

3. Доманская И.Н., Самович Т.В., Будакова Е.А., Спивак Е.А., Филиппенко С.В., Шалыго Н.В. Уровень экспрессии генов защитной антиоксидантной системы как показатель устойчивости ячменя к почвенной засухе // 9 съезд БООФИБ, Минск, 2010, С.141-143.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ЗАЩИТНЫХ БЕЛКОВ МИТОХОНДРИЙ В ПРОРОСТКАХ ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE*) ПРИ СОВМЕЩНОМ ДЕЙСТВИИ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ И ОВОДНЕНИЯ

Дремук И.А., Шалыго Н.В.

*ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии
НАН Беларуси», Минск, Беларусь*

В условиях абиотического стресса в клетках растений реализуется программа избирательной экспрессии генов, в регуляции которой непосредственное участие принимают митохондрии [1]. Известно, что низкотемпературный стресс приводит к изменениям липидного состава митохондриальных мембран, нарушению функционирования электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) и увеличению уровня экспрессии генов защитных белков, в частности, альтернативной оксидазы (АО) и АТФ/АДФ-антипортера, участвующих в защите клетки от окислительного стресса [2,3]. Имеются данные о снижении уровня экспрессии генов АО в условиях гипоксии [1]. Целью нашей работы явилось изучение влияния совместного действия низкой температуры (НТ) и оводнения, т.е. избыточного увлажнения (ИУ) на уровень экспрессии генов митохондриальных белков - АТФ/АДФ-антипортера (*ANT*) и АО (*AOX1*), в зеленых проростках ячменя.

В качестве объекта исследования использовали зеленые проростки ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Гонар, выращенные при температуре +23°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) в режиме 14 ч света интенсивностью 150 мкмоль квантов/(м²·с) и 10 ч темноты. Для моделирования совместного действия низкотемпературного стресса и оводнения 5-дневные растения ячменя на 3-е суток помещали в холодильную камеру с температурой +4°C (стрессовый период) и указанным выше фотопериодом и заливали водой до середины coleoptilia, после чего растения возвращали на 3-е суток в нормальные условия выращивания (постстрессовый период). Пробы для исследования брали через 24 и 72 ч после начала действия стресса, а также

через 72 ч после прекращения действия стрессовых факторов. Контролем служили растения ячменя, выращенные в нормальных условиях. В качестве дополнительных контролей использовали растения, находившиеся в условиях НТ (+4°C) с нормальным водоснабжением, а также растения, находившиеся в условиях избыточного увлажнения при температуре +23°C. Уровень экспрессии генов *ANT* и *AOX1* определяли методом ПЦР-анализа с использованием ген-специфичных праймеров для АТФ/АДФ-антипортера и АО, а также гена-нормализатора – 18S rRNA, с последующей визуальной идентификацией полученных продуктов амплификации после разделения в агарозном геле.

Установлено, что в первые сутки совместного действия НТ и оводнения, а также их раздельного воздействия уровень экспрессии гена *ANT* практически не изменялся по сравнению с контролем. Однако в последующие 2-е суток совместного действия НТ и ИУ, а также воздействия только НТ происходило увеличение экспрессии данного гена в среднем на $27 \pm 5\%$, достигая в постстрессовый период уровня контроля (рис.1 А, Б).

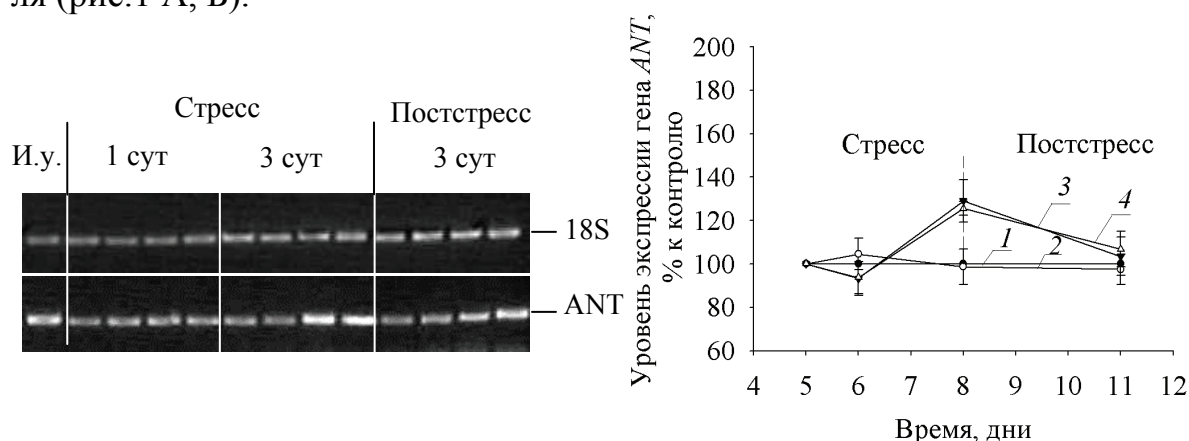


Рисунок 1 – Внешний вид геля (А) и уровень экспрессии гена *ANT* в стрессовый и постстрессовый период (Б) в контрольных растениях (1), а также избыточном увлажнении (2), действии низкой температуры (3) и при совместном действии данных стрессоров (4).

И.у. – исходный уровень

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что увеличение уровня экспрессии гена *ANT* при совместном действии НТ и ИУ обусловлено влиянием НТ.

В первые сутки совместного действия 2-х стрессовых факторов (НТ и ИУ) и действия одной НТ происходило увеличение уровня экспрессии гена *AOX1* на $20 \pm 6\%$ и $44 \pm 8\%$ соответственно. Такое изменение уровня экспрессии данного гена при совместном действии 2-х стрессовых фак-

торов может быть связано с характерным для низкотемпературного стресса нарушением функционирования ЭТЦ митохондрий, и, как следствие, образованием H_2O_2 , выступающего в роли сигнальной молекулы. Однако через 3 суток совместного действия НТ и ИУ экспрессия гена *AOX1* снижалась также, как и при действии ИУ (Рис. 2 А, Б). Это, вероятно, связано с тем, что АО обладает низким сродством к кислороду, снижение концентрации которого в условиях избыточного увлажнения приводит к уменьшению синтеза данного белка.

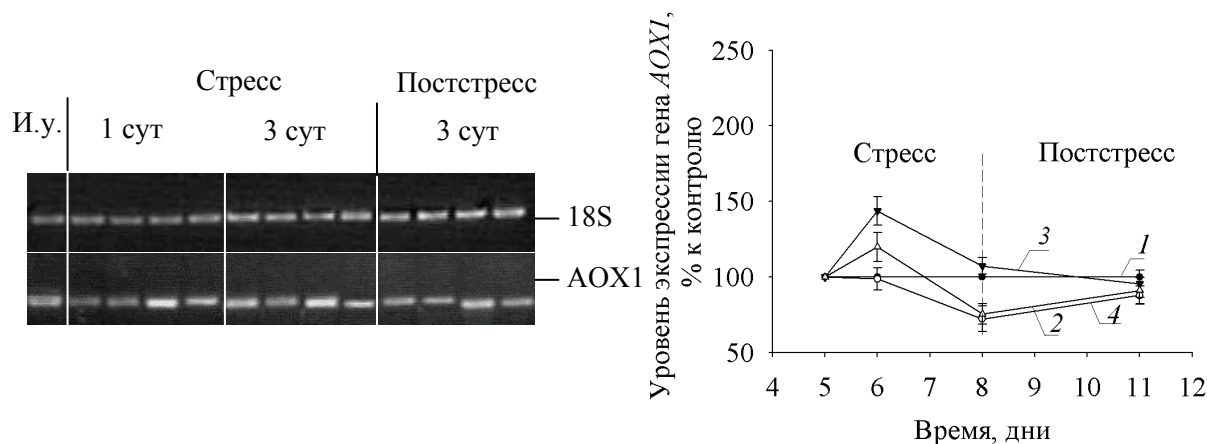


Рисунок 2 – Внешний вид геля (А) и уровень экспрессии гена *AOX1* в стрессовый и постстрессовый период (Б) в контрольных растениях (1), а также избыточном увлажнении (2), действии низкой температуры (3) и при совместном действии данных стрессоров (4).

И.у. – исходный уровень

Таким образом, полученные данные указывают на то, что совместное действие НТ и ИУ, а также их раздельное воздействие приводит к дифференциальной экспрессии генов *ANT* и *AOX1*, кодирующих стрессовые белки митохондрий - АТФ/АДФ-антипортер и альтернативную оксидазу соответственно. При этом модификация активности гена *ANT* обусловлена влиянием низкой температуры, в то время как изменение активности гена *AOX1* связано с действием избыточного увлажнения.

Литература

1. Юрина Н.П., Одинцова М.С. Сигнальные системы митохондрий: ретроградная регуляция у растений // Физиология растений. – 2010. – Vol. 57. – Р. 7 – 19.

2. Taylor N.L., Heazlewood J.L., Day D.A., Millar A.H. Differential impact of environmental stresses on the pea mitochondrial proteome // Mol. Cell. Proteomics. – 2005. – Vol. 4. – P. 1122 – 1133.
3. Van Aken O, Giraud E, Clifton R, Whelan J. Alternative oxidase: a target and regulator of stress responses // Physiol. Plant. – 2009. – Vol. 137. – P. 354 – 361.

СИСТЕМА СИНТЕЗА И ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ ПРОТОХЛОРОФИЛЛИДА ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ ПРОЦЕССОВ ДЫХАНИЯ В ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКАХ ЯЧМЕНЯ

Евдокимова О.В., Кабашникова Л.Ф., Савченко Г.Е.

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
Минск, Беларусь, ewdokimova@inbox.ru*

Регуляция энергетического обеспечения биогенеза фотосинтетического аппарата – одна из важных проблем мембранной биофизики растений, тесно связанных с изучением механизмов взаимодействия внутриклеточных органелл. Интересным объектом для ее исследования являются этиолированные проростки злаков, накапливающие предшественник хлорофилла (Хл) – протохлорофиллид (Пд). Пд депонируется в мембранах этиопластов в виде длинноволновой фотоактивной формы (максимум флуоресценции при 657 нм) в составе комплексов с ферментом Пд-оксидоредуктазой (ПОР) и НАДФН, а также не содержащей кофермента неактивной коротковолновой формы (максимум при 633 нм) [1]. Известно, что соотношение форм Пд в изолированных этиопластах изменяется под влиянием экзогенной АТФ [2]. В нашей работе мы попытались оценить влияние нарушений энергетических процессов в клетке на ранние стадии биосинтеза Хл по спектральным характеристикам Пд, его способности к фотовосстановлению и ресинтезу *in vivo*.

Исследования проводили на 7-дневных проростках ячменя (сорт Гонар), выращенных при 22°C в темноте. Срезанные листья переносили на 3 ч на водопроводную воду (контроль), ингибитор гликолиза фторид натрия (50 мМ) и ингибитор цитохром-с-оксидазы азид натрия (5 мМ). В конце инкубации листья освещали 1 мин светом люминесцентной лампы (30 мкМоль м⁻² с⁻¹) и вновь помещали в темноту. Изучали спектральные превращения пигментов (спектрофлуориметр “Solar CM 2203”, Беларусь) и изменение их содержания в ацетоновых экстрактах.