

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 581.14

Влияние фитогормонов на экспрессию генов *USP* в проростках *Arabidopsis thaliana***Д.С. Горшкова^{1, 2, *} , Е.С. Пожидаева² **¹Кафедра физиологии растений, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева, Российская академия наук, Россия, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35

*e-mail: dsgorshkova@yandex.ru

Универсальные стрессовые белки (Universal Stress Proteins, USP) являются потенциальными участниками процессов, контролирующих морфогенез растений, в которых важная роль отводится фитогормонам. В данном исследовании был выполнен поиск генов *USP Arabidopsis thaliana*, изменяющих свою экспрессию в ответ на действие фитогормонов. Выявлены 15 генов *USP*, экспрессия которых дифференциально регулируется двумя и более фитогормонами. Причем, накопление транскриптов у большинства из исследованных генов наблюдали при действии гормонов, участвующих в формировании устойчивости растений к стрессу — абсцизовой кислоты, этилена и метилжасмоната. В то же время ауксины и гиббереллины — гормоны, регулирующие рост растений, — подавляли экспрессию изученных генов *USP*. Полученные результаты выявили потенциальные гены *USP*, чья функциональная активность напрямую или опосредовано может быть связана с фитогормон-зависимыми процессами, обеспечивающими жизнедеятельность растений в нормальных и стрессовых условиях.

Ключевые слова: абсцизовая кислота, ауксины, гиббереллины, метилжасмонат, универсальные стрессовые белки, этилен, *Arabidopsis thaliana*, GRUSP

Универсальные стрессовые белки растений (Universal Stress Proteins, USP) были впервые охарактеризованы на основании сходства их аминокислотных последовательностей с бактериальными USP [1]. У прокариот USP накапливаются в ответ на стресс и участвуют в формировании устойчивости к неблагоприятным факторам [2, 3]. Как и у прокариот, USP растений выполняют важную роль в условиях абиотических и биотических воздействий [4, 5]. Установлено, что трансгенные растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (*A. thaliana*) со сверхэкспрессией белка AtUSP обладают повышенной устойчивостью к окислительному и температурному стрессам [6, 7]. В растениях в формировании устойчивости к неблагоприятным воздействиям участвуют фитогормоны, в том числе — за счет их способности модулировать экспрессию генов стрессовых белков [8]. Для ряда генов *USP* показано изменение их экспрессии в ответ на действие фитогормонов, участвующих в формировании устойчивости к стрессу, например, абсцизовой кислоты (АБК) [9, 10] или этилена [11]. Это свидетельствует о вовлечении USP в фитогормон-зависимые механизмы устойчивости к стрессу.

Помимо этого, в нестрессовых условиях USP участвуют в гормональной регуляции роста и развития растений. Так, у *A. thaliana* рецептор-подоб-

ная цитоплазматическая киназа STUNTED, содержащая в своем составе USP-домен, необходима для гиббереллин-зависимого контроля клеточного деления [12]. Еще одним примером является белок GRUSP (Germination-Related Universal Stress Protein; ген — At3g58450), участвующий в АБК- и гиббереллин-зависимых механизмах прорастания и перехода к цветению [10, 13–14]. Несмотря на активное изучение растительных USP, в настоящее время практически отсутствуют исследования их роли в физиологических процессах, контролируемых фитогормонами.

В настоящем исследовании с использованием биоинформатического анализа был осуществлен поиск генов *USP*, экспрессия которых изменяется в ответ на действие фитогормонов. После чего методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (qRT-PCR) было детально исследовано воздействие фитогормонов на экспрессию отобранных генов *USP* в двухнедельных проростках *A. thaliana*.

Материалы и методы**Объект исследования и условия выращивания.**

В исследовании использовали двухнедельные проростки *A. thaliana* дикого типа (экотип Columbia, Col-0). Для их получения семена стерилизовали

в течение 10 мин в растворе 50%-ного гипохлорита натрия, содержащего Tween-20 в конечной концентрации 0,02%. Семена высевали на агаризованную (0,8%) питательную среду Мурасиге-Скуга (MS; Duchefa, Нидерланды) в половинной концентрации и стратифицировали при 4 °C в течение 3 сут в темноте. Далее семена проращивали в условиях 16-часового фотопериода при 21 °C и интенсивности освещения 120 мкМ фотонов·с⁻¹·м⁻².

Обработка фитогормонами. Двухнедельные проростки Col-0 переносили в чашки Петри на три слоя фильтровальной бумаги, увлажненной средой MS, содержащей фитогормоны (Sigma, Германия) в ранее подобранных [15] конечных концентрациях: 5 мкМ гиббереллинов (ГК), 50 мкМ АБК, 50 мкМ метилжасмоната (МЖ), 1 мкМ индолилуксусной кислоты (ИУК) или 10 мкМ предшественника биосинтеза этилена 1-аминоциклопропан-1-карбоксилловой кислоты (АЦК). Контрольные проростки инкубировали на питательной среде без добавления фитогормонов. Проростки инкубировали в течение 3 или 24 ч, после чего 100 мг проростков каждого из образцов фиксировали в жидком азоте для выделения РНК.

Выделение РНК и qRT-PCR. РНК выделяли с использованием TRIzol-реагента (Thermo Fisher Scientific, США) согласно стандартному протоколу. Очистку РНК от примеси ДНК проводили с применением ДНКазы I (Thermo Fisher Scientific, США) с последующей проверкой качества очистки методом полимеразной цепной реакции. Обратную транскрипцию проводили с использованием олиго(dT)18-праймера (Евроген, Россия) и обратной транскриптазы RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, США). qRT-PCR проводили в реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) на амплификаторе Light Cycler 96 (Roche, Швейцария). Анализ относительной экспрессии генов проводили, используя программное обеспечение Light Cycler 96 (Roche, Швейцария). В качестве референсного гена использовали ген убиквитин-конъюгирующего фермента UBC10 (*At5g53300*). Список праймеров представлен в табл. 1. Праймеры для qRT-PCR подбирали с применением программного обеспечения Vector NTI Advance 11 (Invitrogen, США) и их специфичность оценивали в Primer BLAST на сервере NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Биоинформатический анализ. Для идентификации генов *A. thaliana*, кодирующих USP, был проведен поиск белковых последовательностей, содержащих в своей структуре USP-домен (PFAM PF00582). Поиск осуществляли в базе данных NCBI с использованием инструмента DELTA-BLAST (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST), позволяющего применять данные из базы консервативных доменов (Conserved Domain Database, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>). В качестве ша-

блона использовали последовательность USP MJ0577 (Uniprot Q57997) из *Methanocaldococcus jannaschii*. В дальнейшем информацию о генах идентифицированных последовательностей USP *A. thaliana* получали из баз данных TAIR (<https://arabidopsis.org>). Анализ транскриптомных карт *A. thaliana* и характеристику паттернов экспрессии генов USP проводили на основе данных из базы Transcriptome Variation Analysis (TraVA), интегрированных в графическую оболочку eFP Browser (<https://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) [15]. Для этого на основании цифровых значений уровня экспрессии целевых генов, полученных из этой базы данных, строили тепловые карты при помощи Microsoft Office Excel (США), а затем на их основе отбирали гены, экспрессия которых статистически значимо изменяется при действии фитогормонов.

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов осуществляли при помощи программного обеспечения GraphPad Prism 6 (США). Достоверность различий оценивали при помощи двухвыборочного теста ANOVA. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. На диаграммах планки погрешностей соответствуют стандартным ошибкам.

Результаты и обсуждение

Для исследования свойств USP в фитогормон-зависимой регуляции роста и развития растений с применением биоинформатического анализа были идентифицированы 56 генов *A. thaliana*, кодирующих белки, в составе которых присутствует USP-домен. Далее анализ профилей экспрессии на платформе eFP Browser показал, что идентифицированные гены демонстрируют специфичный профиль экспрессии в зависимости от стадии развития. При этом уровень транскрипции 15 генов USP дифференциально регулируется фитогормонами ИУК, ГК, АБК, МЖ и этиленом (табл. 2), которые, в частности, вовлечены в процессы, связанные с прорастанием семян и развитием проростков.

Для более детального анализа полученных данных, методом qRT-PCR были изучены временные изменения (3 и 24 ч) в экспрессии указанных генов USP (табл. 2) в двухнедельных проростках Col-0. Физиологическую реакцию проростков на фитогормоны оценивали в ходе экспериментов по уровню экспрессии маркерных генов (рис. 1) относительно необработанных вариантов. Согласно рис. 1, экспрессия генов *RD21b*, *IAA_19*, *ERF_1* и *ERF-1* возросла в несколько раз при обработке АБК, ИУК, АЦК и МЖ, а экспрессия гена *GA20ox1* снизилась при обработке ГК, что соответствует ожидаемому поведению экспрессии этих генов при обработке фитогормонами на основе литературных данных [16–20]. На рис. 2 и 3 представлены профили

экспрессии исследуемых генов *USP* в ответ на обработку АБК, ГК, ИУК, МЖ и АЦК.

Активность большинства анализируемых генов изменялась при действии АБК (рис. 2А). У шести генов (*At3g58450*, *At3g11930*, *At2g47710*, *At1g77280*, *At2g21620*, *At5g47740*) экспрессия возрастала по мере увеличения времени обработки, в то время как у двух генов (*At3g53990* и *At3g62550*) индукция наблюдалась только в первые 3 ч обработки, но спустя 24 ч уровень их экспрессии возвращался к прежним значениям. По амплитуде ответа на АБК выделяются гены *At3g58450* и *At5g47740*, экспрессия

которых возрастала на 1–2 порядка в ответ на обработку 50 мкМ АБК по сравнению с необработанным вариантом (рис. 2А). Гены *At3g11930*, *At2g47710*, *At1g77280* и *At2g21620* изменяли свою экспрессию в 2–3 раза по сравнению с необработанным контролем. Поскольку АБК играет важную роль при формировании устойчивости к абиотическим воздействиям, наблюдаемая у генов *USP* реакция на АБК вполне ожидаемая и подтверждает ранее полученные результаты, демонстрирующие участие *USP* в формировании устойчивости растений к стрессовым воздействиям [9].

Таблица 1

Последовательности праймеров, используемых в исследовании

Название	Последовательность (5' => 3')	Название гена	Описание согласно базе данных TAIR
GRUSP_F	TTGTTGGTAGCCGTGGACTC	<i>At3g58450</i>	GRUSP
GRUSP_R	GAGGTTTCTCTAGGCGGTCTG		
UBQ10-F	CACCATTTCCAAGGTGCTGC	<i>At5g53300</i>	Убиквитин-конъюгирующий фермент 10
UBQ10-R	GAGCTATCTCGGGCACCAAA		
77280_F	GGCTCTGGTTAAAGTCGCT	<i>At1g77280</i>	USP
77280_R	GCTTCAGCTTCAGATCCACCT		
63940_F	CAGATTTCGGATTTCGCCAGC	<i>At5g63940</i>	USP
63940_R	CCCACAAGACAAGGCTCTCC		
13690_F	AAAGAGTGTCCCTTACCATC	<i>At3g13690</i>	USP
13690_R	AAAGGTGAAGTTCCCAGGTC		
01520_F	CCCCTGAGGATTTCCGAGAC	<i>At3g01520</i>	USP
01520_R	TCACACAGAACGCACTCACA		
14680_F	TGGTGGCGGTGAATGAATCG	<i>At5g14680</i>	USP
14680_R	AGCCAGAGGTATTGGACCGA		
17020_F	AGTTATGGCGGAGAGTGGTG	<i>At3g17020</i>	USP
17020_R	GTGATCCAACGGTCTCCCAG		
21620_F	TCAGGGAAAGTAGTGTTCGCG	<i>At2g21620</i>	RD2 (USP)
21620_R	AGACGGCGTGGACAAGATG		
11360_F	CGACAGTGGTGGGGAGAATC	<i>At1g11360</i>	USP
11360_R	GCTGCTACTGCTTATCCGAAG		
62550_F	CCCCCTCTTCCCGTTTACTC	<i>At3g62550</i>	USP
62550_R	TCACACTCCCTAGCAAAGCC		
25930_F	TCATCAGTCGGCTTTGCTCA	<i>At3g25930</i>	USP
25930_R	TGTCTCTGCCTTGATCCCAT		
53990_F	CTATTGTCATGGGAAGCAGAG	<i>At3g53990</i>	AtUSP (USP)
53990_R	TTATTTCGTTATCCTTGACAACG		
47740_F	AGTTGGAAGGGAGAAGCAGC	<i>At5g47740</i>	USP
47740_R	GCAGAGCAGGCATGAAGGAA		
47710_F	GTGATGGTCGTCGGAGTTGA	<i>At2g47710</i>	USP
47710_R	GGAGCGTAAGGAGCGAAGAA		
11930_F	AGCGTTTCTTGGGAGCGTTA	<i>At3g11930</i>	USP
11930_R	TCTCCTTAGGTGGCTTGACA		
RD29b_F	GTGAGAGGTGGTGTAAACGG	<i>At5g52300</i>	RD29b
RD29b_R	GTCGGTGCCCTCTTTTCG		
GA20-1F	GGCTACGCAAGCAGTTTCAC	<i>At4g25420</i>	GA20ox1
GA20-1R	TTGAACGGATTTTGAGCGGC		
IAA19_F	GAGATGTGGCAGAGAAGATG	<i>At3g15540</i>	IAA_19
IAA19_R	TTCCTCAAATAAGGCACACC		
ERF1_F	ATTAGGGTTTGGCTCGGGAC	<i>At3g23240</i>	ERF_1
ERF1_R	GACTCTTGAACCTCTCCGCCG		
ERF-1_F	CGAAGAAGAGGAGAACGGTGG	<i>At4g17500</i>	ERF-1
ERF-1_R	GCCACTTCAACAACCTCGCAC		

Таблица 2

Перечень генов *USP*, экспрессия которых дифференциально регулируется двумя и более фитогормонами по данным транскриптомного анализа из базы eFP Browser

Название гена	Описание	Фитогормоны
<i>At1g11360</i>		АБК, АЦК, ГК, МЖ
<i>At1g77280</i>		АБК, ГК, ИУК
<i>At2g21620</i>	RD2	АБК, АЦК, ГК, МЖ
<i>At2g47710</i>		АБК, ГК
<i>At3g01520</i>		АБК, АЦК, ГК, МЖ
<i>At3g11930</i>		АБК, АЦК, ГК, МЖ
<i>At3g13690</i>		АБК, ИУК
<i>At3g17020</i>		АБК, ГК
<i>At3g25930</i>		АЦК, ГК, МЖ
<i>At3g53990</i>	AtUSP	АБК, ГК, МЖ
<i>At3g58450</i>	GRUSP	АБК, ГК
<i>At3g62550</i>		АЦК, ГК, МЖ
<i>At5g14680</i>		АБК, ГК
<i>At5g47740</i>		АБК, ГК
<i>At5g63940</i>		АБК, ИУК

АБК также участвует в регуляции покоя и прорастания семян. Роль USP в этом процессе была показана на примере белка GRUSP [10, 13]. В ходе прорастания семена трансгенной линии, дефицитной по гену *At3g58450*, проявляли более выраженную чувствительность к присутствию в питательной среде АБК, чем семена Col-0 [10]. Вероятно, что белок GRUSP задействован в процессах, связанных с восприятием сигнала АБК

при прорастании. Ранее было показано, что белки AT3G11930 и AT2G47710 являются потенциальными партнерами GRUSP в ГК-индуцируемом формировании проростков [13]. Экспрессия генов *At3g11930* и *At2g47710* также индуцировалась при обработке АБК, но с меньшей интенсивностью, чем *At3g58450* (рис. 2А). Полученные результаты могут служить косвенным свидетельством в пользу взаимодействия белков GRUSP, AT3G11930 и AT2G47710 и в АБК-регулируемых процессах, происходящих в проростках.

Нетипичное для генов *USP* АБК-опосредованное подавление генной экспрессии было выявлено у *At3g13690* (рис. 2А). Уровень его транскриптов значимо снижался в два раза после 24 ч обработки АБК. Согласно данным транскриптомного анализа из базы eFP Browser, транскрипты этого гена отсутствуют при созревании семени, но появляются в прорастающих семенах. Вероятно, функциональная активность белка AT3G13690 инициируется прорастанием и необходима в развивающихся проростках.

Этилен-регулируемые гены *USP* были обнаружены по изменению их экспрессии в проростках, обработанных АЦК. Гены *At3g25930* и *At3g62550* индуцировались в первые 3 ч обработки, два других – *At3g58450* и *At5g47740* – спустя 24 ч (рис. 2Б). При этом амплитуда ответа на АЦК была ниже, чем в случае АБК: *At3g58450* активировался в 4 раза по сравнению с контролем, а *At5g47740* – в 3 раза.

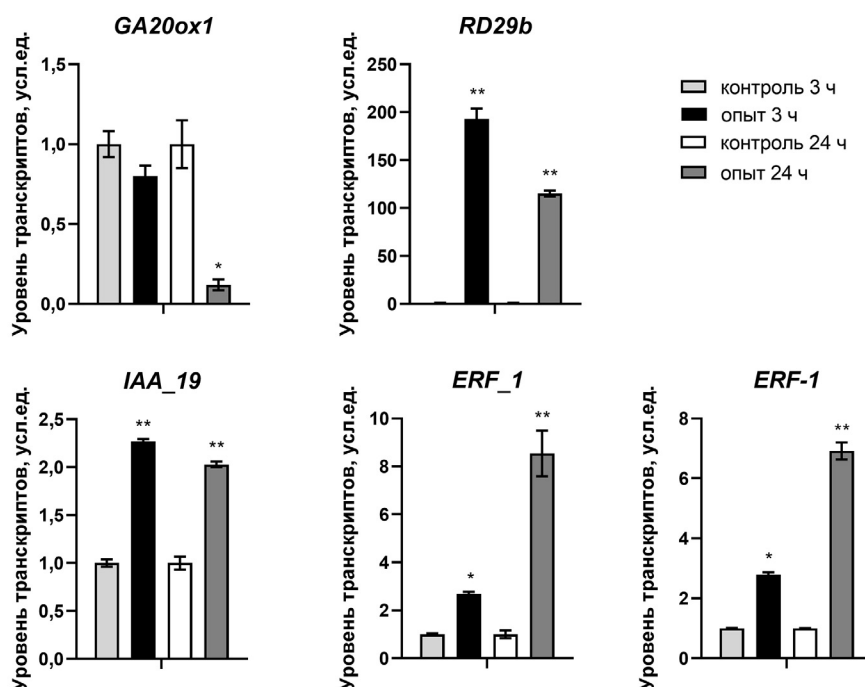


Рис. 1. Уровень экспрессии маркерных генов в двухнедельных проростках при воздействии фитогормонами в течение 3 и 24 ч (опыт) и без обработки (контроль), где: А – 5 мкМ гиббереллинов, Б – 50 мкМ абсцизовой кислоты, В – 1 мкМ индолилуксусной кислоты, Г – 10 мкМ 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатной кислоты, Д – 50 мкМ метилжасмоната; контроль – MS. Нормализация относительно уровня экспрессии гена *UBC10* и относительно уровня экспрессии соответствующих генов в необработанном контроле. Данные представлены в десятичной форме. Планки погрешностей соответствуют стандартным ошибкам.

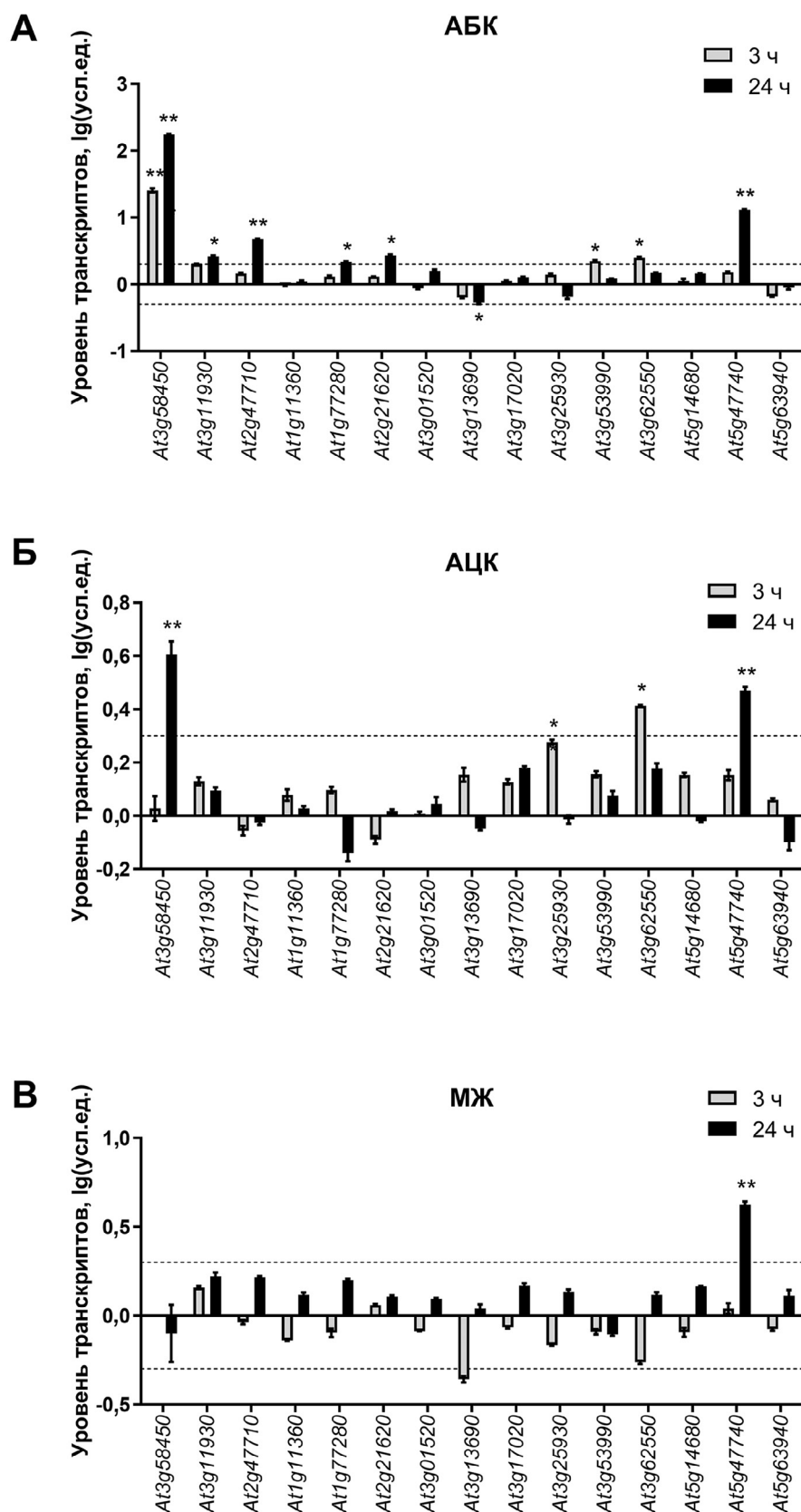


Рис. 2. Экспрессия генов *USP* в двухнедельных проростках *A. thaliana* при действии абсцизовой кислоты (АБК), 1-аминоциклопропан-1-карбоксилловой кислоты (АЦК) и метилжасмоната (МЖ) в течение 3 и 24 ч. А – уровень экспрессии генов *USP* при обработке 50 мкМ АБК, Б – уровень экспрессии генов *USP* при обработке 10 мкМ АЦК, В – уровень экспрессии генов *USP* при обработке 50 мкМ МЖ. Нормализация относительно уровня экспрессии гена *UBC10* и относительно уровня экспрессии соответствующих генов в необработанном контроле. Данные представлены в логарифмической форме. Тонкая пунктирная линия отмечает изменение уровня экспрессии в 2 раза по сравнению с необработанным контролем. Планки погрешностей соответствуют стандартным ошибкам, звездочками отмечены значимые различия, уровни значимости: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Как известно, этилен участвует в регуляции многих физиологических процессов, в том числе при прорастании семян [21], старении растений [22] или их реакции на различные стрессовые факторы [23]. Было показано, что *At3g62550* индуцируется в старых листьях [22], а уровень экспрессии *At5g47740* повышается в корнях в ответ на присутствие в среде неорганического фосфата [24]. Вероятно, в дальнейшем функцию соответствующих белков можно исследовать в контексте их участия в этилен-зависимой регуляции процессов, связанных со старением листьев или ростом растений в условиях дефицита фосфора [22, 23]. Ген *At3g58450* также относится к этилен-индуцибельным генам (рис. 2Б), чья экспрессия возрастает через 24 ч действия АЦК. Учитывая, что экспрессия этого гена зависит от стадии развития растения [10], мы предполагаем, что этилен-зависимая функция GRUSP реализуется в стареющих растениях или в прорастающих семенах.

Интересно, что среди изученных генов *USP* только у *At5g47740* наблюдали достоверные изменения в накоплении транскриптов после 24 ч воздействия МЖ (рис. 2В). Это может быть связано с упомянутой выше индукцией *At5g47740* в при-

сутствии неорганического фосфата, поскольку МЖ участвует в ответе растений на дефицит фосфора [25]. Кроме того, в нашем исследовании влияние фитогормонов на экспрессию генов *USP* оценивали в двухнедельных проростках. Это также вносит ограничения в экспрессионный анализ и может объяснять отсутствие реакции *At3g62550* на обработку МЖ. При этом существуют данные об участии *At3g62550* в МЖ-регулируемом развитии тычинок [26]. Возможно, остальные гены *USP* не проявили предсказанной реакции на МЖ при обработке проростков, поскольку участвуют в реализации специфических программ развития.

Обработка двухнедельных проростков экзогенной ГК практически не влияла на экспрессию исследуемых генов (рис. 3А, Б). Более того, для пяти генов (*At1g11360*, *At3g01520*, *At3g17020*, *At5g14680*, *At5g63940*) мы не обнаружили предсказанную в ходе анализа транскриптомов реакцию на гиббереллины (рис. 3Б). Поскольку ГК являются одним из ключевых факторов, стимулирующих прорастание, то изменения в экспрессии этих и других генов *USP* могут проявляться не на стадии двухнедельных проростков, а при набухании и прорастании семени. Действительно, из базы

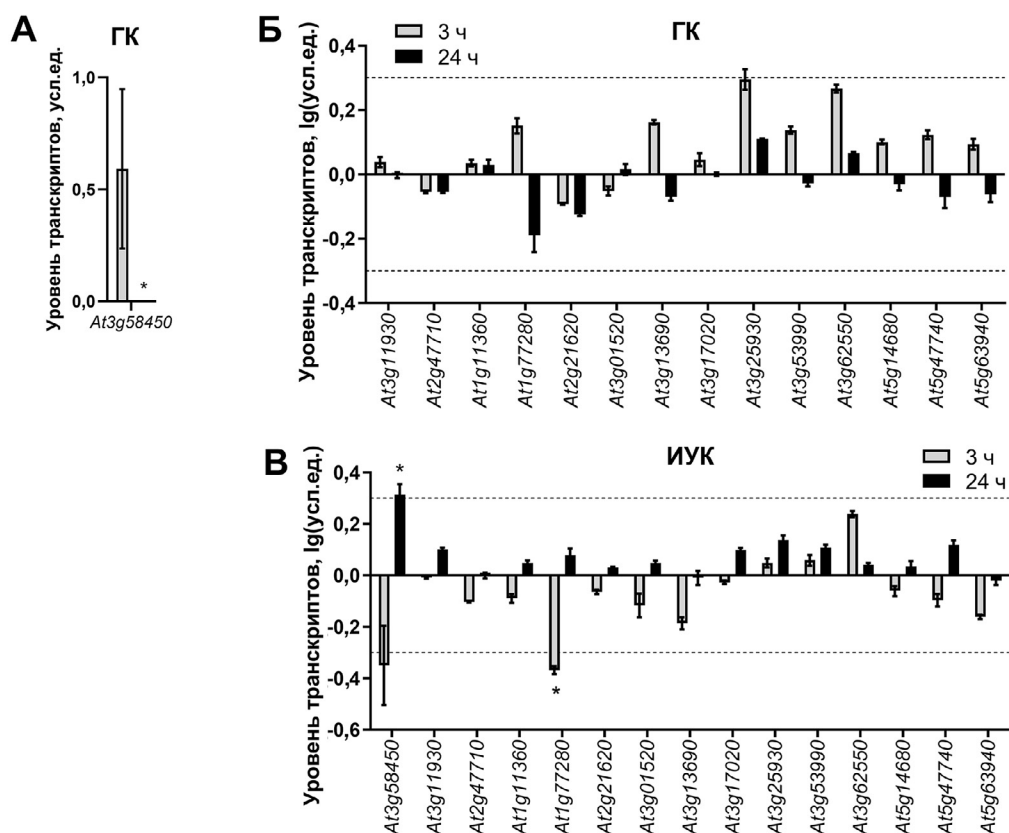


Рис. 3. Экспрессия генов *USP* в двухнедельных проростках *A. thaliana* в ответ на обработку гиббереллинами (ГК) и индолилуксусной кислотой (ИУК) в течение 3 и 24 ч. А — уровень экспрессии гена *At3g58450* в ответ на обработку 5 мкМ ГК, Б — уровень экспрессии остальных генов *USP* при обработке 5 мкМ ГК, В — уровень экспрессии генов *USP* при обработке 1 мкМ ИУК. Нормализация относительно уровня экспрессии гена *UBC10* и относительно уровня экспрессии соответствующих генов в необработанном контроле. Данные представлены в логарифмической форме за исключением экспрессии гена *At3g58450* в присутствии ГК по причине полного подавления гиббереллинами его экспрессии. Тонкая пунктирная линия отмечает изменение уровня экспрессии в 2 раза по сравнению с необработанным контролем. Планки погрешностей соответствуют стандартным ошибкам, звездочками отмечены значимые различия, уровни значимости: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$.

данных eFP Browser установлено, что транскрипты *At1g11360*, *At1g77280*, *At3g11930*, *At3g53990*, *At3g58450*, *At5g47740* присутствуют только в сухих семенах и, вероятно, ГК-чувствительность их экспрессии ограничивается стадией семени.

Особое место в этом ряду занимает ген *At3g58450* (*GRUSP*), для которого наблюдали достоверное подавление его экспрессии через 24 ч воздействия ГК (рис. 3А). Несмотря на максимальное накопление транскриптов *At3g58450* в сухих семенах и их отсутствие в розеточных листьях, для *At3g58450* экспериментально подтверждено его участие не только в ГК-зависимой регуляции прорастания [13], но и в переходе к цветению [14]. Причем при развитии проростков *GRUSP* опосредованно стимулирует метаболизм ГК и ГК-зависимые ответы, действуя через регуляцию накопления белков из группы DELLA, репрессоров сигнала ГК [13]. В индукции цветения функция белка *GRUSP* реализуется через снижение уровня флорального репрессора *FLC* и стимуляцию метаболизма ГК и ГК-зависимого пути флоральной индукции [14]. Эти результаты свидетельствуют, что негативная регуляция на транскрипционном уровне является не менее важным результатом при исследовании функции целевого гена и должна рассматриваться на разных этапах развития растения.

Ауксин, еще один ростостимулирующий гормон, либо ингибировал, либо не оказывал заметного эффекта на экспрессию большинства изученных генов *USP* (рис. 3В). Ауксин-регулируемую экспрессию наблюдали только для двух генов: *At3g58450* и *At1g77280*. Уровень транскриптов *At3g58450* незначительно снижался в первые 3 ч обработки ИУК, однако уже спустя 24 ч демонстрировал двукратное увеличение. В случае *At1g77280* была схожая регуляция, однако спустя 24 ч воздействия активация была значительно слабее, и уровень транскриптов *At1g77280* возвращался к исходным значениям. При этом согласно опубликованным данным этот ген относится к ауксин-индуцибельным генам [27].

Выполненный в ходе данного исследования поиск аминокислотных последовательностей, содержащих USP-домен, позволил обнаружить у *A. thaliana* 91 аминокислотную последовательность, соответствующую 56 генам *USP*. Эти результаты уточняют ранее опубликованные исследования [1, 5] и дополняют информацию о белках семейства *USP* в растениях. Анализ транскриптом-

ных карт *A. thaliana* и паттернов экспрессии идентифицированных генов *USP* позволил выделить группу генов, чья транскрипция находится под дифференциальным контролем фитогормон-зависимых факторов. Причем экспрессия большинства изученных генов *USP* индуцируется в присутствии АБК, этилена и МЖ — гормонов, участвующих в формировании устойчивости растений к стрессу. В то же время ауксины и гиббереллины — гормоны, регулирующие рост растений — подавляли экспрессию изученных генов *USP*. Это принципиально новая информация, которая, с одной стороны, еще раз подтверждает, что функциональная активность *USP* растений ассоциирована со стрессовыми воздействиями. С другой стороны, они могут вовлекаться в процессы морфогенеза растений, так или иначе находящиеся под контролем тех же самых гормонов. Среди всех проанализированных генов *USP* наиболее выраженный фитогормональный эффект наблюдали у *At3g58450*, экспрессия которого разнонаправлено регулировалась АБК, АЦК, ИУК и ГК. Наблюдаемая регуляция свидетельствует о важной роли соответствующего белка *GRUSP* на различных этапах формирования растений. Участие *GRUSP* в ГК-опосредованных процессах, связанных с регуляцией прорастания и перехода к цветению, интенсивно исследуется [13, 14]. С нашей точки зрения особый интерес вызывает участие *GRUSP* в АБК-зависимых процессах. Согласно анализу транскриптомов мутантов *abi5* и *abi4/abi5*, дефицитных по генам ключевых регуляторов ответа на АБК, уровень транскриптов *GRUSP* в семенах этих мутантов значительно снижен по сравнению с диким типом, что говорит о возможной взаимосвязи *GRUSP* с путем передачи сигнала АБК [28, 29]. Таким образом, *GRUSP* может играть важную роль во взаимосвязи сигнальных путей различных фитогормонов. Изучение роли *USP* в регуляции роста и развития растений имеет большое значение, поскольку они могут представлять собой потенциально новый и малоизученный класс регуляторных белков.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-34-90017. Работа осуществлена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kerk D., Bulgrien J., Smith D.W., Gribskov M. Arabidopsis proteins containing similarity to the universal stress protein domain of bacteria // Plant Physiol. 2003. Vol. 131. N 3. P. 1209–1219.
2. Nyström T., Neidhardt F.C. Expression and role of the universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli*

during growth arrest // Mol. Microbiol. 1994. Vol. 11. N 3. P. 537–544.

3. Vollmer A.C., Bark S.J. Twenty-five years of investigating the universal stress protein: function, structure, and applications // Adv. Appl. Microbiol. 2017. Vol. 102. P. 1–36.

4. Chi Y.H., Koo S.S., Oh H.T., Lee E.S., Park J.H., Phan K.A.T., Wi S.D., Bae S.B., Paeng S.K., Chae H.B., Kang C.H., Kim M.G., Kim W.-Y., Yun D.-J., Lee S.Y. The physiological functions of universal stress proteins and their molecular mechanism to protect plants from environmental stresses // *Front. Plant. Sci.* 2019. Vol. 10: 750.
5. Bhuria M., Goel P., Kumar S., Singh A.K. Genome-wide identification and expression profiling of genes encoding universal stress proteins (USP) identify multi-stress responsive USP genes in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiol. Rep.* 2019. Vol. 24. N 3. P. 434–445.
6. Jung Y.J., Melencion S.M.B., Lee E.S., Park J.H., Alinapon C.V., Oh H.T., Yun D.-J., Chi Y.N., Lee S.Y. Universal stress protein exhibits a redox-dependent chaperone function in *Arabidopsis* and enhances plant tolerance to heat shock and oxidative stress // *Front. Plant. Sci.* 2015. Vol. 6: 1141.
7. Melencion S.M.B., Chi Y.H., Pham T.T., Paeng S.K., Wi S.D., Lee C., Ryu S.W., Koo S.S., Lee S.Y. RNA chaperone function of a universal stress protein in *Arabidopsis* confers enhanced cold stress tolerance in plants // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18. N 12: 2546.
8. Verma V., Ravindran P., Kumar P.P. Plant hormone-mediated regulation of stress responses // *BMC Plant Biol.* 2016. Vol. 16: 86.
9. Bhuria M., Goel P., Kumar S., Singh A.K. The promoter of AtUSP is co-regulated by phytohormones and abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana* // *Front. Plant. Sci.* 2016. Vol. 7: 1957.
10. Gorshkova D.S., Getman I.A., Voronkov A.S., Chizhova S.I., Kuznetsov V.I., Pojidaeva E.S. The gene encoding the Universal Stress Protein AtUSP is regulated by phytohormones and involved in seed germination of *Arabidopsis thaliana* // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2018. Vol. 479. N 1. P. 105–107.
11. Sauter M., Rzewuski G., Marwedel T., Lorbietke R. The novel ethylene-regulated gene *OsUSP1* from rice encodes a member of a plant protein family related to procaryotic universal stress proteins // *J. Exp. Bot.* 2002. Vol. 53. N 379. P. 2325–2331.
12. Lee L.Y.C., Hou X., Fang L., Fan S., Kumar P.P., Yu H. STUNTED mediates the control of cell proliferation by GA in *Arabidopsis* // *Development.* 2012. Vol. 139. N 9. P. 1568–1576.
13. Gorshkova D.S., Pojidaeva E.S. Members of the Universal Stress Protein family are indirectly involved in gibberellin-dependent regulation of germination and post-germination growth // *Russ. J. Plant Physiol.* 2021. Vol. 68. N 3. P. 451–462.
14. Gorshkova D.S., Getman I.A., Sergeeva L.I., Kuznetsov V.I., Pojidaeva E.S. GRUSP, an universal stress protein, is involved in gibberellin-dependent induction of flowering in *Arabidopsis thaliana* // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2021. Vol. 499. N 1. P. 233–237.
15. Winter D., Vinegar B., Nahal H., Ammar R., Wilson G.V., Provart N.J. An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets // *PLoS One.* 2007. Vol. 8: 718.
16. Zentella R., Zhang Z.-L., Park M., Thomas S.G., Endo A., Murase K., Fleet C.M., Jikumaru Y., Nambara E., Kamiya Y., Sun T.-P. Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2007. Vol. 19. N 10. P. 3037–3057.
17. Uno Y., Furihata T., Abe H., Yoshida R., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000. Vol. 97. N 21. P. 11632–11637.
18. Tatematsu K., Kumagai S., Muto H., Sato A., Watahiki M.K., Harper R.M., Liscum E., Yamamoto K.T. MAS-SUGU2 encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell.* 2004. Vol. 16. N 2. P. 379–393.
19. McGrath K.C., Dombrecht B., Manners J.M., Schenk P.M., Edgar C.I., Maclean D.J., Scheible W.-R., Udvardi M.K., Kazan K. Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of *Arabidopsis* transcription factor gene expression // *Plant Physiol.* 2005. Vol. 139. N 2. P. 949–959.
20. Solano R., Stepanova A., Chao Q., Ecker J.R. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 // *Genes Dev.* 1998. Vol. 12. N 23. P. 3703–3714.
21. Corbineau F., Xia Q., Bailly C., El-Maarouf-Bouteau H. Ethylene, a key factor in the regulation of seed dormancy // *Front. Plant Sci.* 2014. Vol. 5: 539.
22. Gepstein S., Sabehi G., Carp M.-J., Hajouj T., Nesher M.F.O., Yariv I., Dor C., Bassani M. Large-scale identification of leaf senescence-associated genes // *Plant J.* 2003. Vol. 36. N 5. P. 629–642.
23. Song L., Liu D. Ethylene and plant responses to phosphate deficiency // *Front. Plant. Sci.* 2015. Vol. 6: 796.
24. Bari R., Pant B.D., Stitt M., Scheible W.-R. PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants // *Plant Physiol.* 2006. Vol. 141. N 3. P. 988–999.
25. Khan G.A., Vogiatzaki E., Glauser G., Poirier Y. Phosphate deficiency induces the jasmonate pathway and enhances resistance to insect herbivory // *Plant Physiol.* 2016. Vol. 171. N 1. P. 632–644.
26. Mandaokar A., Dinesh Kumar V., Amway M., Browse J. Microarray and differential display identify genes involved in jasmonate-dependent anther development // *Plant Mol. Biol.* 2003. Vol. 52. N 4. P. 775–786.
27. Goda H., Sawa S., Asami T., Fujioka S., Shimada Y., Yoshida S. Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2004. Vol. 134. N 4. P. 1555–1573.
28. Nakabayashi K., Okamoto M., Koshiba T., Kamiya Y., Nambara E. Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed // *Plant J.* 2005. Vol. 41. N 5. P. 697–709.
29. Reeves W.M., Lynch T.J., Mobin R., Finkelstein R.R. Direct targets of the transcription factors ABA-Insensitive1 (ABI1) and ABA-Insensitive2 (ABI2) reveal synergistic action by ABI1 and several bZIP ABA response factors // *Plant Mol. Biol.* 2011. Vol. 75. N 4–5. P. 347–363.

Поступила в редакцию 25.08.2021
 После доработки 19.10.2021
 Принята в печать 27.10.2021

RESEARCH ARTICLE

The effect of phytohormones on the expression of USP encoding genes in *Arabidopsis thaliana* seedlings

D.S. Gorshkova^{1, 2, *} , E.S. Pojidaeva² 

¹Department of Plant Physiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Botanicheskaya st. 35, Moscow, 127276, Russia

*e-mail: dsgorshkova@yandex.ru

Universal stress proteins (USP) are potentially involved in the processes that control plant morphogenesis, in which phytohormones play an important role. In this study, we searched for the genes of *Arabidopsis thaliana* USP that modulate their expression in response to the action of phytohormones. Fifteen *USP* genes have been identified whose expression is differently regulated by two or more phytohormones. Moreover, the accumulation of transcripts of the most studied genes was observed under the action of hormones involved in the formation of plant resistance to stress – abscisic acid, ethylene, and methyl jasmonate. At the same time, auxins and gibberellins, hormones that regulate plant growth, suppressed the expression of the studied *USP* genes. The obtained results revealed potential genes of USP, whose functional activity may be directly or indirectly associated with phytohormone-dependent processes that ensure plant growth under normal and stress conditions.

Keywords: *Absciscic acid, auxins, gibberellins, methyl jasmonate, universal stress proteins, ethylene, Arabidopsis thaliana, GRUSP*

Funding: The research was funded by the Russian Foundation for Basic Research, project no. 19-34-90017.

Сведения об авторах

Горшкова Дарья Сергеевна – аспирант, мл. науч. сотр. кафедры физиологии растений биологического факультета МГУ, мл. науч. сотр. лаборатории экспрессии генома Института физиологии растений РАН. Тел.: 8-499-678-54-25; e-mail: dsgorshkova@yandex.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1663-2710>

Пожидова Елена Станиславовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории экспрессии генома Института физиологии растений РАН. Тел.: 8-499-678-54-25; e-mail: alenapoj@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5106-5707>