

АНАЛІЗ РІВНІВ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ АЛЬФА-ТУБУЛІНУ ПІД ЧАС ХОЛОДОВОЇ АКЛІМАЦІЇ У ЯРОЇ ТА ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ

З'ясування механізмів морозостійкості рослин було і залишається актуальним питанням для створення нових сортів культурних рослин. Особливого значення це питання набуває в регіонах помірних широт. Незважаючи на велику кількість досліджень, клітинні та молекулярні механізми холодостійкості розкриті далеко не повністю. Встановлено, що ціла низка сигнальних шляхів у клітині та ферментів залучена до процесу формування морозостійкості, крім того відмічають і певну роль структурних білків, залучених до регуляції поділу клітин, зокрема, тубулінів [1].

У процесі холодової акліматизації в організмі рослин у результаті зміни експресії генів відбувається ряд морфологічних, фізіологічних та біохімічних перетворень, що залучені до механізмів холодо- та морозостійкості [2–4]. Раніше вже було показано, що під час холодової акліматизації у пшениці (*Triticum aestivum* L.) змінюється рівень експресії генів α -тубуліну. Детальний аналіз рівня експресії представників родини генів α -тубуліну в озимих та ярих сортах пшениці (з різним рівнем холодостійкості) може допомогти в розкритті ролі тубулінів в холодовій акліматизації.

Припускають, що зміна рівня експресії генів тубулінів під впливом низьких температур пов'язана зі змінами складу мікротрубочок [5], що може бути передумовою специфічних білок-білкових взаємодій на їх поверхні [6]. Також вважається, що тубуліни можуть бути залучені до процесів передачі сигналу за рахунок взаємодій з рецепторними протеїназами [4]. У попередніх дослідженнях було показано, що під час холодової акліматизації рівень експресії генів, зокрема α -тубуліну, у пшениці може змінюватись. Встановлено, що різні представники генів родини β -тубулінів (*TUBA*) експресуються в різній мірі, до того ж характер експресії змінюється з часом. Зокрема, на прикладі озимої пшениці (*T. aestivum* cv. Chihoku) показано, що за умов впливу низької температури змінюється рівень експресії гена *TUBA-2-3* [7].

Детальний аналіз рівня експресії представників родини генів α -тубуліну в озимих та ярих сортах (з різним рівнем холодостійкості) може допомогти в з'ясуванні ролі тубулінів в холодовій акліматизації та передачі сигналів холодового стресу. Оскільки найбільші зміни рівня експресії спостерігаються у випадку гена *TUBA-2-3* (зростання на кілька порядків) [7], можна припустити, що високий рівень його експресії є важливим фактором у формуванні холодостійкості під час холодової акліматизації. Вірогідно, що такі зміни експресії у різних сортів позитивно корелюють зі ступенем холодостійкості та швидкістю проходження холодової акліматизації [8, 9]. Якщо такий зв'язок буде знайдено та підтверджено в результаті порівняння рівня експресії у сортів з різним рівнем холодостійкості, то можна буде стверджувати ключову роль гена *TUBA-2-3* у формуванні холодостійкості м'якої пшениці. Саме на вирішення цього питання і було спрямоване наше дослідження.

Матеріали і методи

Об'єктами для експериментів були два вітчизняні сорти м'якої пшениці: озимий сорт Миронівська 808 та ярий сорт Харківська 26. Насіння обох сортів пшениці поверхнево стерилізували шляхом експозиції у 3 %-ному розчині гіпохлориту натрію впродовж 15 хв. У подальшому насіння пророщували 7 днів на вологому фільтрувальному папері при температурі 20 °С, далі 2 тижні проростки вирощували при 20 °С та довжині світлового дня 16 год, після чого половинну проростків продовжували утримувати за вказаних умов (контроль), а іншу половину (експеримент) за умов 4 °С та довжині світлового дня 8 год. Для освітлення використовували люмінесцентні лампи потужністю 16 Вт.

Перед початком експерименту і через 24, 48 та 72 год відбирали зразки тканин (надземна частина рослин), заморожували їх у рідкому азоті та зберігали для подальшого аналізу при –80 °С. Виділення РНК проводили з використанням гуанідинтіоанат фенол-хлороформного методу (TRIzol реагент) [10, 11]. Чистоту та концен-

трацію виділеної РНК визначали за допомогою електрофоретичного аналізу та спектрофотометрії (Eppendorf Biophotometer, США). Концентрації РНК у різних зразках були вирівняні шляхом подальшого розведення.

Для отримання кДНК використовували набір REVERTA-L (ИнтерЛабСервис, Росія). Реакційну суміш загальним об'ємом 20 мкл, яка містила близько 1 мкг РНК та 0,2 мкг випадкових гексануклеотидів (Random hexamers), денатурували нагріванням при 95 °С протягом 5 хв з наступним охолодженням на льоду, після чого додавали реакційний буфер, 1 мМ dNTPs та 200 одиниць зворотної транскриптази (MMlv). Реакційну суміш інкубували 40 хв при 37 °С, у подальшому фермент інактивували прогріванням до 65 °С протягом 10 хв. Температурний режим підтримували за допомогою ампліфікатора Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, США).

Оцінку відносного рівня експресії α -тубуліну 2–3 (*TUBA-2-3*) було проведено за допомогою кількісної ПЛР (ДДС метод). Ампліфікацію специфічного фрагменту гена, що кодує α -тубулін 2–3, проводили з використанням набору SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma-Aldrich, США). Реакційна суміш загальним об'ємом 25 мкл містила 2 мкл кДНК, 1 мкл прямого та зворотнього праймерів. ПЛР проводили з інтеркалюючим барвником SybrGreen (490 нм) з використанням ампліфікатора iQ5 (Bio-Rad, США) за наступним температурним протоколом: початкова денатурація – 94°С, 2 хв; 40 циклів: денатурація – 94°С, 30 с; відпал праймерів при 58°С – 30 с, синтез ДНК при 72°С – 1 хв, заключний етап елонгації – 72°С, 2 хв. Рівень флуоресценції вимірювали на стадії синтезу ампліконів.

Було використано 2 пари специфічних до кДНК *TUBA-2-3* праймерів:

I. Прямий 5' GAGTATTAAGCCTGCCTCCT 3'
Зворотній 5' CAAGGTTCTTACAACACAACAG 3'
II. Прямий 5' GCSTTTGAGCCTTCGTCCAT 3'
Зворотній 5' CCTGGTGGCTGGTAGTTGAT 3'

Після ампліфікації якість продукту перевіряли, досліджуючи криву плавлення продуктів ПЛР та візуально за допомогою електрофорезу в 1,5%-ному агарозному гелі з додаванням бромистого етидію в ультрафіолетовому світлі. Рівень експресії оцінювали окремо для кожної пари праймерів. Для оцінки якості та відтворюваності результатів реакції експеримент проводили у трьох повтореннях. Як референсний ген використовували ген убіхітину.

Результати та обговорення

Система праймерів I. У випадку обох сортів (Миронівська 808 та Харківська 26) спостерігаються дещо схожі зразки експресії *TUBA-2-3*. На початковому етапі відбувається пригнічення рівня експресії цього гена з подальшим зростанням його у кілька разів від початкового рівня. Зокрема після 24 год. холодової аклімації рівень експресії гена *TUBA-2-3* у сорту Миронівська 808 знижується у 5 разів від початкового рівня, після 48 год. – зберігається зниженим у 4,5 разів, після 72 год. – зростає у 8,5 разів у порівнянні з початковим рівнем (до початку холодової аклімації). У сорту Харківська 26 після 24 год. аклімації спостерігається зниження рівня експресії у 38 разів, а після 48 год. рівень експресії зростає, збільшуючись у 1,4 разу від початкового рівня. Після 72 год. експерименту спостерігається підвищений у 8,9 разу рівень експресії гена *TUBA-2-3* (рис. 1).

Система праймерів II. Після 24 год. аклімації рівень експресії гена *TUBA-2-3* у сорту Миронівська 808 знижується у 5 разів, після 48 год. – знижується у 13,5 разу від початкового рівня, після 72 год. рівень експресії збільшується у 20 разів від початкового. У сорту Харківська 26 спостерігається поступове підвищення рівня експресії гена *TUBA-2-3*: після 24 год. ресструється підвищення цього показника у 5,6 разу, після 48 та 72 год. рівень експресії зростає більше, ніж у 80 разів від початкового рівня. Таким чином, для сорту Миронівська 808 пригнічення експресії гена *TUBA-2-3* спостерігається у перші 48 год., а у сорту Харківська 26 відбувається поступове

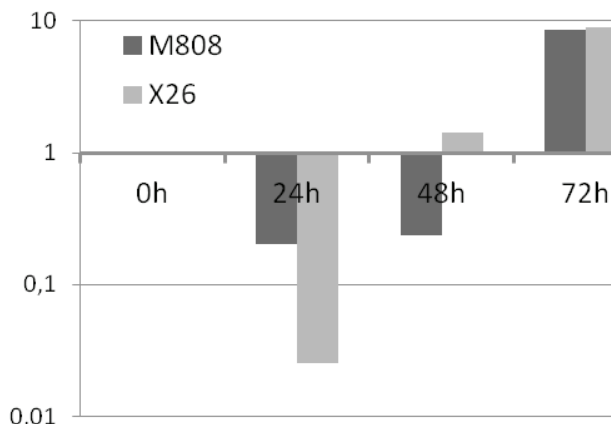


Рис. 1. Відносні рівні експресії гена *TUBA-2-3* (референсний ген – убіквітин) впродовж перших 72 год. холодової аклімації з використанням системи праймерів I (M808 – Миронівська 808, X26 – Харківська 26; вісь ординат – відносний рівень експресії)

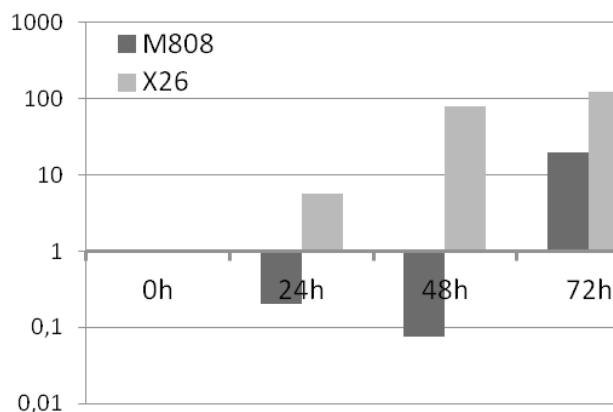


Рис. 2. Відносні рівні експресії гена *TUBA-2-3* (референсний ген – убіквітин) впродовж перших 72 год. холодової аклімації з використанням системи праймерів II (M808 – Миронівська 808, X26 – Харківська 26; вісь ординат – відносний рівень експресії)

підвищення рівня експресії цього гена під час холодової аклімації (рис. 2).

Раніше під час досліджень ярого сорту пшениці Quantum було виявлено, що рівень експресії одного з генів α -тубуліну (досліджувався візуально в агарозному гелі) у порівнянні з контролем виявився різко знижений після 24 год. холодової аклімації, а потім відновлювався до початкового рівня (після 72 год.) і надалі зростав [8]. Якщо розглядати озимі сорти, то рівні експресії гена *TUBA-2-3* у озимого сорту Chihoku вияви-

лися наступними: в перші 24 год. спостерігалось зниження рівня його експресії, а потім цей показник поступово зростав, досягаючи початкового рівня після 6-го дня холодової аклімації, та 10-кратно збільшувався після 14 днів [7]. Таким чином поступове відновлення експресії *TUBA-2-3* спостерігається для обох сортів, але у озимих сортів таке відновлення відбувається пізніше.

Висновки

Досліджено закономірності у змінах рівнів експресії гена *TUBA-2-3* під час перших 72 год. холодової аклімації у озимого (Миронівська 808) та ярого (Харківська 26) сортів м'якої пшениці. Для обох сортів спостерігається пригнічення рівнів експресії гена *TUBA-2-3* з подальшим поступовим його зростанням. У випадку озимого сорту Миронівська 808 у перші 48 год. ресструється знижений у порівнянні з контролем рівень експресії гена *TUBA-2-3* з подальшим відновленням та зростанням експресії після 72 год. У випадку ярого сорту Харківська 26 відбувається поступове підвищення рівня експресії *TUBA-2-3* у перші 24 год., після чого рівень експресії гена *TUBA-2-3* зростає, досягаючи значних рівнів після 72 год. холодової аклімації. В цілому у озимого сорту пшениці відновлення експресії відбувається дещо пізніше в порівнянні з ярим сортом.

ЛІТЕРАТУРА

1. Abdrakhamanova A., Wang Q.Y., Khokhlova L., Nick P. Is microtubule disassembly a trigger for cold acclimation? // *Plant Cell Physiol.* – 2003. – 44. – P. 676–686.
2. Xiong L., Schumaker K.S., Zhu J-K Cell signaling during cold, drought, and salt stress // *Plant Cell.* – 2002. – 14. – P. 165–183.
3. Maibam P., Nawkar G.M., Park J.H., Sahi V.P., Lee S.Y., Kang C.H. The influence of light quality, circadian rhythm, and photoperiod on the CBF-mediated freezing tolerance // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – 14. – P. 11527–11543.
4. Gray G.R., Chauvin L., Sarhan F., Huner P.A. Cold acclimation and freezing tolerance: a complex interaction of light and temperature // *Plant Physiol.* – 1997. – 114. – P. 467–474.
5. Kerr G.P., Carter J.V. Tubulin isotypes in rye roots are altered during cold acclimation // *Plant Physiol.* – 1990. – 93. – P. 83–88.
6. Tardif G., Kane N.A., Adam H., Labrie L., Major G., Gulick P., Sarhan F., Laliberté J.F. Interaction network of proteins associated with abiotic stress response and development in wheat // *Plant Mol. Biol.* – 2007. – 63. – P. 703–718.
7. Christov N.K., Imai R., Blume Y.B. Differential expression of two winter wheat alpha-tubulin genes during cold acclimation // *Cell Biol. Int.* – 2008. – 32. – P. 574–578.
8. Ridha Farajalla M., Gulick P.J. The alpha-tubulin gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.) and differential gene expression during cold acclimation // *Genome.* – 2007. – 50. – P. 502–519.
9. Jian L.C., Sun L.H., Liu Z.P. Studies on microtubule cold stability in relation to plant cold hardiness // *Acta Bot. Sinica.* – 1989. – 31. – P. 737–741.
10. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples // *BioTechniques.* – 1993. – 15. – P. 532–537.
11. Chomczynski P., Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Anal. Biochem.* – 1987. – 162. – P. 156–159.

BUY D.D., PIRKO YA.V., BLUME Ya.B.

Institute of Food Biotechnology and Genomics,

Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskogo str., 2A, e-mail: denisbuy90@gmail.com

EXPRESSION OF WINTER AND SPRING WHEAT ALPHA-TUBULIN GENES DURING COLD ACCLIMATION

Aims. Cereals, such as wheat (*Triticum aestivum* L.), display significant increase in freezing tolerance during a period of cold acclimation (CA). Unravel functions and regulations of CA-associated genes can help in receiving cold-resistant cultivars using biotechnology methods. It have identified potentially important for CA tubulin gene, such as *TUBA-2-3*, which is assumed to be essential in forming cold-tolerant microtubules. **Methods.** Cold acclimation during 72 h was conducted. The level of *TUBA-2-3* mRNA was measured using RT Real-time PCR with specific primers. **Results.** Similar patterns of expression alterations were observed on both winter and spring cultivar. The level of expression *TUBA-2-3* decreased at day 1 and was strongly increased at day 2–3 for winter cultivar. Gene expression gradually increased at day 1–3 for spring cultivar. **Conclusion.** Differences in expression patterns between winter and spring cultivar were found, which leads to different level of winter and spring wheat cold tolerance.

Keywords: *Triticum aestivum*, cold acclimation, tubulin, gene *TUBA-2-3* expression.