

УДК 581.19

UDC 581.19

03.00.00 Биологические науки

Biology

**ЦИКЛИЧНОСТЬ ВЛИЯНИЯ
АКТИНОМИЦИНА Д НА РОСТ
КОЛЕОПТИЛЕЙ ЯЧМЕНЯ****CYCLICAL EFFECTS OF ACTINOMYCIN D
ON THE BARLEY COLEOPTILES GROWTH**

Плотников Владимир Константинович
д.б.н., доцент
vkpbio21@mail.ru
ID: 3971-2200

Plotnikov Vladimir Konstantinovich,
Dr.Sci.Biol., associate professor
vkpbio21@mail.ru

Репко Наталья Валентиновна
к.с.-х. н., доцент
natalja.repko@yandex.ru
ID: 1264-9739

Repko Natalia Valentinovna
Cand.Agr.Sci., associate professor
natalja.repko@yandex.ru

Салфетников Анаталий Алексеевич
д.с.-х.н., профессор
Salfetnikov39@mail.ru
ID: 9677-3687
*Кубанский государственный аграрный университет,
Краснодар, Россия*

Salfetnikov Anatalij Alexeevich
Dr Sci.Agr., professor
Salfetnikov39@mail.ru
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

Ингибитор синтеза РНК - антибиотик актиномицин Д, интеркалируя в ДНК по G-C парам, механически останавливает деятельность всех РНК-полимераз. В первую очередь (в наименьшей концентрации) - РНК-полимеразу 1, осуществляющую синтез рибосомной РНК (рРНК), так как гены этой РНК особенно богаты G-C парами. Для блокады транскрипции матричной РНК (мРНК), гены которых, как правило, обогащены А-U парами, необходима более высокая концентрация актиномицина Д. При замачивании семян на растворе актиномицина Д, антибиотик блокирует синтез РНК и прорастание семян происходит за счёт долго живущей РНК, имеющейся в зрелом семени. В статье представлены экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что по мере хранения семян озимого ячменя происходит изменение действия актиномицина Д на рост coleoptiles. Показано, что актиномицин Д в концентрации 40 мкг/мл в октябре снижал рост, в декабре действие его не достоверно, а в феврале парадоксально усиливал рост coleoptiles. Предполагается, что часть актиномицина Д связывалась ингибитором роста coleoptiles, структура которого изменяется в ходе хранения семян и возрастает сродство актиномицина Д к ингибитору. При концентрации 60 мкг/мл актиномицин Д эффективно снижал рост coleoptiles. Подавление роста корней проростков происходило пропорционально концентрации актиномицина Д и времени экспозиции. Представляет интерес исследование природы ингибитора роста coleoptiles, способного связываться с актиномицином Д

In cell biology, actinomycin D is shown to have the ability to inhibit transcription. Actinomycin D does this by binding DNA at the transcription initiation complex and preventing elongation of RNA chain by RNA polymerase. When soaking the seeds in a solution of actinomycin D, antibiotic blocks RNA synthesis and seed germination occurs at the expense of long-living RNA, available in the mature seed. In the article we present experimental data indicating that as storage seeds of winter barley are changing the action actinomycin D on the growth of coleoptiles. It is shown that actinomycin D at a concentration of 40 µg/ml in October reduced the growth, in December it was not authentically, and in February it was paradoxical amplified growing coleoptiles. We suggest the part of the actinomycin D fastened with growth inhibitor coleoptiles, whose structure changes during seed storage and increase the affinity of actinomycin D to the inhibitors. At a concentration of 60 µg/ml actinomycin D effectively reduced of the coleoptiles growth. Suppression of seedlings roots growth was proportional to the concentration of the actinomycin D and exposure time

Ключевые слова: ЯЧМЕНЬ, ДОЛГОЖИВУЩАЯ РНК, РОСТ, КОЛЕОПТИЛИ, КОРНИ, АКТИНОМИЦИН Д, ВРЕМЯ ХРАНЕНИЯ СЕМЯН

Keywords: BARLEY, LONG-LIVING RNA, GROWTH, COLEOPTILES, ROOTS, ACTINOMYCIN D, TIME OF SEED STORAGE

Введение

Зрелые семена содержат весь метаболический аппарат транскрипции и трансляции, а также долгоживущие РНК, функционирующие при набухании. При замачивании семян на растворах специфических ингибиторов синтеза РНК (актиномицин Д, α -аманитин и др.), осуществляемого ДНК-зависимыми РНК-полимеразами, семена растений наклёвываются, и происходит рост корней и проростков за счет долгоживущей РНК семени.

Замачивание семян на растворе актиномицина Д, по сути предоставляет возможность по косвенным показателям первых часов роста coleoptilia и корней проростков судить о сортоспецифической гетерогенности свойств долгоживущей РНК зрелых семян.

Подобная работа была выполнена ранее с сортами озимой мягкой пшеницы [6, 18]. Актиномициновая блокада транскрипции в замачиваемых семенах приводила к снижению интенсивности роста проростков. В наибольшей степени снижался рост корней проростка. Однако действие актиномицина Д было не стабильно и сильно варьировало от опыта к опыту. Вероятно, это связано с тем, что скорость поступления актиномицина Д в сухое зерно зависит не только от температуры, освещения и влажности (эти условия были стабильны в термостатированных чашках Петри), но и от атмосферного давления, которое менялось неконтролируемо.

Вместе с тем, в ходе этих исследований был отмечен парадоксальный эффект актиномицина Д: в концентрации 20мкг/мл актиномицин не подавлял рост coleoptiles (а иногда и корней), а наоборот – стимулировал [6, 18].

Впервые парадоксальный эффект действия актиномицина Д был описан ещё в 1969 году. Гордон Томкинс и др. [23], изучая действие глюкокортикоидов на регуляцию синтеза тирозинаминотрансферазы (ТАТ) в клетках печени, показали, что индукция ТАТ стероидными гормонами не только не снижается, но даже резко стимулируется при блокаде транскрипции актиномицином Д. Эти данные послужили основанием для гипотезы о посттранскрипционном механизме индукции ТАТ глюкокортикоидами, согласно которой предполагается наличие в цитоплазме клеток нестабильного репрессора, синтезируемого особым регуляторным геном. Репрессор препятствует тем или иным способом осуществлению функции мРНК, вызывая, например, её быструю деградацию. Индукция синтеза фермента стероидными гормонами становится возможной благодаря связыванию ими репрессора. Актиномицин Д, блокируя синтез мРНК, приводит к снижению внутриклеточного содержания нестабильного репрессора и вследствие этого к ускоренному синтезу специфического белка. Этот феномен был назван Г. Томкинсом и соавторами «спасением» мРНК, или супериндукцией [23, 24].

Многочисленные литературные данные о парадоксальном действии актиномицина Д во многих случаях индукции синтеза ферментов, увеличения трансляционной активности полирибосом и мРНК в животных и растительных клетках позволяет полагать, что описанная система регуляции имеет широкое распространение [7-21, 22, 24].

Сообщения об открытии разнообразных ингибиторов трансляции, возможно, имеют отношение к гипотетическому репрессору [18, 19].

И совершенно новую теоретическую трактовку гипотеза Томкинса получает в связи с открытием явления РНК-интерференции, с открытием большого количества малых некодирующих РНК, основная функция которых - инициировать распад ген-специфических мРНК [18, 19].

Ингибитор синтеза РНК - антибиотик актиномицин Д, интеркалируя в ДНК по G-C парам, механически останавливает деятельность всех РНК-полимераз. В первую очередь (в наименьшей концентрации) - РНК-полимеразу 1, осуществляющую синтез рибосомной РНК, так как гены этой РНК особенно богаты G-C парами [1].

В экспериментах на пшенице было выдвинуто предположение, что распад РНК, гены которой обогащены G-C и потому наиболее чувствительны к блокаде транскрипции актиномицином Д, снимает ингибирующее действие на рост проростков пшеницы по той причине, что помимо рРНК, в составе этой группы РНК, могут быть и мРНК белков – ингибиторов роста. Для блокады транскрипции мРНК, гены которых, как правило, обогащены A-U парами, необходима более высокая концентрация актиномицина Д и она достигалась при концентрации 40 мкг/мл [6, 18].

Этот феномен интересен с точки зрения сопряжения регуляции экспрессии генов и регуляции роста растений, с которым связаны все основные биологические особенности растения: стрессоустойчивость, фотопериодичность и др. Поэтому представляло несомненный интерес выяснить, как повлияют разные концентрации актиномицина Д на процессы роста проростков разных сортов озимого ячменя, отличающегося от пшеницы по целому ряду вышеупомянутых особенностей, в ходе хранения зерна.

Материал и методы

Исследования проводили на этиолированных проростках ряда сортов озимого ячменя (*Hordeum vulgare L.*). Актиномицин Д использовали в концентрации от 20 до 60 мкг/мл по 12 мл на чашку Петри (9 см в диаметре) и 100 семян ячменя. В каждом эксперименте 2 чашки Петри контрольные (дистиллированная вода) и 2 чашки опытные, каждого сорта. Поскольку актиномицин Д обладает фотодинамическим эффектом, все

эксперименты проводили в темноте, при 25°C в течение 3-х или 4-х суток. В таблицах даны средние арифметические значения.

Результаты и их обсуждение

В первых двух экспериментах, проведённых в декабре 2013 года, использовалась концентрация 40 мкг/мл при замачивании семян четырёх сортов озимого ячменя урожая этого года. Как и у озимой мягкой пшеницы при этой концентрации актиномицина Д подавлялся рост корней на 40-50%, но, в отличие от пшеницы, подавление роста coleoptiles было не достоверно (табл. 1).

Увеличение экспозиции семян на растворе актиномицина Д до четырёх суток на фоне более выраженного роста увеличивало подавление роста корней до 50-60%, но изменение роста coleoptiles также было недостоверно (табл. 2).

Таблица 1. Влияние актиномицина Д на рост coleoptiles и корней 3-х суточных этиолированных проростков озимого ячменя (концентрация актиномицина Д - 40 мкг/мл, результаты двух независимых экспериментов, декабрь 2013 года)

Сорт	Средняя длина, см			
	Coleoptile		Корень	
	контроль/опыт	% от контроля	контроль/опыт	% от контроля
Кондрат	2,11/1,97	93	4,72/2,59	55
	1,83/1,83	100	5,75/2,84	49
Самсон	1,98/1,99	100	4,40/2,20	50
	2,86/2,21	72	7,01/2,87	41
SZD-7385	3,00/1,60	53	4,70/2,08	44
	2,77/2,66	96	5,20/3,10	60
Кариока	2,16/2,06	95	4,70/2,08	44
	2,08/2,13	102	5,98/3,19	53

Таблица 2. Влияние актиномицина Д на рост coleoptiles и корней 4-х суточных этиолированных проростков озимого ячменя (концентрация актиномицина Д - 40 мкг/мл, декабрь 2013 года)

Сорт	Средняя длина, см			
	Coleoptile		Корень	
	контроль/опыт	% от контроля	Контроль	% от контроля
Кондрат	4,07/3,95	97	8,30/3,15	38
Самсон	4,11/3,88	94	8,01/2,70	34
SZD-7385	4,57/4,36	95	6,66/3,15	47
Кариока	3,71/3,96	107	8,25/2,77	34

В аналогичном эксперименте на 3-х суточных проростках в феврале 2014 года рост корней снижался на 40-50%, как и в первом эксперименте (табл. 1), но актиномицин Д вызвал вполне достоверный рост coleoptiles на 23-44% (табл. 3), аналогично тому, как это наблюдалась у пшеницы при концентрации 20 мкг/мл [6, 18].

Рост coleoptiles контрольного варианта в этом эксперименте был самым слабым из всей серии опытов. Всхожесть семян, как в контроле, так и в опыте, была на уровне 30-50% у всех сортов. Следовательно, актиномицин Д в концентрации 40 мкг/мл не влиял на всхожесть.

Таблица 3. Рост coleoptiles и корней 3-х суточных этиолированных проростков озимого ячменя при проращивании семян на растворе актиномицина Д (40 мкг/мл, февраль 2014 года)

Сорт	Средняя длина, см			
	Coleoptile		Корень	
	контроль/опыт	% от контроля	Контроль/опыт	% от контроля
Кондрат	1,83/2,46	134	5,03/3,05	61
Самсон	1,76/2,24	127	4,92/2,43	49
SZD-7385	1,75/2,28	123	4,28/2,48	49
Кариока	1,56/2,24	144	5,66/3,28	58

На примере сорта Кондрат было изучено влияние разных концентраций актиномина Д. Как следует из таблицы 4 только концентрация 40 мкг/мл определяла достоверное усиление роста coleoptiles. Действие концентрации 20 мкг/мл было недостоверным, а при концентрации актиномина Д 60 мкг/мл наблюдалась тенденция к подавлению роста coleoptiles. При этом рост корней ступенчато снижался: чем выше концентрация актиномина Д, тем эффективнее подавление роста корней (табл. 4). На всхожесть семян актиномина Д не влиял и в этой концентрации (60 мкг/мл).

В марте концентрация 60 мкг/мл уверенно подавляла рост coleoptiles на 16-36% у всех сортов, взятых в исследование (табл. 5). При этом действие актиномина Д на проростки ячменя сорта Кондрат было более выраженным, чем в феврале (табл. 4). Это относится как к coleoptiles (91% в феврале против 64% в марте), так и к корням (34% против 23%).

В мае 2014 года актиномина в концентрации 60 мкг/мл достоверно подавлял рост проростков (табл. 6).

В таблице 7 представлены данные, полученные при изучении зерна ячменя, урожая 2014 года. В октябре 2014 года актиномина Д в концентрации 40 мкг/мл вполне достоверно снижал рост как корней, так и coleoptiles.

Таблица 4. Влияние концентрации актиномина Д на рост coleoptiles и корней 3-х суточных проростков озимого ячменя сорта Кондрат (февраль, 2014 г.)

Концентрация актиномина Д, мкг/мл	Средняя длина, см			
	Coleoptile		Root	
	control/experiment	% of control	control/experiment	% of control
20	2,20/2,10	95	5,90/3,80	64
40	2,20/2,50	114	5,90/3,10	53
60	2,20/2,00	91	5,90/2,00	34

Таблица 5. Рост coleoptiles и корней 3-х суточных этиолированных проростков озимого ячменя при проращивании зерна на растворе актиномицина Д (60 мкг/мл, март, 2014 года)

Сорт	Средняя длина, см			
	Coleoptile		Root	
	control/experiment	% of control	control/experiment	% of control
Кондрат	2,18/1,39	64	6,21/1,45	23
Самсон	2,11/1,88	78	5,57/1,79	32
SZD-7385	2,51/1,99	79	6,22/1,85	30
Кариока	2,26/1,90	84	6,17/1,45	24

Таблица 6. Рост coleoptiles и корней 3-х суточных этиолированных проростков озимого ячменя при проращивании зерна на растворе актиномицина Д (60 мкг/мл, май 2014 года)

Сорт	Средняя длина, см,			
	Coleoptile		Root	
	control/experiment	% of control	control/experiment	% of control
Кондрат	2,34/2,08	89	5,22/1,85	35
SZD-7385	2,82/2,21	71	5,16/1,95	38

В это время происходило полное лунное затмение. Вероятно, этим объясняется то, что всхожесть в среднем была только около 10%. Однако проросшие семена росли весьма интенсивно (табл. 7).

Таблица 7. Рост coleoptiles и корней 3-х суточных этиолированных проростков озимого ячменя при проращивании семян на растворе актиномицина Д (40 мкг/мл, 8 октября 2014 года)

Сорт	Средняя длина, см			
	Coleoptile		Корень	
	контроль/опыт	% от контроля	контроль/опыт	% от контроля
Кондрат	2,53/1,90	75	5,78/2,47	43
Самсон	2,30/2,00	87	6,00/2,73	46
SZD-7385	2,67/2,12	79	4,66/3,00	64
Кариока	2,57/2,19	85	6,00/2,79	47

Это был единственный эксперимент, когда концентрация актиномицина Д 40 мкг/мл эффективно подавляла рост coleoptiles всех четырёх сортов ячменя, взятых в исследование. Изложенные выше экспериментальные данные позволяют полагать, что, по мере хранения семян, требуется все большая концентрация актиномицина Д, чтобы обеспечить эффект подавление роста.

Как известно, пока зерно живой организм, оно дышит, при этом в основном расходуются углеводы. Следовательно, при хранении количество углеводов уменьшается, за счёт этого вначале возможно даже относительное увеличение белков, среди которых имеются специфические ингибиторы прорастания семян и роста проростков.

Мысль о том, что в прорастающих семенах могут существовать замаскированные, или долгоживущие, формы матричной РНК, возникла в связи с необходимостью объяснить сходство между ранними метаболическими изменениями, происходящими при прорастании семян и на ранних стадиях эмбриогенеза у многих животных [2]. Так, при оплодотворении яйца морского ежа происходит активация синтеза белка. Этот процесс наблюдается и в присутствии актиномицина Д. Это значит,

что мРНК уже присутствует в яйце и что оплодотворение стимулирует скорее её трансляцию, чем транскрипцию.

Стабильность мРНК зависит как от гена, копией которого она является, так и от условий окружающей среды. Индивидуальные мРНК значительно различаются по времени жизни, которое варьирует от нескольких минут до нескольких недель. Примером мРНК с относительно продолжительным периодом полужизни у животных является мРНК синтеза кератина пера. Синтез этого белка начинается с 13-го, интенсивно происходит уже на 15-й день развития цыплят при инкубации. После актиномициновой блокады в конце 13 дня синтез белка в коже зародыша полностью прекращается в пределах 24 часов. Однако синтез кератинов продолжается до 15 дня. Эти данные показывают, что мРНК, кодирующая синтез кератина в 15-дневном зародыше, синтезировалась ранее и хранилась в клетках кожи, что свидетельствует о ее высокой стабильности.

Другим примером роли стабильности мРНК может служить глобиновая мРНК, составляющая 90% суммарной мРНК ретикулоцитов у млекопитающих. После потери ядра и в отсутствии транскрипции генов, происходящей во время созревания ретикулоцитов, они длительное время (до 3-х суток) сохраняют гемоглобиновые мРНК и синтез гемоглобина. Запасённая в ретикулоцитах гемоглобиновая мРНК постепенно разрушается, и в зрелых эритроцитах синтез гемоглобина не происходит [18, 19].

В животных и растительных клетках идентифицировано много частиц и предшественников (информосом), которые содержат запасную мРНК и синтез белка на ранних стадиях прорастания зерна регулируется упорядочным превращением предшественников в активные полисомы. Возможно, этому процессу способствует удаление специфического ингибитора, препятствующего связыванию мРНК с рибосомами, или в

результате изменений в самих рибосомах, благодаря которым они приобретают способность связываться с РНК.

По крайней мере, в зародышах пшеницы через 16 часов набухания включение радиоактивно меченой аминокислоты в белок возросло почти в 130 раз. При этом актиномицин Д не подавлял активацию синтеза белка и увеличение числа полисом, но пуромицин, ингибитор функции рибосом, подавляет эти процессы. Сходные данные об увеличении числа полисом во время прорастания были получены в опытах с семенами арахиса, сосны смолистой, гороха и белого клёна, а также в опытах с прорастающими пыльцевыми зёрнами, спорами грибов и бактерий [3].

Актиномицин Д (дактиномицин, актиномицин С₁) – антибиотик с молекулярным весом 1255. Достоверно неизвестны какие-либо химические реакции, кроме синтеза РНК на матрице ДНК, на которые воздействовал бы актиномицин Д, что позволяет говорить о высокой специфичности его действия [2].

Однако в последнее время появились медицинские данные, позволяющие полагать, что актиномицин Д способен связываться с белками. В частности, актиномицин ингибирует дыхание и образование АТФ в лейкоцитах человека, больного лейкемией [3].

Вместе с тем, исходя из аналогии семени растений и половой клетки животных можно ожидать наличия малых РНК в зрелом зерне, подобно тем, что обнаружены у плодовых мушек (дрозофилл). Стерильность или фертильность дрозофилл определяется не только информацией, записанной в ДНК, но и наличием или отсутствием короткой молекулы РНК (РНК-интерференции) в материнской яйцеклетке. Эта РНК блокирует передвижение транспозонов (мобильных генетических элементов), способных самостоятельно перемещаться по геному, встраиваясь в различные участки. Такие передвижения приводят зачастую к мутациям, и, как следствие, к нарушению нормального функционирования клеток [5].

Это позволяет предполагать, что актиномицин Д может приобретать способность частично связываться с ингибиторами роста растений (белковой или РНК-овой природы) в результате изменения их свойств в ходе хранения зерна, что стимулирует рост колеоптилей при концентрации 20 мкг/мл у озимой мягкой пшеницы [6, 18] и при 40 мкг/мл у озимого ячменя (табл. 3), что подтверждает имеющееся в научной литературе наблюдения видовой специфичности действия актиномицина Д [3]. Вероятно, это говорит о том, что семена озимого ячменя содержат существенно больше ингибитора роста по сравнению с семенами озимой мягкой пшеницы.

Сложен вопрос о концентрациях актиномицина Д. Большая часть данных получена на животных объектах. Так, на культуре тканей животных показано, что концентрация в 1-2 мкг/мл почти полностью подавляет синтез РНК. Концентрация 0,05-0,2 мкг/мл используют для избирательного подавления синтеза рРНК (синтез мРНК при этом тоже значительно подавляется). На яйцах морского ежа для подавления синтеза РНК необходимы концентрация порядка 20-25 мкг/мл. Эти же величины были получены, когда в качестве критерия действия служила остановка развития на средней бластуле: заметный эффект обнаруживался уже при 3-5 мкг/мл, но максимальное действие достигалось при 20 мкг/мл и не изменялось при дальнейшем повышении концентрации до 100-200 мкг/мл. Наконец, на амёбе полное и быстрое подавление синтеза РНК достигалось только при концентрации порядка 1000 мкг/мл [1].

Создаётся впечатление, что эти различия связаны только с разной проницаемостью этих клеток для актиномицина и что внутриядерная концентрация, необходимая для одинакового подавления транскрипции, также одинакова. Однако экспериментальных данных такого рода нет.

В семенах хлопчатника актиномицин Д в концентрации 20 мкг/мл в течении 16 часов на 63% подавлял включение ^{32}P в РНК, но не оказывал

никакого влияния на включение ^{14}C -аминокислот в растворимый белок и не менял соотношения моносом и полисом, а также профиль полисом при центрифугировании в сахарозном градиенте [3]

Обработка семядолей прорастающего гороха актиномицином Д в концентрации 5 мкг/мл приводила к снижению включения трития в суммарную РНК, но содержание ген-специфической мРНК легумина, одного из запасных белков, оказывалось выше, чем в контрольной РНК из семядолей не обработанных актиномицином Д. Автор исследования считает, что это проблема обусловлена низкой концентрацией актиномицина [25].

Однако, поскольку количество индивидуальной ген-специфической мРНК определяли методом молекулярной гибридизации с соответствующим ген-специфическим олигонуклеотидом, увеличение содержания мРНК легумина может быть артефактом, связанным с тем, что при частичном деаденилировании мРНК в ходе её распада в условиях блокады транскрипции происходит частичная утрата вторичной структуры мРНК. В связи с этим большее количество мРНК оказывается доступно к молекулярной гибридизации (при условии недостаточной денатурации РНК при молекулярной гибридизации).

Другими словами, имеет место мнимый эффект, противоположный тому, что наблюдается у суммарной мРНК проростков озимой мягкой пшеницы при закаливающих температурах: увеличение полиаденилирования мРНК в этих условиях приводит к гипохромному эффекту и снижению эффективности молекулярной гибридизации [12, 16, 18, 19]. Создаётся впечатление, что закаливающая температура снижает количество РНК. На самом деле это не так.

Введение актиномицина Д в созревающий початок кукурузы (20 день после опыления) в количестве 0,4-0,5 мг, что соответствует приблизительно концентрации 10-20 мкг/мл, приводило к значительному

превалированию распада мРНК над синтезом [10, 11]. На 30-й день от опыления в первые 6-8 часов блокады транскрипции активность свободных полисом в бесклеточной системе синтеза белка (*in vitro*) повышалась в 4 раза, но практически не изменилась активность мембраносвязанных полисом, которая была исходно в два раза выше, чем у свободных полисом [10]. Это свидетельствует о том, что актиномицин стимулировал образование свободных полирибосом из имеющихся в зерне белков рибосом, рРНК и мРНК, в то время как формирование фракции мембраносвязанных полисом уже было завершено.

Вместе с тем, подобный эффект усиления трансляционной активности *in vitro* наблюдался для полирибосом, выделенных из зелёных четырёхсуточных проростков озимой мягкой пшеницы и озимого ячменя в первые 6-8 часов действия закаливающей температуры (4°C), а также при засолении и обезвоживании, что обычно сопровождается повышением активности ферментов РНК-аз (возможен избирательный распад коротко живущих РНК, подобно актиномициновой блокаде транскрипции) [4]. Эти факты также свидетельствует в пользу предположения о наличие в зерне и в проростках относительно коротко живущего ингибитора формирования полирибосом.

Есть данные о том, что актиномицин Д увеличивает степень полиаденилирования поли-(А)-хвоста мРНК, энхансера (усилителя) трансляции, в первые часы блокады транскрипции; аналогичное увеличение поли-(А)-последовательности на 3'-конце мРНК наблюдается и при закаливающих стрессовых условиях среды [18, 19].

Эксперименты по изучению включения ³Н-уридина во вновь синтезирующуюся РНК созревающего зерна кукурузы показали, что в РНК зерна опытных початков даже через 20 и 50 часов после введения ингибитора включалось только 30-35% меченого нуклеотида от уровня контроля. При этом был отмечен разный характер распада суммарной

мРНК и зеин-специфической мРНК (зеин 22кДа): распад суммарной мРНК происходит относительно плавно, в то время как для зеин-специфической мРНК наблюдается ускоренный распад на первых этапах актиномициновой блокады транскрипции. Вероятно это связано с постепенностью вхождения актиномицина Д в зерно и особенностью нуклеотидного состава разных генов. Как известно, белки-проламины, к которым относятся зеины, обогащены такими аминокислотами как пролин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты. Соответственно кодомам этих аминокислот, гены зеинов обогащены парами оснований G:C, подобно генам рРНК, и потому их транскрипция подавляется в первую очередь и меньшими концентрациями актиномицина Д по сравнению с генами не зеиновых белков. Кроме того, мРНК зеинов в созревающем зерне доминирует над остальными по количеству, а в популяции этих мРНК имеется большая группа относительно коротко живущих молекул [11].

Вместе с тем, актиномицин Д эффективно нарушал превращение свободного лизина созревающего зерна кукурузы в другие аминокислоты и сохранял белковый комплекс (соотношение альбуминов, глобулинов и зеинов) ранних этапов развития зерна, когда был введен в початок антибиотик, что предположительно объясняется распадом короткоживущих регуляторных РНК или белков [7, 8, 13, 18, 19].

Анализ научной литературы показывает, что в процессе прорастания семян также транскрибируются и новые мРНК. В основном это транскрипты кодирующие белки необходимые для нормального клеточного метаболизма, так называемые белки «домашнего хозяйства». Специальных белков прорастания не найдено. Известно, что в набухающем семени транскрипционная активность снижена в течение первых 16 часов прорастания. Доля новосинтезированных мРНК в трансляции белка в дальнейшем постепенно возрастает и далее полностью определяет рост проростка. Важность запасённой мРНК для белкового

синтеза на ранних этапах прорастания семени была подтверждена в исследованиях на модельном объекте *Arabidopsis thaliana* с применением ингибитора транскрипции α -аманитина. Кроме этого было показано, что протеом прорастающего на α -аманитине семени, охарактеризованного по включению ^{35}S -метионина в новосинтезированные белки, отличался от протеома семени прорастающего на воде и более напоминал протеом созревающего семени, чем прорастающего. Таким образом, запасённая мРНК включает в себя транскрипты необходимые и в позднем эмбриогенезе и при прорастании [6].

Переход от позднего эмбриогенеза к прорастанию имеет постепенный характер и поэтому эти две фазы сосуществуют. Это показано с помощью методов анализа экспрессии генов с использованием микрочипов. Был проанализирован профиль экспрессии генов в сухом и набухшем семени дикого типа *A. thaliana*. Репрезентативная выборка в микрочиповом анализе составила 22 476, из них 12 470 видов мРНК количественно определены в сухих семенах (запасённая РНК). Похожее количество транскриптов определено в 24 часовом набухшем семени (14395 генов). В среднем 2-3 % генов (~500 генов) с высокой экспрессией активны в сухом семени. Это гены, определяют синтез и деградацию белка. Особенно заметны рибосомные белки, факторы инициации и элонгации трансляции, что отражает крайнюю необходимость синтеза белка на раннем этапе прорастания. Многочисленные виды мРНК ответственны не только за протеазы/пептидазы, но и также за белки родственные системе убиквитин/протеосома. Вовлечение селективного протеолиза в процесс раннего прорастания семени необходимо для масштабного разрушения белковых тел, содержащих запасные белки [6].

Основной вывод

Изложенные в настоящей статье результаты исследований влияния актиномицина Д на рост coleoptiles озимого ячменя и анализ научной литературы позволяют сделать вывод, что в ходе хранения семян происходит усиление сродства актиномицина Д к гипотетическому ингибитору роста проростков, как уже имеющегося в зрелом зерне, так и в проростках. На первых этапах хранения семян (октябрь) актиномицин в концентрации 40 мкг/мл эффективно подавлял рост проростков, в дальнейшем эффективность падала (декабрь) или наблюдался обратный эффект – усиление роста coleoptiles (февраль).

Это можно объяснить частичным связыванием актиномицина Д с ингибитором роста проростков, а следовательно падением концентрации актиномицина ниже 40 мкг/мл. Увеличение исходной концентрации актиномицина Д до 60 мкг/мл снимало эффект усиления роста. По-видимому, этой концентрации хватало и для связывания с ингибитором и для подавления роста проростков. Этот эффект менее свойственен для корней проростков, чаще всего рост корней снижался обратно пропорционально возрастанию концентрации актиномицина Д.

Таким образом, при закладке опытов по блокаде транскрипции генома семян озимого ячменя необходимо учитывать срок хранения семян. Представляются перспективными дальнейшие исследования природы ингибитора роста coleoptiles, его идентификации и выделения с целью управления ростом растения, что в свою очередь определяет стрессоустойчивость, фотопериодизм и другие важные свойства растительного организма.

Литература

- 1) Детлаф Т.А., Бродский В.Я., Гаузе Г.Г. Методы биологии развития, М., Наука, 1974, 619 с.
- 2) Дэвидсон Э. Действие генов в раннем развитии, М.: Мир, 1972, 342 с.

- 3) Контроль активации ферментов во время прорастания семян, 2010 // [Электронный ресурс] - Режим доступа: <http://geopriroda.ru/seed/442-kontrol-aktivacii-fermentov-vo-vremya.html>
- 4) Киль В.И., Бибишев В.А., Плотников В.К. Неспецифический прирост трансляционной активности полисом проростков пшеницы и ячменя под действием стрессов // Физиология растений, 1991, т. 38, вып. 4, С.730-735.
- 5) Классические представления о наследственности вновь пересмотрены // [Электронный ресурс] - Режим доступа: <http://lenta.ru/news/2008/11/28/inheritance/>
- 6) Окон Е.А., Ненько Н.И., Яблонская Е.К., Насонов А.И., Кузембаева Н.А., Плотников В.К. Влияние препарата фурулан на гетерогенность свойств долгоживущей РНК зрелых семян пшеницы // Труды Кубанского государственного аграрного университета, 2008, 4(13), С.154-160.
- 7) Плотников В.К., Рядчиков В.Г., Филичкин С.А., Неудачин В.П., Филипас Т.Б., Долгих Ю.Р. К выяснению причин перераспределения белковых фракций в эндосперме кукурузы opak-2 // Физиология и биохимия культурных растений, 1984, т.16, С.59-66.
- 8) Плотников В.К. Особенности нуклеиново-белкового обмена созревающего эндосперма кукурузы opak-2. Дисс. ...канд. биол.наук., Тбилиси, 1985, 172 с..
- 9) Плотников В.К., Киль В.И. Динамика синтеза зеина и зеина-2 в созревающем зерне обычной и opak-2 кукурузы под влиянием актиномицина и канавамина // Доклады ВАСХНИЛ, 1989, вып. 10, С. 8-10.
- 10) Плотников В.К., Киль В.И., Бибишев В.А., Новиков Б.Н. Влияние теплового шока на белоксинтезирующий аппарат зерна обычной и opak-2 кукурузы // Физиология растений, 1990, т.37, вып. 2, С. 302-307.
- 11) Плотников В.К., Бакалдина Н.Б., Ефимов В.А. Стабильность мРНК зеина кукурузы в условиях нормальной и высокой температур // Физиология растений, 1991, т. 38, вып. 5, С. 981-990.
- 12) Плотников В.К., Бакалдина Н.Б. Посттранскрипционная регуляция экспрессии генов: изучение дифференциального распада мРНК растений *in vivo* и *in vitro* // Генетика, 1997, т. 33, № 3, С.343-349.
- 13) Плотников В.К. Биохимические признаки стабильности мРНК в связи с регуляцией синтеза белка в клетках злаков и их устойчивостью к стрессам с целью создания новых методов селекции. Автореф. дис. на соиск. уч. степени докт. биол. наук. - Краснодар, 1997. 42 с.
- 14) Плотников В.К., Бакалдина Н.Б., Новиков Б.Н., Алексеенко Ж.В. Посттранскрипционная регуляция экспрессии генов растений: ряды индексов стабильности специфических мРНК *in vivo* и *in vitro* // Генетика, 1998, т.34., № 7, С.869-875.
- 15) Плотников В.К., Бакалдина Н.Б., Новиков Б.Н., Алексеенко Ж.В., Бибишев В.А., Полежаев С.Л., Рядчиков В.Г. Посттранскрипционная регуляция экспрессии генов эукариот: влияние стрессов на стабильность мРНК *in vitro* // Генетика, 1998, т. 34, № 9, С. 1205-1211.
- 16) Плотников В.К., Бакалдина Н.Б., Сметанин Д.В. Фотоиндуцированная модуляция стабильности мРНК фитохрома А у проростков пшеницы и ячменя // Физиология растений, 2000, т. 47, № 2, С. 203-209.
- 17) Плотников В.К., Насонов А.И., Иваненко Е.Е., Кузембаева Н.А., Букреева Г.И., Каленич В.И. Взаимосвязь морозостойкости озимой мягкой пшеницы с содержанием катионов магния в РНК // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии, Москва, 2008, Вып. 2, С. 89-92.
- 18) Плотников В.К. Биология РНК зерновых культур, Краснодар, Издательство «Эдви», 2009, 375 с.

- 19) Рядчиков В.Г., Плотников В.К. Экспрессия генов эукариот при аминокислотном имбалансе, 2014, Краснодар, КубГАУ, 375 с.
- 20) Чумак Н.М., Сметанин Д.В., Плотников В.К. Стабильность мРНК лизинкетоглутарат редуктазы/сахаропин дегидрогеназы в созревающем зерне орапе-2 кукурузы // «Эволюция научных технологий в растениеводстве» Том №3. Сборник научных трудов КНИИСХ им. П.П. Лукьяненко. С. 29-33, Краснодар, 2004.
- 21) Plotnikov V.K., Bakaldina N.B. Differential stability of zein mRNA in developing corn kernel // *Plant Molecular Biology*, 1996, V.31., P.507-515.
- 22) Sacher J.A., Morgan E.J., De LaRosa D. Paradoxical Effect of Actinomycin D. Regulation of Synthesis of Wound RNase at Translation in Turnip Tissue // *Plant Physiol.*, 1975, V. 56, № 3, P. 442-449.
- 23) Tomkins G.M., Gelehrter T.D., Granner D., Martin D., Samuels H.H., Thompson E.B. Control of Specific Gene Expression in Higher Organisms // *Science*, 1969, V. 166, № 3912. P. 1474-1480.
- 24) Tomkins G.M., Levinson B.B., Baxter G.D., Dethlisen L. Further Evidence for Posttranscriptional Control of Inducible Tyrosine Aminotransferase Synthesis in Cultured Hepatoma Cells // *Nature New Biology*, 1972, V. 239, № 6, P. 9-14.
- 25) Thompson A.J. Regulation of Gene Expression in Developing Pea Seeds: Ph.D. Thesis. Durham: Durham Univ.Press. 1989. 210 p.

References

- 1) Detlaf T.A., Brodskij V.Ja., Gauze G.G. *Metody biologii razvitija*, M., Nauka, 1974, 619 s.
- 2) Djevidson Je. *Dejstvie genov v rannem razvitii*, M.: Mir, 1972, 342 s.
- 3) Kontrol' aktivacii fermentov vo vremja prorastanija semjan, 2010 // [Elektronnyj resurs] - Rezhim dostupa: <http://geopriroda.ru/seed/442-kontrol-aktivacii-fermentov-vo-vremya.html>
- 4) Kil' V.I., Bibishev V.A., Plotnikov V.K. Nespecificeskij prirost transljacionnoj aktivnosti polisom prorostkov pshenicy i jachmenja pod dejstviem stressov // *Fiziologija rastenij*, 1991, t. 38, vyp. 4, S.730-735.
- 5) Klassicheskie predstavlenija o nasledstvennosti vnov' peresmotreny // [Elektronnyj resurs] - Rezhim dostupa: <http://lenta.ru/news/2008/11/28/inheritance/>
- 6) Okon E.A., Nen'ko N.I., Jablonskaja E.K., Nasonov A.I., Kuzembaeva N.A., Plotnikov V.K. Vlijanie preparata furolan na geterogennost' svojstv dolgozhivushhej RNK zrelyh semjan pshenicy // *Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2008, 4(13), S.154-160.
- 7) Plotnikov V.K., Rjadchikov V.G., Filichkin S.A., Neudachin V.P., Filipas T.B., Dolgih Ju.R. K vyjasneniju prichin pereraspredelenija belkovyh frakcij v jendosperme kukuruzy opak-2 // *Fiziologija i biohimija kul'turnyh rastenij*, 1984, t.16, S.59-66.
- 8) Plotnikov V.K. Osobennosti nukleino-velkovogo obmena sozrevajushhego jendosperma kukuruzy opak-2. Diss. ...kand. biol.nauk., Tbilisi, 1985, 172 s..
- 9) Plotnikov V.K., Kil' V.I. Dinamika sinteza zeina i zeina-2 v sozrevajushhem zerne obychnoj i opak-2 kukuruzy pod vlijaniem aktinomicina i kanavanina // *Doklady VASHNIL*, 1989, vyp. 10, S. 8-10.
- 10) Plotnikov V.K., Kil' V.I., Bibishev V.A., Novikov B.N. Vlijanie teplovogo shoka na beloksintezirujushhij apparat zerna obychnoj i opak-2 kukuruzy // *Fiziologija rastenij*, 1990, t.37, vyp. 2, S. 302-307.

11) Plotnikov V.K., Bakaldina N.B., Efimov V.A. Stabil'nost' mRNK zeina kukuruzy v uslovijah normal'noj i vysokoj temperatur // Fiziologija rastenij, 1991, t. 38, vyp. 5, S. 981-990.

12) Plotnikov V.K., Bakaldina N.B. Posttranskripcionnaja reguljacija jekspressii genov: izuchenie differencial'nogo raspada mRNK rastenij in vivo i in vitro // Genetika, 1997, t. 33, № 3, S.343-349.

13) Plotnikov V.K. Biohimicheskie priznaki stabil'nosti mRNK v svjazi s reguljaciej sinteza belka v kletkah zlakov i ih ustojchivost'ju k stressam s cel'ju sozdaniya novyh metodov selekcii. Avtoref. dis. na soisk. uch. stepeni dokt. biol. nauk. - Krasnodar, 1997. 42 s.

14) Plotnikov V.K., Bakaldina N.B., Novikov B.N., Alekseenko Zh.V. Posttranskripcionnaja reguljacija jekspressii genov rastenij: rjady indeksov stabil'nosti specificheskikh mRNK in vivo i in vitro // Genetika, 1998, t.34., № 7, S.869-875.

15) Plotnikov V.K., Bakaldina N.B., Novikov B.N., Alekseenko Zh.V., Bibishev V.A., Polezhaev S.L., Rjadchikov V.G. Posttranskripcionnaja reguljacija jekspressii genov jeukariot: vlijanie stressov na stabil'nost' mRNK in vitro // Genetika, 1998, t. 34, № 9, S. 1205-1211.

16) Plotnikov V.K., Bakaldina N.B., Smetanin D.V. Fotoinducirovannaja moduljacija stabil'nosti mRNK fitohroma A u prorostkov pshenicy i jachmenja // Fiziologija rastenij, 2000, t. 47, № 2, S. 203-209.

17) Plotnikov V.K., Nasonov A.I., Ivanenko E.E., Kuzembaeva N.A., Bukreeva G.I., Kalenich V.I. Vzaimosvjaz' morozostojkosti ozimoy mjagkoj pshenicy s sodержaniem kationov magnija v RNK // Izvestija Timirjzevskoj sel'skohozjajstvennoj akademii, Moskva, 2008, Vyp. 2, S. 89-92.

18) Plotnikov V.K. Biologija RNK zernovyh kul'tur, Krasnodar, Izdatel'stvo «Jedvi», 2009, 375 s.

19) Rjadchikov V.G., Plotnikov V.K. Jekspressija genov jeukariot pri aminokislotnom imbalanse, 2014, Krasnodar, KubGAU, 375 s.

20) Chumak N.M., Smetanin D.V., Plotnikov V.K. Stabil'nost' mRNK lizinketoglutarat reduktazy/saharopin degidrogenazy v sozrevajushhem zerne opaque-2 kukuruzy // «Jevoljucija nauchnyh tehnologij v rastenievodstve» Tom №3. Sbornik nauchnyh trudov KNIISH im. P.P. Luk'janenko. S. 29-33, Krasnodar, 2004.

21) Plotnikov V.K., Bakaldina N.B. Differential stability of zein mRNA in developing corn kernel // Plant Molecular Biology, 1996, V.31., P.507-515.

22) Sacher J.A., Morgan E.J., De LaRosa D. Paradoxical Effect of Actinomycin D. Regulation of Synthesis of Wound RNase at Translation in Turnip Tissue // Plant Physiol., 1975, V. 56, № 3, P. 442-449.

23) Tomkins G.M., Gelehrter T.D., Granner D., Martin D., Samuels H.H., Thompson E.B. Control of Specific Gene Expression in Higher Organisms // Science, 1969, V. 166, № 3912. P. 1474-1480.

24) Tomkins G.M., Levinson B.B., Baxter G.D., Dethliffen L. Further Evidence for Posttranscriptional Control of Inducible Tyrosine Aminotransferase Synthesis in Cultured Hepatoma Cells // Nature New Biology, 1972, V. 239, № 6, P. 9-14.

25) Thompson A.J. Regulation of Gene Expression in Developing Pea Seeds: Ph.D. Thesis. Durham: Durham Univ.Press. 1989. 210 p.