

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 581.1

А.Ю. Алейникова, Я.О. Зубо, В.В. Кузнецов

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (г. Москва)

ИНТЕНСИВНОСТЬ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ *atpB* ОПЕРОНА ХЛОРОПЛАСТОВ ЛИСТЬЕВ ЯЧМЕНЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДЕЙСТВИЯ РАЗНЫХ ФАКТОРОВ

Материалы опубликованы в рамках проекта ФЦП «Организационно-техническое обеспечение проведения Международной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (ГК № 14.741.12.0153 от 07 июня 2011 г.).

Механизмы регуляции транскрипции отдельных генов в составе хлоропластных оперонов у высших растений не изучены, несмотря на то что данные исследования исключительно важны для понимания регуляции биогенеза хлоропластов. В данной работе изучена интенсивность транскрипции генов в составе пластидных оперонов листьев ячменя в зависимости от возраста растений, эффекта фитогормонов и состояния аппарата транскрипции. Показана высокая консервативность интенсивности транскрипции генов в составе пластидных оперонов листьев ячменя.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare* L.; хлоропласты; транскрипция; *atpB* оперон.

Введение

Большинство хлоропластных генов растений объединены в опероны, имеющие общие регуляторные элементы транскрипции, которые унаследованы от предшественников хлоропластов – цианобактерий. Однако в ходе эволюции, благодаря существованию пластид внутри эукариотической клетки, возникли новые механизмы регуляции экспрессии генов, в том числе и на уровне транскрипции. К ним можно отнести не только появление внутриоперонных промоторов и генов с интронами, но также появление двух типов принципиально различных РНК полимераз пластидного и ядерного кодирования [1, 2]. В настоящее время механизмы регуляции транскрипции отдельных генов в составе хлоропластных оперонов у высших растений не изучены, хотя это исключительно важно для понимания регуляции биогенеза хлоропластов. Цель работы – изучить интенсивность транскрипции генов в составе пластидных оперонов листьев ячменя в зависимости от возраста растений, эффекта фитогормонов и состояния аппарата транскрипции и выяснить, насколько консервативен механизм регуляции транскрипции генов в составе оперонов.

Материалы и методики исследования

Объектом исследования служили первые настоящие листья ячменя сорта Луч (*Hordeum vulgare* L.) разного возраста (3-, 9- и 18-дневные растения) и 3-дневные белые растения мутанта ячменя *albostrians*. Выделение хлоропластов, а также run-on транскрипцию в хлоропластных лизатах проводили по методу, описанному в работе [3]. Фрагменты пластидной ДНК, используемые (после амплификации) в качестве проб при ДНК-РНК гибридизации, были подобраны с применением программы Vector NTI на основании первичной последовательности хлоропластного генома ячменя (NCBI http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_008590). Фрагменты ДНК были нанесены на нейлоновую мембрану (Hybond-N, GE Healthcare, США) с помощью прибора для дот-гибридизации (BioRad, США). Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Полученные результаты обработаны статистически.

Результаты исследования и обсуждение

Для изучения интенсивности транскрипции генов, входящих в состав *atpB* оперона (рис. 1), были получены гибридизационные пробы, выровненные по размеру (100 п.н.) и по GC составу (34–36%), что позволило в одних и тех же условиях для всех проб проводить анализ интенсивности транскрипции. Для *atpB* оперона было подготовлено 9 зондов на: 1 – *atpE* ген, 2–4 – межгенную область *atpE*/*tRNA^{Val}* генов, 5–6 – интрон *tRNA^{Val}* гена, 7–8 – межгенную область *tRNA^{Val}*/*ndhC* генов и 9 – *ndhC* ген (рис. 1). С помощью зондов был определен уровень ³²P-меченой РНК, синтезированной в ходе реакции транскрипции в хлоропластном лизате.

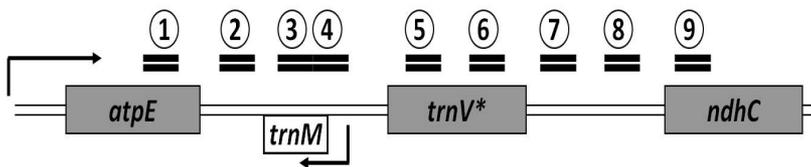


Рис. 1. Схема расположения генов в *atpB* опероне. Транскрипция оперона происходит слева направо. Транскрипция *trnM* гена происходит с противоположной нити справа налево. Локализация гибридизационных проб показана цифрами.

* – наличие в гене интрона

Из рис. 2 видно, что различные участки *atpB* оперона транскрибировались неравномерно. Наибольшую транскрипционную активность в межгенном спейсере *atpE* – *trnV* генов имел участок, соответствующий пробе 3, в то время как расположенный рядом участок (проба 4) во всех экспериментах имел наименьшую активность транскрипции. Вслед за этим активность транскрипции увеличивалась для интрона *trnV* гена (пробы 5 и 6), далее почти не менялась для межгенного спейсера *trnV* – *ndhC* генов (пробы 7, 8) и имела тенденцию к некоторому снижению для *ndhC* гена (проба 9). Несмотря на различное состояние фотосинтетического аппарата у растений разного воз-

раста, сходный профиль транскрипции наблюдался для *atpB* оперона в активно растущем первом листе 3-дневных проростков ячменя, в закончившем рост листе 9-дневных растений и в старом листе 16-дневных растений.

Характер интенсивности транскрипции изученных генов не изменился и при обработке листьев АБК и метилжасмонатом, фитогормонами, которые значительно подавляют транскрипцию (рис. 2).

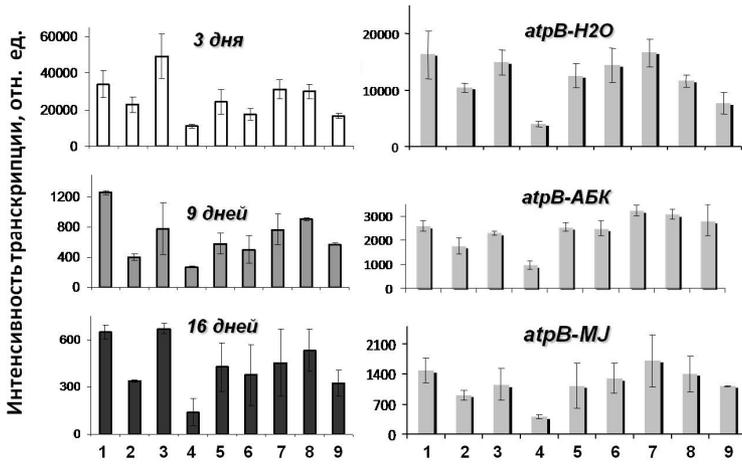


Рис. 2. Относительная интенсивность транскрипции генов *atpB* оперона ячменя в зависимости от возраста растений (слева) и действия абсцизовой кислоты (АБК) и метилжасмоната (MJ) (справа)

Однако у *albostrians* мутанта ячменя, у которого отсутствует РНК-полимераза бактериального типа, наблюдалось изменение профиля интенсивности транскрипции генов *atpB* оперона. Данные рис. 3 показывают, что без этой РНК-полимеразы происходит нарушение дифференциальной транскрипции генов *atpB* оперона.

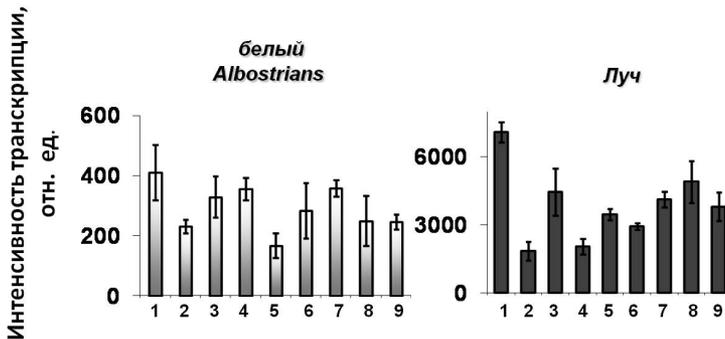


Рис. 3. Относительная интенсивность транскрипции генов *atpB* оперона в 3-дневных мутантах ячменя *albostrians* (слева) и 9-дневных листьях растений ячменя дикого типа (справа). Локализация гибридационных проб, обозначенных цифрами, показана на рис. 1

Заключение

Полученные результаты позволяют заключить, что интенсивность транскрипции генов в составе пластидных оперонов листьев ячменя очень консервативна. Профиль транскрипции изученных генов не зависит от возраста растений и воздействия экзогенных фитогормонов (АБК и метилжасмоната). Однако инактивация РНК-полимеразы пластидного кодирования вызывает значительное изменение интенсивности транскрипции генов *atpB* оперона.

Литература

1. Даниленко Н.Г., Давыденко О.Г. Миры геномов органелл. Мн. : Технология, 2003. 494 с.
2. Liere K., and Börner T. Transcription of plastid genes // Grassler K.D. (ed.) Regulation of Transcription in Plants. Blackwell Publishing Ltd. Oxford, 2006. P. 184–224.
3. Зубо Я.О., Кузнецов В.В. Применение метода run-on транскрипции для изучения регуляции экспрессии пластидного генома // Физиология растений. 2008. Т. 55, № 1. С. 114–122.

Поступила в редакцию 16.06.2011 г.

Anastasia Yu. Aleinikova, Yan O. Zubo, Victor V. Kusnetsov

Timiriazev Institute of Plant Physiology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

EFFECT OF THE VARIOUS FACTORS ON THE CHLOROPLAST *ATPB* OPERON GENES TRANSCRIPTION

The goal of the study was to examine the intensity of gene transcription in the plastid operons barley leaves and its dependence upon plant age, effect of phytohormones and state of the transcription system, and to find out how conservative the mechanism of regulation of gene transcription within operons is.

*This work was performed at the first true leaves of barley of different ages and of white barley mutant albostrians. The transcription intensity was determined by run-on transcription method. To study the intensity of gene transcription, comprising the *atpB* operon hybridization probes were obtained that are aligned in size (100 bp) and GC content (34–36%). For *atpB* operon were prepared 9 probes for: 1 – *atpE* gene, 2–4 – intergenic region *atpE* / *tRNAVal* genes, 5–6 – *tRNAVal* intron of the gene, 7–8 – intergenic region *tRNAVal* / *ndhC* gene and 9 – *ndhC* gene. Using the probes the level of ³²P-labeled RNA synthesized in vitro was determined. Results showed that different parts of the *atpB* operon transcribed irregularly. The highest transcriptional activity in the intergenic spacer *atpE* – *trnV* genes had fragment DNA corresponding to probe 3, while located near area (probe 4) in all experiments had the lowest activity of transcription. Transcription activity increased for the intron of *trnV* gene (probe 5 and 6), then almost no change for the intergenic spacer *trnV* – *ndhC* genes. Similar transcription profile was observed for *atpB* operon in actively growing first leaves of 3-day-old barley seedlings, in completed growth leaves 9-day-old plants and old leaves 16-day plants. The profile of the intensity of genes transcription studied did not change also in the leaves treated by ABA and methyl jasmonate. However, the mutant albostrians barley, which lacks the bacterial RNA polymerase type, there was a violation of differential gene transcription *atpB* operon. The results obtained allow to conclude that the rate of gene transcription in the plastid operons of barley leaves is highly conservative. Transcription profile of genes studied does not depend on plant age and effects of exogenous phytohormones (ABA and methyl jasmonate). However, inactivation of the bacterial type plastid RNA polymerase causes a significant change in the intensity of transcription of genes *atpB* operon.*

Key words: *Hordeum vulgare* L.; chloroplast; transcription; *atpB* operon.

Received June 16, 2011