

УДК 581.1: 576.3

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ СТРЕССОВЫХ БЕЛКОВ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ПОВЫШЕННЫМ ТЕМПЕРАТУРАМ И ЗАСУХЕ

Л.П. Хохлова

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Аннотация

В работе проведен поиск молекулярных биомаркеров устойчивости растений к отдельному и совместному действию повышенных температур (42 °С) и засухи. С этой целью впервые прослежена корреляция между экспрессией генов четырех стрессовых белков: нефотосинтетического малик-энзима TaNADP-ME2, серин-треонин киназы W55a, дегидрина DHN14, липокалина TaTIL – и степенью устойчивости к стрессорным факторам восьми сортов яровой пшеницы. Экспрессию генов изучали методом ОТ-ПЦР по содержанию транскриптов, фиксированных на электрофореграммах. Показано отсутствие сортоспецифичных ответов двух генов TaNADP-ME2 и серин-треонин киназы W55a, уровень генной активности которых не зависел от выносливости сортов к тепловому шоку и водному дефициту. Однако экспрессия двух других генов DHN14 и TaTIL была генотипически детерминированной и положительно коррелировала с высокой устойчивостью отдельных сортов. Сделан вывод, что активность гена дегидрина DHN14 и гена липокалина TaTIL являются потенциальными молекулярными маркерами тепло- и засухоустойчивости яровой пшеницы и могут использоваться в технологиях транскрипционной селекции при создании более адаптированных к условиям среды новых фенотипов сельскохозяйственных культур.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, разные сорта (генотипы), гипертермия, водный дефицит, стрессовые белки, экспрессия генов

Введение

В настоящее время генетическое улучшение растений с целью повышения их устойчивости к экстремальным условиям окружающей среды является экономически насущной задачей для производства и селекции сельскохозяйственных культур на основе использования новых технологий с включением молекулярных маркеров и генетической трансформации. При этом стоит задача – создание базы данных экспрессирующихся генов сельскохозяйственных культур, связь их с условиями среды, с выносливостью к стрессорам, с качеством получаемой продукции и фенофазами. Однако молекулярно-генетические механизмы различных сортов сельскохозяйственных растений, включая пшеницу, при действии экстремальных внешних факторов являются малоизученными. В то же время известно, что общим свойством всех живых организмов и особенно растений в ответ на стрессоры является экспрессия генов и синтез защитных

(стрессовых) белков [1], во многом определяющие формирование фенотипической устойчивости растений [2, 3].

Почти полностью отсутствуют исследования, в которых была бы прослежена связь между индукцией генов стрессовых белков и сортоспецифической реакцией разных по устойчивости сортов яровой пшеницы на действие повышенных температур и засухи. В природных условиях высокие температуры и засуха обычно действуют сопряженно и приносят огромный ущерб растениеводству. В частности, к регионам, несущим большие потери урожая пшеницы вследствие практически ежегодно повторяющихся засух, относится Татарстан. Интерес к изучению отдельного и комбинированного влияния на растения неблагоприятных условий возник давно [4] и не без оснований, так как это важно как для развития теоретической базы экологической фитострессологии, так для решения вопросов прикладного характера. Показано, что тепловой шок (ТШ) вызывает повышение устойчивости растений не только к перегреву, но и к действию засухи, и это свидетельствует о функционировании общих систем устойчивости [5] или кросс-адаптации [6]. Так, тепловая закалка растений усиливает выносливость растений не только к высоким и низким температурам, но и к засолению, и к тяжелым металлам. Более того, «мягкий» тепловой шок (37–40 °С) способствует развитию приобретенной или индуцированной термотолерантности к последующему действию «жесткого» теплового режима (50 °С) [1, 7].

Ввиду недостаточности и противоречивости влияния комбинированного (отдельного и совместного) действия ТШ и водного дефицита на экспрессию генов стрессовых белков у разных по устойчивости генотипов (сортов) в пределах одного вида растений проведение таких исследований необходимо, во-первых, для поиска и идентификации молекулярных маркеров устойчивости растений и, во-вторых, для понимания многофакторной генной регуляции выносливости растений.

Следует отметить, что сложившаяся в последние годы критическая ситуация в реализации эффективных селекционных программ и особенно в регионах с рискованным земледелием в большой степени объясняется отсутствием чувствительных биомаркеров, позволяющих объективно и надежно провести массовый скрининг селекционного материала с целью отбора наиболее устойчивых сортов сельскохозяйственных культур к действию неблагоприятных факторов среды.

Цель нашей работы заключалась в обнаружении генотипически детерминированной экспрессии генов четырех стрессовых белков – нефотосинтетического малик-энзима TaNADP-ME2, серин-треонин киназы W55a, дегидрина DHN14, липокалина TaLIP – у отличающихся по устойчивости восьми сортов яровой пшеницы при отдельном и комбинированном сочетании гипертермии и водного дефицита.

1. Материалы и методы

Объектом исследования являлись листья восьми сортов мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) разного эколого-географического происхождения, которые отличались по морфотипу и продуктивности [8]: Омская 33, МиС, Дебют, Амир, Тризо, Тулайковская 10, Тимер, Закамская.

Теплоустойчивость растений тестировали по термостабильности мембран, которая используется как чувствительный показатель выносливости растений

разных видов, включая пшеницу, к нагреву [3, 9]. Термостабильность мембран характеризовали кинетическими параметрами – температурой порогового повреждения мембран (ТППМ), величиной угла наклона термограмм и коэффициентом повреждаемости мембран, которые были измерены с использованием авторских разработок [10]. ТППМ соответствовала резкому (фазному) повышению проницаемости мембран на полученных термограммах после 5-минутного прогрева листьев при нарастающем действии повышенных температур в диапазоне (49–57 °С). При этом мы исходили из имеющихся в литературе данных, согласно которым увеличение проницаемости мембран, обусловленное усилением выхода из клеток электролитов (в основном K^+) является одним из ранних неспецифических ответных реакций растений на действие повышенных температур и поэтому считается апробированным диагностическим критерием повреждения мембран и уменьшения теплоустойчивости растений [11].

Динамику проницаемости клеточных мембран исследовали на 7-суточных проростках, выращенных в водной культуре в шкафу искусственного климата Биотрон-3 (Россия) при 23 °С, освещенности 10 клк и 10-часовом фотопериоде. Проницаемость мембран контролировали по экзоосмосу электролитов из интактных тканей путем измерения электропроводности водных вытяжек на кондуктометре оригинальной конструкции [10]. Между сортами были обнаружены определенные различия кинетических параметров, что позволило провести распределение растений по уровню теплоустойчивости на три группы: высокоустойчивые сорта – Омская 33, МиС (ТППМ – 55 °С); среднеустойчивые – Дебют, Амир, Тризо, Тулайковская 10 (ТППМ – 54 °С); низкоустойчивые – Тимер, Закамская (ТППМ – 52 °С).

Схема опытов при изучении экспрессии генов. Растения выращивали в течение 7 сут в сосудах с почвой в автоматизированном фитотроне при 23 °С, относительной влажности воздуха около 80%, влажности почвы 70% от полной влагоемкости, освещенности 5 клк и 10-часовом фотопериоде (контрольный вариант). Затем 7-суточные проростки подвергали воздействию повышенных температур и засухи при различных режимах (опытные варианты): 1 – ТШ (38 °С – 30 мин, 40 °С – 30 мин, 42 °С – 2 ч); 2 – преадаптация (45 °С, 15 мин + 23 °С, 2 ч) и ТШ; 3 – засуха и ТШ (засуху создавали путем прекращения полива 5-суточных проростков в течение двух суток); 4 – засуха, преадаптация и ТШ. Такая схема опытов предусматривала возможность развития приобретенной [1] или индуцированной [7] термотолерантности (вариант 1) и воздействия на растений «мягкого» (вариант 2) и «жесткого» (варианты 3 и 4) теплового режима. Из листьев вырезали среднюю часть, замораживали в жидком азоте и хранили в холодильнике при –80 °С. Экспрессию генов изучали, используя метод обратнo-транскрипtазной ПЦР (ОТ-ПЦР).

Метод ОТ-ПЦР основан на определении содержания транскриптов (мРНК) генов растений по накоплению ампликонов – продуктов ПЦР. Методики по выделению тотальной РНК, определению ее содержания, очистке, оценке и все последующие этапы ОТ-ПЦР описаны в ранее проведенных опытах [10]. Реакцию обратной транскрипции проводили с праймерами oligo (dT)₁₈ (Roche, Германия). Фрагменты кДНК, соответствующие транскриптам генов TaNADP-ME2, DHN14, W55a и TaTIL, амплифицировали с использованием ген-специ-

фических праймеров, подобранных с помощью программы Vector NTI. Затем ампликоны подвергали электрофоретическому разделению в агарозном геле и визуализировали в УФ-трансиллюминаторе (Serva, Германия). Размер ампликонов кДНК TaNADP-ME2 составлял 1624 п.н., DHN14 – 325 п.н., W55a – 106 п.н. и TaTIL – 688 п.н. Об экспрессии генов судили по ширине и интенсивности окрашивания полос, появляющихся на электрофореграммах и соответствующих фрагментам кДНК исследуемых генов.

Статистическую обработку данных проводили в программе электронных таблиц. При изучении экспрессии генов опыты включали три биологические повторности, в каждой из которых аналитическая повторность была 2–3-кратной. На рис. 1–4 приведены результаты одного характерного опыта из 2–3.

2. Результаты и их обсуждение

Ответные реакции растений на стрессовые воздействия включают различные механизмы защиты клеток и сохранения целостности всего организма. При этом было открыто множество стресс-индуцированных генов, кодирующих белки, непосредственно участвующие в этих механизмах.

К таким генам относят ген нефотосинтетического малик-энзима TaNADP-ME2 (имеется еще фотосинтетический малик-энзим у C_4 -растений с САМ-метаболизмом). TaNADP-ME2 выполняет множество функций – катализирует окислительное декарбоксилирование малата, регулирует осмотическое давление в замыкающих клетках за счет накопления малата, движение устьиц, участвует в биосинтезе жирных кислот, органических кислот, запасании углерода, NADPH, поддержании клеточного рН и ионного баланса. Показано, что экзогенные гормоны (АБК и салициловая кислота), засоление, засуха и низкие температуры регулируют экспрессию гена этого фермента у пшеницы, и поэтому этот ген считается стресс-зависимым, определяющим ответы растений на различные стрессоры [12].

Почти полное отсутствие данных об экспрессии гена TaNADP-ME2 при различном сочетании стресс-факторов явилось основанием для проведения наших исследований по обнаружению экспрессии этого гена у отличающихся по теплоустойчивости сортов пшеницы при разных режимах гипертермии и водного стресса.

Из рис. 1 видно, что активность гена TaNADP-ME2 проявлялась у растений всех восьми сортов пшеницы в контроле, однако у сортов Тризо и Закамская выявлен слабый сигнал. Стойкая активность гена во всех вариантах стрессорных воздействий (с 1 по 4) сохранялась у большинства сортов – Омская 33, МиС, Амир, Тризо, Тулайковская 10 и Тимер. Экспрессия гена отсутствовала у сорта Дебют в варианте 2 (при преадаптации и действии ТШ) и слабо проявлялась в вариантах 1 и 4. Отсюда следует, что преадаптация проростков к гипертермии приводила к выключению транскрипции гена у сорта Дебют на фоне теплового шока и снижала экспрессию гена при совместном действии засухи и ТШ. В условиях жесткого режима (засуха и ТШ, вариант 3) ген не экспрессировался только у Закамской. Таким образом, слабое проявление сигнала и даже его отсутствие в ряде вариантов, главным образом, у средне- и малоустойчивого сортов указывают на некоторую сортоспецифичную реакцию гена этого фермента на действие засухи и повышенных температур.

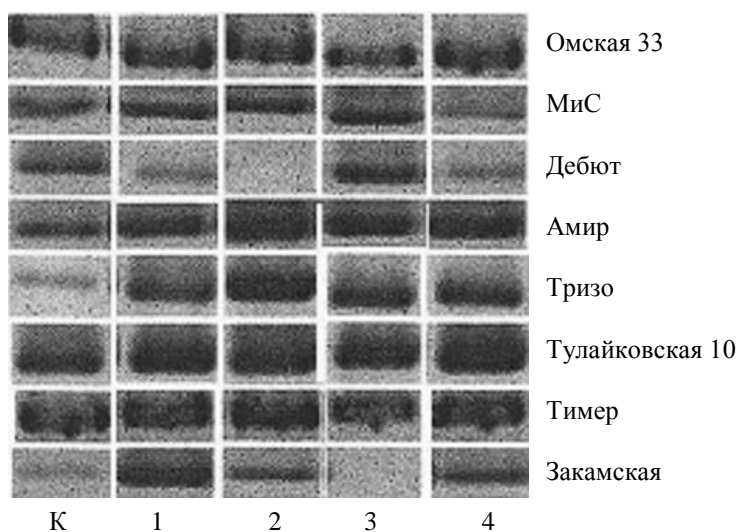


Рис. 1. Электрофореграмма транскриптов гена малик-энзима TaNADP-Me2 листьев разных сортов пшеницы: К – контроль (23 °С); 1 – тепловой шок, ТШ (38 °С – 30 мин, 40 °С – 30 мин, 42 °С – 2 ч); 2 – преадаптация (45 °С – 15 мин + 23 °С – 2ч) и ТШ; 3 – засуха и ТШ; 4 – засуха, преадаптация и ТШ

Известно, что у эукариот обратимое фосфорилирование белков с участием протеинкиназ/протеинфосфатаз является центральным звеном в каскадной передаче в клетке стрессорных сигналов окружающей среды на геном. Установлено, что в трансдукции различных сигналов участвуют серин-треонин протеинкиназы, разделенные на три подсемейства. В геноме арабидопсиса обнаружено более 600 генов, кодирующих протеинкиназы [13]. Недавно был изолирован из пшеницы новый ген серин-протеинкиназы W55a, локализованный в мембране и относящийся к специфичной для растений подгруппе серин-треониновых протеинкиназ SnRK2 [14]. Усиленная экспрессия этого гена, введенного в геном арабидопсиса, повышала выживаемость трансгенных растений и вызывала более интенсивное развитие корней в условиях имитации засухи. Одновременно происходили положительные сдвиги в физиологических показателях – уменьшение скорости потери воды, повышение ОСВ, стабильности клеточных мембран, увеличение фотосинтетического и осмотического потенциалов. И все это коррелировало с увеличением выносливости трансгенных растений к засухе, засолению и замораживанию [15]. По мнению авторов, данная серин-протеинкиназа W55a – это многофункциональный регуляторный белок, который можно использовать в трансгенной селекции для улучшения выносливости сельскохозяйственных культур к абиотическим стрессам.

Проведенный в нашей работе анализ экспрессии гена серин-треонинкиназы W55a показал (рис. 2), что у всех восьми сортов транскрипты присутствуют в норме (контроль). У сортов МиС, Амир, Тризо, Тулайковская 10 активность гена сохраняется как при контрольных, так и при всех стрессовых условиях, тогда как у сортов Омская 33, Тимер и Закамская экспрессия генов отсутствовала при засухе и тепловом шоке (вариант 3). Следовательно, засуха блокировала эффект ТШ, так как при отдельном действии ТШ активность гена у этих

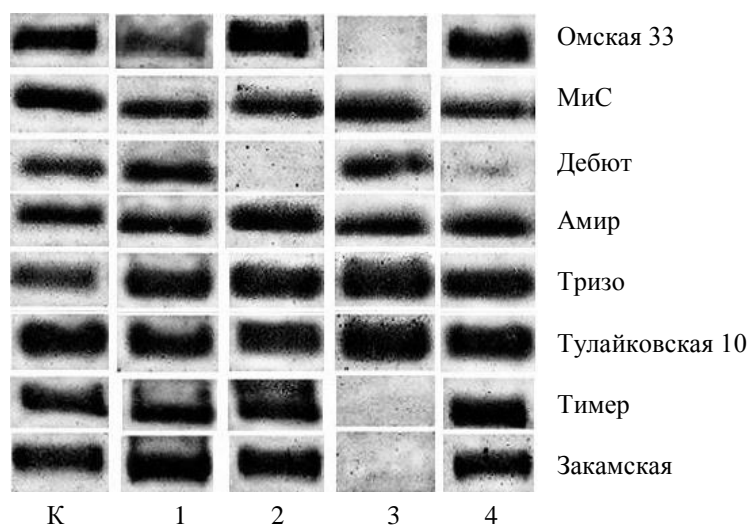


Рис. 2. Электрофореграмма транскриптов гена серин – треонин протеинкиназы W55 листьев разных сортов пшеницы: К – контроль (23 °С); 1 – тепловой шок, ТШ (38 °С – 30 мин, 40 °С – 30 мин, 42 °С – 2 ч); 2 – преадаптация (45 °С – 15 мин + 23 °С – 2ч) и ТШ; 3 – засуха и ТШ; 4 – засуха, преадаптация и ТШ

сортов сохранялась. Несколько иное отмечено для сорта Дебют. В вариантах с преадаптацией (варианты 2 и 4) активность гена или отсутствовала (вариант 2), или была слабовыраженной (вариант 4). Значит, преадаптация проростков к гипертермии выключала транскрипцию гена на фоне засухи и ТШ. Выявленные в наших экспериментах особенности экспрессии гена W55a могут указывать на то, что у сортов Омская 33, Тимер и Закамская тепловой шок подавляет индукцию этого гена при засухе, а у сорта Дебют подобный эффект отмечен в результате преадаптации. Поскольку исследуемая нами серин-треонинкиназа W55a локализуется в мембране, то, вероятно, что происходящая при действии абиотических стрессоров, как правило, сортоспецифическая реорганизация белково-липидных комплексов мембран [3] приводит к дифференцированному нарушению экспрессии данного гена. Вследствие этого отсутствие активности гена W55a может вызывать изменения в передаче различных сигналов внутри клетки у сортов Омская 33, Дебют, Тимер и Закамская.

Наиболее многочисленной группой среди водорастворимых белков, индуцируемых факторами, вызывающими обезвоживание растений (засуха, низкие температуры, засоление, АБК), являются дегидрины, или белки водного стресса, иначе называемые белками позднего эмбриогенеза, так как впервые были обнаружены в зародышах и формирующихся семенах на стадиях позднего эмбриогенеза [16]. Эти белки найдены у многих видов растений различных таксономических групп, в том числе и у пшеницы. Детально изучена структурная организация дегидринов, показано наличие повторяющихся консервативных последовательностей (K-, V- и S-фрагментов), обогащенных гидрофильными аминокислотами, особенно лизином и пролином, образующими особую амфифильную спираль. Именно эти три фрагмента лежат в основе классификации дегидринов [17]. Установленная в некоторых работах корреляция между устойчивостью растений

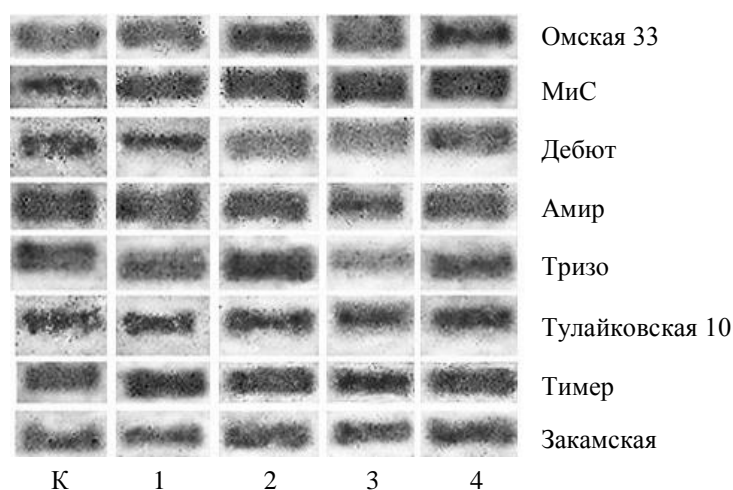


Рис. 3. Электрофореграмма транскриптов гена дегидрина DHN14 листьев разных сортов пшеницы: К – контроль (23 °С); 1 – тепловой шок, ТШ (38 °С – 30 мин, 40 °С – 30 мин, 42 °С – 2 ч); 2 – преадаптация (45 °С – 15 мин + 23 °С – 2ч) и ТШ; 3 – засуха и ТШ; 4 – засуха, преадаптация и ТШ

к обезвоживающим факторам и экспрессией некоторых генов дегидриновых белков, а также локализация их в различных компартментах клетки (в цитозоле, в ядре, вблизи мембран и элементов цитоскелета) явились основанием для предположения о протекторной роли дегидринов в защите мембран и клеточных структур от дегидратации и восстановлении нативной структуры поврежденных белков по типу шаперонов [18, 19]. Несмотря на то что в прежних исследованиях было продемонстрировано накопление дегидринов у пшеницы, подвергнутой засухе [18], однако мало известно о связи экспрессии дегидринов с формированием выносливости к засухе у специфических сортов, по-разному адаптирующихся к водному дефициту. Мы встретили лишь одну работу [20], в которой была прослежена динамика экспрессии дегидринов в связи с развитием устойчивости к нарастающему действию засухи до 12 сут у проростков семи сортов озимой пшеницы. Авторы наблюдали экспрессию гена и накопление дегидрина 24кД у трех засухоустойчивых сортов, в то время как у других менее устойчивых сортов экспрессия этих дегидринов отсутствовала. Авторы показали, что присутствие дегидрина 24кД связано с приобретением сортоспецифической выносливости растений к засухе и с образованием большей биомассы.

В нашей работе мы изучали экспрессию гена дегидрина DHN14 у восьми сортов исследуемых сортов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что экспрессия гена данного дегидрина сохраняется у всех сортов как в контроле, так и при различных режимах температурного и водного факторов (рис. 3). По литературным данным [17, 18], индукция генов дегидринов происходит только под действием стрессорных факторов, однако мы обнаружили сигналы гена у всех сортов в контроле, и это говорит о конститутивной природе данного белка, то есть его ген исходно экспрессируется и в норме. Важно, что в этих опытах явно прослеживаются (судя по ширине полос на электрофореграммах) сортовые различия в активности гена DHN14 между высокоустойчивыми

сортами (Омская 33 и МиС) и низкоустойчивыми (Тимер и Закамская). У последних, особенно Закамской, сигнал был более слабым. Это означает, что ген у неустойчивых сортов экспрессировался менее активно при всех заданных режимах, чем у более высокоустойчивых. Обнаруженные сортоспецифические отличия экспрессии гена DHN14 представляют интерес для селекционной практики в плане возможного использования этого дегидрина в качестве молекулярного биомаркера с целью эффективного отбора выносливых к обезвоживанию сортов яровой пшеницы.

Впервые мы провели эксперименты также по выявлению экспрессии гена еще одного белка – липокалина TaTIL – у разных по устойчивости сортов яровой пшеницы. Липокалины образуют большое семейство низкомолекулярных белков, найденных у животных, бактерий и растений. Экспрессия генов липокалинов проявляется в условиях климатического стресса, и поэтому их стали считать стрессовыми белками [21]. Оказалось, что они являются не только транспортными протеинами, но могут быть вовлечены в выполнение многих других важных функций, например в регуляцию клеточного роста и метаболизма, в иммунные ответы, в связывание с рецепторами, биогенез и восстановление поврежденных мембран, а также в индукцию апоптоза [21]. У растений известны два температурозависимых липокалина – TaTIL (*Triticum aestivum temperature – induced lipocalin*) у пшеницы и AtTIL (*Arabidopsis thaliana temperature – induced lipocalin*) у арабидопсиса [22]. Появление транскриптов TaTIL и накопление липокалинов наблюдали в различных органах пшеницы после воздействия низкой температуры, теплового шока и водного дефицита [21].

Из данных рис. 4 следует, что на электрофореграммах транскрипты гена липокалина TaTIL разных сортов яровой пшеницы обнаружены как в контроле, так и во всех опытных вариантах при различном сочетании стрессорных факторов – ТШ и засухи. По данным [21, 23], экспрессия гена TaTIL необходима при ответах растений на различные стрессоры, включая ТШ и обезвоживание, которые индуцируют разный уровень активности. Однако в наших опытах ТШ присутствовал во всех вариантах, поэтому трудно судить о дифференцированном действии этих двух факторов.

Самым интересным и заслуживающим особого внимания результатом этих опытов является установление среди сортов явно выраженных различий в активности гена данного липокалина. По аналогии с геном дегидрина DHN14 контрастные различия в экспрессии гена липокалина TaTIL отмечены между высокоустойчивым сортом Омская 33 и низкоустойчивым Закамская. Интенсивность сигнала у первого сорта, судя по ширине полос, была достоверно выше, чем у второго. Следовательно, можно говорить о существовании разных механизмов генной регуляции TaTIL в зависимости от уровня устойчивости растений. Физиологический смысл таких перестроек в геноме может быть связан с тем, что липокалины относятся к стероид-связывающим мембранным белкам, поэтому TaTIL может участвовать в транспорте молекул стерола к мембране. В свою очередь, это будет способствовать сохранению структурной упорядоченности мембранных фосфолипидов во время ответа на действие высоких температур. Известно, что повышенные температуры вызывают повреждение мембран и снижают их термостабильность в основном из-за разрушения структурной

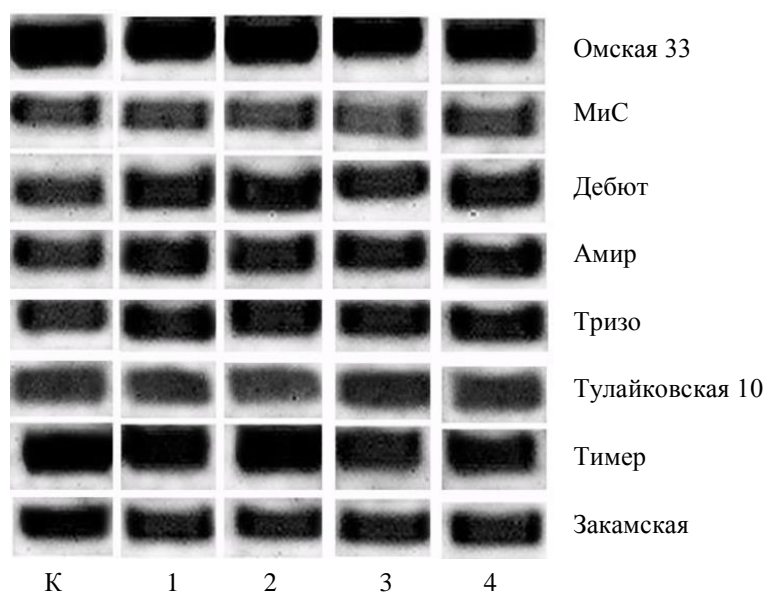


Рис. 4. Электрофореграмма транскриптов гена липокалина TaTIL листьев разных сортов пшеницы: К – контроль (23°C); 1 – тепловой шок, ТШ (38 °С – 30 мин, 40 °С – 30 мин, 42 °С – 2 ч); 2 – преадаптация (45 °С – 15 мин + 23 °С – 2ч) и ТШ; 3 – засуха и ТШ; 4 – засуха, преадаптация и ТШ

организации липидного бислоя вследствие его флюидизации (растекания) и дезинтеграции [3, 24]. В связи с этим экспрессия мембрано-связанных липокалинов, включая TaTIL, проявляющаяся в условиях, повреждающих мембраны [25], предполагает их участие в биогенезе и восстановлении мембран при «жестких» стрессовых условиях – одновременном действии ТШ и водного стресса. Такое предположение находит экспериментальное подтверждение в наших опытах, поскольку более высокий уровень экспрессии гена TaTIL обнаружен у растений более выносливого к нагреву и засухе сорта с высокой термостабильностью мембран [10].

Заключение

Впервые проведены исследования экспрессии генов методом ОТ-ПЦР четырех стрессовых белков – нефотосинтетического малик-энзима TaNADP-ME2, серин-треонинпротеинкиназы W55a, дегидрина DHN14, липокалина TaTIL – у восьми сортов яровой пшеницы с разным уровнем устойчивости к повышенным температурам и засухе. Показано, что все эти гены являются конститутивными и экспрессируются как в норме, так и при напряженных режимах температурного и водного факторов. Не обнаружено какой-либо корреляции между активностью генов TaNADP-ME2 и W55a, с одной стороны, и сортоспецифической реакцией растений разных сортов на стрессорные воздействия, с другой. Однако ответы двух других генов – DHN14 и TaTIL – на отдельное и совместное действие теплового шока и засухи оказались генотипически детерминированными. Активность этих генов была достоверно выше у растений устойчивого сорта Омская 33, чем у неустойчивого сорта Закамская. Следовательно, экспрессии генов дегидрина DHN14 и липокалина TaTIL, тестируемые методом обычной

ОТ-ПЩР по содержанию транскриптов, являются потенциальными молекулярно-генетическими маркерами устойчивости разных сортов яровой пшеницы к повышенным температурам и водному дефициту.

Идентифицированные нами молекулярные диагностические критерии тепло- и засухоустойчивости растений могут быть включены в технологии трансгенной селекции при создании и скрининге более приспособленных к неблагоприятным условиям окружающей среды новых фенотипов зерновых сельскохозяйственных культур. Кроме того, полученные результаты способствуют развитию генетических основ сортового разнообразия яровой пшеницы. Следует иметь в виду, что для эффективного применения биомаркеров в сельскохозяйственной практике необходимо целенаправленно контролировать экспрессию их генов. Становится ясно, что такая возможность является вполне реальной и прежде всего благодаря интенсивно развивающейся в настоящее время в системной биологии сенсорики растений, предусматривающей расшифровку каскадных механизмов восприятия внешних сигналов и передачи их на трансдукторы и геном. В связи с этим основные усилия ученых главным образом были направлены на поиск первичных сенсоров различных биотических и абиотических факторов. Долгое время существовали разные точки зрения о тепловом сенсоре, к которым относили текучесть мембран, гистидинкиназы *Nik34*, содержание цитозольного Ca^{2+} , элементы цитоскелета и др. [26]. Но ни одна из них не получила однозначного экспериментального подтверждения. В последние годы серьезная экспериментальная база на высоком методическом уровне была подведена в работах [27, 28]. Главными тепловыми сенсорами («молекулярными термометрами») стали считать открытые авторами ранее неизвестные локализованные в плазмалемме мха и арабидопсиса особые проницаемые каналы (CNGC), активируемые циклическими нуклеотидами и теплом. Были определены гены этих каналов, изучена их структурная гетеромерная организация. Самым убедительным доказательством вовлечения этих каналов в первичный сигналинг явилось то, что их разрушение приводило к потере растениями термоустойчивости (приобретенной термотолерантности), замедлению роста, снижению температуры индукции белков теплового шока и созданию гиперчувствительных фенотипов. Открытие первичных теплосенсоров предполагает необходимость проведения дальнейших исследований, направленных на установление функциональных связей между работой Ca^{2+} -каналов (CNGC) и потенциальными молекулярно-генетическими мишенями стрессоров.

Литература

1. Александров В.Я., Кислюк И.М. Реакция клеток на действие теплового шока. Физиологический аспект // Физиология растений. – 1994. – Т. 36, № 1. – С. 43–49.
2. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. – Киев: Основа, 2010. – 350 с.
3. Wahid A., Gelani S., Ashraf M., Foolad M.R. Heat tolerance in plants: An overview // Environ. Exper. Bot. – 2007. – V. 61, No 3. – P. 199–223. – doi: 10.1016/j.envexpbot.2007.05.011.
4. Генкель П.А. О сопряженной и конвергентной устойчивости растений // Физиология растений. – 1979. – Т. 26, № 5. – С. 921–924.

5. Кузнецов Вл.В., Ракитин В.Ю., Оноку Л., Жолкевич В.Н. Взаимодействие теплового шока и водного стресса у растений. 1. Влияние теплового шока и последующей почвенной засухи на водный режим и устойчивость хлопчатника // Физиология растений. – 1997. – Т. 44, № 1. – С. 54–58.
6. Титов А.Ф., Таланова В.В. Устойчивость растений и фитогормоны. – Петрозаводск: Карел. науч. центр РАН, 2009. – 206 с.
7. Sung D.V., Kaplan F., Lee K.J., Guy C.L. Acquired tolerance to temperature extremes // Trends Plant Sci. – 2003. – V. 8, No 4. – P. 179–187. – doi: 10.1016/S1360-1385(03)00047-5.
8. Ионова Н.Э., Хохлова Л.П., Валиуллина Р.Н., Ионов Э.Ф. Роль отдельных органов в продукционном процессе яровой пшеницы разного эколого-географического происхождения // Сельскохозяйственная биология. – 2009. – № 1. – С. 60–67.
9. Marcum K. Cell membrane thermostability and whole – plant heat tolerance of Kentucky bluegrass // Crop. Sci. – 1998. – V. 38, No 5. – P. 1214–1218. – doi: 10.2135/cropsci1998.0011183X003800050017x.
10. Хохлова Л.П., Валиуллина Р.Н., Мидер Д.Р., Акберова Н.И. Термостабильность мембран и экспрессия генов низкомолекулярных белков теплового шока (мБТШ) при действии на растения повышенных температур и водного дефицита // Биологические мембраны. – 2015. – Т. 32, № 1. – С. 59–71. – doi: 10.7868/S0233475515010065.
11. Blum A., Klueva N., Nquyen H.T. Wheat cellular thermotolerance is related to yield under heat stress // Euphytica. – 2001. – V. 117, No 2. – P. 117–123. – doi: 10.1023/A:1004083305905.
12. Liu S., Cheng Y., Zhang X., Guan Q., Nishiuchi S., Hase K., Takano T. Expression of an NADP-malic enzyme gene in rice (*Oryza sativa*. L) is induced by environmental stresses; over-expression of the gene in Arabidopsis confers salt and osmotic stress tolerance // Plant Mol. Biol. – 2007. – V. 64, No 1–2. – P. 49–58. – doi: 10.1007/s11103-007-9133-3.
13. Morris E.R., Walker J.C. Receptor-like protein kinases: the keys to response // Curr. Opin. Plant Biol. – 2003. – V. 6, No 4. – P. 339–342. – doi: 10.1016/S1369-5266(03)00055-4.
14. Xu Z.S., Liu L., Ni Z.Y., Liu P., Chen M., Li L.C., Chen Y.F., Ma Y.Z. W55a encodes a novel protein kinase that is involved in multiple stress responses // J. Integr. Plant Biol. – 2009. – V. 51, No 1. – P. 58–66. – doi: 10.1111/j.1744-7909.2008.00776.x.
15. Mao X., Zhang H., Tian S., Chang X., Jing R. TaSnRK2.4, an SNF1-type serine/threonine protein kinase of wheat (*Triticum aestivum* L.), confers enhanced multistress tolerance in Arabidopsis // J. Exp. Bot. – 2010. – V. 61, No 3. – P. 683–696. – doi: 10.1093/jxb/erp331.
16. Dure L. III, Crouch M., Harada J., Ho T.H., Mundy J., Quatrano R., Thomas T., Sung Z.R. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants // Plant Mol. Biol. – 1989. – V. 12, No 5. – P. 475–486. – doi: 10.1007/BF00036962.
17. Close T.J. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins // Physiol. Plant. – 1996. – V. 97, No 4. – P. 795–803. – doi: 10.1111/j.1399-3054.1996.tb00546.x.
18. Close T.J. Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature // Physiol. Plant. – 1997. – V. 100. – P. 291–296.
19. Mayhew M., Hartl F.U. Molecular chaperone proteins // Neidhardt F.C., Curtiss III R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B. Jr., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaechter M., Umberger H.E. (Eds.) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. – Washington DC: Am. Soc. Microbiol., 1996. – P. 922–937.
20. Lopez C.G., Banowitz G.M., Peterson C.J., Kronstad W.E. Dehydrin expression and drought tolerance in seven wheat cultivars // Crop Sci. – 2002. – V. 43, No 2. – P. 577–582. – doi: 10.2135/cropsci2003.5770.

21. Flower D.R. The lipocalin protein family: structure and function // *Biochem. J.* – 1996. – V. 318, Pt. 1. – P. 1–14.
22. Frenette-Charron J.B., Breton G., Badawi M., Sarhan F. Molecular and structural analyses of a novel temperature stress-induced lipocalin from wheat and *Arabidopsis* // *FEBS Lett.* – 2002. – V. 517, No 1–3. – P. 129–132. – doi: 10.1016/S0014-5793(02)02606-6.
23. Clouse S.D., Sasse J.M. Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1998. – V. 49. – P. 427–451. – doi: 10.1146/annurev.arplant.49.1.427.
24. Murata N., Los D.A. Membrane fluidity and temperature perception // *Plant Physiol.* – 1997. – V. 115, No 3. – P. 875–879.
25. Bishop R.E., Penfold S.S., Frost L.S., Höltje J.V., Weiner J.H. Stationary phase expression of a novel *Escherichia coli* outer membrane lipoprotein and its relationship with mammalian apolipoprotein D. Implications for the origin of lipocalins // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270, No 39. – P. 23097–23103.
26. Лось Д.А. Десатуразы жирных кислот. – М.: Науч. мир, 2014. – 372 с.
27. Finka A., Cuendet A.F.H., Maathuis F.J.M., Saidi Y., Goloubinoff P. Plasma membrane cyclic nucleotide gated calcium channels control land plant thermal sensing and acquired thermotolerance // *Plant Cell.* – 2012. – V. 24, No 8. – P. 3333–3348. – doi: 10.1105/tpc.112.095844.
28. Gao F., Han X., Wu J., Zheng S., Shang Z., Sun D., Zhou R., Li B. A heat-activated calcium-permeable channel – *Arabidopsis* cyclic nucleotide-gated ion channel 6 – is involved in heat shock responses // *Plant J.* – 2012. – V. 70, No 6. – P. 1056–1069. – doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.04969.x.

Поступила в редакцию
24.02.16

Хохлова Людмила Петровна, доктор биологических наук, профессор кафедры ботаники и физиологии растений

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: Ludmila.Khokhlova@kpfu.ru; hohlova.ludmila2011@mail.ru

ISSN 1815-6169 (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2016, vol. 158, no. 2, pp. 225–238

Gene Expression of Stress Proteins and Identification of Molecular Markers of Plant Resistance to High Temperatures and Drought

L.P. Khokhlova

Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia
E-mail: Ludmila.Khokhlova@kpfu.ru

Received February 24, 2016

Abstract

Molecular biomarkers of plant resistance to both individual and combined action of high temperatures (42 °C) and drought have been identified. For this purpose, correlation between gene expression of four stress proteins (non-photosynthetic malic enzyme (TaNADP-ME2), serine-threonine kinase (W55a), dehydrin (DHN14), and lipocalin (TaTIL)) and resistance of eight spring wheat cultivars has been

determined for the first time. Gene expression has been studied using the RT-PCR method based on the content of transcripts on electrophoregrams. The absence of species-specific responses of two genes, TaNADP-ME2 and W55a, the gene activity of which did not depend on the resistance of cultivars to heat shock and water deficit, has been shown. However, gene expression of two other genes, DHN14 and TaTIL, was genotypically determined and positively correlated with the high resistance of particular cultivars. It has been concluded that the activities of DHN14 and TaTIL are potential molecular markers of heat and drought resistance in spring wheat and, therefore, can be used in transgenic selection technologies to create new phenotypes of agricultural crops that would be better adapted to the environmental conditions.

Keywords: *Triticum aestivum*, various cultivars (genotypes), hyperthermia, water deficit, stress proteins, gene expression

Figure captions

- Fig. 1. Electrophoregram of transcripts of TaNADP-ME2, malic enzyme, in leaves of different wheat cultivars: C – control (23 °C); 1 – heat shock, HS (38 °C – 30 min, 40 °C – 30 min, 42 °C – 2 h); 2 – preadaptation (45 °C – 15 min + 23 °C – 2 h) and HS; 3 – drought and HS; 4 – drought, preadaptation, and HS.
- Fig. 2. Electrophoregram of transcripts of W55a, serine-threonine kinase, in leaves of different wheat cultivars: C – control (23 °C); 1 – heat shock, HS (38 °C – 30 min, 40 °C – 30 min, 42 °C – 2 h); 2 – preadaptation (45 °C – 15 min + 23 °C – 2 h) and HS; 3 – drought and HS; 4 – drought, preadaptation, and HS.
- Fig. 3. Electrophoregram of transcripts of DHN14, dehydrin, in leaves of different wheat cultivars: C – control (23 °C); 1 – heat shock, HS (38 °C – 30 min, 40 °C – 30 min, 42 °C – 2 h); 2 – preadaptation (45 °C – 15 min + 23 °C – 2 h) and HS; 3 – drought and HS; 4 – drought, preadaptation and HS.
- Fig. 4. Electrophoregram of transcripts of TaTIL, lipocalin, in leaves of different wheat cultivars: C – control (23 °C); 1 – heat shock, HS (38 °C – 30 min, 40 °C – 30 min, 42 °C – 2 h); 2 – preadaptation (45 °C – 15 min + 23 °C – 2 h) and HS; 3 – drought and HS; 4 – drought, preadaptation, and HS.

References

- Alexandrov V.Ya., Kislyuk I.M. Cell response to heat shock. Physiological aspect. *Fiziol. Rast.*, 1994, vol. 36, no. 1, pp. 43–49. (In Russian)
- Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V. Formation of Plants Adaptive Reactions to Abiotic Stressors Influence. Kiev, Osnova, 2010. 350 p. (In Russian)
- Wahid A., Gelani S., Ashraf M., Fooland M.R. Heat tolerance in plants: an overview. *Environ. Exp. Bot.*, 2007, vol. 61, no. 3, pp. 199–223. doi: 10.1016/j.envexpbot.2007.05.011.
- Genkel P.A. About connected and convergent resistance of plants. *Fiziol. Rast.*, 1979, vol. 26, no. 5, pp. 921–924. (In Russian)
- Kuznetsov V.I., Rakitin V.Yu., Opoku L., Zholkevich V.N. The interaction of heat shock and water stress in plants. 1. The effect of heat shock and subsequent soil drought on water regime and resistance of cotton. *Fiziol. Rast.*, 1997, vol. 44, no. 1, pp. 54–58. (In Russian)
- Titov A.F., Talanova V.V. Stability of Plants and Phytohormones. Petrozavodsk, Karel. Nauch. Tsentr Ross. Akad. Nauk, 2009. 206 p. (In Russian)
- Sung D.V., Kaplan F., Lee K.J., Guy C.L. Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends Plant Sci.*, 2003, vol. 8, no. 4, pp. 179–187. doi: 10.1016/S1360-1385(03)00047-5.
- Ionova N.E., Khokhlova L.P., Valiullina R.N., Ionov E.F. The role of individual organs in the production process of spring wheat of different ecologo-geographical origin. *S-kh. Biol.*, 2009, no. 1, pp. 60–67. (In Russian)
- Marcum K. Cell membrane thermostability and whole – plant heat tolerance of Kentucky bluegrass. *Crop. Sci.*, 1998, vol. 38, no. 5, pp. 1214–1218. doi: 10.2135/cropsci1998.0011183X003800050017x.
- Khokhlova L.P., Valiullina R.N., Mider D.R., Akberova N.I. Membrane thermostability and gene expression of small heat-shock protein (sHSP) in wheat shoots exposed to elevated temperatures and water deficiency. *Biol. Membr.*, 2015, vol. 32, no. 1, pp. 59–71. doi: 10.7868/S0233475515010065.
- Blum A., Klueva N., Nguyen H.T. Wheat cellular thermotolerance is related to yield under heat stress. *Euphytica*, 2001, vol. 117, no. 2, pp. 117–123. doi: 10.1023/A:1004083305905.
- Liu S., Cheng Y., Zhang X., Guan Q., Nishiuchi S., Hase K., Takano T. Expression of an NADP-malic enzyme gene in rice (*Oryza sativa*. L) is induced by environmental stresses; over-expression

- of the gene in *Arabidopsis* confers salt and osmotic stress tolerance. *Plant Mol. Biol.*, 2007, vol. 64, nos. 1–2, pp. 49–58. doi: 10.1007/s11103-007-9133-3.
13. Morris E.R., Walker J.C. Receptor-like protein kinases: the keys to response. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2003, vol. 6, no. 4, pp. 339–342. doi: 10.1016/S1369-5266(03)00055-4.
 14. Xu Z.S., Liu L., Ni Z.Y., Liu P., Chen M., Li L.C., Chen Y.F., Ma Y.Z. *W55a* encodes a novel protein kinase that is involved in multiple stress responses. *J. Integr. Plant Biol.*, 2009, vol. 51, no. 1, pp. 58–66. doi: 10.1111/j.1744-7909.2008.00776.x.
 15. Mao X., Zhang H., Tian S., Chang X., Jing R. TaSnRK2.4, an SNF1-type serine/threonine protein kinase of wheat (*Triticum aestivum* L.), confers enhanced multistress tolerance in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.*, 2010, vol. 61, no. 3, pp. 683–696. doi: 10.1093/jxb/erp331.
 16. Dure L. III, Crouch M., Harada J., Ho T.H., Mundy J., Quatrano R., Thomas T., Sung Z.R. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.*, 1989, vol. 12, no. 5, pp. 475–486. doi: 10.1007/BF00036962.
 17. Close T.J. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol. Plant.*, 1996, vol. 97, no. 4, pp. 795–803. doi: 10.1111/j.1399-3054.1996.tb00546.x.
 18. Close T.J. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol. Plant.*, 1997, vol. 100, pp. 291–296.
 19. Mayhew M., Hartl F.U. Molecular chaperone proteins. *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt F.C., Curtiss III R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B. Jr., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaechter M., Umberger H.E. (Eds.). Washington, DC, Am. Soc. Microbiol., 1996, pp. 922–937.
 20. Lopez C.G., Banowitz G.M., Peterson C.J., Kronstad W.E. Dehydrin expression and drought tolerance in seven wheat cultivars. *Crop Sci.*, 2002, vol. 43, no. 2, pp. 577–582. doi: 10.2135/cropsci2003.5770.
 21. Flower D.R. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.*, 1996, vol. 318, pt. 1, pp. 1–14.
 22. Frenette-Charron J.B., Breton G., Badawi M., Sarhan F. Molecular and structural analyses of a novel temperature stress-induced lipocalin from wheat and *Arabidopsis*. *FEBS Lett.*, 2002, vol. 517, nos. 1–3, pp. 129–132. doi: 10.1016/S0014-5793(02)02606-6.
 23. Clouse S.D., Sasse J.M. Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1998, vol. 49, pp. 427–451. doi: 10.1146/annurev.arplant.49.1.427.
 24. Murata N., Los D.A. Membrane fluidity and temperature perception. *Plant Physiol.*, 1997, vol. 115, no. 3, pp. 875–879.
 25. Bishop R.E., Penfold S.S., Frost L.S., Höltje J.V., Weiner J.H. Stationary phase expression of a novel *Escherichia coli* outer membrane lipoprotein and its relationship with mammalian apolipoprotein D. Implications for the origin of lipocalins. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, no. 39, pp. 23097–23103.
 26. Los D.A. Fatty Acid Desaturases. Moscow, Nauch. Mir, 2014. 372 p. (In Russian)
 27. Finka A., Cuendet A.F.H., Maathuis F.J.M., Saidi Y., Goloubinoff P. Plasma membrane cyclic nucleotide gated calcium channels control land plant thermal sensing and acquired thermotolerance. *Plant Cell*, 2012, vol. 24, no. 8, pp. 3333–3348. doi: 10.1105/tpc.112.095844.
 28. Gao F., Han X., Wu J., Zhang S., Shang Z., Sun D., Zhou R., Li B. A heat-activated calcium-permeable channel – *Arabidopsis* cyclic nucleotide-gated ion channel 6 – is involved in heat shock responses. *Plant J.*, 2012, vol. 70, no. 6, pp. 1056–1069. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.04969.x.

Для цитирования: Хохлова Л.П. Экспрессия генов стрессовых белков и идентификация молекулярных маркеров устойчивости растений к повышенным температурам и засухе // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2016. – Т. 158, кн. 2. – С. 225–238.

For citation: Khokhlova L.P. Gene expression of stress proteins and identification of molecular markers of plant resistance to high temperatures and drought. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2016, vol. 158, no. 2, pp. 225–238. (In Russian)