

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ УРОВНЕЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ $\alpha$ -ТУБУЛИНА У ОЗИМЫХ И ЯРОВЫХ СОРТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ХОЛОДОВОЙ АККЛИМАЦИИ

Д.Д. БУЙ, А.Е. ДЕМКОВИЧ, Я.В. ПИРКО, Я.Б. БЛЮМ

Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины,  
ул. Осиповского, 2а, Киев, 04123, Украина

E-mail: denisbuy90@gmail.com; blume.yaroslav@nas.gov.ua; demand.dn@gmail.com, yarvp1@gmail.com

*Изучены профили экспрессии 15 генов  $\alpha$ -тубулина у ярового и озимого сортов мягкой пшеницы под действием низких температур. Среди исследуемых генов выделено два подсемейства (по 3 гена в каждом), для которых характерными являются повышенные уровни экспрессии на начальных этапах холодной акклимации. Особого внимания заслуживает ген Tuba-2-3, который в рамках своего подсемейства характеризуется наиболее выраженным по амплитуде начальным увеличением уровня экспрессии. Также для этого гена выявлены наибольшие различия уровней экспрессии между сортами в рамках подсемейства генов тубулина, к которому принадлежит этот ген. В случае озимого сорта характерны более высокие значения уровней экспрессии этого гена тубулина, сохраняющиеся в течение продолжительного срока (до 7-го дня акклимации). Также установлено, что для всех генов  $\alpha$ -тубулина, принадлежащих к 4-му подсемейству, характерным является значительное начальное увеличение уровней экспрессии, которое максимальных значений в ходе дальнейшей акклимации. Высокие начальные значения уровней экспрессии генов этого подсемейства также могут свидетельствовать об их важной роли в обеспечении устойчивости микротрубочек пшеницы к низким температурам на первых этапах холодной акклимации.*

**Ключевые слова:**  $\alpha$ -тубулин, *Triticum aestivum* L., экспрессия генов, холодная акклимация.

**Введение.** Устойчивость и адаптация растений к низким температурам обеспечивается комплексом различных клеточно-физиологических механизмов [1–5], и дальнейшее изучение их функционирования все еще остается актуальным вопросом. В течение последних десятилетий накоплены доказательства того, что одним из неканонических внутриклеточных механизмов формирования холодо- и морозоустойчивости является передача сигналов для

реорганизации основных элементов цитоскелета растений — актиновых филаментов (микротиламентов) [6–9] и микротрубочек [10–13]. В частности, после таких перестроек микротрубочки, формирующие митотическое веретено, способны сохранять стабильное, полимеризованное состояние при пониженных температурах. В тоже время у ряда теплолюбивых культурных растений (огурцы, помидоры и др.) под действием температур ниже +8 °С происходит деполимеризация микротрубочек, что приводит к нарушению внутриклеточного транспорта и дальнейшей гибели растения [14].

Для повышения холодоустойчивости растений можно применять акклимацию, суть которой сводится к предварительному их выдерживанию (экспозиции) при низких, но положительных температурах, например, при +4 °С. После прохождения холодной акклимации растения приобретают способность выживать при более низких температурах. Показательно, что микротрубочки в клетках таких растений сохраняются при дальнейшем снижении температуры до отрицательных значений, что, например, продемонстрировано для мезофилла шпината [15], корней озимой ржи [16], корней озимой пшеницы [10, 17]. Примечательно, что стабилизация микротрубочек благоприятствует акклимации растений [18] и, очевидно, что процессы акклимации могут быть сопряжены с изменениями гормонального статуса в закаленных растениях [19].

Показано, что в процессе акклимации растений может изменяться содержание отдельных изоформ тубулина, формирующего микротрубочки. В свое время такие результаты были зафиксированы для корней ржи [20], а также при протеомном анализе белков корня цикория [21]. Показно, что в клетках каллусной

культуры высокогорного гималайского снежного лотоса *Saussurea laniceps* наблюдается повышение уровней  $\alpha$ -тубулина после акклимации при 0 °С, в то время как уровни  $\beta$ -тубулина снижаются [22]. В опытах по скринингу мутантов табака, полученных в результате инактивации отдельных генов вследствие агробактериальной трансформации, было продемонстрировано, что у ряда мутантов увеличивается устойчивость к холоду, очевидно, вследствие количественного перераспределения различных изоформ тубулина [23].

Все эти результаты приводят к заключению, что, вероятнее всего, изменения уровня экспрессии отдельных генов тубулина являются составляющей частью важного механизма, обеспечивающего холодоустойчивость растений на клеточном уровне. Прежде всего такое умозаключение нашло подтверждение при исследовании особенностей экспрессии отдельных генов  $\alpha$ -тубулина у пшеницы [24, 25]. На сегодняшний день в геноме мягкой пшеницы обнаружено в общей сложности 15 генов  $\alpha$ -тубулина [25]. Соответственно, некоторые изменения в экспрессии генов  $\alpha$ -тубулина под действием низких температур были уже зарегистрированы ранее для отдельно взятых яровых [25] и озимых [24] сортов мягкой пшеницы. Однако эти исследования касались лишь отдельных изоформ  $\alpha$ -тубулина, характеризовались небольшой продолжительностью опытов и не учитывали сортовых различий. Тем не менее, были выявлены определенные изменения в профиле экспрессии исследуемых  $\alpha$ -тубулинов при воздействии низких температур. Ранее, основываясь на предполагаемой потенциальной роли изоформ  $\alpha$ -тубулина, кодируемого геном *Ta\_TUBA 2-3*, в формировании холодоустойчивости [3] нами были определены уровни экспрессии этого отдельно взятого гена пшеницы при аналогичных экспериментальных условиях [26, 27]. Также в ходе более длительного эксперимента нами были исследованы профили экспрессии генов всех изоформ  $\alpha$ -тубулина у озимого сорта Деметра [28]. С целью завершения этих исследований в данной работе было проведено сравнительное исследование уровней экспрессии всех известных генов  $\alpha$ -тубулина мягкой пшеницы (15 генов) в течение 28 дней при низких темпе-

ратурах у двух сортов, характеризующихся разными уровнями холодоустойчивости.

**Материалы и методы.** Уровни экспрессии генов  $\alpha$ -тубулина исследовали у двух сортов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) отечественной селекции: Деметра (озимый) и Елгия (яровая). Семена стерилизовали в течение 15 мин в 3%-ном растворе гипохлорита натрия, а затем проращивали в течение 7 дней на влажной фильтровальной бумаге при температуре 20 °С. В дальнейшем, после пересаживания в стерильный грунт, проростки 10 дней выращивали при температуре 20 °С и фиксированной длине светового дня (16 ч). После этого часть растений (около 80 проростков на сорт) была подвергнута длительному (28 дней) воздействию низких температур для проведения холодовой акклимации (4 °С при фиксированной длине светового дня 8 ч). В качестве материала для дальнейшего анализа отбирали надземную часть растений (через 1, 2, 3, 7, 10, 21, 28 дня после акклимации), которую немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре –80 °С. Первый отбор образцов проводили перед началом холодовой акклимации (0-й день акклимации). Уровни экспрессии генов  $\alpha$ -тубулина до холодовой акклимации были использованы в качестве условного контроля (100 % или 1 условная единица).

РНК выделяли с использованием коммерческого набора GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit («Thermo Scientific», США) по стандартному протоколу производителя. Полученную РНК подвергали обработке ДНКазой (DNase I, RNase-free, «Fermentas», США). Концентрацию РНК и показатели ее чистоты определяли с помощью биофотометра («Eppendorf Biophotometer», США). Концентрацию РНК в различных образцах выравнивали путем разведения. Для получения кДНК использовали коммерческий набор RevertAid™ Reverse Transcriptase («Fermentas», США) согласно стандартному протоколу производителя, без использования ингибитора нуклеаз.

Для оценки экспрессии генов  $\alpha$ -тубулина для каждого гена были подобраны соответствующие праймеры (в общей сложности 15 пар праймеров). Для одного из генов  $\alpha$ -тубулина – *Ta\_Tuba-2-3* – были использованы ранее пред-

ложенные последовательности праймеров [3]. Кодированные последовательности этого и других исследуемых генов  $\alpha$ -тубулина пшеницы были взяты из общедоступной базы данных GenBank. Подбор праймеров для оценки экспрессии генов  $\alpha$ -тубулинов был проведен при помощи программы PrimerBlast. В качестве референтного гена использован ген, кодирующий убухитин. Список праймеров приведен в таблице.

Оценку относительных уровней экспрессии генов  $\alpha$ -тубулина проводили с помощью количественной ПЦР ( $\Delta\Delta C_t$  метод). Реакционную смесь готовили с использованием коммерческого набора SYBR® Green Jump Start™ Taq Ready Mix™ («Sigma-Aldrich», США) по стандартному протоколу производителя. Реакционная смесь общим объемом 10 мкл на пробу содержала 5 мкл коммерческой смеси, 0,5 мкл полученной ранее кДНК, по 0,5 мкл 100 пмоль прямого и обратного праймеров. ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием амплификатора iQ5 (Bio-Rad, США) в соответствии со следующим протоколом: начальная денатурация — 94 °C, 2 мин.; 40 циклов (денатурация 94 °C, 30 с; отжиг праймеров 58 °C, 30 с; элонгация 72 °C, 60 с); завершающая элонгация — 72 °C, 2 мин. Уровень флуоресценции измеряли на этапе синтеза ампликонов.

После амплификации качество полученного продукта проверяли с помощью изучения кривой плавления, а также с использованием электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле. Уровень экспрессии оценивали отдельно для каждого гена  $\alpha$ -тубулина. Для увеличения точности и оценки воспроизводимости результатов исследование проведено в 3-х кратной повторности.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Исследуемое семейство генов  $\alpha$ -тубулина пшеницы состоит из пяти подсемейств по 3 гена в каждом (рис. 1), потому приведенные ниже результаты сгруппированы соответственно (по подсемействам).

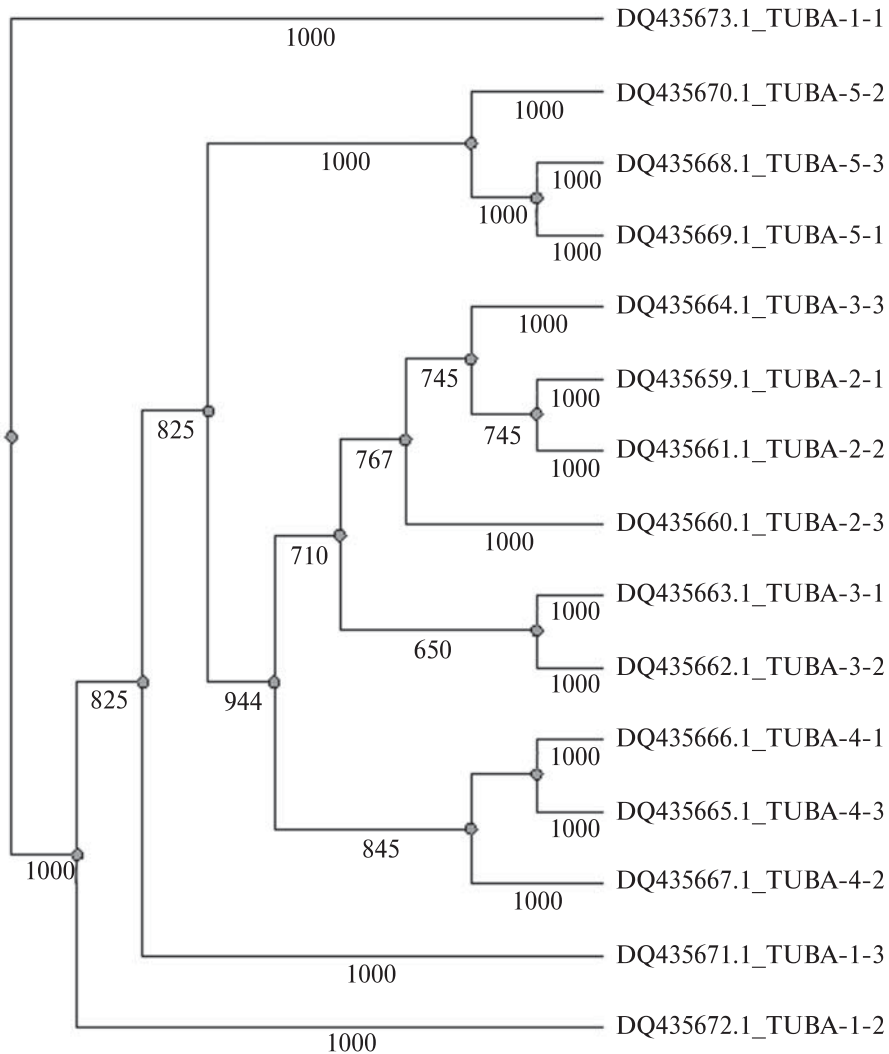
Как было ранее установлено, распределение исследуемых генов  $\alpha$ -тубулина по хромосомам пшеницы равномерно — по 5 генов в каждом из наборов хромосом А, В и D [25]. Подсемейство генов  $\alpha$ -тубулина 1 локализовано во второй паре хромосом, подсемейство 2 — в 1-й паре хромосом, подсемейства 3 и 5 — в 4-й паре

хромосом, подсемейство 4 — в 5-й паре хромосом (рис. 2).

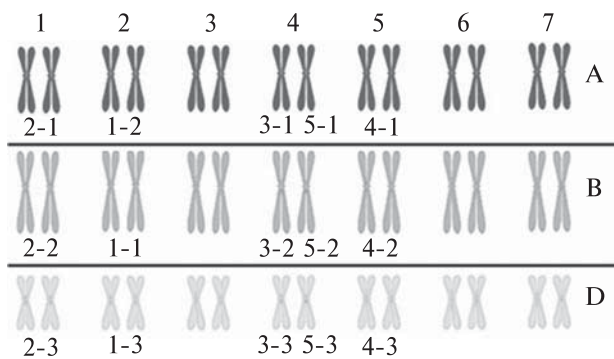
*Первое подсемейство генов  $\alpha$ -тубулина.* Уровни экспрессии генов  $\alpha$ -тубулина, принадлежащих к первому подсемейству, на протяжении всего периода акклиматизации пшеницы колеблются в пределах от 0,05 до 8 у.е. относительно контроля (рис. 3). Характерной особенностью генов  $\alpha$ -тубулина этого подсемейства является снижение уровней их экспрессии в первые дни холодной акклиматизации у ярового сорта Элегия, в то время как у озимого сорта Деметра таких изменений не наблюдали. Напротив, уровень

**Использованные в работе праймеры к генам  $\alpha$ -тубулина мягкой пшеницы**

Гены	Праймеры (F, R, 5'→3')
DQ435673.1 <i>TUBA-1-1</i>	CCGCAGGTCTCAACAGC GCACCATCAAACCTCAGGGA
DQ435672.1 <i>TUBA-1-2</i>	CCCCGCAGGTCTCGACAG CCTCAGCGAGGTGGTAAGTG
DQ435671.1 <i>TUBA-1-3</i>	TCGACAGCTGTTGTAGAGC ACCTCAGGGAGGTGGTAAAGT
DQ435659.1 <i>TUBA-2-1</i>	CTTCATCTATGATGGCCAAGTGT GAGATCATGCACACAGCCCT
DQ435661.1 <i>TUBA-2-2</i>	CAGTTTACCCATCTCCCCAGG AGCACCATCAAACCTCAGGG
DQ435660.1 <i>TUBA-2-3</i>	TGAGGACTGGTGCTTACCGC TCCATAGTCAACAGAGAGGCG
DQ435663.1 <i>TUBA-3-1</i>	GGTCTCCAGGGTTCCCTTGT GGCGCTCAATGTCAAGGGAG
DQ435662.1 <i>TUBA-3-2</i>	CTTCAGGGATTCCCTCGTCTTCA GTTGGTGTATGTTGGGCGCT
DQ435664.1 <i>TUBA-3-3</i>	CATGTTCCCGTGTCTGTCTT AGACGCTCAAGGAGGAGAGA
DQ435666.1 <i>TUBA-4-1</i>	GGATGTGACTGAGTTCCAGAC ATGCCGCACTTGAACCCC
DQ435667.1 <i>TUBA-4-2</i>	GACGCGGCCAATAACTTCG CTCGTTGTGAGCAGGATGG
DQ435665.1 <i>TUBA-4-3</i>	GTCTTCGTTGATCTCGAGCC AGAGGTCGACACCTGAGGA
DQ435669.1 <i>TUBA-5-1</i>	ATCCAAGCTCGGTTTACC TGCTGCTCGTGGGAAGGC
DQ435670.1 <i>TUBA-5-2</i>	AGCTTGTTTCACTATCTATCCTT GTGATCTCGGGGACGGAG
DQ435668.1 <i>TUBA-5-3</i>	TCGGTTGGGGTTGCCAAG AGGATAGATGGTGAAACCGAGC

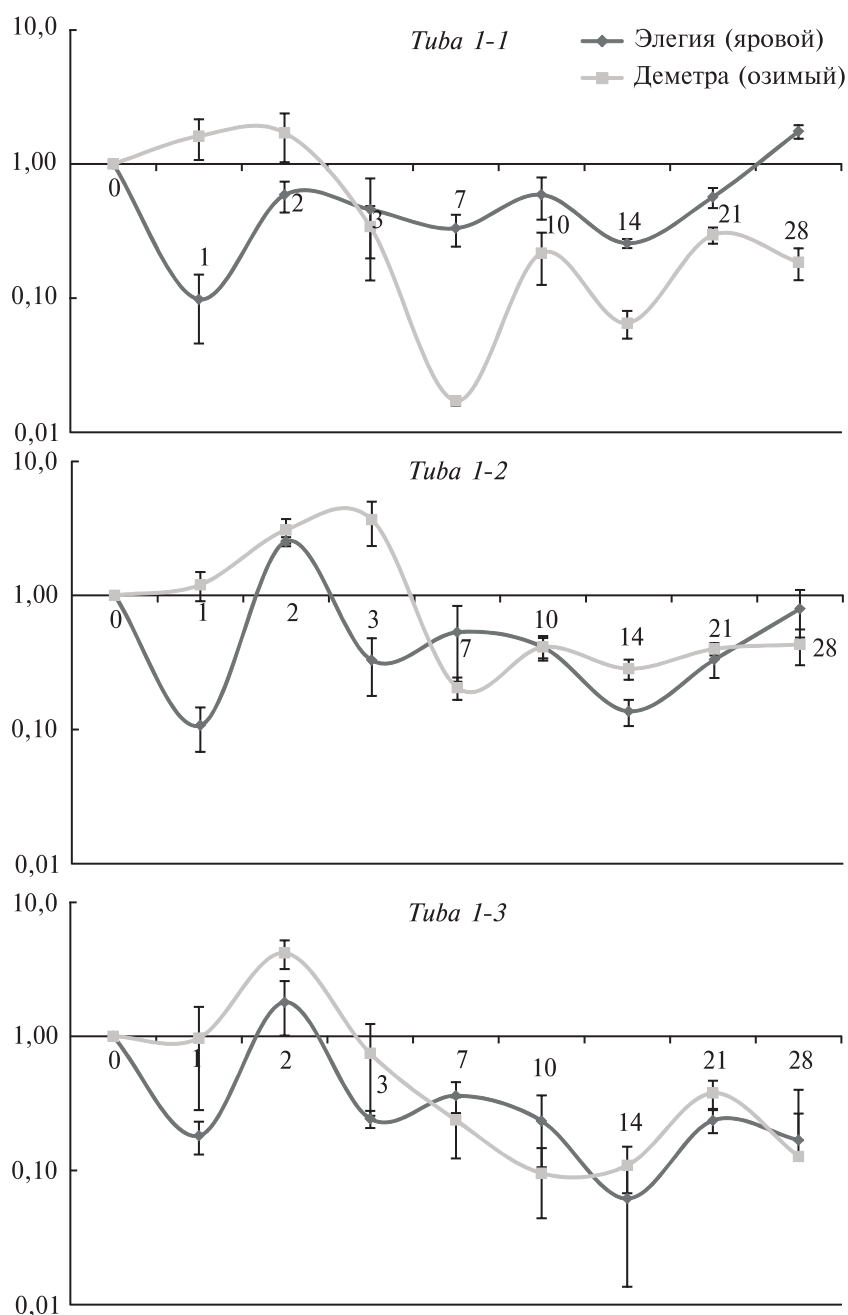


**Рис. 1.** Кладограмма, демонстрирующая степень родства между генами  $\alpha$ -тубулина мягкой пшеницы (кДНК). Цифры на кладограмме указывают на уровень бутстреп поддержки. Индексы в именах генов соответствуют таковым в базе данных GenBank



**Рис. 2.** Распределение изоформ  $\alpha$ -тубулина по хромосомам у мягкой пшеницы *Triticum aestivum*

экспрессии исследуемых генов  $\alpha$ -тубулина у озимого сорта возрастает в первые дни до 2–5 у.е. После третьего дня холодовой акклиматации у обоих сортов наблюдаются сниженные уровни экспрессии генов  $\alpha$ -тубулина (0,1–0,8 у.е.). После 14-го дня для генов *Tuba-1-1* и *Tuba-1-2* отмечается постепенное повышение уровней экспрессии у обоих сортов, которое в случае ярового сорта Элегия достигает контрольных и даже повышенных значений (1,7 у.е. для гена *Tuba-1-1*). Наибольшие различия между озимым и яровым сортом зафиксированы в профилях экспрессии гена *Tuba-1-1*. У озимого

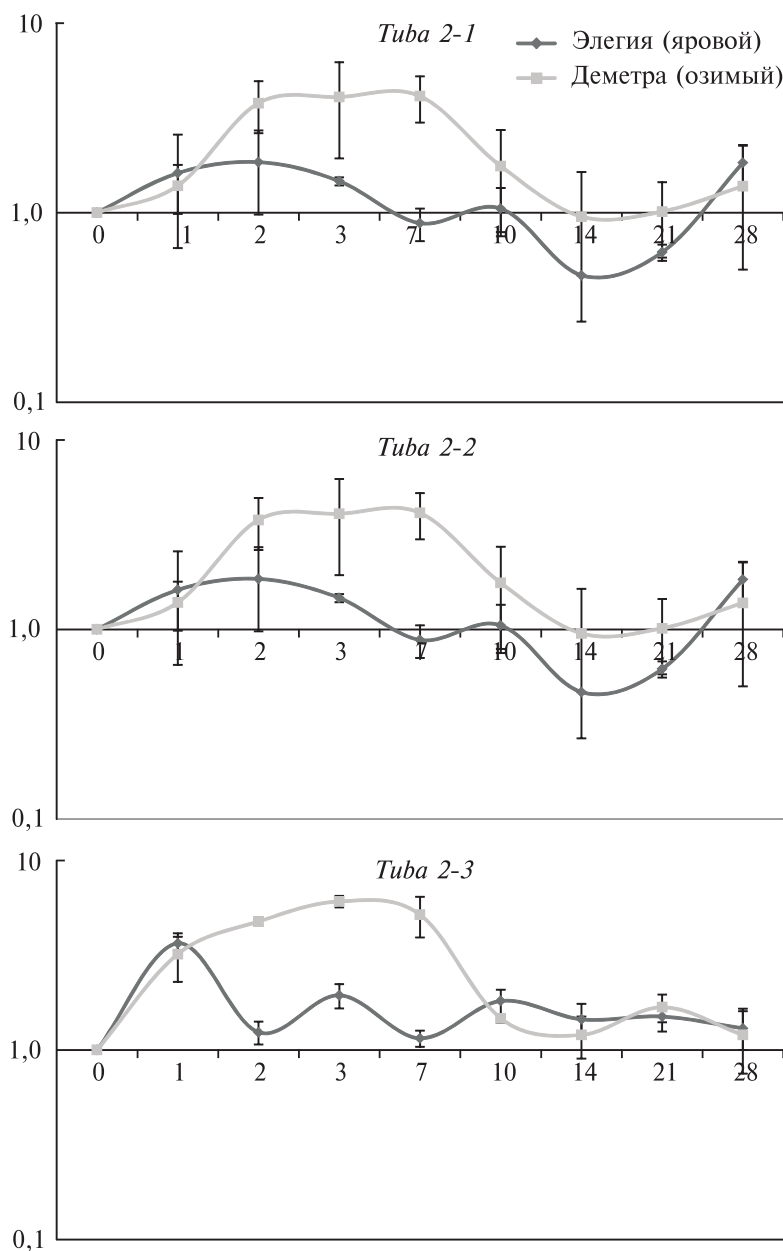


**Рис. 3.** Уровни относительной экспрессии первого подсемейства генов  $\alpha$ -тубулина мягкой пшеницы *Triticum aestivum*; по вертикали – относительная экспрессия, у.е.; по горизонтали – длительность акклимации, дни

сорта наблюдается довольно значительное снижение уровня экспрессии на 7-й день холодовой акклимации (0,05 у.е.).

**Второе подсемейство генов  $\alpha$ -тубулина.** Зарегистрированные уровни экспрессии генов  $\alpha$ -тубулина второго подсемейства колеблются

в условиях эксперимента в пределах от 0,5 до 8 у.е. Характерной особенностью генов  $\alpha$ -тубулина, принадлежащих к этому подсемейству, является начальное повышение уровней экспрессии (особенно резкое в случае гена *Tuba-2-3*) с последующим снижением этого показателя



**Рис. 4.** Уровни относительной экспрессии генов  $\alpha$ -тубулина второго подсемейства мягкой пшеницы *Triticum aestivum*; по вертикали — относительная экспрессия, у.е.; по горизонтали — длительность акклимации, дни

до уровня контроля. Профили экспрессии генов  $\alpha$ -тубулина, представляющих второе подсемейство, у исследуемых озимого и ярового сортов пшеницы сравнимы между собой на начальных и поздних этапах холодовой акклимации. В то же время есть значимые различия их экспрессии в период со 2-го по 7-й день акклимации: уровни экспрессии всех трех генов  $\alpha$ -тубулина

(а в особенности гена 2–3) у озимого сорта оказались выше (рис. 4).

**Третье подсемейство генов  $\alpha$ -тубулина.** В целом, уровни экспрессии генов  $\alpha$ -тубулина из третьего подсемейства колеблются от 0,05 до 6 у.е. на протяжении 28 дней акклимации пшеницы (рис. 5). Характерной особенностью регуляции генов  $\alpha$ -тубулина, принадлежащих к

Сравнительный анализ уровней экспрессии генов  $\alpha$ -тубулина

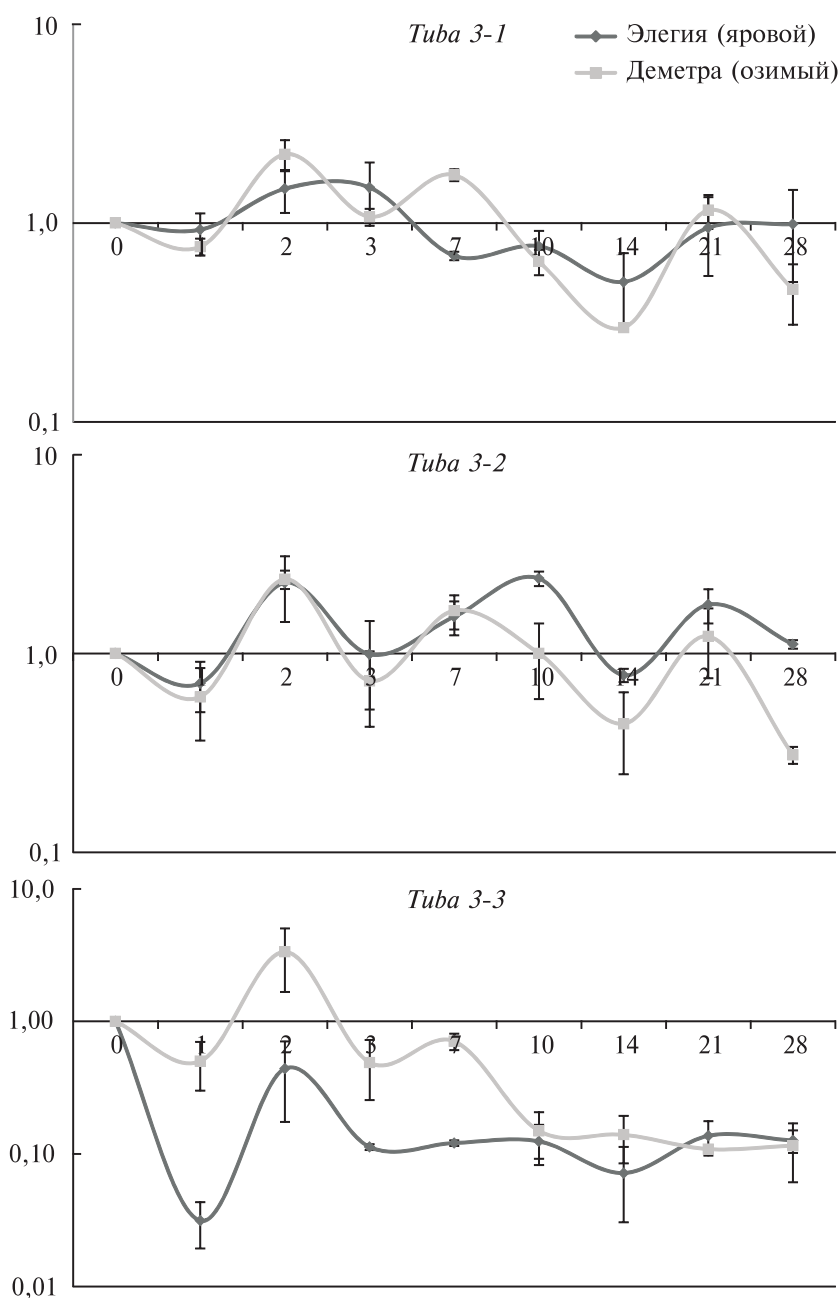
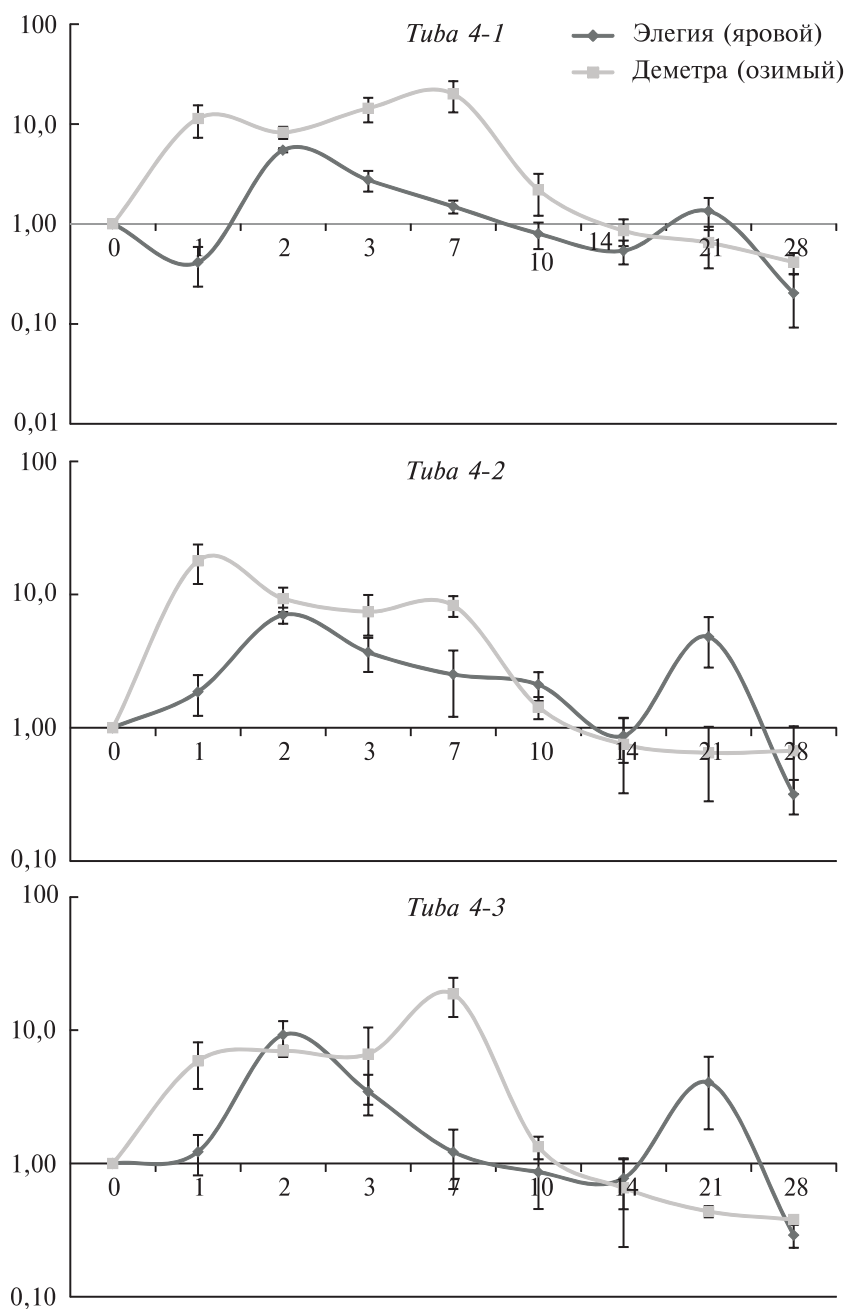


Рис. 5. Уровни относительной экспрессии третьего подсемейства генов  $\alpha$ -тубулина мягкой пшеницы *Triticum aestivum*; по вертикали – относительная экспрессия, у.е.; по горизонтали – длительность акклимации, дни

этому семейству, является наличие колебаний уровней их экспрессии с довольно высокой амплитудой. Профили экспрессии  $\alpha$ -тубулина, представляющих это подсемейство, подобны у озимого и ярового сортов пшеницы. Наибольшие различия зафиксированы для экспрессии гена *Tuba-3-3*, где направленность изменений

этого показателя у изучаемых сортов одинакова, но наблюдаются большие различия в амплитуде самих изменений. Также для гена *Tuba-3-3* характерны «затухающие» в ходе акклимации колебания уровней экспрессии, которые, в отличие от уровней экспрессии генов *Tuba-3-1* и *Tuba-3-2*, сглаживались, достигая низких зна-



**Рис. 6.** Уровни относительной экспрессии четвертого подсемейства генов  $\alpha$ -тубулина мягкой пшеницы *Triticum aestivum*; по вертикали – относительная экспрессия, у.е.; по горизонтали – длительность акклимации, дни

чений экспрессии (0,1 у.е.). Закономерности экспрессии этого гена изучались отдельно нами ранее [27] в течение более короткого периода акклимации пшеницы (10 дней), что уже на этом этапе также позволило выявить схожие межсортовые различия.

*Четвертое подсемейство генов  $\alpha$ -тубулина.* Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что уровни экспрессии генов  $\alpha$ -тубулина четвертого подсемейства колеблются в пределах от 0,2 до 20 у.е. в течение 28 дней акклимации (рис. 6). Профили экспрес-



Сравнительный анализ уровней экспрессии генов  $\alpha$ -тубулина

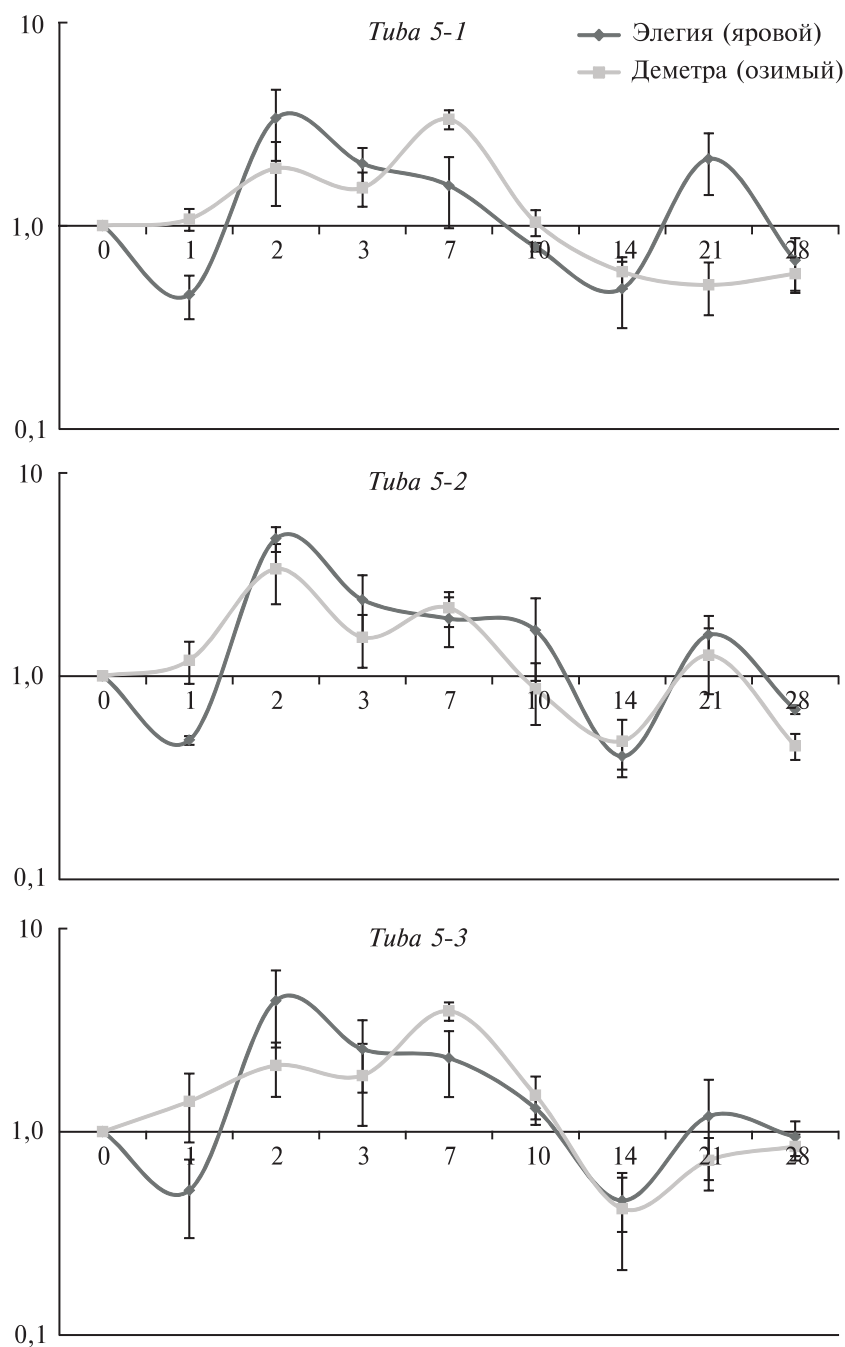


Рис. 7. Уровни относительной экспрессии пятого подсемейства генов  $\alpha$ -тубулина мягкой пшеницы *Triticum aestivum*; по вертикали — относительная экспрессия, у.е.; по горизонтали — длительность акклимации, дни

сии разных представителей генов  $\alpha$ -тубулина этого подсемейства подобны между собой, но сильно отличаются между изучаемыми сортами. Характерной закономерностью для генов  $\alpha$ -тубулина из этого подсемейства является

начальное увеличение уровней их экспрессии с дальнейшим снижением до контрольных и даже отрицательных значений. Основными различиями между сортами является наличие различных пиков экспрессии генов  $\alpha$ -тубулина.

Для озимого сорта Деметра выявлено появление пиков уровней экспрессии генов  $\alpha$ -тубулина на 1-й и 7-й дни, а у ярового сорта Элегия — на 2-й и 21-й дни.

*Пятое подсемейство генов  $\alpha$ -тубулина.* Установлено, что уровни экспрессии генов  $\alpha$ -тубулина, принадлежащих к пятому подсемейству, колеблются от 0,4 до 5 у.е. (рис. 7). Профили экспрессии всех трех тестируемых генов подсемейства подобны между собой, в то же время выявлены некоторые различия уровней экспрессии между сортами. Для ярового сорта Элегия характерны отрицательные пики уровней экспрессии генов  $\alpha$ -тубулина на 1-й и 14-й дни и положительные — на 2-й и 21-й дни. Для озимого сорта Деметра выявлен выраженный положительный пик уровней экспрессии этих же генов на 7-й день холодовой акклимации.

Учитывая потенциальную роль тубулина в формировании более стабильных микротрубочек при низких температурах, особое внимание было уделено тем генам  $\alpha$ -тубулина, уровни экспрессии которых были более высокими на начальных этапах холодовой акклимации. Среди исследуемых генов можно выделить представителей 2-го и 4-го подсемейств (рис. 3 и рис. 5). Среди представителей  $\alpha$ -тубулина второго подсемейства следует особо отметить ген *Tuba-2-3*, который в рамках подсемейства характеризуется наиболее резким и наибольшим по амплитуде начальным увеличением уровня экспрессии (до 6 у.е.). Также для этого гена  $\alpha$ -тубулина выявлены наибольшие различия экспрессии между сортами в рамках данного подсемейства: в случае озимого сорта Деметра (с более высоким уровнем холодоустойчивости) характерны высокие значения уровней экспрессии *Tuba-2-3*, сохраняющиеся в течение продолжительного срока (до 7-го дня). Закономерности экспрессии этого гена уже изучались ранее в нескольких исследованиях [25], где было показано увеличение уровня его экспрессии до 12-кратных величин в сравнении с контролем.

Также необходимо отдельно обратить внимание на особенности экспрессии генов всех представителей  $\alpha$ -тубулина из 4-го подсемейства. Для генов *Tuba-4-1*, *Tuba-4-2*, *Tuba-4-3* характерным является начальное увеличение уровней экспрессии (более резкое у озимого

сорта Деметра), которое достигает пиковых значений в 18 у.е. в случае озимого сорта Деметра и 10 у.е. у ярового сорта Элегия. Высокие начальные значения уровней экспрессии этих генов могут свидетельствовать об их важной роли в обеспечении клеточно-биологических механизмов жизнедеятельности растения на первых этапах холодовой акклимации. Вероятно, на этих этапах акклимации микротрубочки растений могут содержать повышенную долю продуктов этих генов  $\alpha$ -тубулина за счет снижения доли прочих изотипов. Ранее было показано, что через 24 ч после начала холодовой акклимации в различных органах чайного дерева начинается повышение экспрессии одного из генов  $\alpha$ -тубулина, проявляющего гомологию с генами AtTUA3 и AtTUA5 арабидопсиса [29]. По классификации, представленной в работе [30], этот ген относится ко второму классу генов тубулина.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать заключение, что среди 15 исследованных генов  $\alpha$ -тубулина наиболее вероятными кандидатами, обеспечивающими формирование холодоустойчивых микротрубочек, являются гены *Tuba-2-3*, *Tuba-4-1*, *Tuba-4-2*, *Tuba-4-3*. Очевидно, что дальнейшее изучение особенностей первичной структуры изотипов  $\alpha$ -тубулина, кодируемых этими генами, позволит выяснить, какие из них могут обладать структурными особенностями, позволяющими повысить устойчивость микротрубочек к холоду. Ранее нами было продемонстрировано, что наличие в последовательности  $\alpha$ -тубулина растений лишь одной аминокислотной замены, характерной для этого белка у психрофильных водорослей, может привести к существенным изменениям структурных характеристик этого белка [31].

#### EXPRESSION ANALYSIS OF $\alpha$ -TUBULIN GENES DURING COLD ACCLIMATION IN WINTER AND SPRING SOFT WHEAT

D.D. Buy, A.E. Demkovich, Ya.V. Pirko, Ya.B. Blume

Institute of Food Biotechnology and Genomics,  
Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskiy str., 2A  
E-mail: denisbuy90@gmail.com; blume.yaroslav@nas.gov.ua;  
demand.dn@gmail.com, yarvp1@gmail.com

The expression profiles of 15  $\alpha$ -tubulin genes in spring and winter varieties of common wheat during cold ac-

climation were studied. Among the studied genes, two subfamilies were identified (3 genes in each) with elevated expression levels detected at the initial stages of cold acclimation. In particular, the *Tuba-2-3* gene, which, within its subfamily, is characterized by the most pronounced amplitude of the initial expression level increase. Also the greatest differences in expression levels between varieties were found for this gene within its subfamily. In the case of winter varieties, higher values of expression levels for this tubulin gene were detected, that persist for a long time (up to the 7th day of acclimation). A significant initial increase in expression levels for all  $\alpha$ -tubulin genes of the 4th subfamily was registered, reaching maximum values during further acclimation. The high initial values of the expression levels of this subfamily genes may also indicate their important role in resistance ensuring of wheat microtubules to low temperatures in the early stages of cold acclimation.

#### ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ РІВНІВ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ $\alpha$ -ТУБУЛІНУ У ОЗИМИХ ТА ЯРИХ СОРТІВ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ПІД ДІЄЮ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР

Буй Д.Д., Демкович А.Є., Пірко Я.В., Блюм Я.Б.

Вивчено профілі експресії 15 генів  $\alpha$ -тубуліну у ярого та озимого сортів м'якої пшениці під дією низьких температур. Серед досліджуваних генів виділено дві підродини (по 3 гена в кожній), для яких характерними є підвищені рівні експресії на початкових етапах холодової аклімації. На особливу увагу заслуговує ген *Tuba-2-3*, який в рамках своєї підродини характеризується найбільш вираженим по амплітуді початковим збільшенням рівня експресії. Також для цього гена виявлено найбільші відмінності рівнів експресії між сортами в рамках підродини генів тубуліну, до якого належить цей ген. У випадку озимого сорту характерні більш високі значення рівнів експресії цього гена тубуліну, що зберігаються протягом тривалого періоду (до 7-го дня аклімації). Також встановлено, що для всіх генів  $\alpha$ -тубуліну, що належать до 4-ї підродини, є характерним значне початкове збільшення рівнів експресії, яке досягає максимальних значень в ході подальшої аклімації. Високі початкові значення рівнів експресії генів цієї підродини також можуть свідчити про їх важливу роль в забезпеченні стійкості мікротрубочок пшениці до низьких температур на перших етапах холодової аклімації.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Guo, X., Liu, D., and Chong K., Cold signaling in plants: Insights into mechanisms and regulation, *J. Integr. Plant Biol.*, 2018, vol. 60, no. 9, pp. 745–56. doi: 10.1111/jipb.12706.

- Miura, K., Furumoto, T., Cold signaling and cold response in plants, *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, vol. 14, no. 3, pp. 5312–37. doi: 10.3390/ijms14035312.
- Tardif, G., Kane, N.A., Adam, H., Labrie, L., Major, G., Gulick, P., Sarhan, F., and Lalibert, J.F., Interaction network of proteins associated with abiotic stress response and development in wheat, *Plant Mol. Biol.*, 2007, vol. 63, no. 5, pp. 703–18. doi: 10.1007/s11103-006-9119-6.
- Xiong, L., Schumaker, K.S., and Zhu, J.K., Cell signaling during cold, drought, and salt stress, *Plant Cell*, 2002, vol. 14, pp. 165–83. doi: 10.1105/tpc.000596.
- Yadav, S.K., Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review, *Agron. Sustain. Dev.*, 2010, vol. 30, no. 3, pp. 515–27. doi.org/10.1051/agro/2009050.
- Örvar, B.L., Sangwan, V., Omann, F., and Dhindsa, R.S., Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity, *Plant J.*, 2000, vol. 23, no. 6, pp. 785–94.
- Plohovska, S.H., Kraslyenko, Y.A., and Yemets, A.I., Nitric oxide modulates actin filament organization in *Arabidopsis thaliana* primary root cells at low temperatures, *Cell Biol. Int.*, 2018, doi: 10.1002/cbin.10931.
- Plohovska, S.G., Yemets, A.I., and Blume, Ya.B., Influence of cold on organization of actin filaments of different types of root cells in *Arabidopsis thaliana*, *Cytol. Genet.*, 2016, vol. 50, no. 5, pp. 318–23. doi: 10.3103/s0095452716050108.
- Pokorna, J., Sites of actin filament initiation and reorganization in cold treated tobacco cells, *J. Plant Cell Environm.*, 2004, vol. 27, no. 5, pp. 641–53. doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01186.x.
- Abdrakhamanova, A., Wang, Q.Y., Khokhlova, L., and Nick, P., Is microtubule disassembly a trigger for cold acclimation? *Plant Cell Physiol.*, 2003, vol. 44, no. 7, pp. 676–86.
- Kerr, G.P., Carter, J.V., Relationship between freezing tolerance of root-tip cells and cold stability of microtubules in rye (*Secale cereale* L. Cv. Puma), *Plant Physiol.*, 1990, vol. 93, no. 1, pp. 77–82.
- Sheremet, Y.A., Yemets, A.I., and Blume, Y.B., Inhibitors of tyrosine kinases and phosphatases as a tool for the investigation of microtubule role in plant cold response, *Cytol. Genet.*, 2012, vol. 46, no. 1, pp. 1–8. doi: 10.3103/S0095452712010112.
- Sproule, K., Microtubule involvement in the plant low temperature response. University of Saskatchewan, Saskatoon PhD thesis, 2008, 106 p.
- Jian, L.C., Sun, L.H., and Liu, Z.P., Studies on microtubule cold stability in relation to plant cold hardiness, *Acta Bot. Sinica*, 1989, vol. 31, pp. 737–41.
- Bartolo, M.E., Carter, J.V., Microtubules in the me-

- sophyll cells of nonacclimated and coldacclimated spinach, *Plant Physiol.*, 1991, vol. 97, no. 1, pp. 175–81.
16. Pihakaski-Maunsbach, K., Puhakainen, T., Effect of cold exposure on cortical microtubules of rye (*Secale cereale*) as observed by immunocytochemistry, *Physiol. Plant.*, 1995, vol. 93, no. 3, pp. 563–71. doi.org/10.1111/j.1399-3054.1995.tb06859.x.
  17. Wang, Q.Y., Nick, P., Cold acclimation can induce microtubular cold stability in a manner distinct from abscisic acid, *Plant Cell Physiol.*, 2001, vol. 42, no. 9, pp. 999–1005.
  18. Bartolo, M.E., Carter, J.V., Effect of microtubule stabilization on the freezing tolerance of mesophyll cells of spinach, *Plant Physiol.*, 1991, vol. 97, pp. 182–7.
  19. Sakiyama, M., Shibaoka, H., Effects of abscisic acid on the orientation and cold stability of cortical microtubules in epicotyl cells of the dwarf pea, *Protoplasma*, 1990, vol. 157, no. 1–3, pp. 165–71.
  20. Kerr, G.P., Carter, J.V., Tubulin isotypes in rye roots are altered during cold acclimation, *Plant Physiol.*, 1990, vol. 93, pp. 83–8.
  21. Degand, H., Faber, A.M., Dauchot, N., Mingeot, D., Watillon, B., Van Cutsem, P., Morsomme P., and Boutry, M., Proteomic analysis of chicory root identifies proteins typically involved in cold acclimation. *Proteomics*, 2009, vol. 9, no.10, pp. 2903–7. doi.org/10.1002/pmic.200800744
  22. Huang, Y., Jin, D., Lu, C., Lan, X., Qiao, P., Li, H., and Chen, Y., Proteomic responses associated with freezing tolerance in the callus of the Tibetan alpine plant *Saussurea laniceps* during cold acclimation. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2016, vol. 124, pp. 81–95.
  23. Ahad, A., Wolf, J., and Nick P., Activation-tagged tobacco mutants that are tolerant to antimicrotubular herbicides are cross-resistant to chilling stress, *Transgenic Res*, 2003, vol. 12, pp. 615–29. doi: 10.1023/A:1025814814823
  24. Christov, N.K., Imai, R., and Blume, Y.B., Differential expression of two winter wheat alpha-tubulin genes during cold acclimation, *Cell Biol. Int.*, 2008, vol. 32, no. 5, pp. 574–8.
  25. 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, vol. 50, pp. 502–19.
  26. Buy D. D., Demkovich A. E., Pirko Ya. V., Korkhovoy V.I., and Blume Ya.B., Analysis of gene expression of TUBA-2-3 during cold acclimation in varieties of soft wheat Demetra and Elegiya, *Naukovi Dopovidi NUBiP*, 2015, vol. 8, no. 57. (in Ukrainian).
  27. Buy, D.D., Pirko, Ya.V., and Blume, Ya.B., Expression of winter and spring wheat alpha-tubulin gene S during cold acclimation, *Faktori eksperimentalnoyi evolyutsiyi organizmiv*, 2015, vol. 17, pp. 27–30. (in Ukrainian).
  28. Buy, D.D., Demkovich, A.E., Pirko, Ya.V., and Blume, Ya.B., Expression analysis of alpha-tubulin genes during cold acclimation in winter wheat Demetra, *Faktori eksperimentalnoyi evolyutsiyi organizmiv*, 2017, vol. 21, pp. 107–11. (in Ukrainian).
  29. Paul, A., Lal, L., Ahuja, P.S., and Kumar, S., Alpha-tubulin (CsTUA) up-regulated during winter dormancy is a low temperature inducible gene in tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *Mol. Biol. Rep.*, 2012, vol. 39, pp. 3485–90. doi: 10.1007/s11033-011-1121-7.
  30. Oakley, R, Wang, Y, Ramakrishna, W, Harding, S, and Tsai, C., Differential expansion and expression of alpha- and beta-tubulin gene families in *Populus*, *Plant Physiol.*, 2007, vol. 145, no. 3, pp. 961–73. doi: 10.1104/pp.107.107086.
  31. Nyporko, A.Y., Demchuk, O.N., and Blume, Y.B., Cold adaptation of plant microtubules: structural interpretation of primary sequence changes in a highly conserved region of alpha-tubulin, *Cell Biol. Int.*, 2003, vol. 27, no. 3, pp. 241–3. doi.org/10.1016/S1065-6995(02)00342-6.

Поступила 08.10.18