

*На правах рукописи*



**Клаус Александр Александрович**

**Влияние кадмия и теплового шока на сплайсинг мРНК в  
хлоропластах кукурузы**

03.01.05. – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Москва, 2014

Работа выполнена в лаборатории экспрессии генома растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва.

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук,

**Лысенко Евгений Анатольевич**

**Официальные оппоненты:**

**Головка Тамара Константиновна,**

доктор биологических наук, профессор, лаборатория экологической физиологии растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Сыктывкар, заведующая лабораторией.

**Ежова Татьяна Анатольевна,**

доктор биологических наук, профессор, кафедра генетики биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, г. Москва, профессор кафедры.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, г. Уфа.

Защита состоится 21 октября 2014 г. в 13 часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 002.210.01 по специальности 03.01.05 – “Физиология и биохимия растений” (биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук 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 Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва.

**Автореферат разослан «   » \_\_\_\_\_ 2014 г.**

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Сплайсинг является важным этапом созревания молекул РНК. Суть этого процесса заключается в вырезании из молекулы РНК интрона и соединении экзонов. Сплайсинг РНК в хлоропластах необходим для формирования фотосинтетического аппарата, а значит и всей жизнедеятельности зеленых растений. Нарушение сплайсинга за счёт мутаций генов белковых факторов, приводит к появлению нежизнеспособных растений, не обладающих нормальным фотосинтетическим аппаратом (Jenkins et al., 1997). Такие мутанты существуют недолго за счёт запасов в семенах. По данной причине сплайсинг в хлоропластах высших растений преимущественно изучают на кукурузе (Jenkins et al., 1997), так как её зерновка содержит большой запас питательных веществ.

Известно, что экспрессия той части генома растений, которая находится в пластидах - пластоме, чувствительна к изменению факторов внешней среды (Kusnetsov, et al., 1993; Franco et al., 1999; Зубо и др., 2008; Sebeci et al., 2008). Однако, этот вопрос мало изучен. Особенно мало работ посвящено влиянию факторов стресса на сплайсинг мРНК в хлоропластах. Существуют немногочисленные сведения о протекании этого процесса в хлоропластах в условиях повышенной температуры (Karcher, Vock, 2002) и в присутствии трёх тяжёлых металлов: меди, никеля и кадмия (Зарипова и др., 2008; Зарипова и др., 2011). Исследование данных стрессоров актуально на сегодняшний день из-за антропогенного воздействия на окружающую среду (загрязнение атмосферы, водоёмов и почвы тяжёлыми металлами) и возможного глобального потепления.

Кадмий является одним из наиболее токсичных тяжёлых металлов (Clemens, 2006). Кадмий проникает во многие компартменты клетки по переносчикам ионов металлов низкого сродства (Gallego et al., 2012). В присутствии кадмия замедляется рост растений, рост их корней, снижается число боковых корней, наблюдаются хлорозы и некрозы молодых листьев (Chaffei et al., 2004; Wójcik, Tukiendorf, 2005), снижается скорость транспирации, фотосинтеза (Souza et al., 2011), а также происходят нарушения других физиологических процессов, например, минерального питания (Yang et al., 1996; Boussama et al., 1999).

Воздействие повышенных температур на высшие растения не менее актуальная проблема современной физиологии растений, поскольку данный стрессор представляет серьёзную угрозу сельскому хозяйству. В условиях теплового стресса происходит подавление многих метаболических процессов по причине чувствительности ферментов к температуре и изменения свойств мембран (Mogk et al., 2003; Wahid, Shabbir, 2005; Ruelland, Zachowski, 2010).

Имеющиеся в литературе данные описывают влияния кадмия (Зарипова и др., 2008) и повышенной температуры (Kargher, Vock, 2002) на сплайсинг только одной пре-мРНК в хлоропластах. Остается неясным является ли такая реакция типичной для всех хлоропластных интрон-содержащих транскриптов. Представляется интересным изучить, как эти два абиотических фактора влияют на эффективность процессов сплайсинга для всех белок-кодирующих РНК в хлоропластах. Поэтому мы сформулировали **цель исследования** следующим образом: Изучить влияние кадмиевого стресса и повышенной температуры на сплайсинг всех интронов в пре-мРНК хлоропластов кукурузы.

Для достижения этой цели нам нужно было выполнить следующие **задачи**:

- 1) Оценить воздействие кадмия на развитие проростков кукурузы в широком диапазоне концентраций для конкретной модели эксперимента и выбрать условия для дальнейших исследований.
- 2) Оптимизировать метод ОТ-ПЦР для корректного анализа несплайсированных и зрелых форм РНК в хлоропластах.
- 3) Изучить накопление кадмия в хлоропластах кукурузы.
- 4) Изучить воздействие кадмия на соотношение интрон-содержащих и зрелых транскриптов белок-кодирующих генов в хлоропластах кукурузы.
- 5) Изучить воздействие повышенной температуры на соотношение интрон-содержащих и зрелых транскриптов белок-кодирующих генов в хлоропластах кукурузы.

**Научная новизна.** Впервые показано, что повышенная температура подавляет сплайсинг всех хлоропластных пре-мРНК, а кадмий практически не влияет на этот процесс. Впервые показано, что нарушение сплайсинга происходит уже при 37 °С. Полученные нами данные по накоплению кадмия в хлоропластах восполнили пробел в данных предшественников и позволили сделать выводы, которые невозможно было сделать на основании данных предшествующих работ.

**Апробация работы.** Полученные результаты были представлены на Всероссийском симпозиуме “Растение и стресс” (Москва, 2010), на VII Съезде Общества физиологов растений “Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий” (Нижний Новгород, 2011), на Всероссийском симпозиуме “Экология мегаполисов: фундаментальные основы и инновационные технологии” (Москва, 2011), на семинаре молодых учёных ИФР РАН (Москва, 2012), на XIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных “Ломоносов-2012” (Москва, 2012), на Всероссийской научной конференции “Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях и техногенной среде” (Иркутск, 2013), на Всероссийской научной конференции с международным участием “Инновационные направления современной физиологии растений” (Москва, 2013) и на межлабораторном семинаре ИФР РАН (Москва, 2013).

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 11 печатных работ, 2 из которых – статьи в рецензируемых журналах.

**Структура и объём работы.** Диссертационная работа построена по стандартной схеме и включает в свой состав следующие главы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, список литературы, приложение. Объём труда составляет 139 страниц, содержит 22 таблиц и 11 рисунков. Автором процитировано 356 источников, из которых 345 на иностранных языках.

## **ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В качестве **объектов** в исследовании использовались кукуруза *Zea mays* L. (сорт “Лучистая”) и ячмень *Hordeum vulgare* L. (сорт “Луч”).

**Выращивание растений.** Зерновки кукурузы и ячменя набухали на влажной фильтровальной бумаге при 4°C в течение двух суток, затем проращивались в темноте при 21°C (ячмень) или 25°C (кукуруза) двое суток. Проросшие зерновки переносили на водную культуру (модифицированная среда Хогланда), выращивали растения в камерах фитотрона при 21°C (ячмень) или 25°C (кукуруза), 16 часов освещения в сутки, 180-200 мкмоль фотонов м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>). Кадмий вносили спустя сутки после постановки водной культуры (трехдневным проросткам) в виде CdSO<sub>4</sub>. Воздействию повышенной температуры подвергали семидневные растения; вегетационные сосуды с растениями переносили на двое суток в термостат с постоянным освещением 30-50 мкмоль фотонов м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>.

**Измерение морфометрических показателей.** Линейные параметры роста и массу органов растений определяли при помощи линейки и весов. Площадь второго листа рассчитывали по формуле Анিকেева и Кутузова (1961). Свежие органы высушивали в термостате при 60°C.

**Измерение содержания фотосинтетических пигментов.** Пигменты экстрагировали 80% ацетоном и определяли содержание пигментов спектрофотометрически по формуле Lichtenthaler (1987).

**Определение накопления кадмия.** Высушенные навески тканей растений подвергали озолению кислотами по методу, описанному в работе (Клаус и др., 2013). Содержание кадмия в полученных пробах измеряли на атомно-абсорбционном спектрофотометре Formula FM400.

**Измерение параметров флуоресценции хлорофилла а** произведен на интактных листьях растений с помощью флюориметра РАМ 201 (“Walz”) в сотрудничестве с к.б.н. Н.Л. Пшибытко (Институт биофизики и клеточной инженерии НАН,

Республика Беларусь). Результаты измерений были переданы нам в обработанном виде.

**Выделение хлоропластов и получение препаратов РНК.** Интактные хлоропласты выделяли из тканей первого и второго листа и очищали центрифугированием в градиенте Перкола по методу, описанному в работах (Зубо и др., 2008; Лысенко и др., 2013). Из хлоропластов выделяли РНК экстрагирующим буфером с высоким содержанием гуанидин-изотиоцианата (4М) по протоколу, описанному в статье (Лысенко и др., 2013).

**Полимеразная цепная реакция после обратной транскрипции (ОТ-ПЦР).**

Количество РНК в полученных препаратах измеряли на спектрометре NanoDrop ND100. Образцы выравнивали по количеству РНК, подвергали обработке ДНКазы I (“Fermentas”) при 37°C течение часа (0.5 мкг РНК на 1 е.а.), после чего добавляли ЭДТА и инактивировали фермент нагреванием до 70°C в течение 10 минут, охлаждали 3 минуты на льду, после чего сразу использовали для синтеза кДНК. Синтез кДНК проводили с ген-специфичных праймеров. На одну реакцию обратной транскрипции брали 80 нг РНК после обработки ДНКазой. В исследовании использовали обратные транскриптазы RevertAid, RevertAid Premium (“Fermentas”), Thermoscript (“Invitrogen”) по протоколам, рекомендованным производителями. Далее проводили ПЦР полученных препаратов ферментами Taq (“Сибэнзим”), DreamTaq (“Fermentas”), Encyclo (“Евроген”) на амплификаторах Eppendorf Mastercycler.

**Электрофорез в агарозном геле. Элюция из геля. Секвенирование ПЦР-**

**продуктов.** ПЦР-продукты разделяли по размеру электрофорезом в 1.5% агарозном геле с бромистым этидием (1.25 мг/мл) в ТАЕ-буфере. Гели сканировали на фосфоимейджере Thyphoon Trio+ (“GE Healthcare”). При освещении ультрафиолетом (365 нм), вырезали зоны геля, содержащие интересующие фрагменты ДНК, проводили элюцию ДНК при помощи набора “DNA extraction kit” (“Fermentas”), следуя рекомендациям производителя. Полученные препараты ДНК

отдавали на секвенирование в компанию “Синтол” (Москва). Полученные результаты анализировали при помощи программы Sequence Scanner v1.0 (“Applied Biosystems”).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Оценка степени токсического воздействия кадмия на растения

В присутствии 80 мкМ кадмия, этот металл был обнаружен в побеге уже спустя сутки после внесения в среду, в дальнейшем его накопление росло. На основании измерения линейных параметров растений мы выявили, что рост кукурузы при 80 мкМ Cd достоверно замедлялся уже после двух суток экспозиции. Однако содержание фотосинтетических пигментов начинало достоверно отличаться позднее. Содержание хлорофилла *a* в тканях вторых листьев растений, выращенных в присутствии кадмия, было достоверно ниже ( $\alpha < 0,05$ ) контрольных значений только после 5-ти суток стресса, а в случае хлорофилла *b* и каротиноидов – после 6-ти суток стресса (Рисунок 1). Поэтому для дальнейших исследований была выбрана именно шестисуточная экспозиция.

Мы изучили воздействие широкого диапазона концентраций кадмия от 4 до 200 мкМ после шести суток экспозиции (Рисунок 2). Даже наименьшая из использованных концентраций кадмия – 4 мкМ - достоверно снижала длину и площадь второго листа (Рисунок 2). Однако кадмий в концентрации 4 мкМ практически не влиял на массы отдельных органов растений, рост которых был существенно подавлен высокими концентрациями кадмия. Содержание воды в тканях листьев и корней снижалось под действием ионов кадмия в концентрации 20 мкМ и выше (Таблица 1). Содержание хлорофилла *a* достоверно снижалось уже при 4 мкМ Cd, хлорофилла *b* – начиная от 20 мкМ Cd, а каротиноидов только при 80 и 200 мкМ Cd; уровень хлорофилла *a* падал в большей степени по сравнению с уровнями других пигментов, а уровень каротиноидов – в меньшей (Рисунок 3).

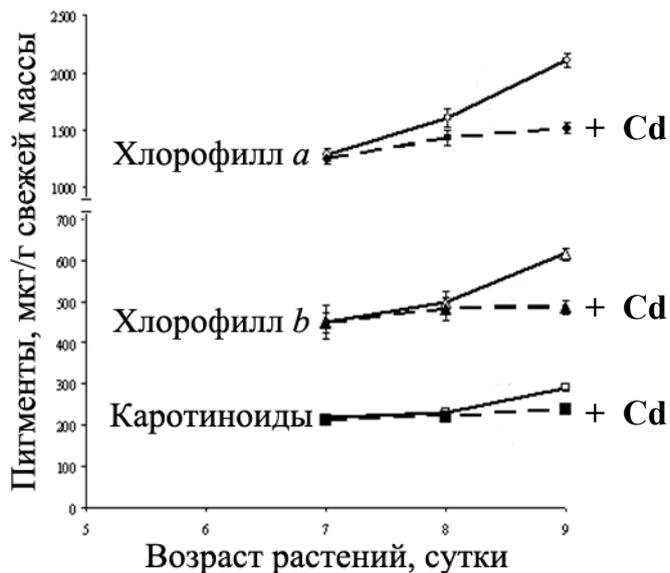


Рисунок 1. Влияние 80 мкМ CdSO<sub>4</sub> на содержание фотосинтетических пигментов у проростков кукурузы.

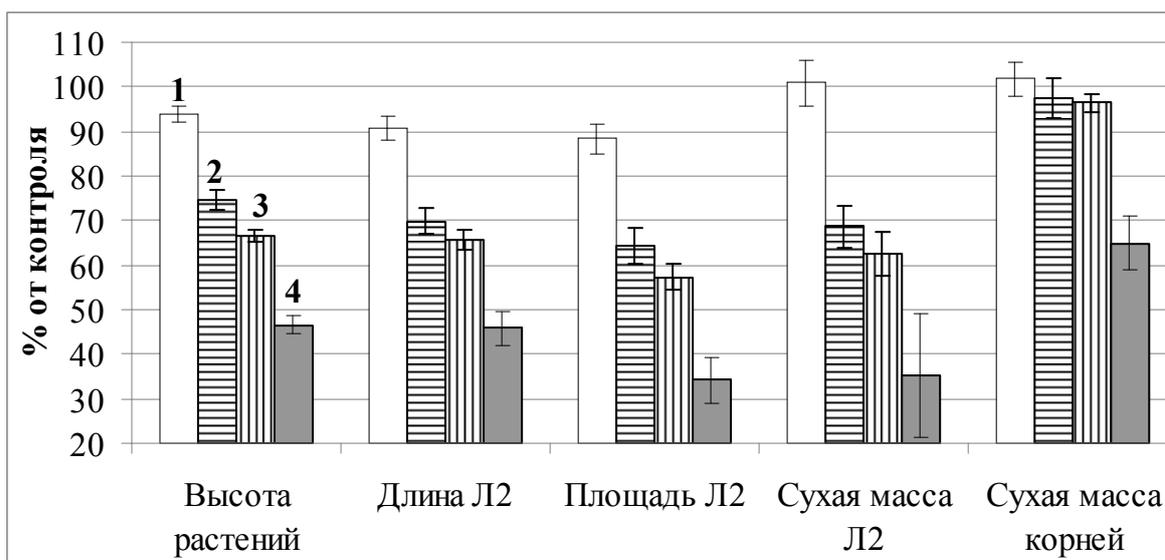


Рисунок 2. Влияние кадмия на рост проростков кукурузы к девятому дню развития (шесть суток на кадмии). Концентрация CdSO<sub>4</sub>: 1 – 4 мкМ, 2 – 20 мкМ, 3 – 80 мкМ, 4 – 200 мкМ. Л2 – второй лист. Данные приведены как средние величины ± SE (стандартная ошибка).

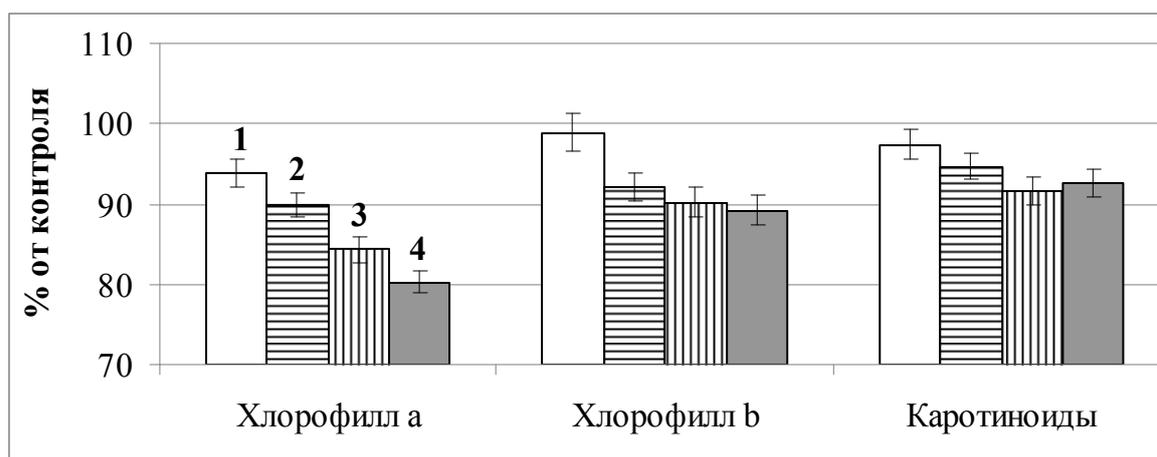


Рисунок 3. Влияние кадмия на содержание фотосинтетических пигментов во втором листе проростков кукурузы к девятому дню развития (шесть суток на кадмии). Концентрация  $CdSO_4$ : 1 – 4 мкМ, 2 – 20 мкМ, 3 – 80 мкМ, 4 – 200 мкМ. Данные приведены как средние величины  $\pm$  SE.

Таблица 1. Влияние кадмия на содержание воды в проростках кукурузы к девятому дню развития (шесть суток на кадмии)

	Cd, мкМ				
	К	4	20	80	200
Л2	92,3 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	92,3 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	91,5 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>	90,7 $\pm$ 0,29 <sup>b</sup>	89,0 $\pm$ 0,50 <sup>г</sup>
корни	95,0 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	95,0 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	94,4 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>	93,5 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>	91,0 $\pm$ 0,37 <sup>г</sup>

К - контроль. Л2 – второй лист. Данные приведены как средние величины  $\pm$  SE. а-г – группы значений, различия между которыми достоверны.

Для того, чтобы установить, влияет ли кадмий на функциональную активность фотосинтетического аппарата кукурузы, мы провели совместное исследование с к.б.н. Пшибытко Н.Л. (ИБКИ НАНБ, Минск, РБ). Были проанализированы такие параметры, как максимальный ( $F_v/F_m$ ) и эффективный ( $\Phi_{F_{CSII}}$ ) квантовый выход фотосистемы II, фотосинтетическое ( $qP$ ) и нефотосинтетическое ( $qN$ ,  $NPQ$ ) тушение флуоресценции хлорофилла. Кадмий в концентрации от 4 до 200 мкМ не оказывал достоверного влияния на эти

Таблица 2. Параметры флуоресценция хлорофилла *a* в листьях растений кукурузы к девятому дню развития (шесть суток на кадмии).

	Cd, мкМ				
	К	4	20	80	200
<b>Fv/Fm</b>	0,785±0,025	0,812±0,018	0,795±0,011	0,785±0,028	0,803±0,018
<b>Φ<sub>ФСII</sub></b>	0,540±0,029	0,588±0,011	0,551±0,018	0,569±0,025	0,579±0,028
<b>qP</b>	0,748±0,018	0,791±0,033	0,766±0,027	0,799±0,018	0,781±0,018
<b>qN</b>	0,294±0,018	0,321±0,021	0,297±0,021	0,299±0,014	0,302±0,008
<b>NPQ</b>	0,690±0,013	0,713±0,015	0,696±0,008	0,687±0,022	0,716±0,021

К – контроль. Данные приведены как средние величины ± SE. Значения, достоверно не отличаются от контрольных при уровне значимости  $\alpha < 0,05$ .

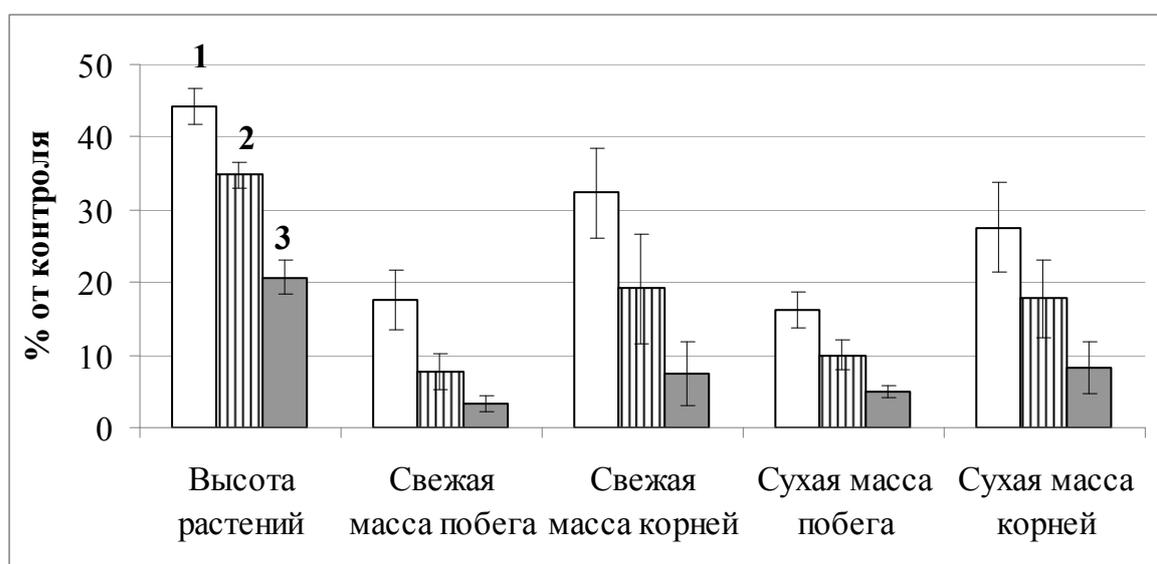


Рисунок 4. Влияние кадмия на рост растений кукурузы к 34-у дню развития (31 сутки на кадмии). Концентрация CdSO<sub>4</sub>: 1 – 20 мкМ, 2 – 80 мкМ, 3 – 200 мкМ. Данные приведены как средние величины ± SE.

показатели (Таблица 2). По-видимому, в наших условиях эксперимента кадмий не влияет существенно на функционирование фотосинтетического аппарата кукурузы.

Мы проверили, как кадмий будет воздействовать на растения кукурузы при более длительной экспозиции. Степень подавления роста растений кукурузы после 31 суток воздействия кадмия в концентрациях 20, 80 и 200 мкМ была больше, чем

после 6-ти суток, но летального эффекта не наблюдалось (Рисунок 4). Летальное воздействие оказывала концентрация 250 мкМ. Первые случаи смерти растений кукурузы наблюдались только после 8 суток воздействия, а массовая гибель начиналась с 18 суток стресса, достигая 42 % на 31 сутки.

## 2. Оптимизация метода ОТ-ПЦР для корректного анализа интрон-содержащих и сплайсированных форм РНК

Наши первые результаты анализа ПЦР-продуктов показали очень низкое количество интрон-содержащих ПЦР-продуктов, что не соответствовало данным полученным другими методами, например Нозерн-блот гибридизацией (Rock et al 1987). Мы предположили, что в примененной нами методике какие-то факторы способствовали занижению доли длинных интрон-содержащих ПЦР-продуктов.

Мы провели поиск таких факторов с тем, чтобы оптимизировать методику для корректного отображения доли интрон-содержащих РНК. Оказалось, что для адекватного выявления доли несплайсированных форм РНК необходимо учитывать способы инактивации ДНКазы, температуру синтеза кДНК и качество используемой ДНК-полимеразы. В случае одного из генов наблюдали уменьшение доли интронсодержащих транскриптов по мере увеличения числа циклов ПЦР.

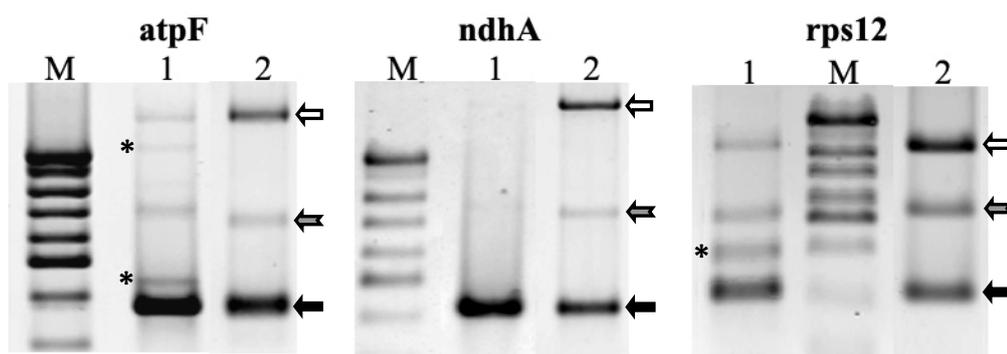


Рисунок 5. Оптимизация ОТ-ПЦР. М - маркер “100 bp”, 1 - исходные условия, 2 - оптимизированные условия. Белые стрелки указывают на несплайсированные формы, чёрные – на сплайсированные, серые – на гетеродуплекс сплайсированных и несплайсированных форм. \* – неспецифичные ПЦР-продукты.

Показано, что после ПЦР нити ампликонов, содержащие и не содержащие последовательность интрона, могут образовывать гетеродуплексы. На Рисунке 5. на примере *atpF*, *ndhA* и *gps12-3'* показан результат оптимизации ОТ-ПЦР. ПЦР-продукты проверены секвенированием.

### 3. Накопление кадмия в хлоропластах кукурузы и ячменя

Имеющиеся в литературе данные о поступлении кадмия в хлоропласты крайне противоречивы (Barylá et al 2001; Pietrini et al 2003). Поэтому мы изучили величину накопления кадмия в хлоропластах кукурузы в условиях нашей экспериментальной модели: три дня без кадмия и шесть дней в присутствии 80 или 250 мкМ кадмия. Ранее было заявлено о влиянии кадмия на сплайсинг РНК *rpl16* в хлоропластах ячменя (Зарипова и др. 2008). Поэтому мы дополнительно изучили накопление кадмия в хлоропластах ячменя в условиях нашей экспериментальной модели (см. выше).

Мы обнаружили, что кадмий поступает в хлоропласты обоих видов растений, и количество его варьировалось от 49 до 171 нг кадмия на 1 мг хлорофилла (Таблица 3). Отметим, что в листьях кукурузы накапливалось больше кадмия, чем в листьях ячменя, однако, в хлоропластах кукурузы накапливалось меньше кадмия, чем в хлоропластах ячменя. Доля кадмия в листьях, проникающего в хлоропласты, у кукурузы составила 0.2-0.3%, а у ячменя - чуть больше 1%.

Таблица 3. Накопление кадмия в хлоропластах к девятому дню развития растений (шесть суток на кадмии)

	Кадмий в среде, мкМ	Кадмий в листьях, мкг/мг хлорофилла	Кадмий в хлоропластах, нг/мг хлорофилла	% кадмия в хлоропластах
Кукуруза	80	23,6±1,9	49±5	0,21
Ячмень	80	14,8±1,6	171±26	1,16±0,14
Кукуруза	250	26,7±3,2	92±20	0,34±0,03
Ячмень	250	9,5±1,3	126±7	1,32±0,09

Данные приведены как средние величины ± SE.

#### **4. Изучение влияния кадмий-индуцированного стресса на уровень сплайсированных мРНК и несплайсированных пре-мРНК в хлоропластах кукурузы**

Растения выращивали до возраста 9 дней, 3-дневным опытным растениям добавляли кадмий до концентрации 80 и 250 мкМ. Хлоропластную РНК анализировали методом ОТ-ПЦР. В результате оказалось, что у контрольных растений и у растений, выращенных в присутствии 80 и 250 мкМ моль кадмия, соотношение сплайсированных и несплайсированных форм не отличается (Рисунок 6). Кадмий не оказывал влияние не только на относительную долю несплайсированных транскриптов, но и на уровень мРНК всех генов, содержащих интроны, а также ряда генов, не содержащих интроны (*atpA*, *atpB*, *petL*, *cemA*; данные не приведены).

Поскольку в хлоропластах ячменя накапливалось большее количество кадмия, то мы дополнительно изучили воздействие кадмия на уровень интрон-содержащих и сплайсированных форм РНК в хлоропластах этого растения. Воздействие осуществляли по той же схеме, что и для кукурузы. Кадмий в концентрации 80 мкМ не оказывал влияние на уровень зрелых и интрон-содержащих транскриптов (Рисунок 7). При летальной концентрации 250 мкМ изменения для большинства генов также не были заметны. Однако, при 250 мкМ кадмия увеличивалось накопление несплайсированных пре-мРНК *rpl2* и *rps12-3'*, тогда как уровень зрелых мРНК этих генов практически не изменялся (Рисунок 7). Эти данные не позволяют говорить о существенном влиянии кадмия на сплайсинг РНК в хлоропластах ячменя. Небольшое накопление интрон-содержащих транскриптов двух генов при летальной концентрации кадмия может быть объяснено слабым ингибированием сплайсинга или значительным усилением транскрипции при неизменной эффективности сплайсинга. Уровень мРНК генов, не содержащих интроны - *atpA*, *atpB*, *petL*, *cemA*, в хлоропластах ячменя в присутствии кадмия также не изменялся (данные не приведены).

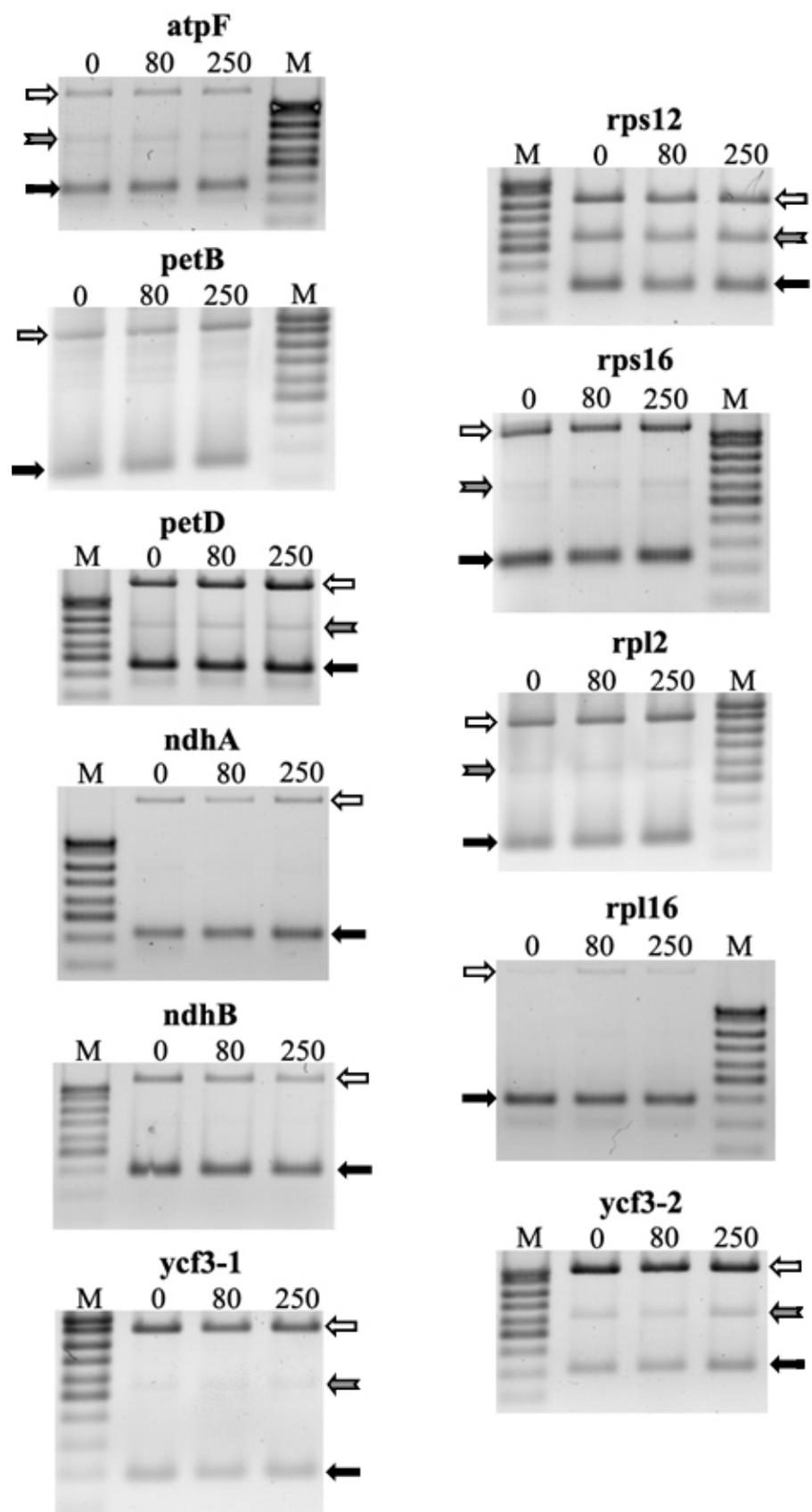


Рисунок 6. Влияние кадмия на сплайсинг мРНК в хлоропластах кукурузы. (0) – 0 мкМ CdSO<sub>4</sub>, (80) – 80 мкМ CdSO<sub>4</sub>, (250) – 250 мкМ CdSO<sub>4</sub>, M – маркер “100 bp”.

Стрелки – как на рисунке 5.

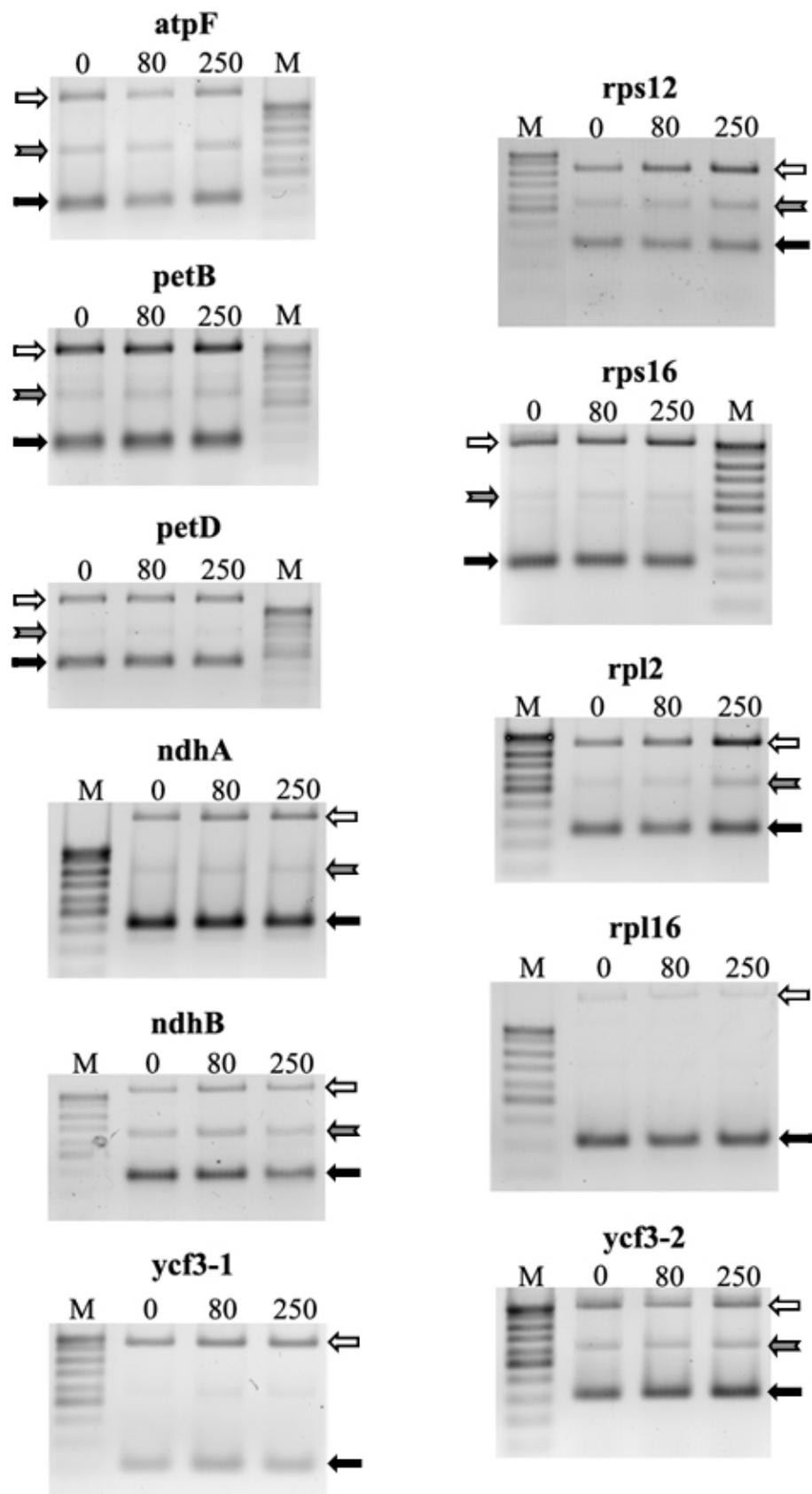


Рисунок 7. Влияние кадмия на сплайсинг мРНК в хлоропластах ячменя. (0) – 0 мкМ CdSO<sub>4</sub>, (80) – 80 мкМ CdSO<sub>4</sub>, (250) – 250 мкМ CdSO<sub>4</sub>, M – маркер “100 bp”. Стрелки – как на рисунке 5.

## 5. Изучение воздействия повышенных температур на растения кукурузы

Вторым неблагоприятным фактором среды, влияние которого мы поставили целью изучить, является повышенная температура. При 37°C растения кукурузы по многим изученным параметрам росли быстрее, чем в контрольных условиях

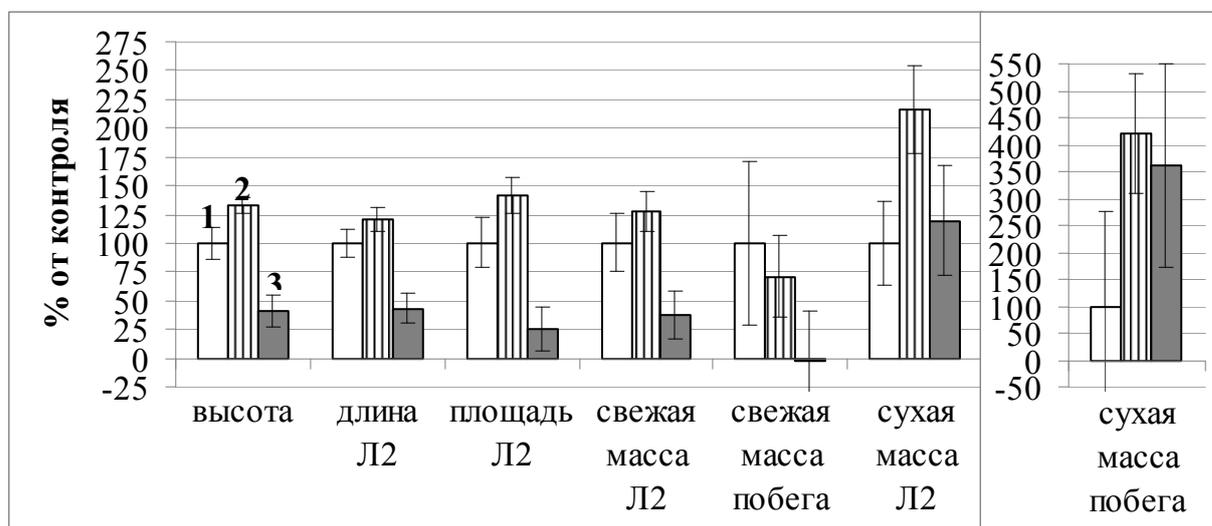


Рисунок 8. Влияние повышенных температур на прирост растений кукурузы за двое суток. 1 – 24°C (контроль), 2 – 37°C, 3 – 42°C. Л2 – второй лист. Данные приведены как средние величины  $\pm$  SE.

Таблица 4. Изменение содержания фотосинтетических пигментов в тканях листьев проростков кукурузы за двое суток при повышенной температуре

		К (24°C)	37°C	42°C
Л1	Хл а	+14 $\pm$ 45 <sup>a</sup>	+232 $\pm$ 180 <sup>a</sup>	-225 $\pm$ 142 <sup>a</sup>
	Хл б	-54 $\pm$ 11 <sup>a**</sup>	+65 $\pm$ 78 <sup>a</sup>	-58 $\pm$ 55 <sup>a</sup>
	Кар	+40 $\pm$ 10 <sup>a**</sup>	+22 $\pm$ 27 <sup>a</sup>	+23 $\pm$ 24 <sup>a</sup>
	Хл/Кар	-0,93 $\pm$ 0,19 <sup>a**</sup>	+0,35 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	-1,17 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>
Л2	Хл а	+285 $\pm$ 39 <sup>a</sup>	+458 $\pm$ 57 <sup>b*</sup>	+128 $\pm$ 129 <sup>ab</sup>
	Хл б	+46 $\pm$ 31 <sup>a</sup>	+125 $\pm$ 31 <sup>a</sup>	+29 $\pm$ 45 <sup>a</sup>
	Кар	+63 $\pm$ 20 <sup>a</sup>	+60 $\pm$ 9 <sup>a*</sup>	+32 $\pm$ 24 <sup>a</sup>
	Хл/Кар	-0,28 $\pm$ 0,33 <sup>ab</sup>	+0,43 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	-0,13 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>

Данные приведены как средние величины  $\pm$  SE. Л1– первый лист, Л2– второй лист  
К – контроль. Хл – хлорофилл, Кар – каротиноиды.

Таблица 5. Изменение содержания воды в органах кукурузы за двое суток при повышенных температурах (в процентных пунктах)

	К (24°C)	37°C	42°C
Л1	+0,9±0,2 <sup>б**</sup>	+0,1±0,1 <sup>а</sup>	-0,3±0,3 <sup>а</sup>
Л2	+1,0±0,1 <sup>б**</sup>	-0,5±0,2 <sup>а*</sup>	-1,5±0,4 <sup>а*</sup>
Стебель	+0,3±0,2 <sup>б</sup>	-1,2±0,2 <sup>а**</sup>	-1,8±0,3 <sup>а**</sup>
Корни	+0,1±0,5 <sup>б</sup>	-0,3±0,3 <sup>б</sup>	-1,3±0,3 <sup>а*</sup>
Побег	+0,6±0,1 <sup>а**</sup>	-0,9±0,2 <sup>б**</sup>	-1,4±0,3 <sup>б**</sup>

К – контроль. Л1 – первый лист. Л2 – второй лист. Данные приведены как средние величины ± SE. а-б – группы значений, различия между которыми достоверно ( $\alpha < 0,05$ ). Значение параметра у 7-дневных и 9-дневных растений отличаются достоверно: \* –  $\alpha < 0,05$ ; \*\* –  $\alpha < 0,01$ .

Таблица 6. Параметры флуоресценции хлорофилла *a* в листьях растений кукурузы после двух суток роста в условиях повышенных температур

	К (24°C)	40°C	42°C
<b>Fv/Fm</b>	0,744±0,007	0,727±0,011	0,625±0,033*
<b>Ф<sub>ФСП</sub></b>	0,619±0,021	0,565±0,004	0,403±0,024**
<b>qP</b>	0,896±0,022	0,883±0,025	0,838±0,014
<b>qN</b>	0,232±0,023	0,332±0,004**	0,442±0,016**

К – контроль. Данные приведены как средние величины ± SE. Значения, достоверно отличающиеся от контрольных при уровне значимости: \* –  $\alpha < 0,05$ ; \*\* –  $\alpha < 0,01$ .

(Рисунок 8). В большинстве случаев эти отличия не достоверны, однако, прирост сухой массы побега оказывается достоверным при 37°C. При 42°C рост кукурузы сильно подавлен относительно контроля, но не прекращался совсем. В контрольных условиях с седьмого по девятый день происходило достоверное увеличение содержания воды в тканях первого и второго листа, а также в среднем по всему побегу (Таблица 5). Содержание воды в различных органах растений кукурузы снижалось по мере увеличения температуры воздуха.

Влияние повышенных температур на функционирование электрон-транспортной цепи хлоропластов, как и в предыдущих опытах, оценивали по флуоресценции хлорофилла в тканях второго листа (совместно с к.б.н. Пшибытко Н.Л.). По данным морфометрического анализа мы не ожидали повреждающего действия от температуры 37°C, поэтому заменили её более высокой - 40°C. Влияние температуры 40°C было заметно только по небольшому увеличению нефотохимического тушения, а при 42°C нарушение фотосинтетических процессов было очевидно (Таблица 6).

## **6. Изучение влияния повышенной температуры на уровень сплайсированных мРНК и несплайсированных пре-мРНК в хлоропластах кукурузы**

Было изучено соотношение интрон-содержащих и сплайсированных форм белок-кодирующих РНК в хлоропластах при контрольной (24°C) и повышенных температурах (37°C и 42°C). При 37°C наблюдали большое разнообразие возможных реакций. Так соотношения форм РНК для *ndhB* не изменялось относительно контроля, для *petB* и *atpF* изменялось слабо, для многих генов, например *ndhA* и *rpl16*, уменьшение содержания зрелой мРНК и увеличение уровня интрон-содержащих транскриптов было явно выражено, а для гена *ycf3*, особенно его второго интрона, этот эффект при 37°C был очень сильным (Рисунок 9).

При 42°C уменьшение уровня зрелых и увеличение содержания интрон-содержащих транскриптов было заметно для всех генов (Рисунок 9). В наименьшей степени этот эффект проявился у генов *ndhB* и *petD*, в наибольшей – у *ycf3*. Уровень зрелых транскриптов за двое суток при 42°C уменьшался очень сильно, но всё же полосы, соответствующие сплайсированным РНК, были заметны. Однако транскриптов *ycf3*, у которых был бы удален второй интрон (*ycf3-2*), нам обнаружить не удалось.

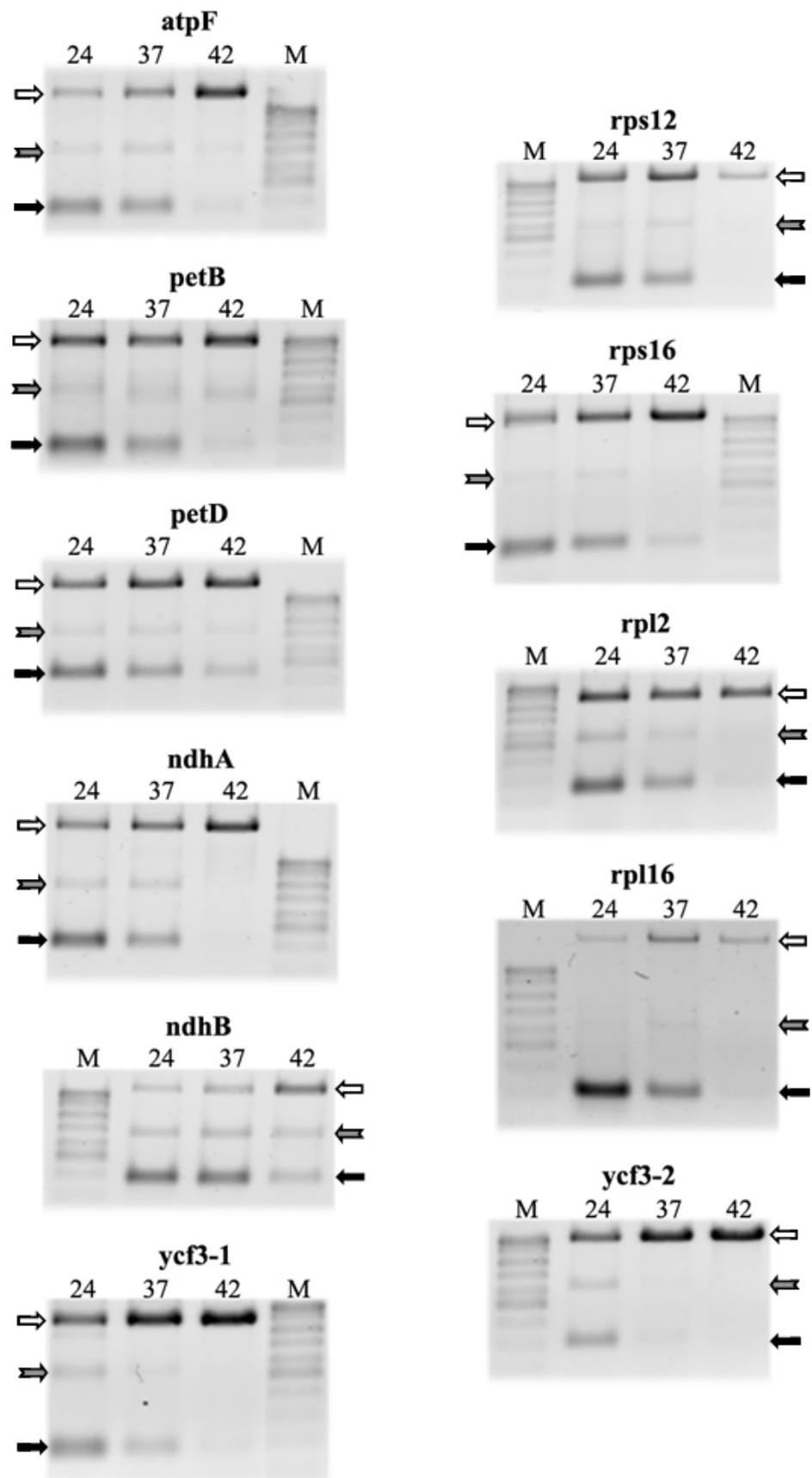


Рисунок 9. Влияние повышенных температур на сплайсинг мРНК в хлоропластах ячменя. (24) – 24°C, (37) – 37°C, (42) – 42°C, М – маркер “100 bp”. Стрелки – как на рисунке 5.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе изучено воздействие двух неблагоприятных факторов среды на сплайсинг всех интронов в пре-мРНК хлоропластов кукурузы. Предварительно была дана оценка влияния данных факторов на рост и различные физиологические процессы растений при разной силе воздействия. Были подобраны условия воздействия для проведения молекулярного анализа. Кадмий не вызывал нарушения сплайсинга у всех интрон-содержащих пре-мРНК ни в случае применения высокой концентрации кадмия 80 мкМ, ни в случае летальной концентрации 250 мкМ. У ячменя при летальной концентрации 250 мкМ кадмия наблюдалось небольшое накопление несплайсированных транскриптов без изменения уровня зрелых мРНК. Этот эффект был обнаружен для двух интронов (*rpl2* и *rps12-3'*) из 11 изученных. Такой эффект может быть вызван активацией транскрипции без изменения эффективности сплайсинга или слабым ингибированием сплайсинга. Таким образом, кадмий не оказывает существенного влияния на сплайсинг РНК в хлоропластах и не влияет на уровень зрелых мРНК, в том числе и для генов без интронов. Одной из причин этого может быть очень эффективная защита наземными растениями своих хлоропластов от поступления в них кадмия - накопление кадмия этих органеллах очень невелико (1% или менее).

В условиях повышенной температуры наблюдается другая картина. По полученным данным и данным литературы температура 37°C была охарактеризована как мягкий стресс, т.е. условие, к которому кукуруза способна приспособиться с небольшими нарушениями физиологических процессов. Однако, уже в этих условиях происходит заметное подавление сплайсинга в хлоропластах почти для всех РНК, кроме *ndhB*. При дальнейшем увеличении температуры воздуха до 42°C происходит существенное нарушение сплайсинга всех пре-мРНК в хлоропластах, а также процессов фотосинтеза и роста растений кукурузы.

## ВЫВОДЫ

- 1) В использованной нами модели постановки эксперимента концентрация кадмия 80 мкМ была высоко токсичной, но не летальной, а концентрация 250 мкМ была летальной как для кукурузы, так и для ячменя. Повышение температуры до 37°C очень слабо влияло на рост растений кукурузы, а при 42°C рост растений был подавлен сильно, но не летально.
- 2) В хлоропласты проникает малая доля кадмия, поступившего в лист (0.21% - 1.32%). Отсутствует прямая связь между накоплением кадмия в листьях и в хлоропластах.
- 3) Кадмий практически не оказывает влияния на сплайсинг пре-мРНК в хлоропластах. Обнаруженное при 250 мкМ кадмия небольшое накопление несплайсированных РНК *rps12* и *rpl2* в хлоропластах ячменя может быть результатом слабого ингибирования сплайсинга или активации транскрипции без изменения эффективности сплайсинга РНК.
- 4) Кадмий в условиях проведённых экспериментов не влияет на уровень мРНК в хлоропластах, как для генов с интронами, так и без них.
- 5) Повышение температуры ингибирует сплайсинг хлоропластных пре-мРНК. С увеличением температуры от 37°C до 42°C степень ингибирования увеличивается, что приводит к резкому уменьшению уровня зрелых мРНК в хлоропластах.

### Список публикаций по теме диссертации

#### Публикации в рецензируемых журналах:

- 1) **Лысенко Е.А., Клаус А.А., Кузнецов В.В.** (2013) Анализ интронсодержащих пре-мРНК и сплайсированных мРНК в хлоропластах кукурузы посредством ОТ-ПЦР. *Молекулярная биология, том 47, № 1*, Москва, с.124-132.
- 2) **Клаус А.А., Лысенко Е.А., Холодова В.П.** (2013) Рост растений кукурузы и накопление фотосинтетических пигментов при кратко- и долгосрочном воздействии кадмия. *Физиология растений, том 60, №2*, Москва, с.246-256.
- 3) **Lysenko E.A., Klaus A.A., Pshybytko N.L., Kusnetsov V.V.** Cadmium accumulation in chloroplasts and its impact on chloroplastic processes in barley and maize. Статья направлена в журнал *Photosynt. Res.*

## Материалы конференций:

- 1) **Лысенко Е.А., Зарипова Н.Р., Клаус А.А., Кузнецов В.В.** (2010) Сравнительный анализ влияния различных стрессоров на экспрессию пластидных генов на примере воздействия теплового шока (ТШ) и кадмия (Cd). *Сборник тезисов докладов всероссийского симпозиума "Растения и стресс"*, Москва, с. 223-224.
- 2) **Клаус А.А., Лысенко Е.А., Холодова В.П., Кузнецов В.В.** (2011) Поглощение кадмия и его влияние на рост и накопление фотосинтетических пигментов растениями кукурузы при кратко- и долгосрочном выращивании. *Сборник тезисов VII съезда Общества физиологов растений России*, Нижний Новгород, с. 338-339.
- 3) **Клаус А.А., Лысенко Е.А., Холодова В.П.** (2011) Замедление роста и развития растений кукурузы и снижение накопления фотосинтетических пигментов в условиях кадмиевого стресса. *Сборник тезисов всероссийского симпозиума "Экология мегаполисов: фундаментальные основы и инновационные технологии"*, Москва, с. 79.
- 4) **Клаус А.А.** (2012) Накопление кадмия растениями кукурузы и его влияние на рост, развитие и накопление фотосинтетических пигментов. *Сборник тезисов докладов XIX международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов-2012"*, Москва, с. 244.
- 5) **Клаус А.А., Пшибытко Н.Л., Лысенко Е.А.** (2013) Сравнительный анализ реакции ячменя и кукурузы на кадмий: сходства и отличия. *Сборник тезисов всероссийской конференции "Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях и техногенной среде"*, Иркутск, с. 114-115.
- 6) **Лысенко Е.А., Клаус А.А., Пшибытко Н.Л.** (2013) Поступление кадмия в хлоропласты и его влияние на отдельные параметры фотосинтеза и рост проростков. *Сборник тезисов докладов всероссийской научной конференции с международным участием "Инновационные направления современной физиологии растений"*, Москва, с. 19-20.
- 7) **Лысенко Е.А., Клаус А.А., Пшибытко Н.Л.** (2013) Две возможные стратегии адаптации растений к поступлению кадмия в побег на примере двух видов злаков. *Сборник тезисов докладов всероссийской научной конференции с международным участием "Инновационные направления современной физиологии растений"*, Москва, с. 296-297.
- 8) **Лысенко Е.А., Клаус А.А., Пшибытко Н.Л., Кузнецов В.В.** (2014) Поступление кадмия в хлоропласты растений и его влияние на экспрессию генов и активность фотосинтетического аппарата. *Сборник тезисов докладов годовичного собрания Общества физиологов растений России "Физиология растений - теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий"*, Калининград, с. 78-79.
- 9) **Lysenko E.A., Klaus A.A., Pshybytko N.L., Kusnetsov V.V.** (2014) Cadmium uptake into chloroplasts and its impact on chloroplastic mRNAs, proteins and energy quenching. *Proceedings of abstracts of International conference "Photosynthesis research for sustainability"*, Pushino, p. 105.