На правах рукописи

ЯМБУРЕНКО Мария Владимировна

Роль фитогормонов и света в регуляции транскрипции хлоропластных генов в ячмене

(03.00.12 – физиология и биохимия растений)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА 2008

Работа выполнена в Лаборатории экспрессии генома растений Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, РФ; и на кафедре Генетики отделения Естественных наук Гумбольдтовского университета, Берлин, Германия.

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

доктор биологических наук, профессор	Кузнецов Виктор Васильевич

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор биологических наук	Юрина Надежда Петровна
кандидат сельскохозяйственных наук, профессор	Семенов Олег Григорьевич

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: Кафедра физиологии растений Биологического факультета Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова.

Защита состоится «24» февраля 2009 года в 11 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: +7(495)9778018, e-mail: ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан « 21 » января 2009 года.

Ученый секретарь
Совета по защите докторских
и кандидатских диссертаций,
кандидат биологических наук М.И. Азаркович

ВВЕДЕНИЕ

Пластиды являются уникальными органеллами растений, выполняющими большое количество метаболических функций, основной из которых является превращение солнечной энергии в энергию химических связей в процессе фотосинтеза (Neuhaus and Emes, 2000). Биогенез пластид тесно взаимосвязан с программой развития растения в целом и его различных тканей и органов (Lopez-Juez, 2007). Пластиды содержат свой собственный геном, в котором кодируется ряд «фотосинтетических» генов и генов «домашнего хозяйства» (Liere and Borner, 2006). В биогенезе пластид принимает участие экспрессия как ядерных, так и пластидных генов. Поэтому для биогенеза пластид очень важны сигналы, регулирующие экспрессию пластидных генов ядерного кодирования, самих пластидных генов, а также тесное взаимодействие и обмен информацией между ядерным и пластидным компартментами (Lopez-Juez, 2007). В регуляции всех этапов экспрессии генов активное участие принимают как внешние факторы, такие как свет, минеральное питание, доступность влаги, различные биотические и абиотические стрессы, так и внутренние факторы, как, например, фитогормоны и углеводы.

К настоящему времени хорошо установлена регуляторная роль цитокининов в биогенезе хлоропластов, которая состоит в активации цитокинином структурной и биохимической дифференциации хлоропластов (Микулович и др., 1971; Partier, 1979; Кулаева, 1973; Kusnetsov et al., 1994; Caers and Vendrig, 2006). Показано антагонистическое действие в регуляции биогенеза хлоропластов цитокининов, которые активируют этот процесс, и абсцизовой кислоты (АБК) и метилжасмоната (МеЖа), которые его ингибируют как на структурном, так и на биохимическом уровне (Кравяж и др., 1977; Хохлова и др., 1978; Reinbothe et al., 1997; Ananieva et al., 2007).

Показана активация цитокинином синтеза РНК в хлоропластах (Микулович и др., 1977; Roussaux et al., 1976; Зубо и др., 2005), активация экспрессии ядерных генов, кодирующих хлоропластные белки (Chory et al., 1994; Kusnetsov et al., 1994; Hutchison and Kieber 2002; Rashotte et al., 2003; Kiba et al., 2005; Brenner et al., 2005), получены данные в пользу посттранскрипционного влияния цитокининов на экспрессию хлоропластных генов (Kusnetsov et al., 1994).

Самым первым этапом экспрессии генов является транскрипция. Ранее было показано, что цитокинин может активировать транскрипцию ряда хлоропластных генов (Зубо и др., 2005). Метилжасмонат (МеЖа), как было недавно установлено, также влияет на транскрипцию хлоропластных генов, но подавление, в данном случае, было показано на уровне суммарной транскрипции хлоропластных генов (Ananieva et al., 2007). Из литературы известны отдельные факты влияния гиббереллинов, ауксинов и брассиностероидов на отдельные этапы биогенеза пластид.

Интенсивное изучение аппарата транскрипции пластидного генома привело к открытию двух типов РНК-полимераз, функционирующих в пластидах. РНК-полимераза фагового типа, состоящая из одной субъединицы, кодируется ядром. Четыре субъединицы РНК-полимеразы бактериального типа кодируются пластомом, а σ-субъединицы, определяющие специфичность связывания с промотором этой полимеразы, кодируются в ядре (Liere K. and Börner T., 2006). Эти данные вызвали значительный интерес к изучению транскрипционной регуляции экспрессии пластидных генов.

Однако до настоящего времени не было работ, которые рассмотрели бы возможное участие в регуляции биогенеза хлоропластов не только света, но и большой группы фитогормонов на уровне регуляции транскрипции хлоропластных генов.

Цель и задачи исследования. Цель диссертационной работы состояла в изучении гормональной и световой регуляции экспрессии хлоропластных генов на уровне транскрипции.

Для ее достижения были поставлены следующие **задачи**:

1. Выбрать для анализа гены, входящие во все известные опероны пластидной ДНК ячменя, кодирующие функционально различные белки и РНК.
2. Изучить принципиальную возможность регуляции транскрипции в разных сегментах листьев разных возрастов под действием АБК, ИУК, $ГК_3$, ЭБ и МеЖа.
3. Выяснить роль света при действии цитокинина и абсцизовой кислоты на транскрипцию хлоропластных генов.

4. Исследовать взаимодействие фитогормонов-антагонистов: БАП и АБК, а также БАП и МеЖа – в регуляции транскрипции хлоропластных генов.

5. Изучить на *albostrians* мутанте ячменя, лишенном пластидного синтеза белка, участие РНК-полимеразы бактериального типа в регуляции транскрипции пластидных генов абсцизовой кислотой.

6. Выявить закономерности регуляции транскрипции индивидуальных хлоропластных генов фитогормонами.

Научная новизна и практическая ценность работы.

Разработана биологическая система, позволяющая изучить участие АБК, 3-индолилуксусной кислоты (ИУК), гибберелловой кислоты ($ГК_3$), эпибрассинолида (ЭБ) и МеЖа в регуляции транскрипции индивидуальных хлоропластных генов ячменя. Впервые показано, что гормоны АБК, ИУК и $ГК_3$ могут регулировать экспрессию ряда хлоропластных генов на уровне транскрипции. Показана необходимость света и важность его интенсивности для активации транскрипции хлоропластных генов цитокинином. Выяснено, что при ингибировании транскрипции хлоропластных генов под действием АБК свет не играет такой важной роли, как при активации транскрипции цитокинином. Выявлено антагонистическое действие БАП и АБК, а также БАП и МеЖа на уровне регуляции транскрипции хлоропластных генов. Получены косвенные доказательства участия РНК-полимеразы бактериального типа в регуляции транскрипции пластидных генов абсцизовой кислотой. Эти результаты вносят существенный вклад в понимание механизмов регуляции биогенеза хлоропластов фитогормонами. Полученные результаты могут быть использованы для разработки теоретических основ управления продуктивностью растений.

Апробация результатов работы. Основные результаты работы были представлены на конференциях (Вологда, 2005; Иркутск, 2006; Казань, 2006; Потсдам, 2006; Сыктывкар, 2007; Екатеринбург, 2008).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из которых 4 в журналах, одобренных ВАК.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, списка сокращений и списка использованной литературы.

Диссертационная работа изложена на 160 страницах машинописного текста, содержит 8 таблиц и 39 рисунков. Список цитируемой литературы составляет 233 наименования, из которых 212 на иностранных языках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили на первых листьях 4- и 9-дневных растений ячменя сорта Луч (*Hordeum vulgare* L.) и на 9-дневных белых и зеленых растениях мутанта ячменя *albostrians* (Hess et al., 1993). Ячмень выращивали в почве в климатической камере при 23˚С, 16 часовом фотопериоде, при освещенности 130 или 270 мкмоль квантов $м^{-2}с^{-1}$. Возраст растений определяли с момента появления на поверхности почвы всходов. Инкубацию листьев на воде и растворе гормонов вели при постоянном освещении интенсивностью 130 мкмоль квантов $м^{-2}с^{-1}$, 270 мкмоль квантов $м^{-2}с^{-1}$ или в темноте. Листья инкубировали на растворах гормонов 3 или 24ч после срезания в темноте или на свету. Ряд экспериментов был выполнен после 24ч предынкубации срезанных листьев на воде и последующей 3ч инкубации на растворе гормонов. В работе использовали апикальные и базальные 2.5 см сегменты листьев.

Использовали следующие рабочие концентрации гормонов: БАП (2.5×10^{-5} М), АБК (7.6×10^{-5} М), ИУК (5.7×10^{-8} М), $ГА_3$ (2.9×10^{-6} М), ЭБ (10^{-7} М), МеЖа (10^{-4} М).

Фрагменты пластидных генов, используемые после амплификации в качестве ДНК проб при ДНК-РНК гибридизации, ранее встроенные в плазмиду *pUC57*, были частично предоставлены профессором Р. Г. Херрманном (Мюнхен, Германия) и к.б.н. Я.О. Зубо, за что им выражается глубокая благодарность.

Методы ПЦР и электрофорез ДНК осуществлялись по стандартным методикам (Sambrook and Russell, 2006).

Трансформация клеток *E.coli* осуществлялась с помощью набора реактивов Fermentas (каталожный номер К2711), полностью следуя прилагаемой инструкции.

Для выделения плазмидной ДНК применяли метод, разработанный ранее Birnboim and Doly (1979), с небольшими модификациями.

Выделение хлоропластов проводили по методу, описанному в статье Brock et al. (1993) с некоторыми модификациями. Подсчет хлоропластов осуществляли с помощью цитологической счетной камеры под световым микроскопом. Для проведения одной run-on реакции отбирали 50 млн. хлоропластов.

Подготовку нейлоновых мембран с иммобилизированными ДНК-пробами на хлоропластные гены и проведение run-on транскрипции также осуществляли в соответствии с методами, описанными в работе Zubo et al. (2008).

Обработку данных run-on экспериментов осуществляли с помощью программ Quantity One и Excel. Данные получены как минимум в 3 -кратной повторности, посчитаны стандартные отклонения. В ряде случаев отношения водного варианта к опытному выражены в форме десятичного логарифма, для более наглядного представления данных.

Содержание хлорофилла определяли спектрометрически по методике Porra et al.(1989).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Синергизм в действии БАП и света на транскрипцию хлоропластных генов

Известно, что БАП оказывает стимулирующее воздействие на транскрипцию хлоропластных генов (Зубо и др., 2005). Чтобы выяснить, как свет влияет на регуляцию цитокинином транскрипции хлоропластных генов, был проведен ряд run-on экспериментов с хлоропластами, выделенными из апикальных сегментов листьев, отделенных от 9-дневных растений, после следующих обработок: (1) 24 ч инкубации на воде в темноте с последующей 3 ч инкубацией на растворе БАП в темноте или на свету; и (2) 24 ч инкубации на воде на свету (270 мкмоль квантов $м^{-2}с^{-1}$) с последующей 3 ч инкубацией на растворе БАП в темноте или на свету (рис. 1). Из этих экспериментов следует, что ни отдельное действие света, ни отдельное действие БАП не имеют активирующего эффекта на транскрипцию хлоропластных генов. Поэтому, для стимуляции хлоропластной транскрипции необходимо совместное действие света и цитокинина. Эти результаты показывают, что освещение листьев в период предынкубации на воде является необходимым условием для активации транскрипции хлоропластных генов цитокинином в ходе последующей 3 ч обработки. После предынкубации листьев в темноте, 3 ч инкубация на растворе БАП не приводит к активации транскрипции, даже если инкубация проводилась на свету.

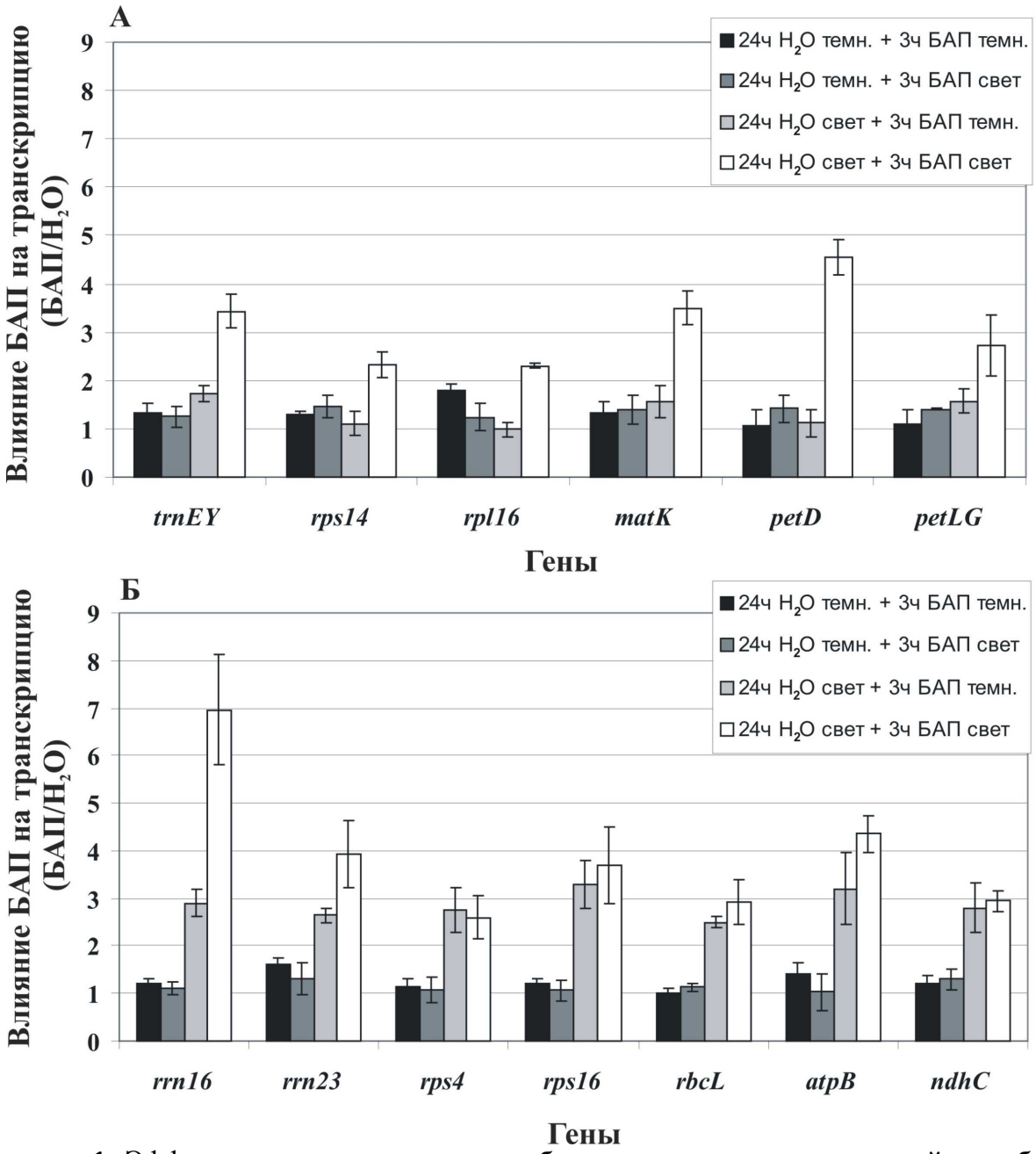

Рисунок 1. Эффект света в ходе предынкубации на воде и последующей инкубации листьев первого яруса растений ячменя на воде или растворе БАП на хлоропластную транскрипцию. Листья первого яруса, отделенные 9-дневных растений ячменя были предынкубированы 24 часа на воде в темноте или на свету (270 мкмоль квантов $м^{-2}с^{-1}$) и инкубированы дополнительные 3 часа на воде или растворе БАП в темноте или на свету. После этого были выделены хлоропласты из апикальных сегментов листьев и использованы для проведения реакции run-on транскрипции. А – гены, транскрипция которых отвечает на цитокинин только после освещения в ходе и предынкубации на воде и инкубации на растворе БАП. Б – гены, транскрипция которых регулируется цитокинином после предынкубации на свету и инкубации в темноте. Транскрипционная активность *psbA* гена служит внутренним стандартом. Каждое значение является отношением варианта с обработкой листьев БАП к контрольному варианту на воде, и представляет собой средние трех независимых экспериментов, барами отмечено стандартное отклонение.

Для активации транскрипции *trnEY, rps14, rpl16, matK, petD* и *petLG* генов свет был необходим как на этапе предынкубации, так и на этапе инкубации листьев на растворе цитокинина (рис. 1 А). Однако, в случае *rrn16, rrn23, rps4, rps16, rbcL, atpB* и *ndhC* генов предынкубация на свету с последующей инкубацией в темноте на растворе БАП оказалась достаточной для активации транскрипции (рис. 1 Б). Инкубация листьев на растворе БАП на свету еще сильнее повышала интенсивность транскрипции *rrn16, rrn23* и *atpB* генов, показывая, что свет и цитокинин, влияя на интенсивность транскрипции хлоропластных генов в условиях наших экспериментов, проявляют синергизм (рис. 1 Б).

Интенсивность света влияет на транскрипцию хлоропластных генов и ее регуляцию цитокинином

Чтобы изучить роль интенсивности света в регуляции цитокинином транскрипции хлоропластных генов, был проведен ряд экспериментов, в которых ячмень выращивали и инкубировали отделенные от него первые листья при более слабой интенсивности освещения – 130 мкмоль квантов $м^{-2}с^{-1}$. При этом было установлено, что разная интенсивность освещения во время выращивания растений и инкубации срезанных листьев на воде по-разному влияет на транскрипцию хлоропластных генов в апикальных сегментах срезанных листьев 9-дненых растений ячменя: сильный свет и темнота во время инкубации срезанных листьев на воде подавляют транскрипцию, тогда как слабый свет ее активирует.

В базальных частях листьев 9-дневных растений при инкубации в течение 24 ч на растворе БАП существенных изменений в интенсивности транскрипции не было выявлено. В то же время в апикальных частях 9-дневных растений 24 часовая инкубация на растворе БАП достоверно активировала интенсивность транскрипции наиболее чувствительного к цитокинину *rrn16* гена. То есть интенсивность освещения влияет и на скорость транскрипции в срезанных листьях ячменя, и на ее регуляцию цитокинином.

АБК участвует в регуляции транскрипции хлоропластных генов в листьях ячменя

Во время инкубации листьев первого яруса, срезанных с 4- и 9-дневных растений ячменя на растворе АБК при постоянном освещении (130 мкмоль квантов

$м^{-2}с^{-1}$) происходило снижение содержания хлорофилла как в апикальных, так и в базальных сегментах листьев, что свидетельствует о запуске процессов старения.

При инкубации листьев 4-дневных растений на растворе АБК в течение 24 ч на свету отмечается ингибирование транскрипции ряда хлоропластных генов в базальных сегментах листьев, тогда как в апикальных сегментах данный эффект не обнаруживается.

Инкубация листьев 9-дневных растений на растворе АБК в течение 24ч приводит к достоверному ингибированию интенсивности транскрипции большинства хлоропластных генов, как в апикальных, так и в базальных сегментах листьев (рис. 2). АБК подавляет интенсивность транскрипции хлоропластных генов дифференцированно – от полного отсутствия подавления (*psbD*) до ингибирования в 7 – 8 раз (*petLG*, *psbE*, *psbK*, *rbcL* гены *rrn* оперона).

За 24 ч инкубации эффект действия АБК на транскрипцию хлоропластных генов носит, возможно, опосредованный характер. Однако за более короткое время (3 ч) АБК не влияет на транскрипцию. После предынкубации срезанных листьев на воде в течение 24 ч АБК за последующие 3 ч инкубации подавляла транскрипцию ряда хлоропластных генов, причем только в базальных сегментах листьев (рис. 3). Вероятно, 24 ч инкубация листьев на воде ускоряет их старение и создает условия действия АБК.

В аналогичных экспериментах, в которых и предынкубация на воде, и инкубация срезанных листьев ячменя 9-дневных растений на растворе фитогормона производились в темноте, было показано, что и в отсутствие света АБК достоверно подавляет транскрипцию многих хлоропластных генов также в базальных сегментах листьев.

Листья первого яруса 4-дневных растений еще растут, тогда как 9-дневных уже закончили рост. Как известно, клеточные деления в листьях злаков происходят в базальной части. Это самые молодые из изученных нами фрагментов листа. В них происходит активное формирование хлоропластов, которое, как было ранее показано, подавляется АБК. Наши результаты показывают, что это происходит на уровне ингибирования под действием АБК транскрипции хлоропластных генов.

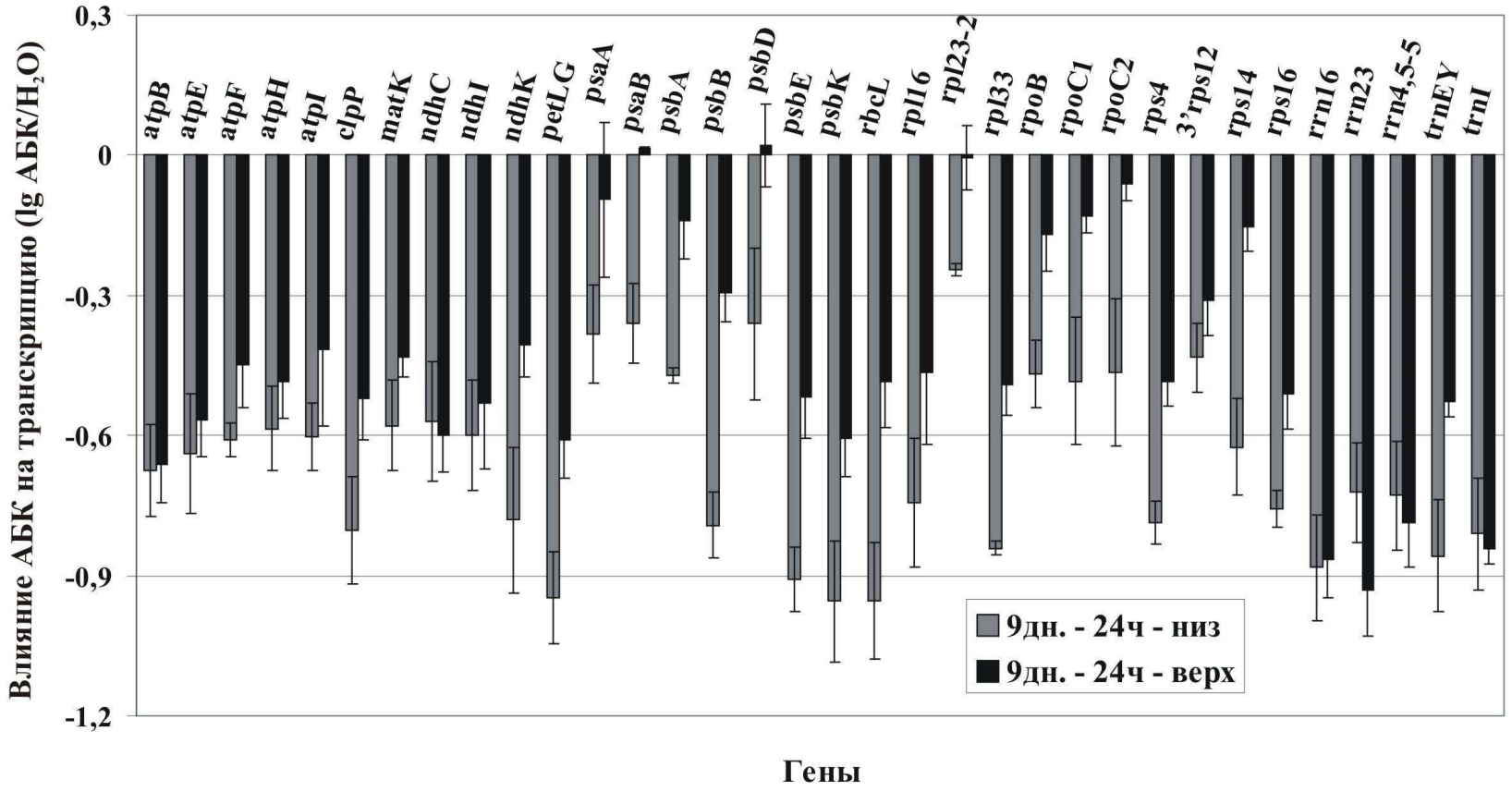

Рисунок 2. Влияние АБК на транскрипцию хлоропластных генов. Инкубация листьев первого яруса, срезанных с 9-дневных растений ячменя проводилась на свету на растворе АБК в течение 24 часов. Интенсивность транскрипции хлоропластных генов измерялась в базальных (низ) и апикальных (верх) сегментах листьев 9-дневных растений. Результаты представлены в виде десятичного логарифма отношения скорости транскрипции хлоропластных генов на растворе АБК к скорости транскрипции на воде. Значения lg выше +0.3 или ниже -0.3 соответствуют достоверной активации или ингибированию интенсивности транскрипции. Данные получены в 3-кратной повторности, барами отмечены стандартные отклонения.

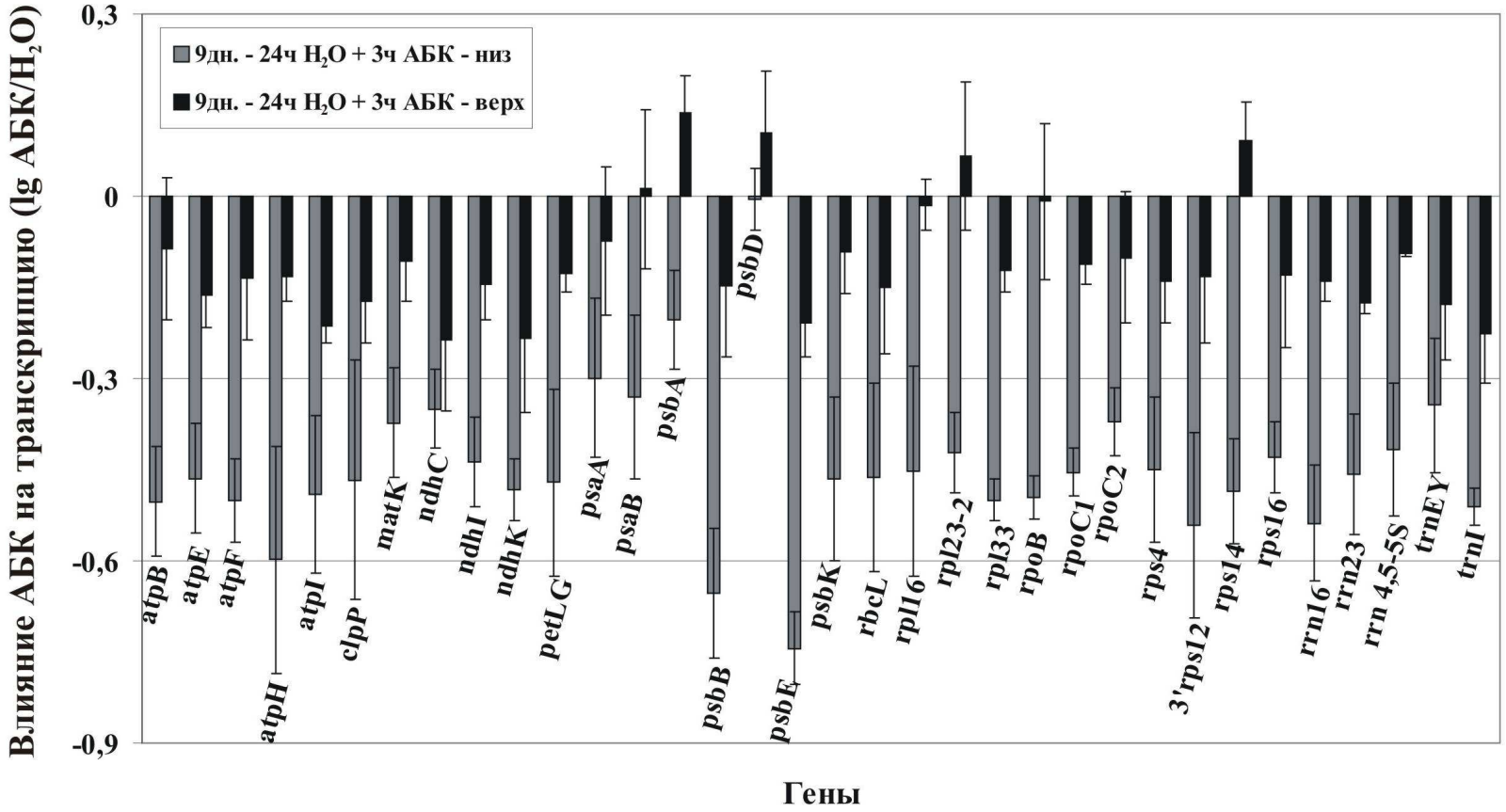

Рисунок 3. Влияние АБК на транскрипцию хлоропластных генов. Предынкубация срезанных листьев на свету на воде длилась 24 часа, после чего листья инкубировали на растворе АБК 3 часа. Интенсивность транскрипции хлоропластных генов измерялась в апикальных (верх) и в базальных (низ) сегментах листьев 9-дневных растений. Результаты представлены в виде десятичного логарифма отношения скорости транскрипции хлоропластных генов на растворе АБК к скорости транскрипции на воде. Значения lg выше +0.3 или ниже -0.3 соответствуют достоверной активации или ингибированию интенсивности транскрипции. Данные получены в 3-кратной повторности, барами отмечены стандартные отклонения.

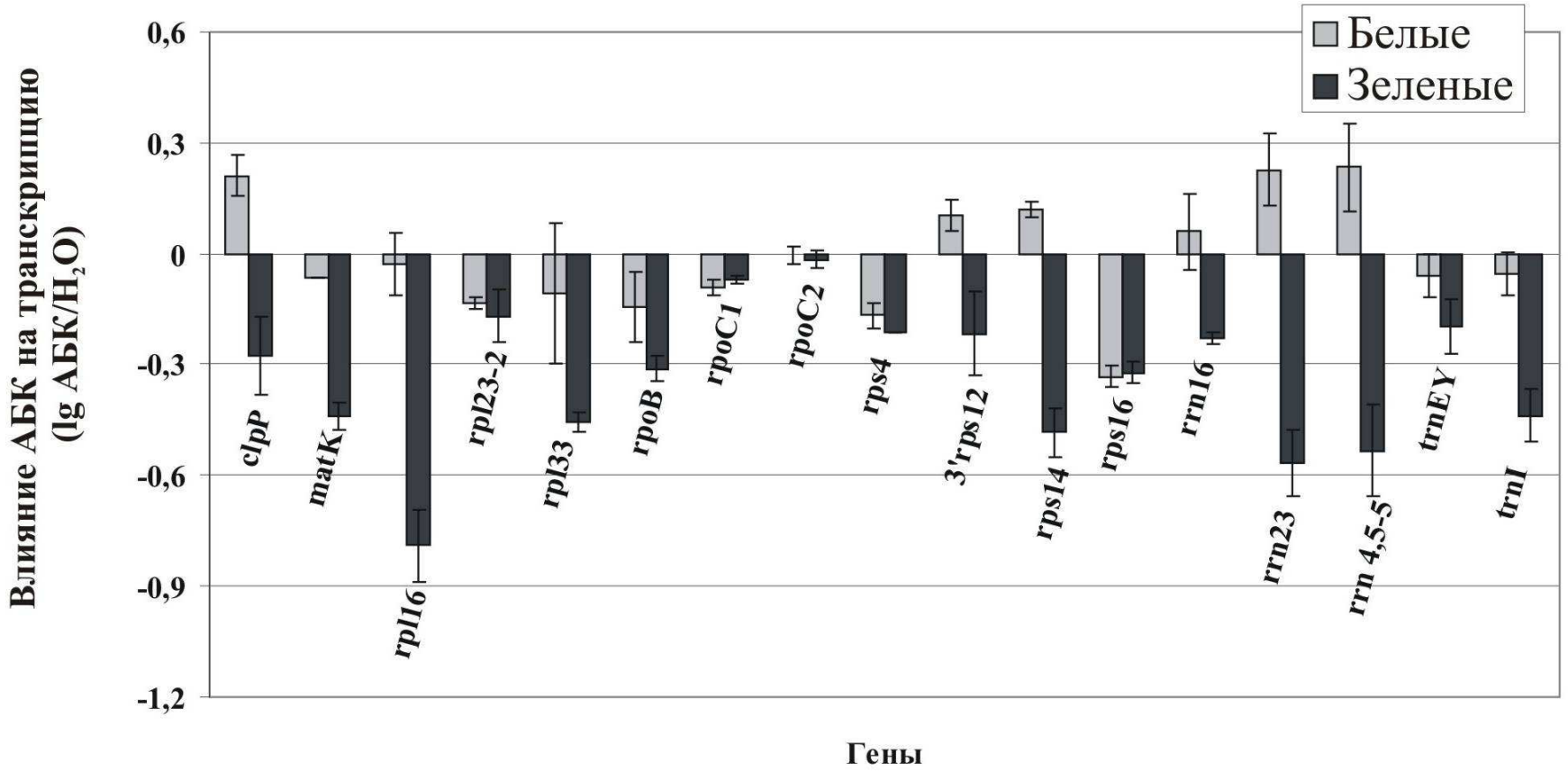

Рисунок 4. Влияние АБК на транскрипцию хлоропластных генов в полностью белых и зеленых листьях мутанта ячменя *albostrians*. Инкубацию срезанных листьев проводили на растворе АБК на свету в течение 3 часов. Интенсивность транскрипции измеряли в базальных сегментах листьев 9-дневных растений. Результаты представлены в виде десятичного логарифма отношения скорости транскрипции пластидных генов на растворе АБК к скорости транскрипции на воде. Значения lg выше +0.3 или ниже -0.3 соответствуют достоверной активации или ингибированию интенсивности транскрипции. Данные получены в 3-кратной повторности, барами отмечены стандартные отклонения.

В апикальных частях листьев 9-дневных растений происходят процессы старения, которые, как известно, ускоряются АБК. Поэтому причины влияния АБК на угнетение транскрипции хлоропластных генов в базальных и апикальных частях могут быть различны.

Известно, что во взрослых хлоропластах транскрипция генов происходит в основном за счет РНК-полимеразы бактериального типа, основные субъединицы которой кодируются пластомом (Liere and Börner, 2006). Вполне возможно, что функционирование именно этой РНК-полимеразы каким-то образом подавлялось АБК. Чтобы проверить это предположение, мы использовали мутант ячменя *albostrians*, лишенный хлоропластных рибосом, и, следовательно, пластидного синтеза белка, который необходим для появления РНК-полимеразы хлоропластного кодирования.

После инкубации зеленых растений на растворе АБК на свету в течение 3 ч интенсивность транскрипции некоторых хлоропластных генов была снижена более чем в два раза. У белых растений после такой же обработки раствором АБК существенных изменений в интенсивности транскрипции не наблюдалось (рис. 4). Исходя из этих данных можно предположить, что АБК влияет, главным образом, на транскрипцию, осуществляемую РНК-полимеразой бактериального типа (хлоропластного кодирования) и не оказывает существенного влияния на РНК-полимеразу фагового типа (ядерного кодирования).

Антагонистическое действие БАП и АБК на транскрипцию хлоропластных генов

Чтобы изучить взаимодействие БАП и АБК в процессе регуляции транскрипции хлоропластных генов, был проведен ряд экспериментов, в которых после этапа предынкубации листьев на воде проводилась их обработка БАП и АБК по отдельности и совместно (рис. 5). Эти опыты проводились при освещении 270 мкмоль квантов $м^{-2}с^{-1}$, интенсивность транскрипции сравнивалась в апикальных сегментах листьев. В данной постановке эксперимента АБК полностью снимала активирующее действие БАП на транскрипцию хлоропластных генов. Таким образом, обнаружен антагонизм БАП и АБК в регуляции транскрипции пластидных генов в листьях ячменя.

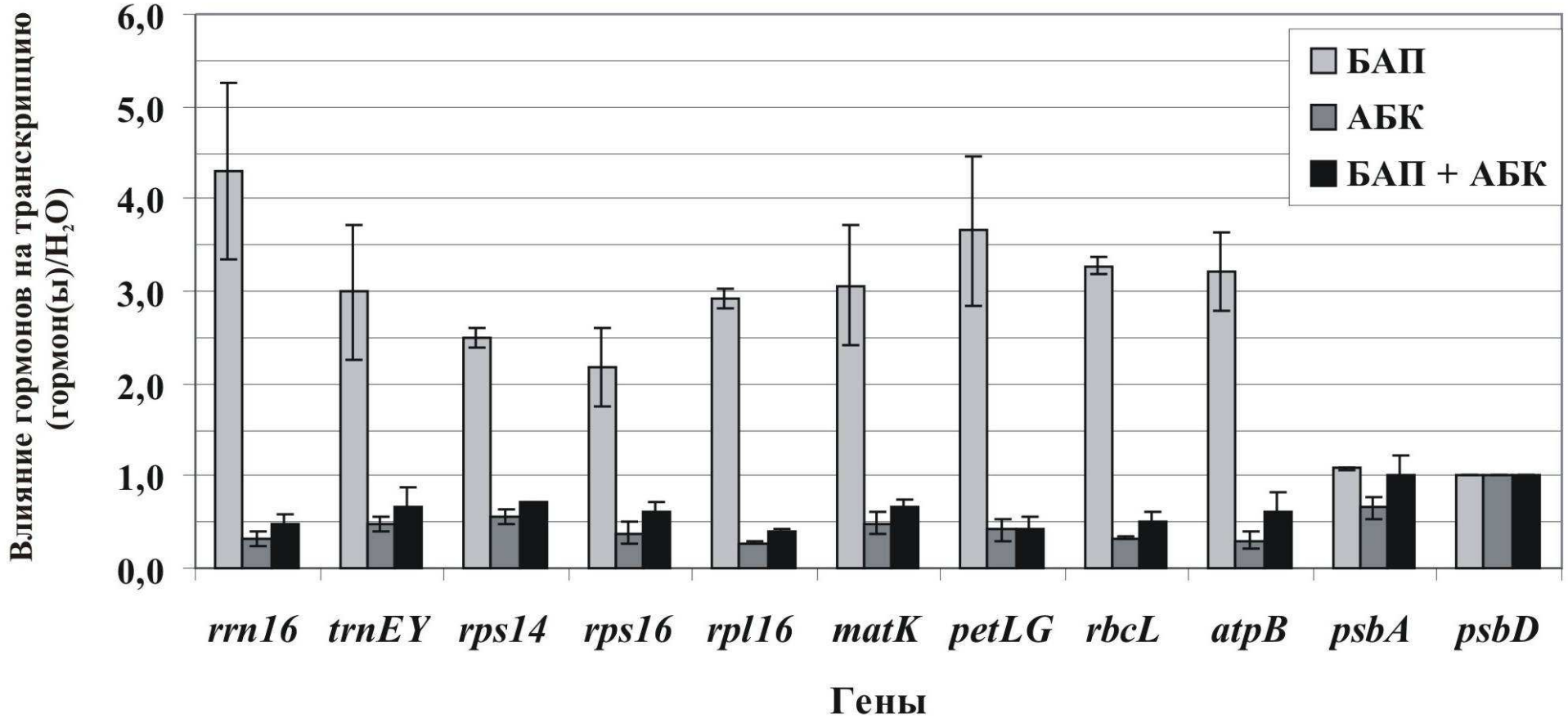

Рисунок 5. Антагонистическое действие БАП и АБК в процессе регуляции транскрипции хлоропластных генов. Срезанные листья 9-дневных растений инкубировали 3 часа на растворе БАП, АБК или их смеси после 24-часовой предынкубации на воде на свету (270 мкмоль квантов $м^{-2}с^{-1}$). На диаграмме представлены отношения значений интенсивности транскрипции вариантов, обработанных гормонами, к контрольным водным вариантам. Бары отображают стандартные отклонения.

Влияние метилжасмоната на транскрипцию хлоропластных генов

Поскольку биогенез хлоропластов может регулироваться также и другими фитогормонами, то представляло значительный интерес изучить участие в регуляции пластидной транскрипции таких гормонов как МеЖа, ИУК, $ГК_3$ и ЭБ. Известно, что эффект МеЖа на растение во многом сходен с действием АБК, которая является антагонистом цитокининов и активно влияет на биогенез хлоропластов. Более быстрая потеря хлорофилла под действием МеЖа происходит в более старой ткани листьев ячменя.

Инкубация в течение 24 ч срезанных листьев 9-дневных растений на растворе МеЖа на свету приводила к ингибированию интенсивности транскрипции от 2 до 8 раз всех генов, как в апикальных, так и в базальных частях листьев (рис. 6). Такое подавление транскрипции всех изучаемых генов, возможно, является неспецифичным, и, ввиду длительности обработки и высокой концентрации МеЖа, скорее всего, является следствием значительного ускорения программы старения листа. Подобное влияние МеЖа ранее наблюдалось на тотальную транскрипцию хлоропластных генов семядолей кабачка (Ananieva et al., 2007). Нами было установлено, что в листьях ячменя обработка МеЖа приводит к общему снижению транскрипции, в том числе и генов «домашнего хозяйства».

После введения периода предынкубации листьев на воде в течение 24 ч при постоянном освещении и трех часов инкубации на растворе МеЖа транскрипция многих хлоропластных генов снижалась. Ингибирование интенсивности транскрипции наблюдалось только в базальных частях листьев (рис. 7). Наиболее сильно подавлялась транскрипция генов субъединиц РНК-полимеразы бактериального типа. Кроме того, ингибировалась транскрипция почти всех генов АТФазы, *clpP*, *matK*, *ndhK*, *petLG*, *psaA*, *psaB*, *psbA*, *psbB*, *rpl16*, *rpl23-2*, *3'rps12*, *rps14*, *rps16* и *trnI* генов.

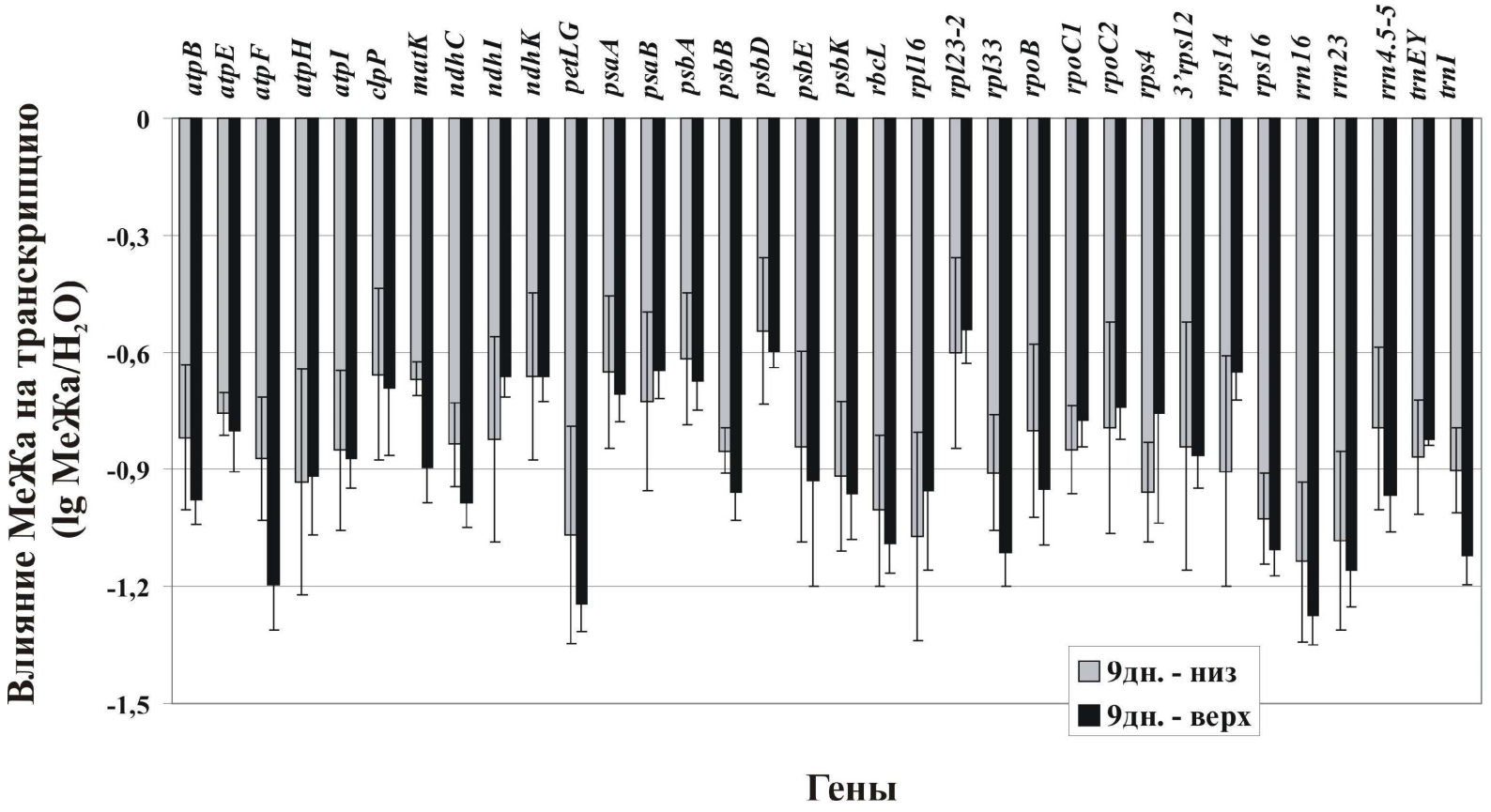

Рисунок 6. Влияние МеЖа на транскрипцию хлоропластных генов. Инкубация листьев первого яруса, срезанных с 9-дневных растений ячменя, на свету на растворе МеЖа длилась 24 часа. Интенсивность транскрипции хлоропластных генов измерялась в апикальных (верх) и в базальных (низ) сегментах листьев 9-дневных растений. Результаты представлены в виде десятичного логарифма отношения скорости транскрипции хлоропластных генов на растворе МеЖа к скорости транскрипции на воде. Значения lg выше +0.3 или ниже -0.3 соответствуют достоверной активации или ингибированию интенсивности транскрипции. Данные получены в 3-кратной повторности, барами отмечены стандартные отклонения.

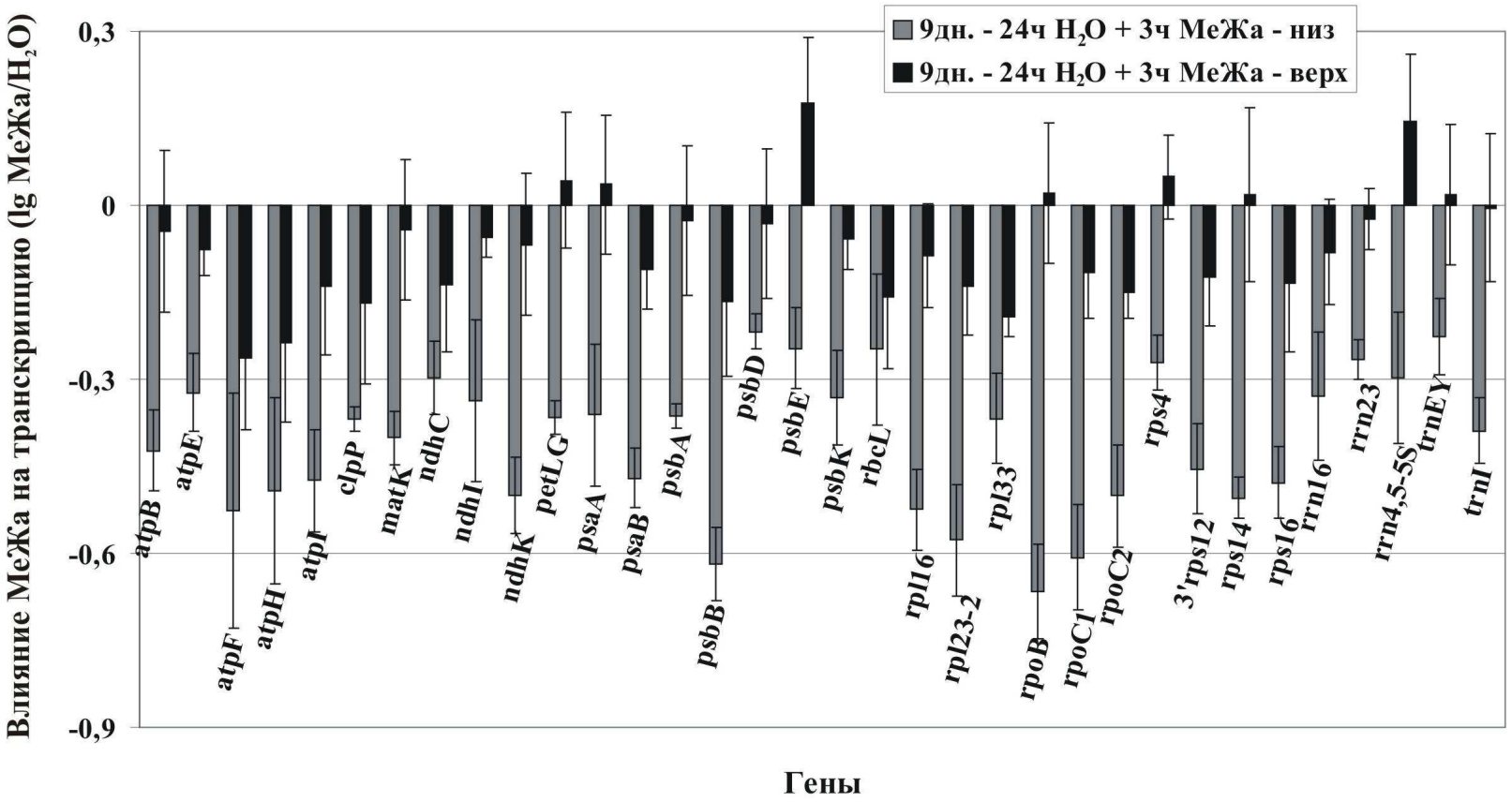

Рисунок 7. Влияние МеЖа на транскрипцию хлоропластных генов. Предынкубация срезанных листьев на свету на воде длилась 24 часа, после чего листья инкубировали на растворе МеЖа 3 часа. Интенсивность транскрипции хлоропластных генов измерялась в апикальных (верх) и в базальных (низ) сегментах листьев 9-дневных растений. Результаты представлены в виде десятичного логарифма отношения скорости транскрипции хлоропластных генов на растворе МеЖа к скорости транскрипции на воде. Значения lg выше +0.3 или ниже -0.3 соответствуют достоверной активации или ингибированию интенсивности транскрипции. Данные получены в 3-кратной повторности, барами отмечены стандартные отклонения.

Таким образом, введение этапа предынкубации срезанных листьев на воде выявило ряд генов наиболее отзывчивых на действие МеЖа, причем, ингибирование скорости транскрипции генов происходило только в более молодой ткани листа.

Так же, в отдельных экспериментах было показано, что МеЖа, также как и АБК, при совместном действии с проявляет антагонизм по отношению к цитокинину в процессе регуляции транскрипции хлоропластных генов ячменя.

Влияние ИУК, $ГК_3$ и ЭБ на транскрипцию хлоропластных генов в листьях ячменя

Полученные нами результаты показали, что ИУК, $ГК_3$ и ЭБ не оказывают яркого эффекта ни на содержание хлорофилла в листьях, ни на интенсивность транскрипции хлоропластных генов. В нашей системе при инкубации срезанных листьев ячменя на растворах ИУК и $ГК_3$ в течение 24 ч отмечалось небольшое снижение интенсивности транскрипции ряда генов в базальных сегментах листьев 9-дневных растений ячменя, тогда как ЭБ в данной системе влияния на транскрипцию не оказывал. Ранее было показано, что ИУК и $ГК_3$, при совместном применении с БАП усиливали эффект цитокинина на задержку старения листьев, а гиббереллин сам обладал подобным свойством (Кулаева, 1973). Таким образом, в нашей системе наблюдается несколько неожиданный эффект для влияния данных гормонов на процессы, проходящие в хлоропластах.

Особенности регуляции транскрипции индивидуальных хлоропластных генов фитогормонами

Изученные нами гены можно условно разделить на гены «фотосинтеза» и на гены «домашнего хозяйства». Группа генов «фотосинтеза» включает несколько подгрупп – гены, кодирующие субъединицы АТР-синтазного комплекса (*atp* гены), НАДН-дегидрогеназного комплекса (*ndh* гены), цитохром b_6/f комплекса (*pet* гены), ФС I и II (гены *psa* и *psb*, соответственно) и ген, кодирующий большую субъединицу РБФК *rbcL*. Транскрипция генов «фотосинтеза» оказалась наиболее отзывчива на действие МеЖа: все изученные 17 генов достоверно снижают уровень транскрипции под действием этого гормона относительно и водного контроля и нулевой точки (транскрипция в только что срезанных первых листьях 9-дневных растений ячменя). АБК также оказывает довольно сильное ингибирующее действие на транскрипцию генов этой группы, скорость транскрипции не снижается достоверно относительно

нулевой точки только у 5 генов (*atpB*, *psaA*, *ndhI*, *psaB* и *psbD*) этой группы. Ауксин и гиббереллин слабее действуют на интенсивность транскрипции этой группы генов. ИУК достоверно подавляет транскрипцию только трех (*atpF*, *ndhC* и *rbcL*) генов, а $ГК_3$ – двух (*atpF* и *psbA*) генов относительно нулевой точки.

Группу генов «домашнего хозяйства» можно условно разделить на следующие подгруппы: гены, кодирующие белки большой и малой субъединиц рибосом (*rpl* и *rps* гены), белки субъединиц РНК-полимеразы бактериального типа (*rpo* гены), гены, кодирующие рРНК (*rrn* гены) и тРНК (*trn* гены), с также гены *matK* и *clpP*, кодирующие интронную матуразу и протеазу, соответственно. В отличие от генов «фотосинтеза» не все гены «домашнего хозяйства» подавляются достоверно относительно водного контроля и нулевой точки – повышение транскрипции всех изученных генов, кодирующих транспортные и рибосомные РНК при инкубации на воде настолько велико, что и АБК и даже МеЖа только стабилизируют уровень транскрипции, не снижая его относительно нулевой точки. Таким образом, из 17 генов «домашнего хозяйства» транскрипция только двенадцати подавляется МеЖа. Из них 9 генов (кроме *rpl23-2*, *rps4* и *3'rps12*) достоверно снижают свою транскрипцию под действием АБК. Транскрипция только одного гена – *rps14* снижается под действием ауксина и гиббереллина.

Различия в действии гормонов на разные группы хлоропластных генов еще раз подчеркивает индивидуальный характер регуляции транскрипции. Изученные нами гормоны по-разному регулируют транскрипцию разных генов. Кроме того, даже гены, входящие в состав одного оперона, могут иметь разный ответ на действие гормонов, что свидетельствует о наличие тонких, еще не изученных механизмов регуляции транскрипции хлоропластных генов.

ВЫВОДЫ

1. Свет необходим для активации цитокинином транскрипции хлоропластных генов. Наиболее критичным является 24 ч период предынкубации листьев ячменя на воде. Отсутствие света в этот период снимает действие цитокинина на транскрипцию пластидных генов. Выделены две группы генов, требующих различных условий освещения для активации транскрипции цитокинином. Для цитокинин-активируемой транскрипции *rrn16*, *rrn23*, *rps4*, *rps16*, *rbcL* , *atpB* и *ndhC* генов свет требуется только в период предынкубации, а для активации транскрипции *trnEY*, *rps14*, *rpl16*, *matK*, *petD* и *petLG* генов свет необходим как в ходе предынкубации на воде, так и при инкубации листьев на цитокинине.

2. Свет разной интенсивности во время выращивания растений и инкубации срезанных листьев на воде по-разному влияет на транскрипцию хлоропластных генов в листьях 9-дненых растений ячменя: свет с интенсивностью 270 мкмоль квантов $м^{-2}с^{-1}$ и темнота подавляют транскрипцию, тогда как свет с интенсивностью 130 мкмоль квантов $м^{-2}с^{-1}$ ее активирует.

3. Абсцизовая кислота и метилжасмонат подавляют транскрипцию хлоропластных генов в отделенных от растения листьях ячменя. При ингибировании транскрипции АБК свет не играет важной роли.

4. Установлен антагонистический характер взаимодействия цитокинина и АБК, а так же цитокинина и метилжасмоната в регуляции транскрипции пластидных генов.

5. Применение в run-on экспериментах *albostrians* мутанта ячменя, у которого отсутствует РНК-полимераза хлоропластного кодирования, позволяет высказать предположение, что регуляция транскрипции пластидных генов абсцизовой кислотой осуществляется, главным образом, через влияние на РНК-полимеразу бактериального типа.

6. Транскрипция пластидных генов, являясь важным элементом регуляции биогенеза хлоропластов, находится под контролем как экзогенных (свет), так и эндогенных (цитокинины, АБК, жасминовая кислота, ауксин, гиббереллин) факторов. Взаимодействие этих регуляторных факторов и определяет развитие хлоропластов.

Список работ по материалам диссертации

1. **Зубо Я.О., Ямбуренко М.В., Селиванкина С.Ю., Зубкова Н.К., Кулаева О.Н., Кузнецов В.В.** (2005) Цитокинин и свет участвуют в регуляции транскрипции хлоропластных генов. В сб. тезисов: *Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия*. Вологда, 19-23 декабря, с. 69.

2. **Зубо Я.О., Ямбуренко М.В., Кравцов А.К., Алейникова А.Ю., Кузнецов В.В.** (2005) Некоторые аспекты регуляции цитокинином транскрипции хлоропластных генов. В сб. тезисов: *Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия*. Вологда, 19-23 декабря, с. 69.

3. **Зубо Я.О., Селиванкина С.Ю., Ямбуренко М.В., Зубкова Н.К., Кулаева О.Н., Кузнецов В.В.** (2005) Цитокинины активируют транскрипцию хлоропластных генов. *Докл. Акад. Наук*, **400(3)**, 396-400.

4. **Зубо Я.О., Ямбуренко М.В., Кравцов А.К., Алейникова А.Ю., Лире К., Кулаева О.Н., Бернер Т., Кузнецов В.В.** (2006) Цитокинины участвуют в регуляции транскрипции генов органелл растений. Материалы *Всероссийской научной конференции*. Иркутск, с. 48-52.

5. **Кузнецов В.В., Ямбуренко М.В., Зубо Я.О.** (2006) Гормональная регуляция экспрессии хлоропластного генома. В сб. тезисов: *Сигнальные системы клеток растений: роль в адаптации и иммунитете*. Казань, 27-30 июня, с. 64.

6. **Zubo Y., Yamburenko M.V., Kulaeva O.N., Liere K., Börner Th., Kusnetsov V.V.** (2006) Cytokinins participate in the regulation of chloroplast gene transcription. 3rd International Symposium “Signals, Sensing and Plant primary metabolism”. Potsdam, Germany, 26-29 April, p. 145.

7. **Зубо Я.О., Ямбуренко М.В., Кравцов А.К., Алейникова А.Ю., Селиванкина С.Ю., Зубкова Н.К., Кудрякова Н.В., Лире К., Кулаева О.Н., Бернер Т., Кузнецов В.В.** (2007) Регуляция транскрипции хлоропластных генов

цитокинином. В сб. тезисов: *Современная физиология растений: от молекул до экосистем*. Сыктывкар, 18-24 июня, с. 187-188.

8. **Ямбуренко М.В., Зубо Я.О., Кулаева О.Н., Оельмюллер Р., Кузнецов В.В.** (2007) Регуляция транскрипции генов рРНК цитокинином и поиск цитокинин-зависимых цис-элементов в промоторной зоне рДНК ячменя. В сб. тезисов: *Современная физиология растений: от молекул до экосистем*. Сыктывкар, 18-24 июня, с. 227-229.

9. **Загоскина Н.В., Пинаев А.С., Алявина А.К., Ямбуренко М.В., Гладышко Т.О., Кузнецов В.В., Фаттахов С.Г., Коновалов А.И.** (2007) Активация мелафеном роста и накопления фенольных соединений в каллусной культуре чайного растения не связана с его возможной цитокининовой. *Докл. Акад. Наук*, **413(6)**, 841-844.

10. **Ямбуренко М.В., Зубо Я.О., Бёрнер Т., Кузнецов В.В.** (2008) Интенсивность транскрипции хлоропластных генов в стареющих листьях ячменя регулируется разными фитогормонами В сб. тезисов*: Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений*. Екатеринбург, 6 – 11 октября, с. 461.

11. **Zubo Y.O., Yamburenko M.V., Selivankina S.Y., Shakirova F.M., Avalbaev A.M., Kudryakova N.V., Zubkova N.K., Liere K., Kulaeva O.N., Kusnetsov V.V., Börner T.** (2008) Cytokinin stimulates chloroplast transcription in detached barley leaves. *Plant Physiol*., **148(2)**, 1082-1093.

12. **Зубо Я.О., Ямбуренко М.В., Кравцов А.К., Кулаева О.Н., Кузнецов В.В.** (2009) Отделенные от растений листья ячменя как экспериментальная модель для изучения регуляции цитокинином транскрипции пластидных генов. *Физиология растений*. – (Принята в печать).