

УДК 581.1

## ВЛИЯНИЕ ВЫСОКИХ ТЕМПЕРАТУР НА НЕКОТОРЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И СОДЕРЖАНИЕ мРНК ГЕНОВ *HSP70*, *BiP*, *IRE1* В ЛИСТЬЯХ ПШЕНИЦЫ

И. А. Нилова, А. Ф. Титов, Л. В. Топчиева

Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

Исследовали влияние высоких температур на рост листьев, их оводненность, теплоустойчивость клеток листьев и содержание мРНК генов *HSP70*, *BiP*, *IRE1* у недельных проростков озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39. Установлено, что температура 33 °С не вызывает существенных изменений в ростовых процессах листьев, приводит к небольшому повышению теплоустойчивости и не влияет на оводненность тканей листа, т. е. действует на растения условно как «мягкий» стресс. Температура 37 °С приводила к большему торможению роста листьев и более быстрому повышению теплоустойчивости растений, но также не влияла на оводненность тканей листа, т. е. действовала как «средний» стресс. Воздействие температуры 43 °С вызывало «жесткий» стресс, который приводил к полной остановке роста листьев, снижению оводненности тканей листа и теплоустойчивости, а через 3 сут – к гибели растений. При действии всех изученных температур – 33, 37 и 43 °С – в клетках листьев проростков зафиксированы определенные изменения уровня транскриптов генов *HSP70*, *BiP*, *IRE1*, кодирующие белки, которые участвуют в упаковке белковых молекул. Причем характер изменения содержания мРНК генов *BiP* и *IRE1* зависел от абсолютного значения используемой в эксперименте температуры. Изучение динамики содержания транскриптов генов *BiP* и *IRE1*, рассматриваемых в качестве маркеров стресса эндоплазматического ретикулума (ЭР-стресса), показало, что при 33 °С их уровень снижается и, следовательно, развитие ЭР-стресса не происходит. Усиление интенсивности высоко-температурного воздействия до 37 °С, напротив, приводило к накоплению транскриптов этих генов, видимо, отражая начальное развитие ЭР-стресса. Температура 43 °С, очевидно, также вызывала развитие ЭР-стресса, и при этом первоначально тоже наблюдалось накопление транскриптов гена *BiP*, но из-за отсутствия неотъемлемого компонента *IRE1* система контроля качества белка в этом случае, по-видимому, не могла работать полноценно. Исходя из полученных данных сделан вывод, что изменение содержания мРНК генов *HSP70*, *BiP* и *IRE1* играет важную роль в развитии теплоустойчивости растений пшеницы и защите клеток от ЭР-стресса, обусловленного действием высоких температур.

Ключевые слова: высокие температуры; *Triticum aestivum* L.; теплоустойчивость; оводненность; накопление транскриптов генов *HSP70*, *BiP*, *IRE1*.

**I. A. Nilova, A. F. Titov, L. V. Topchieva. THE INFLUENCE OF HIGH TEMPERATURES ON SOME PHYSIOLOGICAL INDICES AND THE CONTENT OF *HSP70*, *BiP*, *IRE1* GENES mRNA IN WHEAT LEAVES**

The effect of high temperatures on the growth of leaves, their water content, heat tolerance and dynamics of *HSP70*, *BiP*, *IRE1* genes transcription was investigated in 7-day-old

seedlings of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) variety Moskowskaya 39. It was found that a temperature of 33 °C causes a slight inhibition of leaf growth and some increase in the heat tolerance of their cells, but does not affect the water content of the leaf tissues, i. e. acts as a “mild” stress for the plants. The temperature of 37 °C led to a greater inhibition of leaf growth and a faster increase in the heat resistance of the plants, but did not affect the water content of leaf tissues either, i. e. acted as a “moderate” stress. Exposure to the temperature of 43 °C caused “severe” stress, which terminated leaf growth altogether, reduced the water content of leaf tissues and heat tolerance, and after 3 days resulted in the plant death. All the treatments (exposures to 33, 37 and 43 °C temperatures) led to changes in the transcription of the genes *HSP70*, *BiP*, *IRE1*, which encode the proteins involved in the folding of protein molecules, in the leaves of the seedlings. The nature of the change in the *BiP* and *IRE1* mRNA levels depended on the absolute values of the temperatures used in the experiment. The analysis of changes in the transcription levels of the *BiP* and *IRE1* genes, which are considered to be markers of endoplasmic reticulum stress (ER stress), has demonstrated that their transcription at 33 °C declined, proving the absence of ER stress. Intensification of the high-temperature exposure to 37 °C, on the contrary, leads to an accumulation of transcripts of these genes, obviously reflecting the onset of ER-stress. The temperature of 43 °C apparently also caused the development of ER-stress, since in this case the accumulation of *BiP* gene transcripts was initially observed, but the absence of an integral component of *IRE1* probably prevented the protein quality control system from functioning properly. Based on the data obtained, it was concluded that changes in the content of *HSP70*, *BiP* and *IRE1* mRNA play an important role in the development of the heat resistance of wheat plants and the protection of cells from ER stress in response to high temperatures.

**Key words:** high temperature; *Triticum aestivum* L.; heat tolerance; water content; accumulation of *HSP70*, *BiP*, *IRE1* gene transcript.

## Введение

Действие высоких температур, так же как и других абиотических стресс-факторов, может вызывать в клетках растений накопление неправильно синтезированных белков, или белков с неправильной пространственной упаковкой [Tuedmers et al., 2010; Fanata et al., 2013]. В этом случае выживание и жизнедеятельность растений во многом будет зависеть от эффективности работы системы контроля качества белка. Важнейшими ее компонентами являются шапероны и некоторые другие белки цитозоля и эндоплазматического ретикулума (ЭР). К наиболее значимым представителям шаперонов относят группу белков теплового шока (heat shock proteins – HSP). В частности, в эту группу входят цитоплазматический белок *HSP70* и белок ЭР – *BiP*. Связываясь с полипептидами, они обеспечивают их стабилизацию, способствуют правильной укладке и предотвращают их агрегацию. В условиях стресса, когда в клетках происходит активация синтеза стрессовых белков, может происходить сбой в работе так называемой «фолдинговой машины» и накопление в полости ЭР несвернутых правильным образом белков, т. е. белков, не способных выполнять свои функции. Это состояние характеризуется как стресс эндоплазматического ретикулума (ЭР-стресс). О развитии ЭР-стресса свиде-

тельствует повышение активности фермента *IRE1* (inositol-requiring enzyme 1) [Pu, Bassham, 2013], который участвует в процессе альтернативного сплайсинга мРНК *bZIP60*. В результате синтезируется активный *bZIP60*, который вместе с другими ТФ (*bZIP17* и *bZIP28*) запускает синтез различных белков-шаперонов [Liu et al., 2007a, b; Mittler et al., 2012; Wan, Jiang, 2016]. Успешная реализация процессов, направленных на защиту клеток растений от ЭР-стресса, может играть значительную роль в формировании устойчивости растений и, по-видимому, зависит от напряженности действующего фактора (т. е. от абсолютного значения температуры, действующей на растения, и продолжительности ее действия). Ранее мы показали, что характер изменения теплоустойчивости растений пшеницы и ее уровень, достигаемый в ответ на высокотемпературные воздействия разной интенсивности, существенно различаются между собой [Нилова, Титов, 2014]. Ее стабильно высокий уровень позволяет растениям противостоять негативным эффектам прогрева при температурах 33 и 37 °C, которые относятся для пшеницы к закалывающим (субповреждающим) температурам. Снижение устойчивости растений после продолжительного действия температуры 43 °C, которая является повреждающей для данного объекта, губительно для них, так как чаще всего приводит

в итоге к их гибели. Весьма вероятно, что в этих случаях эффективность работы системы контроля качества белков в клетках, судить о которой можно по уровню экспрессии и активности белков-шаперонов цитозоля и ЭР, будет разной. Однако сведения о характере изменения содержания транскриптов генов, кодирующих белки ответа на ЭР-стресс при действии высоких температур, практически отсутствуют. В связи с этим целью данной работы явилось изучение некоторых физиологических показателей и особенности экспрессии генов *BiP*, *HSP70* и *IRE1* при действии высоких температур – 33, 37 и 43 °С, оказывающих разный эффект на теплоустойчивость растений пшеницы.

## Материалы и методы

Исследования проводили на проростках озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39, которые выращивали в рулонах фильтровальной бумаги на питательном растворе в течение 7 сут с добавлением микроэлементов (рН 6,2–6,4) в камере искусственного климата при температуре воздуха 22 °С, его относительной влажности 60–70 %, освещенности ФАР 180 мкмоль/ (м<sup>2</sup>·с) и фотопериоде 14 ч. Затем недельные проростки подвергали воздействию температуры 33, 37 или 43 °С.

Продолжительность высокотемпературного воздействия составляла от 15 мин до 3 сут. В течение опыта измеряли динамику роста листьев растений и их оводненность.

Для изучения уровня транскриптов генов навеску из листьев (50 мг) фиксировали в жидком азоте. Тотальную РНК выделяли с помощью набора Extract RNA («Евроген», Россия). Количество и качество тотальной РНК определяли на спектрофотометре SmartSpec (Bio-Rad, США). Тотальную РНК обрабатывали ДНКазой (1 е. а). Первую цепь кДНК синтезировали, используя набор для обратной транскрипции с М-MLV обратной транскриптазой и случайными гексапраймерами («Евроген», Россия). Количество и качество выделенной кДНК определяли спектрофотометрически на приборе SmartSpec Plus (Bio-Rad, США). Уровень экспрессии генов растений оценивали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 (Bio-Rad, США), используя набор для амплификации с интеркалирующим красителем SYBR Green («Евроген», Россия). Праймеры («Евроген», Россия) для проведения ПЦР представлены в табл. 1. Смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала 100 нг кДНК, по 1 пкМ прямого и обратного праймеров, 5 мкл реакцион-

ной смеси и 16 мкл деионизованной воды, свободной от нуклеаз. Протокол ПЦР: денатурация кДНК 5 мин при 95 °С; 40 циклов: денатурация при 95 °С 30 с; отжиг при 58 °С 30 с; элонгация при 72° 30 с. Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР фрагментов. Для оценки эффективности ПЦР строили стандартную кривую, используя разведения кДНК. Эффективность ПЦР составляла не менее 98 %. Относительный уровень экспрессии генов вычисляли по формуле:

$$\text{Относительный уровень экспрессии} = \frac{2^{\text{Ст (контрольный)}}}{2^{\text{Ст (тестовый образец)}}$$

где Ст – значение пороговых циклов.

В качестве контрольных образцов были выбраны кДНК, выделенные из растений, не подвергавшихся действию высоких температур. В качестве референсного гена использовали актин.

Повторность в пределах одного опыта 3–6-кратная, а весь опыт повторяли не менее трех раз. Достоверность различий между средними значениями исследованных параметров определяли с помощью дисперсионного анализа (LSD-тест) в среде Microsoft Excel 2007. В статье обсуждаются величины, различающиеся между собой при  $p < 0,05$ .

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

## Результаты

В табл. 2 и 3 представлены результаты влияния высокотемпературных воздействий разной интенсивности на рост 1-го и 2-го листьев соответственно.

Перенос растений из оптимальных условий (22 °С) в условия действия температуры 33, 37 или 43 °С приводил к торможению роста 1-го и 2-го листьев. При этом чем выше была температура, тем меньше был их прирост. Так, у контрольных растений (22 °С) на 5-е сут эксперимента прирост 1-го листа составлял 31 %, в варианте с температурой 33 °С – 26 %, при 37 °С – только 24 %, а при 43 °С рост листьев полностью прекращался и через 3 сут эксперимента растения погибали. Рост 2-го листа еще в большей степени зависел от интенсивности высокотемпературного воздействия: у контрольных растений (22 °С) на 5-е сут опыта его прирост достигал 262 %, при 33 °С – 92 %, а при 37 °С – только 66 %. При 43 °С рост 2-го листа полностью прекращался.

Таблица 1. Характеристика праймеров для ПЦР в режиме реального времени

Table 1. Characterization of primers for real-time PCR

Ген Gene	Номер доступа в базе NCBI Access number in the database NCBI	Праймер Primer	Последовательность праймера 5'→3' Sequence of primer 5'→3'
<i>BiP</i>	KC894715.1	прямой forward обратный reversed	GCTATTGCCTATGGTTTGGACCT TGCCGTGCTTCTTCT
<i>IRE1</i>	CX536022.1	прямой forward обратный reversed	GAAGAAGCCAGGAGATAA AAGCGGTTGATGTGATA
<i>HSP70</i>	AF005993.1	прямой forward обратный reversed	AGGAGGAGATTGAGAAGATGGTGTC GTCGTCCTTGACCGTGTGTC
<i>Actin</i>	AB181991	прямой forward обратный reversed	GGGACCTCACGGATAATCTAATG AACCTCCACTGAGAACAACATTAC

Таблица 2. Влияние высоких температур на суточный прирост 1-го листа пшеницы, % от контроля

Table 2. Effect of high temperatures on the daily increase of the 1st leaf of wheat, % of control

Температура, °C Temperature, °C	Экспозиция, сут Exposition, d					
	0	1	2	3	4	5
22 (контроль) (control)	100	115	127	130	131	131
33	100	118	122*	124*	126*	126*
37	100	111*	121*	123*	124*	124*
43	100	100	100	100	-	-

Примечание. Здесь и далее: \* – отличия от контрольного уровня достоверны при  $p \leq 0,05$ . За 100 % принята длина 1-го листа ( $14,3 \pm 1,7$  см) у семидневных проростков пшеницы, находящихся при 22 °C.

Note. Here and further: \* – differences from control significant at level  $p \leq 0.05$ . For 100 % accepted the length of the 1st leaf ( $14,3 \pm 1,7$  cm) in seven-day wheat seedlings at 22 °C.

Таблица 3. Влияние высоких температур на суточный прирост 2-го листа пшеницы, % от контроля

Table 3. Effect of high temperatures on the daily increase of the 2nd leaf of wheat, % of control

Температура, °C Temperature, °C	Экспозиция, сут Exposition, d					
	0	1	2	3	4	5
22 (контроль) (control)	100	141	190	145	311	362
33	100	122*	163*	164*	176*	192*
37	100	111*	118*	142*	152*	166*
43	100	100	100	100	-	-

Примечание. За 100 % принята длина 2-го листа ( $7,1 \pm 1,9$  см) у семидневных проростков пшеницы, находящихся при 22 °C.

Note. For 100 % accepted the length of the 2nd leaf ( $7,1 \pm 1,9$  cm) in seven-day wheat seedlings at 22 °C.

Установлено также, что у растений, находящихся при температуре 33 и 37 °C, оводненность тканей листьев не отличается от таковой в контроле. В отличие от этого после суточного воздействия температуры 43 °C зарегистрировано существенное снижение оводненности листьев (табл. 4).

Показано, что проростки пшеницы реагировали на действие высоких температур повышением теплоустойчивости, подробная динамика которой представлена нами в предыдущей работе [Нилова, Титов, 2014]. В частности, при температуре 33 °C наблюдали небольшой рост теплоустойчивости клеток листьев, но только

Таблица 4. Влияние высоких температур на оводненность тканей листа растений пшеницы, в %  
 Table 4. Effect of high temperatures on water content of wheat leaf tissues, in %

Температура, °С Temperature, °C	Экспозиция, сут Exposition, d			
	0	1	2	3
33	90	90	89	91
37	90	88	88	88
43	90	84*	68*	60*

через 1 сут от начала прогрева. Ее максимальный уровень достигался через 2 сут эксперимента, и в дальнейшем он не изменялся. При переносе растений из оптимальных условий в условия температуры 37 °С уже через 1 ч наблюдали постепенный рост теплоустойчивости листьев, максимальный уровень которой зафиксирован через 1 сут прогрева, и он был существенно выше максимального значения, отмеченного при 33 °С. Под влиянием температуры 43 °С первоначально (15–30 мин) также был зафиксирован быстрый рост теплоустой-

чивости клеток листьев, но уже через 1 ч действия этой температуры происходило быстрое снижение устойчивости, а спустя 3 сут – гибель растений.

Уже через 15 мин от начала воздействия температур 33, 37 и 43 °С в клетках листьев проростков наблюдали статистически достоверное увеличение содержания транскриптов гена *HSP70*. Максимальный их уровень зафиксирован после часового действия указанных температур на растения. При более продолжительных высокотемпературных воздействиях отмечена тенденция к снижению мРНК *HSP70*.

Следует отметить, что содержание транскриптов гена *HSP70* при температурах 33 и 37 °С было примерно одинаковым, т. е. накопление транскриптов этого гена слабо зависело от абсолютного значения температуры (рис. 1), по крайней мере в пределах диапазона субповреждающих температур. Уровень экспрессии *HSP70* при температуре 43 °С был выше, чем при температурах 33 и 37 °С, только через 0,5, 1 и 6 ч от начала эксперимента и ниже – через 24 и 72 часа.

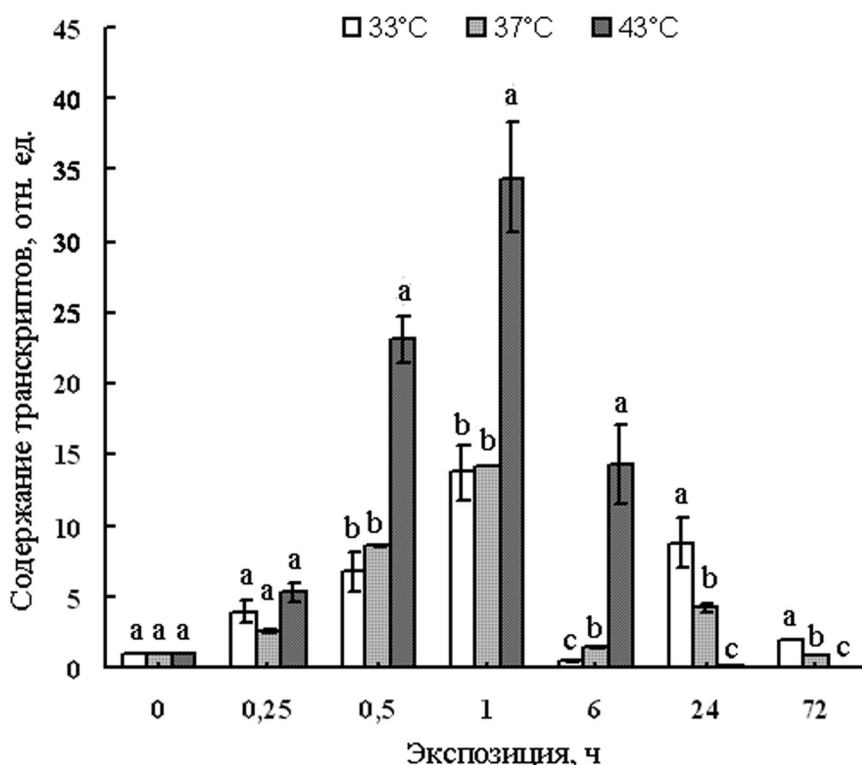


Рис. 1. Содержание транскриптов гена *HSP70* в листьях проростков пшеницы при действии температур 33, 37 и 43 °С

Здесь и далее: abc – различия между воздействиями в пределах каждой экспозиции

Fig. 1. The content of *HSP70* gene transcripts in leaves of wheat seedlings at temperatures of 33, 37 and 43 °C

Here and further: abc – the differences between the exposures within each exposure



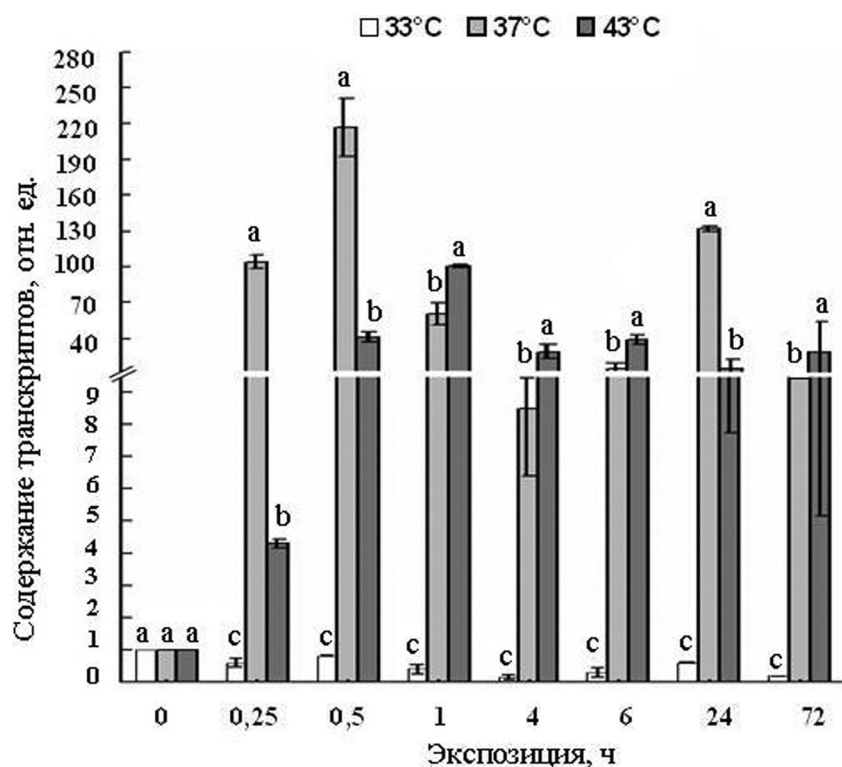


Рис. 2. Содержание транскриптов гена *BiP* в листьях проростков пшеницы при действии температур 33, 37 и 43 °С

Fig. 2. The content of *BiP* gene transcripts in leaves of wheat seedlings at temperatures of 33, 37 and 43 °С

У растений, подвергнутых действию температур 33, 37 и 43 °С, экспрессия генов *BiP* и *IRE1* зависела от абсолютного значения температуры. В клетках листьев растений, находящихся при температуре 33 °С, отмечено снижение уровня транскриптов гена *BiP* (рис. 2). Действие температуры 37 °С, напротив, способствовало быстрому (15 мин – 1 ч) многократному повышению содержания мРНК этого гена, причем отмечена двухфазная динамика содержания мРНК: повторное повышение уровня транскриптов этого гена зафиксировано через 1 сут воздействия температуры 37 °С. При температуре 43 °С также наблюдалось накопление мРНК гена *BiP*, при этом уровень экспрессии гена при температуре 43 °С через 0,25; 0,5 и 1 ч эксперимента был существенно ниже, а через 1, 4, 6 и 72 ч немного выше, чем при 37 °С.

При температуре 43 °С, так же как и при 33 °С, содержание мРНК гена *IRE1* в тканях листьев снижалось в первые 15 мин – 6 ч действия температуры, далее, через 24 и 72 ч, отмечено повышение уровня экспрессии этого гена примерно до уровня контроля (рис. 3). Под влиянием температуры 37 °С, напротив, происходило многократное повышение уровня экс-

прессии гена *IRE1* уже через 15 мин, которое через 1 ч сменялось его резким падением.

### Обсуждение

Результаты проведенных исследований выявили качественно разную реакцию проростков пшеницы на действие температур 33, 37 и 43 °С. У растений, подвергнутых действию температуры 33 °С, отмечено незначительное торможение роста и повышение теплоустойчивости, но не было зафиксировано изменение оводненности тканей листа. Такого рода изменения можно характеризовать как незначительные отклонения от обычных физиологических показателей, характерных для растений, выращиваемых в стандартных условиях. В литературе такого рода отклонения иногда называют «мягким» стрессом [Рихванов и др., 2014; Giri et al., 2017]. При действии температуры 37 °С зафиксировано значительное торможение роста листьев, более быстрое повышение теплоустойчивости растений, но, так же как и при 33 °С, не наблюдалось изменений в оводненности тканей листа. Ранее полученные нами данные показывают, что при температуре 37 °С в листьях увеличивается содержание

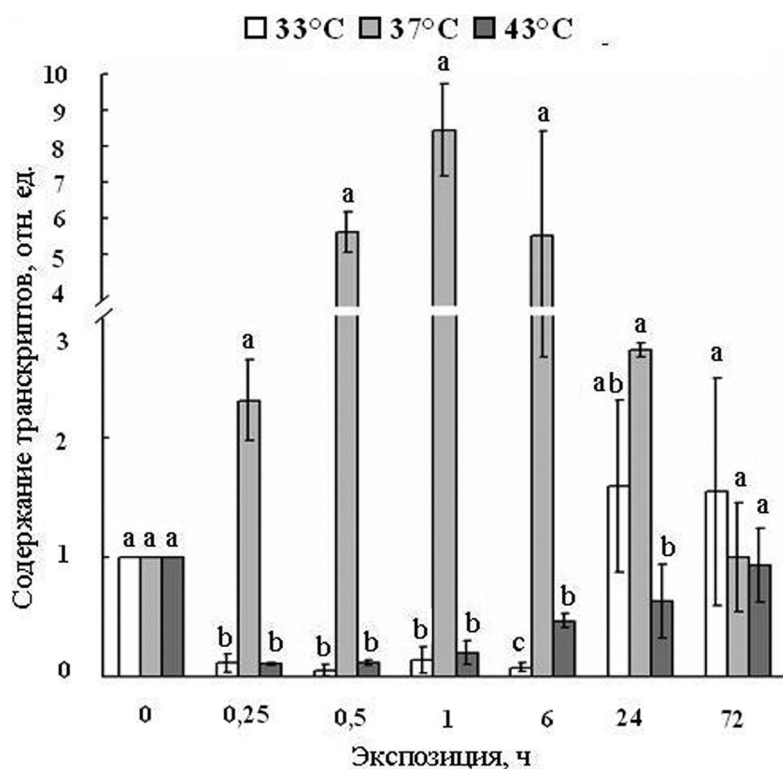


Рис. 3. Содержание транскриптов гена *IRE1* в листьях проростков пшеницы при действии температур 33, 37 и 43 °С

Fig. 3. The content of *IRE1* gene transcripts in leaves of wheat seedlings at temperatures of 33, 37 and 43 °C

продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (МДА) [Топчиева и др., 2017]. Это означает, что в данном случае в клетках происходит развитие окислительного стресса, а следовательно, наблюдаемые в растениях изменения при действии температуры 37 °С можно рассматривать как отражение определенных нарушений в метаболизме клеток, но с которыми растения успешно справляются. Тем не менее появление таких нарушений может свидетельствовать о развитии «среднего» по напряженности стресса [Giri et al., 2017]. Действие температуры 43 °С приводило к полной остановке роста листьев, снижению оводненности тканей листа, снижению теплоустойчивости и резкому накоплению МДА [Топчиева и др., 2017] и в конечном итоге к гибели растений. Это дает основание рассматривать указанные изменения как проявления «жесткого» стресса, который вызывает необратимые повреждения клеток [Рихванов и др., 2014; Giri et al., 2017].

Вполне очевидно, что физиологические изменения и/или нарушения в клетках растений, наблюдаемые при высокотемпературных воздействиях разной интенсивности, зависят от степени развития деструктивных процессов,

затрагивающих разные компартменты клеток, включая ЭР, а также от способности клетки справиться с этими процессами за счет активизации репарационной системы.

Среди цитоплазматических шаперонов, обеспечивающих контроль качества белков, прежде всего необходимо отметить HSP70. Рядом авторов на разных видах растений (пшеница, рис, шпинат, томат, *Arabidopsis thaliana* L.) показано, что экспрессия *HSP70* повышается уже в первые часы и даже минуты (5–60 мин) высокотемпературных воздействий (37–42 °С), максимум достигается через 30–120 мин, а в дальнейшем происходит снижение экспрессии этого гена и синтеза HSP70 [Li et al., 1999; Sung et al., 2001]. Кроме того, установлено, что экспрессия гена *HSP70* происходит не только под влиянием нагрева растений, но и при действии на растения других неблагоприятных факторов, таких как, например, низкие температуры, засуха, засоление [Sarkar et al., 2013; Jacob et al., 2017]. Поскольку HSP70 обладает широким спектром действия (от участия в упаковке и созревании других белковых молекул до транспорта необратимо поврежденных белков к местам их деградации), экспрессия гена *HSP70* и синтез HSP70 считается первичной,

неспецифической реакцией растений на различные неблагоприятные воздействия [Чиркова, 2002; Малышев, 2012]. В количественном отношении содержание мРНК этого гена при 33 °С было примерно равно их содержанию при 37 °С и ниже, чем при 43 °С. Это свидетельствует, что экспрессия цитоплазматического *HSP70* является не только неспецифической реакцией растений на разные виды неблагоприятных воздействий, но и не зависит явным образом от интенсивности высокотемпературного воздействия (по крайней мере в пределах диапазона субповреждающих температур).

Белок BiP, принадлежащий к семейству HSP с молекулярной массой 70 кДа, является наиболее распространенным шапероном в ЭР [Iwata, Koizumi, 2012]. В доступной нам литературе данные о содержании транскриптов этого гена и о синтезе белка BiP при действии высоких температур немногочисленны. Тем не менее известно, что увеличение содержания BiP коррелирует с устойчивостью растений *Arabidopsis thaliana* L. к ЭР-стрессу [Koizumi, 1996]. Показано, что основным индуктором экспрессии *BiP* являются белки с нарушенной структурой, которые появляются в полости ЭР вследствие усиления процессов синтеза белка при наступлении неблагоприятных условий или при прохождении растениями некоторых фаз развития [Carolino et al., 2003]. Молекулы BiP связываются с такими белками, предотвращают их агрегацию и передают на другие компоненты ЭР для рефолдинга или деградации [Wan, Jiang, 2016]. Существует предположение, что увеличение содержания белков с нарушенной структурой в ЭР, т. е. развитие так называемого ЭР-стресса, приводит к тому, что свободных молекул BiP становится недостаточно, и это является сигналом для синтеза дополнительного количества мРНК *BiP* [Leborgne-Castel et al., 1999]. Так, обработка растений табака (*Nicotiana tabacum* L., cv Havana) туникамицином – активатором UPR приводила к увеличению мРНК гена *BiP* и к накоплению белка BiP [Alvim et al., 2001]. Из этого следует, что повышение содержания транскриптов гена *BiP* можно считать одним из маркеров накопления белков с нарушенной структурой и, возможно, развития ЭР-стресса. Наши исследования показали, что при температуре 33 °С («мягком» стрессе) в листьях пшеницы не происходит накопления транскриптов гена *BiP*, следовательно, можно предположить, что развитие ЭР-стресса при этом также не происходит. Повышение интенсивности высокотемпературного воздействия до 37 °С («средний» стресс), напротив, приводит к усилению экспрессии этого гена. В данном случае это

может быть связано с быстрым повышением устойчивости растений и синтезом стрессовых белков *de novo* [Титов, 1989; Титов и др., 2006], что, в свою очередь, приводит к повышению нагрузки на белоксинтезирующий аппарат клетки и, как следствие, к накоплению белков с нарушенной структурой. Интересно, что действие температуры 43 °С («жесткий» стресс) также вызывает накопление транскриптов гена *BiP*, однако их уровень при этом ниже, чем при температуре 37 °С. Возможно, это связано с тем, что BiP, как и другие белки, относящиеся к группе HSP с молекулярной массой 70 кДа, чаще работают в комплексе с другими шаперонами, кошаперонами, ферментами и пр. [Малышев, 2012], поэтому экспрессия BiP может зависеть от содержания фермента IRE1 [Humbert et al., 2012]. BiP совместно с ферментом IRE1 являются важной составляющей системы контроля качества белка в ЭР. BiP, связываясь с белками с нарушенной структурой, отсоединяется от IRE1, после чего IRE1 изменяет свою конформацию и участвует в альтернативном сплайсинге транскрипционного фактора bZIP60. Этот транскрипционный фактор переходит в активное состояние, поступает в ядро клетки и активирует экспрессию генов, кодирующих стрессовые белки, в том числе и BiP [Liu, Howell, 2010; Zhang et al., 2015]. Отметим, что при температуре 43 °С экспрессия гена *IRE1* резко снижается. Таким образом, при этой температуре происходит накопление белков с нарушенной структурой, о чем свидетельствует накопление транскриптов гена *BiP*, однако из-за снижения уровня экспрессии гена, кодирующего фермент IRE1, система контроля качества белка не может в этом случае работать полноценно. Температура 37 °С, напротив, приводит к резкому накоплению транскриптов гена *IRE1*. В доступной нам литературе нет сведений о накоплении транскриптов гена *IRE1* или белка IRE1 при высоких температурных воздействиях разной интенсивности. Однако известно, что у *Arabidopsis thaliana* L. при действии высокой температуры *IRE1* участвует в альтернативном сплайсинге транскрипционного фактора bZIP60, т. е. в формировании его активной формы [Chen, Brandizzi, 2013; Zhang et al., 2015; Nawkar et al., 2018], которая необходима для активации экспрессии гена *BiP3* [Deng et al., 2011].

## Заключение

Проведенные исследования показали, что при температуре 37 °С, вызывающей небольшие отклонения и/или нарушения (условно «средний» стресс) в процессах жизнедеятель-



ности растений пшеницы, формируется максимальный уровень теплоустойчивости клеток листьев и наблюдается максимальный уровень экспрессии генов *BiP* и *IRE1*, кодирующих белки ответа на ЭР-стресс. При температурах, вызывающих у растений только минимальные отклонения (33 °С – «мягкий» стресс) или, наоборот, приводящих к повреждению (43 °С – «жесткий» стресс) и даже гибели растений, прирост теплоустойчивости значительно меньше (или он становится отрицательным) и наблюдается относительно небольшое накопление транскриптов генов, ответственных за синтез белков ответа на ЭР-стресс. При этом экспрессия гена *HSP70* почти не зависит от абсолютного значения действующей температуры, по крайней мере в пределах диапазона субповреждающих температур. Таким образом, исходя из полученных данных можно сделать вывод, что существенный вклад в развитие теплоустойчивости растений пшеницы под влиянием повышенных температур вносит активация экспрессии генов *HSP70*, *BiP* и *IRE1*, что, по-видимому, приводит к увеличению содержания кодируемых ими белков, участвующих в сохранении функциональной активности других белков и снижении уровня ЭР-стресса.

*Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0221-2017-0051).*

## Литература

Малышев И. Ю. Стресс-белки в физиологии и медицине. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 176 с.

Нилова И. А., Титов А. Ф. Динамика теплоустойчивости проростков пшеницы в зависимости от интенсивности высокотемпературного воздействия // Труды КарНЦ РАН. 2014. № 5. С. 214–217.

Рихванов Е. Г., Федосеева И. В., Пятрикас Д. В., Боровский Г. Б., Войников В. К. Механизм функционирования кальциевой сигнальной системы у растений при действии теплового стресса. Роль митохондрий в этом процессе // Физиология растений. 2014. Т. 61, № 2. С. 155–169. doi: 10.7868/S0015330314020134

Титов А. Ф. Устойчивость активно вегетирующих растений к низким и высоким температурам: закономерности варьирования и механизмы: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 1989. 42 с.

Титов А. Ф., Акимова Т. В., Таланова В. В., Топчиева Л. В. Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. М.: Наука, 2006. 143 с.

Топчиева Л. В., Нилова И. А., Титов А. Ф. Динамика содержания транскриптов генов проапопто-

тических белков в листьях растений пшеницы при действии высоких неблагоприятных температур // ДАН. 2017. Т. 472, № 1. С. 102–105. doi: 10.7868/S086956521701025X

Чиркова Т. В. Физиологические основы устойчивости растений. СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 2002. 244 с.

Alvim F. C., Carolina S. M. B., Cascardo J. C. M., Nunes C. C., Martinez C. A., Otoni W. C., Fontes E. P. B. Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress // Plant Physiol. 2001. Vol. 126, no. 3. P. 1042–1054.

Carolino S. M. B., Vaez J. R., Irsigler A. S. T., Valente M. A. S., Rodrigues L. A. Z., Fontes E. P. B. Plant BiP gene family: differential expression, stress induction and protective role against physiological stress // Braz. J. Plant Physiol. 2003. Vol. 15, no. 2. P. 59–66.

Chen Y., Brandizzi F. IRE1: ER stress sensor and cell fate executor // Trends Cell Biol. 2013. Vol. 23, no. 11. P. 547–555. doi: 10.1016/j.tcb.2013.06.005

Deng Y., Humbert S., Liu J. X., Srivastava R., Rothstein S. J., Howell S. H. Heat induces the splicing by IRE1 of a mRNA encoding a transcription factor involved in the unfolded protein response in Arabidopsis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. Vol. 108, no. 17. P. 7247–7252. doi: 10.1073/pnas.1102117108

Fanata W. I. D., Lee S. Y., Lee K. O. The unfolded protein response in plants: A fundamental adaptive cellular response to internal and external stresses // J. Proteomics. 2013. Vol. 93. P. 356–368. doi: 10.1016/j.jprot.2013.04.023

Giri A., Heckathorn S., Mishra S., Krause Ch. Heat stress decreases levels of nutrient-uptake and – assimilation protein in tomato roots // J. Plants. 2017. Vol. 6(1): 6. doi: 10.3390/plants6010006

Humbert S., Zhong S., Deng Y., Howell S. H., Rothstein S. J. Alternation of the bZIP60/IRE1 pathway affects plant response to ER stress in *Arabidopsis thaliana* // PLoS One. 2012. Vol. 7, no. 6. e39023. doi: 10.1371/journal.pone.0039023

Iwata Y., Koizumi N. Plant transducer of the endoplasmic reticulum unfolded protein response // Trends Plant Sci. 2012. Vol. 17, no. 12. P. 720–727. doi: 10.1016/j.tplants.2012.06.014

Jacob P., Hirt H., Bendahmane A. The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance // Plant Biotechnol. J. 2017. Vol. 15, no. 4. P. 405–414. doi: 10.1111/pbi.12659

Koizumi N. Isolation and responses to stress of a gene that encodes a luminal binding protein in *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell Physiol. 1996. Vol. 11, no. 6. P. 865–865.

Leborgne-Castel N., Jelitto-Van Dooren E. P. W. M., Crofts A. J., Denecke J. Overexpression of BiP in Tobacco alleviates endoplasmic reticulum stress // Plant Cell. 1999. Vol. 11. P. 459–469.

Li Q.-B., Haskell D. W., Guy Ch. L. Coordinate and non-coordinate expression of the stress 70 family and other molecular chaperones at high and low temperature in spinach and tomato // J. Plant. Mol. Biol. 1999. Vol. 39. P. 21–34.

Liu J.-X., Howell S. H. Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental

stress responses in plants // *Plant Cell*. 2010. Vol. 22. P. 2930–2942. doi: 10.1105/tpc.110.078154

Liu J.-X., Srivastava R., Che P., Howell S. H. An endoplasmic reticulum stress response in *Arabidopsis* is mediated by proteolytic processing and nuclear relocation of a membrane-associated transcription factor, bZIP28 // *Plant Cell*. 2007b. Vol. 19, no. 12. P. 4111–4119. doi: 10.1105/tpc.106.050021

Liu J.-X., Srivastava R., Che P., Howell S. H. Salt stress responses in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling // *The Plant Journal*. 2007a. Vol. 51. P. 897–909. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03195.x

Mittler R., Finka A., Goloubinoff P. How do plants feel the heat? // *Trends in Biochemical Science*. 2012. Vol. 37, no. 3. P. 118–125. doi: 10.1016/j.tibs.2011.11.007

Nawkar G. M., Lee E. S., Shelake R. M., Park J. H., Ryu S. W., Kang Ch. H., Lee S. Y. Activation of the transducer of unfolded protein response in plants // *Front Plant Sci*. 2018. Vol. 9. doi: 10.3389/fpls.2018.00214

Pu Y., Bassham D. C. Links between ER stress and autophagy in plants // *Plant Signal Behav*. 2013. Vol. 8, no. 6. e24297. doi: 10.4161/psb.24297

Sarkar N. K., Kundnani P., Grover A. Functional analysis of Hsp70 superfamily proteins of rice (*Oryza sativa*) // *Cell stress and Chaperones*. 2013. Vol. 18. P. 427–437. doi: 10.1007/s12192-012-0395-6

Sung D. Y., Vierling E., Guy Ch. L. Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* Hsp70 gene family // *J. Plant Physiol*. 2001. Vol. 126. P. 789–800.

Tyedmers J., Mogk A., Bukau B. Cellular strategies for controlling protein aggregation // *J. Mol. Cell Biol*. 2010. Vol. 11. P. 777–788. doi: 10.1038/nrm2993

Wan Sh., Jiang L. Endoplasmic reticulum (ER) stress and the unfolded protein response (UPR) in plants // *Protoplasma*. 2016. Vol. 253. P. 753–764. doi: 10.1007/s00709-015-0842-1

Zhang L., Chen H., Brandizzi F., Verchot J., Wang A. The UPR branch IRE1-bZIP60 in plants plays an essential role in viral infection and is complementary to the only UPR pathway in yeast // *PLoS Genet*. 2015. Vol. 11, no. 4. e1005164. doi: 10.1371/journal.pgen.1005164

Поступила в редакцию 29.04.2018

## References

Chirkova T. V. Fiziologicheskie osnovy ustoichivosti rastenii [Physiological basis of plant resistance]. St. Petersburg: SPb. un., 2002. 244 p.

Malyshev I. Yu. Stress-belki v fiziologii i meditsine [Stress proteins in physiology and medicine]. Moscow: Genotar-Media, 2012. 176 p.

Nilova I. A., Titov A. F. Dinamika teploustoichivosti prorostkov pshenitsy v zavisimosti ot intensivnosti vysokotemperaturnogo vozdeistviya [The dynamics of thermotolerance in wheat plants depending on the intensity of high temperature influence]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2014. No. 5. P. 214–217.

Rikhvanov E. G., Fedoseeva I. V., Pyatrikas D. V., Borovskii G. B., Voinikov V. K. Mekhanizm funktsionirovaniya kal'tsiovoi signal'noi sistemy u rastenii pri deistvii teplovogo stressa. Rol' mitokhondrii v etom protsesse [Role of mitochondria in the operation of calcium signaling system in heat-stressed plants]. *Fiziol. Rast.* [Russ. J. Plant Physiol.]. 2014. Vol. 61, no. 2. P. 155–169. doi: 10.7868/S0015330314020134

Titov A. F. Ustoichivost' aktivno vegetiruyushchikh rastenii k nizkim i vysokim temperaturam: zakonomenosti var'irovaniya i mekhanizmy [Resistance of actively vegetating plants to low and high temperatures: variation patterns and mechanisms]: Summary of PhD (Dr. of Biol.) thesis. Moscow, 1989. 42 p.

Titov A. F., Akimova T. V., Talanova V. V., Topchieva L. V. Ustoichivost' rastenii v nachal'nyi period deistviya neblagopriyatnykh temperatur [Plant resistance in the initial period of unfavourable temperatures effects]. Moscow: Nauka, 2006. 143 p.

Alvim F. C., Carolina S. M. B., Cascardo J. C. M., Nunes C. C., Martinez C. A., Otoni W. C., Fontes E. P. B. Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiol*. 2001. Vol. 126, no. 3. P. 1042–1054.

Carolino S. M. B., Vaez J. R., Irsigler A. S. T., Valente M. A. S., Rodrigues L. A. Z., Fontes E. P. B. Plant BiP gene family: differential expression, stress induction and protective role against physiological stress. *Braz. J. Plant Physiol*. 2003. Vol. 15, no. 2. P. 59–66.

Chen Y., Brandizzi F. IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. *Trends Cell Biol*. 2013. Vol. 23, no. 11. P. 547–555. doi: 10.1016/j.tcb.2013.06.005

Deng Y., Humbert S., Liu J. X., Srivastava R., Rothstein S. J., Howell S. H. Heat induces the splicing by IRE1 of a mRNA encoding a transcription factor involved in the unfolded protein response in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. Vol. 108, no. 17. P. 7247–7252. doi: 10.1073/pnas.1102117108

Fanata W. I. D., Lee S. Y., Lee K. O. The unfolded protein response in plants: A fundamental adaptive cellular response to internal and external stresses. *J. Proteomics*. 2013. Vol. 93. P. 356–368. doi: 10.1016/j.jprot.2013.04.023

Giri A., Heckathorn S., Mishra S., Krause Ch. Heat stress decreases levels of nutrient-uptake and – assimilation protein in tomato roots. *Plants*. 2017. Vol. 6(1): 6. doi: 10.3390/plants6010006

Humbert S., Zhong S., Deng Y., Howell S. H., Rothstein S. J. Alternation of the bZIP60/IRE1 pathway affects plant response to ER stress in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*. 2012. Vol. 7, no. 6. e39023. doi: 10.1371/journal.pone.0039023

Iwata Y., Koizumi N. Plant transducer of the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Trends Plant Sci*. 2012. Vol. 17, no. 12. P. 720–727. doi: 10.1016/j.tplants.2012.06.014

Jacob P., Hirt H., Bendahmane A. The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. *Plant Biotechnol. J*. 2017. Vol. 15, no. 4. P. 405–414. doi: 10.1111/pbi.12659

Koizumi N. Isolation and responses to stress of a gene that encodes a luminal binding protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 1996. Vol. 11, no. 6. P. 865–865.

Leborgne-Castel N., Jelitto-Van Dooren E. P. W. M., Crofts A. J., Denecke J. Overexpression of BiP in Tobacco alleviates endoplasmic reticulum stress. *Plant Cell.* 1999. Vol. 11. P. 459–469.

Li Q.-B., Haskell D. W., Guy Ch. L. Coordinate and non-coordinate expression of the stress 70 family and other molecular chaperones at high and low temperature in spinach and tomato. *J. Plant. Mol. Biol.* 1999. Vol. 39. P. 21–34.

Liu J.-X., Howell S. H. Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants. *Plant Cell.* 2010. Vol. 22. P. 2930–2942. doi: 10.1105/tpc.110.078154

Liu J.-X., Srivastava R., Che P., Howell S. H. An endoplasmic reticulum stress response in *Arabidopsis* is mediated by proteolytic processing and nuclear relocation of a membrane-associated transcription factor, bZIP28. *Plant Cell.* 2007a. Vol. 19, no. 12. P. 4111–4119. doi: 10.1105/tpc.106.050021

Liu J.-X., Srivastava R., Che P., Howell S. H. Salt stress responses in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. *The Plant Journal.* 2007b. Vol. 51. P. 897–909. doi: 10.1111/j.1365-3113.2007.03195.x

Mittler R., Finka An., Goloubinoff P. How do plants feel the heat? *Trends in Biochemical Science.* 2012. Vol. 37, no. 3. P. 118–125. doi: 10.1016/j.tibs.2011.11.007

Nawkar G. M., Lee E. S., Shelake R. M., Park J. H., Ryu S. W., Kang Ch. H., Lee S. Y. Activation of the trans-

ducer of unfolded protein response in plants. *Front Plant Sci.* 2018. Vol. 9. doi: 10.3389/fpls.2018.00214.

Pu Y., Bassham D. C. Links between ER stress and autophagy in plants. *Plant Signal Behav.* 2013. Vol. 8, no. 6. e24297. doi: 10.4161/psb.24297

Sarkar N. K., Kundnani P., Grover A. Functional analysis of Hsp70 superfamily proteins of rice (*Oryza sativa*). *Cell stress and Chaperones.* 2013. Vol. 18. P. 427–437. doi: 10.1007/s12192-012-0395-6

Sung D. Y., Vierling E., Guy Ch. L. Comprehensive expression profile analysis of the Arabidopsis Hsp70 gene family. *J. Plant Physiol.* 2001. Vol. 126. P. 789–800

Topchieva L. V., Nilova I. A., Titov A. F. The level of proapoptotic gene transcripts in wheat leaves under high temperature stress. *Doklady Akademii Nauk [Doklady Biochemistry and Biophysics]*. 2017. Vol. 472, no. 1. P. 5–8. doi: 10.1134/S1607672917010021

Tyedmers J., Mogk A., Bukau B. Cellular strategies for controlling protein aggregation. *J. Mol. Cell Biol.* 2010. Vol. 11. P. 777–788. doi: 10.1038/nrm2993

Wan Sh., Jiang L. Endoplasmic reticulum (ER) stress and the unfolded protein response (UPR) in plants. *Protoplasma.* 2016. Vol. 253. P. 753–764. doi: 10.1007/s00709-015-0842-1

Zhang L., Chen H., Brandizzi F., Verchot J., Wang A. The UPR branch IRE1-bZIP60 in plants plays an essential role in viral infection and is complementary to the only UPR pathway in yeast. *PLoS Genet.* 2015. Vol. 11, no. 4. e1005164. doi: 10.1371/journal.pgen.1005164

Received April 29, 2018

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

### Нилова Ирина Александровна

младший научный сотрудник  
Институт биологии КарНЦ РАН,  
Федеральный исследовательский центр  
«Карельский научный центр РАН»  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: im-ira@mail.ru  
тел.: (8142) 762712

### Титов Александр Федорович

главный научный сотрудник отдела комплексных  
научных исследований КарНЦ РАН, руководитель лаб.  
экологической физиологии растений, чл.-корр. РАН,  
д. б. н., проф.  
Институт биологии КарНЦ РАН,  
Федеральный исследовательский центр  
«Карельский научный центр РАН»  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: titov@krc.karelia.ru

### Топчиева Людмила Владимировна

ведущий научный сотрудник, к. б. н.  
Институт биологии КарНЦ РАН,  
Федеральный исследовательский центр  
«Карельский научный центр РАН»  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: topchieva67@mail.ru  
тел.: (8142) 573107

## CONTRIBUTORS:

### Nilova, Irina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,  
Russian Academy of Sciences  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: im-ira@mail.ru  
tel.: (8142) 762712

### Titov, Alexander

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian  
Academy of Sciences  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: titov@krc.karelia.ru

### Topchieva, Lyudmila

Institute of Biology, Karelian Research Centre,  
Russian Academy of Sciences  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: topchieva67@mail.ru  
tel.: (8142) 573107