

Раздел 2. Естественные науки

УДК 581.1:581.151

ЭКСПРЕССИИ SIWRKY33 И SIERF5 РАСТЕНИЙ ТОМАТА (*Solanum lycopersicum* L.) ИНДУЦИРУЮТСЯ ПОВЫШЕННОЙ СОЛЕНОСТЬЮ *

Джафаров Гусейн Рустам оглы

Аспирант, Университет Хазар (Баку, Азербайджан)

Азизов Ибрагим Вагаб оглы

д.б.н., Институт молекулярной биологии и биотехнологии

НАНА (Баку, Азербайджан)

Абдурагимов Азад Рамиз оглы

Гасымов Карим Гули оглы*

д.б.н., Институт Биофизики НАНА (Баку, Азербайджан)

Методом иммуноблоттинга в растениях томата был исследован тканеспецифический профиль экспрессии представителей двух суперсемейств – WRKY и ERF/AP2, в зависимости от повышенной солености. Вестерн гибридизация со специфическими поликлональными антителами показала, что SIWRKY33A и SIWRKY33B из семейства WRKY, а так же SIERF5 из семейства ERF/AP2 интенсивно экспрессировались в различных тканях растений томата при повышенной концентрации соли. SIERF5 экспрессировался в верхушках молодых побегов, молодых листьях, корнях и стеблях, а SIWRKY33 A и B экспрессировались в тех же тканях, за исключением корней.

Ключевые слова: *Solanum lycopersicum*; транскрипционные факторы; иммуноблоттинг

* Эта работа выполнена при финансовой поддержке Научно-Технологического Центра Украины (УНТЦ), проект № 6154, и частично Национальной Академией Наук Азербайджана.

**THE EXPRESSION OF SIWRKY33 AND SIERF5 OF
TOMATO PLANTS (*Solanum lycopersicum* L) ARE INDUCED
BY ELEVATED SALINITY**

Jafarov Husein Rustam

PhD student Khazar University (Baku, Azerbaijan)

Azizov Ibrahim Vahab

d.b.sc. Institute of Molecular biology and biotechnology, ANAS (Baku,
Azerbaijan)

Abdurahimov Azad Ramiz PhD

Gasimov Karim Guli*

d.b.sc. Institute of biophysics, ANAS (Baku, Azerbaijan)

The tissue-specific expressions of the members of two superfamilies WRKY and ERF/AP2 depending on elevated salt concentration in tomato plants by means of immunoblotting were studied. Western hybridization with specific polyclonal antibodies revealed that SIWRKY33A и SIWRKY33B of superfamily WRKY and SIERF5 of ERF/AP2 were intensively expressed in variety of tissues of tomato plants at elevated salt concentration. SIERF5 is expressed in shoot apex, young leaves, roots and stems, while SIWRKY33 A and B are expressed in the same tissues as above except roots.

Keywords: *Solanum lycopersicum*; transcription factors; immunoblotting

Транскрипционные факторы (ТФ) представляют собой секвенс-специфические ДНК-связывающие белки, которые могут активировать или подавлять транскрипционный процесс. Они избирательно отображают тканеспецифический и развитие-специфический профиль экспрессии или же стимул-зависимый путь экспрессии при регуляции транскрипционных процессов [1- 3].

Группы генов WRKY и AP2/ERF являются важными суперсемействами, участвующими в реакциях растений на воздействие факторов окружающей среды. Семейство WRKY участвует в сигнальной системе, связанной с абсцизовой и салициловой кислотами [4, 5], а также с сигналами, связанными

с генами DREB факторами [1], а семейство транскрипционных факторов AP2/ERF участвует в системе сигнализации, связанной с этиленом, салициловой и жасминовой кислотами [6, 7].

Каждый WRKY фактор содержит, по меньшей мере, один ДНК-связывающий домен WRKY, который состоит примерно из 60 консервативных аминокислотных остатков. Важной особенностью этой области является хорошо сохранившийся гептапептид WRKYGQK и последующий неканонический мотив цинкового пальца в его С-концевой области [8]. Многие WRKY ТФ были идентифицированы в *Arabidopsis*, рисе, картофеле, кукурузе и табаке [2, 9-11]. Исследования показали, что в С3 растениях гены WRKY являются активаторами сигнального пути, индуцированного абсцизовой кислотой [12]. В *Arabidopsis* избыточная экспрессия AtWRKY25 или AtWRKY33 приводила к повышенной толерантности растения к солености [13]. Аналогичный ген в растениях томата SIWRKY33 сверхэкспрессируется при повышенной концентрации соли и дефиците воды [14].

Члены семейства ERF обнаружены во многих однодольных и двудольных растениях, и они участвуют в широком спектре функций, включая процессы развития ответа на различные биотические и абиотические стрессы [15-17]. Были клонированы многочисленные гены, кодирующие DRE/CRT-связывающие белки от различных видов, таких как DREB/CBF *Arabidopsis* [18, 19], ZmDBF кукурузы [20], VnCBF *Brassica napus*, HvCBF1 ячменя [21]. Гены CBF и COR не экспрессируются в нормальных условиях. Но с охлаждением (4°C) после ранней индукции экспрессии генов CBF, следует экспрессия CBF-регулируемых генов [20].

В данном исследовании представлены тканеспецифические экспрессии двух форм SIWRKY33 (А и В) из суперсемейства WRKY, и SIERF5 из семейства ERF/AP2 в растениях томата при повышенной солености среды.

Материалы и методы. *Растительный материал* выращивали по [14]. После 24 часовой обработки растений с

250 мМ раствором хлористого натрия были отобраны различные ткани растений томата, включая корни, стебли, молодые цветочные бутоны, цветоножки, молодые листья, черешки, апикальный меристемальный и акцилярный меристемальный ткани.

Приготовление общего белка для иммуноблоттинга из разных тканей проводили с некоторыми модификациями в EZ буферных системах [22]. Образцы выбранных тканей гомогенизировали в 1,5 мл пробирке эппендорфа в буфере E (125 мМ Трис-НСl; рН-8,8; 1% (мас./Об.) SDS; 10% глицерина, 50 мМ Na₂S₂O₅), и после полной гомогенизации пробирка с гомогенатом была перенесена на лед. После того, как все образцы были гомогенизированы, пробирки выдержанные на льду, нагревали до комнатной температуры (22 °С). Затем гомогенаты центрифугировали при комнатной температуре со скоростью 13000 g в течение 10 минут. Супернатанты были использованы в виде фракции общего белка. Выделение белка с буфером E позволило провести его количественный анализ по реагенту BioRad Dc Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA USA). На этом уровне гомогенный материал разделяли на аликвоты и хранили при -75°С до использования.

ПААГ электрофорез белков и их иммуноблоттинг.

Для разделения белков на ПААГ электрофарезе, тотальный белок в буфере E смешивали в соотношении 1/10 с буфером Z (125 мМ Трис-НСl; рН 6,8; 12% (мас./об.) SDS; 20% глицерина, 22% β-меркаптоэтанола; 0,001% (мас./об.) бромфенолового синего) и кипятили в течение 3 минут, и сразу же загружали в 12% ПААГ электрофорез.

Белки, разделенные на ПААГ электрофорезе, были перенесены на PVDF мембрану (Millippre, США) с помощью инструмента “Semidray gel transfer” (Thermo Scientific Owl, США) по протоколу обеспеченной производителем. Вестерн-блоттинг и визуализацию гибридных белков проводили с помощью “ECL Western Blotting detection” реагента (Amersham Biosciences, ВБ) по протоколу обеспеченной производителем. В

гибридизации использовали поликлональные кроличьи антитела специфические к SIWRKY33A, SIWRKY33B и SIERF5 белкам.

Для производства антител в качестве антигена были использованы рекомбинантные пептиды, соответствующие аминокислотным остаткам с первого метионина до начала первого WRKY домена для SIWRKY33A (200 остатков) и SIWRKY33B (194 остатков), и полная аминокислотная последовательность для SIERF5 (244 остатков).

Определение концентрации белка было проведено по Bradford Reagent (Sigma-Aldrich, США) и BioRad Dc Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, США).

Результаты и их обсуждение. Для определения профиля экспрессии транскрипционных факторов SIWRKY33 и SIERF5 были использованы растения томата 8 недельного возраста, подверженные влиянию повышенной концентрации хлористого натрия (250 мМ) в течение 48 часов. Экспрессия определена по гибридизации суммарной фракции белков с поликлональными антителами специфические к SIWRKY33A и B, и SIERF5.

Суммарные фракции белков были выделены из различных тканей растений томата, включая корни, стебли, молодые цветочные бутоны, цветоножки, молодые листья, черешки, апикальный меристемальный и акцилярный меристемальный ткани. Белки выделены по вышеописанному методу (EZ буферы). Для фракционирования на ПААГ электрофорезе на каждую полосу загружали 15 мкг тотального белка. Электрофорез проводили по методу Лаемли в 12% ПААГ. После переноса фракционированных белков на PVDF, мембраны гибридизировали против соответствующих поликлональных SIWRKY33A-, SIWRKY33B- и SIERF5-специфических антител.

Белковые фракции, выделенные из следующих органов растений: корней, стеблей, листьев и с апикальной меристемной области, показали гибридизацию с высокой интенсивностью с SIERF5-специфическим антителом (рис. 1). А фракция,

выделенная из цветков, черешков и акцилярных (подмышечных) меристемальных тканей, не гибридизировалась с SLERF5-специфическим антителом.

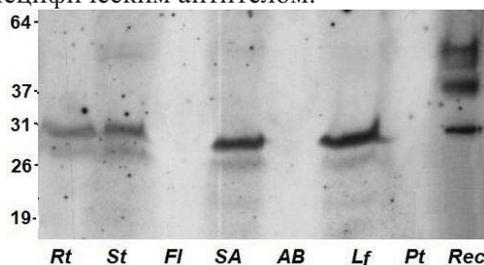


Рис. 1. Вестерн-блоттинг гибридизация суммарного белка с SIERF5-специфическим антителом. *Rt*, корень; *St*, ствол; *Fl*, цветы; *SA*, апикальная меристемальная ткань; *AB*, акцилярная меристемальная ткань; *Lf*, молодые листья; *Pt*, черешки; *Rec*, рекомбинантный SIERF5.

Известно, что факторы ERF обычно регулируют транскрипцию генов, участвующих в сигнальной системе, связанной с этиленом и другими фитогормонами [6, 7, 21]. При анализе интенсивности, полученных по гибридизации белка, наиболее интенсивные полосы наблюдаются в молодых листьях в верхней меристемной ткани побегов. Они отражают интенсивную экспрессию SIERF5 и этих тканей.

Гибридизация с SIWRKY33-специфическим антителом. Суммарные белки, выделенные из вышеуказанных тканей растений томата, были подвержены Вестерн-блоттинг гибридизации, используя SIWRKY33A- и SIWRKY33B-специфические поликлональные антитела. В результате получены гибридизационные полосы белков, выделенных из большинства органов растений томата (рис. 2 и 3) как с SIWRKY33A-, так и SIWRKY33B-специфическими антителами в области ~60 kDa, с молекулярным весом 59.6 и 58.6 kDa соответственно для SIWRKY33A и SIWRKY33B белков.

Сильная гибридизация с SIWRKY33A-специфическим антителом проявилась в тканях апикальной меристемы, в молодых стеблях и молодых цветочных бутонах, и в меньшей степени гибридизация наблюдалась в молодых листьях и

цветоножках, а в черешках листьев, корнях и акцилярной (подмышечной) меристемной зоне гибридизация не наблюдалась (рис. 2).

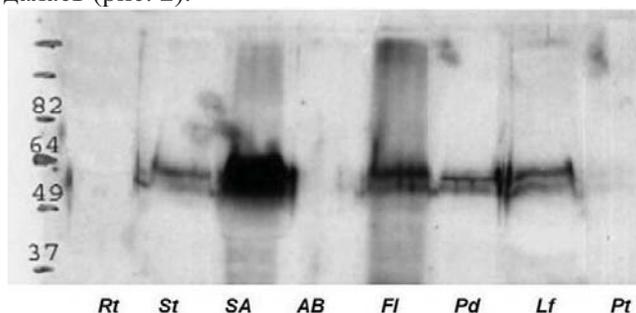


Рис. 2. Вестерн-блоттинг гибридизация суммарного белка с SIWRKY33A-специфическим антителом. *Rt*, корень; *St*, ствол; *SA*, апикальная меристемальная ткань; *AB*, акцилярная меристемальная ткань; *Fl*, цветы; *Pd*, цветоножка; *Lf*, молодые листья; *Pt*, черешки.

Подобный профиль гибридизации получен и с SIWRKY33B-специфическим антителом. В отличие от SIWRKY33A-специфического антитела SIWRKY33B-специфическое антитело проявляло гибридизацию в акцилярной (подмышечной) меристемной ткани. Здесь, как и для случая SIWRKY33A, в корнях, а также в цветоножках гибридизация не наблюдалась (рис. 3).

Сильная гибридизация всех использованных трех антител с белками, выделенных из молодых листьев и стеблей, в частности, из апикально-меристемальной ткани, показывает сильную экспрессию исследуемых транскрипционных факторов, и, вероятно, связана с тенденцией к сильному росту и дифференциации в этих органах растения. Большинство ответов растений на воздействие абиотических факторов окружающей их среды осуществляется физиологически более активными и способными дифференцировать тканями и органами. В данном случае растение томата, образцы тканей которого были извлечены для исследования, выращивали и подвергали

воздействию стрессовых факторов при искусственных климатических условиях.

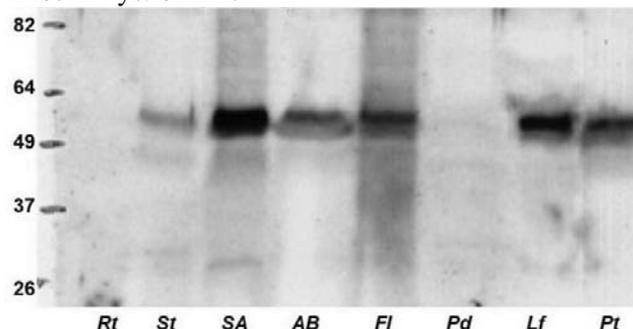


Рис. 3. Вестерн-блоттинг гибридная суммарного белка с SIWRKY33B-специфическим антителом. *St*, ствол; *SA*, апикальная меристемальная ткань; *AB*, аксиллярная меристемальная ткань; *Fl*, цветы; *Pd*, цветоножка; *Lf*, молодые листья; *Pt*, черешки; *Rt*, корень; *Rec*, рекомбинантный SIWRKY33B.

Участие ERF5 в реакции растения томата на повышенную соленость и засуху, связанные с этиленом и абсцизовой кислотой, уже было экспериментально показано [23], так же была анализирована последовательность ДНК-кодирующей ERF5 [24]. Полученные нами результаты иммуноблоттинга показывают экспрессию этого транскрипционного фактора в различных органах растений томата при 48 часовой выдержке в условиях повышенной солености.

Два других исследованных ТФ, SIWRKY33A и SIWRKY33B, так же интенсивно экспрессируются в молодых листьях и апикально-меристемальной зоне томата. Однако эти факторы, в отличие от SIERF5, практически не экспрессируются в корневой ткани. Очевидно, что при ответе на воздействие стресса, растения могут одновременно использовать разные сигнальные системы в различных органах.

Семейство ERF, как правило, регулирует транскрипцию посредников сигнальной системы, связанных с этиленом, салициловой и жасминовой кислотами, в то время как факторы WRKY вовлечены в другие сигнальные системы, такие как

DREB гены и абсцизовая кислота [1]. SlERF5 со своим консервативным AP2 доменом (AP2/ERF5) в растениях томата и в трансгенном табаке (AP2/ERF3) также увеличивает толерантность к солености и засухе [23]. А присутствие абсцизовой кислоты в адаптивных реакциях растений к повышенной солености и дефициту воды экспериментально доказано [2]. Повышение солености и водный дефицит растение в первую очередь чувствует корнями. По-видимому, в ответ на это изменение, посредственно или непосредственно, пока неизвестным путем увеличивается экспрессия ERF5.

В клетках устьиц листьев была обнаружена экспрессия гена альдегидоксидазы, участвующей в синтезе абсцизовой кислоты [25]. Кроме этого, также была доказана экспрессия еще четырех генов, участвующих в синтезе АВА [26, 27]. Хотя их функциональная локализация пока не выяснена, однако известно, что экспрессия генов, связанных с синтезом АВА, наблюдается по направлению регуляции повышения. Представители обоих суперсемейств, SlERF5 и SlWRKY33, вероятно, вовлечены в синтез АВА регулированием транскрипции генов, участвующих в ее синтезе.

Список литературы

1. Li H., Gao Y., Xu H., Dai Y., Deng D., Chen J. ZmWRKY33, a WRKY maize transcription factor conferring enhanced salt stress tolerances in Arabidopsis. // Plant Growth Regul. -2013. -V. 70. -P. 207–216
2. Zhang G., Chen M., Li L., Xu Z., Chen X., Guo J. and Ma Y. Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. // Journal of Experimental Botany. - 2009. -V. 60. -No. 13. -P. 3781–3796.
3. Davuluri R.V., H. Sun, S.K. Palaniswamy, N. Matthews, C. Molina, M. Kurtz, and E. Grotewold, AGRIS: Arabidopsis Gene Regulatory Information Server, an in-formation resource of

Arabidopsis cis-regulatory elements and transcription factors. // BMC Bioinformatics. -2003. -V.23, -No. 4. -P. 25.

4. Yang PZ, Chen CH, Wang ZP, Fan BF, Chen ZX: A pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter. // Plant J. -1999. -V.18. -No. 2. -P. 141-149.

5. Yang, B, Jiang, Y, Rahman, MH, Deyholos, MK, Kav NNV Identification and expression analysis of WRKY transcription factor genes in canola (*Brassica napus* L.) in response to fungal pathogens and hormone treatments // BMC Plant Biology. -2009. -V9. -P.68 doi:10.1186/1471-2229-9-68.

6. Grennan A.K. Ethylene Response Factors in Jasmonate Signaling and Defense Response. // Plant Physiology. -2008. -V. 146. -P. 1457–1458.

7. Lorenzo O, Piqueras R, Sanchez-Serrano JJ, Solano R. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. // Plant Cell. -2003. -V. 15. -P. 165–178

8. Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE. The WRKY superfamily of plant transcription factors. // Trends Plant Sci. -2000. -V. 5. -No. 5. -P. 199-206.

9. Journot-Catalino N, Somssich IE, Roby D, Kroj T, The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. // Plant Cell, -2006. -V. 18. -P. 3289–3302.

10. Kim KC, Fan B, Chen Z, Pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY7 is a transcriptional repressor and enhances plant susceptibility to *Pseudomonas syringae*. // Plant Physiol. -2006. -V. 142. -P. 1180–1192.

11. Knoth C, Ringler J, Dangl JL, Eulgem T, *Arabidopsis* WRKY70 is required for full RPP4-mediated disease resistance and basal defense against *Hyaloperonospora parasitica*. // Mol Plant Microbe Interact. -2007. -V. 20, -P. 120–128.

12. Zou, X., Seemann, J.R., Neuman, D., Shen, Q.J. A WRKY gene from creosote bush encodes an activator of the abscisic

acid signaling pathway. // *J.Biol.Chem.* -2004, -V. 279. -P. 55770–55779

13. Jiang Y and Deyholos M, Functional characterization of Arabidopsis NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses. // *Plant Mol. Biol.* -2009, -V. 69. No. 1. -P. 91-105.

14. Гасымов К.Г., Наджафова Л.А. Ген SIWRKY33 способствует толерантности растений томата к солевому и водному стрессам. // *Физиология Растений и Генетика.* -2014. -Т. 46. -№ 5. -С. 385-394.

15. Jofuku K.D., Den Boer B.G., Van Montagu M., Okamoto J.K. Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. // *Plant Cell.* -1994. -V. 6. -No. 9. -P. 1211-1225.

16. Ohme-Takagi M. and H. Shinshi, Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. // *Plant Cell.* -1995. -V. 7. -No. 2. -P. 173-182.

17. Okamoto J.K., B. Caster, R. Villarroel, M. Van Montagu, K.D. Jofuku, The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in Arabidopsis. // *P.N.A.S. USA.* -1997. -V. 94. -P. 7076-7081.

18. Stockinger E.J., Gilmour S.J., Thomashow M.F., Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. // *P.N.A.S. USA.* -1997. -V. 94. -P.1035-1040.

19. Gilmour S.J., D.G. Zarka, E.J. Stockinger, M.P. Salazar, J.M. Houghton, and M.F. Thomashow, Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. // *Plant J.* -1998. -V. 16. -No. 4. -P. 433-442.

20. Kizis D. and M. Pages, Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the

drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. // *Plant J.* -2002. -V. 30. -No. 6. -P. 679-689.

21. Vernie T., Moreau S., de-Billy F., Plet J., Combier J-P., Rogers C., Oldroyd, G., Frugier F., Niebel A., Gamasa P., EFD Is an ERF Transcription Factor Involved in the Control of Nodule Number and Differentiation in *Medicago truncatula*. // *The Plant Cell.* -2008. -V. 20. -P. 2696–2713.

22. Martínez-García J.F., Monte E, Quail P.H. A simple, rapid and quantitative method for preparing *Arabidopsis* protein extracts for immunoblot analysis. // *Plant J.* -1999. -V. 20. -No. 2. -P. 251-257.

23. Pan Y, Seymour GB, Lu C, Hu Z, Chen X and Chen G. An ethylene response factor (ERF5) promoting adaptation to drought and salt tolerance in tomato. // *Plant Cell, Rep.* -2012. -V. 31. -No. 2. -P. 349-360

24. Aoki K, Yano K, Suzuki A, Kawamura S, et al., Large-scale analysis of full-length cDNAs from the tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivar Micro-Tom, a reference system for the Solanaceae genomics. // *BMC Genomics.* -2010. -V. 11. 210 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/210>)

25. Koiwai, H., Nakaminami, K., Seo, M., Mitsuhasi, W., Toyomasu, T. and Koshiba, T. Tissue-specific localization of an abscisic acid biosynthesis enzyme, AAO3, in *Arabidopsis*. // *Plant Physiol.* -2004. -V. 134. -P. 1697-1707.

26. Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. // *Plant J.* -2001. -V. 27. -P. 325-333.

27. Tan, B. C., Joseph, L. M., Deng, W. T., Liu, L., Li, Q. B., Cline, K. and MaCarty, D. R. Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase gene family. // *Plant J.* -2003. -V. 35. -P. 44-56.

© Джафаров Г.Р., Азизов И.В.,
Абдурагимов А.Р., Гасымов К.Г., 2018