

УДК 577.218+630\*165.3

DOI: 10.36305/0513-1634-2022-144-88-94

## ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ *DREB* КЛОНОВ ТОПОЛЯ И БЕРЕЗЫ *IN VITRO*

Анна Михайловна Кондратьева, Елена Юрьевна Аминева,  
Татьяна Михайловна Табацкая, Ольга Сергеевна Машкина,  
Татьяна Петровна Федулова

ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции  
и биотехнологии»

394087, Россия, Воронежская обл., ул. Ломоносова, 105

E-mail: kondratyeva\_anya@mail.ru

Проведено изучение экспрессии генов факторов транскрипции *DREB1* и *DREB2* с использованием листьев верхнего яруса растений *in vitro* тополя белого *Populus alba* L., тополя сереющего *Populus × canescens* (Aiton) Sm., гибрида тополя белого и осины *Populus alba* L. × *Populus tremula* L., березы далекарлийской *Betula pendula* f. “dalecarlica” (L. f.) Schneid. и пушистой *Betula pubescens* Ehrh., подвергнутых воздействию солевого стресса, и контрольных образцов. Микрорастения четырехкратно подвергались воздействию солевого стресса в культуре *in vitro* (½ WPM + 1% NaCl) в течение 3 недель, с чередованием их пребывания на неселективной питательной среде (½ WPM) в течение 3-4 недель. Контрольные образцы находились на среде ½ WPM без добавления соли. Исследованные гены факторов транскрипции показали дифференциальные изменения уровня экспрессии у клонов тополя и березы. Уровень экспрессии гена после воздействия солевого стресса на контрольные образцы повышается у клонов березы повислой; у клона березы далекарлийской отмечено незначительное изменение уровня экспрессии. Для всех образцов, ранее перенесших воздействие солевого стресса, характерно понижение уровня экспрессии при очередном воздействии фактора. Оценка экспрессии проанализированных факторов транскрипции выявила наличие выраженного стрессового ответа (снижение или повышение уровня экспрессии генов) у клонов березы и некоторых клонов тополя после воздействия 1% NaCl в составе питательной среды ½ WPM. Существенное понижение уровня экспрессии при повторных воздействиях солевого стресса свидетельствует о чувствительности клонов к стрессовому фактору.

**Ключевые слова:** *Populus*; *Betula*; тополь; береза; *DREB1*; *DREB2*; засоление; засуха; солевой стресс; экспрессия генов

### Введение

На сегодня аридизация климата считается одной из главных проблем, над решением которой трудится научное сообщество, и является причиной засух, засоления почв и, как следствие, снижения их биологической продуктивности и плодородия. На территории России засоленные почвы занимают более 3% от всей площади [3] и от 20 до 50% сельскохозяйственных земель отдельных регионов [6]. Засоленность почв – это показатель ее неблагополучного состояния: снижение плодородия почв негативно влияет на онтогенез растений, в том числе культурных, за счет внутриклеточных изменений [5].

Степень воздействия абиотических и биотических факторов среды на растительный организм зависит от особенностей самого организма. Изменения факторов среды в пределах ареала произрастания носят сезонный характер и, по большей части, постоянны год от года. Значительные колебания абиотических факторов в некоторые годы приводят к повышению адаптационных способностей растительных организмов, вследствие чего происходит повышение их устойчивости [10]. Действие стрессовых факторов, таких как высокая или низкая температура, недостаток влаги, засоление, инфекции различной этимологии, может быть

длительным или кратким по времени, но сильным. Устойчивость организма к действию какого-либо фактора не означает невосприимчивость к другому стрессору. При этом некоторые растительные организмы демонстрируют сопряженную устойчивость одновременно к ряду неблагоприятных факторов. К неспецифической реакции на неблагоприятные факторы относится активация и синтез стрессовых белков, а также снижение синтеза белков, образующихся в нормальных условиях [10]. Молекулярные механизмы устойчивости к абиотическому стрессу включают восприятие стресса, передачу сигнала клеточным компонентам, экспрессию генов и метаболические изменения, придающие стрессоустойчивость [14]. Устойчивость к стрессу контролируется на уровне транскрипции сложной регуляторной сетью генов [12]. Факторы транскрипции *DREB* (dehydration-responsive element binding) из семейства AP2/ERF белков регулируют экспрессию многих генов, индуцируемых стрессом, а также и играют значительную роль в повышении устойчивости растений к абиотическому стрессу вследствие взаимодействия с DRE/CRT регуляторным цис-элементом в промоторной области различных генов, чувствительных к абиотическому стрессу [11, 13].

Гены *DREB*, кодирующие *DREB* белки, относятся к семейству транскрипционных факторов и регулируют экспрессию различных генов при воздействии стресса, а также отвечают за развитие устойчивости к воздействию различных абиотических факторов [13]. Исследования нескольких видов тополя и березы показали наличие дифференциальной экспрессии генов *DREB1* и *DREB2*, что может свидетельствовать о перекрестном взаимодействии путей синтеза данных факторов транскрипции при воздействии солевого стресса в условиях культивирования *in vitro* [1, 7, 8]. Установлено, что уровень транскрипции *DREB2* увеличивался после воздействия засухи у тополя и березы [1, 13], в связи с чем факторы транскрипции *DREB* можно использовать в качестве молекулярного маркера при отборе засухоустойчивых растений благодаря их активности в качестве основного регулятора экспрессии генов, реагирующих на засуху.

#### Объекты и методы исследования

Изучение экспрессии генов факторов транскрипции *DREB1* и *DREB2* проводили с использованием листьев верхнего яруса растений *in vitro* (рис. 1) тополя белого *Populus alba* L. (клоны Е, Тг), тополя сереющего *P. × canescens* (Aiton) Sm. (клон Тпр), гибрида тополя белого и осины *P. alba* L. × *P. tremula* L. (клон 1/03), березы далекарлийской *Betula pendula* f. “*dalecarlica*” (L. f.) Schneid. (клон R2) и пушистой *B. pubescens* Ehrh. (клоны 6 пш, 3 пш), подвергнутых воздействию солевого стресса, и контрольных образцов (рис. 1).

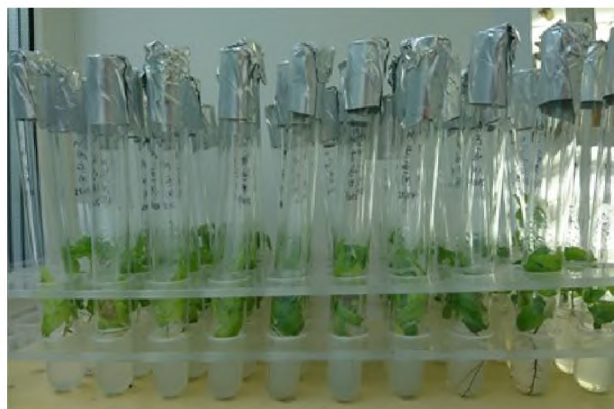


Рис. 1 Общий вид микрорастений тополя *in vitro*, задействованных в эксперименте по засолению

Микрочеренки исследуемых клонов четырехкратно подвергались воздействию солевого стресса в культуре *in vitro* ( $\frac{1}{2}$  WPM + 1% NaCl) в течение 3 недель (опытные образцы), с чередованием их пребывания на неселективной питательной среде ( $\frac{1}{2}$  WPM) в течение 3-4 недель. Контрольные образцы находились на среде  $\frac{1}{2}$  WPM без добавления соли. Исследуемые опытные микрорастения, предварительно четырехкратно подвергнутые солевому стрессу, и контрольные образцы переносились на селективную питательную среду  $\frac{1}{2}$  WPM с 1% NaCl, через неделю их отбирали для исследования [9].

Выделение РНК проводили по модифицированной методике [2, 4]. В анализе использовались последовательности нуклеотидов, подобранные к видам *P. trichocarpa* (*PtDREB1*: прямой праймер – 5'-TTGAGGGGTAGGTCTGCTTG-3', обратный – 5'-CCTCATCTCCCGTCCTCATC-3'; *PtDREB2*: прямой – 5'-TGTATGCTCGTATGCTCGT-3', обратный – 5'-TCCTCATACACGCAGACCTC-3') и *B. pendula* (*BpDREB2*: прямой праймер – 5'-AGGCAGAGAACATGGGGAAA-3', обратный – 5'-GAAAGTTGAGGCGAGCGTAA-3'), в качестве референсного гена был выбран 18S тополя (последовательность прямого праймера – 5'-GGCTCTGCCCGTTGCTCT-3', обратного – 5'-CGTCACCCGTCACCACCA-3') [1, 7, 8]. Обратную транскрипцию осуществляли с помощью набора с MMLV-RH (Диаэм), амплификацию проводили, используя qPCRmix-HS SYBR (Евроген) [8]. Параметры амплификации были следующими: 95 °C – 3 мин, затем 35 циклов из стадий 95 °C – 30 сек, 60 °C – 30 сек, 72 °C – 30 сек, завершающихся стадией 72 °C – 2 мин. На основе программы CFX Manager (Bio-Rad) произведен расчет относительного уровня транскриптов исследуемых генов, эффективности амплификации (E) и средних значений пороговых циклов ( $C_{q\text{сред}}$ ) (табл. 1). Все этапы исследования были повторены четырехкратно (табл. 1).

Таблица 1

Результат расчета эффективности амплификации ПЦР-РВ и средние значения пороговых циклов для исследуемых генов

| Ген            | Эффективность ПЦР-РВ по экспоненциальному участку (E), % | Средние значения пороговых циклов ( $C_{q\text{сред}}$ ) |
|----------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| <i>PtDREB1</i> | 96-99                                                    | 28,33                                                    |
| <i>PtDREB2</i> | 91-94                                                    | 32,63                                                    |
| <i>BpDREB2</i> | 80-82                                                    | 31,76                                                    |
| <i>18S</i>     | 98-99                                                    | 21,42                                                    |

### Результаты и обсуждение

Экспрессия выбранных для изучения факторов транскрипции *DREB* была исследована ранее у образцов тополя в ответ на моделируемый холодостресс [7, 8], а у березы – в ответ на засуху [1]. Для анализируемых в данной работе клонов тополя и березы ранее было отмечено варьирование сохранности в условиях моделируемого солевого стресса в культуре *in vitro* [9].

На основании полученных данных построены гистограммы, показывающие экспрессию генов факторов транскрипции *DREB* у исследованных образцов тополя и березы. Экспрессия гена *DREB1* после воздействия солевого стресса на контрольные образцы тополя, культивируемые на среде без стрессора, снижается, причем у клона Е отмечено значительное снижение в 3,6 раза (табл. 2, рис. 2а). У опытных образцов при пересадке на селективную среду наблюдается дифференциальная экспрессия: значительное снижение у клона Е (в 2,9 раза) и увеличение уровня экспрессии у остальных клонов (Тг – в 11,5 раза). Образец 1/03 показал незначительные колебания уровня экспрессии при пересадке на среду  $\frac{1}{2}$  WPM + 1% NaCl, как для контрольных.

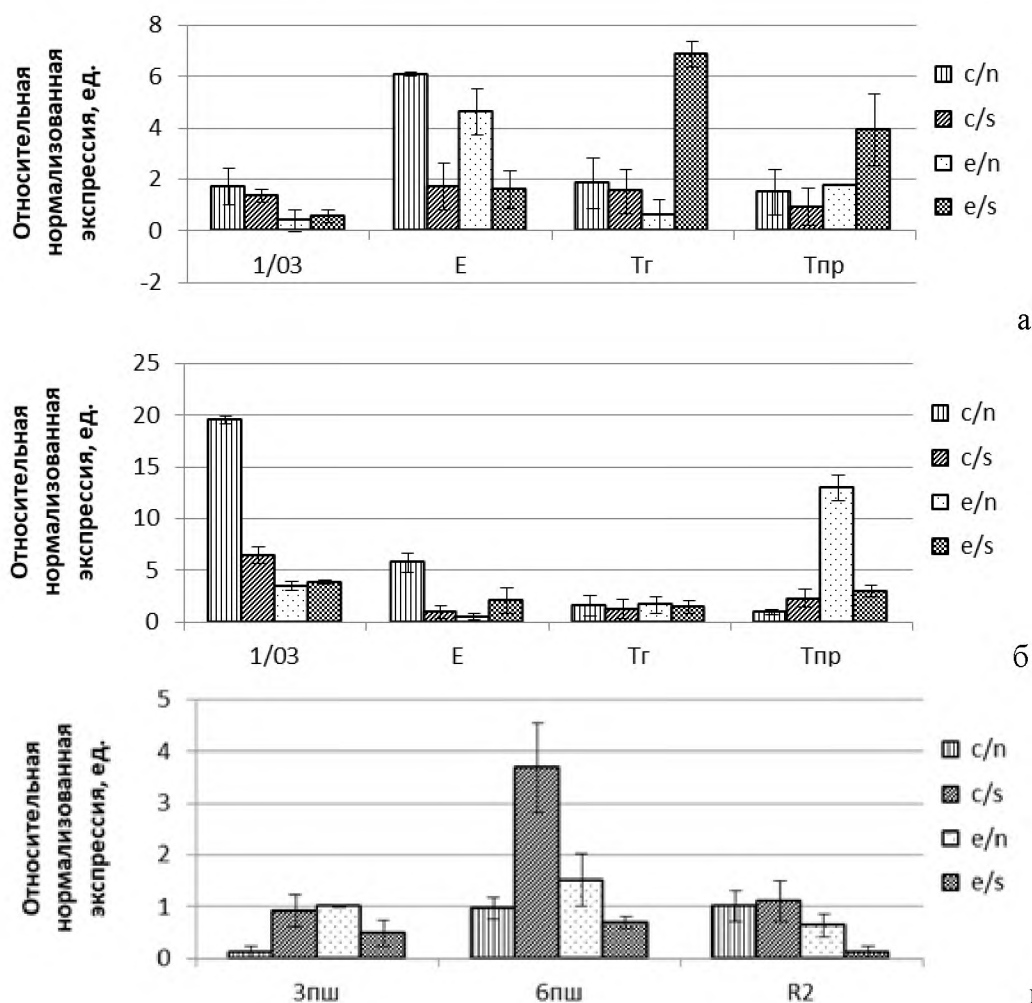


Рис. 2 Изменение экспрессии генов факторов транскрипции *PtDREB1* (а), *PtDREB2* (б), *BpDREB2* (в) после воздействия солевого стресса на клоны тополя и березы в культуре *in vitro*.

c/n – контрольное растение на  $\frac{1}{2}$  WPM; c/s – контрольное растение на  $\frac{1}{2}$  WPM + 1% NaCl; e/n – опытное растение на  $\frac{1}{2}$  WPM; e/s – опытное растение на  $\frac{1}{2}$  WPM + 1% NaCl

Для *PtDREB2* (рис. 2б) характерна дифференциальная экспрессия. Наблюдается снижение уровня экспрессии, в том числе значительное, для ряда контрольных образцов, пересаженных на селективную среду (клоны 1/03, E) и его подъем для контрольного образца клона Тпр (табл. 2). Опытные и контрольные образцы клона Тг на среде  $\frac{1}{2}$  WPM без добавления 1% NaCl и  $\frac{1}{2}$  WPM с 1% NaCl характеризуются незначительными колебаниями уровня экспрессии. У опытного образца Тпр на неселективной среде уровень экспрессии в 14,3 раза выше, чем у контрольного образца, а при пересадке на селективную среду снизился в 4,1 раза, почти сравнявшись со значениями контрольного образца, пересаженного на  $\frac{1}{2}$  WPM с 1% NaCl.

Исследование экспрессии *BpDREB2* у образцов березы представлены на рисунке 2в. Уровень экспрессия гена после воздействия солевого стресса на контрольные образцы повышается у клонов березы повислой (3пш, 6пш), относительная устойчивость к солевому стрессу на этом этапе подтверждается биотехнологическими показателями [9]; у клона березы далекарлийской (R2) отмечено незначительное изменение уровня экспрессии (табл. 2). Для всех образцов, ранее перенесших воздействие солевого стресса, характерно понижение уровня экспрессии при очередном воздействии фактора, при этом отмечено незначительное замедление темпов

роста по сравнению с контролем, что объясняется угнетением биологических процессов клетки (табл. 2).

Таблица 2

Значения разницы экспрессии *DREB* при пересадке опытных и контрольных образцов тополя и березы на селективную среду (стрелками обозначено увеличение или снижение экспрессии генов у исследованных образцов, *к* – контрольные образцы, *о* – опытные образцы)

| Образец<br>Ген | Тополь |      |      |      |      |       |      |      |
|----------------|--------|------|------|------|------|-------|------|------|
|                | 1/03   |      | Е    |      | Тг   |       | Тг   |      |
|                | к      | о    | к    | о    | к    | о     | к    | о    |
| <i>PtDREB1</i> | 1,2↓   | 1,5↑ | 3,6↓ | 2,9↓ | 1,3↓ | 11,5↑ | 1,7↓ | 2,5↑ |
| <i>PtDREB2</i> | 3,1↓   | 1,1↑ | 6,3↓ | 4,4↑ | 1,2↓ | 1,2↓  | 2,3↑ | 4,1↓ |
| Образец<br>Ген | Береза |      |      |      |      |       |      |      |
|                | 3пш    |      | бпш  |      | R2   |       |      |      |
|                | к      | о    | к    | о    | к    | о     | к    | о    |
| <i>BpDREB2</i> | 7,0↑   | 2,1↓ | 3,8↑ | 2,2↓ | 1,1↑ | 5,0↓  |      |      |

Исследованные гены факторов транскрипции показали дифференциальные изменения уровня экспрессии у клонов тополя и березы. Отличия в ответных реакциях на стресс могут быть обусловлены их генотипическими особенностями (например, метилированием). Оценка экспрессии проанализированных факторов транскрипции выявила наличие выраженного стрессового ответа (значительное снижение или повышение уровня экспрессии генов) у клонов березы и некоторых клонов тополя (Е, Тг) после воздействия 1% NaCl в составе питательной среды ½ WPM. Существенное понижение уровня экспрессии при повторных воздействиях солевого стресса свидетельствует о чувствительности клонов к стрессовому фактору.

### Выводы

1. Результаты исследования показали дифференциальные значения уровня экспрессии факторов транскрипции *DREB* у клонов тополя и березы в культуре *in vitro* в условиях моделируемого солевого стресса. Полученные данные свидетельствуют о чувствительности проанализированных клонов к засолению.

2. Для получения большей информации о возможном ответе клонов тополя и березы на солевой стресс необходимо в дальнейшем проводить изучение уровня экспрессии исследованных факторов транскрипции при различной продолжительности солевого воздействия и в разных органах образцов, увеличить количество точек измерения уровня экспрессии, расширить выборку генов для проведения анализа экспрессии. Также необходимо проведение изучения активности ключевых ферментов клеточного цикла.

### Список литературы

1. Гродецкая Т.А., Гродецкая Т.А., Евлаков П.М., Исаков И.Ю. Анализ экспрессии генов стрессоустойчивости в условиях воздействия засухи на растения березы в Центрально-Черноземном регионе // Лесотехнический журнал. – 2020. – Т. 10. № 2 (38). – С. 23-34. DOI: 10.34220/issn.2222-7962/2020.2/3.
2. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Федорин Д.Н. Идентификация и исследование экспрессии генов: учебно-методическое пособие для вузов. – Воронеж: Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2008. – С. 3-15.
3. Иванцев В.В., Евграшкина Т.Н., Бойкова О.И., Жуков Н.Н. Засоление почвы и его влияние на растения // Известия Тульского государственного университета. Науки о Земле. – 2020. – № 3. – С. 28-42.

4. Кондратьева А.М., Федулова Т.П. Исследование экспрессии генов *CBL1* и *CBL2* тополей в условиях моделируемого солевого стресса в культуре *in vitro* // Актуальные вопросы изучения наземных и водных экосистем среднерусской лесостепи. – Вып. 2. – 2021. – С. 19-23.
5. Панкова Е.И., Воробьева Л.А., Гаджиев И.М., Горохова И.Н., Елизарова Т.Н., Королюк Т.В., Лопатовская О.Г., Новикова А.Ф., Решетов Г.Г., Скрипникова М.И., Славный Ю.А., Черноусенко Г.И., Ямнова И.А. Засоленные почвы России. – М.: Академкнига, 2006. – 857 с.
6. Панкова Е.И., Конюшкова М.В., Горохова И.Н. О проблеме оценки засоленности почв и методике крупномасштабного цифрового картографирования засоленных почв // Экосистемы: Экология и динамика. – 2017. – Т. 1 (1). – С. 26-54.
7. Ржевский С.Г., Гродецкая Т.А., Федулова Т.П., Евлаков П.М. Идентификация и исследование экспрессии генов стрессоустойчивости у тополей // Лесотехнический журнал. – 2018. – Т. 8. – № 4 (32). – С. 29-37. DOI: 10.12737/article\_5c1a3210046e86.17339317.
8. Ржевский С.Г., Гродецкая Т.А., Федулова Т.П., Евлаков П.М. Влияние холодового стресса на экспрессию генов факторов транскрипции у селекционноценных генотипов тополя // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2019. – № 4. – С. 67-73.
9. Табацкая Т.М., Аминев Е.Ю., Машикина О.С. Биотехнологическая оценка коллекционного материала березы и тополя в условиях солевого стресса в культуре *in vitro* // Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки: материалы V международной научно-практической конференции (Симферополь, 5-9 октября 2020 г.). – Симферополь, 2020. – С. 190-191.
10. Чудинова Л.А., Орлова Н.В. Физиология устойчивости растений: учеб. пособие к спецкурсу. – Пермь, 2006. – 124 с.
11. Agarwal P.K., Agarwal P., Reddy M.K., Sopory S.K., Agarwal P.K. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants // Plant Cell Rep. – 2006. – No. 25 (12). – P. 1263-1274. DOI: 10.1007/s00299-006-0204-8.
12. Chen W.J., Zhu T. Networks of transcription factors with roles in environmental stress response // Trends Plant Sci. – 2004. – No. 9 (12). – P. 591-596. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.10.007.
13. Chen J., Xia X., Yin W. Expression profiling and functional characterization of a DREB2-type gene from *Populus euphratica* // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2009. – Vol. 378. – No. 3. – P. 483-487. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.11.071.
14. Lata C., Prasad M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants // J Exp Bot. – 2011. – No. 62 (14). – P. 4731-4748. DOI: 10.1093/jxb/err210.

Статья поступила в редакцию 03.06.2022 г.

**Kondratyeva A.M., Amineva E.Yu., Tabatskaya T.M., Mashkina O.S., Fedulova T.P. Expression dynamics of DREB transcription factor genes in poplar and birch clones *in vitro* // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2022. – № 144 – P. 88-94**

The expression of the DREB1 and DREB2 genes was studied using leaves of the upper layer of *in vitro* clones of white poplar (*Populus alba* L.), gray poplar (*P. × canescens* (Aiton) Sm.), a hybrid of white poplar and aspen (*P. alba* L. × *P. tremula* L.), downy birch (*Betula pubescens* Ehrh.) and *B. pendula* f. “*dalecarlica*” (L. f.) Schneid. exposed to salt stress and control plants. Microplants were exposed to salt stress four times (½ WPM + 1% NaCl) for 3 weeks, alternating their stay on ½ WPM for 3–4 weeks. Control samples were kept on ½ WPM without salt addition. The studied transcription factor genes showed differential changes in the expression level in poplar and birch clones. The level of gene expression after exposure to salt stress on control samples increases in clones of downy birch; a clone of *B. pendula* f. “*dalecarlica*” showed a slight change in the expression level.

For all samples that had previously undergone exposure to salt stress, a decrease in the level of expression was characteristic with the next exposure to the factor. Evaluation of the expression of the analyzed transcription factors revealed the presence of a pronounced stress response (decrease or increase in the level of gene expression) in birch clones and some poplar clones after exposure to 1% NaCl in the nutrient medium  $\frac{1}{2}$  WPM. A significant decrease in the expression level upon repeated exposure to salt stress indicates the sensitivity of the clones to the stress factor.

**Key words:** *populus; Betula; poplar; birch; DREB1; DREB2; salinity; drought; salt stress; gene expression*