



На правах рукописи

КРАВЦОВ Александр Константинович

**Гормональная регуляция деэтиоляции
однодольных растений на примере ячменя**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2011

Работа выполнена в лаборатории экспрессии генома растений Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва.

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор

Кузнецов Виктор Васильевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор

Лось Дмитрий Анатольевич

доктор биологических наук,
профессор

Тараканов Иван Германович

Ведущая организация: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Томский государственный университет», Биологический институт.

Защита состоится «22» февраля 2011 г. в 11 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.

Факс: (495) 977 8018, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждении Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан « 19 » января 2011 г.

Ученый секретарь

совета по защите докторских
и кандидатских диссертаций
кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Деэтиоляция – процесс перехода растения с роста в темноте к росту на свету, характеризующийся рядом физиологических, биохимических и морфологических изменений, которые проросток претерпевает в ответ на свет и которые приводят к накоплению хлорофилла и началу фотосинтеза. Наиболее заметным изменением в ходе деэтиоляции проростков является их позеленение вследствие накопления хлорофилла (Fox and Hillman, 1968; Chory et al., 1994; Nemhauser and Chorry, 2002; Waters and Langdale, 2009; Symons et al., 2008).

Проведенные к настоящему времени исследования по изучению механизмов гормональной регуляции деэтиоляции выполнены, главным образом, на двудольных растениях, таких как: арабидопсис, табак, люпин, тыква, горох, и др. (Kulaeva, 1973; Кравяж и др., 1977; Parthier, 1979; Lerbs et al., 1984; Evans, 1985; Potts et al., 1985; Kieber et al., 1993; Kusnetsov et al., 1994; Novakova et al., 2005). В этих работах показано, что цитокинины активируют формирование ультраструктуры этиопластов и хлоропластов, повышают активность хлоропластных ферментов, увеличивают накопление фотосинтетических пигментов и скорость фотосинтеза. Эффект цитокининов и абсцизовой кислоты (АБК) на развитие хлоропластов может быть связан с их влиянием на экспрессию ядерных (Ohya and Suzuki, 1991; Kusnetsov et al., 1994; Kiba et al., 2005), и пластидных генов, кодирующих хлоропластные белки (Lerbs et al., 1984; Kusnetsov et al., 1994; Brenner et al., 2005). Однако в этих работах изучалось влияние фитогормонов на содержание транскриптов пластидных и ядерных генов и не было показано участие фитогормонов в регуляции процесса транскрипции. Только в 2008 году впервые была доказана регуляция цитокинином транскрипции индивидуальных хлоропластных генов на закончивших рост (зелёных) листьях ячменя (Zubo et al., 2008). До настоящего времени участие цитокинина и АБК в регуляции процесса деэтиоляции однодольных растений было не установлено. Тем более, никем не показана регуляция цитокинином и АБК процесса транскрипции пластидных генов в ходе позеленения при переносе на свет листьев, отделенных от этиолированных однодольных растений.

В связи с этим в диссертации рассматривается, главным образом, роль фитогормонов – антагонистов (цитокинина и АБК) во время ключевого этапа процесса деэтиоляции – формирования фотосинтетического аппарата в листьях

однодольных растений после их отделения от этиолированных проростков и перенесения на свет. Изучается регуляция накопления хлорофилла, развития структуры пластид, экспрессия генов хлоропластных белков ядерного и пластидного кодирования. Особое внимание обращено на процесс регуляции транскрипции в связи с тем, что именно транскрипция является первым этапом экспрессии генов и от нее может зависеть не только количество индивидуальных мРНК, но и накопление белка, что прямо влияет на превращение этиопластов в хлоропласты и на переход этиолированных растений к автотрофному питанию.

Цель диссертационной работы заключалась в изучении гормональной регуляции деэтиоляции однодольных растений на примере ячменя.

Задачи:

1. Изучить влияние фитогормонов (цитокинина и абсцизовой кислоты) на накопление хлорофилла и формирование хлоропластов в зеленеющих листьях этиолированных проростков ячменя разного возраста, а также определить период развития растений наиболее чувствительный к действиям фитогормонов.

2. Для изучения гормональной регуляции экспрессии генов в процессе деэтиоляции однодольных растений выбрать гены, входящие во все известные опероны пластидной ДНК ячменя, кодирующие различные белки и РНК хлоропластов, а также гены ядерного кодирования хлоропластных белков и ферментов, участвующих в процессе биосинтеза хлорофилла.

3. Исследовать влияние света и фитогормонов на экспрессию ядерных и пластидных генов в процессе деэтиоляции ячменя разного возраста.

4. Выявить закономерности гормональной регуляции транскрипции генов, отвечающих за формирование хлоропластов и накопление хлорофилла в ходе деэтиоляции однодольных растений.

Научная новизна работы. Впервые изучена гормональная регуляция процесса деэтиоляции однодольных растений на примере ячменя (*Hordeum vulgare* L.). Установлено, что скорость накопления хлорофилла на свету листьями, отделенными от этиолированных растений, зависит от продолжительности их роста в темноте и интенсивности транскрипции генов пластома.

Впервые показано, что цитокинин и АБК в ходе деэтиоляции участвуют в регуляции экспрессии генов хлоропластных белков как пластидного, так и ядерного кодирования не только на уровне накопления транскриптов, но и на уровне интенсивности транскрипции. Оба гормона вызывают дифференциальную регуляцию экспрессии пластидных и ядерных генов в процессе деэтиоляции листьев 3 и 6-дневных проростков ячменя.

Полученные в диссертационной работе результаты показывают, что процесс деэтиоляции злаков находится под контролем как света, так и фитогормонов-антагонистов (цитокинина и АБК), которые оказывают сложное регуляторное влияние на экспрессию пластидных и ядерных генов хлоропластных белков и РНК, на процесс формирования ультраструктуры хлоропластов, накопление хлорофилла, что, в конечном результате, в зависимости от баланса фитогормонов и условий освещения, приводит к превращению этиопластов в хлоропласты, к формированию фотосинтетического аппарата и началу автотрофного питания.

Результаты изучения гормональной регуляции деэтиоляции однодольных растений на примере одной из важнейших с.-х. культур России – ячменя имеют практическую ценность для селекционно-генетических учреждений нашей страны, так как могут быть использованы для разработки теоретических основ прогнозирования продуктивности зерновых культур, создания особо ценных сортов и гибридов. Полученные экспериментальные данные могут быть использованы в курсах лекций для студентов биологических и агрономических специальностей ВУЗов.

Апробация результатов работы. Результаты работы докладывались на 12-ой и 14-ой международной Пущинской школе-конференции молодых ученых "Биология - наука XXI века" (Пущино, 2008, 2010), на Межинститутском научном молодежном семинаре ИФР РАН «Актуальные проблемы физиологии, молекулярной биологии и биотехнологии растений» (Москва, 2008), Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов – 2009» (Москва, 2009), Международной конференции «Фитогормоны: молекулярные механизмы действия». (Москва, 2009), Международной конференции «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному

загрязнению в условиях крайнего севера» (Апатиты, 2009), а также конгрессе FESPB-2010 (Валенсия, 2010).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, из которых 4 в журналах, рекомендуемых ВАК.

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения и выводов, списка использованной литературы. Диссертационная работа изложена на 147 страницах машинописного текста, содержит 5 таблиц, 2 схемы и 30 рисунков. Список цитируемой литературы составляет 156 наименования, из которых 131 на иностранном языке.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования.

Исследования проводили на листьях ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Луч. Семена проращивали в земле в камерах фитотрона в темноте при температуре 20 – 22 °С. Для опытов брали первые настоящие листья ячменя (далее – первые листья), отделенные от 3, 6, 9 и 12 дневных растений. Возраст ячменя считали с момента появления проростков на поверхности земли. Инкубацию срезанных листьев проводили на постоянном свете ($270 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) на воде или растворах фитогормонов: БАП ($2.2 \times 10^{-5} \text{ М}$), АБК ($7.6 \times 10^{-10} \text{ М}$; $7.6 \times 10^{-6} \text{ М}$; $7.6 \times 10^{-5} \text{ М}$). Для изучения совместного действие БАП и АБК инкубацию срезанных листьев проводили на растворах, содержащих одновременно БАП $2.2 \times 10^{-5} \text{ М}$ и АБК $4.4 \times 10^{-5} \text{ М}$. Оптимальные концентрации всех использованных в работе фитогормонов были определены в предварительных экспериментах.

Методы исследования.

Содержание хлорофилла определяли по методу Lichtenhaler and Wellburn (1983) через 2, 4, 6 и 24 ч. после начала инкубации листьев на свету, отделенных от 3, 6, 9 и 12 дневных этиолированных проростков ячменя. Хлорофилл экстрагировали 80% ацетоном и определяли с помощью спектрофотометра «Ultrospec 2000» (Pharmacia Biotech).

Выделение пластид и run-on транскрипцию в пластидных лизатах проводили согласно методикам, описанным ранее (Зубо и Кузнецов, 2008). Этиопласты из

этиолированных растений выделяли на зелёном свете с помощью ступенчатого градиента перкола. Транскрипцию *in vitro* проводили 15 мин при 25°C в лизате 5 x 10⁷ хлоропластов в объеме 100 мкл в буфере следующего состава: 50 мМ трис HCl pH 8.0, 10 мМ MgCl₂, 0.2 мМ ЦТФ, ГТФ, АТФ, 0.01 мМ УТФ, 50мкКю [α -³²P]-УТР (Amersham, England), 20 е.а. РНКзин (Fermentas), 10 мМ β -меркаптоэтанол. Реакция была остановлена добавлением равного объема стоп-буфера (50 мМ трис HCl pH 8.0, 25 мМ ЭДТА, 5% Саркозил). ³²P-меченая РНК, синтезированная в ходе реакции транскрипции, была выделена из реакционной среды и использована для гибридизации (Зубо и Кузнецов, 2008). По 1 мкг каждого из фрагментов изучаемых генов было нанесено в двухкратной повторности на нейлоновую мембрану Hybond-N⁺ (Amersham Pharmacia Biothech, England). После их гибридизации с ³²P-мечеными транскриптами радиоактивные сигналы были сканированы, используя фосфоимиджер Typhoon Trio («GE Healthcare», USA). Эффект на интенсивность транскрипции считался достоверным, если его сигнал отличался от контроля не менее чем в два раза.

Для выделения тотальной РНК 2 г растительной ткани растирали в фарфоровой ступке с жидким азотом до пудрообразного состояния. Не давая растаять, этот порошок переносили в пробирку для центрифугирования с 20 мл TRIZOL (InVitroGene). Гомогенизировали 15 секунд на вортексе, после чего добавили 4 мл хлороформа. Центрифугирование проводили 5 мин 2900 g при +4°C (Eppendorf 5810R, Eppendorf, Germany). Полученную верхнюю водную фазу переносили в новую пробирку, добавляли 12 мл изопропанола, перемешивали и инкубировали при комнатной температуре 10 мин. Затем центрифугировали 5 мин 6500 об./мин. при +4°C на той же центрифуге. К осадку добавили 20 мл 80% этанола и вновь центрифугировали 5 мин 2900 g. Осадок подсушивали 5 – 10 мин и растворяли в 800 мкл бидистиллированной воды. Выделенную РНК очищали от примеси ДНК, используя РНКзу (Fermentas).

Метод ПЦР после обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) использовался для определения содержания транскриптов ядерных генов, кодирующих ферменты биосинтеза тетрапирролов. В качестве контрольного гена использовался ген *UBC* (Kiba et al., 1999). Синтез кДНК осуществляли с помощью RevertAid H Minus First cDNA Synthesis Kit #k1631 (Fermentas). ДНК-затравкой служили праймеры oligo(dT)

(tttttttttttttttttttttt (v)(n)), комплементарные поли А-концу мРНК генов ядерного кодирования. Далее проводили ПЦР с использованием генспецифических праймеров, подобранных на основании нуклеотидной последовательности генов данных он-лайн ресурса: NCBI (Nacional center of bioinformatics, USA, www.ncbi.nlm.nih.gov) с использованием программы VectorNTI Suite 9 (Invitrogen). Количественную оценку ампликонов проводили на сканере Typhoon TRIO+ Variable Mode Imager с пакетом Typhoon Scanner Control (GE Healthcare, США), а также ImagerQuant TL Control Centre. Результаты экспериментов подвергали математической обработке данных, средние значения и их стандартные отклонения получены на основании проведения значений трёх независимых повторений эксперимента.

Все неописанные здесь молекулярно-биологические процедуры выполнены согласно руководству Маниатис и др. (1984).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние возраста этиолированных проростков на накопление хлорофилла листьями в процессе деэтиоляции ячменя. Процесс деэтиоляции растений зависит, прежде всего, от света. Известно, что при переносе растения на свет после его длительного пребывания в темноте не осуществляется нормальный биосинтез хлорофилла, не происходит сборка светособирающих комплексов, не идет процесс фотосинтеза - растение в таких условиях гибнет. Нами были получены результаты, на основании которых можно сделать вывод, что скорость накопления хлорофилла зависит от возраста этиолированных проростков. Как видно из представленных результатов (рис. 1), содержание хлорофилла в зеленеющих листьях 3-дневных этиолированных проростков ячменя через 6 ч. инкубации на свету соответствует содержанию хлорофилла в зеленеющих листьях ячменя, отделенных от 9-дневных растений и инкубированных на свету в течение 24 ч. Уровень хлорофилла у листьев, отделённых от 3-дневных этиолированных проростков ячменя, был примерно в 1.5 раза выше, чем в листьях 6-дневных проростков и в 2 раза выше, чем в листьях, отделённых от 9-дневных проростков. Следовательно, чем дольше растения находились в темноте, тем в большей степени они теряли

способность к накоплению хлорофилла. Листья 12-дневных этиолированных проростков полностью теряли способность к позеленению на свету.

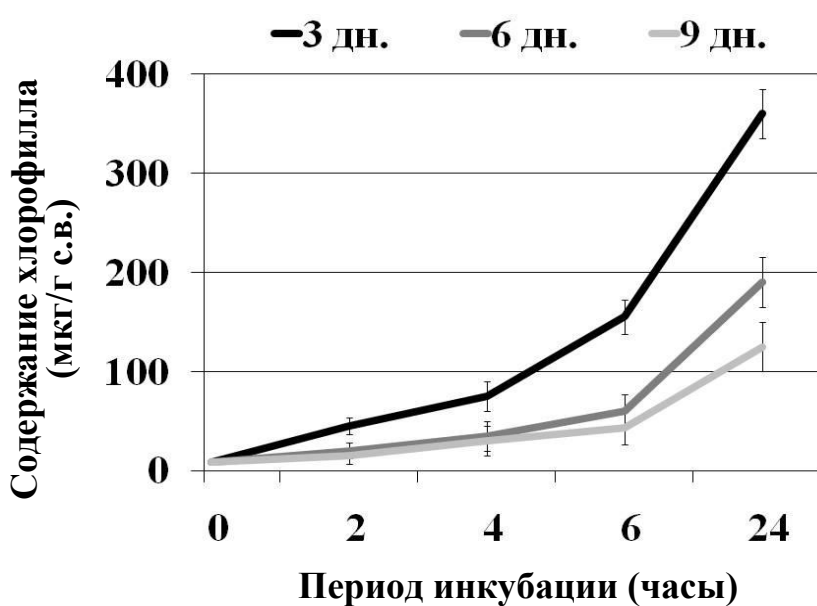


Рис. 1 Накопление хлорофилла на свету листьями, отделенными от этиолированных проростков ячменя и инкубированными на воде. Листья, отделенные от 3, 6 и 9-дневных этиолированных проростков ячменя, инкубировали на свету на воде в течение 2, 4, 6 и 24 ч.

Установленные закономерности скорости накопления хлорофилла в зависимости от продолжительности роста этиолированных проростков в темноте нуждались в более глубоком молекулярно-генетическом изучении. Необходимо было исследовать регуляцию экспрессии генов, кодирующих РНК и белки, обеспечивающие сборку фотосинтетических комплексов и развитие хлоропластов.

2. Влияние продолжительности пребывания этиолированных проростков ячменя в темноте на интенсивность транскрипции пластидных генов. Таким образом, свет и продолжительность пребывания этиолированных растений в темноте являются важнейшими факторами регуляции процесса деэтиоляции растений. Хорошо изучено влияние света на дифференциацию хлоропластов, биогенез фотосинтетического аппарата и экспрессию генов на двудольных растениях (Oelmüller, 1989; Kusnetsov *et al.*, 1994; Kusnetsov *et al.*, 1999). Показана активация важнейших ферментов системы биосинтеза хлорофилла, участвующих в синтезе 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) и образовании Mg-протопорфирина IX (Berry-Lowe *et al.*, 1987; Аверина, 1997). Однако практически нет данных по экспрессии пластидных генов в этиолированных однодольных растениях. В данной работе

эксперименты проводили на первом листе проростков ячменя, росших в темноте в течение 3, 6 и 9 дней (рис. 2).

Из результатов, представленных на рисунке 2 (а, б, в) видно, что есть ряд генов (*petB*, *atpH*, *trnA* и др), у которых сигналы run-on транскрипции не детектируются. Это может быть связано с полным отсутствием транскрипции этих генов в темноте или с низкой её интенсивностью в условиях эксперимента. Скорость транскрипции генов 3- и 6- дневных растений различалась незначительно (исключение составляли гены *rps4*, *trnA*, *rpoC1*, *psaA*, *psbD*, и *ndhI*, кодирующие рибосомный белок 4 малой субчастицы, тРНК, β -субъединицу РНК-полимеразы, белки ФСІ, ФСІІ и НАДН-пластохиноноксидордуктазы. Из группы изученных «генов домашнего хозяйства» и генов фотосинтетических белков интенсивность транскрипции в этиопластах 3 и 6-дневных проростков была практически всегда достоверно выше, чем у 9-дневных этиолированных растений.

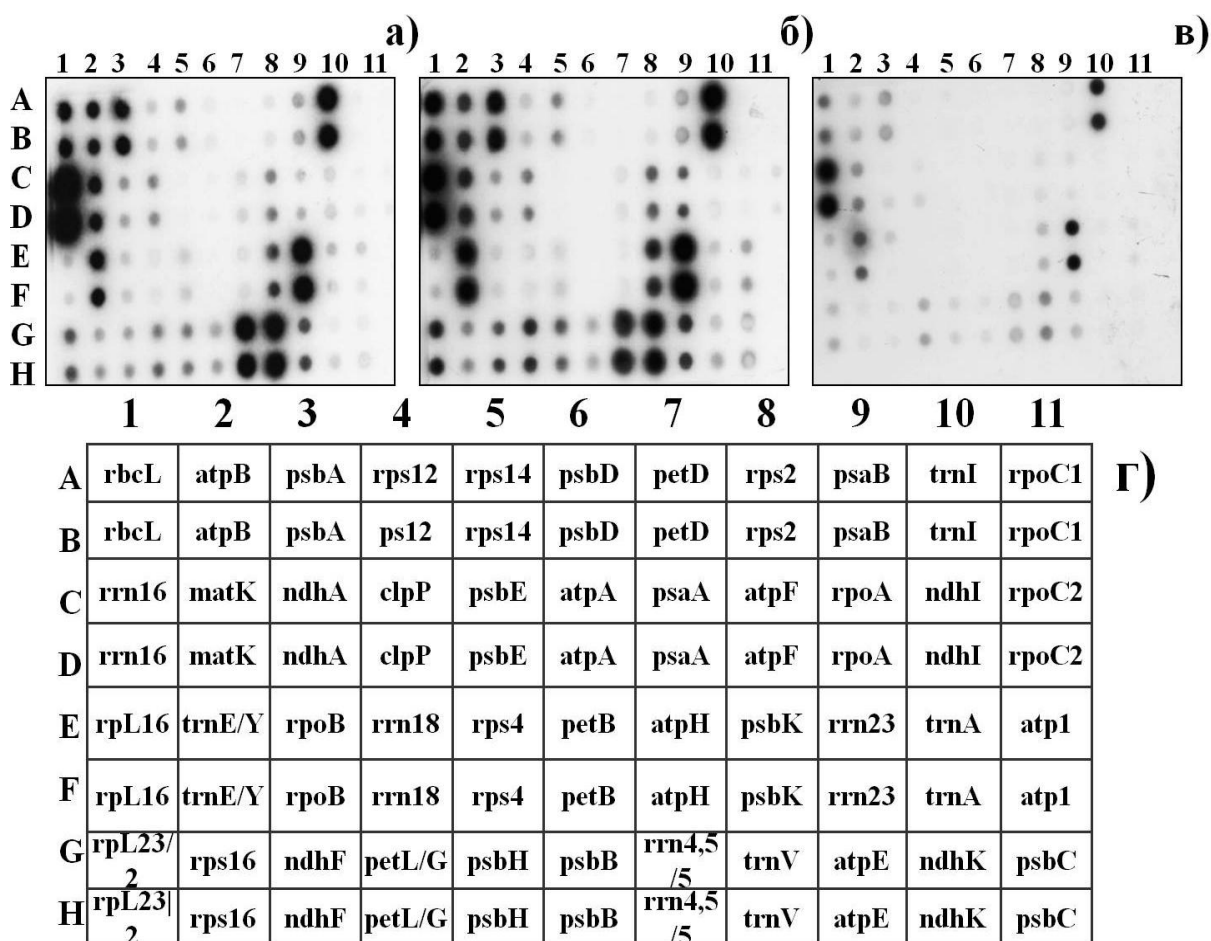


Рис. 2 Влияние продолжительности пребывания этиолированных проростков ячменя в темноте на интенсивность транскрипции пластидных генов. Интенсивность транскрипции пластидных генов определена методом run-on транскрипции в

этиопластах из листьев сразу после их отделения от: (а) – 3, (б) – 6 и (в) – 9-дневных этиолированных проростков ячменя. (г) – схема расположения на мембране ДНК-зондов изучаемых генов.

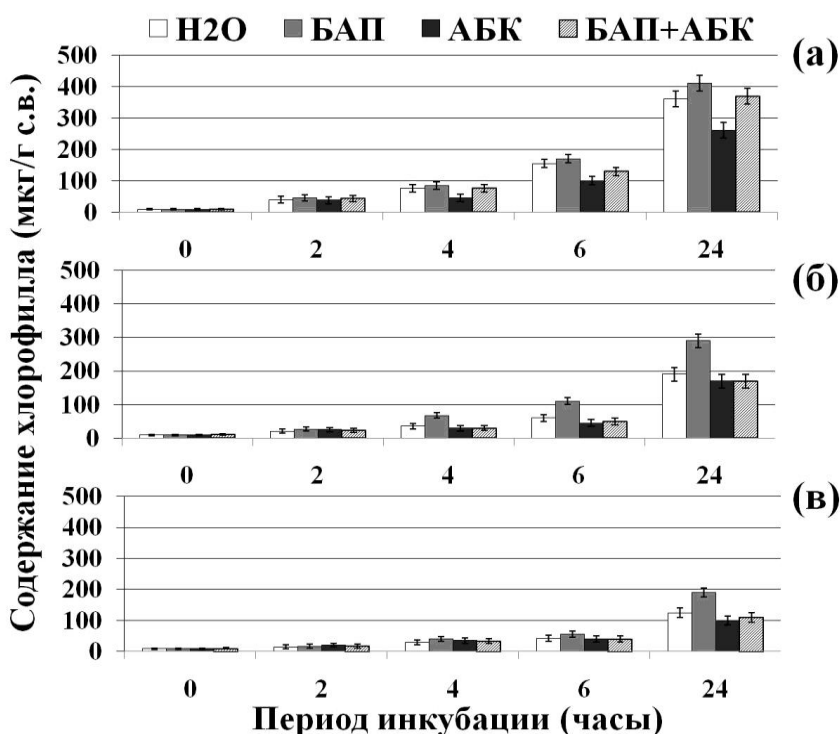
Следовательно, транскрипция пластидных генов в первых листьях ячменя снижается с увеличением возраста этиолированных проростков, и такое снижение, хотя бы частично, может влиять на скорость накопления этиолированными растениями хлорофилла при перенесении их на свет. Это связано, прежде всего, с формированием фотосинтетического аппарата, а на его формирование оказывают процессы, происходящие на разных уровнях экспрессии генов. Как показано на двудольных растениях, в регуляции процесса деэтиоляции, наряду со светом, большую роль играют фитогормоны и, в первую очередь, цитокинины, которые активируют процесс формирования фотосинтетического аппарата, и АБК, которая его подавляет (Кулаева, 1973; Kusnetsov *et al.*, 1994). Поскольку на однодольных растениях таких исследований практически не проводилось, то мы далее изучали роль фитогормонов в процессе деэтиоляции растений ячменя.

3. Влияние фитогормонов на содержание хлорофилла в зеленеющих листьях ячменя. Изучено влияние продолжительности выращивания ячменя в темноте на способность к накоплению хлорофилла на свету, влияние на этот процесс цитокининов (БАП 2.2×10^{-5} М) и АБК (7.6×10^{-10} М; 7.6×10^{-6} М; 7.6×10^{-5} М), а также их совместное действие БАП (2.2×10^{-5} М) + АБК (4.4×10^{-5} М).

В работе использовали первые листья, отделённые от этиолированных проростков ячменя, выращенных в темноте в течение 3, 6, 9 и 12 дней после прорастания. Определение хлорофилла проводили через 2, 4, 6 и 24 ч. после начала инкубации листьев на свету на воде или на растворах фитогормонов (БАП, АБК). Результаты показали, что цитокинин наиболее активно вызывал накопление хлорофилла листьями, отделёнными от 6-дневных растений, а АБК более эффективно ингибировала накопление хлорофилла листьями, отделёнными от 3-дневных проростков. Интересно отметить, что цитокинин, который практически не влиял на позеленение листьев 3-дневных проростков, эффективно снимал

ингибирующее действие на этот процесс АБК (рис. 3а). АБК полностью подавляла активирующее действие цитокинина в листьях 6-дневных проростков, у которых БАП активировал накопление хлорофилла, а АБК слабо влияла на этот процесс. (рис. 3б).

Рис. 3 Влияние БАП и АБК в отдельности, а также при их совместном действии на накопление хлорофилла на свету в листьях, отделенных от этилированных проростков ячменя разного возраста. Листья, отделенные от: (а) – 3, (б) – 6 и (в) – 9-дневных этилированных проростков ячменя, инкубировали на свету в воде или растворах: АБК, БАП или БАП + АБК в течение 2, 4, 6 и 24 часов.



В результате этого содержание хлорофилла в листьях на растворе БАП +

АБК не отличалось от его содержания в присутствии одной АБК. У листьев 9-дневных растений, у которых одна АБК не влияла на позеленение, она также устраняла вызванную цитокинином активацию этого процесса (рис. 3в). Таким образом, показано, что накопление хлорофилла листьями растений всех трех изученных нами возрастов проявляет чувствительность к действию как цитокинина, так и АБК, но действие цитокинина у листьев 3-дневных растений проявлялось только на фоне действия АБК, а эффект АБК у листьев 6- и 9-дневных растений обнаружен только на фоне действия цитокинина.

4. Изучение регуляции экспрессии ядерных генов ферментов биосинтеза хлорофилла в процессе дээтиоляции ячменя. Как мы установили, скорость образования хлорофилла в листьях зависит от возраста и степени этиоляции растений, находящихся в темноте. Это влияет на время перехода растения с гетеротрофного на автотрофный тип питания, который зависит от накопления

хлорофиллов и формирования фотосинтетического аппарата. На основании анализа литературы нами были определены основные участники биосинтеза хлорофилла (рис. 4).

Важно отметить, что гены, кодирующие все ключевые ферменты биосинтеза тетрапирролов, локализованы в ядре. Это один из наиболее значимых примеров ядерного контроля функционирования хлоропластов. Известно, что более 90% белков хлоропластов кодируются ядерным геномом (Leister, 2003; Одинцова и Юрина, 2003). Возможно, что активация цитокинином накопления хлорофилла связана со стимуляцией экспрессии ядерных генов ферментов биосинтеза

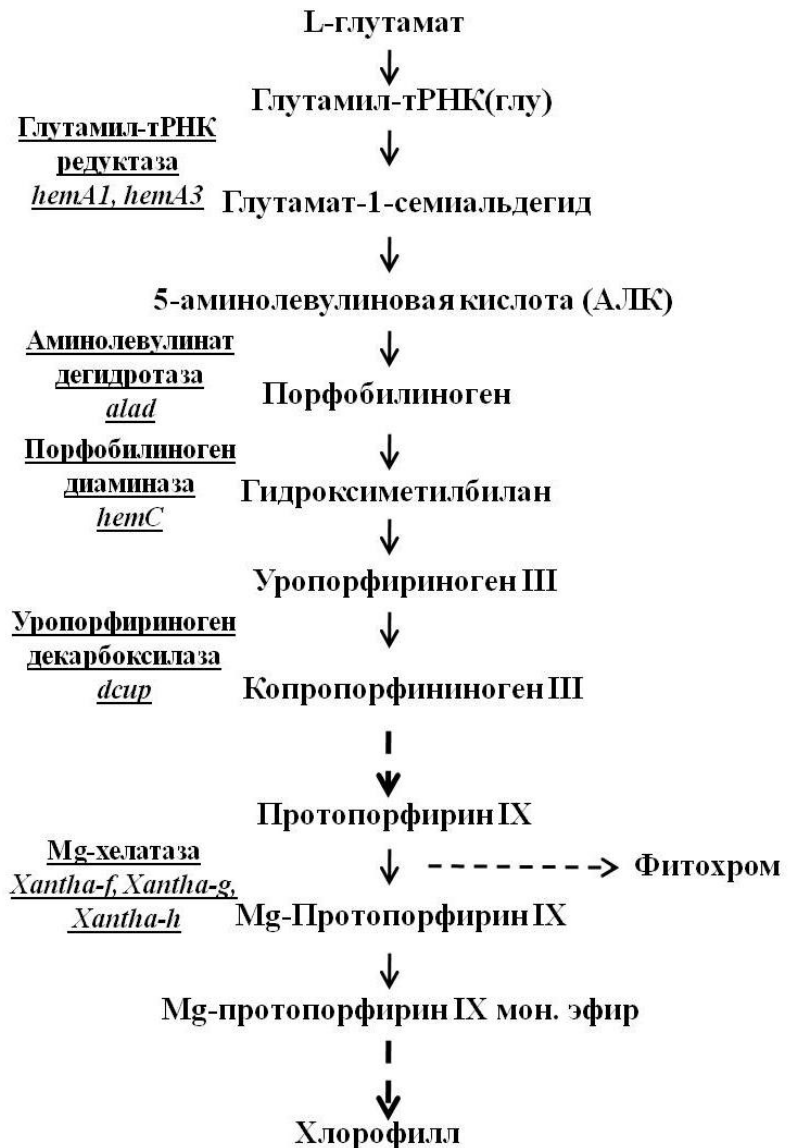


Рис. 4 Основные участники пути биосинтеза тетрапирролов и кодирующие их гены

хлорофилла. Для изучения экспрессии ядерных генов нами использован метод полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции (ОТ-ПЦР), а эксперименты были проведены согласно схеме 1. Выращивание этиолированных проростков проводили в земле в темноте в течение 5 дней после прорастания семян. Определение содержания мРНК изучаемых генов проводили в листьях 5 дневных этиолированных проростков, а также в этиолированных и зеленеющих листьях через 3 и 24 ч. после начала эксперимента (схема 1). В результате проведения серии экспериментов установлено,

что по сравнению с начальным уровнем мРНК индивидуальных генов в этиолированных листьях 5-дневных проростков ячменя за 24 ч. роста в темноте незначительно (менее чем в 1.5 раза Lg 2) повысился уровень мРНК гена *hemA3* - одной из изоформ глутамил-тРНКредуктазы ячменя, а так же *Xantha-f* – F субъединицы Mg-хелатазы (рис. 5а).

Выращивание этиолированных проростков ячменя в темноте (5 дней)

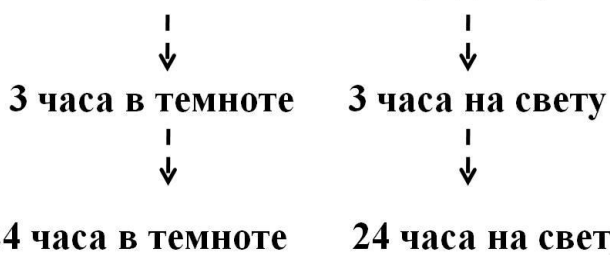


Схема 1. Изучение содержания транскриптов ядерных генов ферментов биосинтеза хлорофилла в листьях проростков ячменя в процессе деэтиоляции.

Содержание транскриптов гена *alad*, кодирующего фермент аминолевулинатдегидротаза, в листьях за 24 ч. роста в темноте этиолированных проростков снизилось в 1.5 раза.

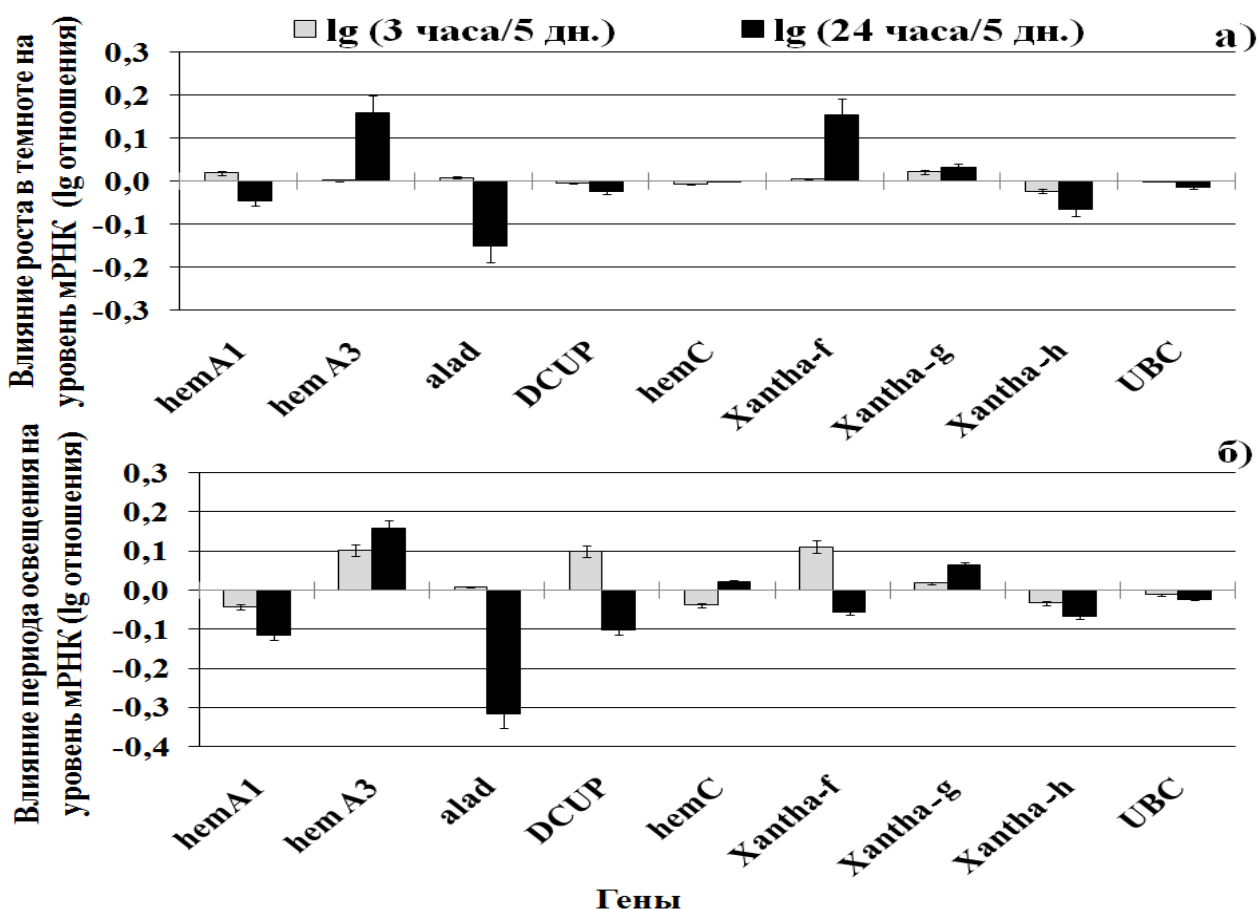


Рис. 5 Изменение содержания транскриптов ядерных генов ферментов биосинтеза хлорофилла в листьях 5-дневных этиолированных проростков: (а) – инкубированных в темноте в течение 3 и 24 ч.; (б) – инкубированных в течение 3 и

24 ч. на свету. \lg – десятичный логарифм отношения уровня мРНК в листьях 5-дневных проростков ячменя, инкубированных 3 или 24 ч. в темноте или на свету, к уровню мРНК в листьях проростков ячменя в момент начала эксперимента.

Уровень остальных ядерных генов изученных ферментов биосинтеза хлорофилла оставался на начальном уровне в листья ячменя на протяжении 24 ч. эксперимента (рис. 5а). Таким образом, содержание транскриптов генов ферментов биосинтеза хлорофилла существенно (в два и более раза) не изменялось в листьях 6-дневных этиолированных проростков ячменя по сравнению с 5-дневными растениями. При переносе 5-дневных этиолированных растений на свет через 3 и 24 ч. содержание транскриптов существенно не изменилось. Снижение уровня транскриптов гена (*alad*) ключевого фермента (рис. 5б), расположенного в самом начале цикла биосинтеза хлорофилла, в ходе освещения листьев ячменя, возможно, связано с изменением скорости транскрипции или с уменьшением стабильности транскриптов. Полученные в данных экспериментах результаты показывают, что в первые 24 ч. деэтиоляции 5-дневных этиолированных проростков ячменя, свет не вызывает активацию экспрессии изученных нами генов ферментов начальных этапов биосинтеза тетрапирролов.

5.1 Влияние фитогормонов на уровень транскриптов ядерных генов основных ферментов биосинтеза хлорофилла в процессе деэтиоляции ячменя.

Определение уровня мРНК генов проводили методом ОТ-ПЦР в листьях 5-дневных этиолированных проростков ячменя, а также в отделённых листьях, инкубированных на свету и в темноте (контроль), на воде или растворах БАП ($2.2 \times 10^{-5} \text{M}$) или АБК ($7.6 \times 10^{-5} \text{M}$) через 3 и 24 ч. согласно схеме 2.

Анализируя представленные на рисунке ба результаты, можно заключить, что за 24 ч. инкубации отделённых листьев ячменя на воде и растворах фитогормонов в темноте только АБК достоверно регулирует (ингибирует) экспрессию ядерных генов ферментов биосинтеза хлорофилла (*hemA1*, *hemA3*, *alad*, *DCUB*). На свету (рис. 6б) через 3 ч. инкубации на растворе АБК, по сравнению с инкубацией на воде,

уменьшается уровень мРНК гена *hemA1* и *DCUP*, а через 24 ч. падает уровень транскриптов *hemA3* гена.

**Выращивание этиолированных проростков
ячменя в темноте (5-дней)**

**Инкубация срезанных листьев в воде, на
растворах БАП и АБК**

3 часа в темноте

3 часа на свету

24 часа в темноте

24 часа на свету

Схема 2. Влияние света и фитогормонов (цитокинина и АБК) на уровень мРНК ядерных генов ферментов биосинтеза хлорофилла в отделенных листьях в ходе деэтиоляции ячменя.

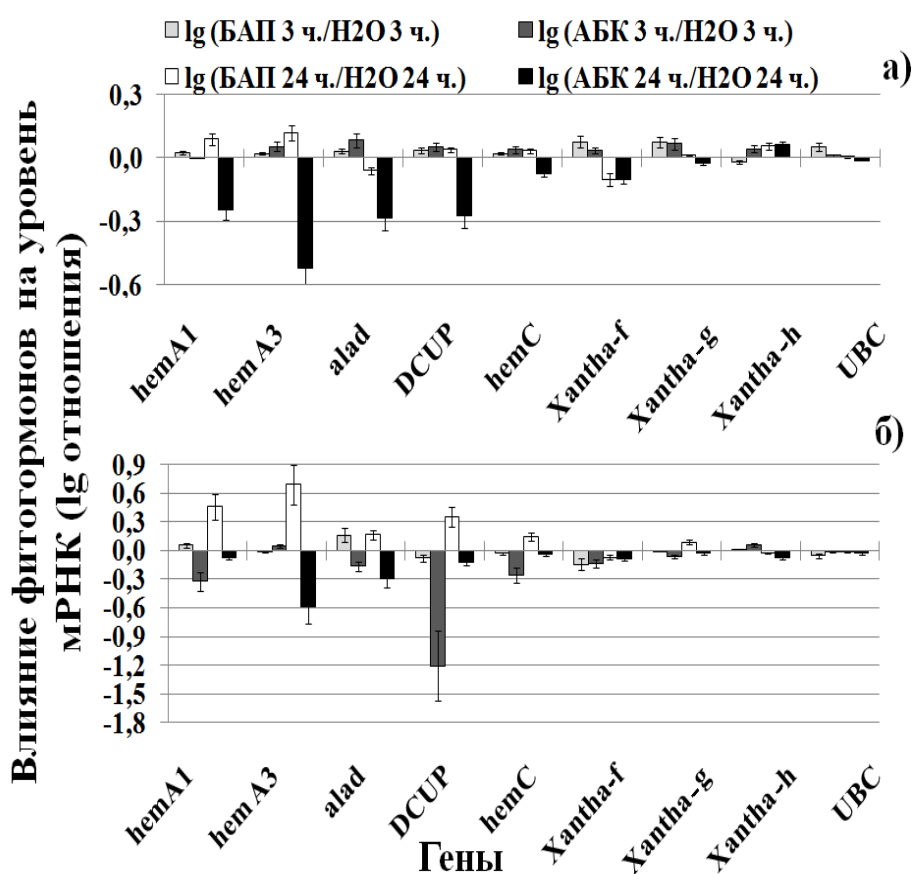
Цитокинин через 24 ч.

инкубации листьев на свету

стимулирует экспрессию двух генов семейства *hemA*, а также гена *DCUP*. Уровень транскриптов генов субъединиц ключевого фермента биосинтеза хлорофилла не изменяется, однако по сравнению уровнем мРНК *Xantha-f* в темноте (рис. 6а.) за 3 ч. инкубации на свету на воде содержание транскриптов увеличивается, а в листьях, инкубированных на растворах БАП и АБК, остаётся прежним, т.е. фитогормоны на свету поддерживают определённый уровень мРНК гена F-субъединицы Mg-хелатазы.

Рис. 6 Эффект БАП и АБК на уровень мРНК ряда ядерных генов в листьях 5-дневных проростков ячменя, инкубированных 3 и 24 ч.: (а) – в темноте и (б) – на свету на воде и растворах фитогормонов. (lg отношения) – десятичный логарифм отношения уровня мРНК в отделённых листьях ячменя к контролю.

Таким образом, фитогормоны-антагонисты, участвуя в регуляции уровня мРНК генов ферментов биосинтеза тетрапирролов,



вероятно, обеспечивают более эффективное расходование энергии, несомненно, в затратном (в энергетическом плане) процессе экспрессии генов, дифференциально контролируя их активность. Полученные результаты согласуются с тем, что экспрессия структурных и регуляторных компонентов каждого этапа в метаболизме порфиринов, требует специфической регуляции, чтобы синхронизировать и обеспечить адекватное снабжение тетрапирролами различные компартменты клеток и ткани растений (Mock *et al.*, 1995). Кроме того, регуляция биосинтеза тетрапирролов должна гарантировать постоянный поток субстратов, чтобы предотвратить накопление интермедиатов – порфиринов (Аверина, 1988).

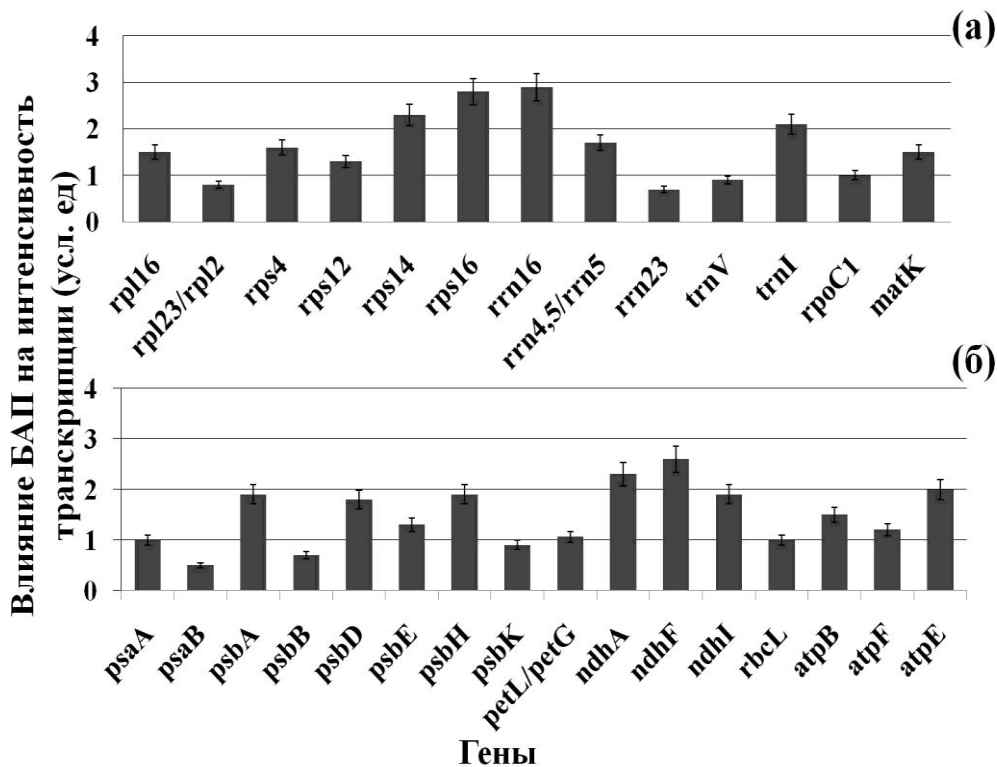
Так содержание продуктов биосинтеза хлорофила АЛК и протопорфирина в процессе деэтиоляции злаков сопровождается снижением уровня мРНК гена *alad* и увеличением содержания АЛК и АЛК-дегидрогеназы, а также протопорфиррина-IX (Sood *et al.*, 2005), с одновременным снижением белка порфобилиногендеаминазы и субъединиц Mg-хелатазы (Yang *et al.*, 2007). Следовательно, можно предположить, что дифференциальная регуляция экспрессии генов ферментов биосинтеза хлорофилла фитогормонами и светом обеспечивает необходимый баланс ферментов и интермедиатов в процессе позеленения растений.

6. Изучение гормональной регуляции экспрессии пластидных генов в процессе деэтиоляции ячменя. Одной из возможных причин активации цитокинином накопления хлорофилла и сокращения времени перехода растения к автотрофному питанию могла явиться стимуляция цитокинином экспрессии пластидных генов. Продукты, кодируемые этими генами, абсолютно необходимы для развития функционально активных хлоропластов. Для изучения роли фитогормонов в регуляции экспрессии пластидных генов в ходе деэтиоляции растений ячменя была определена интенсивность транскрипции хлоропластных генов не только в наиболее чувствительных к цитокинину листьях, отделенных от 6 – дневных этиолированных проростков ячменя, но и в зеленеющих листьях 3-дневных этиолированных проростков. Интенсивность транскрипции определяли после инкубации листьев на свету в течение 3 ч. в присутствии цитокинина (рис.7).

Рис. 7 Влияние БАП на интенсивность транскрипции хлоропластных генов в ходе инкубации листьев 3-дневных этиолированных проростков ячменя на свету.

Листья, отделенные от этиолированных 3-дневных проростков ячменя, инкубировали в течение 3 ч. на свету на воде или растворе БАП. Результаты представлены в виде отношения интенсивности транскрипции хлоропластных генов

при инкубации листьев на растворе БАП к интенсивности транскрипции листьев, инкубированных на воде: (а) – гены домашнего хозяйства; (б) – хлоропластные гены, кодирующие фотосинтетические белки.



При совместном действии цитокинина и света на листья 3-дневных проростков наблюдалась активация транскрипции 4 генов «домашнего хозяйства» (*rps14*; *rps16*, *rrn16* и *trnI*) и 3 генов фотосинтетических белков: *ndhA*, *ndhF* - субъединиц НАДН-пластохиноноксидоредуктазы и *atpE* (ϵ -субъединица АТФ синтазы)

В зеленеющих листьях 6-дневных проростков цитокинин на свету активировал транскрипцию 6 генов «домашнего хозяйства» (*rps14*, *rps16*, *rrn16*, *rrn4,5/rrn5*, *matK*) (рис. 8а) и 6 генов фотосинтетических белков (*psaA*, *psbH*, *ndhA*, *ndhF*, *ndhI*, *atpB*) (рис. 8б).

Причем, один свет в использованной нами постановке эксперимента не активировал (достоверно, то есть более, чем в 2 раза) скорость транскрипции ни одного из изученных генов пластома в отделённых листьях ячменя. Кроме того, цитокинин стимулировал в темноте транскрипцию двух генов – *rpl16* и *rps12*, кодирующих рибосомные белки (рис. 8а).

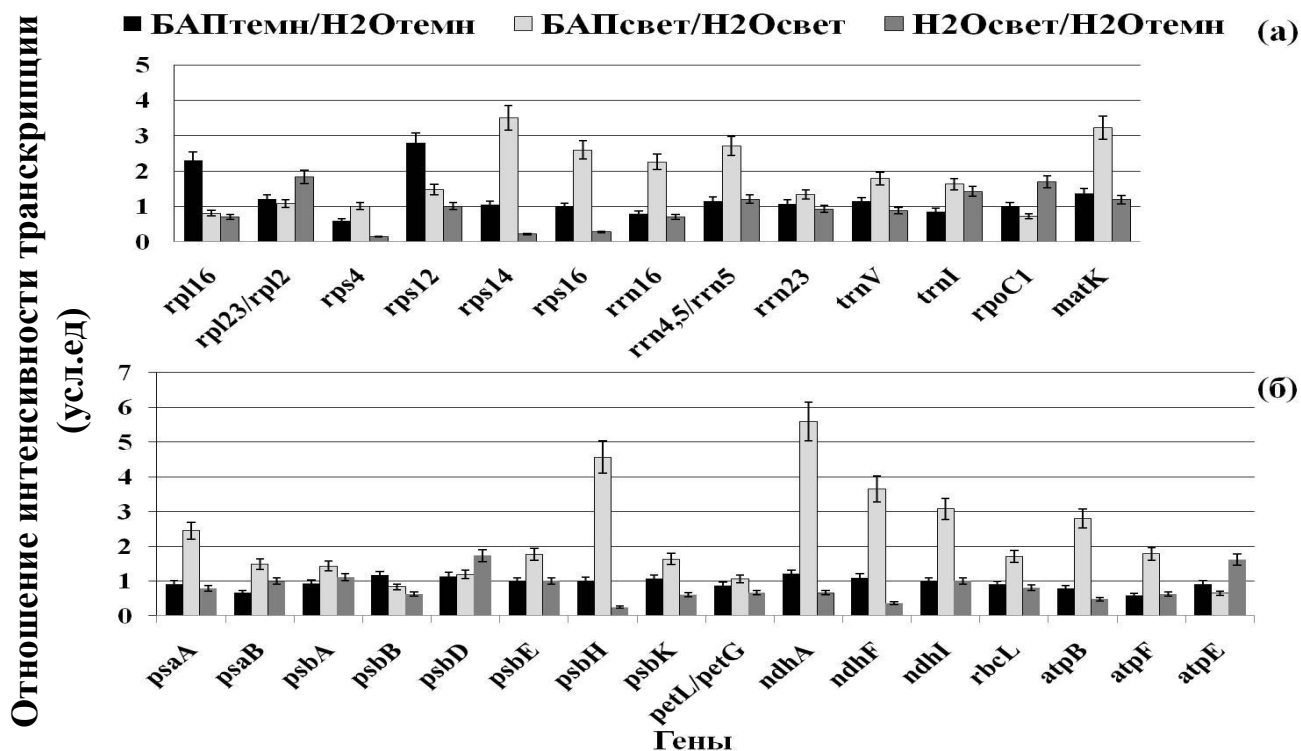


Рис. 8 Влияние света и БАП на интенсивность транскрипции хлоропластных генов аппарата транскрипции и трансляции (а) и генов белков фотосинтетического аппарата (б) в ходе деэтиоляции листьев ячменя. БАПтемн/Н₂Отемн – отношение интенсивности транскрипции в листьях, инкубированных на растворе БАП в темноте, к интенсивности транскрипции в листьях, инкубированных на воде в темноте. БАПсвет/Н₂Освет – отношение интенсивности транскрипции в листьях, инкубированных на растворе БАП на свету, к интенсивности транскрипции в листьях, инкубированных на воде на свету. Н₂Освет/Н₂Отемн – отношение интенсивности транскрипции в листьях, инкубированных в воде на свету, к интенсивности транскрипции в листьях, инкубированных на воде в темноте. На рисунке приведены средние значения и их стандартные отклонения.

Однако для активации всех других генов в наших опытах (рис. 8), как и в случае закончивших рост зеленых листьев ячменя (Zubo et al., 2008), был необходим свет. Важно отметить, что гены, активируемые цитокинином в темноте (*rpl16* и *rps12*), слабо регулировались при совместном действии света и цитокинина. Наибольший эффект цитокинина обнаружен для *rps14*, *psbH* и *ndhA* генов (Рис. 8а). Активация цитокинином транскрипции пластидных генов, возможно, приводит к ускорению формирования фотосинтетического аппарата и, как результат, к переходу растения к автотрофному типу питания. Подавление АБК накопления хлорофилла в листьях 6-дневных проростков ячменя достигается, вероятно, за счет ингибирования экспрессии генов белков фотосинтетического аппарата растений (табл. 1).

Таблица 1. Гормональная регуляция интенсивности транскрипции генов пластома в процессе деэтиоляции листьев 6-дневных проростков ячменя

Функциональные комплексы, белки		Интенсивность транскрипции генов:		
		не регулируются	активируются БАП	ингибируются АБК
гены домашнего хозяйства				
Хлоропластная РНК-полимераза	β – субъединица РНК-полимеразы β' – субъединица РНК-полимеразы	<i>rpoC1</i>		<i>rpoB</i> **
Рибосома	рибосомный белок 4S рибосомный белок 12S рибосомный белок 14S рибосомный белок 16S рибосомный белок 16L рибосомный белок 23L и 12L 4.5-5S рРНК 16S рРНК 23S рРНК	<i>rps4</i> <i>rps12</i> <i>rpl16</i> <i>rrn23</i>	<i>rps14</i> * <i>rps16</i> * <i>rrn4,5/rrn5</i> <i>rrn16</i>	<i>rps16</i> <i>rpl23/rpl12</i>
тРНК	тРНК-Val тРНК-Глу и тРНК-Тир		<i>trnV</i> ***	<i>trnE/trnY</i> **
Матураза	Матураза-К		<i>matK</i>	<i>matK</i>
гены белков фотосинтетического аппарата				
ФС I	A1 апопротеин ФС I A2 апопротеин ФС I	<i>psaB</i>	<i>psaA</i>	<i>psaA</i>
ФС II	полипептид реакционного центра D1 47 кДа хлорофилл апопротеин полипептид реакционного центра D2 α -субъединица цитохрома b559 Н-полипептид 7.7 кДа ФС II К-полипептид 3.9 кДа ФС II		<i>psbE</i> <i>psbH</i> <i>psbK</i>	<i>psbA</i> <i>psbB</i> <i>psbD</i> <i>psbH</i> <i>psbK</i>
Цитохром b6/f комплекс	цитохром b6 субъединица IV субъединицы V и VII	<i>petB</i> *** <i>petD</i> *** <i>petL/petG</i> ***		
АТФ-синтаза	β – субъединица АТФ синтазы I – субъединица АТФ синтазы ϵ - субъединица АТФ синтазы	<i>atpE</i> ***	<i>atpB</i> <i>atpF</i>	<i>atpB</i> <i>atpF</i>
НАДН-пластохинон оксидоредуктаза	субъединица A субъединица F субъединица (27 кДа) I		<i>ndhA</i> <i>ndhF</i> <i>ndhI</i>	
Большая субъединица РБФК			<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i>

* интенсивность транскрипции генов регулирует БАП в темноте,

** влияние БАП на интенсивность транскрипции генов в процессе деэтиоляции ячменя не изучено,

*** влияние АБК на интенсивность транскрипции генов в процессе деэтиоляции ячменя не изучено.

Наиболее подвержены ингибированию абсцизовой кислотой гены белков ФСII (*psbA*, *psbB*, *psbD*, *psbH*, *psbK*). Ряд белков ФСII отличаются очень коротким периодом полураспада; например, ген *psbA* кодирует белок D1, который ресинтезируется быстрее, чем любой другой белок фотосинтетических мембран (Mattoo et al., 1984). Это свойство белка D1 связано с подверженностью ФС II фотоиндуцированным повреждениям. Повреждения влекут за собой фотоингибирование и падение эффективности фотосинтеза, а большая скорость ресинтеза D1 позволяет быстро восстанавливать повреждения.

Кроме того, АБК активно влияет на антенный комплекс ФСII, ингибируя транскрипцию *psbB* гена (табл. 1). Известно, что продукт гена *psbB* – белок PsbB - CP47 абсолютно необходим для роста автотрофных организмов. Так эксперименты по инактивации гена *psbB* показали важность белка PsbB - CP47 для формирования и функционирования ФСII (Bricker, 1990).

Обработка на свету листьев этиолированных проростков ячменя АБК приводит к ингибированию экспрессии гена *psbH*, что, возможно, препятствует сборке ФСII, в то время как цитокинин оказывает активирующий эффект. Для 6 генов (*rpl16*, *rps14*, *rrn16*, *psaA*, *ndhA*, *ndhF*) интенсивность транскрипции не зависела от АБК и существенно увеличивалась на свету в присутствии БАП.

Данные опыта по изучению совместного действия БАП (2.2×10^{-5} М) и АБК (4.4×10^{-5} М) показали существенное снижение интенсивности транскрипции 3 генов (*rpl23/rpl2* и *psbD*) в листьях 6-дневных проростков ячменя, инкубированных на свету в присутствии БАП и АБК, по сравнению с интенсивностью транскрипции этих генов в листьях, инкубированных на воде или растворе (рис. 8) цитокинина. Таким образом, в работе показана прямая зависимость между накоплением хлорофилла листьями разного возраста и гормональной регуляцией экспрессии в них хлоропластных генов. Листья 6-дневных этиолированных проростков ячменя при обработке цитокинином активно накапливают хлорофилл. Это, вероятно, достигается благодаря дифференциальной регуляции экспрессии генов пластома и, в первую очередь, активации экспрессии генов рибосомных белков (*rps14*, *rps16*, *rrn4.5/rrn5*, *rrn16*), а так же рРНК (4.5-5S рРНК и 16S рРНК), которые обеспечивают

биосинтез белка в процессе деэтиоляции. Приведенные данные позволяют предположить, что цитокинин обладает отличным от АБК механизмом действия: он регулирует в большей степени экспрессию генов «домашнего хозяйства» и, в первую очередь, генов аппарата трансляции. Кроме того, цитокинины стимулируют транскрипцию генов субъединиц НАДН-пластохиноноксидоредуктазы, участвующей в дыхательном обмене растений в процессе деэтиоляции (табл. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе изучалось влияние продолжительности роста в темноте на способность накапливать хлорофилл на свету листьями 3, 6, 9 и 12-дневных проростков ячменя как наиболее значимый показатель наступления деэтиоляции растений. Показано, что наибольшая интенсивность накопления хлорофилла наблюдается в листьях 3-дневных проростков, которая с возрастом снижается, а у 12-дневных этиолированных растений наблюдается необратимая этиоляция. Следовательно, накопление хлорофилла на свету листьями, отделенными от этиолированных проростков ячменя, зависит, в первую очередь, от продолжительности их роста в темноте. Это может быть связано со значительным падением скорости транскрипции многих пластидных генов при длительном периоде этиоляции. Основная цель работы заключалась в изучении роли фитогормонов в период деэтиоляции ячменя. Нами установлено, что свет и фитогормоны (цитокинины и АБК) дифференциально регулируют процесс деэтиоляции листьев проростков ячменя разного возраста. Причем, наиболее чувствительными к цитокинину являются листья 6-дневных растений, а к АБК – листья 3-дневных растений. Важно отметить, что цитокинин, не влияя на позеленение листьев 3-дневных растений, снимает ингибирующий эффект АБК, а АБК, не оказывая влияния на позеленение листьев 6-дневных растений, подавляет активирующее действие цитокинина. Возможно, это достигается разнонаправленной регуляцией экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты реакций биосинтеза хлорофилла. В диссертационной работе показано, что цитокинин активирует накопление транскриптов ядерных генов (*hemA1*, *hemA3*, *DCUP*) и не влияет на гены *hemC*, *Xantha-f*, *Xantha-g*, *Xantha-h*, кодирующие ферменты биосинтеза хлорофилла. Следовательно, активация экспрессии этих генов, хотя и косвенно, способствует

накоплению хлорофилла. В то же самое время, АБК подавляет накопление транскриптов *hemA1*, *hemA3*, *DCUP* генов и может противодействовать активирующему эффекту цитокинина.

Свет является необходимым фактором для запуска программы развития хлоропластов. Дифференцированные хлоропласты также отвечают на наличие или отсутствие света. Фитогормоны могут влиять на процесс деэтиоляции путём регуляции транскрипции как на свету, так и в темноте не только генов, кодирующих фотосинтетические белки, но и генов «домашнего хозяйства», которые кодируют белки, обеспечивающие функционирование аппарата транскрипции и трансляции, без которых формирование фотосинтетически активных хлоропластов невозможно.

АБК ингибирует интенсивность транскрипции пластидных генов, подавляет накопление мРНК ядерных генов ферментов биосинтеза хлорофилла (*alad*, *hemA1*, *hemA3*, *DCUP*) в процессе деэтиоляции, тормозит увеличение содержания хлорофилла, замедляя развитие структуры хлоропластов и, тем самым, задерживает процесс перехода этиолированных растений на автотрофное питание.

Данные о влиянии цитокинина на транскрипцию хлоропластных генов в закончивших рост листьях ячменя получены в 2008 г. (Zubo et al., 2008). В нашей работе представлены первые сведения о влиянии цитокинина и АБК на транскрипцию не только хлоропластных, но и ядерных генов ферментов биосинтеза хлорофилла в процессе деэтиоляции однодольных растений. Исследование механизма действия каждого из этих гормонов, взаимодействие их сигнальных систем в регуляции экспрессии хлоропластных и ядерных генов на уровне биосинтеза белка и активности ферментов является задачей будущих исследований. В настоящее время установлено, что действие цитокинина на содержание мРНК изученных ядерных генов зависит от света, тогда как регуляторное действие АБК может проявляться и независимо от света.

Результаты данной работы внесли некоторую определенность в понимание особенностей действия фитогормонов (цитокинина и АБК) на однодольные растения разных возрастов во время протекания одного из начальных этапов онтогенеза растений – процесса деэтиоляции.

ВЫВОДЫ

1. Накопление хлорофилла на свету листьями, отделенными от этиолированных проростков ячменя, зависит от продолжительности их роста в темноте. Наибольшая интенсивность накопления хлорофилла наблюдается в листьях 3-дневных проростков, которая с возрастом снижается, а у 12-дневных этиолированных растений наблюдается необратимая этиоляция.
2. Процесс деэтиоляции листьев, отделенных от этиолированных проростков ячменя, регулируется цитокинином и АБК. Чувствительность к фитогормонам зависит от возраста этиолированных растений. Наиболее чувствительными к цитокинину являются листья 6-дневных растений, а к АБК – листья 3-дневных растений. Цитокинин, не влияя на позеленение листьев 3-дневных растений, снимает ингибирующий эффект АБК, а АБК, не оказывая влияния на позеленение листьев 6-дневных растений, подавляет активирующее действие цитокинина.
3. Цитокинин стимулирует накопление транскриптов ядерных генов (*hemA1*, *hemA3*, *DCUP*), и не влияет на гены *hemC*, *Xantha-f*, *Xantha-g*, *Xantha-h*, кодирующие ферменты биосинтеза хлорофилла. Активация экспрессии этих генов, вероятно, способствует накоплению хлорофилла.
4. Цитокинин совместно со светом в ходе деэтиоляции вызывает дифференциальную регуляцию экспрессии хлоропластных генов. Впервые обнаружена свет-независимая активация цитокинином скорости транскрипции двух (*rpl16* и *rps12*) из 30 изученных пластидных генов.
5. АБК ингибирует интенсивность транскрипции пластидных генов, подавляет накопление мРНК ядерных генов ферментов биосинтеза хлорофилла (*alad*, *hemA1*, *hemA3*, *DCUP*), тормозит увеличение содержания хлорофилла, замедляет развитие структуры хлоропластов и, тем самым, задерживает процесс перехода этиолированных растений на автотрофное питание.
6. Обнаружен антагонизм в действии цитокинина и АБК в ходе деэтиоляции отделенных листьев ячменя на уровне транскрипции пластидных генов, накопления транскриптов ядерных генов ферментов биосинтеза хлорофилла, накопления хлорофилла, влияния на ультраструктуру хлоропластов. Установлено, что действие цитокинина на содержание мРНК изученных ядерных генов зависит от света, тогда как АБК может проявлять регуляторное действие независимо от света.
7. Процесс деэтиоляции злаков находится под контролем как света, так и фитогормонов-антагонистов (цитокинина и АБК), которые оказывают сложное

регуляторное влияние на экспрессию пластидных и ядерных генов хлоропластных белков и РНК, на процесс формирования ультраструктуры хлоропластов, накопление хлорофилла, что, в конечном результате, в зависимости от баланса фитогормонов и условий освещения, приводит к превращению этиопластов в хлоропласты, к формированию фотосинтетического аппарата и началу автотрофного питания.

СПИСОК РАБОТ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Кравцов А.К.** Молекулярные механизмы гормональной регуляции деэтиоляции ячменя (*Hordeum vulgare* L.). (2007) Сборник тезисов. Всероссийская конференция. Москва. РГАУ-МСХА. с. 27 – 29.
2. **Зубо Я.О., Ямбуренко М.В., Кравцов А.К., Алейникова А.Ю., Селиванкин С.Ю., Зубкова Н.К., Кудрякова Н.В., Лире К., Кулаева О.Н., Бернер Т., Кузнецов В.В.** (2007) Регуляция транскрипции хлоропластных генов цитокинином. Тезисы Съезда Общества физиологии растений. Сыктывкар с. 187 – 188.
3. **Кравцов А.К., Алейникова А.А., Белозерова Н.С., Зубо Я.О., Кулаева О.Н., Кузнецов В.В.** (2007) Участие цитокинина в деэтиоляции растений ячменя. Тезисы Съезда Общества физиологии растений. Сыктывкар с. 190 – 192.
4. **Зарипова Н.Р., Зубо Я.О., Кравцов А.К., Холодова В.П., Кузнецов В.В., Кузнецов Вл.В.** (2008) Влияние кадмия, меди и никеля на транскрипцию **пластидных** генов ячменя и блокирование сплайсинга мРНК. Тезисы докладов международной научной конференции "Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений. Екатеринбург. с. 177 – 178.
5. **Кравцов А.К., Кузменков П.В., Алейникова А.Ю., Зубо Я.О., Кузнецов В.В.** (2008) Фитогормоны влияют на экспрессию генов в ходе деэтиоляции. Тезисы докладов международной научной конференции "Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений. Екатеринбург с. 224 – 225.
6. **Зарипова Н.Р., Зубо Я.О., Кравцов А.К., Холодова В.П., Кузнецов В.В., Кузнецов Вл.В.** (2008) Тяжёлые металлы вызывают дифференциальную регуляцию транскрипции пластидных генов и блокирование сплайсинга мРНК. *Доклады Академии Наук* 423(1) с. 124-128.
7. **Кравцов А.К., Зубо Я.О., Кузнецов В.В.** (2008) Изучение влияния света и фитогормонов на экспрессию генов в ходе деэтиоляции. Сборник тезисов. 12-я

международная пушинская школа-конференция молодых ученых "Биология - наука XXI века". Пушино с. 35 - 36.

8. **Кравцов А. К.** (2009) Изучение влияния АБК на экспрессию генов в ходе деэтиоляции ячменя. Тезисы докладов «Ломоносов – 2009» Москва. с. 231 – 232.

9. **Зарипова Н.Р., Зубо Я.О., Кравцов А.К., Холодова В.П., Кузнецов В.В., Кузнецов Вл.В.** (2009) Изменение экспрессии хлоропластных генов проростков ячменя в условиях стресса, вызванного солями кадмия, меди и никеля. Тезисы докладов «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях крайнего севера». Апатиты. с. 126 – 127.

10. **Зубо Я. О., Ямбуренко М. В., Кравцов А. К., Кулаева О. Н., Кузнецов В. В.** (2009) Отделённые от растений листья ячменя как экспериментальная модель для изучения регуляции цитокинином транскрипции пластидных генов. Физиология растений, 56 (4). 609-618.

11. **Кравцов А.К., Зубо Я.О., Кулаева О.Н., Кузнецов В.В.** (2009) Абсцизовая кислота участвует в регуляции экспрессии ядерных и пластидных генов в ходе деэтиоляции ячменя. Тезисы докладов «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях крайнего севера». Апатиты. с. 178 – 179.

12. **Кравцов А.К., Зубо Я.О., Кулаева О.Н., Кузнецов В.В.** (2010) Как цитокинин и свет регулируют деэтиоляцию. Сборник тезисов. 14-я международная пушинская школа-конференция молодых ученых "Биология - наука XXI века". Пушино. с. 321-322.

13. **Кузнецов В.В., Кравцов А.К., Селиванкина С.Ю., Зубо Я.О., Зубкова Н.К., Кулаева О.Н., Фаттахов С.Г., академик РАН Коновалов А.И.** (2010) Мелафен повышает активность РНК-полимеразы I, но не влияет на транскрипцию пластидных генов ячменя. *Доклады Академии Наук* 431 (4). с. 551–555.

14. **Kravtsov A.K., Zubo Ya.O., Kulaeva O. N., Kusnetsov V. V.** (2010) Cytokinin and light: the ways to regulate de-etiolation of barley. Abstract book *FESPB-2010*, p. 137.

15. **Kravtsov A.K., Zubo Y.O., Kulaeva O.N., Yamburenko M.V., Kusnetsov V.V.** Cytokinin and abscisic acid control plastid gene transcription during barley seedling de-etiolation. *Plant Growth Regulation*. DOI: 10.1007/s10725-010-9553-y.