степень индукции гена *PR-1B* была существенно выше, чем при использовании клеток немутантного штамма.

С учетом имеющихся в литературе сведений по контролю экспрессии *PR*-генов *S. lycopersicum* наши данные позволяют говорить о двоякой роли белка DspE бактерий *Pca* при взаимодействии с этими растениями. С одной стороны, продукция этого белка немутантными бактериями (и доставка его в клетки растений) очевидно усиливает индукцию нескольких *PR*-генов (*PR-2*, *PR-5x* и *PR-5*), что соответствует характеру наблюдаемого взаимодействия бактерий с устойчивыми растениями. С другой стороны, существенно большая индукция *PR-1B* клетками штамма дикого типа в сравнении с клетками *dspE*-мутанта может свидетельствовать об участии эффекторного белка DspE в супрессии этого *PR*-гена растения, что может быть выгодным для патогена при инфекции чувствительного растения. Следует также отметить несколько неожиданную DspE-независимую индукцию маркера РГ (HSR515) в клетках листьев, непосредственно не контактировавших с патогеном.

1. *Николайчик Е.А., Овчинникова Т.В., Валентович Л.Н., Губич О.И., Шолух М.В., Евтушенков А.Н.* Транслокация белка DspE фитопатогенными бактериями *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* в клетки *Nicotiana tabacum* и его необходимость для индукции реакции гиперчувствительности // Доклады НАН Беларуси. 2005. т.49,№5. с. 81-85
2. *Николайчик Е.А., Лагоненко А.Л., Валентович Л.Н., Присяжненко О.К., Евтушенков А.Н.* Сравнительная характеристика харпинов HrpN *Erwinia carotovora* и *Erwinia amylovora* // Докл. НАН Б. 2007.Т.51, №3. С. 81-85
3. *Лагоненко А.Л., Николайчик Е.А., Евтушенков А.Н.* Характеристика харпина HrpW бактерий *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* // Докл. НАН Б. 2006. Т.50, №1. С. 70−73.

ИЗУЧЕНИЕ ОТВЕТА НА ХОЛОД И ЯРКИЙ СВЕТ МУТАНТА *NFZ24 ARABIDOPSIS THALIANA*

М.Г. Новокрещенова

Биологический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия

maria.novok@gmail.com

Холодовой стресс один из главных лимитирующих факторов развития и продуктивности растений в России. Адаптация растений к стрессу включает как морфологийеские, физиологические так и биохимические изменения. Один из важнейших регуляторов, который контролирует не только рост и развитие, но и ответы на воздействия окружающей среды, является гормон абсцизовая кислота (АБК). АБК играет важную роль во многих клеточных процессах и ответах на абиотические стрессы, в том числе низкую температуру. Анализ мутантов с измененной чувствительностью к стрессовым факторам – один из эффективных методов выявления генов, контролирующих адаптивный ответ. *Arabidopsis thaliana* является модельным растением, геном которого полностью секвенирован и для которого получены мутанты с измененной чувствительностью к разным абиотическим факторам. К сожалению, большинство исследований таких мутантов ограничиваются анализом чувствительности/устойчивости к отдельным стрессовым факторам, что не позволяет оценить всех последствий мутационных изменений для растения, а значит и перспектив использования мутантных генов этого вида для улучшения адаптивных свойств у хозяйственно ценных растений.

В данной работе исследован мутант *nfz24*, выделенный на кафедре генетики МГУ с помощью химического мутагенеза по устойчивости к индуктору окислительного стресса гербициду норфлуразону, который ингибирует биосинтез каротиноидов, вызывает фотодеструкцию хлорофилла и гибель растений. Мутант *nfz24* имеет светлую желто-зеленую окраску листьев и стебля, и, по данным проведенных ранее исследований,

проявляет перекрестную устойчивость к другому индуктору окислительного стресса – параквату. В то же время, при воздействии низких положительных температур мутант *nfz24* показывает большую чувствительность к холоду, чем растения дикого типа расы *Dijon-M* [1, 2]. Такая высокая чувствительность мутанта *nfz24* к гипотермии может быть связана с дефицитом каротиноидах (до 30 % от дикого типа), хотя по соотношению разных форм каротиноидов растения мутанта и дикого типа практически не различались (рис. 1).

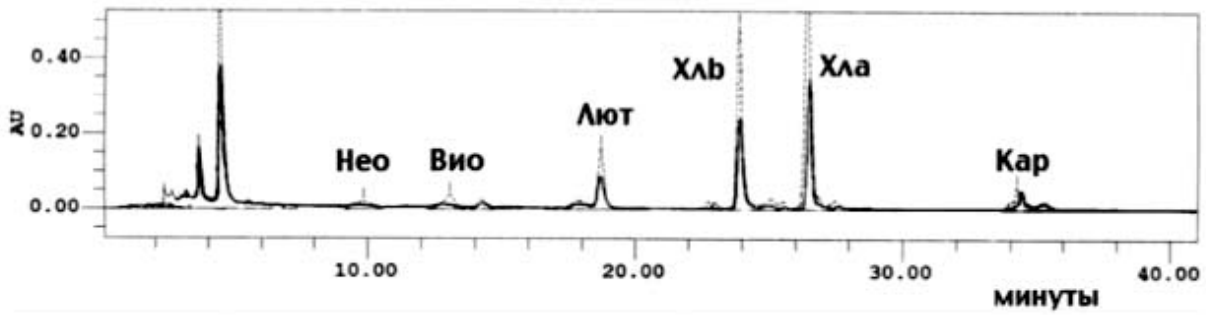

Рис. 1. Хроматограмма содержания пигментов в контрольной расе *Dijon-M* (серая линия) и в мутанте *nfz24* (черная линия).

Методом полуколичественного ПЦР-анализа продуктов обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) изучили экспрессию генов АБК-зависимого и АБК-независимого ответа на холодовой стресс в растениях, выращиваемых при температуре +20 °С (контроль) и подвергнутых холодовому воздействию (+4 °С). Уровень экспрессии АБК-зависимого гена *RAB18,* который кодирует гидрофильный белок из семейства дегидринов, в растениях мутантной линии оказался в три раза ниже в контрольных условиях, чем в растениях дикого типа (рис. 2).

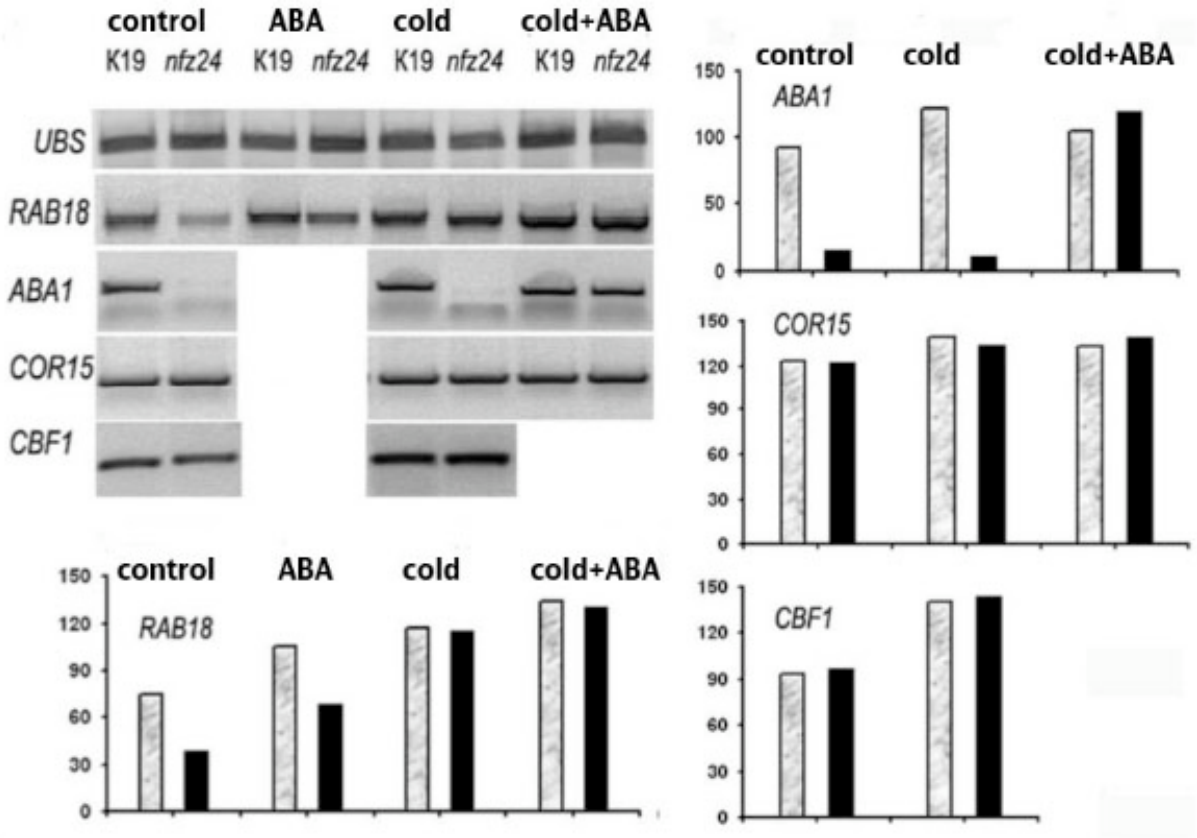

Рис. 2. Относительный уровень транскрипции генов холодового ответа *ABA1*, *COR15A*, *CBF1* и *RAB18* в растениях дикого типа (серый) и мутанта *nfz24* (черный). Данные ОТ-ПЦР и расчитанный по ним относительный уровень экспрессии генов. Содержание кДНК выравнивали по контрольному гену UBS.

Ранее было показано, что существует прямая зависимость концентрации мРНК гена *RAB18* от содержания АБК в растении, поэтому по уровню экспрессии этого гена можно оценивать относительный уровень эндогенной АБК в растениях [3]. При холодовом стрессе количество транскрипта *RAB18* в растениях мутанта и дикого типа становится близким (рис. 2), что можно объяснить индукцией под действием холода синтеза эндогенной АБК не только в растениях дикого типа, но и у мутанта *nfz24*. При совместном действии холода и экзогенной АБК уровень экспрессии гена *RAB18* увеличивался еще значительнее в равной степени у мутанта и дикого типа. Экспрессия гена *ABA1 (LOS6),* контролирующего синтез АБК, в растениях мутанта существенно ниже (более, чем в 8 раз), чем в контрольных растениях дикого типа (рис. 2). При холодовом воздействии в растениях дикого типа экспрессия гена *ABA1* повышалась, в то время как у мутанта она оставалась на низком уровне. При совместном действии холода и АБК экспрессия гена *ABA1* в растениях дикого типа практически не изменялась по сравнению с холодовой обработкой, а в растениях мутанта увеличивалась в 10 раз, достигая уровня транскрипции этого гена в растениях дикого типа после воздействия холода (рис. 2). Холодовое воздействие незначительно повышало экспрессию гена *CBF1,* кодирующего транскрипционный фактор, в растениях дикого типа и мутанта (рис. 2), но практически не влияло на уровень экспрессии гена *COR15a,* который кодирует гидрофильный белок, находящийся в строме хлоропласта (рис. 2). Таким образом, анализ транскрипции генов, контролирующих разные пути холодового ответа показал, что у мутанта *nfz24* наблюдается изменение экспрессии генов АБК-зависимого холодового ответа (*RAB18*, *ABA1*), но практически не изменена (по сравнению с диким типом) экспрессия генов не регулируемых (*CBF1*) или частично (*COR15a*) регулируемых АБК.

Измененный ответ на пониженную температуру и на яркий свет были продемонстрированы ранее для мутантов ячменя [4]. Мутант *nfz24* показал более высокий уровень устойчивости к воздействию яркого света по сравнению с растениями дикого типа. В контрольных условиях (150 мкЕ, 14 ч/с) растения дикого типа в возрасте четырех недель переходили к стадии цветения и начинали формировать цветонос, в то время как растения мутанта *nfz24* находились на стадии розетки. После воздействия ярким светом (300 мкЕ, 14 ч/с) в течение недели у растения расы *Dijon-M* прирост числа листьев и увеличение длины цветоноса не были значительным (рис. 3).

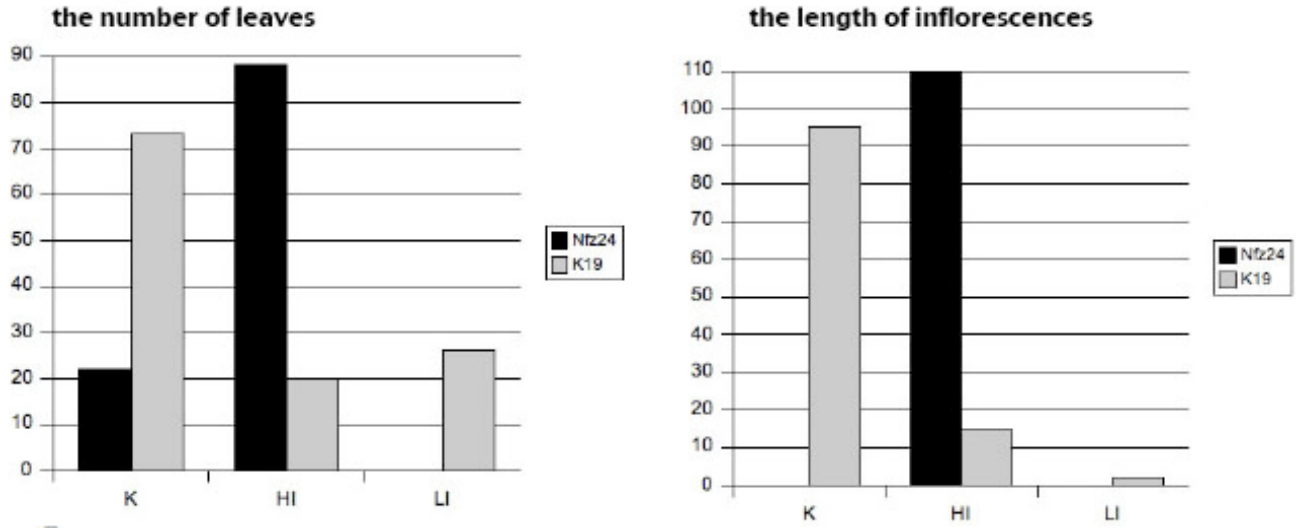

Рис. 3. Изменение морфометрических показателей (увеличение числа листьев (слева), удлинение цветоноса (справа)) растений мутанта *nfz24* (черный) и дикого типа (серый) в процентах от контроля.

В отличие от оставленных в контрольных условиях растений *nfz24*, которые так и оставались на стадии розетки, на ярком свету растения мутанта характеризовались значительным приростом числа листьев и высоты цветоноса (рис. 3). Эти результаты могут быть объяснены тем фактом, что АБК регулирует не только холодовой ответ, но также и передачу светового сигнала и ответ на изменение интенсивности освещения [5] (рис. 4).

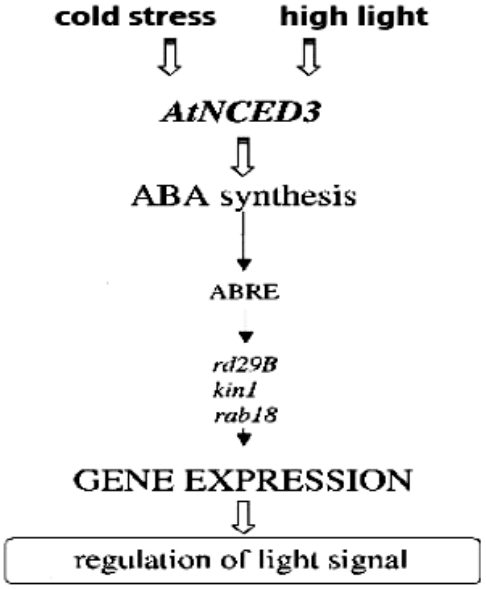

Рис. 4. Рабочая модель ответа *A. thaliana* на холод и яркий свет [по 5].

Для изучение причины толерантности к яркому свету исследовали уровень транскрипции генов антиоксидантных систем: *sApx* (стромальной аскорбатпероксидазы), *CSD2* (магний/цинк супероксиддисмутазы) и *PrxRQ* (пероксиредуксина), поскольку эти гены участвуют в детоксикации радикалов кислорода и перекиси водорода, в том числе и при гипотермии [6, 7]. Нами установлено, что исходный уровень транскрипции гена *sApxd* в растениях мутантной линии *nfz24* ниже, чем в растениях расы *Dijon-M*, но при воздействии холодом, этот уровень значительно повышается по сравнению с диким типом (рис. 5 А).

Аналогично, но менее выражено ведет себя ген из семейства супероксиддисмутаз *CSD2* (рис. 5 А).При совместном воздействии холода и АБК уровень экспрессии гена *sApxd* в растениях расы *Dijon-M* повышается в три раза по сравнению с контрольным уровнем. Это значение у мутанта *nfz24* достигает лишь уровня в растениях дикого типа под воздействием только холода. Транскрипция гена *PrxQ* в контрольных условиях в растениях мутанта сравнима с таковой в растениях расы *Dijon-M*. Под воздействием холода, как и под совместным воздействием холода и экзогенной АБК, в растениях дикого типа экспрессия снижается. В то же время транскрипция гена *PrxQ* в растениях мутанта *nfz24* под воздействием холода не изменяется, и повышается под совместным воздействием холода и АБК. Изменение уровня транскрипции данных генов в условиях разной освещенности представлена на рис. 5 Б.

Таким образом, при воздействии холода и яркого света выявляются различия в ответе мутанта на уровне транскрипции генов по сравнению с диким типом. Следовательно, мутант *nfz24* характеризуется повышенной активностью антиоксидантных систем не только при действии гербицидов, но и при воздействии других стрессовых факторов, одной из составляющих которых является повышение уровня активированного кислорода и перекисей. В то же время эта активация недостаточна для обеспечения устойчивости мутанта к холоду.

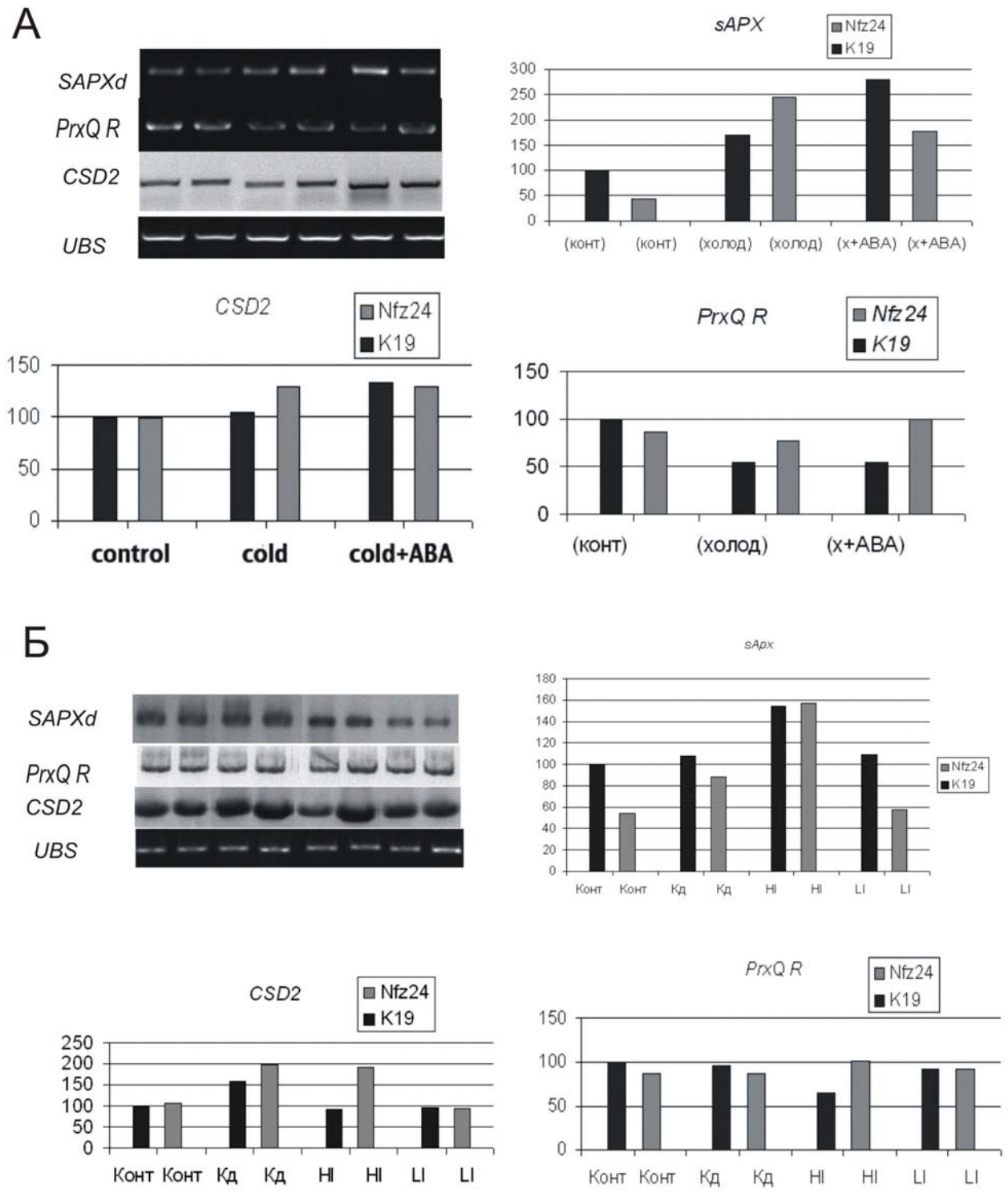

Рис. 5. Пояснения в тексте.

Автор выражает глубокую благодарность доктору Т. Ежовой и профессору Б. Гримму за помощь в проведении исследований. Работа поддержана грантами РФФИ (проект 07-04-12077-офи), ФЦП «Ведущие научные школы» (НШ-4202.2008.4).

1. *Ежова Т.А., Солдатова О.П., Маманова Л.Б., Мусин С.М., Гримм В., Шестаков С.В.* Коллекция мутантов *Arabidopsis thaliana* с измененной чувствительностью к индукторам окислительного стресса. Известия РАН. 2001. №5б С. 533-543.

2. *Волкова Л.А., Бургутин А.Б., Солдатова О.П., Ежова Т.А., Лапшин П.В.* Влияние параквата и гипотермии на устойчивые к норфлуразону мутанты *Arabidopsis thaliana* и полученные из них клеточные культуры. Физиология растений. 2005, 52 (3).С. 421-429.
3. *Parcy F., Giraudat J.* 1997. Interactions between the ABI1 and the ectopically expressed ABI3 genes in controlling abscisic acid responses in *Arabidopsis* vegetative tissues // Plant J. Vol. 11 (4). P. 693–702.
4. *Marcin Rapacz, Barbara Wolanin, Katarzyna Hura, Miroslaw Tyrka* 2008 The effects of cold acclimation on photosynthetic apparatus and the expression of COR14b in four genotypes of barley (*Hordeum vulgare*) contrasting in their tolerance to freezing and high-light treatment in cold conditions // Ann Bot. vol. 101 (5) pp. 689-99.
5. *Chang-Hyo Goh, Hong Gil Nam, Yu Shin Park* 2003 Stress memory in plants: a negative regulation of stomatal response and transient induction of rd22 gene to light in abscisic acid-entrained *Arabidopsis* plants // Plant J. vol. 36 (2) pp. 240-55.
6. *Kliebenstein D.J., Monde R.A., Last R.L.* Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: An eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization // Plant Physiol. 1998. V. 118. P. 637-650.
7. *Miller E., Schreier P.* Stadies on flavonol degradation by peroxidase (donor H2O2-oxidoreductase, EC 1.11.1.7) Part 1: kaempferol // Food Chem. 1985 V. 17. P. 143-154.

СИСТЕМНАЯ АКТИВАЦИЯ ФАГОЦИТОВ КАК ВОЗМОЖНАЯ ПРИЧИНА РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА

Д.Р. Петренёв

ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси», Гомель, Беларусь
danse@tut.by

В последние десятилетия изучение молекулярных механизмов воздействия на организм малых доз ионизирующего излучения (ИИ) и оценка отдалённых последствий облучения стало одной из основных задач радиационной биологии. Зачастую последствия действия малых доз радиации носят стохастический характер и демонстрируют проявление немишенных или опосредованных эффектов облучения. Наибольший интерес представляют такие феномены как «нестабильность генома», «адаптивный ответ» и «эффект свидетеля» (bystander effect). Суть последнего явления заключается в том, что эффекты облучения выявляются не только в пораженных радиацией клетках, но и в соседних. Этот эффект выявляется как на клеточных культурах, так и в целостном организме [1-3]. Так сыворотка облучённых организмов при внесении в среду культивирования способна вызывать повышение количества генетических аномалий в культуре клеток, не подвергавшихся облучению, а облучение отдельных частей тела приводит к увеличению количества выявляемых генетических перестроек в клетках необлучённых тканей. Среди идентифицированных факторов, обладающих подобным эффектом, выделяют провоспалительные цитокины, свободные радикалы и некоторые продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ). Эти соединения являются кластогенными факторами и играют важную роль в индукции нестабильности генома [3, 4].

Среди отдалённых эффектов воздействия на организм ионизирующего излучения нестабильность генома остаётся наиболее загадочным феноменом. Это явление характеризуется появлением у потомков облучённых клеток неклональных мутаций и аберрантного кариотипа, т.е. повышенный уровень генетических нарушений выявляется спустя длительный срок после облучения, а выявленные нарушения не могут являться прямым следствием воздействия радиации [1, 3]. По нашему мнению одной из причин индукции нестабильности генома является усиление эндогенной продукции свободных радикалов в облучённом организме и формирование состояния называемого окислительным стрессом. Известно, что повышенный уровень продукции свободных радикалов и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) наравне с истощением антиокислительных, детоксикационных и репарационных систем организма приводит к увеличению регистрируемого количества мутаций и хромосомных аберраций, т.е. формированию