

УДК 581.19:577.175.19:575.117

Действие экстракта куколок дубового шелкопряда на уровень экспрессии генов трех белков растительных клеток, способных участвовать в стресс-реакции

Г.В. Ляхнович*, Т.А. Толкачева**, А.А. Чиркин*

*Государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси»

**Учреждение образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машиерова»

В настоящей работе приведены данные, которые доказывают, что в жидком содержимом куколок дубового шелкопряда имеются вещества, способные модулировать экспрессию генов трех белков – β -глюкозидазы, фосфолипазы D и фитохрома A. Эти белки могут участвовать в процессах трансдукции сигналов и развитии ответов растения на стрессовые воздействия разной природы. Экстракт куколок дубового шелкопряда повышает уровень экспрессии гена β -глюкозидазы через 7 суток после обработки семян. Экстракт куколок дубового шелкопряда, вероятно, вызывает волну повышения уровня экспрессии генов фосфолипазы D и фитохрома A в интервале 3–7 суток после обработки семян. Основной итог данного исследования заключается в том, что при разведении жидкого содержимого куколок в 10000 раз (исходный экстракт готовится в разведении 1:10) удастся зарегистрировать модулирующее действие низкомолекулярных биорегуляторов практически в гомеопатических концентрациях на экспрессию генов.

Ключевые слова: дубовый шелкопряд, β -глюкозидаза, фосфолипаза D, фитохром A, экспрессия генов.

Effect of the Extract of Oak Silkworm Pupae on the Level of Gene Expression of Three Proteins of Plant Cells Capable of Participating in Stress Reaction

G.V. Lyakhnovich*, T.A. Tolkacheva**, A.A. Chirkin**

*Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus

**Educational establishment «Vitebsk State P.M. Masherov University»

The paper presents data that prove that the liquid content of oak silkworm pupae have substances that can modulate gene expression of three proteins: β -glucosidase, phospholipase D and phytochrome A. These proteins are able to participate in the processes of signal transduction and the development of plant responses to stress impact of different nature. Extract of oak silkworm pupae increases the level of expression of the gene β -glucosidase 7 days after seed treatment. Extract of oak silkworm pupae is likely to cause a wave of increasing the level of gene expression of phospholipase D and phytochrome A in the range of 3–7 days after seed treatment. Main findings of the study are the fact that 10000 time delusion of liquid silkworm pupae content (the 1:10 deluded basic extract is prepared) it is possible to register modulating impact of low molecule bioregulators in practically homeopathic concentrations on the gene expression.

Key words: oak silkworm, β -glucosidase, phospholipase D, phytochrome A, gene expression.

Растения постоянно подвергаются влиянию биогенных и абиогенных стрессовых факторов внешней среды, которые могут вызывать различные изменения в растительных тканях

вплоть до их повреждения [1–2]. Как правило, после воздействия в клетках растений инициируются процессы, восстанавливающие гомеостаз, включая регенерацию поврежденных тка-

ней. Вместе с тем, в случае проникновения через поврежденные участки патогенных организмов растение активирует реакции, способные ослабить или полностью предотвратить развитие инфекции. В настоящее время охарактеризованы некоторые этапы ответа растения на стрессовые воздействия. Например, в ответе могут участвовать олигосахариды, высвобождаемые при разрушении клеточной стенки, а также стрессовые фитогормоны (жасмоновая кислота, этилен, абсцизовая кислота, олигопептид системин) [3–4]. Все эти биологически активные вещества участвуют в передаче сигнала в растении, индуцируют образование внутриклеточных сигнальных и защитных соединений и экспрессию защитных генов. Конечные этапы ответа растения на стресс включают в себя синтез вторичных метаболитов и белков с разнообразными функциями (ингибиторы протеиназ, полифенолоксидазы, ферменты катаболизма аминокислот), а также молекул, восстанавливающих клеточную стенку. Эти вещества обеспечивают либо заживление поврежденных участков тканей, либо оказывают отпугивающее или отравляющее действие на животных-фитофагов, а также предотвращают распространение патогенных организмов в здоровые клетки инфицированного растения [2–4]. Нет сомнения в том, что поиск веществ, с помощью которых можно влиять на скорость и эффективность восстановительных процессов в растении, имеет первостепенное значение для практики растениеводства.

Вместе с тем, природа промежуточных этапов трансдукции сигнала о повреждении в растениях изучена недостаточно. Имеются разрозненные сведения о том, что в развитии ответа могут участвовать свободные жирные кислоты (ЖК) и фосфатидная кислота (ФК). Однако конкретные функции этих липидов и механизмы стресс-индуцированной модуляции их внутриклеточного содержания до сих пор остаются далекими от полного понимания. Предполагается, что ЖК могут служить интермедиатами при синтезе жасмоновой кислоты, а функции ФК до сих пор точно не установлены. Известно, что ЖК могут высвобождаться из глицерофосфолипидов фосфолипазами A_1 и A_2 (Фл $A_{1,2}$), а ФК образуется при гидролизе глицерофосфолипидов фосфолипазой D (ФлD) и/или при сопряженном действии фосфолипазы C (ФлC) и диацилглицерол (ДАГ)-киназы. Но вопрос о том, какие именно ферменты и в какой последовательности принимают участие в модуляции содержания ЖК и ФК, остается неясным [5].

В связи с этим целью настоящей работы было изучение действия экстракта куколок дубового шелкопряда на уровень экспрессии генов некоторых белков растительной клетки – фосфолипазы D, β -глюкозидазы и фитохрома A, способных участвовать в процессах трансдукции сигналов и развитии ответов растения на стрессовое воздействие.

Материал и методы. Исследование выполнено с привлечением молекулярно-генетических методов исследования растительных тканей [6].

В качестве объекта исследования использовали первые листья проростков овса (*Avena Sativa* L.) сорта «Гоша» отечественной селекции. Растения выращивали при 15-часовом световом дне и освещении полихроматичным белым светом (40 Вт, 150 мкмоль $m^{-2}s^{-1}$), при температуре 25°C. Семена овса замачивались сутки в воде (контроль) или в растворе экстракта куколок (1:1000 = экстракт:вода). Экстракт куколок дубового шелкопряда получали в соответствии с патентом [7]. Равномерно проросшие зерновки отбирались для дальнейшего выращивания на воде или растворе экстракта, соответственно. В возрасте проростков 3 и 7 суток со дня прорастывания проводили забор ткани из апикальной зоны листа проростка. Далее измеряли уровень относительной экспрессии (R) генов: β -глюкозидазы – *Gluc*, фосфолипазы D – *PLDav2*, фитохрома A – *PhyA2*.

Выделение общей РНК из растительной ткани проводили с использованием реагента *TRISOL* в соответствии с коммерческим протоколом *Invitrogen* (USA). Количество выделенной РНК определялось спектрофотометрически по поглощению при 260 нм. Степень чистоты препаратов оценивалась по соотношению A_{260}/A_{280} ($A_{260}/A_{280} = 2,0$).

Для получения кДНК на матрице РНК использовали реакцию обратной транскрипции (ОТ) с применением обратной транскриптазы вируса мышиной лейкемии Молони (*M-MLN* – *Moloney murine leukemia virus*). Реакцию проводили с помощью набора реагентов «*RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit*» в соответствии со стандартным протоколом (*Fermentas*). В качестве затравки для синтеза цепи ДНК на РНК-матрице использовали смесь случайных гексамерных праймеров (*random hexanucleotide primers*). На реакцию брали 2 мкг общей РНК, предварительно обработанной ДНКазой (*Deoxyribonuclease I*), что позволяло избавиться от загрязнения препарата геномной ДНК. Реакцию проводили в соответствии со стандартным протоколом (*Fermentas*).

Объем реакционной смеси для амплификации фрагментов кДНК составлял 20 мкл. Для проведения ПЦР использовали набор реагентов «High Fidelity PCR Enzyme Mix». Реакционная смесь содержала 200 мкМ дНТФ, 1 U *Taq*-полимеразы, 100 нг кДНК. Использовали ген-специфические праймеры для ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Концентрация ионов магния и праймеров оптимизировалась в ходе экспериментов. ПЦР проводили на амплификаторе MiniOpticon (Bio-Rad) в следующем режиме: начальная денатурация – 95°C, 3 мин; затем 40 циклов (денатурация – 95°C, 40 с; отжиг – 56°C, 30 с; элонгация – 72°C, 30 с); конечная элонгация – 72°C, 15 мин; остановка реакции – 10 мин, 10°C.

Анализ полученных данных и уровня экспрессии генов проводился $\Delta\Delta C_t$ -методом (C_t – threshold cycle = пороговый цикл):

$$\Delta C_{tm} = C_{tmk} - C_{tmv} \text{ and } \Delta C_{tn} = C_{tnk} - C_{tnv}$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

где $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{tn} - \Delta C_{tm}$,

R – относительное изменение уровня экспрессии гена; m – ген-мишень (экспрессия которого исследуется); k – контрольный образец (получен из растительной ткани, не подвергавшейся никаким обработкам); n – ген-нормализатор (ген, экспрессия которого принимается за постоянную при различных условиях роста растений); v – образец растительной ткани после внешнего модулирующего воздействия.

Дополнительный контроль выхода амплифицированных ДНК-фрагментов проводили методом одномерного горизонтального электрофореза в агарозном геле. Детекцию нуклеиновых кислот, окрашенных бромистым этидием, осуществляли на приборе *Gel-Doc2000* (Bio-Rad). В качестве контроля линейных размеров и количества ДНК использовали маркеры Gene Ruler 50 bp DNA Ladder Plus, Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus, ФХ174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, 9 и pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23.

Результаты и их обсуждение. β -глюкозидаза – общее название ферментов класса гидролаз (β -D-глюкозидглюкогидролаза, EC 3.2.1.21), катализирующих гидролиз β -глюкозидной связи при концевых невосстанавливающих β -D-гликозильных остатках с высвобождением β -D-глюкозы и агликона различной природы в природных и синтетических β -глюкозидах и олигосахаридах. β -глюкозидазы широко распространены в природе и характерны как для прокариотных, так и для эукариотных организмов. В растениях β -глюкозидазы выполняют многочисленные функции, такие, как пере-

стройки клеточной стенки, лигнификация, химическая защита, взаимодействие растения и патогена, активация фитогормонов и вторичных метаболитов (агликоны, высвобождаемые глюкозидазами из гликозида, могут представлять собой токсичные соединения или их предшественники, активные формы фитогормонов, активированные вторичные метаболиты). У разных объектов и даже у одного объекта, но в разных типах ткани фермент может находиться в различных компартментах. Например, для β -глюкозидазы характерна как внутриклеточная, так и внеклеточная локализация. У разных видов β -глюкозидаза локализуется в клеточной стенке, хлоропластах, цитоплазме и ядре. Содержание транскриптов β -глюкозидазы может зависеть от возраста ткани, например, в кукурузе (*Zea mays* L.) β -глюкозидаза содержится, главным образом, в молодых частях растений (корень, мезокотиль, почка, примордиальные листья, coleoptиль, нитевидные пестики кукурузы, семечка) и локализуется в пластидах [8–10]. В проростках овса бета-глюкозидаза (авенакозидаза) локализуется в хлоропластах, в то время как ее субстрат (авенакозиды) накапливается в вакуолях. Повреждение клетки при инфицировании грибом приводит к тому, что фермент приходит в контакт с высвобождаемым из вакуоли субстратом и гидролизует его с образованием токсического продукта, который убивает инфекционный агент или замедляет его рост. Особенности возрастной динамики экспрессии гена β -глюкозидазы представлены на рис. 1.

Анализ данных, представленных на рис. 1, показал, что экстракт куколок дубового шелкопряда через 3 суток увеличивает экспрессию гена β -глюкозидазы незначительно, но через 7 суток этот эффект делается достоверным ($P < 0,05$).

Одним из ключевых ферментов метаболизма фосфолипидов в растительной клетке является фосфолипаза D (ФлД) (EC 3.1.4.4). ФлД катализирует реакцию гидролиза глицерофосфолипидов по концевой фосфодиэфирной связи с образованием фосфатидной кислоты (ФК) и спирта, входящего в полярную группу исходного субстрата. Этот фермент играет важную роль в защитных ответах растений на различные неблагоприятные воздействия внешней среды, такие, как дефицит воды, механическое повреждение, низкие температуры, действие фитопатогенов. Помимо выполнения катаболических функций ФлД участвует в процессах сигнальной трансдукции, опосредованной фитогормонами. Известно также, что ФлД играет важную регуля-

торную роль в различных процессах, протекающих в растительной клетке, включая программируемую гибель клеток, дифференцировку корневых волосков, рост корня и другие ответы на различные стрессовые воздействия. Фосфатидная кислота, продукт деятельности ФлД, стимулирует многие клеточные процессы, включая синтез ДНК, пролиферацию клеток, активность ряда ферментов: фосфатидилинозитолфосфат-5-киназы, фосфолипазы С, фосфолипазы А2 и различных протеинкиназ. Кроме того, она может служить предшественником липидных медиаторов (диацилглицерол, лизо-

фосфатидная кислота, свободные жирные кислоты). Как один из ферментов, контролирующих обмен мембранных фосфолипидов, ФлД участвует в поддержании клеточной жизнеспособности и гомеостаза, играет важную роль в процессах прорастания семян, старения клетки, а также адаптации растительного организма к воздействию таких стрессовых факторов внешней среды, как бактериальная инфекция и механическое повреждение тканей [11–12]. Особенности экспрессии гена данного фермента под влиянием экстракта куколок дубового шелкопряда представлены на рис. 2.

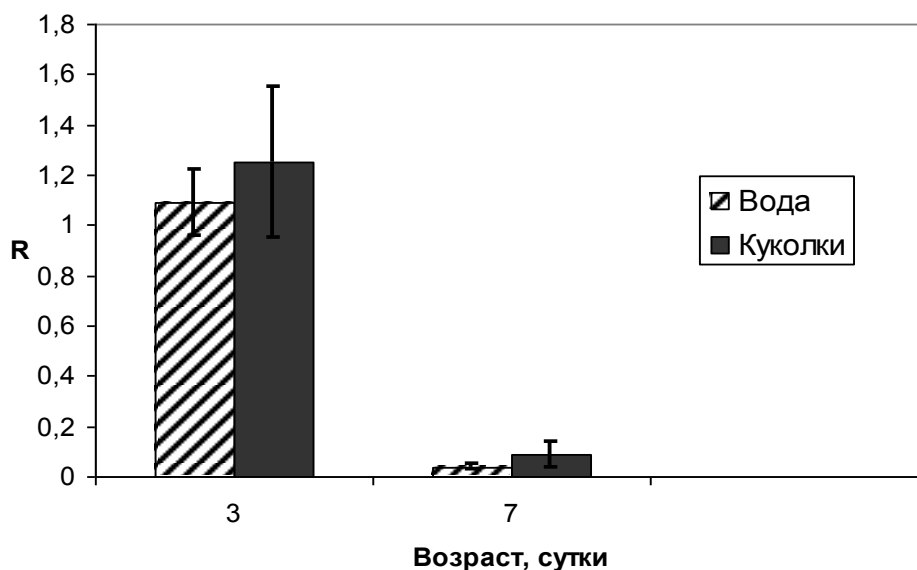


Рис. 1. Возрастные изменения R(Gluc) при действии экстракта куколок дубового шелкопряда.

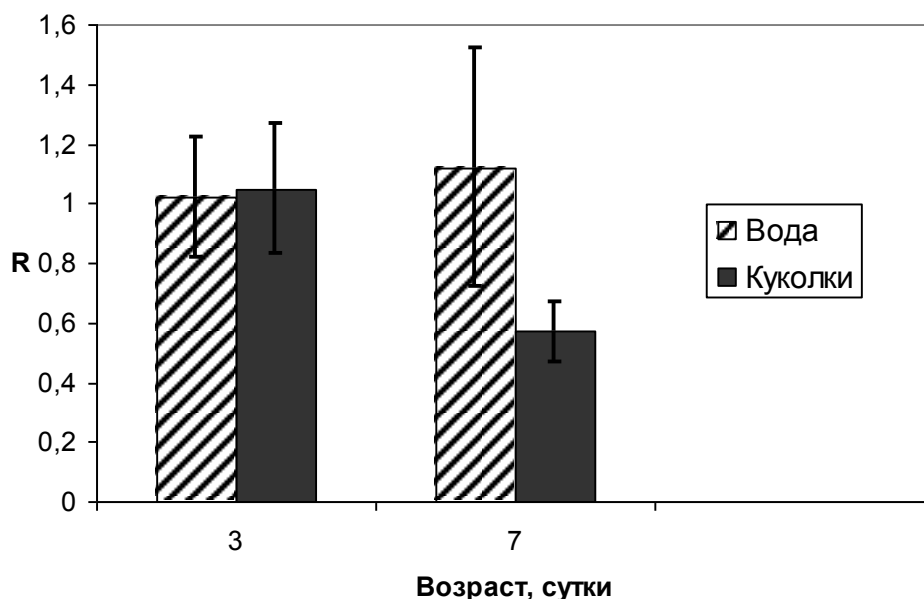


Рис. 2. Возрастные изменения R(PLDav2) при действии экстракта куколок дубового шелкопряда.

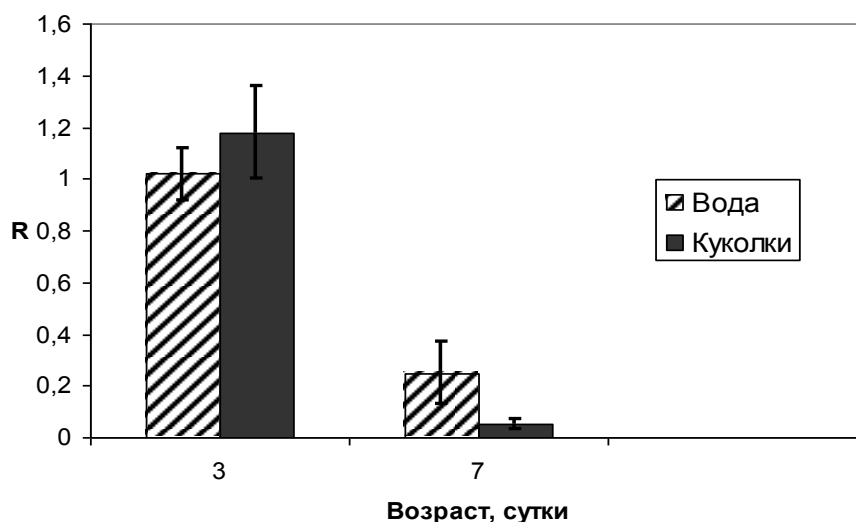


Рис. 3. Возрастные изменения R(PhyA2) при действии экстракта куколок дубового шелкопряда.

Из анализа приведенных данных следует, что степень экспрессия гена фосфолипазы D через 3 суток одинакова в опыте и контроле. Однако спустя 7 суток степень экспрессии гена фосфолипазы D при действии экстракта куколок дубового шелкопряда достоверно ниже по сравнению с контролем (обработка водой). При интерпретации этих данных возможны две точки зрения. Во-первых, экстракт куколок дубового шелкопряда может уменьшать уровень экспрессии гена фосфолипазы D, поскольку подобный путь сигналинга для растительной клетки в данной постановке эксперимента не актуален. Во-вторых, не исключено, что экстракт куколок дубового шелкопряда вызывает усиление экспрессии гена фосфолипазы D в более ранние сроки наблюдения, и эта волна экспрессии завершается уменьшением уровня экспрессии гена фермента через 7 суток.

Хромопротеин фитохром отвечает за обратимые ответы растения на свет. В настоящее время фитохром обнаружен во всех систематических группах растений – покрытосеменных, голосеменных, водорослях, папоротниках и мхах, а также в цианобактериях и некоторых грибах [13]. Фитохром может существовать в двух спектральных взаимопревращающихся формах: неактивной P_k -форме (поглощающей красный, К-свет) и физиологически активной P_{dk} -форме (поглощающей дальнекрасный, ДК-свет). Механизм передачи сигнала от фитохрома к эффекторным системам до сих пор остается не ясным. Фитохром может оказывать свое рецепторное действие на уровне экспрессии генов, на уровне модуляции активности ферментов без их синтеза *de novo*, а также на мембранном уровне, связанном с изменениями эф-

фективности ионных потоков и проницаемости мембран. Иными словами, фотоответы могут реализовываться на уровне транскрипции, трансляции и/или деградации белка (медленные реакции, развивающиеся в течение десятков минут и часов) и на уровне изменения электрических и осмотических показателей клетки (быстрые реакции, протекающие в течение секунд и минут). Все эти варианты могут осуществляться, взаимодополняя и взаимозаменяя друг друга в зависимости от характера сигнала.

На рис. 3 представлены данные по экспрессии гена фитохрома А под влиянием экстракта куколок дубового шелкопряда.

Фитохромы выполняют в клетке различные фотосенсорные функции. Наиболее полно изучены функции *phyA* и *B*. Фитохром А опосредует процессы прорастания семян и деэтиоляции проростков на постоянном ДК-свету (FR-HIR) и за индуцируемые коротким импульсом света сверхнизкоэнергетические реакции прорастания семян и индукции экспрессии гена *CAB*. Кроме того, *phyA* обеспечивает деэтиоляцию проростков, развивающихся под густым растительным покровом, в условиях когда световое окружение обогащено ДК-светом [14].

Результаты, приведенные на рис. 3, напоминают динамику экспрессии гена фосфолипазы D: экстракт куколок дубового шелкопряда достоверно увеличивает уровень экспрессии гена фитохрома А через 3 суток и достоверно уменьшает этот показатель через 7 суток. Можно предположить, что экстракт куколок дубового шелкопряда вызывает усиление экспрессии гена фитохрома А в более ранние сроки наблюдения, и эта волна экспрессии завершается уменьшением уровня экспрессии гена фермента через 7 суток.

Заключение. В последние 20 лет интенсивно изучались производные первичных метаболитов, выполняющих регуляторные функции. Синтез таких веществ требует экспрессии генов определенных наборов ферментов. В свою очередь, синтезированные биорегуляторы модулируют экспрессию генов ферментов, продуцирующих компоненты сигнальных систем, обеспечивающих адаптацию растений к изменяющимся условиям обитания и, в частности, к различным проявлениям стресса. Так, жасмонаты – группа гормонов растений, которые регулируют рост и развитие (жасмоновая кислота, ее эфиры), – синтезируются из линолевой кислоты. Они являются аналогами простагландинов – биорегуляторов млекопитающих, синтезирующихся из арахидоновой кислоты, образуемой при достаточном количестве линолевой и линоленовой жирных кислот. Содержание жасмонатов в тканях растений отличается на разных этапах развития и является ответом на стимулы внешней среды. Жасмоновая кислота и метилжасмонат 1) ингибируют прорастание неспящих семян и вызывают прорастание спящих семян; 2) стимулируют накопление запасных белков, поскольку гены, кодирующие запасные белки, являются чувствительными к жасмоновой кислоте и ее производным; 3) вызывают хлороз и ингибируют гены, продукты которых участвуют в фотосинтезе; 4) влияют на устойчивость растений к насекомым и заболеваниям, так как активируют многие гены защитной системы растений (совместное действие с этиленом); 5) вызывают деградацию JAZ-белка, меченного убиквитином, и освобождение ряда факторов транскрипции [1; 4; 15].

В данной работе приведены сведения, которые доказывают, что в жидком содержимом куколок дубового шелкопряда имеются вещества, способные модулировать экспрессию генов трех белков – β -глюкозидазы, фосфолипазы D и фитохрома A. Эти белки способны участвовать в процессах трансдукции сигналов и развитии ответов растения на стрессовые воздействия разной природы. Экстракт куколок дубового шелкопряда повышает уровень экспрессии гена β -глюкозидазы через 7 суток после обработки семян. Экстракт куколок дубового шелкопряда, вероятно, вызывает волну повышения уровня экспрессии генов фосфолипазы D и фитохрома A в интервале 3–7 сутки после обработки семян.

Основной итог нашего исследования заключается в том, что при разведении жидкого содержимого куколок в 10000 раз (исходный экстракт готовится в разведении 1:10) удается зарегистрировать модулирующее действие низкомолекулярных биорегуляторов практически в гомеопатических концентрациях на экспрессию генов. Поскольку экстракт куколок дубового шелкопряда был получен методом трехкратного кипячения и удаления выпавших осадков, можно думать, что модулирующие экспрессию генов вещества следует искать, прежде всего, среди аминокислот и небольших пептидов.

ЛИТЕРАТУРА

- Gfeller, A. Jasmonate controls polypeptide patterning in undamaged tissue in wounded *Arabidopsis* leaves / A. Gfeller [et al.] // *Plant Physiol.* – 2011. – Vol. 156. – P. 1797–1807.
- Vij, S. Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants: review article / S. Vij, A.K. Tyagi // *Plant Biotechnol. J.* – 2007. – Vol. 5. – P. 361–380.
- Bahramnejad, B. Differential expression of eight defensin genes of *N. benthamiana* following biotic stress, wounding, ethylene, and benzothiadiazole treatments / B. Bahramnejad [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2009. – Vol. 28. – P. 703–717.
- Koo, A.J. Cytochrome P450 CYP94B3 mediates catabolism and inactivation of the plant hormone jasmonoyl-L-isoleucine / A.J. Koo, T.F. Cooke, G.A. Howe // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2011. – Vol. 108(22). – 9298–9303.
- Li, M. Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants / M. Li, Y. Hong, X. Wang // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – Vol. 1791. – P. 927–935.
- Толкачева, Т.А. Защитные реакции растительных объектов при стрессе и методы их оценки / Т.А. Толкачева, И.М. Морозова, Г.В. Ляхнович // *Современные проблемы биохимии. Методы исследований* / под ред. А.А. Чиркина. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – С. 438–469.
- Способ получения средства для профилактики инсулинорезистентности: пат. Респ. Беларусь 15645 A61K 35/64; A61P 5/50 / А.А. Чиркин, В.У. Буко, О.М. Балаева-Тихомирова, Т.А. Толкачева, Д.И. Паршенок. – Опубл. 30.04.2012 // *Бюлл. № 2 (85)*. – 2012. – С. 79.
- Kwak, S.N. Assembly and function of AsGlu2 fibrillar multimer of oat β -glucosidase / S.N. Kwak [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – Vol. 1794. – P. 526–531.
- Lee, K.H. Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid / K.H. Lee [et al.] // *Cell.* – 2006. – Vol. 126. – P. 1109–1120.
- Mazzuca, S. Cell and tissue localization of β -glucosidase during the ripening of olive fruit by in situ activity assay / S. Mazzuca, A. Spadafora, A.M. Innocenti // *Plant Sci.* – 2006. – Vol. 171. – P. 726–733.
- Wang, X. Phospholipase D in hormonal and stress signaling / X. Wang // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2002. – Vol. 5. – P. 408–414.
- Xuemin, Wang. Regulatory Functions of Phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses / Wang Xuemin // *Plant Physiology.* – 2005. – Vol. 139. – P. 566–573.
- Синешев, В.А. Система фитохромов в растительной клетке: флуоресцентный и фотохимический подходы / В.А. Синешев // *Фотобиология растений и фотосинтез: Годневские чтения*. – Минск, 1998. – Т. 4. – С. 54–82.
- Yanovsky, M.J. Phytochrome A, phytochrome B and HY4 are involved in hypocotyl growth responses to natural radiation in *Arabidopsis*: weak de-etiolation of the *phyA* mutant under dense canopies / M.J. Yanovsky, J.J. Casal, G.C. Whitelam // *Plant Cell Environ.* – 1995. – Vol. 18. – P. 788–794.
- Farmer, E.E. Plant biology: jasmonate perception machines / E.E. Farmer // *Nature.* – 2007. – Vol. 448. – P. 659–660.

Поступила в редакцию 27.05.2013. Принята в печать 22.08.2013
Адрес для корреспонденции: e-mail: chir@tut.by – Чиркин А.А.