

УДК 581.19: 57.045

С. М. ПАВЛЮЧКОВА, Н. В. ШАЛЫГО

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ ОКСИДАЗЫ
И АТФ/АДФ-АНТИПОРТЕРА В ТРАНСГЕННЫХ ПО Fe-СОД
И Mn-СОД РАСТЕНИЯХ ТАБАКА (*NICOTIANA TABACUM*)
В УСЛОВИЯХ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА**

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск,
email: svetlanapavluchkova@yandex.ru*

(Поступила в редакцию 15.06.2013)

Введение. При низкотемпературном стрессе основными источниками активных форм кислорода (АФК) являются хлоропласты и митохондрии [1]. Ранее мы показали, что эффективная нейтрализация АФК в этих клеточных компартментах за счет дополнительного увеличения в них содержания антиоксидантного фермента – супероксиддисмутазы (СОД) – позволяет усилить защиту растительной клетки от холодового воздействия [2]. В частности, на растениях табака (*Nicotiana tabacum* L.), трансформированных смысловым геном СОД (митохондриальной – Mn-СОД или хлоропластной – Fe-СОД), мы наблюдали повышенную активность антиоксидантной системы, что приводило к снижению окислительных процессов в трансформантах и предотвращению повреждений клеточных мембран в условиях низкотемпературного стресса (+4 °С, 22 ч) [3]. При этом трансгенные по Mn-СОД растения табака оказались более устойчивыми к низким температурам, чем растения, трансформированные Fe-СОД [3, 4].

Известно, что митохондрии растений играют ключевую роль в ответе растений на понижение температуры, так как в них имеется ряд систем, прямо или косвенно вовлекаемых в защиту растительной клетки от повреждающего действия низких температур через процесс термогенеза [5]. В функционировании таких систем участвуют белки, в частности, цианидрезистентная альтернативная оксидаза и АТФ/АДФ-антипортер (адениннуклеотидтранслоказа) [5].

В настоящее время получены многочисленные, зачастую неоднозначные, экспериментальные данные, о функционировании альтернативной оксидазы в условиях низкотемпературного стресса. Так, в работах [6–7] сообщается об активации альтернативной оксидазы через увеличение содержания фермента в растениях арабидопсиса и пшеницы под действием низких температур (+12 °С, –6 °С, 3 ч). Напротив, авторы [8–10] наблюдали снижение активности альтернативной оксидазы либо отсутствие достоверных изменений активности фермента в проростках кукурузы в условиях низкотемпературного стресса (+5–14 °С, 1–5 сут). Отмечается, что степень вовлечения альтернативного пути и его физиологическая роль в ответ на действие низких температур зависит от продолжительности действия стрессового фактора, состояния растительного организма и его устойчивости к данному виду стресса [8–11]. Менее устойчивые к стрессу генотипы растений характеризовались пониженным уровнем экспрессии гена *AOXI*, ответственного за синтез альтернативной оксидазы, по сравнению с более устойчивыми генотипами [11].

Важную роль в разобщении окислительного фосфорилирования в условиях пониженных температур играет АТФ/АДФ-антипортер, обеспечивающий импорт АДФ и экспорт АТФ. Было показано, что длительный низкотемпературный стресс (+10 °С, 5 сут) приводил к резкому увеличению в культуре клеток риса уровня экспрессии гена *ANT*, ответственного за синтез АТФ/АДФ-антипортера [12]. Существенное повышение уровня экспрессии гена *ANT* также было зафиксировано в митохондриях проростков кукурузы и клубней картофеля, выращенных при пониженных температурах [10, 13].

Следует отметить, что изменение активности генов *AOXI* и *ANT* в постстрессовый период, т. е. после прекращения действия стрессового фактора, практически не изучалось [14].

Целью данной работы явился сравнительный анализ уровня экспрессии генов, кодирующих альтернативную цианидрезистентную оксидазу и АТФ/АДФ-антипортер, в растениях табака, трансформированных смысловым геном хлоропластной Fe-СОД и митохондриальной Mn-СОД, а также растений дикого типа, находившихся в условиях действия низкой положительной температуры (+4 °С, 22 ч) и в постстрессовый период (+25 °С, 24 ч).

Материалы и методы исследования. В опытах использовали 3–4-й лист 45-дневных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.), трансформированных смысловым геном хлоропластной СОД (Fe-СОД) и митохондриальной СОД (Mn-СОД) арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L.).

Растения табака выращивались в пластмассовых емкостях в грунте «Восторг» с пониженным содержанием ионов Ca^{2+} (так как ионы Ca^{2+} ингибируют прорастание семян табака) под люминесцентными лампами белого света Philips TL-D 36W/765 (интенсивность 160 мкмоль квантов $\cdot m^{-2} \cdot c^{-1}$) в режиме 14 ч света и 10 ч темноты и влажности 60 %.

Низкотемпературный стресс моделировали помещая трансгенные растения табака и растения дикого типа в холодильную камеру на 22 ч с температурой +4 °С, режим и интенсивность освещения в холодильной камере соответствовали освещению при выращивании растений. Продолжительность стрессового воздействия и температурный режим были подобраны экспериментально [2]. После прекращения действия стрессового фактора табак помещали в нормальные условия выращивания (+25 °С) на 24 ч (постстрессовый период), отбор проб производили через 2, 4 и 24 ч после прекращения действия стрессового фактора. В качестве контроля использовали трансгенные растения табака и растения дикого типа, не подвергавшиеся стрессовому воздействию.

Уровень экспрессии генов *AOXI* и *ANT* определяли методом ПЦР-анализа с использованием кДНК, синтезированной на мРНК, и праймеров, рассчитанных нами для генов *AOXI*, *ANT* и гена-нормализатора актина (табл. 1). Экстракцию РНК из растительной ткани проводили с использованием в качестве среды выделения TRI Reagent («Sigma-Aldrich», Германия). Выделение суммарной РНК и синтез кДНК осуществляли согласно методике, подробно изложенной в работе [15]. В качестве дополнительного контроля использовали реакционную смесь без добавления кДНК (отрицательный контроль).

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

Белок	Ген	Праймеры
Альтернативная оксидаза	<i>AOXI</i>	F-TGTGTTGGGTCACATGGGTCC R-GGTAATGACCTGCCCATCTGG
АТФ/АДФ-антипортер	<i>ANT</i>	F-TGAGCTGGAATGTGTTTGCCATTGA R-GCCCCCAAGATAAACTGCCTTCC
Актин	<i>act</i>	F-GGTTACGCCCTTCCTCATGC R-GGTAATGACCTGCCCATCTGG

ПЦР-анализ проводили согласно методике, описанной в работе [15]. Оптимальные условия проведения амплификации были подобраны экспериментально (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Условия ПЦР-анализа с праймерами, используемыми для анализа

Ген	Температура отжига праймеров	Количество циклов ПЦР	Концентрация праймеров, пмоль
<i>AOXI</i>	59 °С	35	20
<i>ANT</i>	58 °С	35	20
<i>act</i>	55,6 °С	35	20

Продукты амплификации выявляли с помощью гель-электрофореза в 2%-ном агарозном геле после окрашивания 10 x SYBR Green («Sigma-Aldrich», Германия). В качестве маркера линейных размеров ДНК использовали ДНК маркер O'RangeRuler 100 bp, смешанный с 10 x SYBR Green.

Электрофорез проводили при напряжении 110 В и силе тока 144 мА в течение 40 мин. Регистрацию продуктов амплификации осуществляли при помощи системы гель-документирования под УФ-светом GelDoc 2000. Анализ полос, соответствующих продуктам ПЦР, проводили в программе TotalLab TL120.

Статистическую обработку результатов проводили в программе MS Office Excel 2010. В статье представлены данные 3 опытов, проведенных в 3-кратной биологической повторности.

Результаты и их обсуждение. В условиях низкотемпературного стресса, а также в постстрессовый период уровень экспрессии генов *AOX1* и *ANT* в растениях дикого типа и в трансформантах изменялся, что отчетливо видно после визуализации продуктов ПЦР-анализа (рис. 1).

В растениях дикого типа низкотемпературный стресс приводил к снижению уровня экспрессии генов *AOX1* на 23 % по сравнению с исходным уровнем (рис. 2, а). В трансформантах Fe-СОД в условиях низкой температуры уровень экспрессии гена *AOX1*, напротив, увеличивался на 37 %, а в трансгенных по Mn-СОД растениях – на 58 % по сравнению с уровнем, зафиксированным в трансформантах в нормальных условиях выращивания (рис. 2, а). При этом уровень экспрессии гена *AOX1* в трансгенных по Fe-СОД и Mn-СОД растениях при действии низкой температуры был выше, чем в растениях дикого типа в 2,0 и 2,4 раза соответственно. Через 2 ч после прекращения действия стрессового фактора данный показатель оставался на том же уровне, что и при стрессе во всех исследуемых растениях. После 4 ч постстрессового периода уровень экспрессии *AOX1* в диком типе начал увеличиваться и через 24 ч достигал исходного уровня. Напротив, в трансгенных по Fe-СОД и Mn-СОД растениях уровень экспрессии данного гена после 4 ч постстрессового периода постепенно снижался. Однако и через 24 ч после прекращения действия стрессора этот показатель был выше контроля, особенно в Mn-СОД трансформантах (рис. 2, а).

В растениях дикого типа низкотемпературный стресс также приводил к снижению уровня экспрессии гена *ANT* на 54 % по сравнению с исходным уровнем (рис. 2, б). В трансформантах Mn-СОД в условиях низкой температуры уровень экспрессии гена *ANT* увеличивался на 36 % по сравнению с исходным уровнем данного трансформанта, а в трансформантах Fe-СОД – оставался практически без изменений. В целом данный показатель в трансгенных по Fe-СОД и Mn-СОД растениях при стрессе превышал дикий тип в 2,2 и 3 раза соответственно. Через 2 ч после прекращения действия стрессового фактора уровень экспрессии гена *ANT* во всех исследуемых растениях увеличивался, причем в трансформантах Mn-СОД он был выше на 24 % по сравнению с трансформантами Fe-СОД и на 84 % выше по сравнению с диким типом. Через 4 ч постстрессового периода уровень экспрессии гена *ANT* в растениях дикого типа еще более возрастал и практически достигал исходного уровня, после чего не изменялся. В трансформантах уровень экспрессии гена *ANT* постепенно снижался и к 24 ч постстрессового периода приближался к исходным значениям (рис. 2, б).

Таким образом, в условиях низкотемпературного стресса и на протяжении всего постстрессового периода наиболее высокий уровень экспрессии генов белков термогенеза – альтернативной оксидазы и АТФ/АДФ-антипортера – был зафиксирован в растениях табака, трансформированных Mn-СОД, по сравнению с Fe-СОД трансформантами. В литературе имеются данные о том, что в проростках пшеницы гены альтернативной оксидазы ко-экспрессируются с генами

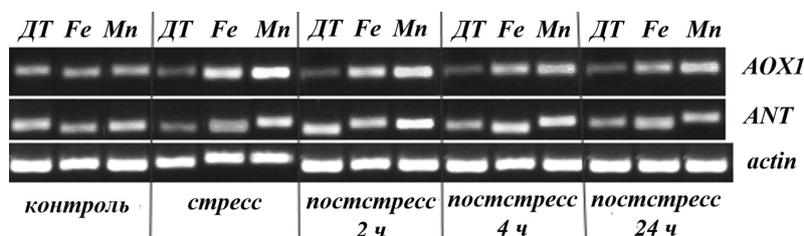


Рис. 1. Внешний вид продуктов амплификации после разделения в агарозном геле: ДТ, Fe, Mn – растения дикого типа, трансформанты Fe-СОД и трансформанты Mn-СОД соответственно. Контроль – нормальные условия выращивания (+25°C); стресс – +4°C, 22 ч; постстресс 2 ч, 4 ч и 24 ч – 2 ч, 4 ч, и 24 ч с момента прекращения действия стрессового фактора (+25°C)

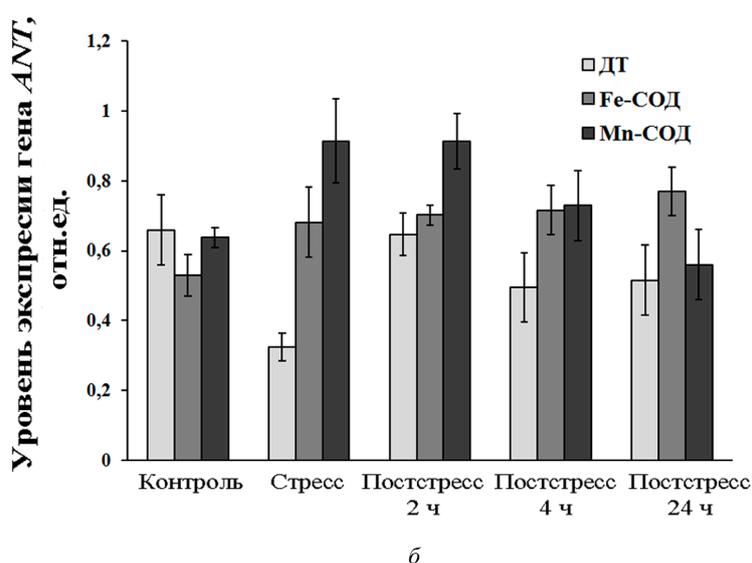
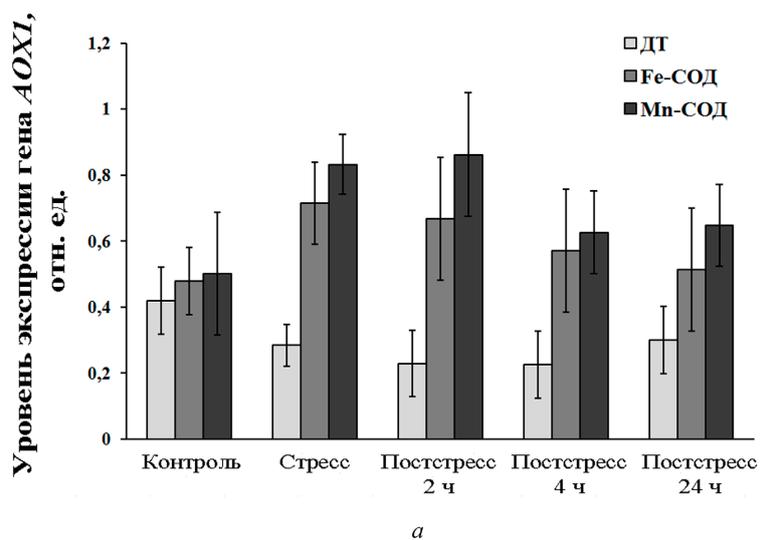


Рис. 2. Уровень экспрессии гена *AOX1* (а) и *ANT* (б) в 3–4-м листе трансгенных по Fe-СОД (Fe-СОД), трансгенных по Mn-СОД (Mn-СОД) растениях табака и ДТ в нормальных условиях выращивания (контроль), а также в условиях низкотемпературного стресса (стресс) и в постстрессовый период (постстресс)

Mn-СОД в условиях пониженной температуры (4°C в течение 1–3 сут) [13]. Возможно, что трансформанты табака с повышенной экспрессией Mn-СОД при низкотемпературном стрессе обладают высоким уровнем экспрессии гена *AOX1* также вследствие ко-экспрессии данных генов. Повышенный уровень экспрессии генов *AOX1* и *ANT* в постстрессовый период указывает на важность белков термогенеза для растений при их выходе из низкотемпературного стресса, по крайней мере в течение первых 24 ч. Это может быть обусловлено тем, что защитные белки – альтернативная оксидаза и АТФ/АДФ-антипортер – являются частью антиоксидантной защиты клетки. Они снижают образование АФК и выполняют функции регуляции энергетического и метаболического баланса растительной клетки при стрессе [13, 16, 17].

Заключение. Установлено, что трансформанты Fe-СОД и, в особенности, трансформанты Mn-СОД обладают повышенным уровнем экспрессии генов белков термогенеза (альтернативной оксидазы (*AOX1*) и АТФ-АДФ-антипортера (*ANT*)) не только при низкотемпературном стрессе (+ 4 °С, 22 ч), но и в постстрессовый период по сравнению с растениями дикого типа. Полученные результаты указывают на важный вклад белков термогенеза в формирование устойчивости трансгенных растений к низкой температуре, а также при выходе растений из стрессового состояния, обусловленного действием низкой температуры.

Літэратура

1. Колупаев Ю. Е., Карпец, Колупаев Ю. В. // Физиол. и биохим. культ. растен. 2009. Т. 41, № 2. С. 95–108.
2. Павлючкова С. М., Шалыго Н. В. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2012. № 2. С. 91–95.
3. Павлючкова С. М., Шалыго Н. В. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 1. С. 57–62.
4. Павлючкова С. М. // Научные, прикладные и образовательные аспекты физиологии, генетики и биотехнологии растений и микроорганизмов: Сб. ст. XII Междунар. науч. конф. Киев, 2012. С. 114.
5. Грабельных О. И. // Журн. стресс-физиологии и биохимии. 2005. Т1, № 1. С. 37–54.
6. Fiorani F., Umbach A. L., Shiedow J. N. // Plant Physiol. 2005. Vol. 139. P. 179–180.
7. Grabelnych O. I., Sumina O. N., Funderat S. P., Pobezhimova T. P. // J. Termal. Biol. 2004. Vol. 29. P. 165–175.
8. Ribas-Carbo M., Aroca R., Gonzalez-Meler M. A., Irigoyen J. J. // Plant Physiol. 2000. Vol. 122. P. 199–204.
9. Гармаш Е. В. // Изв. Коми научного центра Уро РАН. 2010. Вып. 3. С. 26–31.
10. Grabelnych O. I. // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. 2013. Vol. 9, N. 4. P. 319–328.
11. Stewart C. R., Martin B. A., Reding L., Cerwick Sh. // Plant Physiol. 1990. Vol. 92. P. 755–760.
12. Hashimoto H., Nishi R., Umeda M. et al. // Plant. Mol. Biol. 1993. Vol. 22. P. 163–164.
13. Попов В. Н., Епринцев А. В., Мальцева Е. В. // Физиол. растен. 2011. Т. 58, № 5. С. 758–765.
14. Дремук И. А., Шалыго Н. В. // Мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Сб. ст. Междунар. науч. конф. в 2 ч. Ч.2. Мн., 2012. С. 107.
15. Доманская И. Н., Радюк М. С., Будакова Е. А. и др. // Технология ДНК-типирования генов устойчивости ячменя к засухе: методические указания. Мн., 2011.
16. Maxwell D. P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. P. 8271–8276.
17. Gonzalez-Meler M. A., Ribas-Carbo M., Giles L., Siedow J. N. // Plant Physiol. 1999. Vol. 120. P. 765–772.

S. M. PAULIUCHKOVA, N. V. SHALYGO

ALTERNATIVE OXIDASE AND ATP/ADP-ANTIporter GENE EXPRESSION IN TRANSGENIC Fe-SOD AND Mn-SOD TOBACCO PLANTS (*NICOTIANA TABACUM*) UNDER LOW TEMPERATURE STRESS

Summary

It was shown that the Fe-SOD transformants and especially the Mn-SOD transformants have elevated gene expression of thermogenic protein – alternative oxidase (*AOX1*) and ATP/ADP-antiporter (*ANT*) as compared to wild type under low temperature stress (+ 4°C, 22 h) and during the post-stress period (+ 25°C, 24 h). The results indicate an important contribution of thermogenic proteins to the forming transgenic resistance to low temperatures and during the period after termination of the stress factor.