

7. Кунах В.А. Биотехнология лекарственных растений. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи.— К.: Логос, 2005.— 724 с.

8. Спиридонова Е.В., Адноф Д.М., Андреев И.О., Кунах В.А. Динамика изменений генома каллусных тканей раувольфии змеиной при переводе в условия глубинного выращивания // Цитология и генетика.— 2008.— Т.42, №2.— С. 35–41.

#### **Резюме**

ISSR-аналіз 9 клітинних ліній *U. victoris*, отриманих від однієї рослини, показав, що тривале культивування *in vitro* супроводжується перебудовами міжмікросателітних ділянок геному, які призводять до дивергенції ліній. Генетичні відстані Жакарда між лініями склали від 0 до 3,73%. Не виявлено залежності рівня мінливості від складу живильного середовища та способу вирощування.

ISSR-анализ 9 клеточных линий *U. victoris*, полученных от одного растения, показал, что длительное культивирование *in vitro* сопровождается перестройками межмикросателлитных участков генома, и приводит к дивергенции клеточных линий. Генетические расстояния Жакарда между линиями составили от 0 до 3,73%. Не выявлено зависимости уровня изменчивости от состава питательной среды и способа выращивания.

ISSR-analysis of nine *U. victoris* cell lines generated from the same plant revealed the variability of inter simple sequence repeat markers to be induced by long term culture *in vitro*, which resulted in divergence of the lines. Jacquard's genetic distances between cell lines varied from 0 to 3.73%. No relationship was found between variability level and of nutrient medium content as well as mode of maintenance.

**ВЕСЕЛОВ Д.С., АХИЯРОВА Г.Р.**

*Институт биологии УНЦ РАН, Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 69*

### **ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ АКВАПОРИНОВ У РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ ПРИ ОСМОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ**

Способность сохранять баланс между поглощением и потерей воды очень важно для растений, поскольку водоснабжение и транспирация могут изменяться очень быстро в естественных условиях. В течение долгого времени внимание исследователей было сосредоточено на механизмах, позволяющих контролировать потерю воды с помощью изменения устьичной проводимости [1]. Открытие водных каналов аквапоринов и раскрытие механизмов, контролируемых их число и активность, сместило акценты в сторону изучения регуляции поглощения воды с помощью изменения гидравлической проводимости тканей. Аквапорины могут увеличивать транспорт воды через мембраны, уменьшая их гидравлическое сопротивление [2]. Роль аквапоринов в регуляции водных отношений при водном дефиците хорошо изучена, однако их экспрессия в этих условиях может увеличиваться, уменьшаться или совсем не изменяться [3]. Считается, что увеличение и снижение экспрессии аквапоринов и соответствующие изменение проницаемости мем-

бран для воды имеет важное значение для сохранения водного статуса растений. В первом случае уменьшение водной проницаемости мембран клеток корня предотвращает выход воды из корня в почву [4]. Во втором случае высокий уровень аквапоринов может увеличивать поглощение воды при водном дефиците [5]. Считается, что вклад обоих типов ответов может изменяться в зависимости от интенсивности и продолжительности стресса [3]. Таким образом, цель работы состояла в изучении влияния дефицита воды, создаваемого путем добавления полиэтиленгликоля в питательную среду на экспрессию генов у растений кукурузы.

### **Материалы и методы**

Эксперименты проводили на 7-суточных растениях кукурузы (*Zea Mays L.*, линия В73). Дефицит воды создавали с помощью 12% раствора нейтрального осмотика ПЭГ 6000. Влияние водного дефицита изучали при двух температурных режимах — 23 и 28 °С. Транспирацию определяли весовым методом. Тотальную РНК экстрагировали из свежих листьев и корней, используя мининабор RNeasy для растений (Qiagen, Maryland, USA). Образцы листьев делили на экспонированную часть (листовая пластина) и часть в основании листа внутри пазухи длиной 3–4 см. Первая является зрелой частью листа, вторая — его зоной роста. Во время экстракции РНК проводили ферментативное разрушение ДНК с помощью ДНКазы в соответствии с рекомендациями производителя. Для ПЦР реакции использовали реакциюную смесь QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen). РТ-ПЦР в реальном времени проводили с помощью ABI PRISM7700 (Applied Biosystems), сначала при 95 °С в течение 15 мин, за которым следовало 40 циклов (95 °С, 15 сек; 58 °С, 30 сек; 72 °С, 30 сек). Относительную количественную оценку проводили с использованием 26S rRNA для нормализации выхода РНК как описано (PE Applied Biosystems (2001) User Bulletin#2). Определение транскрипционной активности генов ZmPIP проводили как описано [6].

### **Результаты и обсуждение**

Было изучено влияние на растения добавления ПЭГ в питательный раствор. Выбор кукурузы был обусловлен тем, что аквапорины наиболее хорошо изучены у растений этого вида.

При добавлении ПЭГ в питательный раствор транспирация растений кукурузы снижалась. Степень ингибирования была значительно больше в случае высокой температуры (примерно 50% и 40% от уровня контроля при 23 и 28 °С соответственно). Уменьшение уровня транспирации неизбежно приводило к снижению гидравлической проводимости вследствие того, что снижение транспирации уменьшало долю апопластного пути, т.е. пути с меньшим гидравлическим сопротивлением, в общем транспорте воды [7]. При этом значение мембранного транспорта должно было возрасти, и важно было попытаться выявить возможную роль аквапоринов в регуляции транспирационного потока воды по растению. Мы попытались выяснить, не связаны ли различия в реакции на ПЭГ при двух температурных режимах с

уровнем экспрессии и содержанием аквапоринов плазматической мембраны (PIP).

Анализ данных о влиянии осмотического стресса на растения кукурузы показывает следующее. Экспрессия генов аквапоринов в корнях и дифференцированной зоне листьев в большинстве случаев резко возрастала при действии ПЭГ при обеих температурах, в то время как содержание соответствующих белков увеличивалось в меньшей степени, а в некоторых случаях не отличалось от контроля или даже снижалось ниже его уровня. В некоторых других экспериментах уровень мРНК аквапоринов не отражал количества транслированного продукта [8]. В нашем случае мы смогли найти всего несколько примеров пропорциональности изменений уровня транскрипта и продукта его трансляции. Так, в случае PIP2;6 снижение содержания белка в корнях ниже уровня контроля на фоне высокой температуры можно было связать со снижением уровня транскрипта. Еще один пример пропорциональности изменений уровня экспрессии и содержания продукта — повышение уровня экспрессии PIP 2;5 гена и количества его продукта в корнях через 8 часов действия ПЭГ при нормальной температуре и пропорциональное снижение экспрессии гена PIP и его продукта в зоне роста листа при повышенной температуре через 8 часов действия ПЭГ. Но в большинстве других случаях такого соотношения выявить не удавалось. Уровень экспрессии генов во многих случаях возрастал гораздо сильнее, чем содержание кодируемых ими белков, а в некоторых случаях на фоне возрастания количества транскрипта содержание соответствующего белка не менялось или даже снижалось ниже уровня контроля. Различия в изменении уровня транскрипта и продукта его трансляции можно объяснить тем, что концентрация белка зависит от многих факторов, кроме уровня экспрессии гена (скорости трансляции, стабильности белка и т.д.) [8]. Высказывалось предположение о том, что активные формы кислорода (ROS), которые образуются при многих стрессах [9] инициируют цепь реакций с удалением электронов, которые могут привести к деструкции биоактивных молекул, таких как аквапорины [10]. Деструкцией аквапоринов при стрессе можно объяснить то, что их количество только слегка увеличивалось (или не увеличивалось совсем, а даже снижалось) под воздействием ПЭГ, несмотря на огромное увеличение уровня мРНК аквапоринов. Таким образом, повышение уровня транскрипции аквапоринов могло способствовать поддержанию количества водных каналов у растений при действии оксидативного стресса и других деструктивных процессах, вызванных обработкой ПЭГ.

В наших экспериментах можно проследить обратную зависимость между степенью снижения транспирации под влиянием ПЭГ и уровнем накопления аквапоринов в корнях растений, которые росли при разных температурных режимах: транспирация снижалась в меньшей степени у растений, которые росли на фоне более низкой температуры, и именно у этих растений наиболее явно и стабильно повышалось содержание аквапоринов в корнях при действии ПЭГ. Таким образом, увеличение уровня аквапоринов в корнях способ-

ствует поддержанию транспирации у растений на фоне осмотического стресса благодаря снижению сопротивления потоку воды через корни. В наших экспериментах вклад аквапоринов в поддержание потока воды в стрессированных растениях проявлялся в изменении уровня PIP2 в корнях. Изменения в уровне PIP1;2 носили нерегулярный характер. Это соответствует данным литературы о том, что хотя изоформы PIP1 могут функционировать как водные каналы во взаимодействии с PIP2 аквапоринами [11], PIP2 аквапорины непосредственно участвуют в транспорте воды через мембраны [6]. Сравнение скорости транспирации и содержания аквапоринов в корнях при разных температурных режимах позволило нам выявить роль корневых аквапоринов из класса PIP2 в поддержании транспирационного потока. Значение изменений уровня аквапоринов в листьях не так очевидно, как в корнях.

### **Выводы**

Таким образом, уровень содержания аквапоринов и экспрессии их генов в корнях, по все видимости, является важным фактором, способствующим поддержанию транспирационного потока в растениях кукурузы при осмотическом стрессе. На первый взгляд это утверждение плохо согласуется с нашими данными о том, что транспирация снижалась при действии ПЭГ, в то время как экспрессия генов аквапоринов и содержание некоторых из кодируемых ими белков увеличивалась (по крайней мере, при более низкой температуре). Однако сравнение ответа растений на воздействие ПЭГ при различных температурных режимах показало, что на фоне накопления аквапоринов транспирация снижалась в меньшей степени при более низкой температуре. Результаты, которые мы получили при более низкой температуре, соответствуют данным Lian et al. [5], показавшим, что высокий уровень аквапоринов играет положительную роль в избегании засухи у риса благодаря повышению поглощения воды и поддержанию водного баланса. Однако, снижение уровня транскрипции аквапоринов было очевидным только на фоне сильного стресса [12], когда устьица почти полностью закрывались, а количество доступной воды в почве резко снижалось [3]. Это соответствует нашим данным, которые мы получили при действии высокой температуры, когда стресс был более сильным, поскольку к осмотическому стрессу прибавлялась воздушная засуха. По данным литературы дефицит воды неоднозначно влияет на уровень аквапоринов в растениях. Наши результаты свидетельствуют в пользу того, что уровень аквапоринов может увеличиваться, оставаться неизменным или даже снижаться у растений под влиянием дефицита воды в зависимости от интенсивности стресса.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 09-04-00942.*

### **Литература**

1. Webb A.A.R., Baker A.J. Stomatal biology: new techniques, new challenges.— *New Phytol.*— 2002.— V.153.— P. 365–370.
2. Morillon R., Chrispeels M.J. The role of ABA and the transpiration stream in the regulation of the osmotic water permeability of leaf cell.— *PNAS USA.*— 2001.— P. 14138–14143.

3. Galmes J., Pou A., Alsina M.M., Tomas M., Medrano H., Flexas J. Aquaporin expression in response to different water stress intensities and recovery in Richter-110 (*Vitis* sp.): relationship with ecophysiological status.— *Planta*.— 2007.— V.226.— P. 671–681.

4. Aroca R., Ferrante A., Vernieri P., Chispeels M.J. Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in *Phaseolus vulgaris* plants.— *Ann. Bot.*— 2006.— V.98.— P. 1301–1310.

5. Lian H.-L., Yu X., Ye Q., Ding X.-S., Kitagawa Y., Kwak S.-S., Su W.-A, Tang Z.-C. The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice.— *Plant Cell Physiol.*— 2004.— V.45.— P. 481–489.

6. Chaumont F., Barrieu F., Wojcik E., Chrispeels M.J., Jung R. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize.— *Plant Physiol.*— 2001.— V.125.— P. 1206–1215.

7. Steudle E, Peterson C.A How Does Water Get Through Roos? — *J Exp Bot.*— 1998.— V.49.— P. 775–788.

8. Suga S., Komatsu S., Maeshima M. Aquaporin isoforms responsive to salt and water stresses and phytohormones in radish seedlings.— *Plant Cell Physiol.*— 2002.— V.43.— P. 1229–1237.

9. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа: Гилем, 2001.— 160 с.

10. Henzler T., Ye Q., Steudle E. Oxidative gating of water channels (aquaporins) in *Chara* by hydroxyl radicals.— *Plant Cell Environ.*— 2004.— V.27.— P. 1184–1195.

11. Fetter K., Van Wilder V., Moshelion M., Chaumont F. Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity.— *Plant Cell.*— 2004.— V.16.— P. 215–228.

12. Bogeat-Triboulot M.-B et al. Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a Poplar growing in arid regions.— *Plant Physiology.*— 2007.— V.143.— P. 876–892.

### Резюме

Повышенный уровень экспрессии генов аквапоринов обеспечивал сохранение содержания водных каналов в мембранах на уровне, не уступающем контрольному, в условиях стресса. Увеличение активности водных каналов способствует поддержанию транспирационного потока у растений.

In stress conditions high level of aquaporin gene expression contributed the level of water channel in membranes not low that in control plants. Increasing of water channel activity promote the maintenance of plant transpiration.

**ВИНИЧЕНКО Н.А., КИРИКОВИЧ С.С., ЛЕВИТЕС Е.В.**

*Институт цитологии и генетики СО РАН,*

*Россия, 630090, Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 10, e-mail: levites@bionet.nsc.ru*

## **ВЛИЯНИЕ ТРИТОНА X-100 НА БЕЛКОВЫЕ ПРОФИЛИ И ДИНАМИКУ ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН САХАРНОЙ СВЕКЛЫ**

Известно, что обработка растений детергентом “Тритон X-100” вызывает появление наследуемых морфо-физиологических изменений в ряду клеточных и половых поколений у растений пшеницы и сахарной свеклы