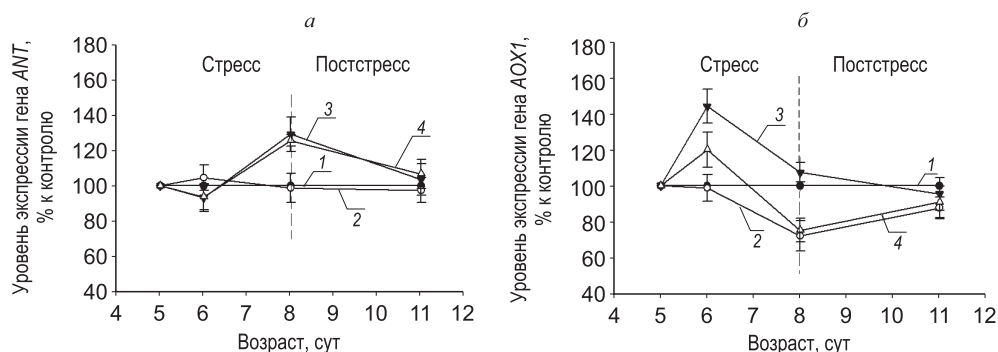


Рис. 2. Уровень экспрессии генов *ANT* (а) и *AOX1* (б) в листьях ячменя в стрессовый и постстрессовый периоды при действии ИУ (2), НТ (3) и при совместном действии НТ и ИУ (4), а также в листьях контрольных растений (1)

Количественный анализ динамики экспрессии гена *AOX1*, кодирующего АО, показал, что через 1 сут действия 2 стрессовых факторов (НТ+ИУ) и влияния только НТ уровень ампликонов изучаемого гена был выше контроля на 20 ± 6 и 44 ± 8 % соответственно, тогда как при действии ИУ экспрессия *AOX1* не изменялась по отношению к контролю. Однако через 3 сут воздействия НТ+ИУ уровень экспрессии *AOX1* снижался в той же степени, как и при действии одного ИУ (рис. 2, б). В литературе имеются данные о том, что в условиях недостатка кислорода (гипоксии) в растениях ячменя происходит снижение активности АО вследствие низкого сродства данного белка к кислороду, а также снижение уровня экспрессии гена *AOX1* [23]. Напротив, в условиях действия НТ происходит замедление цитохромного пути транспорта электронов и включаются альтернативные пути дыхания, в связи с чем наблюдается повышение активности АО и увеличе-

ние уровня экспрессии гена *AOX1*, связанное, прежде всего, с генерацией пероксида водорода [21]. Учитывая эти данные, можно предположить, что возрастание уровня экспрессии гена *AOX1* на начальном этапе комплексного воздействия НТ+ИУ связано с нарушением функционирования ЭТЦ митохондрий, вызванным низкотемпературным стрессом. Последующее снижение уровня экспрессии гена *AOX1* при действии НТ+ИУ связано с действием ИУ и обусловлено гипоксией, развивающейся при подтоплении.

Установлено, что через 1 сут действия ИУ, а также действия НТ+ИУ происходило увеличение активности ЦО на 7 ± 3 и $12 \pm 6\%$ соответственно, тогда как в условиях только низкотемпературного стресса активность данного фермента практически не отличалась от контроля (рис. 3). Однако уже к концу

стрессового периода активность ЦО в вариантах НТ и НТ+ИУ была ниже контрольного уровня на $9 \pm 3\%$, что свидетельствует о замедлении цитохромного пути транспорта электронов в таких растениях. В постстрессовый период активность ЦО в указанных вариантах приближалась к исходному уровню. В растениях, находившихся в условиях ИУ, активность ЦО, наоборот, увеличивалась и через 3 сут превышала контроль на $13 \pm 4\%$, оставаясь на том же уровне даже после возвращения растений в нормальные условия выращивания. Ранее на растениях картофеля было показано, что в условиях гипоксии ингибирование процесса дыхания происходит при более высоких концентрациях O_2 , чем $K_m(O_2)$ для ЦО, и поэтому не связано с прямым ограничением доступности кислорода для ЦО [16]. По-видимому, увеличение активности ЦО в листьях ячменя при действии ИУ на фоне ингибирования экспрессии гена *AOX1* можно рассматривать как защитный компенсационный механизм, необходимый для нормального обеспечения клеток листьев растений молекулами АТФ.

При сопоставлении динамики экспрессии гена *AOX1* (рис. 2, б) и изменения активности ЦО (рис. 3) при совместном действии 2 стрессовых факторов (НТ+ИУ) видно, что к концу стрессового периода снижается уровень ампликонов *AOX1*, что вызвано влиянием ИУ, а также ингибируется активность ЦО, что связано с воздействием НТ. Очевидно, в данных условиях происходит частичное нарушение как альтернативного пути дыхания, так и основного – цитохромоксидазного.

Заключение. Совместное действие НТ и ИУ приводит к увеличению уровня экспрессии гена *ANT*, кодирующего АТФ/АДФ-антипортер митохондрий, что обусловлено влиянием низкотемпературного стресса. При действии двух стрессовых факторов (НТ+ИУ) уровень экспрессии гена *AOX1*, ответственного за синтез АО в митохондриях, и активность ЦО проходят через максимум, что связано с преимущественным влиянием НТ и ИУ соответственно. В условиях длительного действия НТ+ИУ снижается уровень ампликонов *AOX1* и происходит ингибирование активности ЦО, что свидетельствует о нарушении как альтернативного, так и основного цитохромоксидазного дыхательных путей.

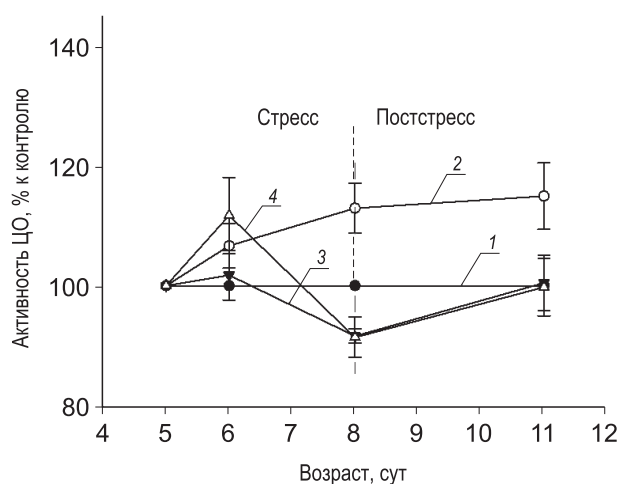


Рис. 3. Активность ЦО в листьях ячменя в стрессовый и постстрессовый периоды при действии ИУ (2), НТ (3) и при совместном действии НТ+ИУ (4), а также в листьях контрольных растений (1)

Литература

1. Sharma A. D., Kaur P. // General Applied Plant Physiol. 2009. Vol. 35. P. 88–92.
2. Wei Li, Chunyan Zhang, Qingtao Lu et al. // Journal of Plant Physiology. 2011. Vol. 168. P. 1743–1752.
3. Pucciariello Ch., Banti V., Pierdomenico P. // Plant Physiol Biochem. 2012. Vol. 59. P. 3–10.
4. Дремук И. А., Шалыго Н. В. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. №4. С. 52–56.
5. Кордюм Е. Л., Сьтнік К. М., Бараненко В. В. и др. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях. Киев, 2003.

6. Santis De A., Landi P., Genchi G. // Plant Physiol. 1999. Vol.119. P. 743–754.
7. Popov V.N., Eprintsev A. T., Maltseva E. V. // Russian Journal of Plant Physiology. 2011. Vol. 58, №5. P. 914–920.
8. Скулачев В.П. // Соросов. образоват. журн. 1998. №8. С. 2–7.
9. Vianello A., Petrussa E., Macri F. // FEBS Lett. 1994. Vol. 349. P. 407–410.
10. Popov V.N., Markova I.S., Mokhova E.N., Skulachev V.P. // Biochim. Biophys. Acta. 2002. Vol. 1553. P. 232–237.
11. Onda Y., Kato Y., Abe Y. et al. // Plant Physiol. 2008. Vol. 146. P. 636–645.
12. Van Aken O., Giraud E., Clifton R., Whelan J. // Physiol. Plant. 2009. Vol. 137. P. 354–361.
13. Umbach A.L. // FEBS Lett. 1994. Vol. 348. P. 181–184.
14. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. СПб., 2002.
15. Geigenberger P., Fernie A.R., Gibon Y. et al. // Biol. Chem. 2000. Vol. 381. P. 723–740.
16. Доманская И.Н., Радюк М.С., Будакова Е.А. et al. Технология ДНК-типирования генов устойчивости ячменя к засухе: методические указания. Мн., 2011.
17. Walia H., Wilson C., Wahid A., Condamine P. et al. // Funct. Integr. Genomics. 2006. Vol. 2. P. 143–156.
18. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. и др. Методы биохимического исследования растений. Л., 1987. С. 45–47.
19. Edmands S., Burton R. S. // Evolution. 1999. Vol 53, N 6. P. 1972–1978.
20. Hashimoto H., Nish R., Umeda M. et al. // Plant. Mol. Biol. 1993. Vol. 22. P. 163–164.
21. Popov V.N., Markova O. V., Mokhova E. N., Skulachev V.P. // Biochim. Biophys. Acta. 2002. Vol. 1553. P. 232–237.
22. Szal B., Jolivet Y., Hasenfratz-Sauder M.P. et al. // Physiologia Plantarum. 2003. Vol. 119. P. 494–502.
23. Попов Н.В., Епринцев А.Т., Мальцева Е.В. // Физиол. растен. 2011. Т. 58, №5. С. 758–765.

I. A. DREMUK, N. V. SHALYGO

**PROTECTIVE PROTEINS GENES EXPRESSION AND MITOCHONDRIAL CYTOCHROME OXIDASE
ACTIVITY IN BARLEY (*HORDEUM VULGARE*) UNDER THE COMBINED ACTION OF LOW TEMPERATURE
AND EXCESSIVE MOISTURE**

Summary

The combined action of low temperature and excessive moisture leads to an increase in expression of *ANT* gene, which encodes the ATP/ADP antiporter and that is due to the influence of low-temperature stress. Under the action of two stress factors (low temperature and excessive moisture) the expression level of the *AOXI* gene, responsible for the synthesis of the alternative oxidase in the mitochondria, and the activity of the cytochrome oxidase reaches a maximum, which is due to the primary influence of low temperature and excessive moisture, respectively. Prolonged action of above-mentioned stress factors reduces the level of *AOXI* amplicons and inhibits cytochrome oxidase activity that indicates a violation of both the alternative and main (cytochrome oxidase) respiration pathways.