

УДК 581.1

**ЭТИЛЕН-НЕЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ МУТАНТЫ  
АРАБИДОПСИСА *etr1-1* И *ein2-1* ИМЕЮТ  
ПОНИЖЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ К ГИПОТЕРМИИ**

**В. Н. Попов\*, А. Н. Дерябин, Н. В. Астахова, О. В. Антипина,  
Т. А. Суворова, Г. П. Алиева, И. Е. Мошков**

Представлено академиком РАН И.А. Тарчевским 17.04.2019 г.

Поступило 23.04.2019 г.

Изучали особенности низкотемпературной устойчивости растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. в связи с функционированием этиленового сигнального пути. В качестве объектов исследования использовали растения дикого типа (экотип Col-0) и этилен-нечувствительные мутанты *etr1-1* и *ein2-1*. Впервые установлено, что этилен-нечувствительные мутанты отличались от растений дикого типа меньшей на 25–30% интенсивностью видимого фотосинтеза, пониженным содержанием растворимых сахаров и, как результат, более низкой устойчивостью к холоду. Полученные данные свидетельствуют о необходимости сохранения восприятия и передачи этиленового сигнала для конститутивной устойчивости растений арабидопсиса к низкой температуре.

**Ключевые слова:** *Arabidopsis thaliana* Heynh. (L.), этилен-чувствительные мутанты, фотосинтез, сахара, гипотермия.

**DOI:** <https://doi.org/10.31857/S0869-56524873338-341>

Одной из фундаментальных проблем современной биологии является исследование гормональной регуляции роста, развития и устойчивости растительного организма к абиотическим стрессорам. Этилен  $C_2H_4$  является газообразным гормоном, регулирующим многие физиологические процессы на разных этапах онтогенеза растительного организма, такие как деление клеток, полярный транспорт ауксина, прорастание семян, формирование боковых корней и корневых волосков, эпинастия листьев, старение цветков и листьев, ответная реакция на стрессорные воздействия и др. [1]. Сведения об участии этилена в регуляции процесса формирования устойчивости растений к низкой температуре немногочисленны и противоречивы. Было обнаружено возрастание выделения растениями этилена при холодовой экспозиции и высказано предположение о прямой взаимосвязи между его биосинтезом и степенью развиваемой холодоустойчивости [2]. Экзогенная обработка растений 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислотой (АЦК) — предшественником этилена повышала холодоустойчивость [3]. Кроме того, исследования, проведенные с мутантом арабидопсиса *eto1-3*, являющимся сверхпродуцентом этилена, продемонстрировали его по-

вышенную устойчивость к низкой температуре [4]. Авторы показали, что мутант *eto1-3* характеризовался более высоким уровнем экспрессии генов *CBF1*, *CBF2* и *CBF3*, которые связаны с формированием холодоустойчивости, по сравнению с растениями дикого типа (экотип Col-0). В то же время другие авторы наблюдали снижение холодоустойчивости у мутанта *eto1-3*, а также у растений арабидопсиса дикого типа *in vitro*, обработанных экзогенной АЦК [5].

В данной работе мы попытались при помощи этилен-нечувствительных мутантов арабидопсиса определить необходимость функционирования этиленового сигнального пути для развития холодоустойчивости. Полученные экспериментальные данные позволили впервые установить, что этилен-нечувствительные мутанты отличались от растений дикого типа меньшей интенсивностью видимого фотосинтеза, пониженным содержанием растворимых сахаров и, как результат, более низкой устойчивостью к холоду.

Объектами исследования были растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. дикого типа (экотип Col-0) и нечувствительные к этилену мутанты *ethylene resistant1-1* (*etr1-1*) и *ethylene insensitive2-1* (*ein2-1*). У мутанта *etr1-1* имеется точечная мутация в гене *ETR1*, кодирующем один из рецепторов этилена. Данная мутация в связывающем центре мембран-

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева  
Российской Академии наук, Москва

\*E-mail: [vnpopov@mail.ru](mailto:vnpopov@mail.ru)

ного рецептора нарушает связывание этилена с ETR1, в связи с чем он способен связывать только 20% этилена по сравнению с растениями дикого типа [6]. У мутанта *ein2-1* имеется мутация в гене *EIN2*, кодирующем мембранный белок EIN2, вследствие чего нарушается передача сигнала на этилен-зависимые факторы транскрипции [7].

Семена растений получены из Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (Великобритания). Растения выращивали в грунте в течение 8 недель при температуре 22 °C, освещённости 150 мкмоль/(м<sup>2</sup>·с) и восьмичасовом фотопериоде, что гарантировало развитие розетки без перехода в фазу цветения. Материалом для биохимических исследований служили листья с 10-го по 16-й.

Для оценки низкотемпературной устойчивости растения арабидопсиса подвергали промораживанию при температурах от –3 до –6 °C в течение 1 суток в климатической камере MIR-153 (“Sanyo”, Япония), а также краткосрочному охлаждению при температуре –4 °C в течение 15 и 30 мин. Об устойчивости исследуемых растений к низкой температуре судили по выходу электролитов из клеток листьев [8], а также по накоплению одного из конечных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) — малонового диальдегида (МДА), который определяли, как описано в [9].

Для определения содержания глюкозы в листьях использовали набор Глюкоза-Ольвекс (“Ольвекс диагностика”, Россия) и протокол фирмы-производителя. Содержание сахарозы и фруктозы определяли методом Рое с модификациями [10].

Изучение CO<sub>2</sub>-газообмена растений арабидопсиса проводили на установке открытого типа с инфракрасным газоанализатором “URAS2T” (Германия) при 22 °C. Измерения газообмена включали определение скоростей видимой ассимиляции CO<sub>2</sub> и темнового дыхания [11].

Все эксперименты проводили в 4–7 биологических повторностях и 3–4 аналитических. На рисунках и в таблице представлены среднеарифметические значения опыта и их стандартные ошибки.

Для выявления различий в уровне конститутивной холодоустойчивости исследуемых растений арабидопсиса на первом этапе исследований применяли краткосрочное охлаждение с оценкой устойчивости по накоплению МДА. Согласно полученным данным (рис. 1), после охлаждения наблюдали повышение содержания МДА растений Col-0 на 15–25%, а у мутантов *etr1-1* и *ein2-1* в полтора раза по сравнению с неохлажденным вариантом. Это

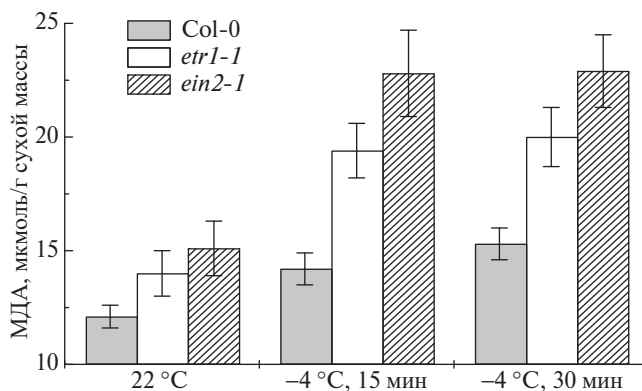


Рис. 1. Действие краткосрочного охлаждения (–4 °C) на содержание МДА в листьях растений арабидопсиса дикого типа (Col-0) и мутантов *etr1-1* и *ein2-1*.

свидетельствует о значительном смещении подвижного равновесия между ПОЛ и антиоксидантной системой в сторону активации процессов ПОЛ у нечувствительных к этилену мутантов.

Результаты исследований конститутивной устойчивости растений арабидопсиса к гипотермии по выходу электролитов из листьев приведены на рис. 2. Согласно полученным данным, у всех генотипов с понижением температуры с –3 до –6 °C наблюдалось возрастание значений выхода электролитов, особенно сильное у этилен-нечувствительных мутантов. Важно отметить, что температура, при которой отмечается 50%-й выход электролитов, для растений Col-0 составляла около –4,5 °C, тогда как для обоих мутантов на 1 °C выше, что является существенной величиной для растений арабидопсиса.

Известно, что в формировании устойчивости к гипотермии у растений значительную роль играют растворимые сахара, которые выполняют энергетическую, осморегуляторную, криопротекторную и другие функции, а также участвуют в “перехвате” активных форм кислорода, препятствуя развитию окислительного стресса [12]. Показана чёткая зависимость между накоплением растворимых сахаров и LT<sub>50</sub> различных экотипов *A. thaliana* [13]. Мы предположили, что одной из возможных причин различий в уровне конститутивной холодоустойчивости исследуемых генотипов арабидопсиса могло быть неодинаковое содержание в их листьях растворимых сахаров. Проведённые исследования подтвердили наше предположение (рис. 3). Максимальное содержание сахаров было обнаружено у растений дикого типа, в основном за счёт повышенного накопления фруктозы и глюкозы. Этилен-нечувствительные мутанты *A. thaliana* отличались от растений дикого типа пониженным содержанием растворимых сахаров.

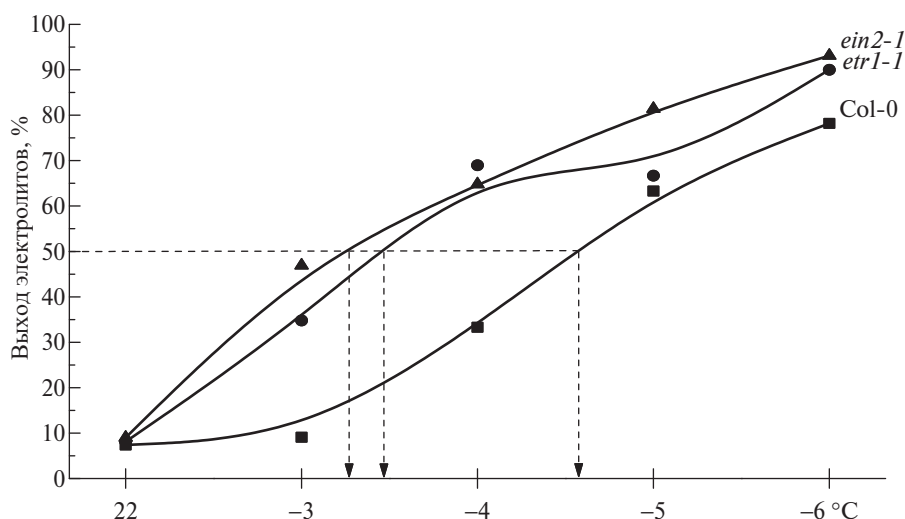


Рис. 2. Действие промораживания в течение суток на выход электролитов из листьев растений арабидопсиса дикого типа (Col-0) и мутантов *etr1-1* и *ein2-1*.

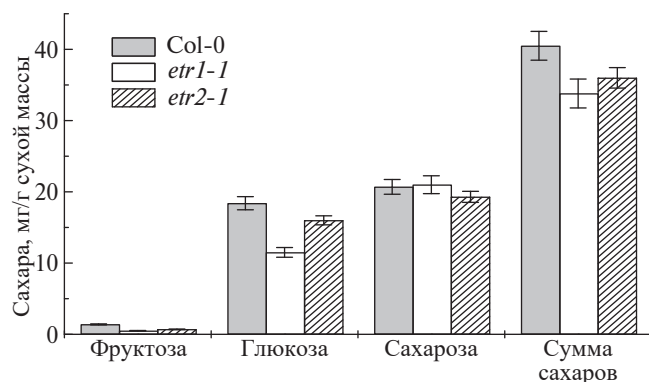


Рис. 3. Содержание растворимых сахаров в листьях растений арабидопсиса дикого типа (Col-0) и мутантов *etr1-1* и *ein2-1*.

Полученные данные по содержанию сахаров позволили предположить, что между исследуемыми генотипами могут существовать различия в интенсивности процессов фотосинтеза и дыхания. Исследования  $\text{CO}_2$ -газообмена показали, что этилен-нечувствительные мутанты имели на 25–30% меньшую интенсивность видимого фотосинтеза и незначительно превосходили растения дикого типа по интенсивности темнового дыхания (табл. 1). В результате величина отношения видимый фотосинтез/темновое дыхание у растений *etr1-1* и *ein2-1* оказалась на 30–40% меньше, чем у генотипа Col-0. Поскольку увеличение отношения видимый фотосинтез/темновое дыхание создаёт предпосылки для накопления сахаров, то полученные данные по  $\text{CO}_2$ -газообмену хорошо объясняют повышенное содержание сахаров в клетках растений арабидопсиса дикого типа, описанное выше.

В литературе имеются сведения о том, что использованные в нашей работе этилен-нечувстви-

Таблица 1. Интенсивность  $\text{CO}_2$ -газообмена растений арабидопсиса дикого типа (экотип Col-0) и мутантов *etr1-1* и *ein2-1*

Показатель	Col-0	<i>etr1-1</i>	<i>ein2-1</i>
Видимый фотосинтез, мг $\text{CO}_2$ /(г сухой массы·ч)	7,2 ± 0,8	5,1 ± 0,5	5,5 ± 0,4
Темновое дыхание, мг $\text{CO}_2$ /(г сухой массы·ч)	3,9 ± 0,3	4,5 ± 0,5	4,2 ± 0,3
Видимый фотосинтез/темновое дыхание	1,8	1,1	1,3

тельные мутанты *etr1-1* и *ein2-1* проявляют повышенную чувствительность к глюкозе [14]. Мутант *etr1-1* демонстрировал сильное торможение роста на питательной среде с 4% глюкозы, в то время как растения дикого типа росли даже в присутствии 6% глюкозы [15]. Можно предположить, что имеющие повышенную чувствительность к глюкозе мутанты *etr1-1* и *ein2-1* были не способны к её накоплению в количествах, характерных для Col-0. Как результат, пониженное содержание растворимых сахаров в клетках этилен-нечувствительных мутантов могло приводить к снижению холодоустойчивости этих растений.

Таким образом, используя в качестве экспериментальной модели растения арабидопсиса дикого типа, а также этилен-нечувствительные мутанты *etr1-1* и *ein2-1*, мы впервые показали пониженную устойчивость к гипотермии растений, неспособных к восприятию и передаче этиленового сигнала. Прерывание этиленового сигналинга на стадии связывания этилена с мембранным рецептором (*etr1-1*), а также на стадии передачи сигнала на этилен-зависимые факторы транскрипции (*ein2-1*) одинаково приводило к снижению низкотемпературной устойчивости растений арабидопсиса. Полученные дан-

ные убедительно свидетельствуют о необходимости сохранения восприятия и передачи этиленового сигнала для конститутивной устойчивости растений арабидопсиса к низкой температуре.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bleecker A.B., Kende H. // Ann. Rev. Cell and Develop. Biol. 2000. V. 16. P. 1–18.
2. Ciardi J.A., Deikman J., Orzolek M.D. // Physiol. Plant. 1997. V. 101. P. 333–340.
3. Catal R., Lopez-Cobollo R., Castellano M.M., et al. // Plant Cell. 2014. V. 26. P. 3326–3342.
4. Catal R., Salinas J. // Plant Signaling & Behavior. 2015. V. 10. № 3. P. e989768-1–e989768-2.
5. Shi Y., Tian S., Hou L., et al. // Plant Cell. 2012. V. 24. P. 2578–2595.
6. Woeste K., Kieber J.J. // Phil. Trans. Roy. Soc. London. 1998. V. 353. P. 1431–1438.
7. Alonso J.M., Hirayama T., Roman G., et al. // Science. 1999. V. 284. P. 2148–2152.
8. Campos P.S., Quartin V., Ramalho J.C., et al. // J. Plant Physiol. 2003. V. 160. P. 283–292.
9. Жиров В.К., Мерзляк М.Н., Кузнецов Л.В. // Физиология растений. 1982. Т. 29. С. 1045–1052.
10. Туркина М.В., Соколова С.В. Методы определения моносахаридов и олигосахаридов. В кн.: Биохимические методы в физиологии растений / Под ред. О.А. Павлиновой. М.: Наука, 1971. С. 7–34.
11. Климов С.В. // Изв. РАН. Сер. биол. 2003. Т. 30. С. 57–62.
12. Tarkowski L.P., Van den Ende W. // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. Article 203.
13. Zuther E., Schulz E., Childs L.H., et al. // Plant Cell Environ. 2012. V. 35. P. 1860–1878.
14. Leon P., Sheen J. // Trends in Plant Science. 2003. V. 8. P. 110–116.
15. Zhou L., Jang J.C., Jones T.L., et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 10294–10299.

## ETHYLENE-INSENSITIVE ARABIDOPSIS MUTANTS *etr1-1* AND *ein2-1* HAVE DECREASED FREEZING TOLERANCE

V. N. Popov, A. N. Deryabin, N. V. Astakhova, O. V. Antipina,  
T. A. Suvorova, G. P. Alieva, I. E. Moshkov

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences,  
Moscow, Russian Federation

Presented by Academician of the RAS I.A. Tarchevsky April 17, 2019

Received April 23, 2019

The freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. was studied in relation to functioning of the ethylene signaling pathway. Constitutive freezing tolerance was compared in wild-type plants (ecotype Col-0) and ethylene-insensitive mutants *etr1-1* and *ein2-1*. For the first time it was established that ethylene-insensitive mutants had by 25–30% lower net photosynthesis rate, the decreased content of soluble sugars and, as a result, lower freezing tolerance. Our work provides evidence that perception and transduction of ethylene signal are necessary for constitutive tolerance of *Arabidopsis* to low temperature.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana* Heynh. (L.), ethylene-insensitive mutants, photosynthesis, sugars, hypothermia.