

УЧАСТИЕ ФИТОХРОМОВ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ АППАРАТА ТРАНСКРИПЦИИ ПЛАСТИД В ХОДЕ ЦИТОКИНИН-ЗАВИСИМОЙ ДЕЭТИОЛЯЦИИ ПРОРОСТКОВ *Arabidopsis thaliana* НА КРАСНОМ СВЕТУ

Дорошенко Анастасия Сергеевна, аспирант Лаборатории экспрессии генома растений ФГБУН ИФР им. К.А. Тимирязева РАН, *anastasiya04101993@gmail.com*

Малюкова Анастасия Максимовна, студент кафедры физиологии растений МГУ им М.В. Ломоносова, *anastasia.malukowa@gmail.com*

Данилова Мария Николаевна, старший научный сотрудник Лаборатории экспрессии генома ФГБУН ИФР им. К.А. Тимирязева РАН, *mariadanilova86@yandex.ru*

Аннотация: Исследования начального этапа фотоморфогенеза *Arabidopsis thaliana* показали, что фитохромы РНУА и РНУВ избирательно регулируют экспрессию генов аппарата транскрипции пластид в ходе деэтиоляции. Позитивный эффект циокинина на экспрессию генов *groB*, *SIG2* и *SIG6*, вероятно, осуществляется за счет активности рецепторов РНУА и РНУВ.

Ключевые слова: фитохромы, цитокинины, деэтиоляция, *Arabidopsis*.

Рост и развитие растений определяется генетической программой, регуляция которой зависит от интеграции сигнальных путей факторов экзогенной и эндогенной природы. Свет является главным экзогенным фактором, определяющим запуск процесса деэтиоляции, ключевым событием которого является формирование фотосинтетически-активных хлоропластов. В основе этого лежит масштабное перепрограммирование экспрессии геномов растительной клетки. Светозависимое изменение экспрессии генов пластид определяется активностью и представленностью компонентов аппарата транскрипции пластома. В этиопластах присутствуют две РНК-полимеразы: моносубъединичная полимереза NEP (Nuclear-Encoded RNA Polymerase), кодируемая ядром, представлена двумя ферментами RPOTr и RPOTrp, которые, главным образом, осуществляют транскрипцию генов «домашнего хозяйства» пластид и проявляют наибольшую активность в условиях темноты, и мультисубъединичная РНК-полимераза PEP (Plastid-Encoded RNA Polymerase), которая состоит из коровых субъединиц α , β , β' и β'' , кодируемых пластомом (*groA*, *groB*, *groC1* и *groC2*), и одного из шести сигма-факторов SIG1 – SIG6 ядерного кодирования (*SIG1* – *SIG6*). Под действием белого света PEP претерпевает значительные структурные изменения, благодаря формированию комплекса с так называемыми PAP белками (PEP-Associated Proteins). В результате PEP становится основной РНК-полимеразой транскрибирующей

фотосинтетические гены пластома, в то время как NER продолжает транскрипцию генов «домашнего хозяйства» [1].

Изменения экспрессии генов под действием белого света опосредуют ряд фоторецепторов, воспринимающих свет в широком диапазоне, которые, вероятно, вносят различный вклад в позитивную регуляцию генов аппарата транскрипции в ходе деэтиоляции. У *Arabidopsis* известно пять рецепторов красного света RHYA-RHYE. В настоящий момент существуют данные об участии фитохромов в регуляции отдельных участников аппарата транскрипции пластома. Показано, что RHYA и RHYB контролируют экспрессию генов *SIG2* и *SIG6* [2], а также участвуют в регуляции экспрессии гена β -субъединицы (*rpoB*) РНК-полимеразы РЕР при длительном выращивании на красном свете [3].

Помимо света, важными эндогенными регуляторами фотоморфогенеза являются фитогормоны. Наше внимание привлекли цитокинины из-за их способности позитивно регулировать процесс деэтиоляции. В многочисленных исследованиях было показано позитивное влияние этого фитогормона на процесс деэтиоляции на белом свете: ускорение формирования ультраструктуры хлоропластов, стимуляция биосинтеза хлорофилла, позитивная регуляция экспрессии генов пути биосинтеза тетрапирролов и генов пластома [4,5]. Однако механизм, с помощью которого цитокинин оказывает позитивное влияние в ходе деэтиоляции, известен лишь частично. Мы предположили, что цитокинины могут активировать экспрессию генов через влияние на компоненты передачи сигнала красного света. С помощью нокаут-мутанта *phyAphyB* мы исследовали участие фитохромов в регуляции цитокинином экспрессии генов аппарата транскрипции в ходе деэтиоляции.

Растения дикого типа *Arabidopsis thaliana* экотипа *Landsberg erecta* и созданный на его основе нокаут-мутант *phyAphyB* высевали на чашки Петри с половинной жидкой питательной средой Мурасиге-Скуга без гормона (0 мкМ *транс*-зеатина) и с цитокинином (1 мкМ *транс*-зеатина). Далее, семена стратифицировали при температуре +4°C в течение 3 суток и переносили в условия полной темноты при +21-22°C. По истечении 4-х суток с момента прорастания этиолированные проростки фиксировали в жидком азоте в темноте (точка 0 ч), далее растения переносили на красный узкополосный свет с максимумом 660±20 нм (Ocean Optics USB2000+, USA) и интенсивностью 120±10 мкМ* с⁻¹* м⁻² (Li-COR Li-250A, USA) и фиксировали спустя 3, 6, 9 и 16 ч освещения. Контрольным образцом служили этиолированные проростки дикого типа, фиксированные в условиях темноты (точка 0 ч), выращенные на питательной среде без цитокнина (0 мкМ *транс*-зеатина). Относительный количественный уровень транскриптов оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени после обратной транскрипции на амплификаторе LigthCyclerR96 (“Roche”, Швейцария). Уровень транскриптов целевых генов был нормализован относительно уровня транскриптов референсного гена полиубиквитина (*UBQ10*).

Для доказательства эффективности выбранной модельной системы анализировали динамику уровня мРНК генов, экспрессия которых

положительно регулируется светом и цитокинином в ходе деэтиоляции. Анализ показал, что перенесение на красный свет проростков дикого типа и нокаут-мутанта *phyAphyB* стимулирует накопление транскриптов гена *LHCB2.4*, кодирующего белок светособирающего комплекса фотосистемы II. На фоне действия красного света экзогенный цитокинин позитивно регулировал уровень матриц гена *LHCB2.4* как в проростках материнской линии, так и у нокаут-мутанта *phyAphyB*, однако мутант отличался более слабой способностью к цитокинин-зависимому накоплению транскриптов в ходе деэтиоляции. При анализе экспрессии гена-маркера ответа на цитокинин *ARR5*, наоборот, различий между мутантом *phyAphyB* и диким типом не наблюдалось: в обоих случаях цитокинин активировал накопление мРНК *ARR5* гена в ходе деэтиоляции на красном свете. Эффективность выбранной нами модельной системы так же подтверждается достоверным укорочением hypocotyle проростков дикого типа и нокаут-мутанта *phyAphyB*, выращенных на питательной среде с добавлением 1 мкМ *транс-зеатина*.

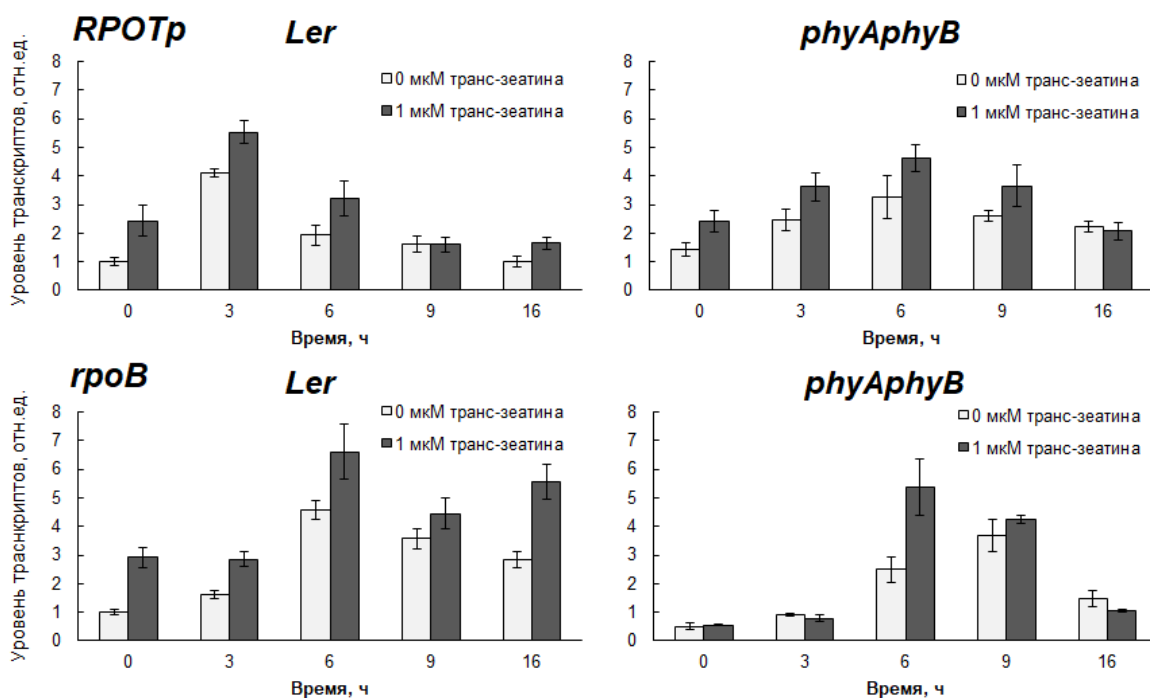


Рис. Динамика уровня транскриптов генов РНК-полимеразы фагового типа *RPOTr* и β -субъединицы комплекса РЕР *rpoB* в 4-х дневных проростках дикого типа *Landsberg erecta* (*Ler*) и нокаут-мутанта *phyAphyB* при цитокинин-зависимой деэтиоляции на красном свете

Анализ экспрессии генов РНК-полимеразы фагового типа *RPOTr* и β -субъединицы комплекса РЕР *rpoB* показал, что перенесение на красный свет проростков дикого типа *A. thaliana* и нокаут-мутанта *phyAphyB* индуцирует экспрессию обоих генов в ходе деэтиоляции (рис. 1). Однако профиль экспрессии этих генов в растениях нокаут-мутанта *phyAphyB* и его материнской линии различались: если в тканях дикого типа динамика содержания транскриптов *RPOTr* характеризовалась резким ростом уровня матриц, спустя

три часа освещения, и постепенным снижением к 16 ч, то в проростках нокаут-мутанта *phyAphyB* профиль экспрессии гена-интереса характеризовался более плавным ростом и снижением (рис.). Так же мутации влияли и на динамику экспрессии *rhoB*, сдвигая максимальный уровень транскриптов на 9 ч с начала освещения у мутанта *phyAphyB*, по сравнению с диким типом. На фоне красного света экзогенный цитокинин незначительно стимулировал накопление транскриптов обоих генов РНК-полимераз в ходе деэтиоляции в проростках дикого типа. Позитивное действие цитокина в ходе деэтиоляции нокаут-мутанта *phyAphyB* сохранялось на экспрессию гена *RPOTr*, в то время как регуляция уровня транскриптов *rhoB* практически отсутствовала (рис.).

Далее анализировали влияние красного света и цитокинина, а также участие рецепторов красного света в этом процессе, на экспрессию четырех генов сигма-факторов. Оценка содержания транскриптов генов *SIG1*, *SIG2*, *SIG5* и *SIG6* в 4-х дневных этиолированных проростках дикого типа *A. thaliana*, перенесенных на красный свет, демонстрировала рост уровня матриц всех четырех исследуемых нами генов. Инактивация рецепторов РНУА и РНУВ приводила к пониженной способности накапливать матрицы двух сигма-факторов, а именно *SIG5* и *SIG6*, под действием красного света, судя по реакции нокаут-мутанта *phyAphyB*. Напротив, эффект мутаций на экспрессию генов *SIG1* и *SIG2* отсутствовал. Выращивание проростков дикого типа *A. thaliana* на питательной среде с цитокинином избирательно регулировало транскрипцию генов сигма-факторов: стимулировало экспрессию *SIG1* и *SIG2*, подавляло уровень матриц *SIG5* и не регулировало экспрессию гена *SIG6* в ходе деэтиоляции на красном свете. На фоне действия красного света экзогенный цитокинин не регулировал экспрессию гена *SIG1*, *SIG2* и *SIG6* в 4-х дневных проростках *phyAphyB*.

Формирование фитосинтетически-активных хлоропластов под действием света и цитокинина требует координированной экспрессии ядерного и пластидного геномов растительной клетки. Ранее Даниловой с соавторами была показана цитокинин-зависимая регуляция экспрессии генов аппарата транскрипции на белом свете: экзогенный цитокинин вызывал увеличение уровня транскриптов генов РНК-полимераз *RPOTr* и *RPOTrp* и сигма-фактора *SIG2*, регулировал накопление матриц сигма-фактора *SIG5* [5]. В данной работе была предпринята попытка изучить участие рецепторов фитохромов в цитокинин-зависимой регуляции экспрессии генов аппарата транскрипции пластид. Наши результаты показали, что рецепторы РНУА и РНУВ избирательно регулируют экспрессию генов аппарата транскрипции пластома: определяют профиль экспрессии генов РНК-полимераз *RPOTr* и *rhoB*, регулируют экспрессию генов сигма-факторов *SIG5* и *SIG6* под действием красного света в процессе деэтиоляции. Вероятно, активирующий эффект красного света в отсутствие главных рецепторов РНУА и РНУВ на уровень матриц выбранных для анализа генов определяется активностью оставшихся трех функционально-активных рецепторов (РНУС – РНУЕ). Позитивный эффект цитокинина в ходе деэтиоляции на регуляцию экспрессии генов *rhoB*,

SIG2 и *SIG6*, вероятно, объясняется его действием через фоторецепторы РНУА и РНУВ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №19-34-90183 и проекта РФФИ №20-04-00294

Библиографический список

1. Börner, T. Chloroplast RNA Polymerases: Role in Chloroplast Biogenesis / T. Börner, A. Aleynikova, Y. Zubo, V. Kusnetsov // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2015. – V. 1847. – P. 761-769.

2. Oh, S. Phytochrome-dependent coordinate control of distinct aspects of nuclear and plastid gene expression during anterograde signaling and photomorphogenesis / S. Oh, B.L. Montgomery // *Front Plant Sci.* – 2014. – V. 5:171.

3. Yoo, C.Y. Phytochrome Activates the Plastid-Encoded RNA Polymerase for Chloroplast Biogenesis via Nucleus-To-Plastid Signaling / C.Y. Yoo, E. K. Pasoreck, H. Wang, J. Cao, G. M. Blaha, D. Weigel, M. Chen // *Nat Commun.* – 2019. – V. 10:2629.

4. Cortleven, A. Cytokinin Regulates the Etioplast-Chloroplast Transition Through the Two-Component Signaling System and Activation of Chloroplast-Related Genes / A. Cortleven, I. Marg, M. V. Yamburenko, H. Schlicke, K. Hill, B. Grimm, G. E. Schaller, T. Schmölling // *Plant Physiol.* – 2016. – V.172. – P.464-478.

5. Danilova, M.N. Plastome Transcription Machinery and Peculiarities of the Expression of Its Genes during Cytokinin-Dependent Deetiolation of *Arabidopsis thaliana* / M.N. Danilova, A.S. Doroshenko, N.V. Kudryakova, A.A. Andreeva, V.V. Kusnetsov // *Russian Journal of Plant Physiology.* – 2018. – V. 65. – P.801-812.

ФАКУЛЬТЕТ ЗООТЕХНИИ И БИОЛОГИИ

СЕКЦИЯ АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ В СОВРЕМЕННОМ ЖИВОТНОВОДСТВЕ

УДК 636.52/.58.033:697.92

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЦИРКУЛЯЦИИ ВОЗДУХА В ПОМЕЩЕНИИ ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ БРОЙЛЕРОВ В ХОЛОДНЫЙ ПЕРИОД ГОДА

*Малородов Виктор Викторович, аспирант кафедры частной зоотехнии
ФГБОУ ВО «РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева», Malorodov@gmail.com*

Аннотация: *проведён эксперимент с целью определения эффективности выращивания бройлеров в зависимости от равномерности распределения воздушных потоков в птичнике в холодный период года с использованием циркуляционных вентиляторов.*