

Влияние трансформации растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) геном *AtCPK1* с мутацией в соединительном домене на старение, вызванное тепловым стрессом

О.А. Тихонова*, Г.Н. Веремейчик, В.П. Григорчук

ФНЦ Биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

* olga.tikhonova.kam@mail.ru

Цель: выяснить, влияет ли трансформация геном *CDPK1 Arabidopsis thaliana* с мутацией в соединительном домене на устойчивость растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) к высоким температурам и старению, вызываемому тепловым стрессом.

Материалы и методы: При кратковременном воздействии был оценен стресс-индуцированный уровень экспрессии генов биосинтеза АБК *NtNCED1*, *NtNCED3*, АБК-зависимого гена *NtSAG12* и СК-зависимого гена *NtACD6* методом ПЦР-РВ. Также методом иммуноферментного анализа был вычислен уровень АБК в растениях при нормальных и стрессовых условиях. После длительного воздействия стресса выполнены экстракция и анализ содержания продуктов деградации хлорофилла методом ВЭЖХ-МС (МС²), измерены длины стеблей растений.

Результаты: При длительном воздействии теплового стресса в растениях наблюдалось снижение роста, исключением были трансгены с кальций-независимой мутацией (KJM-23), скорость роста которых была равна растениям в контрольных условиях. Кроме того, внешне KJM23-трансгенные растения были менее подвержены негативным факторам теплового стресса, проявляющимся в меньшем пожелтении листьев.

Абсцизовая кислота напрямую связана с процессами старения, поэтому было важно изучить экспрессию генов ее биосинтеза, а также экспрессию нескольких протеаз, участвующих в процессах клеточной гибели. В контрольных условиях KJM23-ОЕ-трансгены имели повышенную в 7 раз экспрессию гена биосинтеза АБК *NCED3*. При этом стрессовое воздействие вызывало рост экспрессии *NCED3* в растениях дикого типа и трансгенах с нативной и неактивной формами гена *AtCPK1*. Для растений, трансформированных постоянно активной формой гена *AtCPK1*, напротив, наблюдалось снижение экспрессии до уровня нетрансгенного контроля. Экспрессия *NCED1* остается практически неизменной, вне зависимости от внесения генетической конструкции и стрессового воздействия. В контрольных условиях экспрессия АБК-зависимого *SAG12* увеличивалась как у нативной (в 2 раза), так и у постоянно активной (в 5 раз) формы. А экспрессия гена *ACD6* увеличивалась более чем в 5 раз у растений KJM23-ОЕ по сравнению с WT, тогда как у растений KJM4-ОЕ и CPK1-ОЕ она равна дикому типу. Тепловой стресс приводил к увеличению экспрессии генов *SAG12* и *ACD6* более чем в два раза в растениях дикого типа (WT), трансгенов с неактивной (KJM4-ОЕ) и нативной (CPK1-ОЕ) формами. В то же время экспрессия генов *SAG12* и *ACD6* была почти полностью заблокирована у растений KJM23-ОЕ при кратковременном тепловом стрессе.

Мы показали, что относительное содержание продуктов деградации хлорофилла в контрольных условиях достоверно не отличалось у исследуемых форм и нетрансгенных растений. Содержание NCC/DNCC при воздействии длительного температурного стресса увеличивается для нетрансгенных растений и трансгенов с неактивной (KJM4-ОЕ) и нативной (CPK1-ОЕ) мутантными формами в среднем в 12 раз, тогда как в KJM23-трансгенных растениях лишь в 2 раза. Показано повышенное в 1,5 раза относительно дикого типа содержание АБК в растениях с внесением мутантного постоянно активного гена KJM23-ОЕ при нормальных условиях. Внесение неактивной и нативной формы гена не приводило к достоверному увеличению концентрации относительно дикого типа. Кратковременное температурное воздействие вызывало рост концентрации АБК в каждой из форм, исключая KJM23-ОЕ. Для постоянно активной формы, напротив, наблюдалось снижение концентрации до 20 нг/г, равных дикому типу в контрольных условиях.

Выводы: В представленной работе мы показали, что трансформация растений табака конститутивно активной модифицированной формой гена *AtCPK1* (KJM23-ОЕ растения) позволяет значительно смягчить такой негативный эффект теплового стресса, как деградация хлорофилла. Детальный молекулярно-биохимический анализ показал, что устойчивость KJM23-ОЕ растений к длительному тепловому стрессу сопровождается снижением уровня биосинтеза АБК и снижением АБК-зависимых процессов стресс-индуцируемого старения, предположительно за счет СРК-зависимой активации сигнальной системы СК, которая является антагонистом сигнальной системы АБК. Сверхэкспрессия нативной формы гена не имела эффекта на устойчивость к длительному интенсивному тепловому стрессу.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ № 24-24-00005.