

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОЙ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ЭКСПРЕССИЮ СТРУКТУРНЫХ И РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОВ ПУТИ БИОСИНТЕЗА АНТОЦИАНОВ В ПРОРОСТКАХ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

Савина С.М., Дремук И.А., Емельянова А.В., Прищепчик Ю.В., Аверина Н.Г.
ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь
svetlanapavluchkova@yandex.ru

Введение. Антоцианы представляют собой нефотосинтетические пигменты растений, относящиеся к классу флавоноидов. Они играют важную физиологическую и экологическую роль в развитии растений, их защите от патогенов и неблагоприятных факторов внешней среды [1]. Так, обладая мощной антиоксидантной активностью, антоцианы непосредственно участвуют в детоксикации свободных радикалов. Очищенные растворы антоцианов удаляют практически все виды активных форм кислорода и азота с эффективностью в четыре раза большей, чем аскорбат и α -токоферол [2]. Антоцианы активно поглощают излучение в УФ-области, защищая растения (в частности, генетический аппарат) от губительного действия УФ лучей.

В настоящее время большое внимание уделяется изучению роли обогащенных антоцианами разных тканей и органов растений в формировании их стрессоустойчивости. Хорошим объектом для таких исследований является пшеница, для которой расшифрованы гены, контролирующие пигментацию отдельных ее органов, таких как колеоптили (*Rc*-гены), стебли (*Pc*), зерно (*R*), перикарп (*Pp*), пыльники (*Pan*) и др. [3], а также показана регуляторная природа этих генов [3, 4]. Важная роль в формировании устойчивости растений к абиотическим и биотическим факторам внешней среды отводится колеоптилям пшеницы. Так, показана защитная роль антоцианов, содержащихся в колеоптилях проростков пшеницы, выращиваемых в присутствии ионов Cd [5]. Проростки пшеницы с интенсивно окрашенными в красный цвет колеоптилями и высоким содержанием антоцианов обладали большей устойчивостью к засухе по сравнению с растениями со слабо окрашенными органами и низким уровнем в них антоцианов [6].

Индукция накопления антоцианов в хозяйственно ценных сельскохозяйственных культурах, в том числе в озимых, может явиться весьма эффективным способом повышения устойчивости растений. 5-аминолевулиновая кислота (АЛК) – важнейший предшественник в системе биосинтеза тетрапирролов (хлорофиллов и гема), экологически безопасный природный регулятор роста растений и антистрессор, а также высокоэффективный индуктор накопления антоцианов. В литературе показано, что АЛК усиливает обусловленную антоцианами окраску плодов, улучшает не только товарный вид, но и вкусовые качества яблок, персиков, груш, китайской сливы [7]. В кожуре яблок, обработанных АЛК, отмечено повышение экспрессии генов ключевых ферментов системы биосинтеза антоцианов – *PAL*, *CHS*, *CHI*, *DFR* [8]. Наряду с этим, отсутствуют данные о влиянии экзогенной АЛК на систему биосинтеза антоцианов в злаковых культурах. Мы предположили, что с помощью экзогенной АЛК можно индуцировать повышение уровня экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты биосинтеза флавоноидов, и тем самым повысить содержание антоцианов в растениях озимой пшеницы.

Целью данного исследования являлось изучение влияния экзогенной АЛК на экспрессию регуляторного гена *PAP-1*, кодирующего транскрипционный фактор PAP1/ТаMYB75, а также на экспрес-

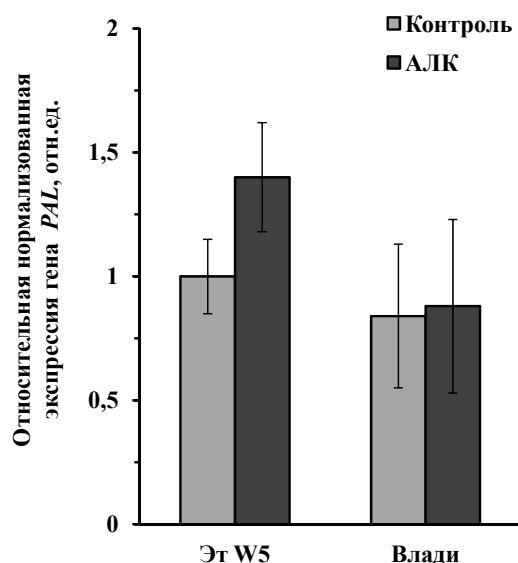
сию структурных генов пути биосинтеза антоцианов – *PAL*, кодирующего ключевой фермент фенилпропаноидного участка пути фенилаланин-аммоний-лиазу, и *CHS*, кодирующего начальный фермент флавоноидного участка пути халконсинтазу.

Материалы и методы. Объектом исследования служили колеоптиль 8-дневных проростков озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта «Эт W5», характеризующегося красной окраской колеоптилей, и сорта «Влади», характеризующегося зеленой окраской колеоптилей. Семена пшеницы были любезно предоставлены Республиканским унитарным предприятием «Научно-практический центр земледелия Национальной академии наук Республики Беларусь». Семена пшеницы предварительно замачивали в дистиллированной воде (контроль) или в растворе АЛК в концентрации 50 мг/л (вариант «АЛК») на 2 ч при температуре $25\pm 2^\circ\text{C}$, затем семена высаживали в грунт «Восторг» и выращивали в лабораторных условиях при температуре $25\pm 2^\circ\text{C}$ до 8-дневного возраста.

Уровень экспрессии генов *PAL*, *CHS* и *PAP-1* оценивали методом ПЦР в реальном времени с использованием термоциклера C1000 Touch с оптическим модулем CFX96 (Bio-Rad, США). Суммарную РНК выделяли из свежих колеоптилей с помощью Tri-reagent (Sigma-Aldrich, США) и количественно определяли с помощью спектрофотометра ND-2000 (Thermo Scientific, США). Для получения кДНК на матрице РНК использовали реакцию обратной транскрипции с применением обратной транскриптазы вируса мышиной лейкемии Молони. Синтез кДНК проводили с помощью набора реагентов ProtoScript II Reverse Transcriptase (New England BioLabs, США) в амплификаторе MJ Mini (Bio-Rad, США) [9]. Реакцию ПЦР проводили с помощью 2,5-кратной реакционной смеси для ПЦР в реальном времени в присутствии EVA Green (Синтол, Россия) с использованием ген-специфичных праймеров для целевых генов *PAL* – CGCCGAGGCTATTGACATCT (прямой) и GTTCCTCACCGTGTCTTCA (обратный), *CHS* – AAAGGCGATCAAGGAGTGGG (прямой) и GGCGAAGACCGAGCATCTTA (обратный), *PAP-1* – ACAAGAAGCGCCCTGAAACT (прямой) и ACAGCGTTGGACCTGATGAA (обратный) и гена-нормализатора *act* – TGGACGTCACCAAC (прямой) и AGGTCAAGACGAAGGATGGC (обратный). Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием стандартного пакета программ «Excel 2010» и программы Bio-Rad CFX Maestro. Различия считали статистически достоверными при $p \leq 0,05$. Результаты анализа представляли в виде относительной нормализованной экспрессии в отн. ед. (относительно контрольного варианта для сорта «Эт W5»).

Результаты и выводы. С целью выявления взаимосвязи между способностью к накоплению антоцианов и экспрессией ряда структурных и регуляторных генов пути биосинтеза антоцианов в качестве объекта исследования были отобраны два сорта озимой пшеницы, различающиеся по окраске колеоптилей и содержанию в них антоцианов: сорт «Эт W5» с красной окраской колеоптилей и высоким содержанием антоцианов (412 ± 52 мкмоль/г сырой массы) и сорт «Влади» с зеленой окраской колеоптилей и низким содержанием антоцианов ($12,5 \pm 1,2$ мкмоль/г сырой массы).

А



Б

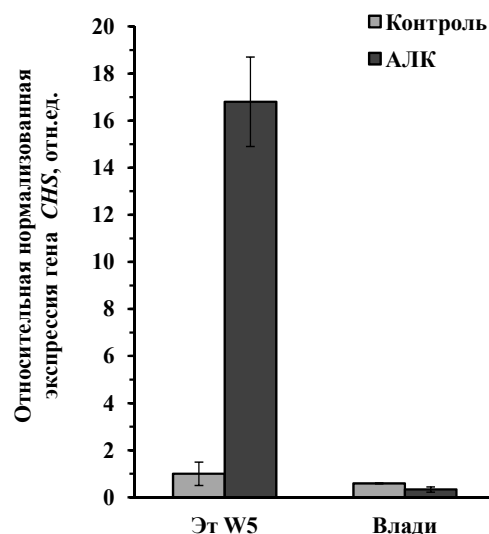


Рисунок – Влияние экзогенной АЛК в концентрации 50 мг/л на экспрессию генов *PAL* (А) и *CHS* (Б) в колеоптилях озимой пшеницы сортов «ЭтW5» и «Влади»

Ранее нами было показано, что при предварительном замачивании семян озимой пшеницы в растворе АЛК в концентрации 50 мг/л колеоптили проростков сорта «Эт W5» приобретали более интенсивное окрашивание ткани, что было обусловлено повышением содержания в них антоцианов в 1,5 раза по сравнению с контролем. Напротив, колеоптили растений сорта «Влади», семена которых обрабатывали АЛК, своей окраски не меняли, и содержание в них антоцианов оставалось низким – в среднем 22 мкмоль/г сырой массы [10].

В данной работе установлено, что в колеоптилях пшеницы сорта «Эт W5» под действием АЛК в 1,4 раза возрастает уровень относительной нормализованной экспрессии гена *PAL* и в 17 раз этот показатель возрастает для гена *CHS* по сравнению с уровнем экспрессии данных генов в колеоптилях растений контрольного варианта (рисунок). При этом в колеоптилях растений сорта «Влади» достоверных изменений под действием АЛК экспрессии генов *PAL* и *CHS* зафиксировано не было. Можно сделать вывод, что положительное действие экзогенной АЛК на экспрессию структурных генов биосинтеза антоцианов в колеоптилях пшеницы является сортоспецифичным и определяется начальным уровнем содержания антоцианов в данной ткани.

Далее мы изучили влияние экзогенной АЛК на экспрессию регуляторного гена *PAP-1*, кодирующего транскрипционный фактор PAP1/TaMYB75, который контролирует тканеспецифическую экспрессию структурных генов биосинтеза антоцианов. Результаты исследования показали, что уровень экспрессии *PAP-1* в колеоптилях пшеницы сорта «Эт W5», характеризующегося красной окраской колеоптилей, был в 20 раз выше, чем уровень экспрессии данного гена в колеоптилях сорта «Влади», характеризующегося зеленой окраской колеоптилей. Под действием экзогенной АЛК наблюдалась лишь тенденция к увеличению экспрессии *PAP-1* в колеоптилях растений сорта «Эт W5», при этом в колеоптилях растений сорта «Влади» экспрессию *PAP-1* детектировать не удалось.

Ранее в работе [8] на растениях озимого рапса Авериной Н.Г. с соавторами было показано, что экзогенная АЛК контролирует экспрессию структурного гена синтеза антоцианов *DFR*, кодирующего 4-дегидрофлавонолредуктазу, и регуляторного гена *HY5* транскрипционного фактора HY5. Отмеченное нами положительное действие экзогенной АЛК на экспрессию генов *PAL* и *CHS* в колеоптилях озимой пшеницы указывает на то, что АЛК влияет не только на экспрессию «поздних» структурных и регуляторных генов биосинтеза антоцианов, но и на экспрессию начальных структурных генов фенилпропаноидного и флавоноидного участков пути биосинтеза антоцианов.

Исследования проводились при финансовой поддержке гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б20ГРМГ-001).

Список использованных источников

1. 5-Aminolevulinic acid (ALA) biosynthetic and metabolic pathways and its role in higher plants: a review / Y. Wu [et al.] // Plant Growth Regulation. – 2019. – Vol. 87. – P. 357–374.
2. Wang, H. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins / H. Wang, G. Cao, R. L. Prior // J Agric Food Chem. – 1997. – Vol. 45, N 2. – P. 304–309
3. Молекулярно-генетические механизмы формирования окраски плодов и семян растений / В.Ф. Аджиева [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Vol. 19 (5). – P. 561–573.
4. Shoeva, O.Y. The specific features of anthocyanin biosynthesis regulation in wheat / O.Y. Shoeva, E.K. Khlestkina // Advances in wheat genetics: from genome to field : proceedings of the 12th International wheat genetics symposium. – 2015. – P. 147–157.
5. Shoeva, O.Y. Anthocyanins participate in the protection of wheat seedlings against cadmium stress / Shoeva O.Y., Khlestkina E.K. // Cereal Research Communications. – 2018. – Vol. 46 (2). – P. 242–252.
6. Tereshchenko, O.Y. Relationship between anthocyanin biosynthesis and abiotic stress in wheat / O.Y. Tereshchenko [et al.] // In: A. Börner, B. Kobijlski (eds), Proc. 15th EWAC Conf. – 2011, Novi Sad. – P. 72–75.
7. New physiological effects of 5-aminolevulinic acid in plants: the increase of photosynthesis, chlorophyll content, and plant growth / Y. Hotta [et al.] // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1997. – Vol. 12. – P. 2025–2028.
8. Effect of 5-aminolevulinic acid and genistein on accumulation of polyphenol and anthocyanin in «Qinyang» apples / L. Chen [et al.] // J Anim Plant Sci. – 2015. – Vol. 25. – P. 68–79.
9. Молекулярно-генетические механизмы регуляции дигидрофлавонолредуктазы и транскрипционного фактора HY5 экзогенной 5-аминолевулиновой кислотой в проростках озимого рапса / Н.

Г. Аверина [и др.] // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2020. – Т. 64, № 3. – С. 317–324.

10. Savina, S.M. «Induction of accumulation of anthocyanins by 5-aminolevulinic acid in winter wheat varieties with different coleoptile color» / S.M. Savina [et al.] // International Scientific Conference “Plants Stress and Adaptation”: The Bulletin of Kharkiv National Agrarian Universit. Series biology. – 2021. – P.156–157.