

## ВЛИЯНИЕ $\gamma$ -ОБЛУЧЕНИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТЫ МЕТАБОЛИЗМА АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ В ЗАРОДЫШАХ СЕМЯН ЯЧМЕНЯ

© С.В. Битаршвили, В.С. Бондаренко, С.А. Гераськин

Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии, Обнинск

Для цитирования: Битаршвили С.В., Бондаренко В.С., Гераськин С.А. Влияние  $\gamma$ -облучения на экспрессию генов, кодирующих ферменты метаболизма абсцизовой кислоты в зародышах семян ячменя // Экологическая генетика. — 2018. — Т. 16. — № 4. — С. 85–89. doi: 10.17816/ecogen16485-89.

Поступила: 23.08.2018

Одобрена: 10.12.2018

Принята: 25.12.2018

✿ Изучено влияние  $\gamma$ -облучения семян ячменя сорта Нур в дозах 4–50 Гр на экспрессию генов, кодирующих ферменты биосинтеза абсцизовой кислоты (АБК), диоксигеназу 9-цис-эпоксикаротиноидов (*HvNCED1*) и катаболизма АБК 8'-гидроксилазу (*HvABA8'OH-1*) в зародышах семян ячменя в первые 30 часов прорастания. Показано, что гамма-облучение семян ячменя изменяет экспрессию генов, кодирующих ферменты биосинтеза и катаболизма АБК, во всех экспериментальных группах, что может обусловить снижение содержания АБК при использовании стимулирующих доз облучения и увеличить потенциал синтеза фитогормона при использовании ингибирующей дозы.

✿ **Ключевые слова:** ячмень;  $\gamma$ -облучение; абсцизовая кислота (АБК); *HvNCED1*; *HvABA8'OH-1*; ПЦР в реальном времени; экспрессия генов.

## INFLUENCE OF $\gamma$ -IRRADIATION ON THE EXPRESSION OF ENCODING ABA METABOLISM ENZYMES IN BARLEY EMBRYOS

© S.V. Bitarishvili, V.S. Bondarenko, S.A. Geras'kin

Russian Institute of Radiology and Agroecology, Obninsk, Russia

For citation: Bitarishvili SV, Bondarenko VS, Geras'kin SA. Influence of  $\gamma$ -irradiation on the expression of encoding ABA metabolism enzymes in barley embryos. *Ecological genetics*. 2018;16(4):85-89. doi: 10.17816/ecogen16485-89.

Received: 23.08.2018

Revised: 10.12.2018

Accepted: 25.12.2018

✿ **Background.** Small doses of radiation stimulate the growth and development of plants including seed germination. ABA plays a key role not only in seed dormancy and germination but also in the regulation of adaptive reactions of plants. *The aim* of our work was to study the effect of  $\gamma$ -irradiation of barley seeds in a small doses on the expression of genes encoding ABA biosynthesis enzyme 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (*HvNCED1*) and catabolism enzyme ABA 8'-hydroxylase (*HvABA8'OH-1*). **Materials and Methods.** The barley seeds were irradiated at dose range of 4–50 Gy at a dose rate of 60 Gy/h, the radiation source was  $^{60}\text{Co}$ . The study was carried out in the embryos within the first 30 hours after germination. Relative gene expression was investigated using real-time PCR (RT-PCR). **Results.** It was shown that  $\gamma$ -irradiation of barley seeds changes the expression of ABA biosynthesis and catabolism genes in all experimental groups. **Conclusion.** This alterations can lead to a decrease the ABA content under irradiation with stimulating doses and increase the biosynthesis of phytohormone under irradiation with inhibitory dose.

✿ **Keywords:** barley;  $\gamma$ -irradiation; ABA; *HvNCED1*; *HvABA8'OH*; real-time PCR; gene expression.

### ВВЕДЕНИЕ

Абсцизовая кислота — один из пяти классических фитогормонов растений, играет ключевую роль во многих процессах жизнедеятельности растений, включая поддержание покоя семян и ингибирование их прорастания [1]. АБК нередко называют «гормоном стресса», благодаря ее исключительному значению для процессов адаптации к различным биотическим и абиотическим стрессам. В стрессовых условиях эндогенные уровни АБК резко увеличиваются, активируя сигнальные пути и изменяя экспрессию генов, вовлеченных в ответ на стресс [2].

Прорастание семени является критическим этапом в жизни растений, существенно зависящим от факто-

ров окружающей среды. Неблагоприятные условия могут угнетать прорастание, снижать жизнеспособность проростков и негативно сказываться на морфологических показателях [3]. Однако низкие дозы стрессоров могут приводить к противоположному эффекту. В начале прошлого века было установлено, что ионизирующие излучения (ИИ) в малых дозах могут ускорять рост и развитие растений, стимулировать прорастание семян [4].

В нашей предыдущей работе [5] было исследовано влияние  $\gamma$ -облучения семян ячменя сорта Нур в дозах 4–50 Гр на содержание основных классов фитогормонов в проростках на ранних этапах онтогенеза. Показа-

но, что облучение в стимулирующих развитие проростков дозах приводило преимущественно к уменьшению содержания АБК, применение ингибирующей рост дозы 50 Гр вызывало ее накопление.

Эндогенное содержание АБК определяется балансом ее биосинтеза и катаболизма [6]. Семейство генов *NCED* кодирует важнейший фермент биосинтеза диоксигеназу 9-цис-эпоксикаротиноидов. Катаболизм АБК в ячмене регулируется генами *HvABA8'OH* из семейства *CYP707A*, продуктом которого является фермент 8'-гидроксилаза АБК [6]. Экспрессия генов *NCED* и *ABA8'OH* выступает ключевым фактором, контролирующим уровень АБК и, соответственно, процесс покоя и прорастания [7].

Таким образом, для выяснения механизмов изменения содержания АБК в облученных проростках мы изучили влияние  $\gamma$ -облучения на экспрессию генов, кодирующих ферменты биосинтеза и катаболизма АБК в первые 30 часов прорастания.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования был выбран ячмень (*Hordeum vulgare* L.) сорта Нур первой репродукции. Воздушно-сухие семена (влажность — 13–15 %) облучали в дозах 4, 10, 16, 20, 50 Гр при мощности дозы 60 Гр/ч на установке ГУР-120 (ВНИИРАЭ, Обнинск) с источником излучения  $^{60}\text{Co}$ . Контролем служили необлученные семена. Сразу после облучения семена замачивали в дистиллированной воде рулонным методом согласно ГОСТу 12038–84 [8] и помещали в термостат MIR-254 (Sanyo, Япония) без освещения при температуре 20 °C на 6, 12, 18, 24 и 30 часов экспозиции в рулонах.

Для каждой биологической повторности из 20 семян извлекали зародыши и фиксировали в жидком азоте до экстракции. Все измерения проводили в трех биологических повторностях (т. е. 60 семян на одну экспериментальную точку). Зародыши гомогенизировали и выделяли РНК при помощи набора NucleoSpin TriPrep фирмы Macherey-Nagel согласно протоколу производителя. Синтез кДНК на матрице РНК проводили при помощи набора реактивов MMLV RT kit фирмы «Евроген». Концентрацию нуклеиновых кислот измеряли спектрофотометром NanoDrop и флуориметром Qubit 2.0 с использованием наборов реактивов для флуориметрического измерения концентрации ДНК и РНК фирмы Invitrogen согласно протоколу производителя.

У ячменя известны два гена, кодирующих фермент биосинтеза АБК диоксигеназу 9-цис-эпоксикаротиноидов (*HvNCED1* и *HvNCED2*), и два гена, кодирующих фермент катаболизма 8'-гидроксилазу АБК (*HvABA8'OH-1* и *HvABA8'OH-2*). Генами интереса в рамках данной работы выступали гены *HvNCED1* (синтез) и *HvABA8'OH-1* (катаболизм), так как их экс-

прессия наиболее чувствительна к действию внешних факторов, в отличие от паралогов [9, 10]. В качестве референтного был выбран ген *18SrRNA*, кодирующий 18S-субъединицу рРНК. У ячменя данный ген входит в число наиболее стабильных генов домашнего хозяйства в условиях биотических и абиотических стрессов и рекомендуется к использованию в качестве референтного при исследовании транскрипционной активности [11]. В качестве праймеров применяли следующие последовательности:

- к *18SrRN* — GTGACGGGTGACGGAGAATT и GACACTAATGCGCCCGGTAT [11];
- к *HvNCED1* — CCAGCACTAATCGATTCC и GAGAGTGGTGATGAGTAA;
- к *HvABA8'OH-1* — AGCACGGACCGTCAAAGTC и TGAGAATGCCTACGTAGTG [9].

Уровень транскрипционной активности генов интереса определяли посредством ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе ДТ-96 фирмы ДНК-Технология. Реакционные смеси готовили на основе набора реактивов HS TaqDNA Polymerase dNTP mix фирмы «Евроген». Для детекции накопления продуктов ПЦР в режиме реального времени использовали флуоресцирующий краситель SYBR Green I фирмы Lumiprobe.

Реакции осуществляли в объеме 20 мкл с первичной денатурацией в течение 10 мин при 95 °C, затем 50 циклов с тремя температурными полками: 94 °C — 20 с, 60 °C — 20 с, 72 °C — 20 с. Определение накопления продуктов амплификации проводили автоматически, на стадии отжига праймеров (60 °C) каждого цикла.

Реакции выполняли в трех повторах (триплетах) для каждой матрицы кДНК. В случае если значения порогового цикла реакции (Ct) в триplete различались на 0,5 и более, результаты по данному триpletу признавали недействительными, и реакцию для данной матрицы проводили повторно. Пороговую линию выставляли автоматически в среде специализированного программного обеспечения фирмы ДНК-Технология. Относительный уровень транскрипционной активности целевых генов рассчитывали методом  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [12].

Экспериментальные данные анализировали, используя непараметрическую статистику с помощью программ Microsoft Office Excel 2003 и STATISTICA 6.0. Статистическую значимость отличий оценивали с помощью *U*-критерия Манна — Уитни. На диаграммах представлены средние значения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаружено изменение транскрипционной активности исследуемых генов в облученной группе на всех этапах экспозиции в рулонах (6–30 ч), и даже в зародышах воздушно-сухих семян. Максимальные значения экспрессии гена биосинтеза АБК зафиксированы при дозе 50 Гр на 24 часа экспозиции и в воздушно-сухих

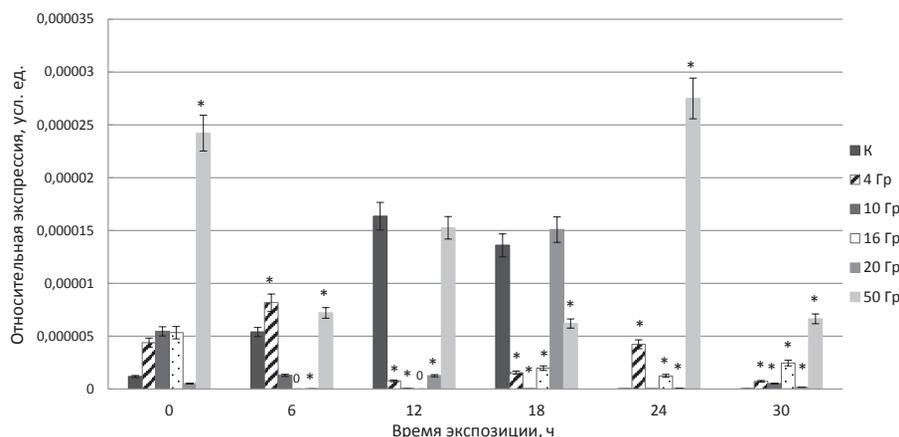


Рис. 1. Транскрипционная активность гена *HvNCED1*, кодирующего фермент биосинтеза АБК, в зародышах в зависимости от дозы облучения семян и времени экспозиции в рулонах с дистиллированной водой. 0 — нет детекции; \* различия статистически значимы по сравнению с контрольными значениями,  $p < 0,05$ , *U*-тест Манна — Уитни

Fig. 1. Transcriptional activity of the gene *HvNCED1* encoding the ABA biosynthesis enzyme in embryos depending on the dose of seed irradiation and incubation time in rolls with distilled water. 0 — no detection; \* differences are statistically significant compared to control values,  $p < 0,05$ , Mann-Whitney *U*-test

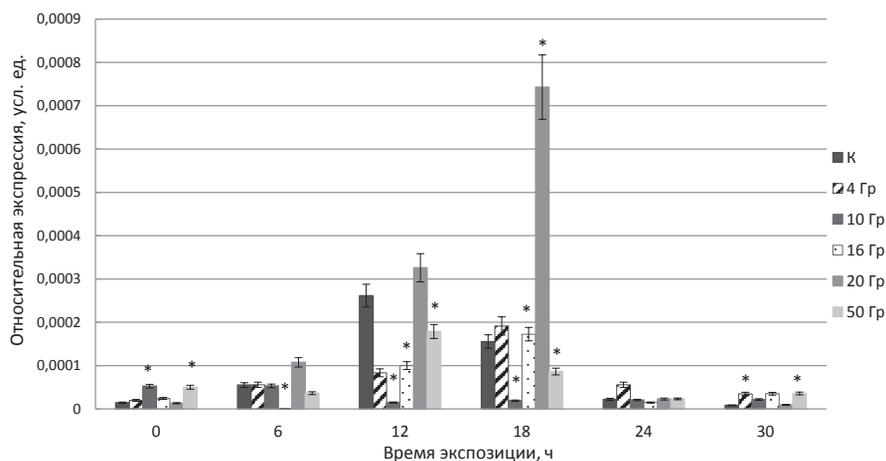


Рис. 2. Транскрипционная активность гена *HvABA8'OH-1*, кодирующего фермент катаболизма АБК, в зародышах в зависимости от дозы облучения семян и времени экспозиции в рулонах с дистиллированной водой. \* различия статистически значимы по сравнению с контрольными значениями,  $p < 0,05$ , *U*-тест Манна — Уитни

Fig. 2. Transcriptional activity of the gene *HvABA8'OH-1* encoding the ABA catabolism enzyme in embryos depending on the dose of seed irradiation and incubation time in rolls with distilled water. \* differences are statistically significant compared to control values,  $p < 0,05$ , Mann-Whitney *U*-test

зародышах (рис. 1), что указывает на активацию синтеза АБК. Именно при этой дозе в предыдущем эксперименте отмечалось накопление АБК в проростках ячменя [5].

На 6-й, 12-й и 18-й час экспозиции при дозах, ведущих к снижению уровня АБК в ранее проведенном эксперименте (4–20 Гр), транскрипционная активность гена, кодирующего фермент биосинтеза АБК, была преимущественно подавлена, что может обуславливать низкие уровни фитогормона. На 24-й и 30-й час экспозиции транскрипционная активность гена *HvNCED1* в контроле резко понизилась. На этом фоне в облученной группе фиксировали увеличение исследуемого параметра при

всех используемых дозах, максимальное — при дозе облучения 50 Гр. В сухом семени, на 24-й и 30-й час наблюдали положительную корреляцию значений транскрипционной активности с дозой излучения ( $r = 0,88$ ,  $p < 0,05$ ;  $r = 0,88$ ,  $p < 0,05$ ;  $r = 0,91$ ,  $p < 0,05$  соответственно).

Увеличение транскрипционной активности гена, кодирующего фермент катаболизма АБК *HvABA8'OH-1* может указывать на снижение содержания АБК в зародышах семян ячменя. В эксперименте транскрипционная активность гена *HvABA8'OH-1* увеличивалась на каждом этапе экспозиции в зависимости от дозы, однако статистически значимо в сухом семени на 18-й и 30-й час экспозиции (рис. 2). На 18-й час эк-

спозиции значимое увеличение исследуемого параметра фиксировали при дозах 16 и 20 Гр, причем при 20 Гр отмечали самое большое значение генной экспрессии в эксперименте. В ранее проведенных исследованиях на ячмене именно при этих дозах (16–20 Гр) наблюдали стимуляцию развития проростков [13], увеличение активности ферментов антиоксидантной системы [14], снижение содержания АБК и увеличение уровней гормонов, стимулирующих прорастание семян [5].

Снижение экспрессии гена катаболизма АБК при дозе 50 Гр, отмечавшееся на 12-й и 18-й час экспозиции могло вести к повышению содержания АБК. Действительно, облучение семян ячменя ингибирующей рост дозой 50 Гр приводило к накоплению АБК в проростках [5]. Следует отметить, что снижение транскрипционной активности *HvABA8'OH-1* происходило и при использовании некоторых стимулирующих доз с 6-го по 18-й час экспозиции.

Предполагается, что прерывание покоя в ячмене происходит за счет изменения содержания гиббереллинов, а содержание АБК и экспрессия генов ее метаболизма не играет существенной роли [10]. Однако в нашей предыдущей работе показано, что содержание АБК в проростках ячменя снижается после облучения семян в стимулирующих рост дозах 4–20 Гр и увеличивается после применения ингибирующей рост дозы 50 Гр [5].

Молекулярные изменения в результате действия ИИ опосредованы индукцией активных форм кислорода (АФК) [15]. Рассматривая изменения в экспрессии генов метаболизма АБК, необходимо учитывать роль АФК как в процессе прорастания, так и при ответе на стресс. В условиях стресса в растениях индуцируются большие количества АФК, что ведет к увеличению содержания АБК за счет усиления синтеза и уменьшения катаболизма [16]. Однако повышенные концентрации АФК во время прорастания семян увеличивают экспрессию генов катаболизма АБК и, таким образом, снижают уровни АБК [17]. Итак, АФК могут как положительно, так и отрицательно регулировать содержание АБК в зависимости от их концентрации и локализации. Изменения в транскрипционной активности исследуемых генов после облучения семян дозой 50 Гр свидетельствуют в пользу проявления окислительного стресса и увеличения потенциала синтеза АБК.

Результаты настоящей работы демонстрируют, что гамма-облучение семян изменяет экспрессию генов, кодирующих ферменты биосинтеза и катаболизма АБК в зародышах ячменя. Изменения фиксировали на всех этапах экспозиции, даже в зародышах воздушно-сухих семян. Использование стимулирующих доз преимущественно приводило к снижению транскрипционной активности гена биосинтеза АБК *HvNCED1* с 6-го по 18-й час экспозиции и различной динамике накопления транскриптов гена катаболизма АБК *HvABA8'OH-1*, в том числе резкому увеличению их содержания на 18-й час

при дозе 20 Гр, что может вызвать снижение уровней АБК в исследуемой ткани. Применение ингибирующей дозы 50 Гр приводило к увеличению транскрипционной активности гена *HvNCED1* и снижению активности гена *HvABA8'OH-1* с 6-го по 18-й час экспозиции, что может вызвать накопление АБК. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о противонаправленном действии  $\gamma$ -облучения на экспрессию изучаемых генов. Это может указывать на распространенное явление, при котором гены одного семейства демонстрируют различную и даже противоположную динамику транскрипционной активности при одном и том же воздействии, что было показано на генах биосинтеза различных фитогормонов [9, 18]. Разные паттерны транскрипционной активности представителей одного семейства генов могут быть опосредованы работой дифференциальных регуляторных систем и запуском конкретных генных сетей в каждом случае. Для подтверждения данной гипотезы необходимы дальнейшие исследования с определением экспрессии всех паралогичных генов одного семейства. Поскольку изученная в данной работе относительная экспрессия генов не является концом сигнального пути, она не может быть индикатором определенного содержания АБК, но может указывать на изменения потенциала накопления данного фитогормона.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Finkelstein R. Abscisic Acid synthesis and response. *Arabidopsis Book*. 2013;11:e0166. doi: 10.1199/tab.0166.
2. Christmann A, Weiler EW, Steudle E, Grill E. A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *Plant J*. 2007;52(1):167-174. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03234.x.
3. Deborah V, Malone RP, Dix PJ. Increased tolerance to abiotic stress in tobacco plants expressing a barley cell wall peroxidase. *J Plant Sci*. 2011;6(1):1-13. doi: 10.3923/jps.2011.1.13.
4. Козьмин Г.В., Гераськин С.А., Санжарова Н.И. Радиационные технологии в сельском хозяйстве и пищевой промышленности. — Обнинск: ВНИИРАЭ, 2015. [Koz'min GV, Geras'kin SA, Sanzharova NI. Radiatsionnye tekhnologii v sel'skom khozyaystve i pishchevoy promyshlennosti. Obninsk: VNIIRAE; 2015. (In Russ.)]
5. Битаршвили С.В., Волкова П.Ю., Гераськин С.А. Влияние  $\gamma$ -облучения семян на фитогормональный статус проростков ячменя // Физиология растений. — 2018. — Т. 65. — № 3. — С. 223–231. [Bitarishvili SV, Volkova PY, Geras'kin SA.  $\gamma$ -Irradiation of Barley Seeds and Its Effect on the Phytohormonal Status of Seedlings. *Fiziologiya Rastenii*. 2018;65(3):223-231. (In Russ.)]. doi: 10.7868/S0015330318030065.

6. Nambara E, Marion-Poll A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol.* 2005;56:165-185. doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046.
7. Tuan PA, Kumar R, Rehal PK, et al. Molecular Mechanisms Underlying Abscisic Acid/Gibberellin Balance in the Control of Seed Dormancy and Germination in Cereals. *Front Plant Sci.* 2018;9:668. doi: 10.3389/fpls.2018.00668.
8. ГОСТ 12038\_84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. Межгосударственный стандарт. Стандарты на методы контроля. — М., 2002. [GOST 12038\_84. Semena sel'skokhozyaystvennykh kul'tur. Metody opredeleniya vskhozhesti. Mezghosudarstvennyy standart. Standarty na metody kontrolya. (In Russ.)]
9. Millar AA, Jacobsen JV, Ross JJ, et al. Seed dormancy and ABA metabolism in Arabidopsis and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. *Plant J.* 2006;45(6): 942-54. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02659.x.
10. Bahin E, Bailly C, Sotta B, et al. Crosstalk between reactive oxygen species and hormonal signalling pathways regulates grain dormancy in barley. *Plant Cell Environ.* 2011; 34:980-993. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02298.x.
11. Jarosova J, Kundu JK. Validation of reference genes as internal control for studying viral infections in cereals by quantitative real-time RT-PCR. *BMC Plant Biol.* 2010;10:146. doi: 10.1186/1471-2229-10-146.
12. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$  Method. *Methods.* 2001;25:402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
13. Гераськин С.А., Чурюкин Р.С., Казакова Е.А. Модификация развития ячменя на ранних этапах онтогенеза при воздействии  $\gamma$ -облучения на семена // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2015. — Т. 55. — № 6. — С. 607–615. [Geras'kin SA, Churukin RS, Kazakova EA. Modification of Barley Development at Early Stages after Exposure of Seeds to  $\gamma$ -Irradiation. *Radiation biology, radioecology.* 2015;55(6):607-615. (In Russ.)]. doi: 10.7868/S0869803115060065.
14. Волкова П.Ю., Чурюкин Р.С., Гераськин С.А. Влияние  $\gamma$ -облучения семян на активность ферментов в проростках ячменя // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2016. — Т. 56. — № 2. — С. 1–7. [Volkova PY, Churyukin RS, Geras'kin SA. Influence of  $\gamma$ -Irradiated Seeds on the Enzyme Activity in Barley Seedlings. *Radiation biology, radioecology.* 2016;56(2):1-7. (In Russ.)]. doi: 10.7868/S0869803116020144.
15. Esnault MA, Legue F, Chenal C. Ionizing radiation: advances in plant response. *Environ Exp Bot.* 2010;68(3):231-7. doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.01.007.
16. Huang GT, Ma SL, Bai LP, et al. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Mol Biol Rep.* 2012;39:969-987. doi: 10.1007/s11033-011-0823-1.
17. Ishibashi Y, Aoki N, Kasa M, et al. The interrelationship between abscisic acid and reactive oxygen species plays a key role in barley seed dormancy and germination. *Front Plant Sci.* 2017;8:275. doi: 10.3389/fpls.2017.00275.
18. Ishibashi Y, Kasa S, Sakamoto N, et al. A role for reactive oxygen species produced by NADPH oxidases in the embryo and aleurone cells in barley seed germination. *PLoS One.* 2015;10(11): e0143173. doi:10.1371/journal.pone.0143173.

## ✪ Информация об авторах

**София Валерьяновна Битаршвили** — младший научный сотрудник лаборатории радиобиологии и экотоксикологии растений. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии», Обнинск. E-mail: bitarishvili.s@gmail.com.

**Владимир Сергеевич Бондаренко** — канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории исследования действия неионизирующих излучений на агроценозы. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии», Обнинск. E-mail: bvs79@mail.ru.

**Станислав Алексеевич Гераськин** — д-р биол. наук, заведующий лабораторией главный научный сотрудник лаборатории радиобиологии и экотоксикологии растений. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии», Обнинск. E-mail: stgeraskin@gmail.com.

## ✪ Information about the authors

**Sofia V. Bitarishvili** — Jr Researcher, Laboratory of Radiobiology and Ecotoxicology of Plants. Russian Institute of Radiology and Agroecology, Obninsk, Russia. E-mail: bitarishvili.s@gmail.com.

**Vladimir S. Bondarenko** — PhD, Leading Researcher, Laboratory for the Study of the Effects of Agroecosystems Exposure to Non-ionizing Radiation. Russian Institute of Radiology and Agroecology, Obninsk, Russia. E-mail: bvs79@mail.ru.

**Stanislav A. Geras'kin** — Doctor of Science, Professor, Head of the Laboratory of Radiobiology and Ecotoxicology of Plants. Russian Institute of Radiology and Agroecology, Obninsk, Russia. E-mail: stgeraskin@gmail.com.