

УДК 631.811.98

ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ ЗАРОДЫШЕЙ СЕМЯН В РАННЕМ ПОСТЭМБРИОГЕНЕЗЕ

В. А. Цыганкова¹ ¹Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев
Л. И. Мусатенко² *E-mail: sponom @ukr.net*
Л. А. Галкина¹
А. П. Галкин¹ ²Институт ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины, Киев
С. П. Пономаренко¹
К. М. Сытник²
Д. Е. Икин³ ³Тихоокеанская северо-западная лаборатория, США
E-mail: david.eakin @pnl.gov

С помощью α -аманитина — специфического ингибитора синтеза мРНК и актиномицина D, блокирующего преимущественно синтез рРНК, показано, что до завершения лаг-фазы прорастания семян фасоли (18 ч) на фоне подавления синтеза мРНК и рРНК после их набухания (с 6 ч) включаются и активизируются во времени в клетках зародышевой оси процессы биосинтеза белка. На основании этого сделан вывод о том, что в инициацию биосинтеза белков в самый ранний период постэмбриогенеза вовлекаются отложенные в запас в позднем эмбриогенезе транскрипты мРНК и рРНК, а перед проклевыванием корешка (после 18 ч) в биосинтез белка включаются и новосинтезированные мРНК и рРНК.

С помощью афидиколина, избирательно подавляющего репликативный синтез ДНК, установлено, что возрастающие потребности в продуктах экспрессии генов (белках) на стартовых стадиях постэмбриогенеза обеспечиваются амплификацией и структурных, и рибосомных генов. Стимулирующее действие регуляторов роста растений связано не с дополнительным увеличением числа копий генов, а с активацией генов путем усиления функций промоторных и энхансерных регуляторных последовательностей генов через активацию трансфакторов белковой природы.

Сформулирована концепция действия экзогенных регуляторов роста растений на генетическом уровне.

Ключевые слова: зародышевая ось, синтез РНК, амплификация генов, регуляторы роста.

Широкое применение в биотехнологии растений физиологически активных соединений требует изучения механизмов их действия с целью эффективного использования без нанесения ущерба организму растений и окружающей среде.

В своих исследованиях мы акцентируем внимание на изучении влияния регуляторов роста на генетические процессы в клетках зародышей семян, поскольку важно знать, в каком направлении под влиянием физиологически активных соединений пойдет развитие организма растений (ускоренном нормальном или же с отклонениями) начиная с раннего этапа его онтогенеза (постэмбриогенеза).

В наших работах [1, 2] было установлено, что уже на начальной стадии постэмбриогенеза, в первые сутки прорастания семян фасоли (т. е. в начале темновой фазы — фазы набухания и выхода семян из состояния физиологического покоя) в клетках зародышевой оси запускается и быстро возрастает во

времени синтез РНК. Имеются также сведения об активации в раннем постэмбриогенезе в зародышах растений синтеза не только РНК, но и белков, и ДНК [3].

Примерно в те же годы другими авторами на семенах различных растений было установлено, что в ранний предростовой постэмбриональный период биосинтезу мРНК предшествует биосинтез белка, причем его скорость и спектр синтезированных белков находятся в прямой зависимости от гидратационных способностей зародышей (оводненности семян) и продолжительности жизни резервных мРНК. В этих работах был сделан вывод об участии в инициации белкового синтеза преобразованных (отложенных в запас в позднем эмбриогенезе) мРНК. Вопрос о соотносительной роли резервных и новосинтезированных рРНК в инициации биосинтеза белка в раннем постэмбриогенезе по сравнению с мРНК менее изучен. Приведенные кратко данные подробно рассмотрены в содержательной монографии Н. В. Обручевой

[4]. Структуре и физиологической роли запасных мРНК посвящена также книга М. А. Айтхожина и Б. К. Исакова [5].

Однако неизученным остался вопрос: происходит ли наблюдаемое, резко нарастающее во времени, увеличение синтезов мРНК и рРНК в ранний период постэмбриогенеза вследствие усиления активности генов или же за счет увеличения числа их копий путем амплификации? Основанием для постановки такого вопроса служат данные об обнаружении синтеза ДНК в зародышах растений в раннем постэмбриогенезе [3], амплификации структурных и рибосомных генов в разных эукариотических организмах на ранних этапах их развития [6–10], а также тот факт, что по крайней мере в первые сутки прорастания семян фасоли рост зародышевой оси осуществляется не за счет клеточного деления (т.е. увеличения числа клеток, связанного с репликацией ДНК), а вследствие растяжения клеток (удлинения) ее гипокотыля, при котором репликативный синтез ДНК не происходит [1, 2, 11].

Основываясь на результатах наших исследований и данных литературы, в настоящей работе мы поставили цель провести комплекс исследований соотносительной роли предсуществующих и новосинтезированных мРНК и рРНК в процессах биосинтеза белка на ранних этапах постэмбриогенеза, а также механизмов увеличения во времени уровня экспрессии генов в процессе роста и развития зародышей и, используя аналогичные методические подходы, попытаться определить, каким образом регуляторы роста действуют на генетическом уровне, ускоряя рост и развитие зародышевого организма.

Материалы и методы

В опытах использовали семена спаржевой фасоли сорта Белозерная, анатомо-морфологическая и физиолого-биохимическая характеристики роста и развития зародышевой оси которых нами были подробно изучены [6]. В качестве «инструментов» для изучения поставленных вопросов в работе применяли:

1. α -Аманитин (α -Ам) фирмы Sigma Aldrich (США), избирательно выключающий экстрадрюшковый синтез РНК (т.е. синтез мРНК) [12,13, 14];

2. Актиномицин D (AD) фирмы Sigma Aldrich (США), выключающий при малых концентрациях преимущественно синтез РНК в ядрышках (т.е. синтез рРНК), но не ингибирующий синтез и выход в цитоплазму мРНК [15];

3. Афидиколин (АФ) фирмы Fluka (Швейцария), избирательно выключающий катализируемый ДНК-полимеразой α -репликативный синтез ДНК, но не затрагивающий процесса амплификации ДНК [16;17].

Простерилизованные раствором $KMnO_4$ семена фасоли проращивали на водных растворах 0,02% -го α -Ам либо 0,028% -го AD (опыты), а контроль — на дистиллированной воде. При изучении синтезов РНК и белков в среды также добавляли соответственно 3H -уридин и C^{14} -лейцин (фирмы «Изотоп», Россия). В серии опытов по гибридизации ДНК-РНК в среду вносили $Na_2H^{33}PO_4$ (фирмы Amersham, Великобритания) с высокой удельной активностью (370 MBq/ml). С целью увеличения проницаемости мембран клеток для проникновения в них указанных ингибиторов в средах для инкубации присутствовал также 0,5% -й диметилсульфоксид. Каждый опыт проведен в трех повторениях.

После инкубации отпрепарированные от семядолей зародышевые оси использовали для выделения из них препаратов цитоплазматической РНК, суммарных белков и ядерной ДНК. Разделение цитоплазматической РНК на поли-А⁺РНК (т.е. мРНК) и поли-А РНК (т.е. в основном рРНК) проводили соответственно описанному ранее способу [11]. Выделенные препараты ДНК из зародышевых осей сухих семян (контроль) и из семян через разные сроки их проращивания (опыт) предварительно денатурировали, фиксировали на нитроцеллюлозных фильтрах и подвергали гибридизации (дот-блоттингу) с насыщенными в растворе концентрациями ^{33}P -РНК (гибридизационными зондами мРНК и рРНК), как описано в руководствах [18,19]. Радиоактивность проб определяли по [1,2].

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлена увеличенная в раз- мере зародышевая ось семени фасоли, в которой различают (сверху вниз) первичные лист, эпикотиль, гипокотиль (стебель) и корень. Согласно нашим исследованиям, преобладающую часть зародышевой оси составляет гипокотиль (3,5–4,0 мм), размер корневой меристемы с корневым чехликом — 1,5 мм. Формирование проростка при прорастании длится около трех суток. Период набухания семени — около 6 ч (для изолированной из семени оси около 1 ч), что связано с интенсивностью поглощения воды: больше всего ее поглощает гипокотиль (53%), меньше — семядоли (46%), первичные листья

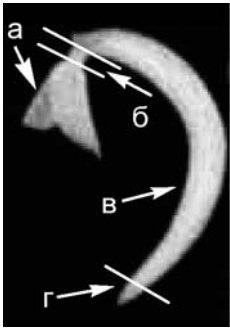


Рис. 1. Стрoение зарoдышевой оси семян фасоли:
а — первичный лист, *б* — эпикотиль, *в* — первичный стебель (гипокотиль); *г* — зарoдышевый корень

(47%) и зарoдышевый корень (39%). Дальнейшие 12–13 ч (лаг-фаза) масса и длина зарoдыша почти не изменяются. Следующий период характеризуется увеличением размеров и массы зарoдыша и завершается проклевыванием семени (выход корешка за пределы семенной оболочки). Но если первый этап, когда поступление воды происходит по физическим законам, свойствен как живым, так и нежизнеспособным семенам, то третья фаза присуща только живым и связана с общим возрастанием метаболизма семени.

Следует подчеркнуть, что проклевывание семени (24 ч) происходит вследствие растяжения клеток гипокотыля, которое начинается в его базальной части — у корня и постепенно перемещается к семядольному узлу. При этом клетки не растягиваются сразу до их окончательной длины, а наблюдается несколько периодов наиболее энергичного роста. Спецификой роста гипокотыля является ограниченный, заканчивающийся к 8-м сут после замачивания рост, обеспечивающий выполнение основной функции — выноса семядолей со стеблевой почечкой из почвы.

В корневой меристеме первые митозы обнаруживаются, как правило, в уже проклюнувшихся семенах, т. е. рост корня начинается спустя примерно сутки (через 25–28 ч) после замачивания практически одновременной инициацией деления и растяжения. В первые 24 ч длина клеток и их количество в ряду не изменяются, а размеры зон (меристема — 0,5 мм и растяжение — 1 мм) и соответственно размер корня (около 1,5 мм), свойственные сухому семени, остаются постоянными. Через 32 ч длина зон меристемы и растяжения увеличивается вдвое. Зона зрелых клеток формируется примерно через 36 ч и составляет 0,8 мм. К 44- и 72-му ч прорастания стабилизируется размер соответственно зон меристемы (1,4 мм) и растяжения (5 мм).

В стеблевой меристеме клетки начинают делиться лишь через 36–40 ч, а в листе — че-

рез 48 ч. Установлена определенная последовательность инициации ростовых процессов, отражающая особенности развития отдельных органов зарoдышевой оси: гипокотиль, зарoдышевый корень, лист.

Приведенные результаты послужили основой для осмысливания полученных нами данных по синтезу РНК, белков и ДНК.

Из рис. 2, А явствует, что практически до 12 ч после начала прорастания семян фасоли в клетках зарoдышевой оси не происходит синтез мРНК, который начинается только с 18 ч и непрерывно нарастает вплоть до 36 ч инкубации (рис. 2, А, кривая 1). α -Ам вызывает практически полное подавление синтеза мРНК на протяжении всего периода инкубации семян растений (рис. 2, А, кривая 2), что вполне согласуется с данными других авторов о полном подавлении синтеза мРНК α -Ам и в клетках других организмов [12, 13]. В то же время нами обнаружено частичное, видимо неспецифическое, ингибирование синтеза мРНК AD (рис. 2, А, кривая 3), хотя по данным литературы [15] он избирательно ингибирует только синтез рРНК и не затрагивает (при используемой нами его концентрации) синтеза и перехода в цитоплазму мРНК. Все-таки, очевидно, AD обладает меньшей избирательной специфичностью по сравнению с α -Ам как ингибитор синтеза какого-либо одного класса РНК.

Подобная картина временной кинетики синтеза мРНК получена нами при изучении синтеза рРНК (рис. 2, Б): до 12 ч отсутствие синтеза, включение синтеза к 18 ч и дальнейший резко возрастающий подъем синтеза до 36 ч инкубации семян (рис. 2, Б, кривая 1). По чувствительности синтеза рРНК к ингибиторам α -Ам и AD наблюдается противоположная картина по сравнению с мРНК: слабое, очевидно также неспецифическое, ингибирование α -Ам мРНК (рис. 2 Б, кривая 2) и почти полное ингибирование AD синтеза рРНК (рис. 2, Б, кривая 3).

В свете полученных нами данных по синтезу мРНК и рРНК весьма информативным представляется сопоставление этих данных с данными по синтезу белка (рис. 2, В). Уже с 6 ч в клетках зарoдышевой оси начинается синтез белка и через каждые 6 ч (12 ч, 18 ч и т. д.) уровень биосинтеза белка возрастает примерно вдвое (рис. 2, В, кривая 1), притом, что фактически только с 18 ч начинается синтез как мРНК, так и рРНК. Интересно и то, что до этого времени практически не наблюдается влияние на синтез белка ни α -Ам, ни AD (рис. 2, В, кривые 2 и 3), т. е. синтез белка в этот промежуток времени происходит,

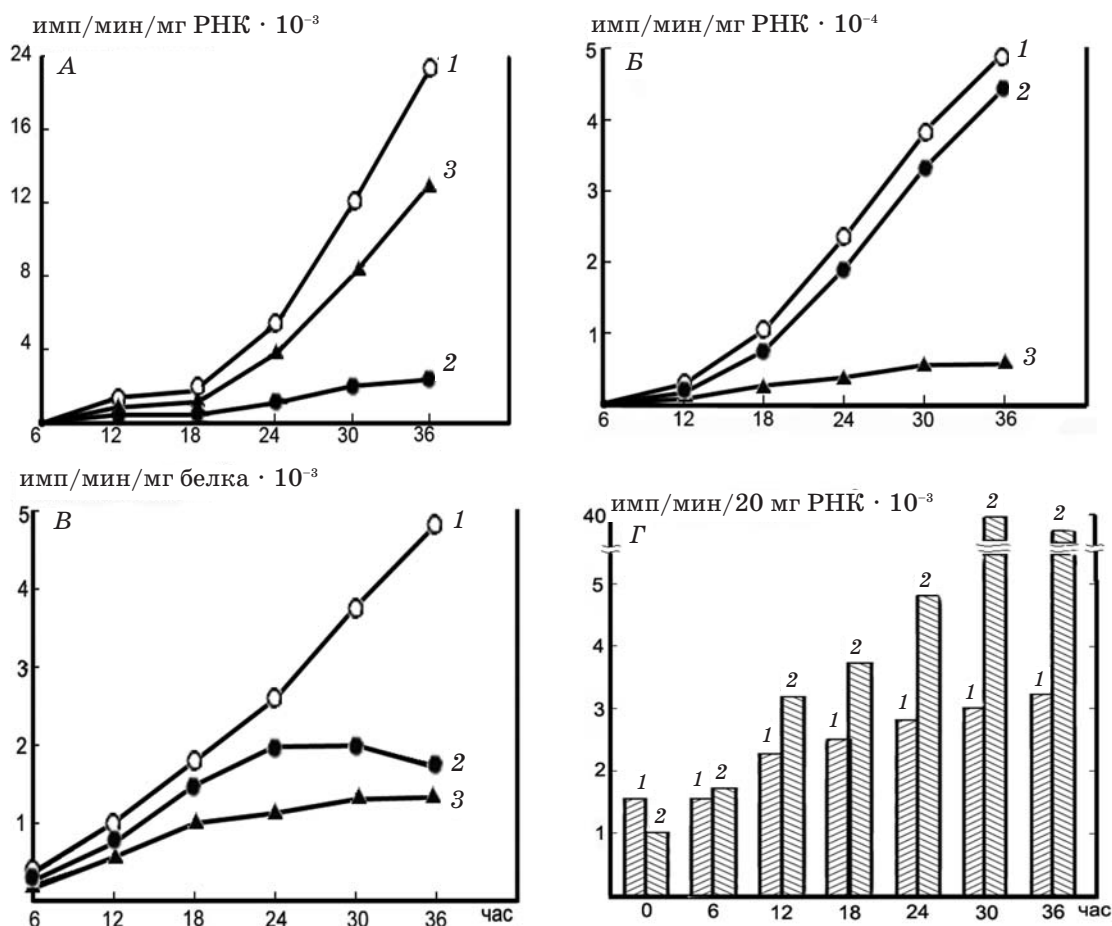


Рис. 2. Кинетика включения ³H-уридина в поли-А+РНК (А), поли-А-РНК (Б) и ¹⁴C-лейцина в белки (В) клеток зародышевой оси семян фасоли:
 1 — контроль; 2 — в присутствии α-Ам; 3 — в присутствии АД;
 дот-блоттинг (Г) препаратов ³³P-поли-А+РНК (столбик 1) и ³³P-поли-А-РНК (столбик 2), полученных из зародышевой оси через 24 ч после начала прорастания семян фасоли, с препаратами ДНК, выделенными из зародышевых осей соответственно из сухих семян (контроль) и через 6; 12; 18; 24; 30 и 36 ч после начала прорастания семян (опыт)

вероятно, на предсуществующих, запасенных мРНК и рРНК). Этот вывод согласуется и с данными о том, что существуют короткоживущие и долгоживущие мРНК, период полужизни которых исчисляется от нескольких минут до нескольких часов и даже суток [7, 14, 20–22].

Судя по замедлению дальнейшего подъема после 18 ч биосинтеза белка по отношению к контролю под влиянием α-Ам и АД, можно констатировать, что по крайней мере с 24 ч и далее в синтезе белка участвуют уже и новосинтезированные мРНК и рРНК, синтез которых подавляется соответственно α-Ам и АД. Следует также отметить, что длительное торможение биосинтеза белка, опосредованное угнетением синтезов мРНК и рРНК, приводит к аномалиям в росте и развитии зародышевой оси, что проявляется в замедлении роста гипокотила примерно в 4 раза.

Таким образом, данные наших исследований четко показали, что в ранний переходный период от состояния покоя к активному росту и развитию при прорастании семени для инициации ростовых процессов используются отложенные в запас в позднем эмбриогенезе специфические продукты экспрессии генов (транскрипты в виде мРНК и рРНК), необходимые для экстренной наработки какого-то количества специфических белков, без которых невозможно было бы дальнейшее развитие (приведение в действие) в клетках генетической программы роста и развития зародышевого организма.

Синтез и отложение в запас в клетках зародышевой оси этих транскриптов при вхождении семян в состояние физиологического покоя в эмбриогенезе осуществляются, очевидно, с целью обеспечения начальных этапов генетического контроля выхода зародышей из «спящего» в физиологически

активное состояние и поступательного развертывания независимой уже от генетических факторов материнского организма автономной генетической программы постэмбрионального роста и развития зародышей с постепенным формированием из них растений со специализированными высококодифференцированными клетками, органами и тканями.

С помощью α -Ам исследован также соотносительный вклад пула запасенных и ново-синтезированных мРНК в прорастание семян *Arabidopsis* и соответственно в процессы роста и развития зародышей этих растений [14]. Показано, что даже при избыточных дозах α -Ам происходит выход корешка наружу из семени, но дальнейший рост и развитие зародышей прекращаются. Сделан вывод о том, что для дальнейшего развития зародыша необходима транскрипция мРНК *de novo*. Однако, прорастание семян полностью блокируется при подавлении биосинтеза белка ингибитором трансляции циклогексимидом, что доказывает, по мнению авторов, участие пула запасенных мРНК в белковом синтезе прорастающих семян и в реализации процесса выхода корешка наружу из семени. Полученные в этих исследованиях данные позволили авторам сделать следующие обобщения:

- в регуляции скорости прорастания принимают участие регуляторные факторы, синтез которых *de novo* подавляется α -Ам;

- наблюдаемое 15-кратное снижение чувствительности к гибберелловой кислоте прорастающих семян под влиянием α -Ам свидетельствует о приоритетной роли этого фитогормона в процессах прорастания;

- наряду с запасенными белками в зародышах в эмбриогенезе необходимы синтез *de novo* некоторых ферментов, вовлекаемых в мобилизацию резервов, возобновление метаболической активности после физиологического покоя и обеспечение адаптивных реакций зародышей к стрессовым факторам (например, к водному стрессу);

- прорастание семян запускается с помощью генетической программы, заложенной при созревании, составляющими которой являются как использование в процессах инициации прорастания отложенных в запас при созревании мРНК и белков, так и последовательная активация генов синтеза *de novo* аналогичных и других белков, обеспечивающих процесс прорастания семян растений.

При этом все еще малоизученными остаются механизмы инициации экспрессии генов и наблюдаемое быстрое возрастание

уровня экспрессии генов в зародышах растений в ранний постэмбриональный период. По мере быстрого истощения резервов (отложенных в запас транскриптов узкого назначения — для запуска первоначального синтеза белков) включаются генетически запрограммированные механизмы последующей быстрой наработки нового или дополнительного массива продуктов экспрессии генов. К числу таких механизмов относят усиление активности генов и увеличение числа их копий (амплификацию). Как показано [7–10], последний механизм часто используется в период развития зародышей многих эукариотических организмов.

По аналогии с этим мы предположили, что на начальном этапе развития зародышевой оси фасоли, когда еще не включены репликативные процессы, относящиеся к процессам увеличения численности клеток и направляемые на создание дифференцированных и специализированных клеток и органов, возможно, используется механизм амплификации генов для экстренной наработки продуктов экспрессии генов. К тому же на начальном этапе постэмбриогенеза рост зародышевой оси, как уже отмечалось, происходит не за счет увеличения числа клеток, а вследствие растяжения клеток гипокотыля [1,2]. Для проверки этого предположения мы использовали афидиколин, который выключает репликативный синтез (если таковой имеется) и не влияет на процесс амплификации генов [16,17].

Рис. 2, Г свидетельствует о резком возрастании во времени в геномной ДНК последовательностей, гибридизирующих с ^{33}P -гибридизационными зондами мРНК и, особенно, с рРНК (столбики 1, 2). Афидиколин, по крайней мере до 30 ч, не снижает увеличения генетического материала, гибридизирующегося с продуктами транскрипции (во всех случаях для гибридизационного анализа использовали ^{33}P -транскрипты, выделенные из зародышевой оси на 24-й ч прорастания семян). И только спустя 30 ч после начала прорастания семян, судя по диаграмме, включаются механизмы репликации ДНК, ингибируемые афидиколином. В противоположность этому, ДНК, полученная из исходных сухих семян (как видно из рис. 2, Г) содержит относительно меньше копий последовательностей, гибридизирующихся с ^{33}P -РНК-зондами.

Эти опыты четко показали, что в зародышах растений, как и в других эукариотических зародышах, на начальных этапах развития используются механизмы амплификации

структурных и еще в большем масштабе рибосомальных генов для интенсивной работы конечных продуктов экспрессии генов (белков).

В проведенной работе нам также удалось показать, что стимуляторы роста растений (в частности, ивин или зеастимулин) ускоряют ростовые процессы не дополнительным увеличением числа копий генов в зародышах растений (данные не приводятся), а их активацией (таблица). Стимуляторы роста способствуют максимальному раскрытию генетического потенциала клеток растений [23]. Это происходит, видимо, посредством усиления активности промоторных и энхансерных (усиливающих уровень и скорость транскрипции) последовательностей ДНК за счет ускорения формирования в промоторах растений инициаторных транскрипционных комплексов (рис. 3) из элементов регуляторных областей генов, РНК-полимеразы и трансфакторов белковой природы. Такие комплексы состоят из более чем 70 белков (поэтому их называют транскриптомом по аналогии с рибосомой) [24].

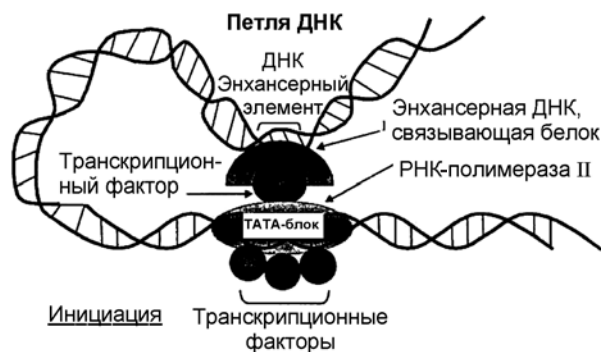


Рис. 3. Схематическое изображение инициаторного транскрипционного комплекса [24]

Таким образом, регуляторы роста растений не затрагивают базовые генетические процессы (амплификацию генов), а, ускоряя процессы экспрессии генов, сокращают сроки их протекания.

Несмотря на достигнутые успехи в использовании регуляторов роста в растениеводстве, строгие научно обоснованные нормативы или «рецепты» применения их не предложены из-за ограниченности знаний о механизмах их действия (влиянии каждого из соединений на метаболизм клеток на протяжении всего периода онтогенеза растений, особенностях действия соединения в зависимости от его концентрации и условий выращивания, влияния регуляторов на наследственные свойства растений и др.).

Включение ³H-уридина в суммарную РНК цитоплазмы клеток зародышевой оси в динамике прорастания семян фасоли без (контроль) и со стимулятором роста ивином (имп/мин/мгРНК)

Время, ч	Контроль	Опыт (ивин)
6	230 ± 1,8	260 ± 2,4
12	350 ± 2,6	480 ± 4,2
18	1 500 ± 7,4	2 200 ± 8,6
24	3 500 ± 12,3	7 200 ± 15,4
30	8 150 ± 16,4	18 300 ± 18,9
36	16 400 ± 20,6	39 380 ± 26,1

В контексте перечисленных общих направлений определения регуляторных свойств соединений первостепенным является изучение следующих вопросов:

– Действуют ли экзогенные регуляторы роста (природные либо синтетические), а также другие химические соединения непосредственно на функции генов или же через каких-то посредников?

– Каким образом синтетические химические соединения, с совершенно несвойственной для фитогормонов структурой (например, триамелон [25]), действуют порой так же, как и природные соединения (по интегральным конечным результатам)?

– Почему во многих случаях синтетические соединения оказывают выраженный физиологический эффект при значительно более низких концентрациях (некоторые даже при концентрации 10^{-12} М), чем природные соединения (от 10^{-5} до 10^{-8} М)?

В поисках ответов на эти вопросы мы сочли целесообразным ниже представить некоторые литературные и наши данные, касающиеся этих проблем, а также сложившиеся в науке представления о принципах формирования в клетках растений ответных реакций на различные воздействия и их механизмах.

Несомненно, к числу фактов, связанных с выяснением указанных вопросов, можно отнести обнаружение в клетках растений резкого увеличения концентрации эндогенного пула фитогормонов и изменения соотношения фитогормонов под влиянием экзогенных регуляторов роста (природных или синтетических) [26].

С этими данными интерферируют и результаты наших исследований, показывающие, что:

– присутствие в среде регуляторов роста является мощным импульсом развития у растений вегетативных органов (рис. 4, А, Б, В), что можно объяснить индуцированием

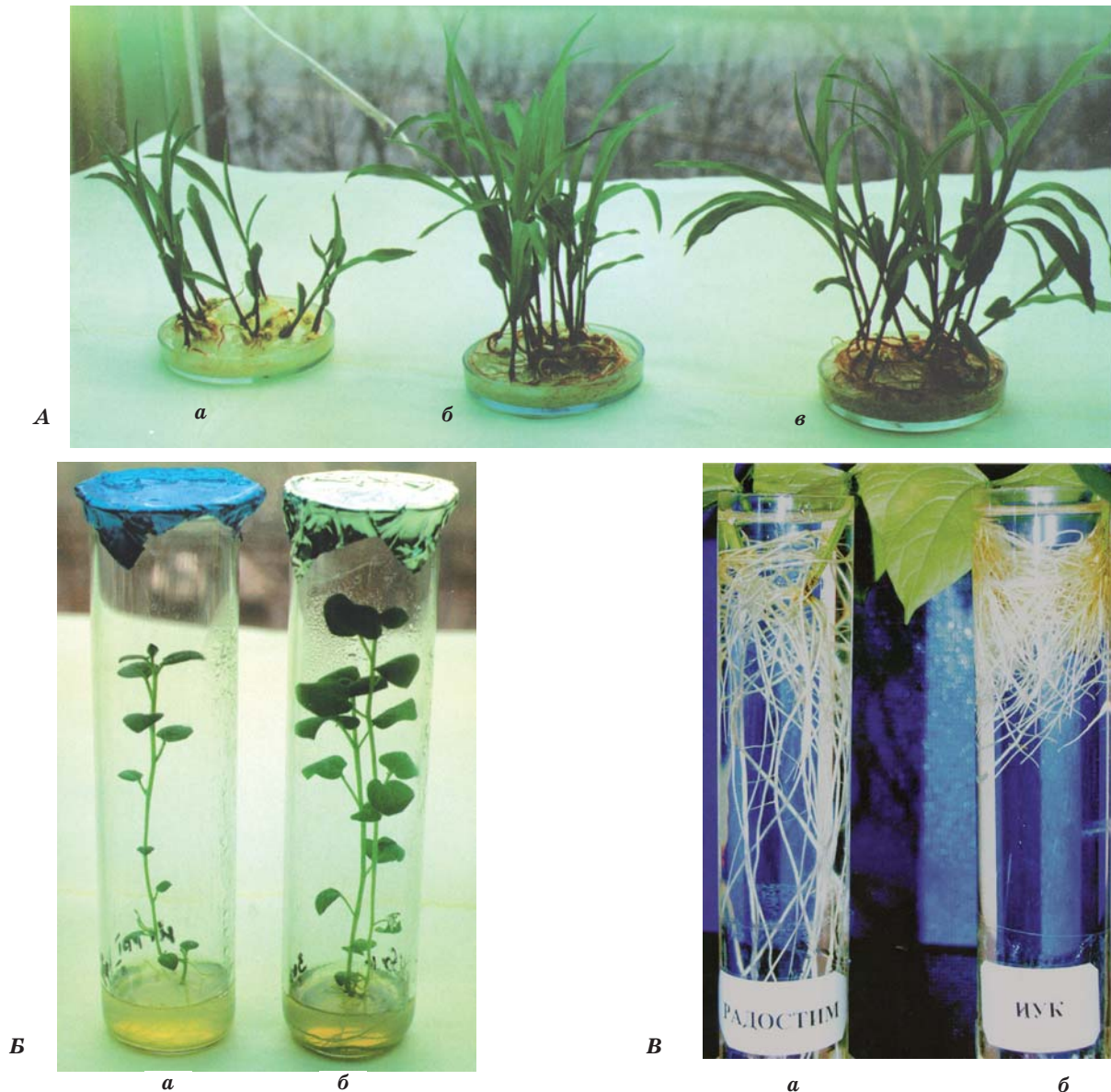


Рис. 4. Влияние (А) зеастимулина на рост проростков кукурузы: контроль, вода (а); зеастимулин — 10^{-8} М (б); 10^{-10} М (в); (Б) потейтина на рост растений-регенерантов картофеля на средах: с кинетином (контроль, а) и с потейтином вместо кинетина (опыт, б); (В) радостима 10^{-10} М (а) и индолилуксусной кислоты 10^{-10} М (в) на укоренение черешков листа фасоли

экзогенными регуляторами синтеза фитогормонов, контролирующих эти процессы;

- действие синтетических регуляторов на рост гипокотыля у декапитированных (т.е. лишенных верхушечной части) зародышевых осей семян растения отсутствует [27];

- стимулирующего действия регуляторов роста на одноклеточные организмы (бактерии, дрожжи), где регуляция роста иная, чем у растений, нами не обнаружено;

- в работах с культурами клеток и тканей растений *in vitro* в питательных средах для индуцирования тех или иных морфологических

процессов можно с успехом использовать вместо одного или даже двух фитогормонов какое-либо одно отобранное в процессе скрининга химическое соединение [28].

В предлагаемой ниже концепции приведенные наши и литературные данные в цепочке механизма действия регуляторов роста растений мы рассматриваем как определяющие. В краткой форме суть этой концепции сводится к следующему: регулятор(ы) роста растений активирует(ют) трансфакторный(ые) белок(ки) по принципу аллостерического эффекта (проявлению сродства структуры

регулятора роста к структуре или части структуры активного центра белковой молекулы трансфактора). В результате изменения пространственной структуры (а возможно и опосредованной каталитическим действием регулятора роста ферментативной модификации трансфактора) происходит активация трансфактора(ов), что приводит к ускорению формирования инициаторного транскрипционного комплекса в регуляторной части (промоторе) гена(ов) синтеза фитогормона(ов) и далее по цепочке активации генов синтеза и других фитогормонов, образующих специфический на действие регулятора баланс фитогормонов. В свою очередь, этот комплекс фитогормонов включает или активирует гены синтеза структурных или функциональных белков либо одновременно тех и других в случае стимуляции регулятором(ами) сбалансированного роста и развития организма растений.

В пользу описанной последовательности приведенных механизмов реализации сигналов регулятора(ов) роста свидетельствуют следующие факты:

- у растений именно фитогормоны являются посредниками между сигналами внешней (или внутриклеточной) среды и генами в формировании клетками соответствующих ответных реакций;

- факты увеличения концентрации и изменения баланса эндогенного комплекса фитогормонов под влиянием экзогенных регуляторов приведены нами выше;

- механизм опосредованной (через специфические трансфакторы белковой природы) регуляции экспрессии генов фитогормонами четко доказан в работах многих авторов [29, 30]. В данном случае структура фитогормонов и структура трансфакторов в полной мере подходят друг другу как «ключ к замку»;

- по аналогии с приведенными аргументами логично предположить, что сигналы регуляторов роста, как и другие внешние или внутриклеточные сигналы опосредуют свое действие через регуляторную систему фитогормонов.

Далее мы попытаемся дать более подробное обоснование некоторых положений сформулированной нами концепции. Как уже отмечалось, у растений существует двойственный контроль их роста и развития: генетический контроль и фитогормональная регуляция, тесно взаимодействующие между собой. Гены программируют синтез фитогормонов, а фитогормоны по принципу обратных связей регулируют ак-

тивность генов синтеза структурных и функциональных белков. Вследствие активации одного из генов синтеза какого-либо фитогормона происходит по цепочке включение и других генов синтеза этого же фитогормона, а затем параллельно (синхронно) генов синтеза и иных фитогормонов, совместно образующих баланс фитогормонов, которые запускают каскад структурных генов, формирующих ответные реакции/процессы на то или иное воздействие [26]. Причем такой баланс фитогормонов является кратковременным. Однако продолжительное присутствие в окружающей среде активатора генов синтеза фитогормонов (регулятора роста) может стабилизировать их баланс, в результате чего фитогормоны будут продолжать действовать в том же составе под влиянием регулятора роста (подтверждением этого является обнаруженное нами резкое замедление «старения» каллусов при их пассировании и длительном культивировании на средах с синтетическими регуляторами). Длительная задержка в смене баланса (ансамбля) фитогормонов стимулятором роста может привести к ускоренному увеличению размера растения (из-за избыточного синтеза структурных элементов клетки, обеспечивающих быстрый рост вегетативных органов) и запаздыванию или подавлению включения генов синтеза специфических (специализированных) белков, участвующих в закладке и формировании генеративных органов растения.

Учитывая то, что могут образовываться и смешанные пулы фитогормонов в ответ не на один, а на два или несколько сигналов (например, на температуру и регулятор роста), весьма сложно определить истинный пул фитогормонов на то или иное воздействие. К этому следует добавить, что трудно также определить, какой из фитогормонов подвергается деструкции: находившийся до формирования пула в ответ на сигнал или же после реализации сигнала.

Известно, что все внешние воздействия либо сигналы (свет, темнота, тепло, холод, затопление, засуха, химические вещества, включая и регуляторы роста, засоление почв, загрязнение ионами тяжелых металлов и др.) воспринимаются вначале рецепторами или эффекторами клеток, и что система рецепторов располагается как внутри их, так и на поверхности мембран. Рецепторы представляют собой сложные комплексы, содержащие многомерные белки. Очевидно, что узнавание рецепторами химических структур может быть специфичным, отчас-

ти специфичным или неспецифичным (т. е. вследствие образования случайных связей между химическим соединением и какой-то частью многомерной структуры рецептора). Другая возможность действия регуляторов — формирование комплекса между ними и активной частью молекул белка — трансфактора, минуя рецептор, благодаря случайно проявленному сродству (аллостерическому эффекту) какой-то части структуры трансфактора и регулятора роста (структура ДНК инертна для взаимодействия с регулятором роста), в результате чего меняется пространственная организация трансфактора, что, вероятно, и приводит к его/их активации и соответственно ускорению формирования инициаторных транскрипционных комплексов в промоторах генов синтеза фитогормонов. По нашему мнению, все поступающие извне сигналы клеток опосредуют свое действие именно через изменение пула (т.е. синтеза) соответствующих фитогормонов, а полученный биологический эффект достигается уже посредством включения либо выключения или же активации фитогормонами структурных генов, кодирующих функциональные белки, отвечающие за тот или иной процесс либо ответ в клетках (например, за ускорение роста и развития растений).

Само по себе попавшее в клетку чужеродное химическое соединение вряд ли сможет найти вслепую специфические точки приложения для формирования специфического ответа, являющегося продуктом цепи последовательных реакций, программируемых не одним, а многими генами. Специфическое последовательное включение одних генов и выключение других «под силу» только фитогормонам, которые узнают регулируемые ими гены «в лицо» и знают, когда и в какой последовательности их запускать, а какие выключать (схема опосредованной через фитогормоны регуляции активности генов в зародышах растений представлена нами ранее [27]).

Другой аспект этой проблемы заключается в том, что отобранный в процессе скрининга для определенного периода развития химический регулятор, в отличие от фитогормонов, вряд ли будет обладать такой же активностью на другом этапе развития. Действительно, как мы уже отмечали, инициация ростового процесса происходит за счет отложенных в запас мРНК и рРНК и последующего включения ограниченного количества ранних генов синтеза подобных классов РНК и синтеза на них ранних белков, участвующих в запуске и разворачивании генетической программы роста и развития растений.

Эти ранние (возможно примитивные) гены, очевидно, содержат относительно простые регуляторные последовательности и небольшой круг «обслуживающих» их трансфакторов (т. е. вероятно у этих генов короткие промоторные и энхансерные последовательности, а может, отсутствуют энхансеры), которые воспринимают ограниченное количество регуляторных сигналов и экспрессируют ограниченное количество ранних, видимо в основном регуляторных, белков, которые обеспечивают выключение ранних генов и включение средних генов уже с более сложной разветвленной системой регуляции.

Таким образом, каждый период роста и развития растений характеризуется включением генов со все более сложными областями регуляции и соответственно взаимодействующих со все большим количеством трансфакторов, обеспечивающих регуляцию самих генов, межгенные взаимодействия, процессы дифференциации и специализации клеток, межклеточные и межорганные взаимодействия. К тому же все гены и их регуляторные последовательности отличаются первичной и пространственной структурой. Ясно, что отобранный при скрининге и случайно оказавшийся «подходящим» регулятор роста на первом этапе развития вряд ли может оказаться таким же эффективным на последующих этапах онтогенеза (за исключением, очевидно, регуляции генов синтеза каких-то общих для всех этапов развития структурных белков). Вероятно, идеальным было бы проводить дробный скрининг химических соединений через короткие интервалы в процессе роста и развития. Известно, что именно такой подход используется в работах с культурами клеток и тканей растений *in vitro*. В этих работах для индуцирования тех или иных морфогенетических процессов экспланты растений последовательно переносят с одной среды на другую с измененным составом стимуляторов морфогенеза (природных или синтетических) [31]. С рассмотренных позиций можно объяснить и обнаруженную нами разную сортовую чувствительность сельскохозяйственных растений к регуляторам роста. Причиной этого, видимо, является микрогетерогенность по генам в семействах «многосемейственных» генов у сортов растений (т.е. небольшие различия в нуклеотидных последовательностях и их регуляторных областях) и, соответственно, в структуре трансфакторов, обеспечивающих функции генов, проявляющих и не проявляющих сродство к регулятору роста.

С высокой избирательностью действия регуляторов роста на активность генов можно связать и зависимость биологического эффекта от концентрации физиологически активных соединений [32, 33]. Превышение их концентрации (передозировка) может привести к несвоевременному (одновременному) включению средних или поздних генов, неспецифическому угнетению регуляторами функции окружающих генов, оказавшихся мишенями негативного влияния на них регуляторов роста (ингибирования в этих генах энхансерных и активации сайленсерных последовательностей ДНК — ингибиторов транскрипции), нарушению межклеточных и органных взаимодействий, что может явиться причиной несбалансированного роста и развития зародышевого организма, который определяется преобладанием работающих генов с позитивным ответом над негативным, либо наоборот, на действие регулятора роста. Опыт показывает, что использование композиций регуляторов роста обеспечивает сбалансированное развитие растения.

Полученные данные и представления авторов о механизмах действия, а также описанные закономерности имеют важное значение для биотехнологии, в частности, для активации «нужных» и выключения «ненужных» генов при синтезе необходимых физиологически активных соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сьтник К. М., Мусатенко Л. И., Пушкарев В. М. и др. Исследование синтеза РНК в органах зародышевой оси прорастающих семян фасоли // Укр. ботан. журн. — 1982. — Т. 39, №3. — С. 104–111.
2. Мусатенко Л. И., Галкин А. П., Пушкарев В. М., Сьтник К. М. Изучение начальных стадий экспрессии генома в первичных органах зародышевой оси в течение созревания и прорастания семян фасоли // Геном растений: структура и экспрессия. — Уфа: Башкирское Отделение АН СССР, 1983. — С. 154–161.
3. Heun A. N. J. Molecular basis of auxin-regulated extension growth and role of dextranase // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1981. — V. 78, N11. — P. 6608–6612.
4. Obroucheva N. V. Seed Germination: A Guide to the Early Stages. — Backhuys Publishers: Leiden, 1999. — 158 p.
5. Айтхожин М. А., Искаков Б. К. Информосомы растений. — Алма-Ата: Наука, 1982. — С. 41–48.
6. Мусатенко Л. И. Рост и метаболизм зародышевых органов растений: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. — К., 1985. — 52 с.
7. Кафиани К. А., Костомарова А. А. Информационные макромолекулы в раннем развитии животных. — М.: Наука, 1978. — 336 с.
8. Stark G. R. Gene amplification. // Ann. Rev. Biochem. — 1984. — V. 53. — P. 447–491.
9. Гилберт С. Биология развития. — М.: Мир, 1994. — Т. 2. — 236 с.
10. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. — М.: Мир, 1998. — Т. 2. — 392 с.
11. Tsygankova V. A., Zayets V. N., Galkina L. A. et al. An unusual minor protein appearing in embryonic axis cells of haricot bean seeds following germination process stimulated by 6-methylthiouracils // Biopolimeri i Kletka. — 1998. — V. 14, N5. — P. 438–448.
12. Blair G. R., Dommasch M. Nuclear DNA-dependent RNA polymerases of Ehrlich ascites tumor cells: two discrete α -amanitin sensitive forms. Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1972. — V. 49, N 4. — P. 877–883.
13. Hastie N. D., Mahy B. W. J. Effects of α -amanitin in vivo on RNA polymerase activity of cultured chick embryo fibroblast cell nuclei: resistance of ribosome RNA synthesis to the drug. // FEBS Lett. — 1973. — V. 32, N 1. — P. 95–99.
14. Rajjou L., Gallardo K., Debeaujon I, et al. The Effect of α -Amanitin on the Arabidopsis Seed Proteome Highlights the Distinct Roles of Stored and Neosynthesized mRNAs during Germination // Plant Physiology. — 2004. — V. 134, N3. — P. 1598–1613.
15. Perry R. P. and Kelley D. E. Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D. Characteristic dose-response of different RNA species. // J.Cell.Physiol. — 1970. — V. 76, N 2. — P. 127–140.
16. Sala F., Parisi B., Burroni D. et al. Specific and reversible in the alpha-like DNA polymerase in plant cells. — FEBS Lett. — 1980. — V. 117 (1). — P. 93–98.
17. Arabshahi L., Brown N., Khan N., Wight G. Inhibition of DNA polymerase alpha by aphidicolin // Nucleic Acids Res. — 1998. — V. 16 (11). — P. 5107–5113.
18. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. — М.: Мир, 1998. — Т. 1. — 375 с.
19. Маниатис Т., Фриг Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
20. Гайцхоки В. С. Информационные РНК клеток животных. — М.: Медицина, 1980. — 200 с.
21. Газарян К. Г., Тарантул В. З. Геном эукариот. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1983. — 272 с.
22. Тейлор Д., Грин Н., Стаут У. Биология. — Мир, 2002. — Т. 3. — 451 с.
23. Кухарь В. П., Карабанов Ю. В., Павленко А. Д. и др. Новый регулятор роста — Ивин //

- Физиологически активные соединения. — 1986. — №18. — С. 3–14.
24. *Potenza C., Aleman L., Sengupta-Goplan C.* Invited Review: Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation // *In Vitro Cell. Dev. Biol.* — 2004. — Plant 40. — P. 1–22.
25. *Galkina L. A., Tsygankova V. A., Synytsa A. D.* Triamelon — a new effective inductor of organogenesis in plant tissue culture in vitro // *Журн. орг. фарм. хімії.* — 2006. — Т. 4, вип.2 (14). — С. 78 — 80.
26. *Курапов П. Б.* Гормональный баланс растений. Методы его изучения и регулирования: Дис. ... докт. биол. наук. — М., 1996. — 275 с.
27. *Tsygankova V. A., Zayets V. N., Galkina L. A., Blume Y. B.* The phytohormone-mediated action of the synthetic regulators on cell extension growth in higher plants // *Biopolymers and cell.* — 1999. — V. 15. — P. 432–441.
28. *Tsygankova V. A., Blume Ya. B.* Screening and peculiarity of the biological action of synthetic plant growth regulators // *Ibid.* — 1997. — V. 13, N 6. — P. 484–492.
29. *Кулаева О. Н., Прокопцева О. С.* Новейшие достижения в изучении механизма действия фитогормонов. // *Биохимия.* — 2004. — Т. 69, №3. — С. 293–310.
30. *Галкин А. П., Лешина Л. Г., Медведева Т. В. и др.* Регуляторные области промоторов генов растений и белки — регуляторы промоторной активности // *Биополимеры и клетка.* — 2004. — Т. 20, №5. — С. 363–379.
31. *Сидоров В. А., Пивень Н. М., Глеба Ю. Ю., Сытник К. М.* Соматическая гибридизация семейства пасленовых. — К.: Наук. думка, 1985. — 130 с.
32. *Ашмарин И. П., Лелекова Т. В., Санжиева Л. Ц.* Об эффективности ультрамалых доз и концентраций биологически активных соединений // *Известия Росс. АН. Серия биол.* — 1992. — № 4. — С. 531–536.
33. *Пономаренко С. П.* Изучение регуляторных механизмов клетки — путь к управлению качеством продукции в растениеводстве // *Зб. наук. праць Уманського держ. агр. ун-ту. Спец. випуск: Біол. науки та проблеми рослинництва.* — Умань, 2003. — С. 15–19.

**ОСОБЛИВОСТІ ДІЇ РЕГУЛЯТОРІВ РОСТУ
НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ
У КЛІТИНАХ ЗАРОДКІВ НАСІННЯ
В РАНЬОМУ ПОСТЕМБРИОГЕНЕЗІ**

В. А. Циганкова¹
Л. І. Мусатенко²
Л. О. Галкіна¹
А. П. Галкін¹
С. П. Пономаренко¹
К. М. Ситник²
Д. Е. Екін³

¹Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії
НАН України, Київ
E-mail: sponom @ukr.net

²Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН
України, Київ

³Тихоокеанська північно-західна лабораторія,
США

E-mail: david.eakin @pnl.gov

За допомогою α -аманітину — специфічного інгібітору синтезу мРНК і AD, що блокує переважно синтез рРНК, показано, що до завершення лаг-фази проростання насіння квасолі (18 год) на тлі пригнічення синтезу мРНК і рРНК, після їх набухання (із 6-ї год), включаються й активізуються у часі в клітинах зародкової

**THE PECULIARITY OF GROWTH
REGULATOR ACTION ON GENE
EXPRESSION IN CELL OF EMBRYO OF
SEEDS IN EARLY POSTEMBRYOGENESIS**

V. A. Tsygankova¹
L. I. Musatenko²
L. O. Galkina¹
A. P. Galkin¹
S. P. Ponomarenko¹
K. M. Sytnik²
D. E. Eakin³

¹Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: sponom @ukr.net

²Kholodny Institute of Botany of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

³Pacific Northwest National Laboratory, USA

E-mail: david.eakin @pnl.gov

α -Amanitin (a specific inhibitor of mRNA synthesis) and Actinomycin D (that blocks primarily rRNA synthesis) were used to inhibit mRNA and rRNA synthesis in sprouting bean seeds. It was demonstrated that prior to completion of the bean seed germination lag-phase (18 hours) with inhibited mRNA and rRNA synthesis following seed upswelling (after 6 hours),

осі процеси біосинтезу білка. На цій підставі нами зроблено висновок, що в ініціації біосинтезу білків у найраніший період постембріогенезу беруть участь відкладені в запас у пізньому ембріогенезі транскрипти мРНК і рРНК, а вже після 18-ї год у біосинтез білка включаються й новосинтезовані мРНК і рРНК.

За допомогою афідиколіну, що вибірково пригнічує реплікативний синтез ДНК, встановлено, що зростаючі потреби в продуктах експресії генів (білках) на стартових стадіях постембріогенезу забезпечуються ампліфікацією і структурних, і рибосомних генів. Стимулювальна дія регуляторів росту рослин пов'язана не з додатковим збільшенням числа копій генів, а з активацією генів шляхом посилення функцій промоторних і енансерних регуляторних послідовностей генів, через активацію трансфакторів білкової природи.

Сформульовано концепцію щодо механізмів дії екзогенних регуляторів росту рослин на генетичному рівні.

Ключові слова: зародкова вісь, синтез РНК, ампліфікація генів, регулятори росту.

protein biosynthesis processes are triggered and their duration actively increases in embryonic axis cells. Based on the above, we came to the conclusion that during the earliest stage of postembryogenesis, mRNA and rRNA transcripts stocked during late embryogenesis are involved in the initiation of protein biosynthesis; and newly synthesized mRNA and rRNA are also involved in the biosynthesis before root emergence (after 18 hours).

Aphidicolin that selectively suppresses DNA replication helped to determine that increasing needs in gene expression products (proteins) at early stages of postembryogenesis are satisfied by amplification of both structural and ribosomal genes. Stimulating effect of plant growth regulators is not related to additional amount of gene copies, but rather to gene activation through intensification of promoter and enhancer functions of gene regulatory sequences via activation of protein transactors.

The concept of exogenous plant growth regulators behavior at genetic level has been formulated.

Key words: embryonic axis, RNA synthesis, gene amplification, growth regulators.