

ПАНЧУК І.І., ЧЕРЕВАТОВ О.В., ВОЛКОВ Р.А.✉

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
Україна, 58012, м. Чернівці, вул. Коцюбинського, 2м, e-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

✉ r.volkov@chnu.edu.ua, (050) 916-82-14

ВПЛИВ САХАРОЗИ НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ *Apx* ЗА ДІЇ ТЕПЛОВОГО СТРЕСУ

Вуглеводи займають центральне місце в обміні речовин. Зокрема, у рослин ці сполуки є первинними продуктами фотосинтезу, які – безпосередньо чи опосередковано – впливають на більшість метаболічних процесів. Основним транспортним вуглеводом вищих рослин є сахароза. Ця сполука впливає на ріст та розвиток: у деяких видів підвищений рівень розчинних сахаридів затримує проростання насіння і стимулює цвітіння та старіння [1–3].

Проте сахароза є не тільки джерелом карбону та основою енергетичного обміну, вона також відіграє важливу роль у якості сигнальної молекули [4], яка здатна активувати різні сигнальні шляхи, що викликає зміни в експресії генів [5, 6] і призводить до фізіологічної адаптації [2].

Показано, що стресові чинники абіотичної природи, зокрема такі, як посуха, засолення, низькі температури, інтенсивне освітлення, які призводять до утворення активних форм кисню у клітині, викликають накопичення сахарози. Вважається, що таке накопичення може бути адаптивною відповіддю рослин на стресові умови [7]. За дії сахарози на проростки *Cucumis sativum* відбувалося зростання активності антиоксидантних ферментів, зокрема таких, як супероксиддисмутаза, гваякол пероксидаза, аскорбат пероксидаза та глутатіон редуктаза. Водночас спостерігалось зниження рівня перекисного окислення ліпідів [8]. Крім того, обробка рослин броколі розчином сахарози перед початком стресу зумовлювала накопичення у квітках такої важливої антиоксидантної сполуки, як аскорбат [9].

На сьогоднішній день питання впливу сахарози на експресію стресових генів, зокрема генів антиоксидантних ферментів, залишається мало дослідженим. Тому метою нашого дослідження було вивчити вплив сахарози на експресію мультигенної родини *Apx* у *Arabidopsis thaliana* в умовах теплового стресу.

Матеріали і методи

Для досліджень використовували арабі-

допис *Arabidopsis thaliana* екотипу Columbia 0. Рослини вирощували у кліматичній камері в ґрунті за сталої температури 20°C і при освітленні 2,5 кЛк в умовах 16-годинного світлового дня та відносній вологості повітря 60–70 %. Через 6,5 тижнів рослини переносили на 3 дні на 28°C. У наших попередніх дослідженнях було встановлено, що культивування за 28°C підсилює стресову відповідь арабідопсису на тепловий шок. Для стресової обробки використовували листки середньої частини розетки рослин *A. thaliana*. Стрес проводили в скляних колбах на водяній бані в інкубаційному буфері, що містив 1 мМ калій-фосфатний буфер (рН 6,0). Залежно від варіанта обробки, до середовища додавали 1 % сахарозу. В колби вносили по 10–15 листків.

Теплову обробку рослин проводили в темряві протягом 2 год за температури 37°C. Контролем слугували зразки, які інкубувалися протягом зазначеного часу у темряві за температурі 20°C. Після стресу листки заморожували.

Виділення полі(А)⁺-мРНК здійснювали із 100 мг рослинної наважки за допомогою Oligotex kit (Qiagen). 50 нг полі(А)⁺-мРНК конвертували в кДНК, використовуючи праймер oligoT₁₈V та зворотну транскриптазу RNase minus (ThermoScript RT-PCR System, Invitrogen, Carlsbad, США). Експресію досліджуваних генів на рівні мРНК оцінювали а використанням ЗТ-ПЛІР у режимі реального часу (real-time RT-PCR). Праймери для ПЛІР створювалися з використанням пакета програм Primer 3 Software (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>) та послідовностей генів, наявних у GenBank. У якості внутрішнього стандарту для порівняння при оцінці рівня мРНК різних генів використовували мРНК *Act2*, що кодує одну з ізоформ актину. Ампліфікацію кДНК проводили в реакційній суміші об'ємом 50 мкл, що містила 1 од. акт. Hot-Start Tag ДНК-полімерази (Invitrogen), 50 мМ КСl, 3 мМ MgCl₂, 20 мМ трис-НСl (рН 8,4), 300 мкМ кожного з дезокси-нуклеотидтрифосфатів (Sigma) та 0,5 мкМ ген-

специфічних праймерів. Накопичення продуктів ПЛР у реакції оцінювали за їх взаємодією з барвником SYBR-Green (Molecular Probes). ПЛР здійснювали на установці CFX96 (Bio-Rad, США) за такою програмою: (1) первинна активація – 95°C, 10 хв.; (2) денатурація ДНК – 94°C, 20 с; (3) гібридизація праймерів – 60°C, 50 с; (4) синтез ДНК – 70°C, 30 с. Загальна кількість циклів ампліфікації – до 40.

Усі експерименти проводили для трьох незалежно вирощених партій рослин. Відхилення порогових значень (threshold values) складала менше 1 циклу для незалежних препаратів кДНК та менше, ніж 0,5 циклу, для повторностей однієї й тієї ж кДНК. Зміни у 2 або більше разів у відносній концентрації ПЛР продуктів

стаціонарного рівня мРНК згідно з t-тестом були статистично достовірними [10].

Результати та обговорення

Враховуючи, що сахароза може мати прокторну або сигнальну функцію у клітині [4], а отже, впливати на характер стресової відповіді, було вирішено перевірити, чи присутність сахарози в інкубаційному середовищі впливає на характер експресії генів *Арх*. Для цього були зіставлені рівні мРНК *Арх* для листків *A. thaliana*, які зазнали інкубації за 37°C протягом 2 год у 1 мМ калій-фосфатному буфері без додавання або із додаванням 1 % сахарози (рис.).

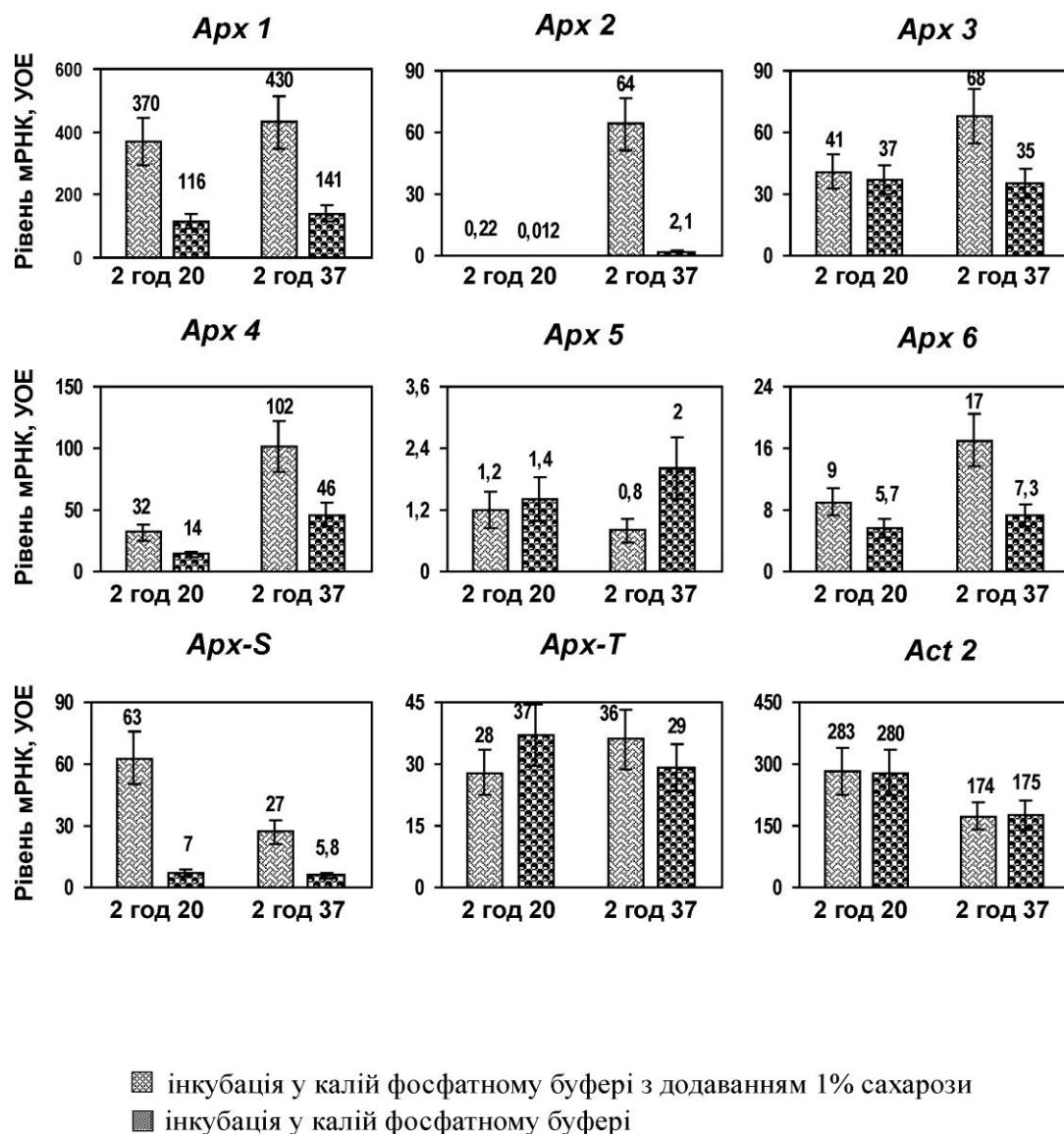


Рис. Рівень мРНК різних генів *Арх* та актину в листках *Arabidopsis thaliana* екотипу Columbia 0.

Встановлено, що для більшості генів *Арх* відсутність сахарози в інкубаційному буфері призводила до зниження рівня мРНК як за умов теплового стресу, так і після інкубації за кімнатної температури. Найсильніше цей ефект проявлявся для *Арх2*: за відсутності сахарози рівень мРНК був у 30 разів нижчим за умов теплового стресу та у 18 разів нижчим – за кімнатної температури. Аналогічні ефекти становили 4,7 і 9 разів для *sАрх* та 3 та 3,2 рази для *Арх1*. Для решти досліджених генів зниження рівня мРНК не перевищувало 2–2,3 раза або було взагалі відсутнім. Отже, присутність сахарози в інкубаційному буфері – як за умов помірного теплового стресу, так і за кімнатної температури – викликає селективне збільшення рівнів мРНК деяких *Арх*. Раніше нами було оцінено рівень мРНК у листках *A. thaliana* екотипу С24 для інтактних рослин та рослин, що інкубувалися за кімнатної температури в присутності сахарози [11]. Порівняння наших нових даних із рівнями мРНК, які були визначені у попередніх експериментах, наводить на думку, що наявність сахарози в інкубаційному буфері є одним із факторів, які зумовлюють зростання рівня мРНК у листках арабідопсису, що інкубувалися за кімнатної температури.

Література

1. Sauer N. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters // *FEBS Letters*. – 2007. – V. 581. – P. 2309–2317. doi: 10.1016/j.febslet.2007.03.048.
2. Wind J., Smeekens S., Hanson J. Sucrose: metabolite and signaling molecule // *Phytochemistry*. – 2010. – V. 71, No 14–15. – P. 1610–1614. doi: 10.1016/j.phytochem.2010.07.007.
3. Hellmann H.A., Smeekens S. Sugar sensing and signaling in plants // *Frontiers Plant Sci*. – 2014. – V. 5. – P. 113. doi: 10.3389/fpls.2014.00113.
4. Rolland F., Sheen J. Sugar sensing and signaling networks in plants // *Biochemical Society Transaction*. – 2005. – V. 33. – P. 269–271. doi: 10.1042/BST0330269.
5. Loreti E., Poggi A., Novi G., Alpi A., Perata P. A genome-wide analysis of the effects of sucrose on gene expression in *Arabidopsis* seedlings under anoxia // *Plant Physiol*. – 2005. – V. 137. – P. 1130–1138. doi: 10.1104/pp.104.057299.
6. Ho S.-L., Chao Y.-C., Tong W.-F., Yu S.-M. Sugar coordinately and differentially regulates growth- and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanism // *Plant Physiol*. – 2001. – V. 125, No 4. – P. 877–890. doi: 10.1104/pp.125.2.877.
7. Couee I., Sulmon C., Gouesbet G. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants // *J. Exp. Bot*. – 2006. – V. 57. – P. 449–459. doi: 10.1093/jxb/erj027.
8. Cao Y.-Y., Yang M.-T., Chen S.-Y., Zhou Z.-Q., Li X., Wang X.-J., Bai J.-G. Exogenous sucrose influences antioxidant enzyme activities and reduces lipid peroxidation in water-stressed cucumber leaves // *Biologia Plantarum*. – 2015. – V. 59, No 1. – P. 147–153. doi: 10.1007/s10535-014-0469-7.
9. Nishikawa N., Kato M., Hyodo H., Ikoma Y., Sugiura M., Yano M. Effect of sucrose on ascorbate level and expression of genes involved in the ascorbate biosynthesis and recycling pathway in harvested broccoli florets // *J. Exp. Bot*. – 2005. – V. 56. – P. 65–72. doi: 10.1093/jxb/eri007.
10. Буджак В.В. Біометрія. – Чернівці: Рута, 2013. – 326 с.
11. Panchuk I.I., Volkov R.A., Schoffl F. Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of APX in *Arabidopsis* // *Plant Physiol*. – 2002. – V. 129, No 6. – P. 838–853. doi: 10.1104/pp.001362.

Отже, в цілому отримані результати свідчать про те, що присутність сахарози в інкубаційному буфері позитивно впливає на експресію більшості генів *Арх*. Можна припустити, що цей ефект пов'язаний із тим, що у проведених дослідах (інкубація у темряві) сахароза виступає важливим зовнішнім джерелом енергії для клітин листка. За відсутності сахарози клітини обмежені у своїх енергетичних можливостях і підтримують транскрипцію генів та синтез лише тих білків, які були найбільш необхідні для виживання. Із такою точкою зору узгоджується відносна стабільність рівня мРНК *Act2* (важливого білка «домашнього господарства») незалежно від присутності сахарози в інкубаційному буфері. Відповідно, зниження рівня мРНК деяких *Арх* у контрольних пробах без сахарози вказує, що експресія цих генів не є критично важливою за умов досліду.

Висновки

Отримані дані показали, що в умовах теплового стресу сахароза може виконувати сигнальну роль у регуляції стресової відповіді, зокрема – підсилювати залежну від температури експресію генів *Арх1* та *Арх2*.

PANCHUK I.I., CHEREVATOV O.V., VOLKOV R.A.

Yuri Fedkovych National University of Chernivtsi,

Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsubynski str., 2, e-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

EFFECT OF SUCROSE ON EXPRESSION OF APX GENES UPON HEAT STRESS

Aim. Sucrose plays an important role as a signaling molecule that causes changes in gene expression. However, the effect of sucrose on gene expression of antioxidant enzymes is poorly understood. The purpose of our study was to investigate the effect of sucrose on the expression of the multigenic family *Apx* in *Arabidopsis thaliana* under heat stress conditions. **Methods.** Leaves of *A. thaliana* were exposed to heat stress at 37°C in the presence or in absence of sucrose. Subsequently, mRNA levels were determined using quantitative RT-PCR. **Results.** It was found that absence of sucrose in the incubation buffer resulted in a decrease of mRNA for most *Apx* genes, both in heat stress-treated samples and after incubation at room temperature. The strongest effect was shown for *Apx2*: without sucrose the level of mRNA under heat stress was 30 times lower. **Conclusions.** Obtained data showed that sucrose can perform a signaling role in regulating the stress response upon heat stress, and, in particular, enhance the temperature-dependent gene expression of *Apx1* and *Apx2*.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, multigenic family *Apx*, heat stress, mRNA, qPCR.