

Торговый центр «Модуль» в Молодечно был оценен респондентами в $2,56 \pm 0,14$ балла. При анализе визуального объекта специализированным программным обеспечением были получены следующие результаты: агрессивное поле, создаваемое большим количеством окон, составляет 28,4%; визуальный шум, создаваемый чрезмерным количеством вывесок, составляет 16,1%; комфортная среда создана зелеными насаждениями и составляет 1,7%.

Постройки начала 20-го века в Столбцах, согласно анкетированию, были оценены в $2,4 \pm 0,12$ балла. Данный визуальный объект характеризуется преобладанием гомогенного поля (27,7%) и агрессивного поля (11,6%).

Микрорайон Каменная Горка в Минске был оценен респондентами в $2,14 \pm 0,12$ балла. Индекс агрессивности составил 65% за счет огромного количества одинаковых объектов – окон. Также данный микрорайон характеризуется наличием гомогенных полей: стен, которые представляют собой плоскости, выкрашенные в белый цвет (4,1%).

Таким образом, анализ визуальных объектов посредством специализированного программного обеспечения «ЭкоВид-2020» показал, что объекты с наибольшей оценкой, полученной в ходе анкетирования, имеют высокий индекс комфортности, за счет зеленых насаждений, близкой к естественной среде вида, разнообразной фактуры и использования различных строительных материалов.

Объекты, получившие наименьшей оценки от респондентов, имеют низкий уровень комфортности. У таких объектов присутствует визуальный шум, а также высокие показатели агрессивного и гомогенного поля.

ЛИТЕРАТУРА

1. Филин, В. А. Автоматия саккад / В.А. Филин – Москва: МГУ, 2002. – 240 с.
2. Гартман, Н. Эстетика = Ästhetik / Н. Гартман. 2-е издание. – Киев: Ника-Центр, 2004. – 640 с.
3. Флэнаган, Д. JavaScript. Карманный справочник. Сделайте веб-страницы интерактивными! / Д. Флэнаган // Перевод А.Г. Сысонука. – Москва.: Издательский дом «Вильямс», 2015. – 320 с.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЗАСУХИ НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ СТРЕСС-АССОЦИИРОВАННЫЕ БЕЛКИ ЯБЛОНИ

IMPACT OF DROUGHT STRESS ON STRESS-ASSOCIATED PROTEINS APPLE GENES EXPRESSION LEVEL

Е. С. Королева, П. В. Кузмицкая, О. Ю. Урбанович

E. S. Koroleva, P. V. Kuzmitskaya, O. Yu. Urbanovich

*Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси,
г. Минск, Республика Беларусь
e.koroleva@igc.by*

*Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus*

Стресс-ассоциированные белки (SAP) у многих растений участвуют в ответе на воздействие неблагоприятных факторов биотической и абиотической природы. С целью изучения изменения уровня экспрессии генов, кодирующих SAP, у яблони, подвоя ММ-106 были подвергнуты воздействию засухи в течение 24 ч. В ходе реакции количественной ПЦР (qPCR) установили профили экспрессии 14 исследуемых генов, кодирующих SAP, среди которых можно выделить ряд активно экспрессируемых в заданных условиях. Для 9 генов из 14, кодирующих SAP, показано максимальное накопление транскрипта к 4 часу воздействия засухи.

Stress-associated proteins (SAP) in many plants are involved in the response to adverse factors of biotic and abiotic nature. In order to study changes in the expression level of SAP genes in apple trees, MM-106 rootstocks were exposed to drought for 24 h. Expression profiles of 14 studied genes encoding SAP were established during the quantitative PCR reaction (qPCR), among which were revealed of actively expressed under specified conditions. The majority of SAP genes have maximum transcript accumulation by 4 hours of exposure to drought.

Ключевые слова: яблони, стресс, стресс-ассоциированные белки, qPCR, засуха.

Keywords: apple trees, stress, stress-associated proteins, RT-PCR, drought.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2021-1-268-271>

Введение

Растения на протяжении своего роста и развития могут быть подвержены воздействию неблагоприятных абиотических стрессовых факторов, таких как засуха, засоление, экстремальные температуры, механическое повреждение. В ответ на их воздействие растения выработали ряд сложных молекулярных механизмов, которые

регулируют уровни транскрипции отдельных генов, связанных со стрессом. Одними из транскрипционных факторов, которые участвуют в опосредованной регуляции развития стрессовых реакций у растений, являются SAP.

Яблоня является широко культивируемой плодовой культурой во всем мире. Воздействие неблагоприятных факторов среды, в частности засухи, приводит к замедлению роста, продуктивности и падению урожайности данной культуры. Исследование уровней экспрессии генов позволяет показать их вклад в формирование стрессового ответа у растений на действие неблагоприятных факторов. В данном исследовании мы изучали изменение уровня экспрессии генов, кодирующих SAP, в ответ на воздействие засухи на подвой яблони с помощью qPCR.

Материалы и методы

В исследовании использовали клоновые подвои яблони сорта MM-106. Данный сорт отличается средней морозоустойчивостью и низкой устойчивостью к засухе. Подвои были выращены в условиях длинного светового дня 16ч / 8ч (день/ночь) при температуре 22°C. Для изучения влияния засухи на изменение уровня экспрессии генов, кодирующих SAP, растения были поделены на 2 группы: 1 – подвергли воздействию засухи, путем извлечения корневой системы из субстрата и помещения корней на фильтровальную бумагу на 24 часа, 2 – контрольная группа (находится в прежних условиях).

В каждой группе было по три дерева. Отбор листьев осуществляли в начальный момент, через 2, 4 и 24 часа. Отобранные листья незамедлительно были заморожены в жидком азоте.

Выделение РНК из замороженных листьев проводили с использованием СТАВ (цетил-триметил-аммоний-бромид) метода [1]. Качество выделенной РНК определяли с помощью электрофореза в агарозном геле. Концентрацию полученной РНК измеряли с помощью прибора NanoDrop (ND-8000 Spectrophotometer, ThermoScientific, EU). Очистку РНК от ДНК осуществляли реактивом DNase I, RNase-free (ThermoScientific, EU) в соответствии с протоколом. Построение минус цепи кДНК было проведено с помощью Rever tAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific, EU) в соответствии с протоколом.

Ранее в исследовании [2] [2]нами были определены гены, кодирующие SAP, к которым в дальнейшем сконструировали праймеры для постановки qPCR: *MdSAP1*, *MdSAP2*, *MdSAP3*, *MdSAP4*, *MdSAP6*, *MdSAP8*, *MdSAP11*, *MdSAP12*, *MdSAP16*, *MdSAP17*, *MdSAP18*, *MdSAP19*, *MdSAP20*, *MdSAP21*. Классификация генов представлена согласно [2][2]. Разработку праймеров для постановки qPCR проводили, учитывая не только требования к их последовательности, но и филогенетические связи генов, кодирующих SAP, к которым они должны быть комплиментарны, чтобы оценить изменение уровня экспрессии в парах генов-гомологов. Эффективность представленных праймеров была оценена по реакции qPCR на матрице кДНК яблони сорта MM-106, результаты которой показали, что эффективность каждой пары праймеров входит в диапазон допустимых значений 90–110% [3]. По вышеприведенной реакции была оценена специфичность каждой пары праймеров, график кривых плавления показал наличие одного острого пика, что гарантирует амплификацию уникального фрагмента кДНК. Реакцию амплификации проводили с помощью прибора CFX96 RealTimeSystem (Bio-Rad, USA). Конечный объем реакционной смеси составил 20 мкл, в состав которой входил qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) – 4мкл, праймеры F и R – 1 мкл (5 pmol/мкл), 2 мкл кДНК, 12 мкл стерильной деионизированной воды. Программа амплификации: предварительная денатурация 95°C – 5 минут, затем 38 циклов 95°C – 20 сек, 58°C – 20 сек, 72°C – 20 сек. На каждом цикле происходило считывание флуоресценции красителя SYBR-green. В качестве внутреннего контроля был выбран фактор элонгации *Ef-1a*. В качестве отрицательного контроля вместо кДНК использовали равное количество деионизированной воды. Для анализа экспрессии генов, кодирующих SAP, в ответ на действие абиотических стрессовых факторов было использовано по три биологических повтора в каждом из экспериментальных условий. Подсчет относительного уровня экспрессии исследуемых генов осуществляли по методу $2^{-(\Delta\Delta CT)}$, где $\Delta\Delta Cq = (Cq_{\text{gene of interest}} - Cq_{\text{internal control}})_{\text{treatment}} - (Cq_{\text{gene of interest}} - Cq_{\text{internal control}})_{\text{control}}$ [4][4].

Результаты и их обсуждение

Ранее в исследовании [2] [2]нами была проведена полногеномная идентификация генов, кодирующих SAP, в результате которой было установлено наличие 21 гена в геноме *Malus domestica*, у 12 из которых было обнаружено наличие структуры доменов типа цинковых пальцев A20-AN1. Кроме того результаты анализа последовательностей, которые располагаются перед первым кодоном генов, кодирующих SAP, показали возможность участия транскрипционных факторов во множестве биологических процессов: регуляции стадий жизненного цикла (WRKY, TCP, GATA, SBP), гормональной регуляции (EIN3, AP2, SBP, MYB), изменении освещения (MYB, bZIP, bHLH)[2].

Для оценки изменения уровня экспрессии исследуемых генов в условиях действия засухи, корни растений были извлечены из земли и помещены на фильтровальную бумагу. Отбор проб (листьев) проводили на 0-м, 2-м, 4-м и 24-м часах воздействия засухи. Профили экспрессии генов представлены на рисунке 1.

Уровень экспрессии для большинства исследуемых генов, кодирующих SAP, увеличивается ко второму часу воздействия засухи. Наиболее значительное увеличение экспрессии наблюдалось у генов *MdSAP12*, *MdSAP1*, *MdSAP19*, *MdSAP4*, которое превысило в 18,5; 8,7; 6,1; 3,1 раза соответственно значение уровня экспрессии этих генов по сравнению с началом воздействия. У генов *MdSAP3* и *MdSAP20* уровень экспрессии снизился в 3,06 раза и в 1,18 раза соответственно по сравнению с началом воздействия. У генов *MdSAP16* и *MdSAP17* уровень экспрессии не изменялся.

На 4-м часу воздействия засухи можно отметить характерную особенность для большинства исследуемых генов: достижение максимального уровня экспрессии. Для генов *MdSAP21*, *MdSAP19*, *MdSAP6*, *MdSAP4*,

MdSAP12, *MdSAP2*, *MdSAP20* он увеличился, соответственно, в 3,74; 3,76; 12,04; 9,38; 6,05; 1,93; 1,92 раза по сравнению с референсным геном *Efl-α*.

На 24-м часу воздействия засухи для большинства исследуемых генов, кодирующих SAP, была отмечена тенденция снижения уровня экспрессии, кроме, *MdSAP3*, для которого наблюдалось снижение уровня экспрессии ко 2 и 4 часам, а к 24 часу его уровень увеличился в 2,62 раза относительно начала эксперимента.

Таким образом, по приведенным результатам можно сделать вывод о наличии тенденции скачкообразного увеличения экспрессии к 4-му часу для *MdSAP4* (в 12,35 раза), *MdSAP6* (в 16,53 раза), *MdSAP12* (в 37,8 раза), *MdSAP19* (в 37,6 раза), *MdSAP1* (в 12 раз) относительно начала эксперимента, а также постепенного увеличения для *MdSAP21* (в 3,85 раза), *MdSAP16* (в 3,9 раза) относительно начала эксперимента, незначительного изменения для *MdSAP17* (в 1,04 раза), *MdSAP20* (в 1,18 раза), *MdSAP8* (в 1,05 раза), *MdSAP2* (в 1,7 раза) относительно начала эксперимента и полное отсутствие экспрессии *MdSAP18* в условиях действия засухи и при нормальных условиях.

Чтобы изучить влияние степени идентичности нуклеотидных последовательностей на профиль экспрессии генов, кодирующих SAP, в условиях действия засухи, нами были разработаны праймеры с учетом гомологии изучаемых последовательностей. Так, из 14 исследуемых генов было сформировано 7 пар генов – гомологов: *MdSAP1* – *MdSAP8*, *MdSAP2* – *MdSAP3*, *MdSAP4* – *MdSAP6*, *MdSAP11* – *MdSAP12*, *MdSAP16* – *MdSAP17*, *MdSAP18* – *MdSAP19*, *MdSAP20* – *MdSAP21*. Значительное увлечение экспрессии наблюдается для обоих генов в паре *MdSAP4* – *MdSAP6* с максимальным уровнем экспрессии на 4-м часу воздействия засухи, с последующим его снижением к 24-му часу, однако уровень их экспрессии на 24-м часу воздействия оставался выше относительно начала эксперимента. В паре *MdSAP1* – *MdSAP8* уровень экспрессии *MdSAP1* значительно изменялся на всем протяжении воздействия засухи с общей тенденцией достижения максимального уровня экспрессии к 4-му часу воздействия, с последующим уменьшением относительно *MdSAP8*.

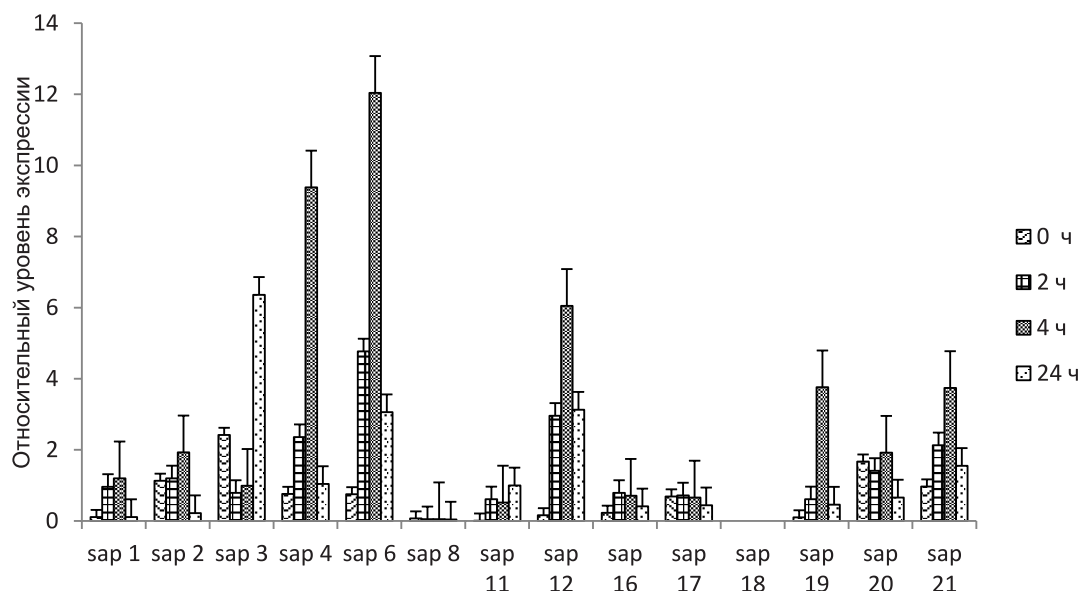


Рис. 1 – Профиль экспрессии генов, кодирующих SAP, в условии действия засухи на подвое яблони сорта ММ-106 на протяжении 0 ч, 2 ч, 4 ч, 24 ч. Данные были нормализованы относительно гена домашнего хозяйства яблони *Efl-α*. Вертикальные полосы отображают стандартную ошибку среднего. Уровень значимости составляет $\alpha=0.05$

В паре *MdSAP2* – *MdSAP3* для *MdSAP2* значительное увеличение уровня экспрессии относительно начала эксперимента не наблюдается, однако можно отметить резкое снижение уровня экспрессии к 24-му часу. Для *MdSAP3* наблюдается нехарактерная для других генов тенденция: снижение уровня экспрессии к 2-му и 4-му часу с последующим резким увеличением и достижением максимума к 24-му часу воздействия засухи. В паре *MdSAP11* – *MdSAP12* экспрессия *MdSAP11* ко 2-му часу воздействия увеличилась в 6 раз, а к 24-му часу в 100 раз относительно начала эксперимента, у *MdSAP12* максимальный уровень экспрессии был отмечен на 4-м часу воздействия засухи и так же характеризуется резким скачкообразным изменением уровня экспрессии. В паре *MdSAP16* – *MdSAP17* уровень экспрессии обоих генов мало изменяется на всем протяжении воздействия. В паре *MdSAP18* – *MdSAP19* уровень экспрессии *MdSAP19* характеризуется резким увеличением и достижением максимума к 4-му часу воздействия засухи, а *MdSAP18* не был экспрессирован в данных условиях. В паре *MdSAP20* – *MdSAP21* уровень экспрессии первого гена незначительно изменялся на 2-м и 4-м часу воздействия, однако отличился резким снижением к 24-му часу, в то время как для *MdSAP21* характерно более значительное повышение уровня экспрессии. Таким образом, можно сделать вывод об отсутствии прямой зависимости между характером экспрессии генов, кодирующих стресс-ассоциированные белки у яблони, и степенью идентичности их нуклеотидных последовательностей в условиях действия засухи.

Изучение роли стресс-ассоциированных белков в реакциях ответа на воздействие стрессовых факторов, в частности засухи, у яблони является актуальным вопросом. Dong et al. 2018 [5] в своей работе проводили изучение

влияния условий засухи на изменение уровня экспрессии стресс-ассоциированных белков у *Malus domestica* сорта Golden Delicious, приостановив полив растений до 8 дней, отбор листьев осуществляли на 0, 4-й и 8-й день. По результатам эксперимента было отмечено три активно экспрессируемых гена в условиях приостановки полива в течение 8 дней со значениями в диапазоне от 2,2 до 5,5. В проведенном нами эксперименте в качестве объекта исследования были выбраны подвой яблони сорта ММ-106, условия потери влаги моделировали путем размещения корневой системы растения на фильтровальной бумаге в течение 24 часов. По результатам проведенного нами эксперимента можно выделить 5 активно экспрессируемых генов в течение 24 часов в условиях потери влаги подвоем ММ-106, значения уровня экспрессии которых находятся в диапазоне от 3,74 до 12,04.

Таким образом, по приведенным результатам можно сделать вывод о наличии большего количества генов, кодирующих SAP, со значительным уровнем экспрессии в эксперименте, проводимом на подвое яблони ММ-106 в условиях потери влаги на протяжении 24 часов.

Заключение

По результатам исследования можно сделать вывод об участии ряда стресс-ассоциированных белков в реакции ответа яблони на воздействие засухи, поскольку было установлено изменение уровня экспрессии всех исследуемых генов, кроме *MdSAP18*. Данный ген в заданных условиях не был экспрессирован. Кроме того, среди 14 исследуемых генов можно отметить 5 – *MdSAP4*, *MdSAP6*, *MdSAP12*, *MdSAP19*, *MdSAP21* – уровень экспрессии которых резко возрастает к 4-му часу воздействия и достигает максимума. Максимальное значение экспрессии составило 12,04 для гена *MdSAP6*. Так же для большинства исследуемых генов характерно наличие общей тенденции: резкое или постепенное увеличение уровня экспрессии в первые часы воздействия с последующим его снижением. Такое увеличение уровня экспрессии к 4-му часу согласуется с предположением о высокой скорости накопления транскрипта на ранней стадии реализации ответа на воздействие стрессового фактора с последующим его снижением к 24-му часу. При оценке влияния степени идентичности исследуемых нуклеотидных последовательностей на сходство их профилей экспрессии было установлено отсутствие прямой зависимости между характером экспрессии генов, кодирующих стресс-ассоциированные белки, и степенью идентичности их нуклеотидных последовательностей в условиях действия засухи на подвой яблони ММ-106.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jaakola L [et al.]. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit // Molecular biotechnology. – 2001. – Vol. 19, № 2. – P. 201–203.
2. Кузмицкая П., Урбанович О., Кильчевский А. Идентификация генов, кодирующих стресс-ассоциированные белки, содержащие домены A20/AN1, в геноме яблони *in silico* и анализ их филогенетических связей // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2018. – Vol. 62. – P. 455–462.
3. Bustin SA [et al.]. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. – 2009.
4. Rao X [et al.]. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis // Biostatistics, bioinformatics and biomathematics. – 2013. – Vol. 3, № 3. – P. 71.
5. Dong Q [et al.]. Genome-wide analysis and cloning of the apple stress-associated protein gene family reveals MdSAP15, which confers tolerance to drought and osmotic stresses in transgenic *Arabidopsis* // International journal of molecular sciences. – 2018. – Vol. 19, № 9. – P. 2478.

ОСОБЕННОСТИ РИЗОГЕНЕЗА РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ *PRUNUS SERRULATA* СОПТА SHIROFUGEN В УСЛОВИЯХ IN VITRO И EX VITRO FEATURES OF RHIZOGENESIS OF REGENERANTS *PRUNUS SERRULATA* v. SHIROFUGEN IN CULTURE IN VITRO AND EX VITRO

Т. А. Красинская^{1,2}, Н. О. Лукьяненко¹

T. A. Krasinskaya^{1,2}, N. O. Lukyanenko¹

¹Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь

²РУП «Институт плодоводства», г. Минск, Республика Беларусь

krasinskaya@tut.by

lukyanenko_1967@mail.ru

¹Belarusian State University, ISEI BSU
Minsk, Republic of Belarus

²RUE "Institute for Fruit Growing"