

**Симпозиум 2**

**ГЕНОМ РАСТЕНИЙ  
И РЕГУЛЯЦИЯ ЕГО ЭКСПРЕССИИ**

**ANALYSIS OF GLIADIN ALLELE COMPOSITIONS AT GLI-1 AND GLI-2 LOCI IN CHINESE BEINONG WHEAT****Qijian Yang<sup>1</sup>, А.Ю. Драгович<sup>2</sup>, А.М. Кудрявцев<sup>2</sup>, Tongquan Yu<sup>1</sup>, Xiuxiu Ge<sup>1</sup>**<sup>1</sup> Biotechnology Institute of Beijing Agricultural University, BeijingE-mail: [yangqijian@hotmail.com](mailto:yangqijian@hotmail.com)<sup>2</sup> Vavilov Institute of General Genetics, RAS, MoscowE-mail: [dragova@mail.ru](mailto:dragova@mail.ru)

For many years, Chinese wheat breeding programs have focused on improving traits associated with productivity, mainly due to the pressure of a large population. In recent years, the Chinese wheat-processing industry has been experiencing significant modernization and development to meet the increased demand for diverse industrially manufactured wheat-based foods. Chinese wheat is generally characterized with acceptable protein content, but weak gluten property, and thus inferior quality for mechanized production of bread and noodles. Therefore, improving gluten quality has become one of the major breeding objectives, although starch properties and flour color have also shown importance, particularly in achieving high noodle quality.

Gliadin, a major class of storage proteins in wheat, are heterogeneous mixtures of single-chained polypeptides which are, in their native state, soluble in 70 % aqueous alcohol. In accordance with their mobility in A-PAGE (acid-PAGE), they are divided into four groups:  $\alpha$ - (fastest mobility),  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\omega$ -gliadins (slowest mobility). The molecular weight range is about 30.000 to 75.000 Da. Using one-dimensional electrophoresis, gliadins of a single wheat grain can be separated into 20-25 components. Genes coding these proteins are located on the short arms of group 1 and 6 chromosomes. They are tightly linked genes located at three homologous loci of the group 1 chromosome: Gli-A1, Gli-B1, and Gli-D1 and group 6 chromosomes: Gli-A2, Gli-B2, and Gli-D2 loci. Gli-1 genes code for all the  $\omega$ - and most of the  $\gamma$ -gliadins while Gli-2 genes code for all the  $\alpha$ -, most of the  $\beta$ -, and some of the  $\gamma$ -gliadins. The allelic variation at these loci plays a crucial role in determining dough viscoelastic properties, therefore they are effective and useful genetic markers for wheat breeding programs targeted for gliadin quality improvement.

Being separated by PAGE electrophoresis gliadins form the gliadin electrophoretic spectrum (GES). Almost each wheat variety has its own, unique electrophoretic spectrum. The GES is very similar to the code-bar which any industrial product or goods has now. Like the code-bar the GES could be checked to identify any wheat variety and its purity as well as reveal different biotypes of the heterogenic variety.

The GES is very stable and does not change under different environmental conditions. All these unique characteristics of GES allow to use it during seed purity and authenticity control procedure which is applicable in Russia according to the State law. Recently, the electrophoresis of gliadins was approved as official method for laboratory control of commercial seeds. Plant genetic Lab. Of the N.I. Vavilov Institute is accredited by Russian government as the head laboratory in the National Seed Control Organization. Under Russian Academy of Science grant the N.I. Vavilov Institute of General Genetics is performing the big National project: «Designing of the laboratory equipment complex for the automatic analysis of agricultural plants genetic diversity, seeds authenticity and purity». As result of this project it is planned to be created the unique laboratory complex which allows to perform electrophoretic analysis of seeds prolamins rapidly and with high labor productivity. On the base of this, we received the project of ministry of Scientific and Technological between Russia and China.

In 2005-2006, with GES, 8 BeiNong wheat landraces were investigated for their gliadin allele compositions by acidic polyacrylamide gel electrophoresis. The results suggested that there were 18 types of alleles and 48 gliadin combinations in BeiNong wheat. The genetic variation indexes of the first and the sixth group chromosomes have the similar trend. A's was the highest, B's was the secondary and D's was the lowest. There are 1, 2, 1 and 5 kinds of gliadin blocks in each of the Gli-A1, Gli-B1, Gli-D1 and Gli-B2 loci have not been characterized.

Supported by project of ministry of Scientific and Technological between Russia and China (№ CR10-B-28) and Beijing Science Flat-roof Foundation and Project of Beijing Science committee Foundation (2007 № 16).

#### **МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ 24-ЭПИБРАСССИНОЛИДОМ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНИНОВ В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ**

##### **Molecular mechanisms of cytokinin content regulation by 24-epibrassinolide in wheat seedlings**

**А.М. Авальбаев, Р.А. Юлдашев, Ф.М. Шакирова**  
Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа  
E-mail: *shakirova@anrb.ru*

Ранее в наших исследованиях было показано, что 24-эпибрас-  
синолид (ЭБ) – один из самых активных представителей брассино-  
стероидов – индуцирует в четырехсуточных проростках пшеницы  
быстрое (в пределах 0.5 ч) стойкое двукратное накопление гормо-

нов цитокининовой природы на фоне отсутствия изменений в уровне ИУК и АБК. Для поддержания повышенного уровня цитокининов (ЦК) необходим именно ЭБ, поскольку двукратное увеличение концентрации ЦК в проростках поддерживается в присутствии ЭБ в среде их инкубирования и удаление ЭБ из среды приводит к снижению уровня ЦК до контрольного значения. Выявлено, что ЭБ способен проявлять характерные для ЦК реакции, а именно задерживать распад хлорофилла в отрезках срезанных листьев, повышать активность нитратредуктазы в отсутствие нитрата в среде инкубирования проростков и стимулировать деление клеток апикальной меристемы корней проростков пшеницы. Полученные данные дают основание предполагать, что ЭБ-индуцированное накопление ЦК и поддержание их повышенного уровня имеют важное значение в реализации физиологической активности ЭБ на растения пшеницы. Однако молекулярные механизмы регуляции ЭБ количественного уровня ЦК были неизвестны. В связи с этим предстояло выяснить связано ли ЭБ-индуцированное накопление ЦК с ослаблением их распада и/или с усилением их синтеза.

С целью изучения влияния ЭБ на деградацию ЦК нами было исследовано влияние ЭБ на активность и экспрессию гена цитохромоксидазы (ЦО) – ключевого фермента этого процесса. Ранее нами был синтезирован ПЦР-продукт размером 260 нуклеотидов, соответствующий консервативным участкам гена ЦО кукурузы и мРНК ЦО пшеницы и других злаков, который оказался эффективным в качестве гибридационного зонда для оценки уровня экспрессии гена ЦО в растениях пшеницы. Выявлено, что обработка ЭБ приводит к снижению транскрипционной активности гена ЦО в сравнении с контролем, как в корнях, так и в побегах проростков пшеницы. В то же время детальный анализ содержания ЦК в корнях проростков выявил значительное накопление ЦК уже через 5 мин от начала воздействия ЭБ, что может быть связано и со снижением активности фермента ЦО. Анализ активности ЦО в проростках пшеницы показал, что ЭБ вызывает быстрое ингибирование активности фермента в корнях и побегах проростков пшеницы. Таким образом, выявленный нами эффект ЭБ на быстрое и стойкое накопление ЦК в проростках пшеницы может быть обусловлен снижением под его влиянием активности ЦО и экспрессии гена этого фермента и, следовательно, торможением деградации цитокининовых гормонов.

Вместе с тем, исследование эффекта ЭБ на количественные изменения отдельных свободных форм ЦК показало, что, в ответ на обработку ЭБ, в проростках пшеницы повышается количество изопентениладенозина и зеатиннуклеотида, которые рассматриваются в качестве первичных форм на пути биосинтеза ЦК в расте-

ниях. Эти данные свидетельствуют о возможности усиления под влиянием ЭБ новообразования цитокининовых гормонов. Кроме того, нельзя исключить возможность ЭБ воздействовать на процесс высвобождения ЦК из запасных форм, что может вносить свой вклад в ЭБ-индуцированное повышение уровня ЦК. Для проверки этого предположения мы провели анализ влияния ЭБ на соотношение запасных форм *o*-глюкозидов и активных форм ЦК в 4-суточных проростках пшеницы с использованием фермента глюкозидазы. Интересно, что в контрольных растениях *o*-глюкозиды практически не регистрировались, хотя можно было ожидать, что они могли бы служить резервом для быстрого ЭБ-индуцируемого увеличения пула свободных ЦК. Наоборот, оказалось, что увеличение уровня *o*-глюкозидов происходило в обработанных ЭБ проростках. По-видимому, этот результат можно рассматривать в качестве еще одного довода в пользу участия ЭБ в синтезе цитокининовых гормонов, которые могут быстро превращаться в *o*-глюкозиды.

Полученные данные позволяют приблизиться к пониманию молекулярных механизмов регуляции 24-эпибрассинолидом метаболизма цитокининов в растениях пшеницы.

Работа проведена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 04-04-48853), грантов Президента РФ для молодых кандидатов наук (МК-1838.2006.4) и ведущих научных школ (НШ-3692.2006.4).

#### ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ ГЕНОВ ХЛОРОПЛАСТНЫХ ОПЕРОНОВ ЯЧМЕНЯ

##### Differential transcription of genes in barley chloroplast operons

А.Ю. Алейникова, Я.О. Зубо, В.В. Кузнецов

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: [yanzub@mail.ru](mailto:yanzub@mail.ru)

Хлоропласты унаследовали от своих предков – сине-зеленых водорослей – некоторые прокариотические свойства – оперонная структура генов, характерные для бактерий регуляторные транскрипционные элементы, прокариотическая трансляционная система. Однако в процессе эволюции ими приобретены и некоторые эукариотические признаки – наличие интронов в генах, процесс редактирования РНК. Большинство оперонов состоят из генов, кодирующих белки и/или РНК. Считывание РНК с хлоропластных генов происходит, как минимум, двумя разными РНК-полимеразами – бактериального и фагового типов. Это является одной

из причин того, что для многих оперонов в настоящее время показано наличие нескольких промоторов. Для ряда оперонов характерно наличие внутренних промоторов, с помощью которых РНК считывается только с части генов оперона.

С помощью метода run on транскрипции была изучена интенсивность транскрипции ряда оперонов пластома ячменя. Для данного анализа был выбран метод run on транскрипции, так как он позволяет определять именно интенсивность считывания молекул РНК. Основной транскрипционной системы служили хлоропласты, выделенные из первых листьев ячменя разного возраста (4-х, 9-ти и 18-ти дневные). В ходе реакции транскрипции (длительность 10 мин) во вновь синтезированные молекулы РНК включался радиоактивно-меченный УТФ ( $\alpha^{32}\text{P}$ -УТФ), что позволяло в дальнейшем детектировать только эти транскрипты. Ограниченное время реакции не позволяет процессам деградации существенно повлиять на количество синтезированных транскриптов.

Установлено, что у большинства изученных оперонов гены транскрибируются с различной интенсивностью. Наиболее равномерная транскрипция наблюдалась для гро-оперона, содержащего *groB-groC1-groC2* гены. Необходимо отметить, что это, вероятно, единственный оперон пластома ячменя, состоящий только из генов, кодирующих субъединицы одного белкового комплекса (субъединицы РНК-полимеразы бактериального типа). Другие опероны, также несущие большинство генов одной функциональной группы, характеризовались различиями в интенсивности транскрипции генов. Так, у оперона *rps2-atpI-atpH-atpF-atpA* считывание РНК значительно повышалось (в 7-10 раз) для *atpF* гена по сравнению с предыдущими и последующим геном. Транскрипция гена *psaB* в опероне *psaA-psaB-rps14* также была интенсивнее, как минимум, вдвое, чем транскрипция первого и последнего генов оперона.

Отмечены и значительные изменения в оперонах, содержащих гены, кодирующие компоненты различных функциональных групп хлоропластов. Так, оперон *atpB-atpE-trnV-ndhC-ndhK-ndhJ* характеризуется значительно большей интенсивностью транскрипции генов *atpB* и *trnV*, чем остальных генов (превышение в среднем не менее чем в три раза). Таким образом, в данном опероне мы имеем значительно различающиеся показатели интенсивности транскрипции для генов одной группы (*atp*-гены), изменение транскрипции при чередовании генов различных групп (*atpE-trnV* и *trnV-ndhC*) и одинаковые показатели транскрипции для всех *ndh*-генов. Ситуация, когда при чередовании генов различных групп изменяются и показатели интенсивности транскрипции, наблюдается и для оперона *rrn16-trnI-trnA-rrn23-rrn4,5-rrn5*. В этом опероне интенсивность транскрипции снижается вдвое сразу после первого гена,

т.е. при чередовании генов рибосомальной и транспортных РНК. Однако это единственная позиция для этого оперона, где отмечено значительное изменение скорости считывания РНК.

Таким образом, для многих оперонов обнаружен эффект значительного различия интенсивности транскрипции индивидуальных генов. Исследование оперонов хлоропластов молодых, взрослых и старых растений не обнаружило возрастных особенностей в их экспрессии.

Работа частично поддержана грантами РФФИ № 04-04-48247; НШ-3692.2006.4.

**ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТочНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ  
ЦИТОКИНИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА 70кД  
МЕТОДАМИ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ**

**Investigation of cytokinin-binding protein (70 kD) cell localization  
by electron microscopy**

**В.С. Васильева, А.Л. Лушникова, А.О. Шепеляковская, Д.А. Мошков,  
Л.Л. Павлик, Ф.А. Бровко, О.Н. Кулаева<sup>1</sup>**

Филиал Института биоорганической химии  
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, г. Пущино  
E-mail: [brovko@fibkh.serpukhov.su](mailto:brovko@fibkh.serpukhov.su)

<sup>1</sup> Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва

Транскрипционные факторы играют важную роль в дифференцировке и развитии растительной клетки, а также в разнообразных биохимических программах развития органов растений [Long. and Benfey, *Current Opinion in Cell Biology* 18 (2006) p710-714]. Ранее нами был выделен и охарактеризован цитокинин-связывающий белок 70кД (ЦСБ70) и показана его способность цитокинин-зависимо регулировать синтез РНК [Бровко и др. *Физиология растений* 43 (1996) с. 533-540; Kulaeva et al.. *FEBS Letters* 423 (1998) p. 239-242]. Цель настоящей работы – изучение локализации ЦСБ70 в клетках органов, для которых характерна активность регулируемых цитокининами процессов.

Нами было проведено изучение локализации ЦСБ-70 в клетках и тканях проростка кукурузы с помощью методов электронной микроскопии. Используя биотинилированные антитела к ЦСБ-70 и стрептавидин-золотую метку, выявляли исследуемый белок на ультратонких срезах и изучали их под электронным микроскопом. Удалось показать, что моноклональные антитела, получен-

ные к ЦСБ-70, делятся на две группы, одна из которых способна выявлять белок в пластидах растительных клеток, другая – не способна. С использованием всех моноклональных антител было показано, что ЦСБ-70 в растительной клетке в значительном количестве содержится в ядрах растительных клеток, в особенности – в ядрышках. В нуклеоплазме ядра распределение ЦСБ-70 оказалось весьма неравномерным. Было показано, что в ядрышке концентрация исследуемого белка значительно выше, чем в нуклеоплазме. Небольшое количество ЦСБ-70 также обнаруживалось в цитоплазме растительных клеток. В вакуолях и митохондриях ЦСБ-70 отсутствовал. С использованием антител, способных выявлять ЦСБ-70 в пластидах, нами было показано, что распределение ЦСБ-70 в этих органеллах может быть различным. В амилопластах кончика корня содержание ЦСБ-70 оказалось высоким. В пропластидах в кончике корня и листе концентрация ЦСБ-70 была низка. В этиопластах листьев содержание ЦСБ-70 оказалось связанным со степенью развития мембранной системы органелл. На ранних этапах ее формирования пластиды содержали небольшое количество исследуемого белка, в пластидах с хорошо сформированным проламеллярным тельцем концентрация ЦСБ-70 также была невысокой, а в этиопластах с промежуточной степенью развития системы мембран содержание ЦСБ-70 оказалось довольно высоким.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ: № 05-04-49411; № НШ-3692.2006.4.

**ЗНАЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЭКСПАНСИНОВ  
И АКВАПОРИНОВ ДЛЯ ПОДДЕРЖАНИЯ РОСТА И ОВОДНЕННОСТИ  
РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ И ЯЧМЕНЯ ПРИ ОСМОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ**

**Importance of changes in expression of expansins  
and aquaporins genes for maintaining growth and hydration  
of maize and barley plants under salt stress**

**Д.С. Веселов, Л.Б. Высоцкая**  
Институт биологии УНЦ РАН, г. Уфа  
E-mail: [veselov@anrb.ru](mailto:veselov@anrb.ru)

Вода и ионы неравномерно распределены в почве, и быстро растущие корни часто попадают в очаги с пониженной влажностью или повышенной концентрацией ионов, в результате чего возникают проблемы с ее поглощением. Дефицит воды в первую очередь подавляет рост растяжением поделившихся клеток. В этих



условиях для растения важно поддерживать рост листа, поскольку от этого зависит формирование фотоассимилирующей поверхности. Среди механизмов, обеспечивающих поддержание роста листа при дефиците воды, важная роль принадлежит процессам, которые приводят к изменению растяжимости клеточных стенок и активности водных каналов. Вместе с тем, молекулярные механизмы, лежащие в основе этих процессов, остаются слабо изученными. Совместно с сотрудниками ИБГ УНЦ РАН (А.В. Чемерис) нами было изучено влияние осмотического стресса, вызванного добавлением в питательный раствор нейтрального осмотика ПЭГ или NaCl, на экспрессию гена *ехр-1*, кодирующего белок экспансин у растений кукурузы. Известно, что экспансины необходимы для роста клеток растяжением, а увеличение их экспрессии способствовало поддержанию роста корней при дефиците воды. Нами впервые показано быстрое (в течение 15-30 мин) увеличение уровня экспрессии гена *ехр-1* в листьях растений под влиянием как засоления, так и действия нейтрального осмотика. Обнаружено, что повышение уровня экспрессии гена предшествовало и могло быть причиной возобновления роста листа растяжением, которое вслед за его транзиторным прекращением было зарегистрировано с помощью чувствительного датчика роста. Возобновление роста листа при засолении и действии ПЭГ происходило на фоне накопления ИУК в зоне роста листа. Нами показано, что экзогенный ИУК повышал экспрессию гена *ехр-1*, что указывает на возможное участие ауксинов в поддержании роста листа при дефиците воды. При осмотическом стрессе нами также зарегистрированы изменения в содержании цитокининов, которые происходили параллельно с изменением скорости роста листа: содержание гормонов падало одновременно с прекращением роста и возрастало перед его возобновлением. Данные литературы о влиянии цитокининов на стабильность матрицы экспансинов позволяют объяснить параллелизм в изменении содержания цитокининов и скорости роста листа.

Второй важный фактор, от которого в многоклеточном организме может зависеть скорость роста клеток растяжением – это гидравлическая проводимость на пути воды к растущим клеткам. Совместно с В. Фрике (Университет в Пасли, Шотландия) нами изучено влияние засоления на растения ячменя. При действии засоления обнаружено накопление АБК как в дифференцированной, так и в растущей части листа. Причем, накопление АБК в зоне роста происходило быстрее и было более значительным, чем в дифференцированной части листа. На фоне накопления АБК происходила транзиторная активация экспрессии гена аквапорина HvPIP1;6 (№ регистрации в EMBL CO720031) в зоне роста листа.

Более высокий уровень экспрессии этого гена в зоне роста по сравнению с остальными частями листа, указывает на роль кодируемых им водных каналов в обеспечении притока воды, необходимого для поддержания роста растяжением. Поскольку по данным литературы АБК способна индуцировать экспрессию генов аквапоринов, накопление этого гормона в зоне роста является вероятным индуктором повышенной экспрессии гена HvPIP1;6, что должно способствовать поддержанию роста при засолении.

Совместно с проф. Х. Джонсом (Университет в Данди, Шотландия) нами изучено влияние засоления на уровень экспрессии у ячменя другого гена из класса аквапоринов, имеющего высокий уровень гомологии с геном риса PIP2.2. В отличие от листьев в корнях обнаружено снижение активности гена аквапорина при засолении, которое проявлялось раньше и в большей степени у более солеустойчивой линии ячменя (20-45). В литературе обсуждается функциональное значение снижения активности и уровня экспрессии аквапоринов корней, которое может способствовать сохранению их оводненности в условиях дефицита воды. Полученные нами данные о содержании воды и уровне экспрессии генов аквапоринов в корнях растений соответствуют этой гипотезе: на фоне засоления содержание воды в корнях выше у растений, у которых экспрессия генов аквапоринов была сильнее подавлена. Вместе с тем, снижение активности аквапоринов в корнях способствует возрастанию сопротивления на пути воды в побег и увеличению дефицита воды в побеге. В этих условиях, обратная реакция, которую мы наблюдали в листе (увеличение уровня экспрессии гена экспансина), компенсирует возрастание гидравлического сопротивления в корнях за счет его уменьшения на пути воды в листьях от ксилемных сосудов к растущим клеткам листа.

Таким образом, регуляция экспрессии генов экспансинов и аквапоринов, которая по-разному реализуется в органах растений, обеспечивает поддержание оводненности клеток и их роста растяжением при дефиците воды, вызванном осмотическим стрессом.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 06-04-49276.

**ABF ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ  
В НОВОМ МОДЕЛЬНОМ РАСТЕНИИ *THELLUNGIELLA SALSUGINEA***

**ABF transcription factors in a new model plant *Thellungiella salsuginea***

**Д.А. Высоцкий, А.Н. de Boer<sup>1</sup>, А.В. Бабаков**

Всероссийский научно-исследовательский институт  
сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, г. Москва  
E-mail: [den\\_vis@mail.ru](mailto:den_vis@mail.ru)

<sup>1</sup> Vrije Universiteit, Amsterdam

Воздействие такими стрессовыми факторами, как низкие температуры, засоление почвы и засуха, приводит к увеличению содержания в тканях растений фитогормона абсцизовой кислоты (АБК). Этот фитогормон играет важную роль в работе сложного механизма защитных реакций в растительной клетке в ответ на эти воздействия. Многие из АБК-зависимых физиологических процессов сопровождаются изменениями в экспрессии целого ряда генов. Установлено, что в *Arabidopsis* в ответ на воздействие АБК меняется экспрессия более чем 1300 генов.

Благодаря большому количеству экспериментов, проведенных различными исследователями, определены цис-регуляторные элементы различных генов, ответственные за реакцию на стресс и, в частности, на АБК. Многие из этих элементов, известных как ABRE (ABA-responsive element), содержат мотив ACGT. Благодаря исследованиям белков, взаимодействующих с ABRE, был выделен особый класс факторов транскрипции, названных bZIP (basic region/ leucine zipper motif – основная область/ мотив лейциновой молнии). В *Arabidopsis* известны десятки членов этого семейства, и среди них, в частности, четыре фактора транскрипции ABF1-4 (ABRE binding factor – ABRE связывающий фактор), относящихся к одному из 10 подсемейств и продемонстрировавших регуляторную функцию в ответных реакциях на солевой и холодной стрессы.

В настоящее время во всем мире ведутся интенсивные исследования нового модельного объекта – *Thellungiella salsuginea* (сем. *Brassicaceae*) – растения близкородственного *Arabidopsis*. Это растение проявляет устойчивость к засолению, холоду и другим абиотическим факторам значительно более высокую, чем *Arabidopsis*, поэтому с ним связаны надежды в изучении молекулярно-генетических аспектов устойчивости к стрессовым факторам.

Цель настоящей работы – идентификация генов, кодирующих в *Thellungiella salsuginea* факторы транскрипции, аналогичные ABF факторам *Arabidopsis*, изучение их роли в АБК-зависимом пути передачи сигнала в ответ на солевой стресс, а также взаимодей-

ствие с регуляторными белками 14-3-3, которые, как показывают результаты ряда исследований, могут влиять на активность факторов транскрипции, связываясь со специфическим мотивом в аминокислотной последовательности этих белков.

Используя метод RACE-PCR, нами установлены полные нуклеотидные последовательности кДНК, кодирующие в *Thellungiella* гомологи факторов транскрипции ABF2 и ABF4 *Arabidopsis*, и частичные – факторов транскрипции ABF3 и ABF4. Гомология нуклеотидных последовательностей исследуемых факторов транскрипции *Thellungiella* и *Arabidopsis* составляет в среднем 77%, гомология аминокислотных последовательностей – 80%.

Методом RT-PCR была проанализирована экспрессия генов гомологов ABF2 и ABF4 под влиянием засоления на трех экотипах *Thellungiella* «Саратов», «Якутск» и «Бэй» (Казахстан). В контрольных растениях *Thellungiella*, не подверженных засолению, гомологи ABF2 и ABF4 постоянно экспрессируются на определенном уровне. При воздействии стресса наблюдается незначительное повышение уровня экспрессии этих генов. Из литературных данных известно, что в растениях *Arabidopsis* не наблюдается экспрессии ABF-генов в отсутствие стрессовых факторов. В отличие от *Thellungiella* при солевом воздействии на растения *Arabidopsis* экспрессия ABF2 и ABF4 резко повышается. Возможно, именно постоянный и невысокий уровень экспрессии этих генов в нормальных условиях играет стабилизирующую роль в *Thellungiella* на ранних этапах стрессового воздействия, и поэтому в этом растении не наблюдается резкого возрастания экспрессии гомологов факторов транскрипции ABF2 и ABF4.

**ТРАНСЛЯЦИОННЫЕ И ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ СОБЫТИЯ  
В ЗАРОДЫШАХ ПОКОЯЩИХСЯ РЕКАЛЬЦИТРАНТНЫХ СЕМЯН КОНСКОГО  
КАШТАНА ПРИ СТРАТИФИКАЦИИ**

**Transcriptional and translational events in embryos  
of dormant recalcitrant horse chestnut seeds during stratification**

Н.А. Гумилевская, М.И. Азаркович<sup>1</sup>

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

<sup>1</sup> Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, г. Москва

E-mail: m-azarkovich@mail.ru

Исследована возможная роль стратификации в регуляции экспрессии генов (на уровне синтеза белка). Впервые охарактеризована *in vivo* белок-синтезирующая способность осевых органов и семядолей зародыша рекальцитрантных семян в период глубокого покоя и при раннем прорастании в условиях стратификации.

Установлено, что основная масса белков, синтезируемых изолированными осями, сосредоточена в цитозоле и относится к фракции термолабильных белков. Число и тип синтезируемых изолированными осями полипептидов очень мало изменяются на протяжении всей стратификации, до начала видимого прорастания. Это может означать, что в период покоя и постепенного выхода из него в осях рекальцитрантных семян конского каштана экспрессируется постоянный набор генов, мРНК которых были синтезированы в период развития семян и сохраняются в период покоя. Изменения в экспрессии генов на уровне синтеза белка мы наблюдали только при проклевывании и прорастании семян.

Белок-синтезирующая способность обнаружена не только в зародышевых осях каштана, но и в клетках запасочной паренхимы семядолей и черешках семядольных листьев. Фрагменты семядолей и черешки семядольных листьев, инкубированные в присутствии меченой аминокислоты, синтезируют сходный с осями набор полипептидов.

Показано, что оси и семядоли, изолированные из покоящихся и стратифицируемых семян, способны поглощать меченую аминокислоту и включать ее в белки не только при 28°, но и при 5°, т.е. при температуре стратификации. Спектр синтезируемых при этом полипептидов оказался очень сходным. Из этого следует, что во время длительной стратификации в клетках семян может происходить новообразование белков.

Полученные результаты говорят о том, что клетки осей и семядолей в зрелых покоящихся семенах конского каштана обладают компетентным аппаратом трансляции и способны обеспечить синтез белка на протяжении всего периода холодной стратификации. Синтез белка, который способны осуществить изолированные оси, не зависит от транскрипции и мало меняется количественно и качественно в ходе стратификации до начала прорастания. Очевидно, неспособность покоящихся семян прорасти вызвана не дефектом в трансляционной системе, а может быть связана с отсутствием экспрессии определенных генов, кодирующих белки, необходимые для прорастания, или же с экспрессированием генов, ингибирующих прорастание.

Была исследована РНК-синтезирующая способность зародышевых осей. Установлено, что меченый уридин, предоставленный осям при их инкубации с водой при соответствующей температуре (28°), легко проникает в клетки осевых органов. Показано, что регистрируемая в ТХУ-нерастворимом материале радиоактивность действительно принадлежит РНК и отражает реальный процесс транскрипции, а меченый уридин может быть использован для исследования РНК-синтезирующей способности осевых органов рекальцитрантных семян. Полученные в работе результаты пока-

зали, что оси, выделенные из зрелых покоящихся и стратифицированных семян, способны *in vivo* синтезировать РНК при импульсном мечении уридином при оптимальной температуре. Уровень поглощения и включения уридина остается постоянным в ходе стратификации, однако в осях проросших семян включения было более низким, а поглощение возрастало. Уровень включения уридина в суммарную РНК не менялся при инкубации в присутствии АБК и альфа-аманитина. Таким образом, нами продемонстрировано, что клетки осевых органов рекальцитрантных семян конского каштана, находящихся в метаболически активном состоянии, но не способных прорасти, обладают активным аппаратом транскрипции и способны осуществлять синтез полинуклеотидов при благоприятных условиях температуры и влажности. Отсутствие ростовой активности у покоящихся семян может быть связано с дефицитом синтеза того или иного типа РНК. Характеристика преобладающих типов РНК в осях при стратификации и взаимосвязь синтеза РНК с ростовой активностью представляют интерес для дальнейших исследований.

Таким образом, впервые показано, что геном и аппарат транскрипции в клетках осевых органов и семядолей зрелых покоящихся рекальцитрантных семян конского каштана находятся в активном состоянии, и изолированные оси и семядоли способны синтезировать РНК и белки в период глубокого покоя, его преодоления и при прорастании.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 03-04-48156).

**ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ КУКУРУЗЫ (*ZEA MAYS L.*)  
К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ ЗА СЧЕТ ВВЕДЕНИЯ ГЕНА Fe-SOD  
ИЗ *ARABIDOPSIS THALIANA***

**Elevation of maize resistance (*Zea mays L.*) to oxidative stress  
by insertion of the gene Fe-SOD from *Arabidopsis thaliana***

**С.А. Данилова, А.В. Демиденко, Н.В. Радионов, В.В. Кузнецов**  
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: svdan@yandex.ru

Многочисленные исследования показали, что уровень устойчивости растений ко многим стрессам часто коррелирует с уровнем активности определенных изоформ СОД и что ферменты этой группы играют особую роль в окислительном стрессе. Чтобы выявить роль индивидуальной изоформы СОД в повышении устойчивости растений к стрессу, были получены трансгенные растения кукурузы со сверхэкспрессией Fe-SOD. Эти растения были получе-

ны методом агробактериальной трансформации с использованием штамма AGL1, содержащего вектор с геном, который кодирует локализованную в хлоропластах феррум-супероксиддисмутазу арабидопсиса, соединенную с транспептидом малой субъединицы рибулособисфосфат карбоксилазы, направляющим синтезированный в цитоплазме белок в хлоропласты.

В трансгенных растениях кукурузы второго поколения ( $T_2$ ) тотальная активность СОД превосходила уровень активности фермента в контрольных растениях в среднем в три раза. При проведении окислительного стресса, листья кукурузы  $T_2$  выдерживали в течение 20 час в темноте в водном растворе метилвиологена (MV) концентрацией 600 нМ (оптимальные условия для выполнения эксперимента были подобраны в предварительных опытах). В проведенных экспериментах сравнивали тотальную активность СОД трансформированных растений с контрольными растениями. Полученные данные показали резкое повышение активности СОД при обработке растений MV. Активность СОД трансгенных растений при окислительном стрессе значительно превосходила активность фермента в нетрансформированных растениях (среднем в семь раз). Окислительный стресс, созданный под влиянием метилвиологена, приводил к резкой и хорошо воспроизводимой активации СОД в трансгенных растениях. Полученные результаты являются хорошей основой для дальнейшего изучения физиологических особенностей полученных трансгенных растений.

Работа частично поддержана грантом НШ-3692.2006.4.

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АБК НА СТАРЕНИЕ ЛИСТЬЕВ  
И ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН МУТАНТОВ *ARABIDOPSIS*  
С ВЫКЛЮЧЕННЫМИ ГЕНАМИ – ГОМОЛОГАМИ ГЕНА *cip 2.1*  
ЛЮПИНА ЖЕЛТОГО ДЛЯ ДАЛЬНЕЙШЕГО ВЫЯСНЕНИЯ ФУНКЦИИ**

**Studies of ABA effect on leaf senescence and seed germination  
of *Arabidopsis* mutants carrying knock out genes homologs  
of the gene *cip 2.1* of *Lupinus luteus* for further clarifying its function**

**А.В. Демиденко, Н.В. Кудрякова, О.Н. Кулаева, В.В. Кузнецов**  
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: artem.ipp@gmail.com

Методом дифференциального дисплея была выделена кДНК, соответствующая мРНК которой дифференциально регулируется цитокинином (БАП, 22 мкМ) и абсцизовой кислотой (АБК, 76 мкМ).

Ген представлен одной копией в геноме люпина (*Lupinus luteus*), что было показано методом Саузерн-гибридизации. По последовательности белка из люпина найдены три гомолога этого белка в *Arabidopsis thaliana* и по одному в рисе и томатах.

Для гомологов из *A. thaliana* обработаны данные по гибридизации мРНК с чипами 25К фирмы Affimetrix, представленные в публичный доступ на сайте [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org). Обнаружен выраженный ответ генов-гомологов *cir 2.1* из *A. thaliana* на различные воздействия (холод, АБК, соль), проявляющийся в существенном изменении уровня мРНК по отношению к контрольным вариантам. С помощью ПЦР-скрининга отобраны чистые линии растений *A. thaliana* с нокаутированными генами-гомологами *cir 2.1*: At1g21670 и At4g01870.

Для подтверждения данных, полученных *in silico*, было проведено исследование прорастания семян при обработке АБК и ее влияния на старение листьев растения. Чистые линии *Arabidopsis thaliana* с инактивированными генами At1g21670 и At4g01870, гомологичными АБК-индуцируемому гену *cir 2.1* *Lupinus luteus*, обнаружили повышенную чувствительность к воздействию абсцизовой кислоты. Листья всех трех мутантных линий в условиях искусственного старения *in vitro*, индуцированного срезанием и темнотой, выявили ускоренную по сравнению с диким типом потерю хлорофилла при воздействии АБК, зависимую от дозы гормона. В отсутствие АБК снижение содержания хлорофилла у мутантов не отличалось от динамики изменения его уровня у дикого типа как при старении *in vitro*, так и при естественном старении. Все три мутанта не имели видимых фенотипических отличий от исходной формы на всех стадиях онтогенеза, но проявили несколько замедленную скорость прорастания стратифицированных семян, особенно в темноте.

Полученные результаты позволяют сделать предположение о вовлечении белка *cir 2.1* из *Lupinus luteus* и его гомологов из *A. thaliana* в процессы, регулируемые АБК, либо в процессы передачи сигнала от данного гормона. Участие этих генов в метаболизме цитокинина и, возможно, АБК маловероятно, поскольку в листьях розеток не обнаружено существенных различий в эндогенном уровне этих гормонов между растениями дикого типа и мутантами.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 07-04-01398; НШ-3692.2006.4.



**ДЕТЕРМИНАЦИЯ ГЕНАМИ ТЕМПОВ И ТИПА РАЗВИТИЯ  
ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ  
У ИЗОГЕННЫХ ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ И СОИ**

**Determination by genes of tempos and type  
of development physiological-biochemistrical processes  
in near-isogenic lines of soybean and wheat**

**В.В. Жмурко, О.А. Авксентьева**

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, г. Харьков  
E-mail: [zhmurko@univer.kharkov.ua](mailto:zhmurko@univer.kharkov.ua)

Продолжительность онтогенеза, а также тип развития растительного организма – эволюционно сложившийся, наследственно закрепленный признак. Однако под влиянием внешних условий продолжительность индивидуального развития растительного организма может существенно изменяться. Переход растения от вегетативного состояния в генеративное контролируется несколькими системами генов. У пшеницы это система генов *Vrn* – потребности в яровизации, определяющая тип развития (яровой/озимый), система генов *Ppd* – чувствительности к продолжительности фотопериода и система генов *ps* – скороспелости как таковой. У сои в регуляции скорости развития ведущая роль принадлежит системе генов *EE* – продолжительность периода до цветения (*early*) или чувствительности к фотопериоду. Корректное изучение детерминации физиолого-биохимических процессов теми или иными генами возможно только на изогенных линиях (*near-isogenic lines*), имеющих минимальные различия по всем генам, кроме маркирующих конкретные признаки. На кафедре физиологии и биохимии растений Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина поддерживаются коллекции почти изогенных линий мягкой пшеницы *Triticum aestivum L.* по системе генов *Vrn* 1-3 (моно- и дигеннодоминантные) и *Ppd* 1-3 (моногогеннодоминантные), а также изогенных линий сои *Glycine max. (L.) Merr* по системе генов *EE* 1-3 (моно- и дигеннодоминантные), которые используются в исследованиях. В работах по генетике развития растений достаточно широко изучены генетические аспекты проявления эффектов генов *Vrn*, *Ppd* и *EE*. Однако детерминация ими физиолого-биохимических процессов, которые могут определять темпы развития растений, практически не исследована. Цель данной работы – выявление возможных эффектов генов, контролирующих тип и скорость развития изогенных линий пшеницы и сои, на углеводный обмен, фитогормональный баланс и активность окислительно-восстановительных ферментов. Результаты изучения темпов развития моногогенно доминантных изогенных линий по генам

Vrn показали, что период всходы-колошение наиболее продолжительным был у линии Vrn 22. У растений этой линии активность каталазы была ниже, а пероксидазы и полифенолоксидазы – выше, чем у линий Vrn 11 и Vrn 33. Изучение дневной динамики углеводов показало, что в течение дня в листьях линии Vrn 22 накапливалось углеводов больше, чем у линий Vrn 11 и Vrn 33. Эти различия могут определяться не только способностью линии Vrn 22 к более интенсивному накоплению, но более интенсивным дневным оттоком углеводов у линий Vrn 11 и Vrn 33. Результаты исследования фитогормонального баланса показали, что у быстроразвивающихся линий содержание ИУК и ГК было существенно, а ЦК – незначительно выше, в то время как АБК – значительно ниже, чем у медленно развивающихся линии Vrn 22 и озимого сорта (полный рецессив по генам Vrn 1-3). Отношение ростактивирующей гормон / АБК у быстроразвивающихся линий выше, чем у медленно развивающихся линии и озимого сорта. Наибольший эффект на фитогормональный статус, уровень углеводов в листьях и апикальных меристемах и активность оксидаз проявляет доминантный ген Vrn 22. Вероятно, эффекты генов Vrn на исследованные процессы являются одним из важных факторов регуляции темпов развития мягкой пшеницы. Моногеннодоминантные изогенные по Ppd генам линии пшеницы различались по чувствительности к короткому фотопериоду – в наибольшей мере переход к колошению замедляла линия Ppd 22. Линии Ppd 11 и Ppd 33 проявляли низкую фотопериодическую чувствительность, т.е. в условиях короткого дня незначительно (на 10 и 5 дней соответственно) колосились позже, чем на длинном дне. Изучение эффектов генов Ppd на углеводный обмен показало, что исследованные линии существенно различались по накоплению и оттоку водорастворимых сахаров и фруктозанов, активности инвертазы и амилазы. Наибольший эффект на обмен углеводов выявлен для гена Ppd 33. Линия, несущая эти доминантные гены, в наименьшей мере изменяла темпы развития под влиянием короткого дня. Изогенные по генам EE линии сои различались по реакции на длину дня: линии с генотипом  $E_1E_2E_3$  проявляли сильную короткодневную реакцию, а с генотипом  $e_1e_2e_3$  – фотопериодически нейтральную. В условиях короткого дня эти линии различались по интенсивности накопления водорастворимых углеводов, крахмала, амилозы и амилопектина в его составе, по интенсивности их оттока в течение ночи короткодневного цикла, активности сахарозофосфатсинтазы, инвертазы и амилазы, а также активности ИУК и АБК в листьях. Полученные данные дают основание предположить, что гены типа развития и фотопериодической чувствительности детерминируют исследованные физиолого-биохимические процессы, которые обеспечивают изменения темпов развития растений.

## РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ ХЛОРОПЛАСТНЫХ ГЕНОВ ЦИТОКИНИНОМ

## Chloroplast gene transcription regulation by cytokinin

Я.О. Зубо, М.В. Ямбуренко, А.К. Кравцов, А.Ю. Алейникова,  
С.Ю. Селиванкина, Н.К. Зубкова, Н.В. Кудрякова, К. Лире<sup>1</sup>, О.Н. Кулаева,  
Т. Бернер<sup>1</sup>, В.В. Кузнецов

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: [yanzub@mail.ru](mailto:yanzub@mail.ru)

<sup>1</sup> Институт биологии Гумбольдского университета, г. Берлин

Свет и цитокинин – два важнейших фактора регуляции биогенеза хлоропластов. Несмотря на огромный прогресс в последнее десятилетие в познании механизма световой регуляции развития хлоропластов, особенно в изучении процесса транскрипции, до наших исследований ничего не было известно о роли цитокинина в регуляции транскрипции хлоропластного генома. В связи с этим задача работы заключалась в изучении возможности участия цитокининов в регуляции экспрессии индивидуальных хлоропластных генов на уровне транскрипции.

Исследования проводили на первом листе ячменя сорта «Луч», выращенного в условиях фитотрона при 16-часовом световом периоде, температуре 20 °С и интенсивности освещения 270 μmol/m<sup>2</sup>s. Первые листья отделяли от четырех-, девяти- или 22-дневных растений ячменя и раскладывали на влажную фильтровальную бумагу на 24 час при постоянном освещении (этап прединкубации). После этого листья перекладывали на раствор 6-бензиламинопурина (2×10<sup>-5</sup> М) или на воду (контроль) на 3 час в условиях постоянного освещения (этап инкубации). После обработки цитокинином из листьев выделяли хлоропласты и использовали их для *run on* транскрипции, которая позволяет оценить скорость накопления вновь синтезированных транскриптов.

Показана дифференциальная регуляция цитокинином транскрипции хлоропластных генов. Наиболее активируемая транскрипция обнаружена для 13 генов – *rpl16*, *matK*, *trnEY*, *petLG*, *petD*, *rps14*, *rbcL*, *rrn16*, *atpB*, *rps16*, *rps4*, *ndhC*, *rrn23*, которые принадлежат к разным функциональным группам и разным оперонам.

Установлена зависимость гормональной регуляции транскрипции от возраста растений и фрагмента листа, используемого для выделения хлоропластов. В листьях девятидневных проростков регуляция была обнаружена только в апикальной части листа. В старых 22-дневных листьях, вероятно, из-за интенсивного старения регуляция транскрипции была обнаружена только для части генов и не в апикальной, а в более молодой средней части листа. У

листьев четырехдневных растений регуляция цитокинином хлоропластной транскрипции не обнаружена. Вероятно, для успешной регуляции гормоном транскрипции хлоропластных генов в ткани листа должен сложиться определенный баланс эндогенных гормонов и, возможно, каких-то других факторов.

Показаны сложные взаимодействия цитокинина и света в регуляции транскрипции пластидных генов. С одной стороны, для действия цитокинина на транскрипцию абсолютно необходим свет. С другой стороны, цитокинин создает условия для проявления действия света.

Обнаруженный эффект цитокинина на скорость транскрипции хлоропластных генов не сохраняется на уровне тотального содержания индивидуальных матричных РНК.

Получены результаты, которые позволяют сделать предварительный вывод о преимущественном вовлечении РНК-полимеразы бактериального типа в активацию транскрипции хлоропластных генов цитокинином.

Таким образом, впервые показана дифференциальная регуляция транскрипции индивидуальных хлоропластных генов цитокинином. Эффект гормона зависит от возраста и зоны листа, из которой выделялись хлоропласты. Показаны сложные взаимодействия цитокинина и света в регуляции транскрипции хлоропластного генома. Дальнейшие исследования будут направлены на идентификацию *cis*-элементов гормон-регулируемых генов.

Работа частично поддержана грантами РФФИ № 04-04-48247; НШ-3692.2006.4.

#### УЧАСТВУЮТ ЛИ ЦИТОКИНИНЫ В РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА ЦИАНОБАКТЕРИЙ?

Does cytokinin participate in regulation of cyanobacteria metabolism?

Н.Н. Каравайко, Н.В. Кудрякова, С.Ю. Селиванкина, Е.В. Куприянова,  
Н.К. Зубкова, Г.В. Шевченко, В.В. Кузнецов, Д.А. Лось, О.Н. Кулаева

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: [okulaeva@mail.ru](mailto:okulaeva@mail.ru)

Цель исследования заключалась в изучении участия гормонов растений цитокининов в регуляторной системе цианобактерий, древние представители которых рассматриваются в качестве вероятных предшественников хлоропластов растений. Хлоропласты

являются одной из главных мишеней действия цитокининов у растений. Выяснение возможного присутствия у цианобактерий систем восприятия и реализации цитокининового сигнала поможет понять становление в ходе эволюции контроля цитокининами биогенеза хлоропластов

Нами получены результаты, которые позволяют говорить о вовлечении цитокининов в регуляторную систему цианобактерий.

Прежде всего, с помощью иммуноферментного анализа в цианобактериях (*Synechocystis* sp. PCC6803) были обнаружены гормоны растений – цитокинины: зеатин и его рибозид. Содержание зеатина и его рибозида было сопоставимо с их содержанием в зеленых растениях.

Из клеток *Synechocystis* выделены зеин-связывающие белки (65 и 67 кД), которые, в принципе, могут участвовать в передаче цитокининового сигнала. Для выделения белков из цианобактерий разработана многоступенчатая система очистки, включающая гидрофобную и аффинную хроматографии, получение антиидиотических антител, взаимодействующих с сайтами связывания белком основного физиологически активного цитокинина растений – зеатина.

Показано, что цитокинин активирует синтез РНК в транскрипционной системе при предварительном действии гормона *in vivo* (при выращивании в его присутствии цианобактерий), а также *in vitro* – при непосредственном добавлении транс-зеатина в реакционную среду. Эффект транс-зеатина строго зависел от его концентрации с оптимумом действия при концентрации транс-зеатина в реакционной среде  $10^{-8}$ - $10^{-7}$  М. Аналог цитокинина – аденин – подобным эффектом не обладал, что доказывает специфичность действия цитокинина.

Компьютерный поиск в Базе данных цианобактерий (Cyanobase <http://www.kasusa.or.jp/cyano/Synechocystis/search.html>) белков, гомологичных по аминокислотной последовательности белкам *Arabidopsis thaliana*, которые участвуют в восприятии и передаче цитокининового сигнала, а также в синтезе цитокининов, показал в *Synechocystis* наличие белков, имеющих гомологию с ферментами, участвующими в биосинтезе цитокининов у растений. Отсутствие гомологий с фосфотрансмиттерами, а также с CHASE доменом рецепторных гистидиновых киназ у *Synechocystis* указывает на то, что у цианобактерий не функционирует система рецепции и трансдукции цитокининового сигнала по типу бикомпонентной регуляторной системы и индуцируемому ею фосфатному каскаду.

Полученные результаты позволяют сформулировать дальнейшие фундаментальные задачи изучения специфики систем восприятия и реализации регуляторного действия цитокининов у циано-

бактерий с целью выяснения происхождения в эволюции систем гормональной регуляции биогенеза хлоропластов.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 05-04-48289 и Грантом Государственной поддержки научных исследований, проводимых ведущими научными школами РФ НШ-3692.2006.4.

### УЧАСТИЕ ЦИТОКИНИНА В ДЕЭТИОЛЯЦИИ РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ

#### Cytokinin participation in regulating barley plants de-etiolation

А.К. Кравцов, А.Ю. Алейникова, Н.С. Белозерова, Я.О. Зубо, В.В. Кузнецов

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: [kravtsovAK@rambler.ru](mailto:kravtsovAK@rambler.ru)

Деэтиоляция – один из важнейших этапов в жизни растений, который заключается в переходе проростка от роста в темноте (в почве) к росту на свету. В почве реализуется стратегия выживания растений в темноте. При отсутствии света в почве при прорастании используются в качестве энергоресурсов только запасные вещества семени; формируется тонкий, быстрорастущий стебель, облегчающий скорейшее достижение поверхности земли. Растение экономит органические вещества, формируя лишь зачатки листьев. При достижении поверхности земли свет вызывает мгновенные изменения: тормозится удлинение стебля, происходит его утолщение, разворачиваются листья, развиваются хлоропласты и начинается осуществляться самостоятельное питание растений за счёт процесса фотосинтеза.

Деэтиоляция характеризуется активацией экспрессии генов белков, участвующих в развитии и функционировании хлоропластов, синтезом фотосинтетических пигментов, изменением ультраструктуры хлоропластов. По существующим в настоящее время представлениям за оптимальную адаптацию к условиям освещения, связанную с выходом проростка из почвы на свет, отвечает фитохромная система. Если проросток по какой-либо причине задержится в почве, то он может погибнуть, поскольку наступит необратимая этиоляция, при которой растение будет уже не в состоянии адаптироваться к свету. Нами было показано, что при освещении 10-дневных этиолированных листьев ячменя сорта Луч (*Hordeum vulgare* L.) развитие хлоропластов резко задерживается по сравнению с четырех-шестидневными растениями, а 12-дневные этиолированные растения ячменя уже не могут позеленеть на свету. Наряду с фитохромной системой важную роль в процессе

деэтиоляции могут играть фитогормоны, прежде всего цитокинины и абсцизовая кислота (АБК). По нашим данным (Kusnetsov et al., *Planta*, 1994, 194, 318-327) цитокинин в этиолированных отделенных от растения семядолях люпина активировал накопление белков фотосинтетических мембран как ядерного, так и пластидного кодирования, вызывал более быстрое позеленение семядолей на свету и активировал процесс фотосинтеза.

Для изучения механизма гормональной регуляции процесса деэтиоляции нами начаты исследования на этиолированных растениях ячменя. Было показано, что освещение листьев, отделенных от шестидневных этиолированных растений и обработанных цитокинином (6-бензиламинопурина, БАП), уже через 4 часа приводило к увеличению содержания хлорофилла в 1.2 раза, а через 6 часов – в два раза в сравнении с листьями, инкубированными на воде.

С помощью *chip-on* анализа нами установлено, что с возрастом в этиолированных листьях ячменя уменьшается интенсивность транскрипции практически всех пластидных генов. Обработка БАП оказывала незначительное влияние на транскрипцию пластидных генов этиолированных листьев, находящихся в темноте. Однако при освещении таких листьев эффект цитокинина становился значительно более сильным. При четырехчасовом освещении шестидневных этиолированных листьев ячменя, увеличивалась интенсивность транскрипции *psbA*, *rbcL*, *rrn16*, *rpl23*, *atpB*, и *psbD* генов (свет-регулируемые гены). Кроме того, нами установлено, что при освещении шестидневных этиолированных листьев БАП активировал интенсивность транскрипции не только свет-регулируемых генов пластома, но и значительное количество генов, которые не активируются светом – *3rps12*, *clpP*, *ORF18*, *petLG*, *psbB*, *rps4*, *petB*, *trnA*. Стимулирующее действие 6-БАП на транскрипцию генов пластома, возможно, и приводит к более быстрому позеленению обработанных цитокинином листьев. Поскольку в регуляции всех процессов в клетке одновременно участвуют многие фитогормоны, то значительный интерес представляет изучение их взаимодействия в регуляции деэтиоляции растений. Особая роль может принадлежать АБК, которая участвует в адаптации растений в условиях стресса, регулирует прорастание и рост растений. Влияние АБК на деэтиоляцию может быть связано еще и с тем, что ее рецептором является F-субъединица Mg-хелатазы – фермента биосинтеза хлорофилла, а также молекулы, участвующей в передаче «пластидного» сигнала. Возможно, от экспрессии гена данного белка зависит экспрессия других генов, кодирующих белки хлоропластов, как ядерного, так и пластидного кодирования, участвующих в сборке и функционировании светособирающих и хло-

рофиллсвязывающих комплексов.

Работа частично поддержана грантами РФФИ № 04-04-48247; № 07-04-01398; НШ-3692.2006.4.

**ФАКТОРЫ ИНДУКЦИИ СТАРЕНИЯ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ  
 $P_{ARR5}$ -GUS ГЕНА У *ARABIDOPSIS THALIANA***

**Senescence induction factors in regulation  
of  $P_{ARR5}$ -GUS gene expression in *Arabidopsis thaliana***

**Н.В. Кудрякова, В.В. Кузнецов, В.Ю. Штратникова, О.Н. Кулаева**  
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: [okulaeva@mail.ru](mailto:okulaeva@mail.ru)

Изучение дифференциальной экспрессии генов, связанных с синдромом старения, в настоящее время привлекает серьезное внимание. Большой интерес в этой связи представляет изучение регуляции в ходе старения листьев гена первичного ответа на цитокинин *ARR 5 Arabidopsis thaliana*, быстро и специфично индуцируемого этим гормоном и действующего в качестве обратного отрицательного регулятора цитокининового сигнала. В данном исследовании было изучено взаимодействие фитогормонов: цитокинина, абсцизовой и салициловой кислот в регуляции экспрессии гена *ARR5* в ходе естественного и индуцированного срезанием и темной старения листьев. У трансгенных растений *Arabidopsis thaliana*, трансформированных генетической конструкцией  $P_{ARR5}$ -GUS, которая содержит маркерный ген GUS под контролем промотора гена *ARR5*, экспрессия маркерного гена продолжалась на протяжении всего периода старения листьев вплоть до самых последних стадий, сопровождавшихся почти полным разрушением хлорофилла. В течение всего старения листьев сохранялась индуцибельность гена цитокинином. На этом этапе онтогенеза листа, в отличие от начального развития проростков, абсцизовая кислота снижала экспрессию данного гена, и это ее действие ослаблялось цитокинином, который является антагонистом АБК. Антагонизм цитокинина еще ярче проявлялся в отношении салициловой кислоты, которая снижала экспрессию гена  $P_{ARR5}$ -GUS, а цитокинин полностью устранял ее действие. В отличие от гормональных эффектов цитокинин не устранял подавление экспрессии гена полиамином спермином, а инкубация срезанных листьев на растворе нитратов не оказывала влияние на уровень активности GUS, хотя нитраты, наряду с цитокинином, способны индуцировать экспрессию гена *ARR5* в проростках. Полученные результаты свидетельствуют о мно-



гофакторном характере регуляции гена ARR5 в стареющих листьях, что должно способствовать пластичности гормональных ответов на этой стадии онтогенеза.

Работа частично поддержана грантом НШ-3692.2006.4.

**ВЛИЯНИЕ ГЕНОТИПА И ПОГОДНЫХ УСЛОВИЙ  
НА КАЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЫЛЬЦЫ  
РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ-ОПЫЛИТЕЛЕЙ И ОТБОРНЫХ ФОРМ  
*HIPPORHAE RHAMNOIDES* L.**

**The influence of the genotype and annual meteo conditions  
on the qualitative characteristics of pollen  
of different sorts and selected forms of Sea buckthorn**

**Т.Н. Кузнецова, Д.А. Лапшин**

Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия,  
г. Нижний Новгород  
E-mail: [lapshin-da@yandex.ru](mailto:lapshin-da@yandex.ru)

В настоящее время в Нижегородской государственной сельскохозяйственной академии наряду с селекцией женских сортов ведётся селекция мужских сортов-опылителей с хозяйственно ценными признаками, в том числе с высокой пыльцепродуктивностью жизнеспособной пыльцы.

Объектом исследования служила пыльца двух сортов-опылителей (Геракл и Дебют) и шести гибридов *Hipporhae rhamnoides* L., различающихся по эколого-географическому происхождению родительских форм:

- сорт Дебют – сеянец катунского экотипа;
- форма 1/90 – гибрид, полученный при скрещивании родительских форм прибалтийской и саянской популяции;
- сорт Геракл; формы 31/89 и 5/93 – гибриды, полученные от опыления форм прибалтийской облепихи радиомутантом катунской облепихи (Ж – 24);
- формы 5/87, 1/89 и 1/91 – гибриды, полученные от опыления сортов МГУ опылителями катунского экотипа.

Жизнеспособность пыльцы *Hipporhae rhamnoides* L. оценивали по содержанию накопленного крахмала и пролина. Содержание крахмала определяли, используя йодный метод, пролина – путем окрашивания пыльцы изатином. Полученные данные были статистически обработаны методом многофакторного равномерного дисперсионного анализа.

Обработка полученных результатов методом дисперсионного анализа позволила выявить долю влияния генотипа и условий среды на содержание ряда пластических веществ в пыльцевых зернах (ПЗ) у исследованных сортов и гибридов.

Доля влияния генотипа на содержание крахмала в пыльцевых зернах была высокой – 65 %, тогда как доля погодных условий в период формирования пыльцы составила лишь 4 %. В ходе проведенных исследований установлено, что пыльца исследованных образцов существенно различались по содержанию крахмала. Среди исследованных образцов доля ПЗ, богатых крахмалом, была самой высокой у сорта Дебют в 2005 г. и составила 31 %, относительно высокой – у гибрида 1/91 (19 %). В 2006 г. сорт Дебют и гибрид 1/91 также имели наибольшее количество богатых крахмалом ПЗ, но доля их составила соответственно 10 и 8 %, что значительно ниже, чем в 2005 г. Следует отметить, что в 2006 г. количество богатых крахмалом ПЗ было значительно меньше, чем в 2005 г. У гибридов 1/89 и 5/93 в 2005 г. и в 2006 г., у гибридных форм 31/89 и 1/90 в 2005 г. и у образца 5/87 в 2006 г. доля пыльцы с высоким содержанием крахмала составляла менее 3 %.

Влияние генотипа на содержание пролина в пыльцевых зернах, по данным дисперсионного анализа, составило 65 %, а доля влияния погодных условий была значительно ниже – 10 %. Высокое содержание богатых пролином пыльцевых зерен было отмечено у сортов-опылителей Геракл и Дебют, а также у гибрида 1/89 как в 2005 г., так и в 2006 г. Доля ПЗ с высоким содержанием пролина у сортов Геракл, Дебют и гибрида 1/89 составляла в 2005 г. 28, 59 и 39 % соответственно, а в 2006 г. – 25, 25 и 28 %. Следует отметить, что в 2005 г. доля пыльцы с высоким содержанием пролина у гибрида 5/93 составляла 33 %, а в 2006 г. – 4 %. Низкое содержание пыльцевых зерен, богатых пролином, зарегистрировано у гибрида 1/90 в 2005 и 2006 гг. (3 и 2 % соответственно) и у гибрида 31/89 в 2005 г. (3 %). Значительное варьирование количества богатых пролином пыльцевых зерен, в зависимости от года формирования пыльцы, указывает на влияние погодных условий. Генотип опылителя, как мы полагаем, обуславливает потенциальные возможности в накоплении пролина образцом, а количество накопленного пролина контролируется погодными условиями.

Результаты проведенных исследований указывают на более высокое влияние генотипа на накопление крахмала и пролина в пыльце, а погодные условия в период формирования мужского гаметофита играют менее значительную роль.

**ВЛИЯНИЕ  $KNO_3$  НА БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ АПОПЛАСТА  
ЛИСТЬЕВ ПШЕНИЦЫ** **$KNO_3$  influence on apoplast protein composition of wheat leaves**

**Н.Н. Максютова, Л.В. Викторова, Т.В. Трифонова, Е.И. Галеева**  
Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г. Казань  
E-mail: maksyutova@yandex.ru

Известно, что во внеклеточном пространстве происходят самые разнообразные химические процессы. В апопласте обнаружен целый ряд веществ, в том числе и белки, некоторые из них обладают ферментативной активностью. Эти белки играют важную роль в защитных реакциях клетки при патогенезе, при окислительном стрессе, в осморегуляции, в гидролитических процессах и др. Особое значение принадлежит апопласту в передаче внеклеточных сигналов. В настоящей работе изучались изменения белкового состава апопластной жидкости при введении в апопласт листа нитрата калия. Проведены тесты для исключения возможности повреждения клеток в процессе извлечения содержимого апопласта (отсутствие глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназной активности в апопластной жидкости, отсутствие выхода электролитов из растительной ткани, подвергшейся процедуре выделения содержимого апопласта, отсутствие разрушения клеток, определяемое с помощью «красителя синего» Эванса).

Объектом исследования являлись листья 8-дневных проростков пшеницы сорта Мироновская 808. Для получения апопластной жидкости листья помещали на воду (контроль) или раствор нитрата калия (0.5 %) на 3 ч, а затем инфильтрировали этими же растворами 15 мин. Белки из полученной в результате центрифугирования апопластной жидкости осаждали ледяным ацетоном, оставляли на ночь при 4 °С, осадок отделяли центрифугированием и перерастворяли в 50 мМ трис-HCl буфере pH 7.4.

В ходе электрофоретического разделения белков апопласта листьев проростков под влиянием введения нитрата калия было выявлено значительное увеличение содержания полипептидов 20, 21 и 69 кДа.

Известно, что условия азотного питания оказывают всестороннее влияние на растительный организм, в том числе на внутриклеточный pH, катионно-анионный состав тканей, содержание белка и т.д. Однако практически отсутствуют сведения, в которых, в зависимости от снабжения растений азотом, рассматривалось бы состояние антиоксидантной системы.

Наблюдаемое нами изменение содержания полипептидов при введении нитрата калия в апопласт может быть опосредовано, помимо других причин, и образованием перекиси водорода, поскольку имеются данные о влиянии пероксида водорода на содержание белков в листьях растений. При введении нитрата калия обнаружено изменение содержания перекиси водорода в апопласте и активности экстраклеточных пероксидаз, что свидетельствует о нарушении баланса между активными формами кислорода и антиоксидантной защитой. Перекись водорода может также влиять на рН апопласта, приводя к изменению активности ферментов в апопласте. Полученные нами результаты подтверждают важную роль апопласта в межклеточном сигналинге и, по-видимому, свидетельствуют о возможности участия нитрат-иона в этом процессе.

**RAPD-АНАЛИЗ ГЕНОМОВ  
И МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ  
КУЛЬТУРНОЙ И ДИКОРАСТУЩЕЙ ФОРМ ПОДСОЛНЕЧНИКА  
(*HELIANTHUS ANNUUS* L.)**

**RAPD-analysis of genomes and morpho-physiological characters  
of cultural and wild-growing forms of sunflower (*Helianthus annuus* L.)**

**Н.В. Маркин, В.А. Даниленко, М.А. Тихонова, А.В. Усатов**  
Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону  
E-mail: [nmarkin@mail.ru](mailto:nmarkin@mail.ru)

Получение принципиально нового исходного материала с оптимальной адаптивностью к внешней среде для селекции высокопродуктивных гетерозисных гибридов возможно с привлечением потенциала дикорастущих форм подсолнечника, как носителей генных комплексов, сформированных естественным отбором. В качестве первого этапа изучения таких форм был проведен сравнительный RAPD-анализ геномов и некоторых морфофизиологических показателей растений инбредных линий культурной (линия 3629) и дикорастущей форм подсолнечника *Helianthus annuus* L. из генетической коллекции НИИ Биологии ЮФУ.

RAPD-анализ геномной ДНК культурной и дикорастущей формы с 12-ю произвольными праймерами выявил высокий уровень полиморфизма. Все использованные праймеры эффективно обеспечивали синтез специфических и воспроизводимых наборов фрагментов ДНК (ампликонов). Количество ампликонов в зависимости от использованного праймера составляло от пяти до 23, их размеры варьировали в пределах 200-1200 п.н. Образцы имели специ-

фические RAPD-спектры, различавшиеся числом ампликонов, их размерами и степенью выраженности на электрофореграммах. Большую часть спектров включали фрагменты, присутствующие в одном и, соответственно, отсутствующие в другом геноме. Эти фрагменты являются полиморфными маркерами ДНК культурной и дикорастущей форм. Всего было исследовано 185 RAPD-локуса. Процент выявляемого полиморфизма зависел от используемого праймера и в среднем составил 94 %. Такой высокий показатель полиморфизма геномной ДНК между изучаемыми формами очевидно должен быть выражен на уровне фенотипа.

Исследуемые формы значительно различались между собой по динамике роста и развития, показателям габитуса (наличие ветвления, количество и диаметр корзинок, форма и размер листьев), продуктивности одной корзинки, размеру и весу семян. Так, проростки культурной формы на стадии развития третьей-четвертой пары настоящих листьев превышали по высоте проростки дикорастущей формы на 240.8 %, тогда как в конце вегетации их полный рост достигал не более 86 % высоты дикорастущего подсолнечника. Для дикорастущей формы, в отличие от культурной, характерно наличие ветвления с многочисленными корзинками (до 80 шт. на одном растении), расположенными как на концах ветвей, так и в пазухах листьев. Площадь листовой пластинки дикорастущей формы превышала культурную на 14 %. Форма листа растений дикорастущей формы более вытянута (отношение длины к ширине – 1.4), чем у культурной линии (отношение длины к ширине – 1.0). Цветки у растений исследуемых линий собраны в соцветие – многоцветковую корзинку, имеющую форму круглого, у дикорастущей формы плоского, а у культурной линии выпуклого диска. Диаметр корзинки растений 3629 на 68.3 % превышал диаметр центральной корзинки дикорастущей формы. Вес семян одной корзинки и вес 1000 семян у дикорастущей формы на 1450 и 294 % меньше, чем у растений культурного подсолнечника, соответственно.

Таким образом, высокому полиморфизму геномной ДНК между культурной и дикорастущей формами подсолнечника соответствуют значительные различия морфофизиологических показателей. Полученные результаты позволяют дифференцировать изученные формы, а индивидуальные RAPD-спектры могут быть использованы для их паспортизации и дальнейших исследований.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ р\_юг (06-04-96754).

**НОВЫЙ МЕТОД ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ ПЦР  
В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ  
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ  
БЕЗИНТРОННЫХ ГЕНОВ РАСТЕНИЙ**

**New method of real time-pcr products detection for studying  
transcriptional activity of plant genes without introns**

**Р.Т. Матниязов, Ф.Р. Гималов, А.В. Чемерис, В.А. Вахитов**  
Институт биохимии и генетики Уфимского НЦ РАН, г. Уфа  
E-mail: [molgen@anrb.ru](mailto:molgen@anrb.ru)

Существенным фактором окружающей среды, ограничивающим географическое расселение и сроки вегетации растений, является пониженная температура. Рост и развитие плохо приспособленных растений к низким температурам приводят к значительным потерям в продуктивности и качестве урожая. Однако у многих растений при выращивании в условиях низких положительных температур, в процессе так называемой холодной акклимации, повышается устойчивость к холоду. Понижение температуры приводит к индукции экспрессии определенных генов. Многие из этих генов в промоторных областях содержат одну или несколько копий, обозначенных как DRE (dehydration-responsive element)/CRT (C-repeat) cis-элементы. С этими cis-элементами связываются транскрипционные факторы CBF1, CBF2 и CBF3 (CRT-binding factor), называемые также DREB1b, DREB1c и DREB1a (DRE-binding protein), в результате чего транскрипция генов, регулируемых холодом или дегидратацией, значительно активируется. Многочисленные данные указывают, что гены факторов CBF являются ключевым компонентом в транскрипционной регуляции генов холодового ответа растений. Поэтому исследование уровня экспрессии генов CBF в условиях низкотемпературного стресса необходимо для выяснения молекулярных механизмов передачи холодового сигнала, что предполагает необходимость измерения числа копий детектируемых молекул РНК в стартовом материале и оценивать их количественно.

Разработаны различные варианты количественной оценки содержания тех или иных молекул мРНК, в частности, с использованием методов ДНК-амплификации с помощью ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Эти методы отличаются, главным образом, способами детекции целевого продукта ПЦР-РВ. Ранее нами был разработан упрощенный и улучшенный способ детекции целевых продуктов генов, содержащих интроны, основанный на переносе энергии между праймерами, применяемыми при про-

ведении полимеразной цепной реакции. В этом методе праймеры, соответствующие концевым участкам второго и третьего экзонов исследуемого гена, подбирались таким образом, что происходила наработка целевого продукта ПЦР размером всего 40-50 пн, что ускоряло реакцию амплификации ДНК. Праймеры имели в своих составах флуоресцентные красители, пришитые к тимидину, один из которых служил донором (FAM), а другой – акцептором (ROX). Красители представляли собой пару с перекрывающимися спектрами испускания и возбуждения, обеспечивая эффект флуоресцентного резонансного переноса энергии, называемого также FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer), от первого ко второму. Количественная оценка уровня экспрессии генов обеспечивалась тем, что в силу особого расположения мест отжига праймеров амплификация молекул РНК приводила к FRET-эффекту, а вклад геномной ДНК, за счет удаленного благодаря интрону расположения праймеров друг от друга, был полностью исключен, и в этом случае переноса энергии не было из-за большего расстояния между красителями.

Однако при исследовании СВФ-генов, которые не содержат интроны, преимущества описанного выше метода сводились на нет, так как было невозможно исключить вклад самих генов (то есть молекул ДНК) в ДНК-амплификацию молекул РНК. Поэтому нами был разработан новый подход к определению количества мРНК СВФ-генов в образцах растительного материала с применением метода изотермической амплификации нуклеиновых кислот путем самоподдерживающейся репликации, еще известной как NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), который предполагает одновременную активность в реакционной смеси трех ферментов: обратной транскриптазы, РНКазы H, T7 РНК полимеразы. В отличие от других авторов, регистрирующих в реальном времени появление временных РНК-ампликонов, мы вели детекцию постоянных ДНК-ампликонов и, благодаря использованию двух праймеров, обеспечивающих FRET-эффект, оказалось возможным количественно регистрировать протекание экспоненциальной амплификации РНК и ДНК в большом диапазоне концентраций. Вклад геномной ДНК в этом методе исключается благодаря тому, что она, оставаясь двуцепочечной, не может быть вовлечена в процесс амплификации.

Используя этот метод, нами оценены уровни транскрипционной активности различных СВФ генов двух разновидностей капусты, различающихся по морозостойкости, в ответ на воздействия холодом, засухой, абсцизовой кислотой.

**РЕЦЕПЦИЯ ЭТИЛЕНА И ТРАНСДУКЦИЯ ЭТИЛЕНОВОГО СИГНАЛА: НОВЫЙ  
ВЗГЛЯД****Ethylene perception and signal transduction: new insights****И.Е. Мошков, Г.В. Новикова**Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: [moshkov@ippras.ru](mailto:moshkov@ippras.ru)

Исследования механизма действия этилена имеют как академическое, так и практическое значение, поскольку этот фитогормон играет важную роль в ответах растений на биотические и абиотические факторы. Особое внимание в этих исследованиях уделяется изучению рецепции гормона и трансдукции его сигнала – начальных этапов, ведущих к проявлению физиологического ответа на этилен. Несмотря на уникальную газообразную природу этилена, что создает трудности при работе с ним, именно для этого гормона достигнут наибольший прогресс в исследовании молекулярных механизмов действия. Это связано с получением мутантов *Arabidopsis*, имеющих дефекты в генах рецепторов фитогормона и некоторых компонентах пути передачи его сигнала. Известно пять гомологичных генов рецепторов этилена: *ETR1*, *ETR2*, *ERS1*, *ERS2* и *EIN4*, которые кодируют высокогидрофобные мембранные белки с тремя (*ETR1* и *ERS1*) или четырьмя (*ETR2*, *ERS2* и *EIN4*) трансмембранными доменами. Рецепторы этилена гомологичны гистидинкиназам двухкомпонентных систем передачи сигналов клеток прокариот. Доминантная мутация в любом из пяти рецепторов этилена ведет к утрате способности связывать этилен и появлению нечувствительности растений к фитогормону, т.е. такие рецепторы «заперты» в их сигнально-активном состоянии. Генетический анализ этилен-нечувствительных мутантов позволил идентифицировать крайне важный сигнальный компонент, располагающийся в непосредственной близости от рецепторов. Рecessивный мутант *ctr1-1* проявляет конститутивный этиленовый фенотип, причем мутация обнаружена в гене, кодирующем белок, который имеет гомологию с МАП3-киназами Raf-типа, что указывает на возможное вовлечение МАП-киназного каскада в передачу этиленового сигнала. Постулировано, что белок *CTR1* работает с рецепторами этилена, когда последние находятся в их активном (супрессированном) состоянии. Другие идентифицированные компоненты линейного пути, функционирующие после *CTR1*, а именно: *EIN2*, *EIN3/ELK* и *EREB*, – позитивно регулируются этиленом. На основании эпистатического анализа этилен-нечувствительных мутантов был предложен путь передачи этиленового сигнала



с рецепторами этилена и CTR1 в качестве негативных регуляторов, так называемый «линейный путь» передачи этиленового сигнала. Однако оставалось неясным, как достигается позитивная регуляция EIN2, EIN3/ELK и EREB, если CTR1 является единственным эффектором рецепторов этилена. МАП3-киназы, к которым относят и CTR1, осуществляют свой эффект через последовательную активацию путем фосфорилирования МАП2- и МАП-киназ. Поиски мутантов по МАП2- и МАП-киназам, вовлеченным в передачу этиленового сигнала, оказались неудачными, тогда как при помощи биохимических методов нам удалось обнаружить и охарактеризовать этилен-регулируемые МАП-киназы ERK1/2-типа. Увеличение активности МАП-киназ при действии этилена было подтверждено другими исследователями. Наиболее неожиданными оказались полученные нами данные о том, что у *ctr1-1* МАП-киназная активность оказалась существенно выше, чем в диком типе. Изучение МАП-киназной активности рецепторных мутантов показало, что степень контроля активности МАП-киназ индивидуальными рецепторами существенно различалась. Среди трех энзиматически активных МАП-киназ листьев *Arabidopsis* лишь одна активировалась этиленом. По своим свойствам она наиболее близка МРК9 (At3g18040). В клетках животных и дрожжей МАП-киназы являются эффекторами ГТФ-связывающих белков. Мы обнаружили, что активность мономерных G-белков (мG-белков) специфически и рецепторзависимо регулируется этиленом. В листьях растений *Arabidopsis* дикого типа экзогенный этилен вызывал транзиторное повышение и снижение активности индивидуальных мG-белков. Об участии мG-белков в передаче этиленового сигнала на пострецепторном уровне свидетельствуют данные о том, что у доминантного рецепторного мутанта *etr1-1* активность мG-белков ниже, а у *ctr1-1* – значительно выше таковой у дикого типа. Более того, экспрессия двух генов мG-белков – *Rab8* и *Ara3* – существенно повышалась в обработанной этиленом ткани. Как и в случае активности мG-белков, экспрессия *Rab8* у *etr1-1* оказалась ниже, а у *ctr1-1* – значительно выше, чем в диком типе, но у обоих мутантов ни активность мG-белков, ни экспрессия их генов не регулировались экзогенным этиленом. Анализ взаимоотношений между активацией мG-белков и МАП-киназы в ответ на экзогенный этилен дает основания думать, что они функционируют в одном пути. Об этом свидетельствует, в частности, характер зависимости обеих активностей от времени обработки ткани этиленом. На основании полученных нами и другими авторами данных можно заключить, что помимо линейного пути, постулированного на основании генетических исследований этилен-нечувствительных мутантов *Arabidopsis*, существует путь передачи этиленового сигнала, вклю-

чающий модулируемые этиленом мG-белки и этилен-регулируемую МАП-киназу, представляющую собой часть этилен-активируемого МАП-киназного каскада. Дальнейшие исследования позволят установить компоненты этого пути передачи и пункты его взаимодействия с линейным путем передачи этиленового сигнала.

Исследования авторов выполнены при поддержке РФФИ, грант № 05-04-49643.

**ХАРАКТЕРИСТИКА ГЛИАДИНОВ ВИДОВ РОДА *AEGILOPS* L.,  
ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В РАЗЛИЧНЫХ  
ПОЧВЕННО-КЛИМАТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ ТАДЖИКИСТАНА**

**The characteristic of gliadins of *Aegilops* L. species,  
growing in different climatic conditions of Tajikistan**

**С.Н. Наимов, Г.Ф. Касымова, С.В. Донцова, М. Нигмонов**  
Институт физиологии растений и генетики АН Республики Таджикистан,  
г. Душанбе  
E-mail: K.S.Irina@list.ru

В последние годы особую значимость приобретает интрогрессия в геном культурных растений генов диких видов, которые, как показали многочисленные исследования, обуславливают устойчивость растений к экстремальным факторам.

Виды *Aegilops* L., произрастающие в различных климатических условиях, представляют интерес, прежде всего, как перспективные геноисточники в селекции пшеницы.

Географическое положение Таджикистана с его своеобразными почвенно-климатическими условиями способствовало формированию и сохранению уникальных видов *Aegilops* L. с различной степенью устойчивости.

С целью идентификации и регистрации генетических ресурсов Таджикистана нами были исследованы районы произрастания видов *Aegilops* L. Анализ полученных данных свидетельствует, что на территории республики наиболее распространены четыре вида: *Ae. tauschii*, *Ae. triuncialis*, *Ae. cylindrica* и *Ae. crassa*.

Большой диапазон внутривидового разнообразия по фенотипическим признакам свидетельствует о генетической изменчивости данных видов. Среди биотипов *Ae. tauschii* выявлены формы, устойчивые к засухе и засолению почв, а среди биотипов *Ae. triuncialis* встречаются формы, обладающие повышенным иммунитетом к заболеваниям.

Электрофоретический анализ белкового состава зерна исследу-

емых видов указывает на широкий внутривидовой полиморфизм. Для некоторых видов обнаруживается определенная корреляция между белковым составом и фенотипическими признаками. Так, сравнительный анализ электрофоретических спектров глиадинов *Ae. tauschii* свидетельствует о том, что для большинства биотипов, произрастающих в жестких климатических условиях, характерно присутствие очень интенсивного компонента в средней зоне электрофореграммы, в то время как в растениях, произрастающих в мягких климатических условиях, данный компонент либо полностью отсутствует, либо присутствует в следовых количествах. Для этих растений характерно присутствие в той же зоне другого интенсивного компонента. Предполагается, что указанные изменения в составе глиадиновых компонентов свидетельствуют о процессах адаптации растений к условиям внешней среды.

Обсуждается возможность использования генотипов *Aegilops L.* для селекции новых сортов пшеницы, обладающих повышенной устойчивостью к болезням и засолению.

#### СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ И МЕТИЛИРОВАНИЯ ПРОМОТОРА ГЕНА ПАТАТИНА КЛАССА I В ОРГАНАХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ

##### The organ specificity of expression and methylation of class I patatin gene promoter in potato plants

Е.М. Наумкина<sup>1</sup>, В.В. Ашапкин<sup>2</sup>, Б.Ф. Ванюшин<sup>2</sup>, Г.А. Романов<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва

<sup>2</sup> Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, г. Москва  
E-mail: gar@ippras.ru

Промотор гена пататина класса I (V33-промотор) картофеля – это тканеспецифичный промотор, интенсивная экспрессия которого происходит главным образом в клубнях. Ранее было показано, что невысокий, но детектируемый уровень экспрессии обнаруживается и в других органах картофеля. Согласно полученным нами данным, уровень экспрессии уменьшался в последовательности клубень >> стебель > лист > корень. Тканевую/органный специфику функционирования пататиновых генов определяют, по всей видимости, некоторые факторы транскрипции, взаимодействующие с регуляторными последовательностями промотора (Kim et al., 1994; Zourelidou et al., 2002). Однако регуляция генной экспрессии может также зависеть от эпигенетических механизмов, например, метилирования ДНК (Ванюшин, 2005, 2006).

В настоящей работе определяли уровень метилирования остат-

ков цитозина консервативного проксимального участка В33-промотора длиной около 0,5 kb. Исследовали нетрансгенные растения картофеля сорта Дезире, а также трансгенные линии В33::*GUS* и 35S::*GUS*, у которых репортерный ген *GUS* поставлен под контроль пататинового (В33) или 35S CaMV промоторов соответственно. В исследуемом участке промотора выявлены два тетра nukлеотида GCGG, остаток цитозина которых является потенциальным субстратом ДНК-метилазы. Степень метилирования этих тетра nukлеотидов определяли с помощью метилчувствительной рестриктазы AclI, которая расщепляет немодифицированные, но неметилированные сайты GCGG. Обработанные AclI препараты ДНК, выделенные из разных органов/линий картофеля, использовали в качестве матриц для ПЦР с праймерами на исследуемый участок В33-промотора или на участок промотора и начало гена *GUS*. Предварительно в серии контрольных опытов было установлено следующее: а) пригодность выбранных нами праймеров для амплификации проксимальной части В33-промотора (477 п.о.) для всех (трансгенных и нетрансгенных) линий картофеля; б) присутствие объединенной последовательности участка В33-промотора и начала репортерного гена *GUS* (~600 п.о.) исключительно в В33::*GUS*-трансформантах; в) возможность количественной оценки содержания интактных (нерестрицированных) матриц ДНК при оптимальных условиях проведения ПЦР; г) отсутствие заметных различий доступности В33-промотора в препаратах ДНК из разных органов для метилнечувствительной рестриктазы XbaI. ПЦР на матрицах необработанных рестриктазой препаратов ДНК из разных органов приводила к наработке примерно равных количеств амплифицируемой ДНК В33-промотора. Однако после рестрикции ДНК из разных органов рестриктазой AclI последующая ПЦР показала различия в интенсивности полос ампликонов в геле после ЭФ-разделения. Наиболее бледными были полосы ампликонов, полученные с использованием рестрицированных ДНК из клубней и листьев анализируемых растений. Это свидетельствует о значительном разрушении В33-промотора при рестрикции AclI, т.е. о низком уровне его метилирования в данных органах. Низкий уровень метилирования пататинового промотора в клубнях был подтвержден с помощью Southern-блотинга рестрицированных AclI ДНК с меченым зондом на В33-промотор. Максимальный уровень метилирования промотора был выявлен в корнях и стеблях растений картофеля. Мы не обнаружили существенных различий между В33-, 35S-трансформантами и нетрансгенными растениями картофеля в уровне метилирования GCGG-сайтов пататинового промотора в различных органах. Органная специфичность метилирования встроенного В33-промотора в В33::*GUS*-трансформантах была сходной со специфичнос-

тью метилирования эндогенного пататинового промотора.

По всей видимости, уровень метилирования ВЗЗ-промотора определяется главным образом его нуклеотидной последовательностью и ткане/органоспецифичными факторами, а не происхождением или локализацией в хроматине. Обнаружена частичная обратная корреляция между уровнем метилирования GCGG-сайтов ВЗЗ-промотора в органах растений и уровнем его активности. Так, наибольшей экспрессии промотора в клубнях соответствовал наименьший уровень метилирования, тогда как наименьшей экспрессии промотора в корнях, наоборот, соответствовал наибольший уровень метилирования. Вместе с тем, неполная обратная корреляция метилирования и экспрессии промотора в разных органах предполагает участие, помимо метилирования, и других регуляторных факторов, определяющих органную специфику его активности.

#### **ФОСФОПРОТЕОМИКА В ИССЛЕДОВАНИЯХ РЕГУЛЯТОРНЫХ СИСТЕМ РАСТЕНИЙ: ДИВИДЕНДЫ СЕКВЕНИРОВАННЫХ ГЕНОМОВ**

##### **Phosphoproteomics and plant regulatory mechanisms studies: the greatest dividends to come from genomic sequencing**

**Г.В. Новикова, Б.А. Никашин, Н.С. Степанченко, И.Е. Мошков**  
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: gv\_novikova@mail15.com

Завершение проектов по секвенированию геномов *Arabidopsis thaliana* и *Oryza sativa*, установление почти полных нуклеотидных последовательностей табака, лотоса и еще около десятка видов растений, а также цианобактерий, создание технологии ДНК-микрочипов позволяют получать информацию об экспрессии как целых геномов, так и отдельных генов, а следовательно, и кодируемых ими белков. Однако степень корреляции между уровнем экспрессии мРНК и количеством синтезируемых белков чаще всего крайне низка. Более того, функциональная активность белков в значительной степени определяется наличием пост-трансляционных модификаций, а также взаимодействием с другими белками. Эти параметры часто не могут быть предсказаны на основании данных ДНК-микрочипов или нуклеотидных последовательностей.

Обратимое фосфорилирование белков – одна из наиболее важных пост-трансляционных модификаций. Обратимому фосфори-

лированию, которое осуществляется протеинкиназами, подвергаются специфические белки всех регуляторных систем растений. Об исключительно важной роли протеинкиназ свидетельствует тот факт, что только у *Arabidopsis* не менее 1000 генов кодируют протеинкиназы. Фосфорилирование белков влияет на многие их характеристики, включая энзиматическую активность, внутриклеточную локализацию, белок-белковые взаимодействия, а также время полужизни. В единицу времени, по крайней мере, 30 % всех клеточных белков может находиться в фосфорилированном состоянии. Таким образом, фосфопротеом или фосфорилом (полный набор белков протеома, модифицированный *in vivo* за счет фосфорилирования) любого многоклеточного организма достаточно велик. Еще несколько лет назад основным препятствием en masse определения фосфориломов было отсутствие методов их анализа. По этой причине центральное место в работах по изучению регуляторных систем клеток растений и особенно сигнальных путей занимали исследования отдельных протеинкиназ, тогда как было бы крайне важно иметь характеристики фосфориломов, чтобы понимать, как белки активируются или ингибируются, происходят ли взаимодействия с другими компонентами в клетке, как происходит селекция белков, предназначенных для деградации.

Наиболее распространенным методом анализа фосфориломов было и еще остается использование радиоактивного мечения белков *in vivo* и *in vitro*. Однако поступление метки в клетки растений, наличие в клетках пулов свободных и связанных фосфатов может в значительной степени влиять на качество и достоверность получаемых результатов. Иммунологические подходы с использованием антител против фосфорилированных аминокислот часто не приводят к убедительным результатам. Отчасти это связано с тем, что эти антитела не узнают нефосфорилированную форму белка, что затрудняет определение степени фосфорилирования аминокислотных остатков внутри сайта фосфорилирования белка. Отсюда становится очевидной необходимостью идентификации сайтов фосфорилирования белков, что представляется весьма непростой задачей.

В последние годы в исследованиях фосфориломов растений все чаще используются стремительно развивающиеся методы масс-спектрометрии, что уже сейчас позволило идентифицировать не только новые протеинкиназы, но и их субстраты. В данном обзорном докладе будут представлены сведения о современном состоянии исследований фосфориломов и специфических фосфорилированных белков в сложных белковых смесях при помощи методов масс-спектрометрии. Будут обсуждены потенциальные возможности фосфопротеомики как новой технологии для изучения фосфо-

риломов, а также сигнальных путей клеток растений, что позволит по-новому взглянуть на функциональную регуляцию большого числа белков.

Исследования авторов выполнены при поддержке РФФИ, грант № 05-04-49643.

**ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЕЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ,  
УЧАСТВУЮЩИХ В СИСТЕМНОМ КОНТРОЛЕ ДЕЛЕНИЯ  
И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК, У ОПУХОЛЕОБРАЗУЮЩИХ МУТАНТОВ  
РЕДИСА (*RAPHANUS SATIVUS* VAR. *RADICULA PERS.*)**

**Alterations in the expression level of genes participating  
in the systemic control of plant cell division and differentiation  
in radish (*Raphanus sativus* var. *Radicula Pers.*) tumor-producing mutants**

**М.А. Осипова, И.Е. Додуева, Е.Л. Ильина, З.А. Немировская, Л.А. Лутова**  
Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург  
E-mail: [Wildtype@yandex.ru](mailto:Wildtype@yandex.ru)

Опухолообразование у высших растений – одна из моделей для изучения механизмов системного контроля деления и дифференцировки растительных клеток. По-видимому, в контроле этого процесса принимает участие большое количество генов. На спонтанных и индуцированных опухолях у различных видов растений была продемонстрирована ключевая роль изменения баланса цитокининов и ауксинов в переходе к опухолевому росту. Показано, что при опухолообразовании происходит изменение уровней и пространственно-временного характера экспрессии генов регуляторов клеточного цикла, гомеобокс-содержащих меристемо-специфичных генов, генов первичного ответа на цитокинины и ауксины. Объектом наших исследования являются спонтанные опухоли у высокоинбридных линий генетической коллекции редиса (*Raphanus sativus* var. *Radicula Pers.*). Опухолообразующие линии отличаются от родственных линий с нормальной морфологией повышенным содержанием эндогенных цитокининов и пониженным содержанием свободной ИУК, ткани опухолообразующих линий обладают повышенной чувствительностью к экзогенным цитокининам и ауксинам *in vitro*. Методом полуколичественной ОТ-ПЦР мы проанализировали экспрессию ряда генов клеточного цикла (*CycD3*), генов регуляторов меристем (*STM*, *KNAT1*, *WUS*), генов первичного ответа на цитокинин (*ARR5*) и ауксин (*IAA1*) у опухолообразующих и безопухолевых линий редиса на разных стадиях развития, а также при ответе на цитокинин. Для генов *CycD3* и *KNAT1*

показано повышение уровней экспрессии при спонтанном и цитокинин-индуцированном опухолеобразовании, в то же время для генов *STM* и *WUS* показано заметное снижение уровней экспрессии у опухолевых форм. Экспрессия гена *ARR5* при обработке цитокининами индуцируется раньше и на более сильном уровне у опухолевых линий, у линии со 100 %-ным опухолеобразованием наблюдается конститутивно высокий уровень экспрессии *ARR5* при отсутствии экзогенных цитокининов. Уровень экспрессии гена *IAA1* повышен у ряда опухолевых линий, которые характеризуются повышенной чувствительностью к ауксинам *in vitro*.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 05-04-48583, CRDF ST-012-0 и CRDF BP2M12.

**ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ РЕГУЛЯТОРНОГО ГЕНА OPAQUE-2  
НА СОДЕРЖАНИЕ КАТИОНОВ МАГНИЯ  
В РНК СОЗРЕВАЮЩЕГО ЗЕРНА КУКУРУЗЫ  
И ДЛИНУ ТЕРМИНАЛЬНОЙ ПОЛИ-А-ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ мРНК**

**The gene regulatory opaque-2 mutation affect  
on magnesium content in RNA of developing corn kernel  
and mRNA terminal poly-a sequences length**

**В.К. Плотников, Н.М. Чумак, Д.В. Сметанин, А.И. Насонов**  
Краснодарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства  
им. П.П. Лукьяненко, г. Краснодар  
E-mail: [molbiokniish@mail.ru](mailto:molbiokniish@mail.ru)

Белковый продукт гена *opaque-2* в клетках созревающего зерна кукурузы является транскрипционным активатором ряда генов. Дефицит этого белка в созревающем зерне мутанта по гену *opaque-2* приводит к значительному снижению синтеза запасных белков (зеинов) и изменению активности ряда ферментов аминокислотного и углеводного обменов. В частности, у мутанта снижена активность биферментного комплекса лизинкетоглутаратредуктаза-сахаропиндегидрогеназа (LKR-SDH), осуществляющего превращение свободного лизина в глутамин, которым очень богат аминокислотный состав зеинов. Это является центральным моментом формирования как «высоколизинового», так и «адаптационного» синдрома. Весьма вероятно, что причиной такой общности является наличие посттранскрипционной составляющей в регуляции активности этого фермента в связи с тем, что в клетках высоколизинового мутанта и клетках растений, подвергающихся физиологическому стрессу, повышена активность ферментов РНКаз, осуществляющих дифференциальный распад РНК. Для проверки



этой гипотезы были проведены сравнительные исследования стабильности мРНК LKR-SDH *in vivo* и *in vitro* на созревающем зерне кукурузы (*Zea mays* L.) линии Висконсин 64 А обычной и ее высококолизиновом спонтанном мутанте *opaque-2*. Кукурузу выращивали в полевых условиях; в работе использовали початки на 20-е сутки после ручного самоопыления. Блокаду транскрипции (8 ч) в созревающем зерне (*in vivo*) осуществляли с помощью актиномицина Д, который вводили в основание початка в виде водного раствора (1 мг/початок). Препарат РНК из созревающего зерна выделяли фенольно-детергентным методом с переосаждением концентрированным раствором LiCl, мочевины (конечная концентрация 4 М каждого компонента). Состав буфера для экстракции РНК: 0.2 М Трис-НСl, рН 8.5; 0.25 М сахароза, 50 мМ MgCl<sub>2</sub>. Крахмал предварительно удаляли кратковременным центрифугированием, после чего добавляли ДДС-Na<sub>2</sub> до конечной концентрации 1 % и препарат подвергали депротеинизации смесью фенол/хлороформ (1:1). Осаждение этиловым спиртом проводили без добавления ацетата калия, который эффективно удаляет основную массу катионов Mg<sup>++</sup> из молекул РНК. Высокая концентрация Триса обеспечивает защиту РНК от РНКаз и полноту осаждения РНК этиловым спиртом. Распад мРНК в системе *ommp* (*in vitro*) изучали в ходе инкубации (65 °С, 10 мин) водного раствора суммарного препарата Mg<sup>++</sup>-содержащей высокополимерной РНК. Оценку количества ген-специфических мРНК осуществляли с помощью ОТ-ПЦР. Содержание катионов магния проводили методом атомно-абсорбционной спектроскопии по стандартной методике в присутствии катионов стронция. Установлено, что мутация регуляторного гена *opaque-2* увеличивает содержание прочносвязанных катионов Mg<sup>++</sup> в рРНК в 2.5 раза по сравнению с РНК обычной кукурузы. Обработка актиномицином Д приводит к тому, что в препарате рРНК обычной кукурузы до уровня мутанта увеличивается содержание катионов Mg<sup>++</sup> как следствие распада короткоживущей фракции рРНК, но не наблюдалось изменений у мутанта. Однако сравнительно не высокая стабильность мРНК LKR-SDH была существенно ниже у мутанта как в экспериментах *in vivo*, так и в экспериментах *in vitro*, что подтверждает выше высказанную гипотезу о наличии посттранскрипционной составляющей в регуляции гена LKR-SDH. Сопряженные исследования влияния блокады транскрипции актиномицином Д на распад ген-специфических мРНК в системе *ommp* показали, что у обычной кукурузы стабильность мРНК запасного белка – зеина 22 кДа, мРНК LKR-SDH и мРНК убиквитина снижается при этом в 1.5, 9 и 3 раза соответственно в сравнении с контрольным вариантом. Напротив, у мутанта эти мРНК были относительно стабильны *in vitro* после обра-

ботки актиномицином *in vivo*, что, вероятно, связано со снижением скорости деаденилирования. Суммарная поли-А-содержащая мРНК мутанта имеет относительно короткие терминальные поли-А-последовательности по сравнению с таковыми мРНК обычной кукурузы, что обуславливает сравнительно низкую трансляционную активность полирибосом из созревающего зерна мутанта в бесклеточной системе синтеза белка. Однако стабильность суммарной поли-А-мРНК мутанта на 10-12 % выше таковой обычной кукурузы. Это позволяет предположить, что повышенное содержание катионов  $Mg^{++}$  в РНК мутанта *opaque-2* определяет нарушения как в системе полиаденилирования, так и в системе деаденилирования мРНК, что снижает трансляционную активность, но повышает стабильность мРНК.

**АКТИВНОСТЬ СИСТЕМЫ БИОСИНТЕЗА ХЛОРОФИЛЛА  
В ЛИСТЯХ ИЗОГЕННЫХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ  
(*TRITICUM AESTIVUM* L.), МАРКИРОВАННЫХ АЛЛЕЛЯМИ *cn-A1* И *cn-D1***

**Activity of chlorophyll biosynthesis system in leaves of isogenic lines of soft wheat (*Triticum aestivum* L.) marked with *cn-A1* and *cn-D1* alleles**

**В.В. Рассадина<sup>1</sup>, С.Ф. Коваль<sup>2</sup>, Н.Г. Аверина<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, г. Минск  
E-mail: [valentina\\_rassadina@rambler.ru](mailto:valentina_rassadina@rambler.ru)

<sup>2</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск  
E-mail: [kovalsf@nsc.bionet.ru](mailto:kovalsf@nsc.bionet.ru)

Экспрессия ядерных мутантных аллелей *cn-A1* (АНК-32А) и *cn-D1* (АНК-32В), локализованных, соответственно, на длинном плече 7-ой хромосомы А и Д геномов в почти изогенных линиях гексаплоидной  $ВС_9$  мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), приводит к появлению проростков хлорина фенотипа. Аллели *cn* влияют на формирование хлоропластов, фотосинтез и накопление хлорофилла (Хл). Обнаружено наличие дозового эффекта и аддитивное межлокусное взаимодействие мутантных аллелей. Исследование эпигенетического проявления мутаций представляет интерес для установления первопричины дефицита пигментов в изогенных линиях, локализации фотосинтетических генов в геноме пшеницы и взаимодействия продуктов различных геномов в полиплоидных организмах. Проанализировано влияние маркеров *cn-A1* и *cn-D1* на уровень фотосинтетических пигментов в этиолированных, зеленеющих и зеленых растениях и основные показатели, характеризующие состояние системы биосинтеза Хл.

Зеленеющие после этиоляции 7-дневные проростки *sp*-линий характеризуются более длительной лаг-фазой и сниженной скоростью накопления Хл по сравнению с родительской линией Новосибирская 67 (Н-67). Такие же различия в накоплении Хл наблюдаются и при выращивании растений на фотопериодическом свете. Соотношение Хл  $a/b$  во всех линиях в ходе накопления пигментов снижается, оставаясь, однако, в листьях мутантов на всех стадиях более высоким, чем в контроле, что свидетельствует о замедленном, по сравнению с Н-67, формировании в них Хл  $a/b$  ССК. Уровень каротиноидов в этиолированных проростках всех линий примерно одинаков, но по мере формирования основной массы содержащих каротиноиды пигмент-белковых комплексов на более поздних стадиях зеленения или в зеленых листьях, содержание желтых пигментов в мутантах оказывается ниже.

Этиолированные листья изогенных линий содержат в среднем на 5 % больше протохлорофиллида (Пд) по сравнению с листьями исходной линии (Н-67). Содержание фотоактивного Пд практически одинаково для растений всех линий, тогда как содержание фотонеактивного Пд у маркированных линий выше. Кинетика этерификации образованного в результате фотовосстановления Пд хлорофиллида в листьях мутантов не отличается от таковой в рекуррентной линии. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии различий между линиями в осуществлении заключительных реакций хлорофиллообразования, начиная от комплексов Пд-НАДФН оксидоредуктаза до образования молекулы Хл.

Длительность лаг-фазы ресинтеза Пд в кратковременно освещенных и повторно затемненных листьях АНК-32А и АНК-32В увеличена по сравнению с Н-67, а скорость ресинтеза пигмента в них ниже. Тем не менее предельный уровень ресинтезированного Пд примерно одинаков во всех линиях. Скорость накопления эндогенной 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) в ходе ресинтеза Пд, а также в процессе зеленения этиолированных листьев на непрерывном свете в мутантных линиях ниже, чем в Н-67.

В условиях не лимитированного поступления в листья экзогенной АЛК мутантные линии накапливают меньшие количества Пд, суммы Mg-протопорфирина IX (МПП) и его монометилового эфира на фоне более высокого содержания их предшественника протопорфирина IX (ПП), что может быть связано с пониженной ферментативной активностью на участке включения ионов Mg в порфириновое кольцо. При этом в отсутствие экзогенной АЛК в этиолированных, затемненных постэтиолированных или зеленеющих листьях маркированных линий не накапливается предшественник магний-порфиринов – ПП.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что фенотип мутантов связан с пониженной активностью ферментативных стадий, осуществляющих образование АЛК и включение ионов Mg в кольцо ПП. Следовательно, активности двух ключевых этапов хлорофиллообразования – синтеза АЛК и образования МПП, скорректированы в маркированных линиях таким образом, что скорость образования начального субстрата (АЛК) соответствует скорости включения ионов Mg в порфириновое кольцо, что и определяет, в конечном счете, скорость образования в мутантах Пд (в темноте) и Хл (на свету).

#### ПРИМЕНЕНИЕ QTL-АНАЛИЗА ДЛЯ КАРТИРОВАНИЯ ГЕНОВ УГЛЕВОДНОГО МЕТАБОЛИЗМА У *ARABIDOPSIS*

##### Use of QTL-analysis to map genes of carbohydrate metabolism in *Arabidopsis*

Л.И. Сергеева<sup>1, 2</sup>, Д. Вреугденхил<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва

<sup>2</sup> Лаборатория физиологии растений Университета Вагенингена, Нидерланды

E-mail: lsergeeva@mail.ru

Выяснение природы генов, контролирующих полигенные признаки, только начинается. Анализ локусов количественных признаков (QTL-анализ, от quantitative trait loci) позволяет эффективно картировать и идентифицировать гены, определяющие сложные (полигенные) признаки. QTL-анализ выявляет участки генома, где расположены гены или группы тесно сцепленных генов, обнаруживающих значительное количественное влияние на признак, и позволяет количественно оценить такое влияние.

Картирование QTL использовали для идентификации генов, отвечающих за метаболические пути. На 165 рекомбинантных инбредных линиях популяции F11 *Ler* × *Cvi Arabidopsis thaliana* проведены эксперименты по локализации *in situ* и определению в экстрактах активности ключевых ферментов углеводного метаболизма: УДФ-глюкозо-пирофосфорилазы и АДФ-глюкозо-пирофосфорилазы. Полученные данные использованы с применением генетических молекулярных маркеров и специфического статистического анализа для картирования QTL. Для обоих вышеназванных ферментов обнаружены QTL, совпадающие с позициями уже аннотированных (и/или вероятных) структурных генов, а также найдены QTL в других позициях, которые, предположительно,

указывают на регуляторные гены. В опытах по определению содержания сахаров и крахмала в проростках рекомбинантных инбредных линий популяции F11 *Ler* × *Cvi Arabidopsis* и близко-изогенных линий обнаружены QTL, влияющие на содержание крахмала, часть которых совпала с локусами генов, регулирующих активность ферментов биосинтеза крахмала и гликолиза: АДФ-глюкозо-пирофосфорилазы и УДФ-глюкозо-пирофосфорилазы. Некоторые из этих локусов органоспецифичны. Таким образом, открыты новые, видимо, регуляторные локусы ключевых ферментов углеводного обмена, предположительно участвующие в биосинтезе крахмала. Эти QTL определяются генами, которые еще предстоит идентифицировать в процессе высоко разрешающего картирования.

#### НУКЛЕАЗНЫЕ АКТИВНОСТИ И ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК ПРИ СТАРЕНИИ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ ГОРОХА НОРМАЛЬНОГО И АФИЛЬНОГО ГЕНОТИПОВ

##### Nuclease activities and DNA fragmentation during leaf senescence in *Pisum sativum* plants (normal and afilic genotypes)

А.В. Середина<sup>1</sup>, Н.И. Александрюшкина<sup>2</sup>, Э.М. Коф<sup>3</sup>, А.А. Борзов<sup>3</sup>,  
И.Б. Кудряшова<sup>2</sup>, П.Н. Харченко<sup>1</sup>, Б.Ф. Ванюшин<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, г. Москва

<sup>2</sup> НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,  
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва  
E-mail: [vanyush@belozersky.msu.ru](mailto:vanyush@belozersky.msu.ru)

<sup>3</sup> Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: [kof@ippras.ru](mailto:kof@ippras.ru)

Старение (senescence) листьев, лепестков и колеоптилей у растений обычно сопровождается запрограммированной гибелью клеток (ЗГК). В поисках новых моделей для изучения ЗГК был проведен анализ целостности ДНК и динамики изменения ДНК-азной активности в листьях дикой формы и *af* листового мутанта гороха (усатый тип листа) *Pisum sativum* L. с измененной, по сравнению с обычной, морфологией листа.

Показано, что по мере старения и появления первых признаков увядания в листьях гороха происходит заметная деградация ДНК. У растений дикого типа с 12-го по 9-й субапикальный лист ДНК нативна, а в шестом листе деградация ДНК уже достаточно выражена при сохранении заметной доли высокомолекулярной ДНК, тогда как в четвертом и третьем листьях с явными признаками увядания гидролиз ДНК, очевидно, имеет лавинообразный

характер, и высокомолекулярная фракция ДНК практически отсутствует. Аналогичные изменения в характере деградации ДНК по мере старения происходят и в листьях растений с афильным фенотипом, однако в отличие от растений дикого типа степень деградации ДНК в шестом и пятом листьях выражена в меньшей степени. Общим для обеих изученных форм гороха является отсутствие межнуклеосомной фрагментации ДНК (лестницы), характерной для некоторых форм ЗГК у растений.

Деградация ДНК при ЗГК осуществляется группами ДНК-аз, состав которых изменяется в процессе гибели клетки. Показано, что на фоне увеличения суммарной нуклеазной активности в стареющих листьях изменяется соотношение «кислых» и «щелочных» ДНК-аз, причем выявлены четкие различия в их активности у нормальных и афильных растений. При старении листьев гороха в них индуцируются ДНК-азные активности с молекулярной массой 42, 37, 34, 26 и 21 kD соответственно. Отмечается смена набора ДНК-азных активностей, функционирующих на разных этапах старения листа и в разных его частях. Так, в молодых листьях, где активно идут процессы роста и формирования проводящих путей, ДНК-азная активность преимущественно связана с белками 34 и 21 kD. В старых листьях с выраженным хлорозом и увяданием максимальны ДНК-азные активности, ассоциированные с белками 37 и 26 kD. Это может быть связано с реализацией разных форм ЗГК (с одной стороны, апоптоз при формировании сосудистых пучков, а с другой – ЗГК при естественном старении листьев). Выявление нуклеазных активностей, участвующих в деградации ДНК, сопряженной с образованием сосудов, очевидно, оказалось возможным благодаря особенностям морфологии листьев гороха, состоящих из листочков и усиков; в усиках практически нет паренхимы и основной объем занят проводящими пучками. Проанализирована зависимость выявленных ДНК-азных активностей от pH и ионов двухвалентных металлов. Установлено, что основные активности относятся к «щелочным»  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимым нуклеазам с pH оптимумом при 6,8 и молекулярной массой около 40 kD. Лабильный белковый комплекс (более 100 kD) с ДНК-азной активностью выявлен только в усах листа гороха.

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

ЧУВСТВИТЕЛЬНАЯ К СТАТУСУ МЕТИЛИРОВАНИЯ  
ДНК S-АДЕНОЗИЛМЕТИОНИН-ЗАВИСИМАЯ  
РАСТИТЕЛЬНАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА

S-adenosyl-l-methionine-dependent plant endonuclease sensitive  
to DNA methylation status

Д.Е. Соболев, Л.И. Федореева, Б.Ф. Ванюшин

Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,  
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва  
E-mail: [vanyush@belozersky.msu.ru](mailto:vanyush@belozersky.msu.ru)

Из богатой митохондриями фракции везикул, возникающих при апоптозе в клетках стареющих колеоптилей 7-дневных этиолированных проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.), выделена и частично охарактеризована новая  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимая эндонуклеаза WEN1 с молекулярной массой около 27 кДа. Особенность фермента – двухфазный рН-оптимум активности. Один из максимумов его активности (рН 7.0) типичен для  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимых нуклеаз растений. Второй максимум активности (рН 10.0), по-видимому, отражает то, что фермент в качестве субстрата предпочитает одноцепочечную ДНК, участки которой появляются в результате частичной щелочной денатурации двухцепочечной субстратной ДНК.

Эндонуклеаза WEN1 расщепляет двуцепочечную ДНК фага  $\lambda$  ( $\text{dam}^+$ ,  $\text{dcm}^+$ ), содержащую метилированные остатки цитозина (в последовательности  $\text{Cm}^3\text{CWGG}$ ) и аденина ( $\text{Gm}^6\text{ATC}$ ), более эффективно, чем ДНК фага  $\lambda$  ( $\text{dam}^-$ ,  $\text{dcm}^-$ ), неметилированную по этим сайтам. Обе эти ДНК («Fermentas») идентичны по длине и нуклеотидной последовательности. Значит, WEN1 распознает различия в статусе метилирования ДНК. До сих пор это явление не было известно для эндонуклеаз высших эукариот, а свойственно лишь некоторым бактериальным рестрикционным эндонуклеазам. Однако при гидролизе нуклеазой WEN1 не происходит дискретного расщепления метилированной и неметилированной ДНК фага  $\lambda$  с образованием набора фрагментов определенной длины, как это характерно для бактериальных эндонуклеаз рестрикции. Тем самым WEN1, как и многие иные растительные эндонуклеазы, не обладает строгой сайт-специфичностью.

S-аденозил-L-метионин (SAM), универсальный донор метильных групп, в концентрации 1-10 мМ активизирует гидролиз эндонуклеазой WEN1 неметилированной и не влияет на расщепление метилированной  $\lambda$  фаговой ДНК. Конкурентные ингибиторы метилирования ДНК S-аденозил-L-гомоцистеин (SAH) и S-изобути-

ладенозин (SiBA) (в отличие от SAM они не имеют активной метильной группы) также активируют гидролиз неметилированной ДНК. Следовательно, активация SAM гидролиза ДНК не обусловлена метил-донорными свойствами SAM. Значит, именно S-аденозильная группа SAM, SAH и SiBA является аллостерическим фактором активности эндонуклеазы WEN1. Таким образом, впервые показано, что действие растительной эндонуклеазы, подобно некоторым типичным бактериальным эндонуклеазам рестрикции, модулируется S-аденозилметионином и его аналогами.

Функциональная роль WEN1 не известна. Возможно, ее активность каким-то образом скоординирована с ранее обнаруженной в нашей лаборатории адениновой ДНК-метилтрансферазой *wadmtase*, которая, подобно WEN1, локализована в содержащих митохондрии везикулах гибнущих клеток колеоптиля. Оба эти фермента являются S-аденозилметионин- и  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -зависимыми. Таким образом, у растений, по-видимому, существует система, во многом сходная с системами рестрикции-модификации у бактерий.

Не исключено, что WEN1 участвует в деградации ядерной ДНК при запрограммированной гибели растительной клетки. Хотя в расшифрованных геномах растений и отсутствуют последовательности, гомологичные митохондриальной эндонуклеазе G животных, по многим свойствам (зависимость от ионов, двухфазный pH-оптимум, молекулярная масса) найденный растительный фермент WEN1 напоминает эндонуклеазу G, принимающую участие во фрагментации ДНК при апоптозе.

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

#### **ВЛИЯНИЕ МАРКЕРНЫХ ГЕНОВ И ИХ РАЗЛИЧНЫХ СОЧЕТАНИЙ НА МОРФО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH.**

**The influence of marker's genes and their various combinations  
on morpho-physiological parameters of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.**

**О.В. Усманова, Т.П. Усманов, Г.С. Шакирзянова, Ф.Х. Бободжанова**  
Институт физиологии растений и генетики АН Республики Таджикистан,  
г. Душанбе  
E-mail: [pulod\\_us@tajik.net](mailto:pulod_us@tajik.net)

Изучали действие мутантных генов в различной генотипической среде на рост, развитие и продуктивность растений *A. thaliana*. Материалом для исследования служила уникальная экспериментальная модельная система, состоящая из 32-х по-разному марки-



рованных различными сигнальными генами генетически чистых линий арабидопсиса, полученных нами путем многократных скрещиваний между собой и с исходной расой *Columbia* маркерных линий *tr'*, *vc'er* и *gl'an*, мутантные гены которых локализованы во всех ( $n = 5$ ) хромосомах. На различных фазах жизненного цикла растений проводили фенологические наблюдения, учитывали изменчивость ряда качественных и количественных признаков.

Получена полная морфо-физиологическая характеристика 32-х линий, которая вскрыла большой потенциал генотипической изменчивости вида *A. thaliana* по плодовитости – интегральному показателю структуры и функции растительного организма. Исследования показали, что различная генотипическая среда по-разному влияет на проявление генов *tr'*, *vc'*, *er'*, *gl'* и *an'*, если оценивать их действие по параметрам плодовитости (вес 1000 семян, число семян в плоде или же на одном растении). Обнаружено закономерное уменьшение среднестатистических показателей в зависимости от числа мутантных генов, вводимых в генотип арабидопсиса. Максимальные величины веса 1000 семян (1.54 г), числа семян в стручке (63.3 шт.) и на одном растении (3856 шт.) зафиксировано у растений с единственным мутантным геном – *tr'*, *vc'*, *er'*, *gl'* и *an'*. Минимальные (1.34 г, 36.2 и 2232 шт. соответственно) – при введении в генотип арабидопсиса пяти мутантных генов. Установлены границы изменчивости по весу 1000 семян: min – 1.07, max – 2.00. Колебания в весе семян у мутантных форм по сравнению с нормой (исходная раса *Columbia*) в большинстве случаев статистически достоверны.

Установлено, что в зависимости от мутантных генов и их различных сочетаний в генотипе арабидопсиса по-разному меняются вес одного семени и число семян, формирующихся на одном растении. А масса семян, получаемая с одного растения, является постоянной (5.94 г – 5.75 г) при условии введения в генотип арабидопсиса от одного и до трех мутантных генов. Однако при введении в генотип арабидопсиса четырех и пяти генов показатель «масса семян», получаемых с одного растения, резко падает – 3.13 и 3.05 г. Отмечено также, что с увеличением числа мутантных генов растения значительно позже достигают фазы плодоношения-созревания по сравнению с исходной расой *Col* и единичными мутантными генами, присутствующими в генотипе.

Данные, полученные на экспериментальной модельной системе *A. Thaliana*, дополняет широко распространенное мнение о том, что введение в генотип высшего растения большого числа рецессивных генов приводит к замедлению темпов роста и развития растений, к уменьшению величины различных показателей, характеризующих их фотосинтетическую продуктивность.

**РОЛЬ ФИТОХРОМНОЙ СИСТЕМЫ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ  
СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ****Role of phytochrome system in succinate  
dehydrogenase expression regulation in plant leaves**

Д.Н. Федорин, А.Т. Епринцев, В.Н. Попов, М.А. Бондаренко  
Воронежский государственный университет, г. Воронеж  
E-mail: rybolov@mail.ru

В зеленых растениях на свету поставщиком энергетических эквивалентов является фотосинтетическая ЭТЦ. В таких условиях роль цикла Кребса в энергетике растительной клетки нивелируется, о чем и свидетельствует резкое снижение активности ферментов этого пути, хотя не происходит их полного выключения. Вероятнее всего, такое поведение ферментов связано с функционированием ЦТК на свету не как поставщика энергии, а как источника интермедиатов для конструктивного метаболизма. Интересным представляется изучение способов регуляции фотосинтеза и темнового дыхания на энзиматическом уровне. Сукцинатдегидрогеназа (СДГ) может определять не только скорость функционирования ЦТК, но и дыхания в целом. Поэтому изучение уровня экспрессии СДГ-комплекса позволяет показать один из механизмов такой регуляции.

В качестве объектов исследования использовали 24-дневные растения *Arabidopsis thaliana* и 14-дневные проростки *Zea mays*. Нами установлено, что активность сукцинатдегидрогеназы в значительной степени зависит от условий освещения. На свету происходит сильное угнетение работы фермента в обоих объектах исследования, что связано с его ролью в данных условиях не как поставщика АТФ, а источника различных метаболитов для биосинтетических процессов. В ходе изучения влияния красного света (КС) и дальнего красного света (ДКС) на функционирование СДГ было установлено, что в регуляции фермента принимает участие фитохромная система. Под действием КС активность СДГ в листьях арабидопсиса и кукурузы уменьшалась в 3-4 раза, что свидетельствует об ингибировании фермента активной формой фитохрома. Облучения растений ДКС и последовательное действия КС и ДКС проявляется в противоположном влиянии на работу СДГ.

Анализ мутантных форм арабидопсиса, в геноме которых отсутствует ген одного из фитохромов А (PH<sub>Y</sub>A) или В (PH<sub>Y</sub>B), позволил установить роль каждого из указанных рецепторов в регуляции сукцинатдегидрогеназы. После облучения КС в растениях арабидопсиса мутантного по гену PH<sub>Y</sub>A не наблюдалось измене-

ний в работе фермента, из-за отсутствия ингибирующего фактора для СДГ. Действие ДКС и последовательное действие КС и ДКС также не проводило к ингибированию фермента. В арабидопсисе дикого типа и мутантного по гену РНУВ после облучения их КС активность сукцинатдегидрогеназы ингибировалась более чем в 5 раз, однако не наблюдалось угнетения работы СДГ при облучении ДКС и последовательном действии КС и ДКС. Из полученных данных можно заключить, что в регуляции сукцинатдегидрогеназы принимает участие активная форма фитохром А.

Широко известным фактом является участие фитохромной системы в регуляции ферментативных систем путем изменения экспрессии генов. Свое действие он реализует через различные сигнальные системы, вторичные мессенжеры, которыми могут выступать ионы кальция, цАМФ, G-белки и др.

В опытах по влиянию КС и ДКС на уровень экспрессии гена *sdh 1-2* в листьях арабидопсиса методом Нозерн-дот-гибридизации и ПЦР в реальном времени было показано, что КС вызывает уменьшение количества мРНК СДГА в клетках растения. Противоположный эффект вызывает ДКС и последовательное действие КС и ДКС, приводящее к более интенсивному накоплению мРНК гена *sdh1-2*. Изменение уровня мРНК гена *sdh 1-2* под действием различного светового режима коррелирует с изменением активности СДГ. Так, на свету уровень транскрипции гена *sdh1-2* значительно снижен по отношению к растениям «темнового» варианта, что проявляется и в уменьшении активности СДГ. Аналогичные изменения в уровне транскрипции гена и изменения активности фермента наблюдаются и при действии КС и ДКС на листьях арабидопсиса.

Аналогичные результаты были получены и при исследовании изменения уровня экспрессии гена *sdha* кукурузы, экспонируемой в разных световых режимах. На свету и под влиянием красного света количество мРНК СДГ значительно меньше, чем в темноте и после облучения ДКС.

Таким образом, регуляция скорости экспрессии гена *sdh 1-2* арабидопсиса и гена *sdha* кукурузы фитохромной системы является одним из механизмов переключения энергетического метаболизма растения в зависимости от условий освещения. Днем фотосинтетический аппарат обеспечивает клетку энергией, и активная форма фитохрома блокирует экспрессию гена, кодирующего СДГ, уменьшая количество мРНК в клетке. В темноте происходит фотоконверсия активной форма фитохрома А в неактивную, которая снимает блокирование с гена субъединицы А СДГ, и количество мРНК в клетке резко увеличивается.

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА  
УСТОЙЧИВОСТИ СОРТОВ ВИШНИ К ОПАСНЫМ ГРИБНЫМ БОЛЕЗНЯМ  
В УСЛОВИЯХ ЦЕНТРАЛЬНОЙ РОССИИ

Estimation of genetic potential immunity of cherry cultivars  
to dangerous mushroom illnesses in the Central Russia conditions

И.Э. Федотова, А.Ф. Колесникова, О.В. Острикова  
Орловский государственный университет, г. Орел  
E-mail: [ostrix83@mail.ru](mailto:ostrix83@mail.ru)

Ухудшение экологической среды, возникновение климатических аномалий способствуют массовому распространению опасных заболеваний, что ведет к утрате зимостойкости, ухудшению состояния деревьев и, как следствие, к снижению или полной потере адаптивности. В сложившихся условиях промышленные насаждения вишни стали нерентабельными, резко сократились их площади.

Основная причина этого – потеря гетерогенности и определенная ядерная и цитоплазматическая однородность сортовых популяций, возникшая вследствие гибридогенного происхождения вишни обыкновенной (*C. vulgaris* Mill.,  $2n = 4x = 32$ ) от вишни степной (*Cerasus frutikosa* Pall.,  $2n = 4x = 32$ ) и черешни [*C. avium* (L.) Moench,  $2n = 2x = 16$ ] и естественной многовековой эволюции, а также использования в селекции взаимных скрещиваний генотипов этих трех видов. Многочисленными исследованиями установлено, что среди существующего в мире сортимента вишни (около 1300 сортов) отсутствуют сорта, полностью иммунные к опасным грибным болезням — коккомикозу [возбудитель *Coccomyces hiemalis* Higg.], монилиозу [возбудитель *Monilia cinerea* (Schroet. Honey)].

Отбор наиболее адаптивных сортов вишни обыкновенной является актуальной задачей для интенсификации промышленного садоводства и селекции. В связи с этим необходима всесторонняя оценка генетического потенциала адаптивности генофонда данной культуры, в том числе – устойчивости к опасным грибным болезням.

Исследования проводились на агробиологической станции ГОУ ВПО «Орловский государственный университет» в 2003-2006 гг. Объектами исследований послужили сорта вишни обыкновенной:

- полученные на основе генофонда видов вишня обыкновенная и черешня — Орлица, Тургеневка, Ровесница, Мценская, Жуковская, Ливенская, Шоколадница, Памяти Вавилова, Трофимовская, Орлея, Муза;

- полученные на основе генофонда видов вишня обыкновенная, черешня и вишня степная – Стойкая, Неполодская, Превосходная Колесниковой;

- сорта и гибриды, полученные на основе генофонда видов вишня обыкновенная и вишня Маака [*C. Maackii* (Rupr.) Erem. et Simag.] – Новелла, Долгожданная, Элитный сеянец (ЭЛС) 14-1, Элитный сеянец (ЭЛС) Сюрприз.

Оценку устойчивости к коккомикозу и монилиозу растений вишни в полевых условиях, статистическую обработку данных проводили в соответствии с методикой «Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур» (Орел, 1999).

Иммунных сортов среди изученных не выявлено. По устойчивости к коккомикозу в качестве лучших выделилась группа сортов, полученная с участием вишни Маака (средний балл поражения коккомикозом 1.53, в среднем по всем изученным сортам – 2.55). Высокой устойчивостью к коккомикозу обладают ЭЛС Сюрприз (средний балл поражения 0.28 балла) и ЭЛС 14-1 (0.82 балла). Близок к ним по устойчивости сорт Новелла (1.45 балла). Достоверных отличий по устойчивости к коккомикозу между двумя другими группами не выявлено: 2.74 балла для группы сортов, в происхождении которых участвовали виды вишня обыкновенная, вишня степная и черешня; 2.91 балла для группы сортов, в происхождении которых участвовали вишня обыкновенная и черешня. В каждой из этих групп есть сорта устойчивые, среднеустойчивые, восприимчивые.

По данному компоненту адаптивности среди всех сортов выделены следующие группы: высоко устойчивые (высоко адаптированные) – ЭЛС Сюрприз, ЭЛС 14-1; устойчивые (адаптированные) – Орлица, Неполодская, Новелла, Памяти Вавилова; среднеустойчивые (среднеадаптированные) – Ровесница, Превосходная Колесниковой, Мценская, Ливенская, Тургеневка; восприимчивые (неадаптированные) – Шоколадница, Жуковская, Орлея, Трофимовская, Долгожданная, Стойкая.

В результате исследований не удалось выделить группу сортов одинакового происхождения, все сорта которой были бы высоко или слабо устойчивыми к монилиозу. Иммунных к монилиозу сортов не выявлено. В качестве лучшей выделилась группа сортов, полученная с участием вишни Маака (средний балл 1.13). Из двух других групп больший средний балл поражения монилиозом у группы сортов, в происхождении которых участвовал вид вишня степная (2.22 балла), меньший (1.76 балла) — у группы сортов, в происхождении которых участвовала черешня. По данному компоненту адаптивности выделены следующие группы сортов: высоко

устойчивые (высокоадаптированные) – ЭЛС Сюрприз, Долгожданная; устойчивые (адаптированные) – ЭЛС 14-1, Тургеневка, Ровесница, Орлея, Трофимовская, Орлица, Стойкая и Неполодская; восприимчивые (неадаптированные) – Шоколадница, Жуковская, Новелла; неустойчивые – Мценская, Ливенская, Превосходная Колесниковой.

Выделен сорт, устойчивый к двум грибным болезням – ЭЛС Сюрприз.

**СВЕТОВАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ  
ВНЕШНЕЙ РОТЕНОН-НЕЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ  
NADH-ДЕГИДРОГЕНАЗЫ ТОМАТА**

**Light regulation of tomato external rotenone-insensitive  
NADH-dehydrogenase expression**

**О.Ю. Фоменко, Н.А. Карпеченко, А.С. Шацких, В.Н. Попов**  
Воронежский государственный университет, г. Воронеж  
E-mail: *fomenych2001@mail.ru*

Растительные митохондрии, в отличие от их животных аналогов, содержат альтернативные пути окисления дыхательных субстратов. К ним относятся rotenone-нечувствительные NAD(P)H-дегидрогеназы, передающие электроны на убихинол, и альтернативная оксидаза. При окислении NAD(P)H через альтернативные пути дыхания не происходит генерации трансмембранного потенциала. Внутримитохондриальный NADH окисляется, помимо комплекса I, несопряженной внутренней NAD(P)H-дегидрогеназой (NDin). Кроме того, растения способны напрямую окислять цитоплазматический NAD(P)H за счет функционирования внешних rotenone-нечувствительных NAD(P)H-дегидрогеназ (NDex), причем это окисление происходит только в присутствии  $Ca^{2+}$ . В зависимости от вида растения, типа ткани и условий окружающей среды соотношение активностей данных ферментов может варьировать в широких пределах.

Целью данной работы являлось изучение влияния освещенности на уровень экспрессии гена внешней rotenone-нечувствительной NADH-дегидрогеназы митохондрий зеленых листьев томата (ndb1).

Зеленые растения томата выращивались в грунте при 12-часовом световом дне. Опытные растения инкубировались 24 часа в темноте, а затем переносились на свет с интенсивностью 25 Дж/м<sup>2</sup>·с. Уровень экспрессии гена внешней rotenone-нечувствительной

NADH-дегидрогеназы определялся методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием специфических праймеров (прямой 5'-ctgatgaatggttgcgagtg-3' и обратный 5'-tcaccccttatcccgagcttt-3') с оптимальной температурой отжига 60 °C. В качестве контрольных объектов использовались растения томата, подвергнутые 24-часовой инкубации в темноте. Относительное количественное определение уровня экспрессии *ndb1* было произведено с использованием  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -метода.

В результате работы было обнаружено, что при переносе растений томата из темноты на свет относительное количество транскрипта *ndb1* уже через 24 часа увеличивалось в 12 раз по сравнению с контролем. В наших экспериментах этому увеличению соответствовало возрастание активности внешней ротенон-нечувствительной NADH-дегидрогеназы в 1.98 раза.

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что внешняя ротенон-нечувствительная NADH-дегидрогеназа томата является фотоиндуцибельным ферментом. Физиологический смысл этой индукции состоит, по-видимому, в предотвращении перевосстановленности ЭТЦ митохондрий в условиях интенсивного фотосинтеза, что позволяет эффективно снижать скорость генерации активных форм кислорода и предохранять повреждение клеточных структур и, в первую очередь, митохондриальной ДНК.

Работа частично подержана грантами РФФИ и Президента России для молодых докторов наук.

## ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ КУЛЬТУРНЫХ И ДИКОРАСТУЩИХ ФОРМ ЗЕРНОВЫХ ЗЛАКОВ В ТАДЖИКИСТАНЕ

### Genome analysis of local species and wild forms of cereal crops in Tajikistan

Х.Х. Хурматов, Д.А. Сергеев, З.К. Кавракова, Е.А. Салина,  
Е.К. Хлесткина, Ф.Ю. Насырова

Институт физиологии растений и генетики АН Республики Таджикистан,  
г. Душанбе

Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

Целью настоящей работы являлась оценка эффективности набора RAPD и SNP-маркеров для изучения генетического разнообразия сортов мягкой и твердой пшеницы, произрастающих в Таджикистане, а также различных форм их диких сородичей.

В качестве объектов исследования использовали сорта мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L., геном AABBDD, твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf., геном AABB), а также были взяты по

30 образцов *Aegilops triuncialis* L. (геном UUCC), *Ae. tauschii* Coss. (геном DD), *Ae. cylindrical* Hest. (CCDD) и *Ae. crassa* Boiss. (DDM\*M\*), собранных в разных экологических районах Таджикистана.

В результате амплификации ДНК образцов пшениц и *Aegilops* с использованием RAPD праймеров было выявлено 104 ПЦР фрагмента, от 6 до 21 (в среднем 13) на один RAPD праймер. Из 104 ПЦР фрагментов 73 (70 %) были полиморфны между изученными генотипами, 31 (30 %) имели одинаковую длину у всех изученных образцов. Самый высокий процент полиморфных RAPD фрагментов (95 %) был получен при амплификации ДНК с праймером R074. В то же время в случае одного праймера (R181) ни одного полиморфного ПЦР фрагмента (0 %) выявлено не было у 16 изученных образцов. Уровень полиморфизма, выявляемый при амплификации геномной ДНК с использованием остальных праймеров, имел промежуточное значение. Всего выявляется 6 RAPD фрагментов длиной в пределах 500-1000 пар нуклеотидов (п.н.) при амплификации ДНК 16 образцов *Triticum* и *Aegilops* с данным праймером. Четыре ПЦР-фрагмента длиной около 500, 700, 800 и 900 п.н. были неполоморфными. RAPD фрагмент длиной около 740 п.н. присутствует у всех восьми образцов вида *Ae. triuncialis* и отсутствует у других изученных видов. Внутривидовой полиморфизм у *Ae. triuncialis* выявляется с помощью ПЦР фрагмента длиной около 1000 п.н., который присутствует только у образца *Ae. triuncialis* из района Нурабад.

Мы использовали два SNP-маркера, разработанных для генома *T. aestivum*. Изучаемый SNP локус длиной около 400 п.н. присутствует у всех образцов пшеницы и *Ae. tauschii* и отсутствует у всех образцов *Ae. triuncialis*. На основе полученных результатов может быть сделан вывод о том, что SNP маркеры, разработанные для мягкой пшеницы, могут быть использованы и для близкородственных видов, таких как твердая пшеница *T. durum* и донор D-генома мягкой пшеницы *Ae. tauschii*.

На основании данных, полученных в ходе RAPD и SNP анализа, была построена дендрограмма, отражающая генетическое сходство изученных образцов. В дендрограмме выделяются 3 основных кластера. Первый объединяет мягкую и твердую пшеницу, второй – *Ae. tauschii*, третий – *Ae. triuncialis*. Причем кластер *Ae. tauschii* имеет большее генетическое сходство с пшеницей, чем *Ae. triuncialis*, что соответствует известным данным о филогенетическом происхождении мягкой пшеницы. Внутри трех образованных кластеров наибольший уровень генетического разнообразия отмечен для *Ae. triuncialis*, среди образцов которого наиболее выделяется представитель популяции, произрастающий в районе



Нурабад. Между двумя формами *Ae. tauschii* существенного различия обнаружено не было. Установлено полное генетическое сходство сортов мягкой и твердой пшеницы в изученных RAPD локусах, что согласуется с полученными ранее данными о низком уровне межсортового полиморфизма данных локусов у мягкой пшеницы.

### ПЛАСТИДНЫЕ СИГНАЛЫ: РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ЯДЕРНЫХ ГЕНОВ

#### Plastid-to-nucleus signaling: regulation of nuclear genes expression

Н.П. Юрина, О.В. Осипенкова

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, г Москва

E-mail: NYurina@inbi.ras.ru

Для выявления роли пластидных сигналов экспрессии ядерных генов пластидных белков было изучено действие фотодеструкции хлоропластов ячменя на экспрессию ядерных генов *Elip*, кодирующих белки светового стресса хлоропластов и экспрессию генов белков фотосинтеза. Фотодеструкцию хлоропластов использовали для изучения их участия в экспрессии ядерных генов. Показано, что гены белков фотосинтеза не транскрибируются при фотодеструкции хлоропластов, тогда как гены стрессовых белков *Elip* продолжают транскрибироваться. Обнаружено, что транскрипция гена низкомолекулярного белка *Elip* снижена на 30-50 %, что предполагает наличие хлоропластного контроля на этапе транскрипции этого гена. Впервые показано, что интермедиаты биосинтеза тетрапирролов – Mg-протопорфирин IX и метиловый эфир Mg-протопорфирина IX, которые под действием дипиридила накапливаются в хлоропластах на стадии превращения этих порфиринов в протохлорофиллид, существенно (на ~50 %) подавляют экспрессию ядерного гена низкомолекулярного белка *Elip*. Полученные данные подтверждают, что интермедиаты биосинтеза тетрапирролов служат медиаторами пластидных сигналов при регуляции экспрессии ядерных генов стрессовых белков пластид. Для того, чтобы выяснить, может ли редокс-состояние электрон-транспортной цепи хлоропластов выступать в роли пластидного сигнала при экспрессии гена *Elip*, использовали 3-(3', 4'-дихлорфенил)-1,1'-диметилмочевину (DCMU). Этот специфический ингибитор блокирует транспорт электронов от ФСII к пулу пластохинонов (PQ), что предотвращает восстановление последнего и приводит к накоплению пула окисленного PQ. Показано, что редокс-состояние электрон-транспортной цепи фотосинтеза участвует в регуляции

экспрессии ядерного гена хлоропластного белка светового стресса *Elip*. Изменение редокс-состояния хлоропластов, вызванное обработкой проростков ячменя DCMU, приводит к снижению транскрипции гена *Elip* (на ~80 %). Таким образом, в регуляции экспрессии гена хлоропластного белка светового стресса *Elip* у ячменя участвуют, по крайней мере, два класса пластидных сигналов: тетрапирролы и редокс-состояние пула пластохинонов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 06-04-48-923а).

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ, НАБЛЮДАЕМЫЕ В ПРОЦЕССЕ РЕГЕНЕРАЦИИ  
И ЭКСПРЕССИИ ЦЕЛЕВОГО ГЕНА,  
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ИНКУБИРОВАНИЯ  
ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ЭКСПЛАНТОВ КАРТОФЕЛЯ  
НА СЕЛЕКТИВНЫХ СРЕДАХ**

**Some regularities in shoot regeneration  
and tagged gene expression depending on the length  
of the potato transformed explant incubation period on the selective media**

**Н.О. Юрьева<sup>1</sup>, Г.И. Соболюкова<sup>1</sup>, И. Абдеева<sup>2</sup>, И.В. Голденкова<sup>2</sup>,  
Ю.Ю. Кустова<sup>1</sup>, Е.М. Крылова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: [yno@newmail.ru](mailto:yno@newmail.ru)

<sup>2</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва

Было выявлено сходство в частоте появления трансгенных растений картофеля с определенным уровнем экспрессии целевого и репортерного генов в процессе агробактериальной трансформации клубневых эксплантов сортов картофеля Жуковский Ранний и Юбилей Жукова конструкциями с репортерным геном лихеназы и Tms. В обоих случаях маркерным геном служил NPT. В течение первых 14 суток на регенерационной среде без селективного фактора было получено 5 и 6 регенерантов соответственно. Ни один из них не был трансгенным. В течение последующего 21 дневного пассажа на селективной среде получили 4 и 10 трансгенных растений регенерантов (15 %), причем почти у 50 % был выявлен только NPT-ген, а целевой или репортерный отсутствовал. Во время последующей инкубации на селективной регенерационной среде (от 50 до 200 суток) частота встречаемости регенерантов с репортерным или целевым геном увеличивалась, а доля растений только с NPT снижалась с 50 до 2-3 %. Было показано, что активность

лихеназы в регенерантах, полученных после длительного инкубирования на селективных средах, была выше, чем в более ранних пассажах. В популяции Tms-трансгенных растений, полученных в разные сроки, наблюдали аналогичную картину. Кроме того, в обоих случаях к 180-200 дню инкубирования на селективных средах регенерировали только растения, экспрессирующие целевой или репортерный гены. Причины этого явления изучаются.

**РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ рРНК ЦИТОКИНИНОМ  
И ПОИСК ЦИТОКИНИН-ЗАВИСИМЫХ ЦИС-ЭЛЕМЕНТОВ  
В ПРОМОТОРНОЙ ЗОНЕ рДНК ЯЧМЕНЯ**

**Transcription regulation of rRNA genes by cytokinins and searching  
for cytokinin dependent *cis*-elements in promoter region of rdna in barley**

**М.В. Ямбуренко, Я.О. Зубо, О.Н. Кулаева, Р. Оельмюллер<sup>1</sup>, В.В. Кузнецов**  
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: *mashayamb@mail.ru*

<sup>1</sup> Кафедра физиологии растений Йенского университета, г. Йена

Цитокинины оказывают огромное влияние на многие стадии роста и развития растений, такие как деление клеток, развитие хлоропластов и процесс старения. В последние годы достигнут значительный прогресс в исследовании механизма действия цитокининов на экспрессию генома растений. Активно изучается влияние цитокинина на синтез рРНК. Гены рРНК имеют в геноме множество копий генов, которые объединены в опероны, что может создавать некоторые особенности регуляции их экспрессии. Давно установлено, что цитокинин активирует накопление рРНК и стимулирует включения меченых предшественников в рРНК. Также было показано, что в условиях *in vitro* одновременное добавление в транскрипционную систему цитокинин связывающего белка и транс-зеатина приводило к значительной стимуляции транскрипции, устойчивой к  $\alpha$ -аманитину. Более того, в нашей лаборатории с помощью *gus* от транскрипции было показано, что существенная активация транскрипции генов рРНК происходит уже через пол часа после обработки 6-бензиламинопурином (БАП) листьев, отделенных от девятидневных растений ячменя. Данные результаты говорят о целесообразности поиска в промоторной зоне этих генов регуляторных элементов, участвующих в реализации цитокининового сигнала.

Нами был создан набор 5'-делеционных конструкций на основе нетранскрибируемого межгенного спейсера (МГС), который в геноме разделяет повторно расположенные копии рДНК, кодирую-

щие большой предшественник рРНК, процессирующийся с образованием 18S-, 5,8S- и 28S-рРНК. Весь МГС был амплифицирован с помощью ПЦР и встроен в pBluscript II KS (+) по сайту EcoRV. 3'-конец у всех встроженных в pBluscript II KS (+) фрагментов находится в положении +51 относительно сайта инициации транскрипции, а 5'-конец в сайтах -976, -796, -286, -169, -82.

Была отработана методика выделения протопластов из мезофилла листьев ячменя. Показано, что наиболее выровненные по размеру протопласты получают из средней части листа. Удаление нижнего эпидермиса очень сильно повышает выход протопластов. При сравнении двух методов введения плазмидной ДНК (pUC57:GUS) в протопласты ячменя выяснилось, что метод с применением полиэтиленгликоля (ПЕГ), по нашим данным, более эффективен по сравнению с методом электропорации, так как в последнем случае резко падает процент неповрежденных протопластов. Транскрипция с ядерного промотора, находящегося в плазмиде, лучше всего происходит при добавлении к  $10^7$  протопластов 200 мкг плазмидной ДНК. Транскрипция с линейной формы ДНК идет во много раз слабее, чем с суперспирализованной ДНК. При проведении этих опытов после введения плазмидной ДНК в протопласты мы выделяли из них РНК и гибридизовали ее с генспецифичными пробами, мечеными ( $\alpha$ - $^{32}$ P)дАТФ с помощью ПЦР. Выяснилось, что уже через полчаса можно было обнаружить специфичные транскрипты в протопластах, но наибольшая эффективность транзientной экспрессии наблюдалась после 5-6 часов. Самым критичным моментом в транзientной экспрессии является необходимость абсолютного удаления плазмидной ДНК, поскольку внесенная плазида также способна гибридизоваться с генспецифичными пробами. Поэтому в каждом эксперименте был поставлен контроль на наличие ДНК в препарате выделенной РНК и показано полное отсутствие ДНК.

Альтернативным вариантом проведения транскрипции с ядерного промотора гена рРНК, встроженного в плазмиду, является run-on транскрипция в лизатах изолированных ядер. В данном случае ( $\alpha$ - $^{32}$ -P)УТФ включается во вновь синтезируемые транскрипты, которые после выделения гибридизуются с не мечеными генспецифичными пробами. При проведении run-on реакции в течение часа в такой системе обнаруживаются специфичные транскрипты.

Таким образом, проведенная работа по подготовке генетических конструкций для определения цитокинин-зависимых регуляторных элементов генов рРНК ячменя, а также оптимизация двух различных подходов для транскрипции этих генетических конструкций *in vitro* позволяет надеяться на скорую идентификацию *cis*-элементов, участвующих в регуляции транскрипции рибосом-

ных генов ячменя цитокинином.

Работа частично поддержана грантами РФФИ № 04-04-48247; НШ-3692.2006.4.

### ВЛИЯНИЕ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА СОДЕРЖАНИЕ ФЕРМЕНТОВ СИСТЕМЫ БИОСИНТЕЗА ХЛОРОФИЛЛА В ПРОРОСТКАХ ЯЧМЕНЯ

#### The influence of 5-aminolevulinic acid on the content of chlorophyll biosynthesis enzymes in barley seedlings

Е.Б. Яронская<sup>1</sup>, Б. Хедтке<sup>2</sup>, Б. Гримм<sup>2</sup>, Н.Г. Аверина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, г. Минск  
E-mail: [yaronskaya@biobel.bas-net.by](mailto:yaronskaya@biobel.bas-net.by)

<sup>2</sup> Institut für Biologie/Pflanzenphysiologie, Humboldt Universität, Berlin  
E-mail: [bernhard.grimm@rz.hu-berlin.de](mailto:bernhard.grimm@rz.hu-berlin.de)

В настоящее время существуют генетические и физиологические доказательства, указывающие на функционирование в растительной клетке сложной сигнальной системы, посредством которой осуществляются передача в ядро информации о структурно-метаболическом состоянии пластиды и регуляция экспрессии ядерных генов, кодирующих ряд пластидных белков. Участниками одной из цепей трансдукции сигнала из пластиды в ядро являются интермедиаты и белковые компоненты системы биосинтеза растительных порфиринов, такие как магний-протопорфирин IX (MgПрото) и/или СНЛ Н субъединица магний-хелатазы (МХ). С целью дальнейшего развития представлений о природе пластидных сигналов и наборе контролируемых ими ядерных генов в данной работе проведено изучение возможной роли первого специфического предшественника хлорофилла (Хл), 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК), в коммуникации между пластидой и ядром и контроле экспрессии некоторых ядерных генов, кодирующих ферменты системы биосинтеза Хл.

Повышение уровня внутриклеточной АЛК достигалось путем инкубации срезанных листьев зеленых и этиолированных проростков ячменя в темноте в течение 8 ч на растворах АЛК, 4,6-диокси-гептановой кислоты (ДГК), АЛК в сочетании с ДГК, либо на буфере (контроль).

Обнаружено, что обработка листьев экзогенной АЛК вызывает быстро развивающееся во времени значительное увеличение содержания отдельных ферментов системы биосинтеза Хл. Уже через 1-2 ч инкубации с АЛК содержание глутамат-1-полуальдегид-

аминотрансферазы (АТ), АЛК-дегидратазы (АЛКД) и СНL Н субъединицы МХ в 1.5-2.5 раза превышает количество этих белков в контрольных растениях. Содержание глутамил-тРНК<sup>Глу</sup>-редуктазы, s-аденозил-L-метионин:Mg-Прото-метилтрансферазы, СНL I и СНL D субъединиц МХ остается при этом неизменным. В листьях, обработанных АЛК, отмечено возрастание уровня внутриклеточной АЛК, а также накопление значительного количества порфириновых предшественников Хл. Введение в листья совместно с АЛК ингибитора ее превращения в порфирины – ДГК, блокирует накопление порфиринов, в том числе Mg-Прото. Тем не менее, содержание АТ в таких листьях значительно превышает ее количество в контроле, что позволяет исключить роль Mg-содержащих порфиринов в индукции накопления этого фермента. Обработка листьев только ДГК вызывает увеличение количества собственной, эндогенной АЛК в ходе инкубации. Обнаружена корреляция между содержанием АТ и уровнем эндогенной АЛК. Введение в листья аминокислот, имеющих структурное сходство с АЛК – валина и аспарагиновой кислоты, не приводит к увеличению количества АТ. В растениях с повышенным уровнем внутриклеточной АЛК обнаружено возрастание количества цитокининов, но лишь через 8 ч инкубации листьев с АЛК и/или ДГК, в то время как отчетливое увеличение содержания анализируемых белков наблюдается уже после 1 ч инкубации. Полученные результаты позволяют исключить участие цитокининов в индукции накопления ряда ферментов системы биосинтеза Хл и указывают на высокую специфичность действия АЛК. Количество транскриптов для АТ, АЛКД и СНL Н субъединицы МХ в листьях с повышенным содержанием внутриклеточной АЛК не отличается от количества мРНК для этих белков в контроле. Циклогексимид – ингибитор синтеза белков на цитоплазматических рибосомах, вызывает значительное уменьшение содержания АТ в контрольных листьях. Ингибирующее действие антибиотика на уровень этого фермента снижается, либо вообще не регистрируется при введении циклогексимиде совместно с АЛК.

Таким образом, проведенное исследование позволяет сделать вывод о том, что возрастание содержания отдельных ферментов системы биосинтеза Хл в листьях с повышенным уровнем АЛК не обусловлено стимуляцией транскрипционной активности кодирующих эти ферменты ядерных генов, а связано, скорее всего, со стабилизирующим действием АЛК на белковые молекулы на пост-трансляционной стадии экспрессии.

Работа выполнена при поддержке фонда DFG (Германия) и ФФИ РБ (грант Б04Р-135).