

*На правах рукописи*



**Мякушина  
Юлия Александровна**

**УЧАСТИЕ ГЕНОВ *LSU* В КОНТРОЛЕ ЦВЕТЕНИЯ  
*ARABIDOPSIS THALIANA***

03.00.12 – физиология и биохимия растений

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2009

Работа выполнена в лаборатории сигнальных систем контроля онтогенеза им. акад. М.Х. Чайлахяна Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва и в Институте молекулярной физиологии растений им. Макса Планка, г. Гольм, Германия

**Научные руководители:**

доктор биологических наук,  
профессор  
кандидат биологических наук

Романов Георгий Александрович  
Никифорова Виктория Юлиановна

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук,  
профессор  
доктор биологических наук

Хавкин Эмиль Ефимович  
Носов Александр Владимирович

**Ведущая организация:**

Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится 22 декабря 2009 г. в 11 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: (495) 977-80-18, e-mail: ifr@ippras.ru

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

Автореферат разослан 21 ноября 2009 г.

Ученый секретарь  
совета по защите докторских  
и кандидатских диссертаций,  
кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** В последние годы достигнут большой прогресс в изучении молекулярных механизмов роста и развития растений. Обнаружены гены, активность которых необходима для протекания важнейших физиологических процессов в растительном организме (Лутова и др., 2000).

В настоящее время одним из основных подходов в исследовании механизмов протекания и регуляции физиологических и биохимических процессов растений является использование трансгенных растений с избирательным подавлением «работы» индивидуальных или групп генов методами инсерционного мутагенеза и РНК-интерференции (RNAi) (Krysan et al., 1999; Matthew, 2004).

Наиболее популярным модельным объектом в изучении биологии развития растений является *Arabidopsis thaliana* (Ежова и др., 2003). В 2000 году было полностью завершено секвенирование его генома (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), что упростило работу по идентификации новых генов и генетических сетей, вовлеченных в различные стадии роста и развития растений.

Несмотря на то, что растения *A. thaliana* интенсивно изучаются в течение десятков лет, в настоящее время идентифицированы функции лишь части его генов. В соответствии с базой данных Gene Ontology участие в определенных биологических процессах обнаружено для ~50% генов, а для ~49% генов найдены клеточные компоненты, с которыми могут быть связаны их белковые продукты (Haas et al., 2005; Swarbreck et al., 2008).

Среди более чем 25000 белок-кодирующих генов арабидопсиса (The *Arabidopsis* Information Resource, TAIR) ген At3g49580, получивший название *LSU1*, недавно привлек наше внимание в связи с участием в ответе на дефицит серы (Nikiforova et al., 2005). Однако до сих пор этот и гомологичные ему гены *A. thaliana* никем специально не изучались.

**Цели и задачи исследования.** Целью данного исследования являлось изучение возможной роли *LSU*-генов в онтогенезе растений арабидопсиса.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести структурный анализ генов *LSU A. thaliana* и кодируемых ими белков методами биоинформатики.
2. Провести морфофизиологический анализ инсерционных мутантов по генам *LSU*.

3. Получить мутант с одновременным подавлением экспрессии нескольких генов *LSU* с использованием технологии RNAi.
4. Провести морфофизиологический анализ RNAi-мутанта.
5. Проанализировать экспрессию генов, потенциально ответственных за формирование фенотипических признаков, подвергшихся изменениям у инсерционных мутантов и RNAi-мутанта *A. thaliana*. Найти корреляции с изменениями фенотипа.

**Научная новизна работы.** Впервые проведен анализ аминокислотных последовательностей белков семейства LSU методами биоинформатики и обнаружено наличие протяженных участков, формирующих альфа-спирали, а также потенциальных двухспиральных доменов димеризации coiled-coil. С помощью биоинформатических программ предсказана ядерная локализация белков LSU.

Впервые проведены молекулярно-физиологические исследования мутантных линий арабидопсиса по генам *LSU*. В ходе работы обнаружено, что подавление экспрессии генов *LSU* вызывает позднее зацветание, подавление роста главного цветоноса, а также нарушение развития цветков и формирования семян у *A. thaliana*.

Впервые обнаружено, что гены *LSU* необходимы для координированной работы генов АВСЕ-модели цветения.

**Практическое значение работы.** Полученные результаты имеют как фундаментальный характер, так и предоставляют возможность практического применения. Данные фундаментального характера о свойствах *lsu*-мутантов могут быть использованы при подготовке лекционного материала для чтения курсов физиологии, биохимии и молекулярной биологии растений, а также послужить базой для дальнейших исследований функции генов семейства *LSU*. В перспективе полученные результаты могут найти применение в генно-инженерной биотехнологии при создании растений с определенными хозяйственно-ценными признаками и измененными характеристиками цветения. Цветение – один из ключевых процессов в жизни растений, оно определяет продуктивность многих с/х культур. Поэтому управление цветением является перспективным подходом для повышения их урожайности.

**Апробация работы.** Результаты исследований по теме диссертации были представлены на 7-й Международной конференции «Sulfur metabolism in plants» (Варшава, 2008), на Международной научной конференции «Проблемы биоэкологии и пути их решения (Вторые Ржавитинские чтения)» (Саранск,

2008), на Международной научной конференции «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях крайнего севера» (Апатиты, 2009), на 13-й Международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2009), на Республиканской конференции молодых ученых «Развитие биотехнологии в Республике Мордовия» (Саранск, 2009), на VI-й Международной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, 2009).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе в журнале Доклады РАН из списка ВАК.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Материалы диссертации изложены на 150 страницах машинописного текста, содержат 7 таблиц и 39 рисунков. Список литературы включает 240 источников, из которых зарубежной литературы – 225.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объектами исследования** являлись трансформированные и нетрансформированные факультативно длиннодневные растения *A. thaliana* экотипа Columbia-0:

1. Нетрансформированный контроль – растения дикого типа (WT).
2. Трансформированный контроль – растения с введенным вектором pK7GWIWG2(II) без целевого гена.
3. Три линии инсерционных мутантов *lsu2*, *lsu3* и *lsu4*, мутации которых были вызваны интеграцией Т-ДНК вектора pROK2 в 5'- нетранслируемый регион гена *LSU2* (SALK\_031648) и в экзон гена *LSU4* (SALK\_069114), а также интеграцией Т-ДНК вектора pAC161 в промоторную область гена *LSU3* (GABI\_207B03). Семена инсерционных мутантов *lsu2* и *lsu4* получены из Nottingham Arabidopsis Stock Center (Великобритания). Инсерционный мутант *lsu3* был произведен в рамках проекта «GABI-Kat» (Rosso et al., 2003) и получен от Bernd Weisshaar (MPI for Plant Breeding Research; Cologne, Германия).
4. Мутант *LSU1-RNAi* – растения с введенным вектором pK7GWIWG2(II), содержащим фрагменты гена *LSU1*.

**Условия выращивания растений.** Дикий тип и мутантные растения *A. thaliana* выращивали в почве при температуре 22°C днем и 18°C ночью в условиях длинного дня (ДД, 16 ч света и 8 ч темноты) и короткого дня (КД, 8 ч света и 16 ч темноты). Для освещения использовали флуоресцентные лампы с интенсивностью света 120 мкмоль м<sup>-2</sup> сек<sup>-1</sup>. Сроки зацветания растений арабидопсиса определяли путем подсчета числа листьев в розетке 20 растений после появления первого бутона (Koornneef et al., 1991). Для морфологического анализа было использовано также по 20 растений каждой мутантной линии и контрольных растений.

**Получение мутанта *LSU1-RNAi*.** Мутант *LSU1-RNAi* получен с использованием механизма РНК-интерференции (Hannon, 2002) в результате интегрирования в геном *A. thaliana* экспрессируемой ДНК под конститутивным промотором 35S CaMV, содержащей два повторяющихся фрагмента гена *LSU1* в смысловой и антисмысловой ориентации. Для клонирования был взят фрагмент гена *LSU1* длиной 272 нуклеотида (с 9 по 330 нуклеотид), располагающийся в области максимальной гомологии нуклеотидных последовательностей генов семейства *LSU* (70-89%), определенной путем выравнивания нуклеотидных последовательностей генов *LSU* с помощью программы ClustalW2 (Larkin et al., 2007). При создании *LSU1-RNAi* мутанта была использована технология клонирования Gateway (Invitrogen), которая основана на реакциях сайт-специфической рекомбинации бактериофага λ.

**Трансформация арабидопсиса агробактериями.** Для трансформации использовали *Agrobacterium tumefaciens* штамма GV3101, несущего бинарный вектор pK7GWIWG2(II) с целевым геном или без него. Трансформацию растений *A. thaliana* в возрасте 5-6 недель проводили методом вакуумной инфильтрации (Bechtold et al., 1993).

**Количественная ПЦР в реальном времени.** В качестве растительного материала для выделения РНК использовали надземную часть растений, находящихся на стадии цветения после формирования первых 5-10 цветков. Количественную ПЦР в реальном времени проводили на системе ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Великобритания) с использованием SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Результаты ПЦР анализировали с помощью программного обеспечения SDS 2.0 (Applied Biosystems). Эффективность ПЦР определяли с помощью программы LinRegPCR (Ramskers et al., 2003). Содержание индивидуальных мРНК рассчитывали относительно уровня мРНК гена *UBIQUITIN 10 (UBQ10)*.

**Компьютерные методы анализа.** Множественные выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей и определение степени их сходства осуществляли с использованием программы ClustalW2 (Larkin et al., 2007). Анализ вторичной структуры белков LSU выполняли с применением программы GOR4 (Combet et al., 2000). Поиск coiled-coil доменов в последовательностях белков LSU проводили с использованием программы MULTICOIL (Wolf et al., 1997). Предсказание субклеточной локализации белков LSU осуществляли при помощи биоинформатических программ BaCelLo (Pierleoni et al., 2006), CELLO (Yu et al., 2006), MultiLoc (Hoeglund et al., 2006) и SubLoc (Chen et al., 2006). Анализ промоторных последовательностей генов *LSU* выполняли с использованием программ *Arabidopsis thaliana* Map (AthaMap) (Bülow et al., 2009) и *Arabidopsis* Gene Regulatory Information Server (AGRIS) (Davuluri et al., 2003).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### **1. Анализ генов семейства *LSU* и кодируемых ими белков средствами биоинформатики.**

С помощью программы BLAST базы данных TAIR дополнительно к *LSU1* было выявлено ещё три близких по структуре гена, которые вместе образуют небольшое семейство: *LSU1* (At3g49580), *LSU2* (At5g24660), *LSU3* (At3g49570) и *LSU4* (At5g24655).

Относительно короткие гены *LSU1*, *LSU2*, *LSU3* и *LSU4*, длиной 509, 556, 492 и 525 нуклеотидов соответственно, не содержат интроны и расположены попарно на третьей (*LSU1* и *LSU3*) и пятой (*LSU2* и *LSU4*) хромосомах *A. thaliana*. Они кодируют белки соответствующей длины в 94, 94, 97 и 92 аминокислоты, молекулярной массы 10.6-11.2 кДа (рис. 1).

Анализ нуклеотидных последовательностей генов семейства *LSU* и аминокислотных последовательностей, кодируемых этими генами белков, с помощью программы ClustalW2 показал, что их гомология составляет 63-77% для генов и 60-89% для белков. Это с большой степенью вероятности указывает на то, что исследуемые гены выполняют сходную функцию у *A. thaliana*.

Компьютерное предсказание вторичной структуры белков семейства *LSU*, выполненное с использованием программы GOR4, выявило наличие протяженных участков, формирующих альфа-спирали. Дальнейший анализ аминокислотных последовательностей с помощью программы MULTICOIL

установил наличие потенциальных двухспиральных доменов димеризации coiled-coil, богатых остатками глутаминовой кислоты (Glu/E) (рис. 1).

```

LSU4 MGKGGN VVMVAASEVEELRQNGEMEKAVEEMRKEMLQLWRRTQVAAEEAEHLCSQLAEL 60
LSU2 MGKGGN NYVTVAASEVDELRRNGEMEKAVEEMKKEMLQLWRRTQVAAEEAEERLCSQLAEL 60
LSU3 MGKGG GYVTVAASEVEELRRNGELEREMEEMKKEMVQLWRRTVVAAEEAEERLCSQLAEL 60
LSU1 MANRGGC VTVAAEEMDELRRRNIELSREVAEMKTEMIKLWQRTVVAEEAEELCSQLAEL 60
      *.: * . * ***.:*:***:* *.: : *.:*.:*.:* *.:*.:*.:*.:*
      *.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*

LSU4 EAESLDQARDYHTRIIFLTNQLSRFSSDSASP----- 92
LSU2 EAESLDQARDYHSRIIFLMNELSRLSSDSASASP--- 94
LSU3 EVESLDQARDYHSRIVFLMDQISRLSSSSLEVVVTNS 97
LSU1 EVESLEQARDYHDRMLFLMDQISRLSSSSVVSSS--- 94
      *.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*.:*

```

**Рис. 1.** Аминокислотные последовательности белков семейства LSU *A. thaliana*. Области белков, образующие альфа-спирали выделены голубым цветом. Потенциальные coiled-coil домены выделены красным цветом. (\*) - идентичные аминокислотные остатки; (:) – консервативные аминокислотные замены; (.) – полуконсервативные аминокислотные замены. Значения в конце строк соответствуют номеру последнего в строке аминокислотного остатка.

Coiled-coil домены состоят из повторов, представляющих собой гептады вида «abcdefg». При этом в положениях «a» и «d» располагаются гидрофобные, а в положениях «e» и «g» – полярные аминокислотные остатки (Lupas, 1996; Mason, Arndt, 2004). Такой повторяющийся мотив из 7-ми аминокислотных остатков характерен для белков, способных к образованию сверхспиралей, состоящих из двух и более альфа-спиралей (Moutevelis, Woolfson, 2009).

Белки с короткими coiled-coil доменами, содержащими около 6-7 гептад, характерны для семейств транскрипционных факторов арабидопсиса «лейциновая застежка» (leucine zipper) (bZIP) и «спираль-петля-спираль» (helix-loop-helix) (bHLH) (Jakoby et al., 2002; Toledo-Ortiz et al., 2003). Таким образом, обнаружение коротких потенциальных coiled-coil доменов в аминокислотных последовательностях всех белков семейства LSU указывает на возможность осуществления ими межбелковых взаимодействий (т.е. формирования белковых димеров), а также на вероятное участие в регуляции экспрессии генов.



Предположение о вовлеченности белков семейства LSU *A. thaliana* в регуляцию генной экспрессии подкрепляется предсказанием их ядерной локализации с помощью компьютерных программ BaCellO, CELLO, MultiLoc и SubLoc.

## **2. Анализ промоторных последовательностей генов LSU.**

Анализ промоторных областей (длиной 1500 нуклеотидов) генов LSU с использованием программ *Arabidopsis thaliana* Map (AthaMap) и *Arabidopsis* Gene Regulatory Information Server (AGRIS) выявил наличие предполагаемых сайтов связывания для ряда транскрипционных факторов, таких, как: LEAFY (LFY), SEPALLATA1 (SEP1), SEPALLATA 4 (SEP4), AGAMOUS (AG), AGAMOUS-LIKE 15 (AGL15) и LEAFY COTYLEDON 2 (LEC2).

Белковый фактор LFY распознает 5'-CCANTG-3' ДНК-участки (N – аденин (A), тимин (T), гуанин (G) или цитозин (C)) (William et al., 2004). Его основная функция состоит в индукции цветения. Кроме того, после инициации перехода арабидопсиса к репродуктивной фазе развития, LFY активирует работу генов, формирующих органы цветка (Weigel and Nilsson, 1995; Lohmann, Weigel, 2002).

Транскрипционные факторы SEP1 и SEP4, которые связываются с ДНК в соответствующих областях 5'-TT(A/T)CC(A/T)<sub>4</sub>NNGG(A/T/C)(A/T)<sub>2</sub>-3' и 5'-TT(A/T)C(C/T)A(A/T)<sub>4</sub>T(A/G)G(A/T)AA-3' (Huang et al., 1995, 1996), участвуют в регуляции развития чашелистиков, лепестков, тычинок и пестика, а также выполняют важную роль в детерминации флоральной меристемы (Pelaz et al., 2000; Ditta et al., 2004).

Транскрипционный фактор AG связывается с последовательностями ДНК 5'-NN(A/T)NCCA(A/T)<sub>4</sub>T(A/G)G(A/T)(A/T)AN-3' (Huang et al., 1993) и определяет развитие тычинок и пестика в цветках арабидопсиса, а также поддерживает детерминированность флоральной меристемы (Jack, 2004; Vijayraghavan et al., 2005).

Главная роль генов *AGL15* и *LEC2* заключается в регуляции процессов развития и созревания семян (Perry et al., 1996; Santos-Mendoza et al., 2008). Белковые факторы AGL15 и LEC2 осуществляют регуляцию транскрипции, связываясь с 5'-TTАСТАТАТАТАGТАА-3' и 5'-САТGСА-3' последовательностями в промоторных областях генов арабидопсиса (Tang, Perry, 2003; Braybrook et al., 2006).

Следовательно, согласно результатам анализа промоторов, функция генов семейства *LSU* может быть связана со следующими процессами, происходящими в онтогенезе *A. thaliana*: переходом к цветению, развитием цветков, а также формированием семян.

### **3. Морфофизиологические особенности инсерционных мутантов *lsu*, выращенных в условиях КД.**

Функциональная роль индивидуального гена в организме особенно четко проявляется при подавлении его экспрессии. В этой связи в современной физиологии и биохимии растений активно применяются методы так называемой функциональной генетики, которые позволяют подавить экспрессию исследуемого гена и таким образом приблизиться к пониманию его роли в онтогенезе растения.

Инсерционный мутагенез является одним из широко используемых способов «выключения» гена. Подавление экспрессии гена у инсерционных мутантов происходит в результате встраивания протяженной чужеродной ДНК в его последовательность.

При изучении функции генов семейства *LSU* было использовано три инсерционных мутанта *lsu2*, *lsu3* и *lsu4*, в которых соответственно нарушена транскрипция генов *LSU2*, *LSU3* и *LSU4*.

В работе были исследованы рост и развитие мутантов *lsu2*, *lsu3* и *lsu4* в различных фотопериодических условиях: ДД (длинный день) или КД (короткий день).

Анализ развития мутантных растений не выявил каких-либо явных различий в скорости прорастания семян, образовании проростков, формировании корневой системы и листьев по сравнению с диким типом *A. thaliana*.

Изменения в развитии мутантных линий проявлялись при переходе растений к цветению и выражались в различии времени зацветания, изменении архитектуры соцветий и нарушении развития репродуктивных органов арабидопсиса. При этом сроки зацветания исследуемых мутантных растений варьировали в зависимости от условий выращивания.

В условиях ДД не было выявлено существенных различий в скорости зацветания мутантных растений по сравнению с диким типом (табл. 1).

Значительное запаздывание перехода к цветению исследуемых мутантов было обнаружено в условиях КД. Инсерционный мутант *lsu3* зацвел на 22 дня

позднее, чем дикий тип. Еще более значительные различия во времени зацветания были выявлены у мутантов *lsu2* и *lsu4*, которые переходили к цветению на 36-37 дней позже дикого типа *A. thaliana*.

Данные в таблице свидетельствуют о важности функционирования генов *LSU* при переходе арабидопсиса к цветению в неиндуктивных для зацветания условиях КД.

**Табл. 1.** Сроки зацветания мутантов *lsu2*, *lsu3* и *lsu4* по сравнению с диким типом *A. thaliana* в условиях короткого дня (КД) и длинного дня (ДД)

Растение	ДД		КД	
	Время зацветания (число дней) <sup>a</sup>	Число листьев в розетке <sup>b</sup>	Время зацветания (число дней)	Число листьев в розетке
Дикий тип	27,5 ± 1,2	12,2 ± 1,2	73 ± 2,8	61,2 ± 2,4
<i>lsu2</i> мутант	28,2 ± 1,4	13,6 ± 1,3	109 ± 4,1	71,8 ± 3,1
<i>lsu3</i> мутант	28,3 ± 1,3	13,7 ± 1,2	91 ± 3,1	68,1 ± 2,6
<i>lsu4</i> мутант	28,7 ± 1,3	14,1 ± 1,1	110 ± 4,5	74,0 ± 2,5

<sup>a</sup> Данные представляют среднее значение и стандартное отклонение числа дней от посадки до формирования первого бутона у 20-ти растений.

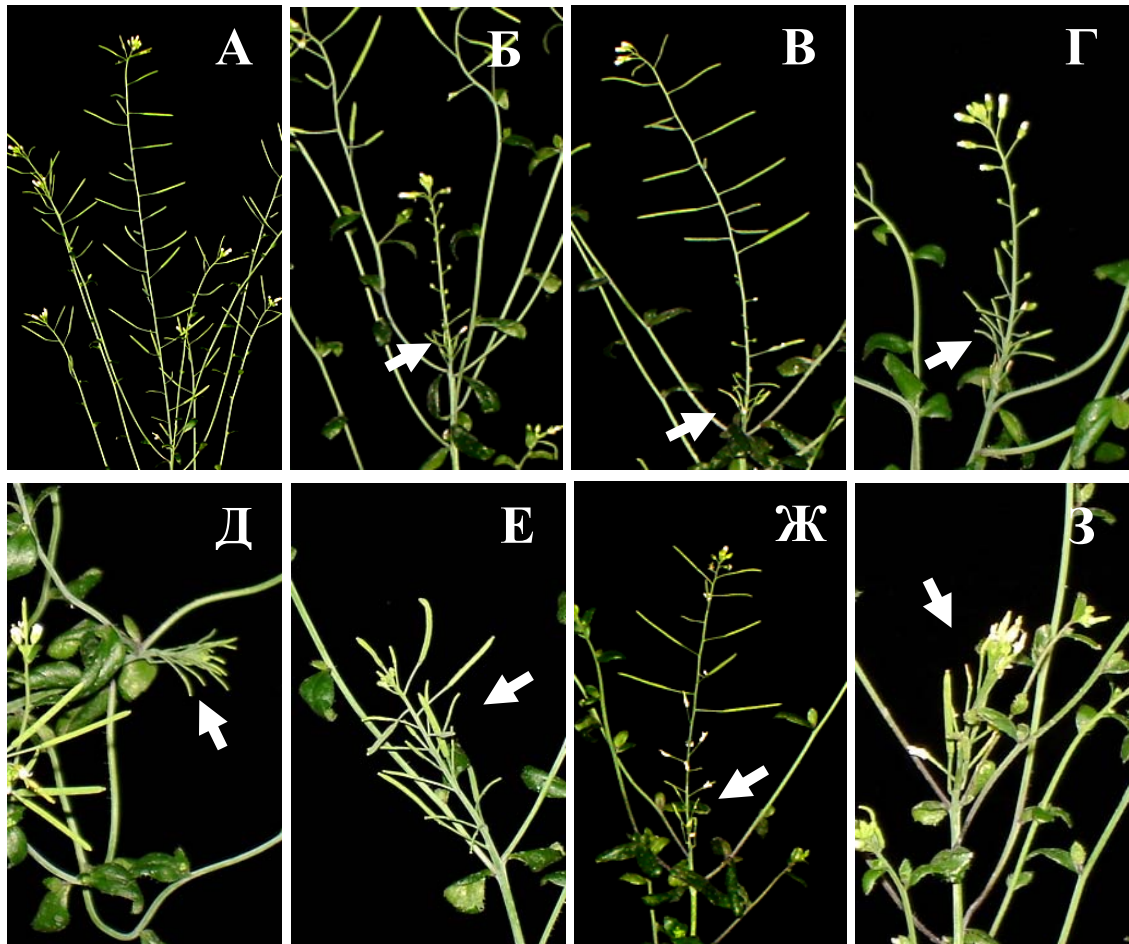
<sup>b</sup> Данные представляют среднее значение и стандартное отклонение числа листьев в розетке у 20-ти растений.

По сравнению с диким типом, в условиях КД инсерционные мутанты *lsu2*, *lsu3* и *lsu4* проявляли заметные фенотипические отличия.

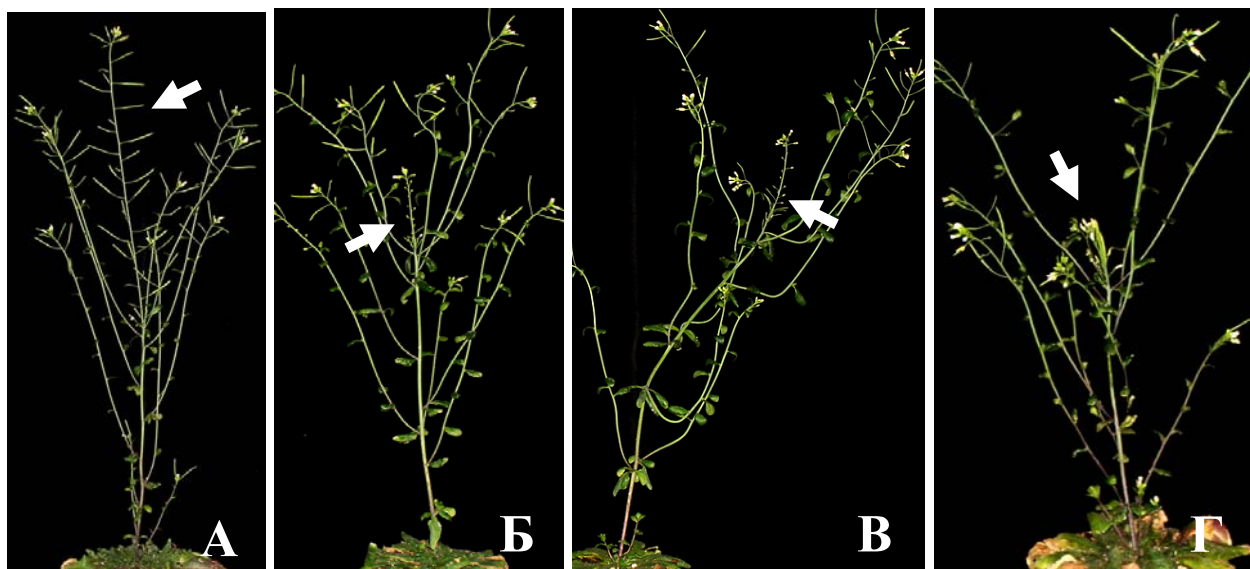
На ранней стадии цветения у 85% мутантов *lsu2* и 80% мутантов *lsu3* и *lsu4* наблюдалось подавление роста главного цветоноса, вследствие чего первые 5-10 цветков на центральной оси соцветия образовывали плотные кластеры (рис. 2 Б, В, Г). При дальнейшем развитии мутантов *lsu2* рост главного цветоноса восстанавливался и расстояния между цветками, образованными на поздней стадии цветения, выравнивались (рис. 3 Б, В). Среди мутантов *lsu2* и *lsu4* наблюдалось как восстановление (рис. Г, Ж), так и отсутствие восстановления роста главного цветоноса (рис. 3 Д, Е, З). При этом, средняя высота центральной оси соцветия инсерционных мутантов *lsu* была в 1,5-2 раза меньше, чем у дикого типа *A. thaliana* (рис. 4 Б, В, Г).



**Рис. 2.** Подавление роста главного цветоноса инсерционных мутантов *lsu2*, *lsu3* и *lsu4* *A. thaliana* на начальных стадиях цветения в условиях короткого дня. А – дикий тип; Б – мутант *lsu2*; В – мутант *lsu3*; Г – мутант *lsu4*.



**Рис. 3.** Рост главного цветоноса инсерционных мутантов *lsu2*, *lsu3* и *lsu4* *A. thaliana* на поздних стадиях цветения в условиях короткого дня. А – дикий тип; Б, В – мутант *lsu2*; Г, Д, Е – мутант *lsu3*; Ж, З – мутант *lsu4*. Стрелками показаны кластеры, состоящие из цветков и стручков.



**Рисунок 4.** Архитектура соцветий инсерционных мутантов *lsu2*, *lsu3* и *lsu4*, выращенных в условиях короткого дня. А – дикий тип *A. thaliana*; Б – мутант *lsu2*; В – мутант *lsu3*; Г – мутант *lsu4*. Главные цветоносы показаны стрелками.

Причина подавления роста главного цветоноса инсерционных мутантов *lsu*, возможно, заключалась в изменении гормонального гомеостаза арабидопсиса, что выражалось также в позднем зацветании мутантных линий.

Кроме представленных выше фенотипических изменений, в условиях КД инсерционные мутанты *lsu2*, *lsu3* и *lsu4* характеризовались образованием дефектных цветков на главной оси соцветия. В отличие от цветков растений дикого типа, дефектные цветки мутантов не раскрывались и оставались в виде бутонов. Первые 3-4 цветка инсерционных мутантов *lsu2* и *lsu4*, образованные на начальной стадии цветения, имели нормальные чашелистики, но редуцированные, неразвитые лепестки, тычинки и пестик (рис. 5 Б, З). Такие нераскрывшиеся цветки не образовывали стручков и со временем просто опадали. Пестик первых 3-4 цветков инсерционного мутанта *lsu3* развивался нормально, но при этом разрастания завязи и формирования стручков не происходило (рис. 5 Д, Е). Цветки мутантных растений *lsu*, формирующиеся позднее, наряду с нормальными чашелистиками, неразвитыми лепестками и тычинками имели объемный пестик, занимавший почти все внутреннее пространство (рис. 5 В, Ж, И). Такие aberrantные цветки формировали стручки, но не образовывали жизнеспособных семян. В то же время цветки мутантов *lsu*, сформированные на поздней стадии цветения, развивались совершенно нормально.



**Рис. 5.** Морфология цветков инсерционных мутантов *lsu2*, *lsu3* и *lsu4* *A. thaliana*. А – цветок дикого типа, находящийся на стадии бутона; Б, В, Г - цветки мутанта *lsu2*; Д, Е, Ж – цветки мутанта *lsu3*; З, И – цветки мутанта *lsu4*. Растения выращены в условиях короткого дня (кроме Г – в условиях длинного дня). На всех фотографиях бар = 200 мкм.



Подобно *lfy* и *ap1* мутантам (Weigel et al., 1992; Huala, Sussex, 1992; Schultz, Haughn, 1993; Bowman et al., 1993), у исследуемых нами растений с мутацией генов *LSU2*, *LSU3* или *LSU4* наиболее значительные нарушения в развитии цветков наблюдались в нижней части соцветия, что могло быть связано с подавлением экспрессии генов *LFY* или *APETALA1 (AP1)*.

Кроме того, гены *LFY* и *AP1*, а также *APETALA 2 (AP2)*, *APETALA 3 (AP3)*, *PISTILLATA (PI)*, *AG* и *SEP1-4* являются основными генами, регулирующими развитие цветка (Jack, 2004). Поэтому мы предположили, что формирование дефектных цветков в условиях КД у инсерционных мутантов *lsu2*, *lsu3* и *lsu4* связано с изменением экспрессии вышеуказанных генов.

Таким образом, по сравнению с диким типом, в условиях КД инсерционные мутанты *lsu2*, *lsu3* и *lsu4* характеризовались следующими признаками: 1) поздним зацветанием, 2) подавлением роста главного цветоноса и 3) формированием дефектных цветков.

#### **4. Морфологические особенности инсерционных *lsu*-мутантов, выращенных в условиях ДД.**

В условиях ДД развитие инсерционных мутантов *lsu3* и *lsu4* не отличалось от дикого типа *A. thaliana*: растения развивались с одинаковой скоростью; архитектура соцветий мутантных растений соответствовала дикому типу арабидопсиса; инсерционные мутанты формировали совершенно нормальные цветки.

В отличие от *lsu3* и *lsu4*, в условиях ДД инсерционный мутант *lsu2* формировал дефектные цветки (рис. 5 Г). Нарушение развития проявлялось у первых 5-7 цветков, образованных в начальный период цветения на главной оси соцветия. Цветки характеризовались наличием редуцированных лепестков, тычинок и пестика, при нормальных чашелистиках (рис. 5 Г). Такие дефектные цветки не раскрывались, оставаясь в виде бутонов, и со временем опадали, не образуя стручков. В то же время на поздней стадии цветения мутанта *lsu2* формировались совершенно нормальные цветки, образующие стручки с жизнеспособными семенами.

Таким образом, нарушения в развитии инсерционных мутантов *lsu3* и *lsu4* обнаружены при определенных условиях фотопериода (КД). Нарушения в развитии инсерционного мутанта *lsu2* наблюдались при различных фотопериодах (ДД и КД) с более ярким проявлением мутантных признаков в условиях КД.

## 5. Изменение экспрессии генов семейства *LSU* у инсерционных мутантов *lsu2*, *lsu3* и *lsu4*.

Экспрессия генов семейства *LSU* у исследуемых инсерционных мутантов была оценена по содержанию мРНК с помощью метода количественной ПЦР в реальном времени.

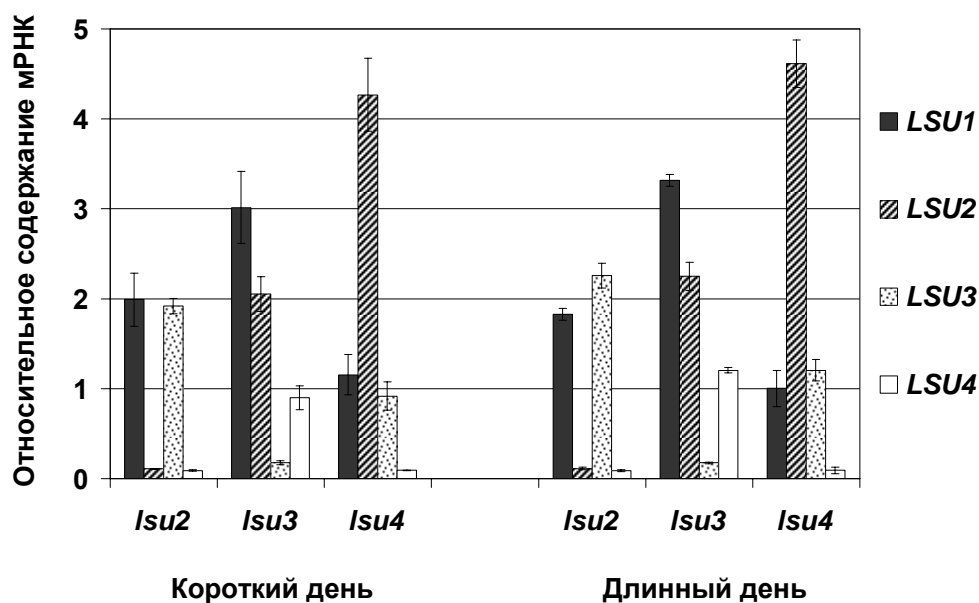
Анализ экспрессии генов семейства *LSU* у инсерционных мутантов *lsu2*, *lsu3* и *lsu4* (рис. 6) показал следующее:

1. Экспрессия гена *LSU2* в инсерционном мутанте *lsu2* была подавлена примерно в 9 раз (на ~90%). При этом экспрессия гена *LSU4* снижалась в среднем в 11 раз (на ~90%), а содержание мРНК генов *LSU1* и *LSU3* увеличивалось в среднем в 2 раза. Таким образом, в инсерционном мутанте *lsu2* была подавлена экспрессия одновременно двух генов: *LSU2* и *LSU4*.

2. В мутанте *lsu3* экспрессия гена *LSU3* была снижена примерно в 6 раз (на ~80%). При этом содержание мРНК генов *LSU1* и *LSU2* увеличивалось в 2-3 раза. Экспрессия гена *LSU4* не изменялась.

3. Экспрессия гена *LSU4* в инсерционном мутанте *lsu4* была подавлена примерно в 11 раз (на ~90%). При этом содержание мРНК гена *LSU2* увеличивалось в среднем в 4.5 раза, а генов *LSU1* и *LSU3* – не изменялось.

4. Значительного варьирования экспрессии генов семейства *LSU* в зависимости от длины дня (ДД или КД) не наблюдалось.



**Рис. 6.** Уровень экспрессии генов семейства *LSU* у инсерционных мутантов *lsu2*, *lsu3* и *lsu4*. Приведено содержание мРНК относительно дикого типа *A. thaliana* (принято за 1) ± стандартное отклонение при трех биологических повторностях.



Из приведенных данных видно, что гены семейства *LSU* взаимно компенсируют недостаточную экспрессию друг друга. Подавление транскрипции одного из *LSU*-генов вызывает усиление экспрессии других генов этого семейства от 2 до 5 раз. Исключение составляет снижение экспрессии *LSU4* у инсерционного мутанта *lsu2*, содержащего Т-ДНК инсерцию в гене *LSU2*.

Исходя из анализа экспрессии собственных генов семейства *LSU* у исследуемых инсерционных мутантов следует, что подавление экспрессии одновременно двух генов семейства *LSU* вызывало усиление фенотипических признаков у инсерционного мутанта *lsu2*: нарушение развития цветков не только при КД, но и при ДД. Все это служит еще одним указанием на то, что гены *LSU2*, *LSU3* и *LSU4* могут быть вовлечены в одни и те же процессы развития *A. thaliana*.

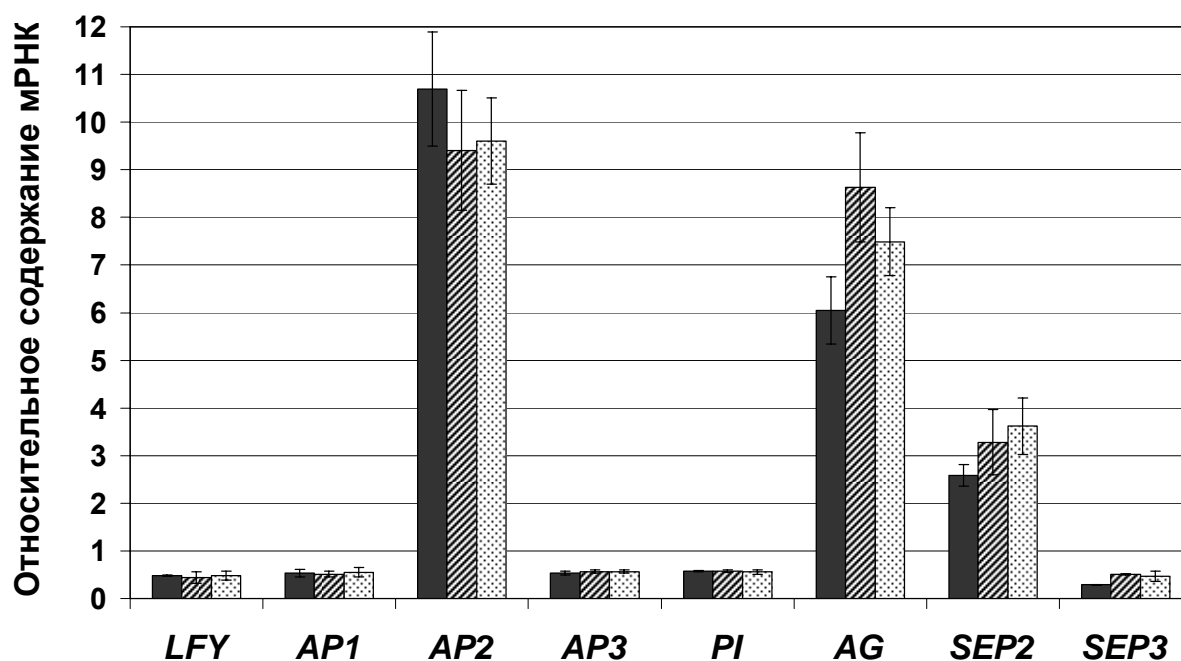
#### **6. Анализ экспрессии гена *LFY* и генов *ABCE*-модели у исследуемых инсерционных мутантов *lsu2*, *lsu3* и *lsu4*.**

Основными генами, ответственными за формирование цветка у арабидопсиса, являются гены идентичности органов цветка (гены *ABCE*-модели): *AP1*, *AP2*, *AP3*, *PI*, *AG* и *SEP1-4* (Coen, Meyerowitz, 1991; Pelaz et al., 2000; Ditta et al., 2004), а также ген идентичности флоральной меристемы *LFY*, выполняющий важную роль в активации транскрипции генов *AP1*, *AP3* и *AG* (Zik, Irish, 2003; Krizek, Fletcher, 2005). Подавление экспрессии этих генов приводит к нарушению развития органов цветка (Bowman et al., 1991; Krizek, Fletcher, 2005).

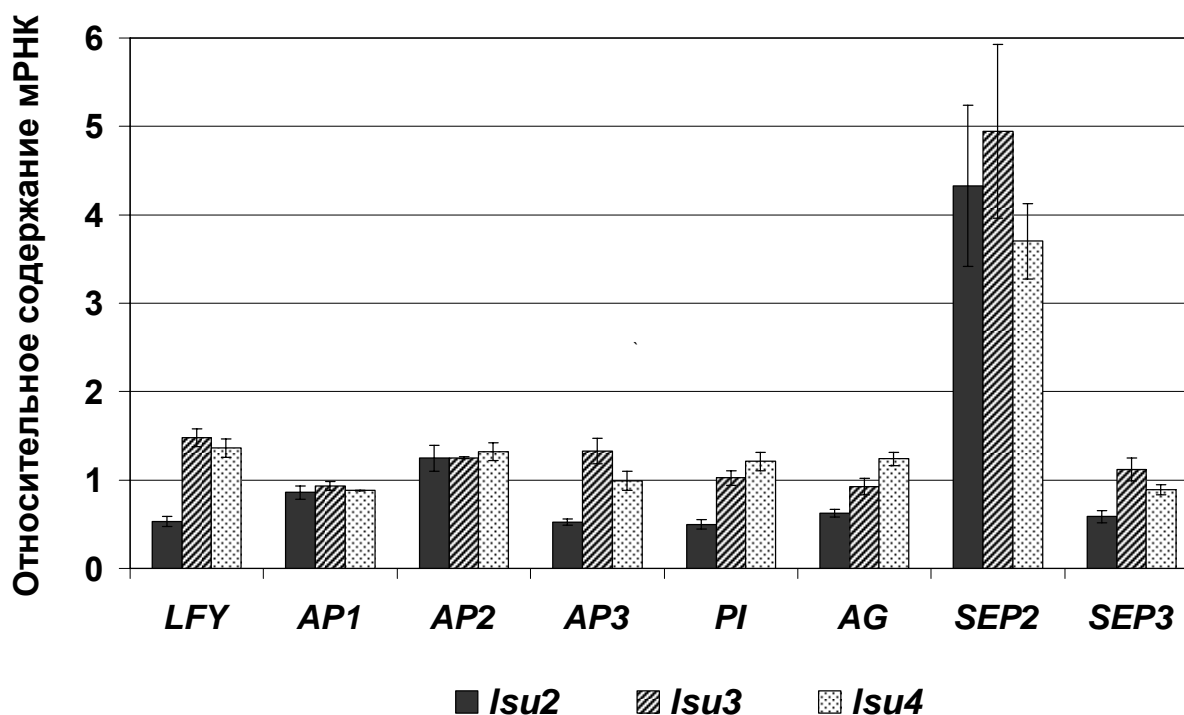
С помощью метода количественной ПЦР в реальном времени мы изучили экспрессию основных генов идентичности флоральной меристемы и органов цветка и выявили значительные изменения содержания их мРНК у инсерционных мутантов *lsu2*, *lsu3* и *lsu4* по сравнению с диким типом *A. thaliana* в условиях КД.

Так, уровень экспрессии генов *LFY*, *AP1*, *AP3*, *PI* и *SEP3* снижался примерно вдвое. С другой стороны, экспрессия генов *AP2*, *AG* и *SEP2* значительно увеличивалась, в среднем в 10, 7 и 3 раз(а), соответственно (рис. 7 А). Следовательно, можно предположить, что подавление экспрессии генов *LSU2*, *LSU3* или *LSU4* у *A. thaliana* вызывало в условиях КД изменение работы гена *LFY* и генов *ABCE*-модели, что приводило к нарушениям в развитии органов цветка и, следовательно, семян.

**A**



**Б**



**Рис. 7.** Уровень экспрессии генов идентичности флоральной меристемы и органов цветка у инсерционных мутантов *lsu2*, *lsu3* и *lsu4* в условиях короткого дня (КД) и длинного дня (ДД). Приведено содержание мРНК относительно дикого типа *A. thaliana* (принято за 1)  $\pm$  стандартное отклонение при трех биологических повторностях. А – КД, Б – ДД.

В условиях ДД экспрессия генов идентичности флоральной меристемы и органов цветка у инсерционных мутантов *lsu3* и *lsu4* практически не менялась по сравнению с диким типом (исключение составлял ген *SEP2*, экспрессия которого увеличивалась в среднем в 4 раза) (рис. 7 Б). Это объясняет, почему в индуктивных условиях (арабидопсис является факультативным растением длинного дня) мутантные растения образовывали нормально развитые цветки.

В отличие от мутантов *lsu3* и *lsu4*, в мутантном растении *lsu2* в условиях ДД экспрессия генов *LFY*, *AP3*, *PI*, *AG* и *SEP3* была подавлена по сравнению с диким типом примерно в 2 раза (рис. 7 Б). Это, очевидно, и является причиной формирования дефектных цветков у инсерционного мутанта *lsu2* при индуктивных для зацветания арабидопсиса условиях длинного светового дня.

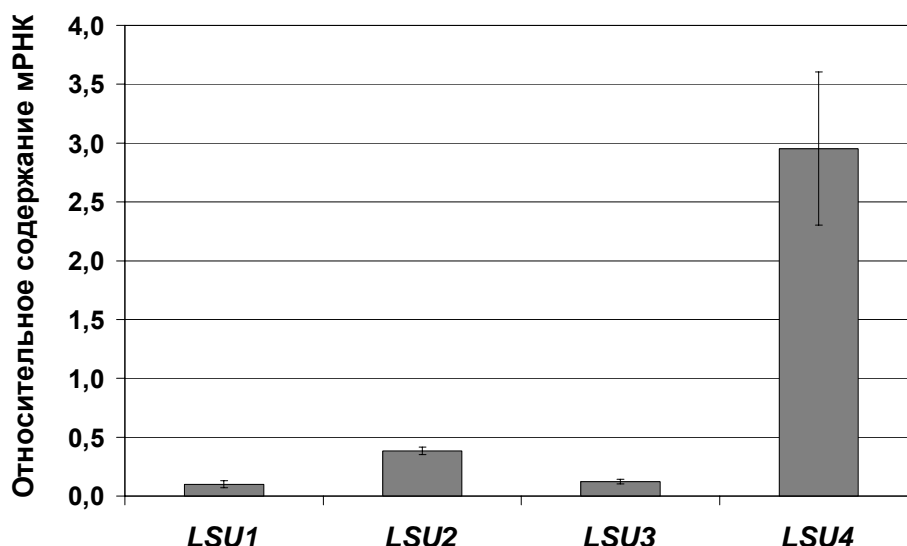
### **7. Получение *RNAi*-мутанта арабидопсиса. Данные экспрессии генов семейства *LSU* у мутанта *LSU1-RNAi*.**

В настоящее время чрезвычайно бурное развитие получило применение механизма РНК-интерференции в качестве мощного и удобного способа специфического подавления экспрессии генов для выяснения их функций. В этом случае используются гомологичные исследуемым генам двуцепочечные РНК как “экзогенные”, так транскрибированные с интегрированных в геном конструкций, что вызывает «выключение» работы исследуемого гена (Hannon, 2002).

Механизм РНК-интерференции был использован нами для получения мутанта *LSU1-RNAi* путем интегрирования в геном арабидопсиса экспрессируемой ДНК под конститутивным промотором 35S CaMV, содержащей два повторяющихся фрагмента гена *LSU1* в смысловой и антисмысловой ориентации.

В результате транскрипции встроенной в геном арабидопсиса плазмиды фрагменты гена *LSU1* комплементарно соединяются друг с другом, образуя двуцепочечную РНК-шпильку, которая распознается специальными белками клетки и уничтожается. При этом должно происходить разрушение всех комплементарных ей последовательностей мРНК, вследствие чего экспрессия гена *LSU1* подавляется.

Мы предположили, что, вследствие высокой гомологии последовательностей генов семейства *LSU* (63-77%), у мутанта *LSU1-RNAi* будет нарушена экспрессия не только *LSU1*, но также и других генов *LSU*.



**Рис. 8.** Экспрессия генов *LSU* у мутанта *LSU1-RNAi* в условиях длинного дня. Приведено содержание мРНК относительно дикого типа (принято за 1)  $\pm$  стандартное отклонение при трех биологических повторностях.

Из рисунка 8 видно, что в результате применения механизма РНК-интерференции у мутанта *LSU1-RNAi* действительно произошло подавление экспрессии как гена *LSU1* (в 10 раз, на ~90%), так и генов *LSU2* (в 2.6 раза, на ~60%) и *LSU3* (в 8.2 раза, на ~90%). В то же время, транскрипция гена *LSU4* увеличивалась в 2.9 раза, что, вероятно, связано с компенсацией слабой экспрессии остальных генов семейства *LSU*.

Таким образом, в результате использования механизма РНК-интерференции была подавлена экспрессия сразу трех генов семейства *LSU* (*LSU1*, *LSU2* и *LSU3*) из четырех.

### **8. Морфологические особенности *LSU1-RNAi* мутанта.**

В условиях ДД не обнаружено разницы во времени зацветания между мутантом *LSU1-RNAi* и контрольными растениями *A. thaliana*. Формирования кластеров цветков у мутанта *LSU1-RNAi* также выявлено не было.

Тем не менее, подобно исследуемым инсерционным мутантам *lsu*, выращенным в условиях КД, мутант *LSU1-RNAi* в условиях ДД характеризовался подавлением роста главного цветоноса (рис. 9 Б) и формированием дефектных цветков (рис. 10 Б, В). При этом aberrantные цветки образовывались не только на центральной оси соцветия, но и на боковых осях.



**Рис. 9.** Фенотип растений дикого типа (А) и *LSUI-RNAi* мутанта (Б), выращенных в условиях длинного дня. Стрелками показана главная ось соцветий.



**Рис. 10.** Морфология цветков мутанта *LSUI-RNAi A. thaliana*, выращенного в условиях длинного дня. А – препарированный цветок дикого типа, находящийся на стадии бутона; Б, В – цветки мутанта *LSUI-RNAi*. На всех фотографиях бар=200 мкм.

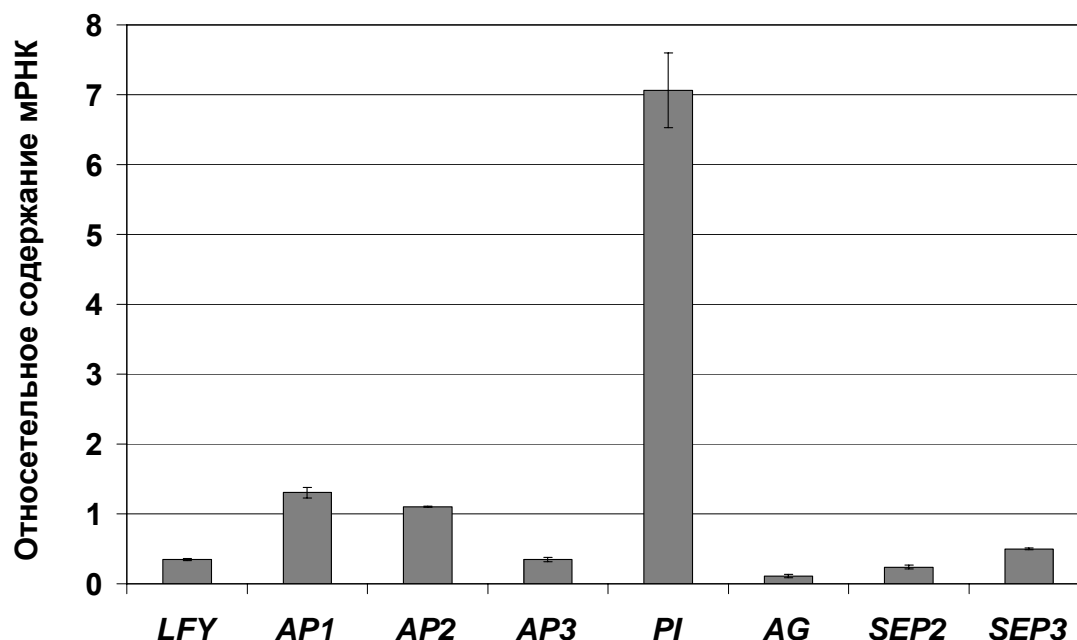
В отличие от инсерционных мутантов *lsu*, первые 2-3 цветка, сформированные на начальной стадии цветения на главной оси соцветия мутанта *LSUI-RNAi*, развивались совершенно нормально. При дальнейшем развитии главного цветоноса наблюдалось формирование цветков с нормальными чашелистиками, но с редуцированными, неразвитыми лепестками, тычинками и пестиком (рис. 10 Б), а также цветков с нормальными чашелистиками, но неразвитыми лепестками и тычинками и с объемным пестиком, занимавшим почти все внутреннее пространство (рис. 10 В). Первые цветки не образовывали стручков и со временем опадали, последующие – формировали стручки, но не жизнеспособные семена. В отличие от боковых

осей соцветия мутанта *LSU1-RNAi*, развития нормальных цветков в верхней части главного цветоноса на поздней стадии цветения не происходило.

### 9. Анализ экспрессии генов идентичности флоральной меристемы и органов цветка у *LSU1-RNAi* мутанта.

Анализ экспрессии гена *LFY* и генов АВСЕ-модели с помощью количественной ПЦР в реальном времени у *LSU1-RNAi* мутанта в условиях ДД выявил значительные изменения. Так, экспрессия гена *LFY* уменьшилась в 2.9 раза, *AP3* – в 2.9 раза, *AG* – в 9.1 раза, *SEP2* – в 4.2 раза, а также *SEP3* – в 2 раза. При этом экспрессия генов *AP1* и *AP2* не изменилась, а содержание мРНК гена *PI* возросло в 7.1 раза (рис. 11).

Ген *LFY* выполняет важную роль в активации транскрипции *AP1*, *AP3* и *AG* (Zik, Irish, 2003; Krizek, Fletcher, 2005). Подавление его экспрессии вызывает снижение активности *AP1*, *AP3* и *AG* и, как следствие, приводит к образованию вегетативных побегов на месте цветков (Weigel et al., 1992, Weigel et al., 1993). Данные рисунка 11 подтверждают важность *LFY* в активации экспрессии *AP3* и *AG*: одновременно с подавлением экспрессии *LFY* наблюдается подавление экспрессии генов *AP3* и *AG*.



**Рис. 11.** Экспрессия гена *LFY* и генов АВСЕ-модели у мутанта *LSU1-RNAi*. Приведено изменение содержания мРНК относительно дикого типа *A. thaliana* (принято за 1) ± стандартное отклонение при трех биологических повторностях. Растения мутанта *LSU1-RNAi* и дикого типа выращены в условиях длинного дня.

Из рисунка 11 также видно, что, в отличие от *AP3* и *AG*, активность гена *API* по сравнению с диким типом не изменилась. Возможно, это связано с тем, что транскрипция гена *API* в условиях ДД, кроме *LFY*, регулируется комплексом белков фотопериодического пути инициации цветения *FT* и *FD* (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005). Поэтому трехкратное подавление экспрессии *LFY* не вызвало снижения уровня экспрессии *API*.

Также с активацией генов фотопериодического пути возможно связано формирование совершенно нормальных цветков у мутанта *LSUI-RNAi* на ранней стадии цветения на главной оси соцветия в условиях ДД.

Таким образом, в результате подавления экспрессии одновременно трех генов семейства *LSU* у мутанта *LSUI-RNAi* произошли более значительные (от 3-х до 9-ти раз) изменения экспрессии гена *LFY* и генов ABCЕ-модели по сравнению с инсерционными мутантами *lsu* (примерно в 2 раза). Кроме того, по сравнению с исследуемыми инсерционными мутантами *lsu*, мутантный фенотип *LSUI-RNAi* был выражен сильнее: подавление роста центральной оси соцветия в условиях ДД, а также формирование дефектных цветков не только на главном, но и на боковых цветоносах.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гены семейства *LSU* характеризуются высокой степенью сходства нуклеотидных последовательностей (63-77%). Уровень гомологии аминокислотных последовательностей, кодируемых генами белков, равен 60-89%. Это с большой степенью вероятности свидетельствует о том, что исследуемые гены выполняют сходную функцию в регуляции развития *A. thaliana*.

Анализ аминокислотных последовательностей белков *LSU* показал наличие протяженных участков, формирующих альфа-спирали, и потенциальных двухспиральных доменов димеризации coiled-coil. Это указывает на вероятное участие белков *LSU* в регуляции экспрессии генов и подтверждается указаниями на их локализацию в клеточном ядре.

Анализ промоторных последовательностей генов *LSU* выявил наличие сайтов связывания для ряда транскрипционных факторов, регулирующих процессы перехода к цветению, развитие органов цветка и семян арабидопсиса: *LFY*, *AG*, *SEP1*, *SEP2*, *AGL15* и *LEC2*. Это свидетельствует о том, что гены *LSU* могут быть вовлечены в процессы цветения *A. thaliana*.

В условиях КД инсерционные мутанты *lsu2*, *lsu3* и *lsu4* переходили к цветению соответственно на 36, 22 и 37 дней позже дикого типа *A. thaliana* и характеризовались заметными фенотипическими отличиями. Так, у инсерционных мутантов *lsu* наблюдалось подавление роста главного цветоноса и формирование кластеров из первых 5-10 цветков. Кроме того, мутации генов *LSU2*, *LSU3* и *LSU4* вызывали образование дефектных цветков на главной оси соцветия *A. thaliana* с нарушением развития лепестков, тычинок и пестика.

В условиях ДД развитие инсерционных мутантов *lsu3* и *lsu4* не отличалось от дикого типа *A. thaliana*, а инсерционный мутант *lsu2* формировал дефектные цветки с нарушением развития лепестков, тычинок и пестика.

Следовательно, мутантные признаки у *lsu3* и *lsu4* проявлялись только в условиях КД. В то же время нарушения в развитии инсерционного мутанта *lsu2* наблюдались при различных фотопериодах (ДД и КД) с более ярким проявлением мутантных признаков в условиях КД.

Анализ экспрессии генов семейства *LSU* у исследуемых инсерционных мутантов подтвердил репрессию мутантных генов и показал, что гены семейства *LSU* взаимно компенсируют недостаточную экспрессию друг друга.

При изучении экспрессии основных генов идентичности флоральной меристемы и органов цветка установлены значительные изменения содержания их мРНК у инсерционных мутантов *lsu2*, *lsu3* и *lsu4* по сравнению с диким типом, что, вероятно, привело к нарушениям в развитии органов цветка.

В результате подавления экспрессии одновременно трех генов семейства *LSU* у мутанта *LSU1-RNAi* произошли более значительные изменения экспрессии гена *LFY* и генов АВСЕ-модели по сравнению с инсерционными мутантами *lsu*. При этом мутантный фенотип *LSU1-RNAi* был выражен сильнее: наблюдалось подавление роста главного цветоноса в условиях ДД, а также формирование дефектных цветков не только на центральной, но и на боковых осях соцветия.

Таким образом, в настоящей работе впервые представлены конкретные экспериментальные данные относительно функции генов семейства *LSU*, показавшие, что исследуемые гены, по всей видимости, кодируют транскрипционные факторы и вовлечены в контроль процессов цветения *A. thaliana*.



## ВЫВОДЫ

1. Гены семейства *LSU A. thaliana* и кодируемые ими белки характеризуются высокой степенью гомологии (соответственно 63-77% и 60-89%). Обнаружение потенциальных coiled-coil доменов и предположительная локализация белков LSU в клеточном ядре указывают на возможность выполнения белками LSU функции транскрипционных факторов.
2. Инсерционные мутанты по генам *LSU3* или *LSU4* характеризуются поздним зацветанием, подавлением роста главного цветоноса, нарушением развития цветков и семян, что проявляется в условиях короткого светового дня. При этом других изменений фенотипа не отмечено.
3. Подавление экспрессии сразу нескольких *LSU*-генов усиливает фенотипические признаки мутантных растений. Инсерционный мутант *lsu2* (подавлена транскрипция генов *LSU2* и *LSU4*) и мутант *LSU1-RNAi*, полученный с использованием технологии РНК-интерференции (нарушена экспрессия трех генов *LSU1*, *LSU2* и *LSU3*), формируют дефектные цветки в условиях не только короткого, но и длинного дня.
4. Дефектные цветки, формирующиеся на центральной оси соцветия у инсерционных мутантов и на центральной и боковых осях соцветия у *RNAi*-мутанта, характеризуются нарушениями развития лепестков, тычинок и пестика.
5. У мутантов по генам семейства *LSU* установлены изменения экспрессии генов *ABCE*-модели цветения и гена *LFY*. Это указывает на необходимость генов *LSU* для координированной работы регуляторных генов, ответственных за формирование соцветий и цветков у *A. thaliana*.
6. Гены семейства *LSU* могут компенсировать недостаточную экспрессию друг друга. Подавление транскрипции одного или нескольких *LSU*-генов вызывает, как правило, активацию работы других генов этого семейства от 2 до 5 раз.
7. Таким образом, в работе впервые описана возможная роль генов *LSU* в онтогенезе арабидопсиса. Результаты работы позволяют предположить, что гены семейства *LSU* вовлечены в процессы регуляции транскрипции и участвуют в формировании органов цветка и определении сроков зацветания растений.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Мякушина Ю.А.**, Миляева Э.Л., Романов Г.А., Никифорова В.Ю. Мутация гена *LSU4* растения *Arabidopsis thaliana* вызывает изменения в развитии органов цветка // Доклады Академии Наук. 2009. Т 428. N. 4. С. 556-559.
2. **Мякушина Ю.А.**, Миляева Э.Л., Романов Г.А., Никифорова В.Ю. Гены семейства *LSU (RESPONSE TO LOW SULFUR)* растения арабидопсис регулируют экспрессию друг друга и могут быть вовлечены в один биологический процесс // Материалы Республиканской конференции молодых ученых «Развитие биотехнологии в Республике Мордовия». Саранск. 2009. С. 35-39.
3. Lewandowska M., Moniuszko G., Kaminska J., Wawrzynska A., **Myakushina Y.**, Nikiforova V., Sirko A. Investigating function of the genes induced by a short-term sulfur deficit: pleiotropic effects of changes in *UP9* expression level // Abstracts of the 7th Workshop on «Sulfur metabolism in plants». Warsaw. 2008. P. 43.
4. **Мякушина Ю.А.**, Никифорова В.Ю. Гены *HRS1*, *HRS2*, *HRS3*, *HRS4* участвуют в ответе на дефицит серы и развитии растения *Arabidopsis thaliana* // Материалы Международной научной конференции «Проблемы биоэкологии и пути их решения (Вторые Ржавитинские чтения)». Саранск. 2008. С. 256-257.
5. **Мякушина Ю.А.**, Никифорова В.Ю., Миляева Э.Л., Романов Г.А. Изменения в развитии цветка у инсерционного мутанта *lsu4* арабидопсиса // Материалы Международной научной конференции «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях крайнего севера». Апатиты. 2009. С. 240-242.
6. **Мякушина Ю.А.**, Миляева Э.Л., Романов Г.А., Никифорова В.Ю. Гены *LSU2* и *LSU3* являются гомологами гена *LSU4* и выполняют сходную функцию в *Arabidopsis thaliana* // Сборник тезисов 13-й Международной школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пущино. 2009. С. 32.
7. **Мякушина Ю.А.**, Миляева Э.Л., Романов Г.А., Никифорова В.Ю. Гены семейства *LSU (RESPONSE TO LOW SULFUR)* участвуют в регуляции развития органов цветка *Arabidopsis thaliana* // Материалы VI-й международной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений». Минск, 2009. С. 114.