

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

**REGULATION OF PHOTOSYNTHETIC ANTENNA FUNCTION
AT THE MOLECULAR LEVEL**

W.I. Gruszecki¹, W. Grudzinski¹, M. Gospodarek², M. Patyra¹, W. Maksymiec³

¹ Department of Biophysics, Institute of Physics,
Maria Curie-Skłodowska University, Lublin
E-mail: *wieslaw@tytan.umcs.lublin.pl*

² Department of General Physics, Institute of Physics,
Lublin Technical University, Lublin

³ Department of Plant Physiology, Institute of Biology,
Maria Curie-Skłodowska University, Lublin

Mechanisms of regulation of light accessory (antenna) function operate at all the organization levels of photosynthetic organisms, including the molecular level. Such a regulation is particularly important under overexcitation conditions, owing to the fact that excess illumination is associated with a risk of photosensitized oxidation leading to degradation of the photosynthetic apparatus. Under overexcitation conditions, a pool of accessory xanthophyll pigment violaxanthin, is transferred from the antenna protein environment to the lipid phase of the thylakoid membrane, where it is subjected to enzymatic conversion to zeaxanthin, within the xanthophyll cycle. According to our recent findings, violaxanthin present outside the largest antenna complex of higher plants, LHCII, induces its specific aggregation. The aggregates are stabilized by formation of hydrogen bonds between the alpha-helices C of the trimeric complexes and they are characterized by efficient chlorophyll singlet excitation quenching. The molecular mechanisms leading to the xanthophyll-induced LHCII aggregation will be analyzed along with the mechanisms responsible for excessive excitation quenching. The hypothetical model of overall regulation of the photosynthetic antenna function at the molecular level will be also presented and discussed.

ЭВОЛЮЦИЯ ТРАНСПОРТА Na⁺: ОТ ПРОКАРИОТ К ВЫСШИМ РАСТЕНИЯМ

Evolution of sodium transport: from procaryots to higher plants

Ю.В. Балнокин, Л.Г. Попова

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, г. Москва
E-mail: *balnokin@yandex.ru*

Общепризнано, что жизнь зародилась в мировом океане. Выбор между Na⁺ и K⁺ в пользу K⁺ как главного катиона, выполняющего осмотическую функцию, участвующего в электрогенезе плазматической мембраны и служащего кофактором ряда ферментатив-

ных реакций, произошел, по-видимому, на самых ранних этапах эволюции. Необходимость выведения из клеток токсических ионов Na^+ , содержащихся в высоких концентрациях в среде и поступающих по градиенту электрохимического потенциала в клетки, очевидно, обусловила появление разнообразных Na^+ -транспортирующих белков в клеточных мембранах древних прокариот. По принципу энергизации транспорта Na^+ эти белки делятся на две группы. Одну из них составляют первично-активные Na^+ -помпы, непосредственно сопрягающие химические реакции превращения субстрата с трансмембранным переносом Na^+ . Другая группа представлена белками, осуществляющими вторично-активный транспорт Na^+ в обмен на H^+ . Эти белки получили название Na^+/H^+ -антипортеров (Krulwich, 1983). Экспорт Na^+ из клеток посредством Na^+/H^+ -антипортеров поддерживается протонным градиентом на плазматической мембране (направленным, соответственно, из среды в клетку) и зависит от функционирования в мембране генератора протонного градиента.

Первичные Na^+ -помпы самой разной природы найдены у прокариот. К Na^+ -помпам относятся локализованные в плазматической мембране некоторых прокариот декарбоксилазы, которые транспортируют Na^+ против градиента электрохимического потенциала за счет энергии, высвобождающейся при декарбоксилировании субстрата. Первичными Na^+ -помпами являются также NADH :убихинон оксидоредуктаза *Vibrio alginolyticus* (Tokuda, Unemoto, 1981, 1984) и Na^+ -транспортирующая метилтрансфераза метаногенных бактерий (Becker, 1992).

В обоих доменах прокариот (царства *Archaea* и *Bacteria*) обнаруживаются разнообразные Na^+ -транспортирующие АТФазы (Grüber et al., 2001). Функция Na^+ -АТФаз у прокариот состоит либо в поддержании низких концентраций Na^+ в цитоплазме, либо в синтезе АТФ за счет $\Delta\mu\text{Na}^+$, образованного другими генераторами – Na^+ -транспортирующими декарбоксилазами, оксидоредуктазами или метилтрансферазами. Во втором случае осуществляется так называемый Na^+ -цикл (Skulachev, 1989). На основании результатов анализа бактериальных геномов сделано предположение, что Na^+ -цикл распространен в мире бактерий весьма широко, по-видимому, он присущ большинству бактерий-патогенов животных и человека (Häse et al., 2001).

Появление в процессе эволюции эукариот, характеризующихся более совершенным, чем у их предшественников, клеточным строением, привело к более узкой специализации клеточных органелл и утрате плазматической мембраной функции энергообеспечения клетки. Таким образом, был утрачен и Na^+ -цикл, который у прокариот протекает в плазматической мембране. Функцию энергообеспечения стали выполнять хлоропласты и митохондрии. Из всего мно-

гообразия Na^+ -транспортирующих систем прокариот в плазматической мембране эукариот сохранились лишь Na^+ -АТФазы Р-типа и Na^+/H^+ -антипортеры. Наиболее хорошо изученной Na^+ -транспортирующей АТФазой эукариот является Na^+ , K^+ -АТФаза животных клеток (царство *Animalia*) (Scheiner-Bobis, 2002). Na^+ -АТФазы обнаружены также в дрожжах (царство *Fungi*) (Benito et al., 2002) и в морской водоросли *Heterosigma akashiwo* (царство *Chromista*) [Shono et al., 1996]. Во фракциях плазмалеммы, выделенных из морских микроводорослей *Tetraselmis viridis* и *Dunaliella maritima* (царство *Plantae*), функционально идентифицированы Na^+ -транспортирующие АТФазы Р-типа и Na^+/H^+ -антипортеры (Balnokin, Poroova, 1994; Poroova et al., 2005). Показано, что у этих примитивных растений Na^+ -транспортирующие АТФазы отвечают за поддержание низких концентраций Na^+ в цитоплазме, а Na^+/H^+ -антипортеры вовлечены в рН-статирование цитоплазматического компартмента клеток (Balnokin et al., 2004; Попова с соавт, 2006). Недавно Na^+ -АТФаза, гомологичная Na^+ -АТФазе дрожжей *S. cerevisiae*, была идентифицирована у мха *Physcomitrella patens* (царство *Plantae*) (Benito, Rodriguez-Navarro, 2003). У высших сосудистых растений Na^+ -транспортирующие АТФазы до настоящего времени не найдены.

Таким образом, в эволюционном ряду организмов растительного царства (примитивные одноклеточные растения – мхи – папоротникообразные – голосеменные – покрытосеменные) Na^+ -АТФазы обнаруживаются только у одноклеточных организмов и мхов. Выход растений на сушу и появление в ходе эволюции сосудистых растений сопровождались утратой Na^+ -АТФаз и передачей функции Na^+ -гомеостатирования цитоплазмы Na^+/H^+ -антипортерам плазмалеммы (Shi et al., 2002; 2002) и тонопласта (Blumwald et al., 2000).

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, гранты № 05-04-48926 и № 06-04-48319.

НОВЫЕ АЛГОРИТМЫ МОРФОГЕНЕЗА

Recent algorithm of morphogenesis

Т.Б. Батыгина

Ботанический институт им. В.Л.Комарова РАН, г. Санкт-Петербург

E-mail: batygina@TB1390.spb.edu

Индивидуальное развитие растительного организма и познание сущности и причин, происходящих в этот период формообразовательных процессов одна, из важнейших проблем морфогенеза. Пе-

ред учеными всего мира все с большей остротой ставится вопрос о новых нетрадиционных подходах и методах, которые позволили бы выявить все потенциальные возможности растительного организма и вместе с тем в более короткие сроки получить новые формы и сорта. Необходимо привлекать эмбриологическую информацию для рассмотрения новых алгоритмов морфогенеза, связанных с изучением развития полового и соматического зародышей, феномена полиэмбрионии и генетической гетерогенности семян.

Феномен полиэмбрионии, рассмотренный нами с позиции ствольных клеток (Batygina, 2006), позволил разработать оригинальную концепцию о гаметофитном апомиксисе. В основе концепции лежат свойства тотипотентности, ствольности и различный генезис клеток зародышевого мешка. В связи с разной относительно детерминированностью клеток «яйцевого» и «антиподального» аппаратов большое внимание уделяется характеристике инициальных клеток полового и дополнительного зародышей при гаметофитной (синергидная, антиподальная) и спорофитной (нуцеллярная, интегументальная, кливажная) полиэмбрионии. Выявление особенностей строения «яйцевого» и «антиподального» аппаратов позволяет управлять процессом образования зародышей, имеющих различное происхождение и генетику.

Изучение зародышевого мешка следует начинать с ценоцитной стадии развития (Батыгина, Васильева, 2003; Batygina, Vasilyeva, 2005). В становлении изолированности яйцеклетки и других клеток можно различить три критических события: 1) инициация фрагментов в 8-ядерном зародышевом мешке; 2) начало изоляции и обособления клеток трех различающихся функционально типов ткани: яйцевого аппарата, антиподального комплекса и центральной клетки; 3) завершение изоляции и формирования клеток яйцевого аппарата и антиподального комплекса (что соответствует зрелому зародышевому мешку). Различные клетки зародышевого мешка в процессе становления приобретают свойство ствольности; они тотипотентны, и таким образом все клетки гаметофита могут нести различную функциональную нагрузку на разных стадиях развития. Рассмотрено множество вариантов образования разных типов зародышей (половой, соматический, партеногенетический) из клеток «яйцевого аппарата» (Батыгина, Виноградова, 2007).

Тотипотентность растительной клетки часто сопровождается поливариантностью матричных процессов и способов репродукции (полового, бесполого и апомиксиса). Механизмы генетической гетерогенности семян в интегрированной таксонспецифичной системе семязачаток-семя сделали возможным прогнозировать генетику клонов, получаемых при различных типах гаметофитного апомиксиса (партеногенез, андрогенез, семигамия) и адвентивной эмбрио-

нии (нуцеллярная, интегументальная и кливажная монозиготическая эмбриония).

Партеногенетические зародыши, сформировавшиеся в результате диплоспории, например, при *Antennaria*- и *Allium*-типах развития зародышевого мешка, имеют одинаковый генотип. Клоны, полученные из партеногенетических зародышей, появляющихся в результате диплоспории при *Taraxacum*- и *Ixeris*-типах развития зародышевого мешка – также унипарентальные, но не идентичны друг другу из-за участия мейоза в их формировании. Явление семигамии позволяет получать новые особи с различной наследственностью клеток химерного зародыша. Клонирование зиготического зародыша при кливажной монозиготической эмбрионии приводит к образованию монозиготных близнецов с бипарентальной наследственностью (пеоны, орхидеи и т.п.). Клонирование эмбриоидов из клеток «dormant» меристемы или из специализированных клеток нуцеллуса и интегумента приводит к образованию клонов с унипарентальной матроклинной наследственностью. Это, несомненно, представляет интерес для генетиков и селекционеров.

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК У РАСТЕНИЙ

DNA methylation in plants

Б.Ф. Ванюшин

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва
E-mail: vanyush@belozersky.msu.ru

У высших растений ДНК сильно метилированы по остаткам цитозина; 5-метилцитозин локализован преимущественно в CGи CNGпоследовательностях. В частности, CNGметилирование вовлечено в замалчивание генов маленькими РНК (RNAsi). Глобальное метилирование ДНК видо-, ткане-, органоид-специфично и уменьшается с возрастом. Метилирование генома – эпигенетический контроль за всеми генетическими функциями, включая транскрипцию и репликацию. Индуцированное 5-азацитидином деметилирование ДНК при формировании зерновки приводит к наследуемому увеличению белковости пшениц. Тем самым, избирательная регуляция метилирования ДНК – новое эффективное средство биотехнологического контроля за продуктивностью растений. Установлено, что репликация сопровождается появлением полуметилированных сайтов в ДНК; возникшая при этом асимметрия метилирования цепей ДНК значительно уменьшается или вовсе исчезает к концу клеточного цикла. На этом основании предложена модель регуляции реп-

ликации ДНК метилированием.

Открыто адениновое метилирование ДНК у растений; N⁶метил-аденин (m⁶A) найден в митохондриальной и ядерной ДНК. У *Arabidopsis thaliana* ген цитозиновой ДНК-метилтрансферазы DRM метилирован как по цитозиновым (CCGG), так и адениновым (GATC) остаткам. Индукция антисмысловых конструкций цитозиновой ДНК-метилтрансферазы (MET1) у трансгенных растений приводит к изменению характера метилирования адениновых остатков в гене *DRM2*. Значит, у растений существует взаимозависимый контроль между адениновым и цитозиновым метилированиями ДНК. Это – новый механизм утонченного эпигенетического контроля сопряженными метилированиями ДНК за функциями генома у эукариот. Гомологичные бактериальным открытые рамки считывания (ORF) для адениновых ДНК-метилтрансфераз найдены в яДНК (но не мтДНК) эукариот (*Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Leishmania major*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Homo sapiens* и другие).

Для углубленного изучения биологической роли метилирования генома, в том числе и сопряженного с метилированием гистонов, получено несколько независимых линий трансгенных растений *Arabidopsis thaliana*, содержащих в геноме под контролем разных индуцибельных промоторов антисмысловые конструируемые генов цитозиновых ДНК-метилтрансфераз СМТ и DRM, адениновой ДНК-метилтрансферазы (m⁶AMTase) и гистоновой метилтрансферазы KRYPTONITE (метилирует Lys в гистоне H). Избирательная индукция экспрессии конструкций, вызывающая нокдаун генов соответствующих ДНК-метилтрансфераз, приводит к серьезным изменениям фенотипических свойств, нарушению роста и развития растений.

Из богатой митохондриями фракции вакуолярных везикул, возникающих при апоптозе у стареющих coleoptилей пшеницы, выделена первая адениновая ДНК-метилтрансфераза высших эукариот. В присутствии S-аденозил-L-метионина (SAM) этот Ca²⁺/Mg²⁺-зависимый фермент (*wadmtase*) метилирует *de novo* остаток аденина в середине последовательности TGATCA у одно- и двутяжевых ДНК, предпочитая одотяжевые структуры. По-видимому, *wadmtase* модифицирует мтДНК и участвует в регуляции репликации митохондрий; не исключено, что она же метилирует и яДНК.

Из coleoptилей пшеницы выделена новая SAM, Ca²⁺/Mg²⁺-зависимая эндонуклеаза WEN, чувствительная к статусу метилирования ДНК. Это явление не было известно для эндонуклеаз высших эукариот, а свойственно лишь некоторым бактериальным рестрикционным эндонуклеазам, что указывает на возможное существование системы рестрикции-модификации генома у растений.

Конкурентные ингибиторы метилирования ДНК Садедозил-Лгомоцистеин и Сизобутиладенозин также активируют гидролиз ДНК этим ферментом. Таким образом, **открыт новый тип регуляции активности эукариотических (растительных) эндонуклеаз**, основанный на их модуляции донором метильных групп и (или) ингибиторами реакции метилирования. По-видимому, WEN участвует в деградации ядерной ДНК при запрограммированной гибели растительной клетки. По некоторым свойствам эндонуклеаза WEN напоминает животную эндонуклеазу G, которая фрагментирует ДНК при апоптозе. Другая выделенная из колеоптилей пшеницы уникальная эндонуклеаза, как и WEN, чувствительна к статусу метилирования ДНК и модулируется SAM, однако в отличие от эндонуклеазы WEN, SAM не активирует, а резко ингибирует активность фермента. Это первый случай с эукариотическими эндонуклеазами, когда SAM подавляет их активность. Иными словами, при благоприятных по содержанию SAM условиях для метилирования ДНК активность одной из нуклеаз подавлена, а другой (WEN) резко увеличена. Таким образом, у **растений открыта система сопряженной регуляции SAM-зависимых** (в том числе чувствительных к статусу метилирования ДНК) **эндонуклеазных активностей с разнонаправленным действием на них эффектора (модулятора) SAM.**

Работа поддержана РФФИ (грант 05-04-48071).

РЕЗУЛЬТАТЫ 30-ЛЕТНИХ СРАВНИТЕЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЗАГРУЗКИ ФЛОЭМЫ АССИМИЛЯТАМИ

The results of comparative research of phloem loading during thirty years

Ю.В. Гамалей, М.В. Пахомова, С.Н. Шереметьев
Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург
E-mail: *kсениачеботар@mail.ru*

Сравнительными исследованиями структуры терминальной флоэмы охвачено 2300 видов, относящихся к 850 родам и 126 семействам из восьми подклассов, входящих в класс двудольных растений. Составленная по материалам исследований типологическая база данных включает информацию: морфологическую (биоморфы), ультраструктурную (признаки структуры клеток флоэмы, обкладки пучков, мезофилла), биохимическую (состав сахаров флоэмного экссудата), сведения об ареалах распространения видов, характеристику места и времени сбора образцов растений, использованных для анатомических и ультраструктурных исследований.

Доклад опирается на всю совокупность этих данных. Он содержит: обзор структурно-функциональных исследований терминальной флоэмы, ревизию представлений о загрузке флоэмы ассимилятами по симпласту и через апопласт, обсуждение причин и последствий эволюционной смены симпластных растений апопластными.

Показано, что русло экспорта ассимилятов из мезофилла во флоэму определяется не в конце загрузочного пути – в терминальной флоэме, а в его начале – в клетках мезофилла. Все препараты, наносимые на поверхность листа, через апопласт загружаются во флоэму, в том числе и у симпластных растений. У этой группы растений фотоассимиляты не загружаются через апопласт не из-за отсутствия помп или переносчиков в клетках терминальной флоэмы, а из-за отсутствия ассимилятов в апопласте. Первичная причина альтернативности двух механизмов загрузки флоэмы – вариации барьерных свойств плазмалеммы и/или тонопласта клеток мезофилла. Методами флуоресцентной микроскопии показана локализация хлоропластов в эндоплазматическом ретикулууме, а первичного пула ассимилятов – в производном от него вакууме. Вакуом интерпретируется как межклеточный подвижный компартмент, формируемый хлоропластами мезофилла с последующей экспансией в направлении точек роста. В удержании ассимилятов внутри вакуома ключевая роль принадлежит тонопласту. Невозможность его преодоления повышает гидростатическое давление в вакууме до уровня, индуцирующего движение потока и формирование плазмодесм между клетками. Потеря тонопластом барьерной для ассимилятов функции ведет к его выходу в апопласт, несовместимому с прокладкой сети плазмодесм и вакуолярного русла экспорта ассимилятов. Убедительным доказательством является обратная зависимость между содержанием сахаров в апопласте и численностью плазмодесм на границе мезофилла и флоэмы.

Принципиальное отличие молодой группы апопластных двудольных (около 20 тыс. видов), становление которой ассоциируется с появлением и экспансией лугово-степной растительности в конце миоцена, – кардинальное изменение барьерных свойств тонопласта, повышение содержания сахаров в апопласте и редукция плазмодесм. Эти изменения могли быть индуцированы дифференциацией климата в миоцене, прогрессирующим развитием дефицита тепла и влаги на значительной территории в этот период. Следствием распада симпласта и выхода сахаров в апопласт стала смена эффективного и энергетически экономичного транспортного канала на не эффективный и не экономичный. Возросшие энергетические расходы на транспорт резко понизили ростовой потенциал вновь формируемых таксонов. Древесные формы роста сменились редуцированными травянистыми, а лесные формации – лугово-степ-

ными.

Таксономический анализ базы данных подтвердил монотипность таксонов до ранга семейств включительно. В порядках и подклассах отмечен параллелизм структурных рядов. Составлены списки семейств, имеющих сходную структуру терминальной флоэмы. В результате наложения этих списков на палеоботанические данные о возрасте семейств установлена специфичность типов терминальной флоэмы и ассоциированных с ними морфологических и функциональных признаков для групп семейств одинакового филогенетического возраста. Анцестральный тип распространен среди семейств *Prodicots*, становление которых относится к меловому периоду. Симпластный тип свойственен семействам *Eudicots* и типам растительности, появившимся в палеогене, апопластный – в неогене. Каждый новый пласт адаптогенеза увенчан специфическими паразитными формами, замыкающими структурные ряды деревьев и трав. На полученном материале обсуждается климатический адаптогенез исследованного комплекса признаков.

Исследование современной географии групп двудольных, классифицированных по типам терминальной флоэмы, начато с середины 90-х гг. XX в. Общая тенденция распределения представителей анцестрального, симпластного и апопластного синдромов найдена связанной с их происхождением и положением в филогенетическом ряду типов. В зонах экстремального климата (полярные области, высокогорья, аридные пустыни) обитают представители группы аркто-альпийских видов и форм двудольных (кустарники, кустарнички, растения-подушки). Всем им свойственны анцестральные варианты организации терминальной флоэмы. Области благоприятного климата, занятые тропическими и субтропическими лесными формациями – царство симпластных двудольных. Чем более гумидным и теплым является климат, тем более продвинутые черты симпластного синдрома демонстрируют представители этой группы двудольных. Лесные формации умеренной и бореальной зон сложены древесными растениями с менее продвинутым комплексом признаков симпластного синдрома. Апопластные травы доминируют в климатических зонах с явно выраженным дефицитом тепла и/или влаги. Здесь они успешно конкурируют и обычно вытесняют древесные растения.

Результаты анализа филогенетических и зональных рядов адаптивных типов двудольных обнаружили их сходство, объяснимое производностью подвижных зональных рядов от постоянного набора адаптивных типов, детерминированного климатической спецификой прошлых эпох. Разновозрастные таксоны всегда различаются по признакам организации терминальной флоэмы. По ее структуре легко установим их филогенетический возраст. Полные по-

вторые климатических ситуаций в длительной динамике, по-видимому, невозможны. История симпластных двудольных – растений с наиболее высокой эффективностью транспорта и роста, возникших в эоцене и продолжающих доминировать в тропических биомах, – завершена. Ни одного нового симпластного вида в неогене не появилось и, видимо, не появится впредь. Расширение группы апопластных двудольных возможно. Результаты исследований таксономического и географического распределения выделенных групп двудольных обсуждаются в контексте проблем глобальных изменений климата и глобальной экологии.

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ
УСТОЙЧИВОСТИ И ПРОДУКТИВНОСТИ РАСТЕНИЙ
В УСЛОВИЯХ ХОЛОДНОГО КЛИМАТА**

Physiological mechanisms of plant adaptability and productivity in cold climate

Т.К. Головки

Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар

E-mail: t_golovko@ib.komisc.ru

Основой жизнедеятельности, роста и продуктивности растений являются процессы превращения энергии, ассимиляции углерода и минеральных элементов. Помимо систем внутренней регуляции, функциональная активность контролируется внешней средой, под которой мы понимаем комбинацию всех биотических и абиотических факторов, действующих на индивидуальные растительные организмы и сообщества (фитоценозы) в их местообитаниях (биотопах). Значительная часть территории России располагается в зоне холодного климата. Рост и развитие растений на Севере ограничивается комплексом факторов, среди которых наиболее значимы недостаток тепла, короткий вегетационный период, бедность и повышенная кислотность почв. Эти факторы оказывают влияние на все стороны жизнедеятельности растений: эффективность роста, накопление и состав биомассы, активность и направленность первичного и вторичного метаболизма, гормональный статус, развитие вегетативной и репродуктивной сферы. Фотосинтетическая активность северных растений варьирует в широких пределах в зависимости от вида, жизненной формы, географической принадлежности и эколого-ценотических условий. Максимальные скорости нетто-фотосинтеза отдельных видов аркто-альпийских и бореальных растений в оптимальных свето-температурных условиях (10-20 °С)

достигают 15-25 мг CO_2 /г сухой массы ч, что сопоставимо со средними величинами, измеренными у адаптированных к Северу сельскохозяйственных культур. Способность фотосинтеза к температурной акклимации проявляется в сдвиге температурного оптимума видимого поглощения CO_2 (в среднем на 3-5 °С) в соответствии с сезонным изменением термических условий среды. Показана чувствительность транспорта электронов в ЭТЦ хлоропластов к супероптимальным температурам. Важную роль в устойчивости и продуктивности фотосинтетического аппарата играет пигментный комплекс, его пластичность определяет способность растений к освоению экотопов с различным световым режимом. Для большинства северных растений характерно относительно высокое содержание каротиноидов, о чем свидетельствует низкое (2-4) соотношение хлорофиллы/каротиноиды. Каротиноиды защищают фотосистемы от фотодеструкции при действии неблагоприятных факторов; образование зеаксантина у световых экотипов способствует снижению избыточного поглощения световой энергии и предотвращает фотоингибирование. У северных растений выработались механизмы, обеспечивающие лучшее снабжение энергией при пониженных и умеренных температурах, что проявляется в активации катаболизма. Растения северных широт характеризуются сравнительно низкой величиной критической температуры дыхания (38-40 °С), но превышают более южные близкородственные виды по скорости дыхания при низких положительных и умеренных температурах. В настоящее время складывается мнение, что рост северных растений больше ограничен недостатком азота, чем тепла. Нами выявлена прямая связь между содержанием азота, накоплением фотосинтетических пигментов и скоростью CO_2 -газообмена в листьях растений природной флоры Приполярного Урала и Южного Тимана (подзоны крайнесеверной и северной тайги). Это означает, что фотосинтетическая активность видов контролируется их азотным статусом. В контролируемых условиях у холодостойкой культуры (ячмень) температурная зависимость роста сильно зависела от обеспеченности элементами минерального питания. При низком питании азотом растения достигали заданной скорости роста и адаптировались к пониженной температуре на метаболическом уровне, что проявлялось в снижении коэффициента Q_{10} теплопродукции и отключении альтернативного пути дыхания. У быстрорастущих растений при оптимальном азотном питании и температуре значительная часть дыхания корней осуществлялась по низкоэнергетическому альтернативному пути.

Большое значение для жизнедеятельности растений на Севере имеют биотические взаимодействия, основанные на симбиозе с бактериями и грибами. Микоризы и микоризные ассоциации являют-

ся важнейшим эволюционным и экологическим фактором. В тундровой зоне микотрофны около 50, а в бореальной – 70 % растений. Микоризы способствуют улучшению водно-минерального питания растений, защите от фитопатогенных организмов и загрязняющих веществ, обеспечивают физиологически активными соединениями. Показано усиление роста и накопления биомассы бобовых при инокуляции селекционными штаммами бактерий по сравнению с аборигенными. Применение препаратов ассоциативных азотфиксаторов способствовало увеличению фотосинтезирующей поверхности и интенсификации продукционного процесса злаковых агроценозов.

В целом, полученные результаты дополняют и углубляют наши представления об адаптации северных растений на разных уровнях организации, создают базу для прогнозирования динамики растительности в изменяющихся условиях.

МОРФОГЕНЕЗ У РАСТЕНИЙ *IN VITRO*

Morphogenesis in plant *in vitro*

Ю.Н. Журавлев

Биолого-почвенный институт ДВО РАН, г. Владивосток

E-mail: ibss@eastnet.febras.ru

Морфогенетический потенциал растительной клетки, ее тотипотентность, обнаруживает себя в системах *in vitro* значительно чаще и в гораздо более широком диапазоне, чем в природных условиях. Сравнивая картину морфогенеза *in vitro* у организмов разной таксономической принадлежности, можно высказать предположение об эволюционной обусловленности у сосудистых растений свойства тотипотентности, в основе которого лежит способность растений к регенерации. В пределах этой обусловленности возможны различные варианты реализации этого свойства. К главным условиям, необходимым для индукции программ регенерации, относятся нарушение целостности и создание асимметрии. В зависимости от того, какими средствами эти условия достигаются, возможны разные морфогенетические сценарии, приводящие к образованию растения-регенеранта. Точное определение путей и способов морфогенеза в условиях *in vitro* имеет большое прикладное значение, однако, именно в работах прикладного характера это определение бывает и приблизительным и ошибочным.

Предложено описание процесса морфогенеза в терминах теории множеств на базе концепции биологических референтов. Произведенная формализация выявляет принципиальные различия в на-

чальных стадиях индивидуального развития в условиях *in vitro* и у интактных растений. Они связаны с уровнем дедифференциации (клетки или ткани), предшествующей образованию структуры, которой предстоит стать новым организмом. Дается интерпретация формальных диаграмм индивидуального развития у растений с позиции представлений о молекулярных механизмах регуляции морфогенеза.

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ БИОГЕНЕЗА ХЛОРОПЛАСТОВ

Hormonal regulation of chloroplast biogenesis

В.В. Кузнецов

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, г. Москва
E-mail: vkusnetsov2001@rambler.ru

Свет является ведущим экзогенным фактором, определяющим развитие хлоропластов. Однако его действие зависит от содержания и функциональной активности эндогенных регуляторов, к которым относятся фитогормоны, прежде всего цитокинины и абсцизовая кислота, и клеточные метаболиты, важнейшую роль среди которых играют углеводы. Хлоропласты являются одной из основных мишеней в действии цитокининов, которые оказывают, главным образом, стимулирующее влияние на многие этапы биогенеза хлоропластов. При этом во многих, но не во всех своих проявлениях цитокинин «заменяет» действие света. Свет и цитокинин имеют очень сложный характер взаимодействия. До недавнего времени действие каждого из этих факторов объяснялось исключительно посттранскрипционной регуляцией. Однако, благодаря достижениям последних лет, ситуация резко изменилась. Два обстоятельства способствовали росту интереса к изучению световой и гормональной регуляции биогенеза хлоропластов.

Во-первых, огромные успехи в изучении структуры и регуляции экспрессии пластидного генома. Определена нуклеотидная последовательность нескольких десятков хлоропластных геномов, выделена хлоропластная РНК-полимераза ядерного кодирования, идентифицированы несколько свет-зависимых цис-элементов и транс-факторов, разработаны очень удобные модельные системы для изучения механизмов хлоропластной транскрипции. Активно изучается роль ядерно-пластидного взаимодействия в развитии хлоропластов.

Во-вторых, достигнут большой прогресс в изучении механизма

действия цитокининов. Открыты мембранные рецепторы цитокининов, гены первичного ответа на цитокинин, доказано присутствие цитокининов в хлоропластах. Показана гормональная регуляция транскрипции пластидных генов. Выделен цитокинин-связывающий белок, участвующий в гормон-зависимой регуляции хлоропластной транскрипции. Обнаружены цитокинины пуринового типа в синезеленых водорослях, которые, согласно симбиотической гипотезе, являются предшественниками хлоропластов высших растений.

Однако, несмотря на успехи последних лет, очень мало известно о рецепции и передаче цитокининового сигнала в хлоропласты. Не изучена роль фитогормонов в ядерно-пластидных взаимодействиях. Не окончательно известно происхождение фитогормонов, локализованных в хлоропластах.

Все это создает новые возможности для анализа и изучения роли цитокинина и света в развитии хлоропластов.

Работа частично поддержана Грантом Президента РФ по государственной поддержке научных исследований, проводимых ведущими научными школами РФ НШ-3692.2006.4.

СВОЙСТВА И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ РЕЦЕПТОРОВ ЦИТОКИНИНОВ

Properties and functioning of cytokinin receptors

Г.А. Романов

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва

E-mail: gar@ippras.ru

Цитокинины были обнаружены в лаборатории Ф. Скуга (США) уже более полвека назад и активно используются в современной биотехнологии, однако только недавно начали открываться основные закономерности молекулярных основ их действия. В 1996 г. японский ученый Т. Какимото впервые высказал предположение о том, что рецептором цитокинина может быть сенсорная гистидинкиназа, а в 2001 г. он же, а также независимо Т. Мицуно с сотрудниками доказали, что сенсорная гистидинкиназа арабидопсиса CRE1/АНК4 является рецептором цитокининов. В настоящее время общепринято, что арабидопсис содержит три рецептора цитокининов – сенсорные гистидинкиназы CRE1/АНК4, АНК3 и АНК2 (обзор см. Романов, 2002). Близкие по структуре рецепторы цитокининов обнаружены у эволюционно далеких от арабидопсиса видов: кукурузы и риса.

Для того, чтобы более детально изучить свойства рецепторов

цитокининов, мы использовали модельную систему на основе трансгенных бактерий (*E. coli*), которые экспрессируют индивидуальные рецепторы цитокининов. У этих бактерий отсутствовала гистидинкиназа RcsC, близкая по структуре к сенсорным гистидинкиназам арабидопсиса. В норме гистидинкиназа RcsC передает сигнал на промотор *cps*-оперона бактерии. Оказалось, что экспрессированные в бактерии рецепторы цитокининов могут замещать отсутствующую RcsC и передавать свой сигнал на *cps*-оперон. Однако передача сигнала происходила только в присутствии активных цитокининов. Это показывало, что растительный рецептор в бактериях находится в функционально-активном состоянии и способен узнавать цитокинины. Для удобства бактерию снабдили репортерной конструкцией *cps::lacZ*. Таким образом, тестирование репортерной активности галактозидазы позволяло оценить степень функциональной активности цитокининового рецептора в бактериях. На данной тест-системе мы сопоставили активность ряда цитокининов и структурно сходных лигандов при их воздействии на бактерии, экспрессирующие различные рецепторы цитокининов: АНК3 или CRE1/АНК4. Оказалось, что при общем сходстве относительных активностей различных цитокининов наблюдаются и определенные различия между рецепторами по интенсивности ответа на те или иные лиганды.

Для более точного анализа лигандной специфичности и основных свойств рецепторов была использована их способность связывать цитокинины. Для проведения этих исследований мы использовали те же бактериальные штаммы, экспрессирующие индивидуальные рецепторы цитокининов арабидопсиса (Romanov et al., 2005, 2006).

Результаты с применением высокоочищенного зеатина показали, что трансгенные бактерии способны специфически связывать цитокинины, но не другие физиологически активные соединения. Были определены важнейшие физико-химические характеристики взаимодействия цитокининов с рецепторами: константа сродства, лигандная специфичность связывания, зависимость связывания от pH и других условий среды. Рассчитанная константа связывания для зеатина составляла 1-2 нМ для АНК3 и 2-4 нМ для CRE1/АНК4, что характерно для высокоаффинных гормон-рецепторных взаимодействий. Установлено, что рецепторы цитокининов CRE1/АНК4 и АНК3, несмотря на сходство общей структуры, существенно различаются по ряду функциональных свойств. Так, CRE1/АНК4 активно связывал флоэмный цитокинин изопентениладенин, тогда как сродство АНК3 к этому цитокинину сравнительно невелико. С учетом того, что рецептор АНК3 экспрессируется большей частью в побегах растения, а CRE1/АНК4 – в корневой системе, становится понятной роль этих рецепторов в поддержании тес-

ного взаимодействия побег-корень целого растения.

Предполагается, что передача цитокининового сигнала рецепторами до генов первичного ответа происходит по «классическому» сценарию для двухкомпонентных систем, с участием белков-фосфотрансмиттеров в качестве челночных переносчиков активного фосфата между мембранным рецептором и ядерными генами первичного ответа. Однако заметную роль в передаче цитокининового сигнала играют и другие регуляторные компоненты, в первую очередь фосфолипаза Д. Фосфатидные кислоты, продукты активности фосфолипазы Д, участвуют в регуляции фосфорилирования клеточных белков, что может сказываться на прохождении сигнала цитокининов. И, наконец, предложенная концепция каскадной регуляции активности генов цитокининами дает представление о том, каким образом гормональный сигнал преобразуется в разнообразные физиологические ответы в растении. Наши данные показывают, что характер и интенсивность ответа клетки на тот или иной цитокинин в значительной степени зависят от того, какие изоформы рецепторов цитокининов представлены в данной клетке или ткани.

Работа поддержана грантами РФФИ 07-04-00331 и 07-04-91211-ЯФ.

ПЕРСПЕКТИВЫ БИОФАРМИНГА И НАНОТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ И СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА НА ОСНОВЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Perspectives of biopharming and nanotechnologies for medicine and agriculture on the base of transgenic plants

Р.К. Саляев

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск
E-mail: salyaev@sifibr.irk.ru

В докладе на наиболее ярких примерах рассматриваются возможности молекулярного биофарминга. Совместными усилиями молекулярных биологов и генетиков конструируются растения, работающие как «биофабрики» для получения большого круга различных соединений, перспективных для медицины, сельского хозяйства и промышленности.

Среди получаемой биофармингом продукции находятся различные ферменты, гормоны роста, новые диагностикумы, моноклональные антитела, различные цитокины, множество антигенных белков, новые противоопухолевые и противозачаточные средства, белки паутины, биоразрушающиеся полимеры и другие весьма перспективные соединения, получаемые на основе трансгенных растений.

С использованием молекулярного биофарминга создаются новые типы вакцин против опасных инфекций. В последнее десятилетие особое внимание исследователей привлекают вакцины орального применения (съедобные вакцины), также получаемые на основе трансгенных растений.

К настоящему времени получены уже десятки оральных вакцин, в частности, против возбудителей холеры, энтерита, гепатитов А, В, С и Е, вируса Норфолка, ротавируса, парвовируса рыб, вируса ящура, бешенства, вируса папилломы, риновируса, вируса геморрагической лихорадки, болезней репродуктивной сферы, СПИДа и ряда других заболеваний.

Показано, что антигены этих вакцин, попадая в кишечник, взаимодействуют с лимфоидными тканями и клетками (Пейеровы бляшки, М-клетки, дендритные клетки) и индуцируют как мукозный, так и общий (гуморальный) иммунный ответ, приводя, в конечном счете, к синтезу специфических антител против того или иного заболевания. Оральные вакцины не несут случайных вирусных или бактериальных белков, способных вызвать нежелательные последствия, а производство их обещает быть более дешевым.

Перспективно производство антител («плантител») в растениях. Есть много примеров получения как одноцепочечных, так и мультимерных антител животных и человека, что открывает возможность использования «плантител» как для иммунотерапевтических целей, так и для аффинной очистки рекомбинантных вакцин.

В биофарминге все чаще используются наносоединения: надмолекулярные комплексы, позволяющие получить новые ценные эффекты, например, сильно снизить дозу вводимых лекарственных соединений или добиться адресности фармацевтика, доставляемого клеткам-мишеням. Наноструктуры используются также для увеличения концентрации вводимых антигенов. Особенно часто применяются так называемые вирусоподобные частицы, на поверхности которых при их ассамблировании концентрируются эпитопы антигенных белков, доступных для антигенулавливающих клеток лимфоидных тканей.

Весьма перспективной представляется генетическая трансформация пластид, так как при этом возникает высокая степень копийности целевых генов, а, следовательно, возрастает и количество антигенного продукта.

В заключение будут приведены результаты завершающего этапа работ по созданию кандидатной оральной вакцины против СПИДа и гепатита В на основе трансгенных томатов, полученной в нашем коллективе совместно с сотрудниками ГНЦ «Вектор», ИХБ и ФМ СО РАН и д-ром Р. Хаммонд (Белтсвилл, США).

Поскольку в некоторых работах по молекулярному биофармингу результаты вышли на клинические испытания, неизбежно возникают вопросы безопасности применения новых препаратов в медицинской практике и их сертификации. Эти вопросы также будут затронуты в докладе.

**ВЫСШИЕ РАСТЕНИЯ В ИСКУССТВЕННЫХ ЭКОСИСТЕМАХ:
ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ**

Higher plants in artificial ecosystems: achievements and perspectives

А.А. Тихомиров, С.А. Ушакова, Г.М. Лисовский
Институт биофизики СО РАН, г. Красноярск
E-mail: *tikhom@ibp.ru*

В искусственных экосистемах высшие растения являются поставщиками растительной пищи и кислорода для человека и регенераторами атмосферы, утилизируя углекислый газ и ряд других газовых компонент. Выращивание растений в замкнутой экологической системе должно отвечать таким требованиям, как эффективное использование лучистой энергии, высокая продуктивность с ограниченных площадей, согласованность интегральной (для всего звена растений) скорости фотосинтеза со скоростью потребления O_2 и выделения CO_2 человеком и другими гетеротрофными компонентами системы, соответствие биохимического состава урожая потребностям человека в растительных компонентах пищи и т.д. Вся технология должна обеспечивать длительную во времени (в принципе, бесконечно длительную) устойчивость и повторяемость всех процессов роста и развития растений. Единственной в мире замкнутой биорегенеративной системой, где выполнены длительные многомесячные эксперименты по поддержанию круговоротных процессов с участием высших растений, является уникальный комплекс БИОС-3 Института биофизики СО РАН. Из всех искусственных биологических экосистем жизнеобеспечения, созданных ранее, только БИОС-3 позволил в автономном режиме обеспечить жизнь экипажа из двух-трех человек в течение четырех-шести месяцев за счет замыкания цикла по воде и газу практически на 100 и пище более чем на 50 %. В решающей степени этому способствовало экспериментальное доказательство того, что для обеспечения высокой степени замкнутости по массообмену перспективным является использование высших растений как основы фотосинтезирующего звена – регенератора атмосферы и поставщика пищи для человека. Проведенные эксперименты, наряду с решением основной научной задачи – доказательством возможности фотосинтетичес-

кой регенерации для человека в замкнутой системе всей атмосферы, воды и частично растительной пищи – показали реальную управляемость и высокую устойчивость процессов роста и развития растений в искусственных условиях, высокую продуктивность и высокую эффективность по таким критериям, как качество продукции, оптимизация энергозатрат и т.д., практически полную независимость от сезонных, суточных и других естественных колебаний природных факторов.

Исследования по созданию биорегенеративных систем с высоким замыканием массообменных процессов потребовали расширение и углубление работ по целому ряду разделов физиологии растений. Так, потребовалось разработать основы светового управления продукционным процессом в замкнутых экосистемах, позволяющих резко интенсифицировать различные стороны продукционного процесса при использовании высокоинтенсивного излучения ФАР и оптимального спектрального состава видимого и теплового диапазонов оптического излучения. Выполнены исследования устойчивости отдельных видов ценозов растений, входящих в фотосинтезирующее звено, к световому и температурному стрессам, что позволяет прогнозировать поведение системы при возникновении ряда аварийных ситуаций в ЗЭС по свету и температуре, оценить особенности продукционного процесса разновозрастных многовидовых фитоценозов. В отношении устойчивости растений представляется важным оценка их уровня толерантности при включении в круговоротные процессы экзометаболитов человека и растительных отходов, колебаниям газового состава атмосферы и ряду других факторов среды. Исключительно важным является обеспечение качества внутрисистемной среды, что требует исследования летучих выделений растений, процессов самоочищения водяной и воздушной сред, стабилизации микрофлоры и других процессов, где роль высших растений крайне важна. Высшие растения являются неотъемлемой частью ЗЭС, и поэтому необходимо выяснять их роль и влияние на условия замыкания биологического круговорота в экосистемах различной степени сложности (сопряжение циклов биогенных элементов, вовлечение в круговорот ряда элементов и соединений, степень замкнутости, устойчивость и надежность массообменных процессов).

В докладе рассматривается комплекс взаимосвязанных физиологических исследований высших растений, обеспечивших прогресс в организации круговоротных процессов с высокой степенью замкнутости для искусственных экосистем космического и земного назначения.

Работа выполнена при частичной поддержке грантов INTAS – ESA 99-00444; INTAS IA-03-59-143; INTAS 05-100008-8010 и интеграционного комплексного проекта № 5.16 СО РАН.