

УДК 631.8:577.21

UDC 631.8:577.21

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЁРЫ ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ НА МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТЬ ОЗИМЫХ ФОРМ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ И ЯЧМЕНЯ

BIOLOGICAL MARKERS FOR SELECTION ON THE FROST RESISTANCE OF WINTER WHEAT AND BARLEY FORM

Плотников Владимир Константинович
д.б.н., доцент
vkpbio21@mail.ru
Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар, Россия

Plotnikov Vladimir Konstantinovich, Dr.Sc. (biol.),
Associate Professor
vkpbio21@mail.ru
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

Евтушенко Ярослав Юрьевич
младший научный сотрудник
Краснодарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко

Yevtushenko Yaroslav Yuryevich - Junior researcher
Lukyanenko Research Institute of Agriculture, Krasnodar, Russia

Салфетников Анатолий Алексеевич
д.с.-х.н., профессор
Salfetnikov39@mail.ru
Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар, Россия

Salfetnikov Anatalij Alexeevich – Dr Sc. (agr.),
Professor
Salfetnikov39@mail.ru
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

Репко Наталья Валентиновна
к.с.-х. н., доцент
natalja.repko@yandex.ru
Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар, Россия

Repko Natalia Valentinovna - Ph.d., Associate
Professor
natalja.repko@yandex.ru
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

Насонов Андрей Иванович
к.б.н.
nasoan@mail.ru
ФГБНУ Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства

Nasonov Andrey Ivanovich - Ph.d.,
nasoan@mail.ru
North Caucasian Research Institute of horticulture and viticulture

Описанные в настоящей обзорной статье теоретические предпосылки и методические решения определяют принципиально новые возможности в разработке лабораторных методов оценки биологических особенностей зерновых культур в ходе селекционного процесса

We have described the theoretical assumptions and methodological solutions in the present review. They are innovative possibilities in the development of laboratory methods for assessing biological features of grain during the selection process

Ключевые слова: ПШЕНИЦА, ЯЧМЕНЬ, МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТЬ, МАРКЁРЫ

Keywords: WHEAT, BARLEY, FROST RESISTANCE, MARKERS

Введение

Исследование адаптации растений к стрессовым факторам внешней среды имеет особое значение для отечественной селекции, так как основная масса сельскохозяйственного производства России находится в зоне рискованного земледелия и потому ему необходимы сорта,

сочетающие повышенную зимостойкость и засухоустойчивость с высокой урожайностью. Климат России не позволяет повышать продуктивность за счёт позднеспелости.

Для отечественных сортов озимых культур одним из важнейших адаптивных признаков является морозоустойчивость. Трудности селекции на зимостойкость определяются многими причинами; это сложный признак, включающий морозоустойчивость – главный компонент успешной перезимовки, а также глубину залегания узла кущения, устойчивость к “выпираанию” и к образованию ледяной корки. Показано, что зимостойкость растений зависит от генотипа, условий закалки, стадии развития [42].

Возможности традиционной селекции сельскохозяйственных растений далеко не исчерпаны. Но в настоящее время в арсенале селекционеров растений преобладает использование морфологического фенотипа в качестве основы селекции. Это определяет очень ограниченный набор, как экспериментального материала, так и круга проблем, которые может решить селекционер. Значительного прогресса в усовершенствовании методов селекции можно было бы достичь в том случае, если бы удалось установить надёжные способы выявления узловых моментов в ряду элементарных процессов, формирующих хозяйственно-ценные признаки и найти простые, дешёвые маркёры для массового скрининга селекционного материала.

В последнее время в стратегии растениеводства определились два главных пути использования достижений биохимии и молекулярной биологии: 1) биохимические и молекулярные маркёры [11], 2) создание и применение на полях трансгенных растений [12, 38]. Эти направления взаимосвязаны и их взаимодействие определяет дальнейший прогресс в развитии биологии, и её успехи в решении практических задач.

Вместе с тем, ближайшая методическая задача состоит не столько в том, чтобы найти новые способы создания генетического разнообразия, а столько в том, чтобы найти новые методы критического анализа того разнообразия, которое уже обеспечено природой, и идентифицировать разные компоненты ценных признаков, в основе которых лежат молекулярно-биологические механизмы реализации генетической информации в особенности физиологии и развития растений.

В генетике существует традиционный принцип идентификации генотипа отдельной особи - испытание потомства. Однако частота встречаемости уникального генотипа в популяциях F_2 столь низка, а популяции у селекционера столь объёмны, что он вынужден на первых этапах селекции выбраковывать по фенотипам 80-90% особей F_2 . Кроме того, результаты трудоёмкого, дорогостоящего и длительного испытания по потомству не очень надёжны, так как существенно искажаются материнскими эффектами, экологическими последствиями, а у растений, кроме того, сильным влиянием триплоидного эндосперма на количественные признаки потомства, межгенотипической конкуренцией, «пестротой» лимитирующих факторов среды и т.п. [6].

При отсутствии простых и надёжных методов идентификации генотипов по фенотипам безвозвратно теряется большая часть ценных форм, что нельзя компенсировать более точными оценками по совокупности потомков на последующих этапах селекционного процесса.

Разработка таких методов зависит от степени изученности генетико-физиологической природы устойчивости растений. В настоящее время молекулярные биологи подступили к изучению сакральных закономерностей формирования эффекта взаимодействия «генотип-среда», важнейшим проявлением которого являются особенности экспрессии генов растений в условиях различного рода стрессов [12, 38, 25, 34, 39, 43].

Эти фундаментальные исследования похожи на долгое и трудное восхождение человека на высокую гору, с вершины которой он может увидеть правильные направления поиска простых, но эффективных методов оценки морозоустойчивости озимых форм пшеницы и ячменя. Развитие и результаты этого процесса мы попытаемся рассмотреть в этой статье.

Основные положения маркёр-зависимой селекции на стрессоустойчивость

Биохимические и молекулярные маркёры являются чрезвычайно эффективным инструментом генетических исследований и вносят существенный вклад в изучение природы генов, а также разработку методов переноса идентифицированных генов в другие формы растений. Молекулярное маркирование успешно применяется для решения всех важнейших фундаментальных и прикладных задач, стоящих перед исследователями генетических ресурсов растений - от поиска нового генетического разнообразия, его идентификации и паспортизации, до охраны прав на него в ходе улучшения сортов растений

Понятие «маркёр» вошло в биологию довольно давно (маркёр – метчик, в биохимии – фактор идентификации). В настоящее время это понятие используют довольно широко. В биохимии на первых этапах маркирование опиралось на весь комплекс химических субстанций вплоть до веществ вторичного происхождения. Но наиболее перспективным оказался анализ полиморфизма макромолекул: белков и нуклеиновых кислот. Полиморфизм обнаруживается физико-химическими методами при анализе не только белков и ДНК, но и масел, спиртов, органических кислот, веществ вторичного происхождения. Однако этот полиморфизм из-за ряда принципиальных ограничений не нашёл широкого применения при решении фундаментальных проблем биологии [11].

В качестве таких ограничений – наличие многих промежуточных этапов на пути реализации информации от её носителя до момента, например синтеза полисахаридов, жирных кислот либо фенольных или иных соединений. Сложность биологии растений и генетики их продуктивности в первую очередь связана с тем, что многие признаки, такие как урожайность, стрессоустойчивость, время созревания, содержание белка и кустистость, являются сложными количественными признаками, находившимися под контролем многих генов (полигены).

Классик фундаментальной науки, основавший и разработавший учение о стрессе, канадский исследователь Ганс Селье (1907-1982) говорил: «Простота и краткость не просто свойства науки, они составляют её сущность» [34, 39].

Академик РАСХН Виктор Михайлович Шевцов (1940-2012), крупнейший специалист в области селекции ячменя, повторял: «Метод для селекции должен быть прост как автомат Калашникова; так, что бы ты бросил его в лужу, он пролежал там год, ты берёшь его, а он стреляет».

Сам же Михаил Тимофеевич Калашников (1919-2013), ссылаясь на бога, любил повторять: «Всё нужное – просто, всё сложное – не нужно». Наука же – это совокупность мыслей господина и слов человека.

Бога каждый представляет себе по-своему. Есть основания полагать, что господь – это эффект взаимодействия генотипа и среды (ВГС). При этом под средой подразумевается широкий круг факторов - от температуры и влажности до космоса и неизвестных пока человеку факторов, т.е. от агрофизики до астрологии. Эти наблюдения частично укладываются в следующую формулу: "Фенотип есть продукт взаимодействия среды и генотипа".

Сорт растений как основа технологии возделывания любой культуры является результатом сложного взаимодействия "генотип-среда", поскольку может реализовать продукционный потенциал и

технологические качества только в конкретных средовых условиях. Чаще всего имеются в виду почвенно-климатические и технологические условия возделывания. Фактически создание сорта предполагает не только получение и отбор новых генотипов, но и поиск экологической ниши, где этот генотип обеспечит высокую продуктивность, экологическую стабильность и качество продукции как основные цели селекции. Таким образом, селекционер, по сути, не изучает и отбирает генотипы как таковые, а оценивает их норму реакции на абиотические, биотические и антропогенные факторы среды [9].

Молекулярные маркёры (ДНК-овые, белковые) являются чрезвычайно эффективным инструментом генетических исследований эукариот. Однако их статичность не позволяет количественно оценить важнейшие свойства организмов (стрессоустойчивость, реакцию на свет и прочее). Как познание электричества и развитие электротехники стало возможным только с появлением электродинамики, так и статичные молекулярные маркёры должны быть существенно дополнены молекулярно-кинетическими (биологическими) маркёрами, способными количественно оценить экспрессию основных регуляторных генов или дать интегральную характеристику всех экспрессирующихся генов определённого генотипа в конкретных условиях роста.

Холодостойкость и морозоустойчивость растений

Оценка морозостойкости сортов – прямое промораживание растений в холодильных камерах и при полевых испытаниях – является наиболее трудоемким и дорогостоящим этапом селекции на зимостойкость. Поэтому поиск относительно дешевых лабораторных методов адекватной оценки этого признака является весьма актуальным.

Адаптация к низким температурам в растительном мире осуществляется в основном путём накопления растениями осенью больших запасов резервных веществ, которые используются для

ультраструктурной перестройки клеток, органелл и мембран, результатом которой становится способность тканей выдерживать межклеточное льдообразование и сопутствующий внутриклеточный осмотический шок. Кроме того, резервные вещества используются в ходе перезимовки в качестве субстрата дыхания, а в ходе весеннего отрастания – для новообразования фотосинтезирующих органов и тканей.

Накопление водорастворимых углеводов происходит, с одной стороны, за счёт их формирования при фотосинтезе и при гидролизе запасных полисахаридов, а с другой, вследствие ограничения их использования в процессе роста растений. Ограничение использования углеводов происходит вследствие практически полного ингибирования роста растений низкими температурами [10].

Чаще всего изучение природы холодоустойчивости сводилось к поиску корреляций между элементарными событиями и устойчивостью растений. Изучен ряд факторов, теоретически способных оказать решающее влияние на холодоустойчивость: содержание сахаров, аминокислот, стойкость мембран и т.д. Вместе с тем, разрабатывались биофизические методы экспресс-оценки холодоустойчивости - по измерению электропроводности растений или по их оптическим характеристикам (люминесценция, сверхслабое свечение) [41, 44].

Однако эти исследования не привели к созданию общепринятой теории холодоустойчивости растений, а перечисленные методы оценки холодоустойчивости не пользуются широкой популярностью из-за низкой воспроизводимости от опыта к опыту [5].

Развитие методов и теорий молекулярной биологии позволяет в настоящее время перевести исследования природы холодоустойчивости на уровень изучения регуляции синтеза белка и предложить принципиально новые молекулярные маркёры оценки холодоустойчивости, отличающиеся большей воспроизводимостью, точностью и производительностью.

Однако остаётся весьма острым вопрос разработки простых маркёров массового скрининга сортов на морозоустойчивость, позволяющих эффективно вести селекцию на этот признак.

Биохимические и молекулярно-биологические особенности метаболизма злаков при закаливающих температурах

Известно, что адаптация растений к стрессам непосредственно связана с работой белоксинтезирующего аппарата. Так, блокирование белкового синтеза в растениях во время закаливания к холоду тормозит развитие морозостойкости, которая остаётся на уровне незакалённых растений. Реакция белоксинтезирующего аппарата эукариот на стрессы не однозначна и определяется главным образом напряжённостью стресса: например, действие отрицательных температур на растительный организм приводит к глубокой и обратимой диссоциации полисом до моносом. В то же время действие низкой положительной температуры (0-5°C) не вызывает распада полисом, а наоборот, увеличивает их количество в цитоплазме по сравнению с контрольными растениями, выращиваемыми при 20°C. Одновременно происходит активация трансляционной активности полисом, наблюдаемая *in vitro*. Аналогичные изменения происходят и при действии других стрессирующих факторов. При этом определяющим течение молекулярных процессов остаётся напряжённость стресса: в закаливающей зоне его действия происходит активация, как транскрипции, так и трансляции, в повреждающей - преобладающими становятся процессы распада, увеличивается активность гидролитических ферментов [23, 27, 29, 34, 39].

На протяжении десятилетий рядом исследователей на растительных и животных организмах было замечено, что разнообразные стрессы, в первые часы своего действия или даже на значительном временном отрезке определяют прирост трансляционной активности полирибосом в бесклеточной системе синтеза белка (*in vitro*), что может иметь важное

адаптационное значение. Ответ организма на стресс складывается из двух основных механизмов: неспецифических защитных реакций, возникающих в ответ на разные стрессы, и формирующегося на их фоне специфического ответа на конкретный стресс. В пользу существования неспецифического механизма адаптации у растений указывают многие факты. В частности, 24-часовой водный стресс индуцировал тот же уровень морозостойкости озимой пшеницы, что и 4-х недельная закалка при 2°C. Устойчивость проростков риса с понижением температуры повышалась после их обработки хлористым натрием [8]. Подобные факты отмечаются и в ряде других работ. Кроме того, одни и те же белки могут синтезироваться в ответ на действие разных стрессовых факторов. Наиболее изучены в этом отношении белки теплового шока [34, 39].

Показано, что уже в первые часы действия закаливающей температуры (4°C), засоления и обезвоживания на 4-х суточные зелёные проростки озимых сортов пшеницы и ячменя происходило увеличение активности полисом *in vitro* [8]. Эффект усиления активности полисом в первые моменты действия стресса наблюдался также при пораниении растений и поражении их ржавчинным грибом [34]. Таким образом, усиление трансляционной активности полисом, наблюдаемое *in vitro*, - неспецифическая ответная реакция растения на стресс.

Исследования прироста трансляционной активности полисом под действием закаливающих температур (6 ч, 4°C) у контрастных по морозоустойчивости сортов показали, что морозоустойчивость озимых сортов, как мягкой пшеницы, так и ячменя, прямо пропорциональна приросту трансляционной активности полисом. При доля тяжёлых полисом при холодовом воздействии возрастала, причём в большей степени у более морозоустойчивого сорта.

Аналогичную картину наблюдали при действии солевого стресса на контрастные по солестойкости сорта ячменя. Всё это указывает на то, что

активация трансляции при стрессе происходит, прежде всего, за счёт увеличения доли полирибосом. Таким образом, при действии соли, низкой положительной температуры и обезвоживания в первые часы действия стресса наблюдается подъём трансляционной активности полисом *in vitro*, в большей степени выраженный у наиболее стрессоустойчивых сортов. Это указывает на важную роль мощности белоксинтезирующего аппарата в неспецифической адаптации растений к стрессам [8, 34, 39].

Энхансером (усилителем) трансляции, в первую очередь, является степень полиаденилирования 3'-конца мРНК: чем длиннее поли-(А)-хвост, тем выше трансляционная активность мРНК [20, 27, 29, 34, 39]. Представляется вполне обоснованным предположение о том, что ключевым моментом в молекулярном механизме адаптации растений к изменяющимся условиям среды являются процессы полиаденилирования и деаденилирования мРНК. Все экологические факторы: свет (освещённость), температура, влажность и другие обуславливают изменения степени полиаденилирования мРНК в зависимости от генетической предрасположенности той или иной культуры, того или иного сорта [2, 26, 34, 39].

Относительная морозоустойчивость сорта в значительной степени связана с реакцией системы полиаденилирования мРНК проростков под влиянием закаливающей температуры. Однако у высокоморозоустойчивого сорта озимой мягкой пшеницы Краснодарская 39 это выражается в увеличении степени полиаденилирования, а у относительно высокоморозоустойчивого сорта озимого ячменя Радикал – в снижении. При этом необходимо отметить, что сравнительная степень полиаденилирования мРНК этих сортов при температуре 20°C выше у ячменя [2, 34].

Вместе с тем, стимуляция трансляционной активности полисом *in vitro* при поранении, холоде и гипоксии коррелирует с усилением

экспрессии гена субъединицы α фактора элонгации трансляции eEF-1 и его соответствующим накоплением в растительной клетке [47, 48, 52]. Этот фактор играет центральную роль в элонгации полипептидных цепей эукариотических клеток, катализируя связывание аминоксил-тРНК с сайтом А на рибосоме, в ходе которого расходуется ГТФ. Помимо этого, для eEF-1 α показаны ассоциация с цитоскелетом, связь с эндоплазматическим ретикулумом, участие в распаде белков и в организации митотического аппарата клетки [34, 39].

Несомненно, фактор элонгации EF-1 α играет важную роль в регуляции синтеза белка и изменение его содержания в той или иной ткани свидетельствует об изменении интенсивности синтеза белка. Поэтому изучение в количественном и качественном аспекте ген-специфической мРНК фактора элонгации трансляции является важным при исследовании адаптационного синдрома. Эксперименты на проростках показали хорошую прогностическую возможность оценки морозоустойчивости озимых сортов мягкой пшеницы и ячменя по стабильности ген-специфической индивидуальной мРНК субъединицы α фактора элонгации трансляции eEF-1.

Но изменения в стабильности этой мРНК под влиянием закалывающей температуры у пшеницы и ячменя были противоположными: у пшеницы прямо пропорциональная зависимость степени морозоустойчивости сорта и степени стабильности этой индивидуальной мРНК, а у ячменя – обратно пропорциональная [2, 34, 39].

Система *ottp* – на пути к

молекулярно-кинетическим маркёрам в селекции растений

Молекулы нуклеиновых кислот ДНК и РНК хранят в себе генетическую информацию, необходимую для существования и размножения живой клетки. Белки же выступают в роли действующего начала: молекулы белков-ферментов катализируют тысячи химических

реакций, протекающих в клетке. Ещё недавно такое «разделение труда» между информационными и действующими молекулами считалось одним из основополагающих принципов биохимии. Однако в последние десятилетия эта схема была пересмотрена в связи с открытием того, что РНК может выступать в качестве фермента (рибозимы) [34, 39].

Стабильность мРНК зависит как от гена, которому она принадлежит, так и от условий окружающей среды. Методы генной инженерии в последние десятилетия позволили многое понять в структурных различиях стабильных и нестабильных молекул мРНК. Время жизни мРНК является самым лабильным компонентом системы регуляции экспрессии генов у эукариот, в значительной мере определяющим эффект взаимодействия «генотип-среда». Однако исследования в этом направлении сдерживались отсутствием простого метода оценки относительной стабильности мРНК, который был бы достаточно адекватен, точен, воспроизводим и не зависел бы от основного клеточного метаболизма.

Дифференциальная стабильность мРНК играет существенную роль в регуляции метаболизма злаков и является наиболее лабильным звеном оперативной реакции растительного организма на изменяющиеся условия окружающей среды (стрессоустойчивость, фотоморфогенез, влияние биологически активных веществ и др.). На растительных и животных объектах было показано, что рециклика (повторное нанесение на колонку) в ходе аффинной хроматографии на полил-(У)-сефарозе или инкубация водного препарата РНК, выделенного из тканей в присутствии катионов магния в экстрагирующем буфере, приводит к дифференциальному магний-зависимому распаду РНК *in vitro*, аналогично закономерностям деградации РНК *in vivo* [1, 21, 22, 23, 34, 39, 46].

Установлено, что Mg^{++} -зависимый распад мРНК *in vitro* (система ommp – «omnia mea mecum porto» - «всё своё ношу с собой») происходит тождественно деградации транскриптов в живой клетке (*in*

vivo) и отражает генетические особенности и физиологическое состояние растений [27, 36].

На примере ряда специфических мРНК растений было показано, что индекс стабильности, определяемый в ходе двухциклической аффинной хроматографии как доля (%) поли(А)⁺⁺мРНК от поли(А)⁺мРНК, представляет собой величину, отражающую соотношение стабильных и нестабильных молекул в популяции мРНК. Индекс стабильности (ИС) проявляет большую чувствительность к изменениям условий окружающей среды, коррелируя с интенсивностью роста растений [24, 27, 34].

Ранжировка озимых сортов пшеницы и ячменя по морозоустойчивости методом прямого промораживания и в полевых испытаниях в основном совпадает с оценкой, сделанной на основании изменения ИС под действием закаливающей температуры (4°C). Однако, в отличие от морозоустойчивых сортов озимой пшеницы для большинства морозостойких сортов озимого ячменя характерно снижение ИС при 4°C. Разная направленность изменения ИС под влиянием холода у сортов озимого ячменя и озимой пшеницы объясняется, по-видимому, их противоположной реакцией на свет и связана с изменением степени полиаденилирования мРНК. Озимые формы злаков также отличаются от яровых степенью и направленностью изменения ИС под влиянием света [1, 2, 34].

Эти факты соответствуют многолетним эмпирическим наблюдениям физиологов и селекционеров, отмечающих противоположные реакции озимой пшеницы и озимого ячменя на холод. Для объяснения несоответствия в изменении индекса стабильности мРНК и изменения трансляционной активности полисом *in vitro* у ячменя требуются дополнительные фундаментальные исследования этих двух феноменов. Возможно, это связано с особенностями рибосомной РНК. Тем не менее, очевидно, что реакция на стрессы белоксинтезирующего аппарата

пшеницы и ячменя, как на уровне стабильности мРНК, так и на уровне трансляционной активности полисом *in vitro* является генотипической (сортоспецифической) [2, 8].

Была изучена степень полиаденилирования мРНК термальной ступенчатой хроматографией и динамика эффективности молекулярной гибридизации поли(А)⁺мРНК eEF-1 α двух контрастных по морозоустойчивости сортов озимой пшеницы (Зимородок - высокоморозоустойчивый сорт, Безостая 1 - среднеморозоустойчивый сорт) в зависимости от времени инкубации в *оттр* системе. Было установлено, что сорт Безостая 1 имеет высокополиаденилированную и стабильную мРНК eEF-1 α у контрольных проростков. Холод вызывал деаденилирование (уменьшение на 40 % фракции длиннохвостовых молекул мРНК eEF-1 α) и дестабилизацию мРНК. У сорта Зимородок наблюдалась обратная картина: контрольные проростки имели нестабильную мРНК eEF-1 α , которая резко стабилизировалась под действием холода и увеличивалась степень ее полиаденилирования (фракция мРНК eEF-1 α с длинными поли(А)-последовательностями увеличивалась на 50%) [2, 34].

По-видимому, эти факты во многом объясняют разницу в морозоустойчивости этих двух сортов: под влиянием закаливающих температур у морозоустойчивого сорта Зимородок резко увеличивается степень полиаденилирования мРНК фактора элонгации трансляции eEF-1 α и ее стабильность, и как следствие этого возрастает синтез белка, что обеспечивает форсированное создание веществ и структур, обеспечивающих морозостойкость; сорт Безостая 1, вероятно, не способен к такой мобилизации белоксинтезирующего аппарата.

Аналогичные исследования контрастных по морозоустойчивости сортов озимого ячменя выявили реакцию, противоположную озимой

пшенице: у морозоустойчивого сорта Радикал под действием холода дестабилизировалась мРНК eEF-1 α , в то время как у слабо морозоустойчивого сорта Вавилон - мРНК eEF-1 α стабилизировалась. Это, возможно, свидетельствует о различных молекулярных стратегиях холодоустойчивости озимых форм пшеницы и ячменя: активная адаптация к холоду у пшеницы и пассивная - у ячменя. Вероятно, этим определяется более острая проблема морозоустойчивости у озимых форм ячменя. При этом нужно отметить, что стабилизация мРНК eEF-1 α у морозоустойчивого сорта пшеницы и неморозоустойчивого сорта ячменя, вероятно, отражает лишь количественную, но не качественную сторону синтеза белка (разный набор стрессовых белков) [2, 23, 34].

Эти факты соответствуют многолетним эмпирическим наблюдениям фитофизиологов и селекционеров, отмечающих противоположные реакции озимой пшеницы и озимого ячменя на холод. Для объяснения несоответствия в изменении ИС мРНК и трансляционной активности полисом *in vitro* у ячменя требуются дополнительные фундаментальные исследования этих двух феноменов. Возможно, это связано с особенностями биологии рибосомной РНК. Как было отмечено выше интенсивность синтеза белка *in vitro* зависит от содержания катионов магния рибосомами [36, 52], а количество магния у ячменя выше, чем у пшеницы [23].

Тем не менее, очевидно, что реакция на холод белоксинтезирующего аппарата ячменя и пшеницы, как на уровне стабильности мРНК, так и на уровне трансляционной активности полисом *in vitro* является генотипической (сортоспецифической).

По-видимому, модуляция ИС мРНК eEF-1 α , определённая в данных условиях *отпр* системы, отражает общие закономерности, характерные как для проростков, так и для взрослых растений.

В проростках озимой мягкой пшеницы под влиянием закаливающей температуры (4°C) происходит стабилизация поли(А)-содержащей мРНК (чем выше морозостойкость сорта, тем длиннее терминальная поли(А)-последовательность и продолжительнее время полужизни мРНК), но сортоспецифически дестабилизируется рРНК. Например, у сорта озимой мягкой пшеницы Краснодарская 39 индекс стабильности поли(А)-содержащей мРНК под влиянием низкой положительной температуры (4°C) увеличивался в 3 раза по сравнению с таковым при 20°C, но при этом в 2 раза снижалась стабильность рРНК [14, 15, 32, 34].

Низкая положительная температура (4°C) приводила к снижению содержания катионов магния в зеленых четырехсуточных проростках пшеницы на 60 % за 8 часов экспозиции растений на холоде (4°C) по сравнению с контрольными проростками, находившимися при 20°C [30, 32, 34].

Следовательно, снижение содержания основного структурообразующего молекулы РНК катиона магния сопряжено со стабилизацией мРНК, но с дестабилизацией рРНК. Эти факты требуют дополнительных фундаментальных исследований, так как являются принципиально важными для понимания биологического смысла оперативной связи во взаимоотношениях стабильности мРНК и рРНК.

Возможно, стабилизация мРНК вызывает ускорение обмена рРНК, что необходимо для эффективного функционирования рибосом. В пользу этого предположения свидетельствуют литературные данные о том, что в опухолевых клетках животных мРНК имеет большее время полужизни по сравнению с таковой нормальных клеток, но рРНК опухолевых клеток содержит на 30-50 % меньше магния [34, 39] и имеет меньшее время полужизни: оборот рибосом возрастает с 2,4% в сутки до 3,1-3,6% у пациентов с онкологическими заболеваниями [50].

Известно, что АУ-богатые области на 3'-конце молекулы мРНК, предшествующие терминальной поли(А)-последовательности и определяющие скорость её деаденилирования, содержат структуры в виде шпилек, устойчивость которых зависит от наличия и количества катионов магния [45]. Вероятно, этим и объясняется обратная зависимость степени полиаденилирования мРНК от количества катионов магния.

Следовательно, есть основания полагать, что степень морозостойкости сорта озимой мягкой пшеницы прямо пропорциональна стабильности мРНК, но обратно пропорциональна стабильности рРНК и содержанию катионов магния в РНК. Под влиянием актиномицина Д соотношение 25S/18S рРНК снижалось на 6-7% за 8 часов экспозиции. Это свидетельствует о том, что 25S рРНК менее стабильна, чем 18S рРНК, что согласуется с литературными данными, полученными на животных объектах и свидетельствующими о том, что высокополимерный компонент рРНК (28S) менее стабилен, чем 18S рРНК.

Вместе с тем, при экспозиции проростков пшеницы на растворе актиномицина Д (40 мкг/мл) в течение 24 часов оставшаяся после частичного распада рРНК этиолированных проростков пшеницы содержала в среднем на 25% больше катионов магния по сравнению с РНК из контрольных растений, т.е. относительно более стабильная 18S рРНК обогащена катионами магния [30, 34].

Следовательно, чем выше содержание катионов магния в рРНК, тем она стабильнее (большее время жизни). Это вполне согласуется с литературными данными, свидетельствующими о том, что чем больше содержится магния в рРНК, тем активнее синтезируют белок (полифенилаланин) рибосомы зародышей пшеницы в бесклеточной системе синтеза белка (*in vitro*) на искусственной матрице (поли-У) [51].

Таким образом, представленные экспериментальные данные позволяют полагать, что морозостойкость озимой мягкой пшеницы прямо

пропорциональна периоду полужизни мРНК и 25S рРНК, но обратно пропорциональна периоду полужизни 18S рРНК и содержанию катионов Mg^{++} в РНК [32, 34].

Учитывая, то, что стабильность рРНК 25S и 18S, возможно, противоположным образом зависят от концентрации катионов магния в клетке, а именно - 18S рРНК стабилизируется катионами магния, а 25S рРНК - дестабилизируется, гипотетическая формула морозостойкости озимой мягкой пшеницы (МОМП) представляется следующей :

$$\text{МОМП} = \frac{1/2T(\text{мРНК} + 25S\text{рРНК})}{1/2T18S\text{рРНК}[Mg^{++}]_{\text{рнк}}}$$

$1/2T$ - период полураспада РНК;

$[Mg^{++}]_{\text{рнк}}$ - содержание катионов магния в РНК.

Вероятно, этим можно объяснить факт усиления *in vitro* трансляционной активности полисом из проростков пшеницы и ячменя под влиянием закаливающей температуры, тогда как в этих условиях длина поли-А-хвоста мРНК у пшеницы увеличивалась, а у ячменя сокращалась [2, 34]. Но ячмень содержит гораздо больше катионов магния по сравнению с пшеницей [17], что, возможно, и определяло увеличение трансляционной активности рибосом ячменя.

Следовательно, увеличение трансляционной активности полирибосом может происходить как за счёт увеличения длины поли-А-хвоста мРНК как энхансера трансляции, так и за счёт увеличения содержания катионов магния в рРНК. Эта принципиально важная гипотеза требует детальной экспериментальной проверки.

При высоком содержании магния способность строить полипептиды приобретают многие синтетические мРНК. При более низких

концентрациях, синтез могут вести только те РНК, в которых присутствуют иницирующие кодоны АУГ и ГУГ. Каким образом магний иницирует синтез? На этот вопрос нет однозначного ответа. Тем не менее, установлено, чем больше содержится магния в рРНК, тем активнее синтезируют белок (полифенилаланин) рибосомы зародышей пшеницы в бесклеточной системе синтеза белка (*in vitro*) на искусственной матрице (поли-У) [51].

Нанобиотехнологические подходы к развитию биологических маркёров

Таким образом, индекс стабильности мРНК представляет собой новый класс молекулярных генетико-физиологических маркёров, который отражает как структурные, так и функциональные параметры у растений.

Метод позволяет развивать молекулярно-кинетические (биологические) маркёры особенностей взаимодействия «генотип-среда» и изучить влияние различных факторов внешней (свет, температура, стресс-факторы) и внутренней (гормоны, биологически активные вещества) среды на стабильность суммарной поли-(А)-содержащей мРНК и индивидуальных ген-специфических мРНК в относительно простых экспериментах [1, 27, 34].

Однако относительная простота метода *оттр*-системы существенно обесценивается сложностью существующих методов детекции количества ген-специфических мРНК (дот-блот, Норзерн-блот, количественный ОТ-ПЦР), что является фактором, ограничивающим развитие исследований в этом направлении. Поэтому имеет принципиальное значение использование для этой цели возможностей, предоставляемых нанобиотехнологией. Достижения в этой области науки уже в настоящее время позволяют ставить вопрос о разработке простого, оперативного и высокочувствительного количественного метода определения ген-специфических мРНК эукариот, основанного на использовании

конъюгатов коллоидного золота (КЗ) с ген-специфическими олигодезоксирибонуклеотидными зондами (оДНК). Получены принципиальные доказательства того, что колориметрический метод с применением наночастиц КЗ-оДНК позволяет оценить количество ген-специфической мРНК в препарате суммарной высокополимерной РНК с чувствительностью, близкой к чувствительности радиоизотопного метода, без синтеза комплементарной ДНК в отличие от метода ОТ-ПЦР, что делает оценку количества индивидуальной мРНК более простой и более дешёвой.

Комбинация этого метода с методом ПЦР резко снижает стоимость анализа методом ПЦР в целях диагностики, так как позволяет оценить количество ампликонов уже после первого (из 25-30) цикла ПЦР при помощи соответствующих конъюгатов коллоидного золота. Кроме того, чувствительность (эффективность) самого метода ПЦР может быть резко увеличена (до 10 000 раз) при помощи коллоидного золота, снижающего неспецифическое взаимодействие праймеров-нуклеотидов [3, 4].

Особый интерес представляет способность одноцепочечных нуклеиновых кислот (преимущественно РНК) предотвращать агрегацию золотых нефункционализированных наночастиц. Это происходит, вероятно, за счёт электростатических взаимодействий между отрицательно заряженными фосфатными группировками нуклеиновых кислот и высокополяризованными золотыми наночастицами, что является перспективным в исследовании экспрессии генов и разработки на этой основе новых методов диагностики биологических свойств организмов. В ходе подобных работ с долгоживущей РНК зрелого зерна были получены обнадеживающие результаты по оценке морозоустойчивости озимой мягкой пшеницы и озимого ячменя [34, 37].

Особенности физико-химических свойств РНК как предпосылки разработки простых РНК-маркёров

Использование системы *оттр* может служить основой для создания эффективных молекулярно-кинетических РНК-маркёров стрессоустойчивости и фотопериодизма злаков, позволяющих на молекулярном уровне в лабораторных условиях и относительно простых экспериментов оценивать амплитуду молекулярно-физиологических реакций растительного организма (норму реакции). Это направление исследований по сути ориентировано на создание лабораторных молекулярно-биологических методов районирования сортов культурных злаков.

Однако обнаруженные закономерности распада мРНК в системе *оттр* не могут быть использованы в широких масштабах, как того требует селекционная практика, поскольку эти методы в настоящее время трудоёмки и дороги. Необходим поиск более простых, но адекватных РНК-маркёров.

Поскольку факторы внешней среды определяют длину терминальной поли(А)-последовательности мРНК, были предприняты эксперименты по разработке относительно простого метода оценки длины поли(А)-хвоста суммарной полиаденилированной мРНК на основании ярко выраженных физико-химических особенностей полиадениловой кислоты: её самой высокой устойчивости к щелочному гидролизу и самой высокой величиной гиперхромного эффекта. Было показано, что отсечение поли(А)-последовательности от молекулы мРНК возможно, так как поли(А)-хвосту в молекуле мРНК предшествует 3'-некодирующая область мРНК, сильно обогащённая фрагментами (У)_nА. В отличие от полиадениловой кислоты, полиуридилловая кислота обладает самой слабой устойчивостью к щелочному гидролизу и самой низкой величиной гиперхромного эффекта. Как и предполагалось, кратковременный

щелочной гидролиз отсекал терминальную поли(А)-последовательность от молекулы мРНК по (У)_n-А-последовательностям, а возможные "обрывки" полиуридилевой кислоты не сказывались на величине гиперхромного эффекта.

Этот метод дал вполне удовлетворительные предварительные результаты по оценке морозоустойчивости и фотопериодизма сортов озимой мягкой пшеницы. В ходе этих экспериментов было отмечено, что кратковременный гидролиз рибосомной РНК также давал вполне адекватные результаты, как по морозоустойчивости, так и по фотопериодизму сортов озимой мягкой пшеницы. При этом было отмечено закономерное выпадение нерастворимых осадков, скорее всего гидрата окиси магния. Это наблюдение послужило отправной точкой для изучения содержания катионов магния в РНК, проростках, созревающем и зрелом зерне злаков [13-16, 34, 40].

Особенности состава зрелого зерна как маркёр морозоустойчивости

Важным шагом в упрощении лабораторных методов оценки морозоустойчивости на основе особенностей реакции белоксинтезирующей системы представляется переход к аналогичным исследованиям не вегетирующих растений, а зрелого зерна.

Было установлено, что в высокополимерной РНК из проростков злаков содержание основного структурообразующего катиона магния (Mg^{++}) существенно варьирует в зависимости от генотипа (сорта) и условий окружающей среды. Исследования показали, что содержание катионов магния в РНК довольно хорошо коррелирует с общим содержанием этого катиона в золе проростков и, что наиболее важно, в золе зрелого зерна. Была показана тесная корреляция между морозоустойчивостью сортов озимой мягкой пшеницы и её морозоустойчивостью, которая была определена предварительно прямыми методами. Чем выше было

содержание катионов магния в зерне, тем ниже морозоустойчивость [13-16, 28, 29, 30, 32].

Эта закономерность прослеживается и в морозоустойчивости видов: сравнительно слабоморозоустойчивый ячмень содержит 180, более высокоморозоустойчивая пшеница – 157, а высокоморозоустойчивая рожь – 92 мг магния на 100 г сухого вещества зрелого зерна [17].

Среднеморозоустойчивые сорта озимой мягкой пшеницы также достоверно отличаются от высокоморозоустойчивых сортов содержанием РНК и ДНК в зрелом зерне. Слабоморозоустойчивые сорта как и высокоморозоустойчивые имели высокое содержание нуклеиновых кислот в зрелом зерне, но отличались от последних не только уровнем содержания катионов магния, но и электрофоретическим спектром рибосомной РНК зрелого зерна.

При этом была обнаружена сортоспецифическая вариабельность в содержании РНК, ДНК и катионов магния, коррелирующая с морозостойкостью изученных сортов озимой мягкой пшеницы (коэффициенты корреляции для содержания РНК - +0,88, для ДНК - +0,80, для магния - -0,51) [14, 15].

Зародыш зрелого зерна среднеморозоустойчивого сорта Безостая 1 как РНК, так и ДНК накапливает меньше, чем высокоморозоустойчивого сорта Мироновская 808, а абсолютное содержание нуклеиновых кислот у яровых сортов пшеницы выше, чем у озимых [19]. Высокоморозоустойчивая рожь содержит в зрелом зерне намного больше РНК, чем зерно озимой мягкой пшеницы (5,40 мкг/г против 3,09, т.е. содержание РНК в зерне ржи на 70% выше). Тритикале различного происхождения имели промежуточное содержание РНК в зерне – ниже, чем во ржи, но выше, чем в пшенице [15].

На основании полученных данных представляется вероятным предположение, что в зерне озимой пшеницы содержание магния в РНК и

в золе, содержание нуклеиновых кислот (РНК и ДНК) и электрофоретические характеристики рРНК определяют (“преформируют”) особенности закалки и всего последующего онтогенеза растения, а, следовательно, и степень его морозоустойчивости при том условии, что зерно сравнимых сортов - одного года репродукции и получено с одного поля (одинаковый агрофон) [1,2].

Обнадёживающие результаты получены и на рисе: холодостойкость его сортов положительно коррелирует с содержанием РНК в зародыше зрелого зерна [7].

Вместе с тем, в процессе подобных фундаментальных исследований нередко выявляются совершенно неожиданные факты, дальнейшее изучение которых позволяет надеяться на разработку еще более простых, эффективных и дешевых методов прогнозирования, чем те, на которые изначально были ориентированы исследователи.

В ходе экспериментов было замечено, что в равных условиях (соотношение навески и объема экстрагирующего буфера) экстракция шрота зрелого зерна озимой пшеницы и озимого ячменя происходила по-разному. Объем экстракта из ячменя был на 30–40% меньше, чем из пшеницы, т.е. шрот зрелого зерна озимого ячменя отличался большей гигроскопичностью. Но самое важное заключалось в том, что наблюдались сортовые различия между относительно высоко и слабо морозоустойчивыми сортами ячменя. Более морозоустойчивые сорта озимого ячменя отличались большей гигроскопичностью шрота, и эти различия достигали величины более 20%.

У сортов озимой мягкой пшеницы подобной выраженной закономерности не наблюдалось, что, вероятно, объясняется разными молекулярными механизмами формирования морозоустойчивости растений пшеницы и ячменя [2].

Экспериментально была установлена взаимосвязь между морозоустойчивостью сортов озимого ячменя и водоудерживающей способностью (гигроскопичностью) зрелого зерна. На примере десятков сортов показано, что чем выше морозоустойчивость сорта, тем меньший объём надосадочной жидкости может быть получен при экстракции шрота ячменя раствором, содержащим катионы магния. Результаты сравнительных исследований морозоустойчивости по степени выживания растений при промораживании в холодильных камерах и по степени гигроскопичности зрелого зерна показали, что эти два метода оценки морозоустойчивости дают весьма близкие данные. Вместе с тем, по простоте и низким экономическим затратам предлагаемый метод оценки морозоустойчивости во много раз превосходит метод прямого промораживания растений [3].

Однако, разрешающая способность нового метода существенно не превышает таковую метода прямого промораживания ($НСР=0,05$ для различий по морозостойкости в 8-10%), а для эффективной селекции, по мнению академика РАСХН В.М. Шевцова, желательны различия в 2 раза большие. Дальнейшие исследования показали возможность увеличить разрешающую способность этого лабораторного метода за счет дополнительного анализа содержания в зрелом зерне ячменя экстрактивного магния, которым особенно богаты среднеморозоустойчивые сорта [17, 18].

Заключение

Фактор времени имеет нередко решающее значение в жизни растения, продлевая работу одних генетических систем и задерживая смену их другими и, наоборот, ускоряя этот процесс. Изменение скорости роста и развития определяет такие свойства, как стрессоустойчивость и фотопериодизм. Например, на практике имеют превосходство по морозоустойчивости те сорта озимой мягкой пшеницы, закалка которых

(при 4°C) происходит сравнительно быстро [2, 34], т.е. можно предполагать, что степень морозоустойчивости злаков прямо пропорциональна скорости закалки проростков. Поэтому фактор времени имеет большое значение при разработке соответствующих маркёров. Скорость изменения компонентов белоксинтезирующей системы проростков пшеницы и ячменя озимых сортов дифференциальна (сортоспецифична) и реагирует на закаливающие температуры как на уровне трансляции полирибосом, так и на уровне стабильности суммарной мРНК или ген-специфической мРНК.

Каждый из этих уровней определяет экономичность, точность и производительность разрабатываемых на их основе маркёров морозоустойчивости. В этом отношении принципиально важно оказалось перейти к исследованию не вегетирующих растений или проростков, а к исследованию зрелого зерна.

Исследования озимой мягкой пшеницы привели к выводу о целесообразности дальнейшего изучения долгоживущей РНК зрелого зерна. На основании полученных данных предполагается, что в зерне озимой мягкой пшеницы содержание магния в РНК и в золе, содержание нуклеиновых кислот (РНК и ДНК) и электрофоретические характеристики рРНК определяют (“преформируют”) особенности закалки и всего последующего онтогенеза растения, а, следовательно, и степень его морозоустойчивости.

Молекулярно-биологические механизмы формирования морозоустойчивости озимого ячменя оказались более сложными, чем таковые озимой пшеницы. Однако, в ходе молекулярно-биологических работ эмпирически был найден простой маркёр морозоустойчивости озимого ячменя: гигроскопичность зрелого зерна прямо пропорциональна его морозоустойчивости, что, возможно, связано с разным содержанием в зерне «растворимого крахмала» - бета-глюканов [35, 36].

Описанные в настоящей статье теоретические предпосылки и методические решения определяют принципиально новые возможности в разработке лабораторных методов оценки биологических особенностей зерновых культур в ходе селекционного процесса, что в перспективе привело бы к существенному развитию теории селекции и предоставило маркёры для отбора по ряду биологических признаков, отличающихся от традиционных подходов меньшей трудоёмкостью и большей экономичностью, что позволило бы в конечном итоге ускорить начальные этапы селекции и сократить сроки выведения новых форм злаков.

Литература

1. Алексеенко Жанна Владимировна Дифференциальный распад мРНК злаков *in vitro* как молекулярно-кинетический маркёр эффекта взаимодействия «генотип-среда»: Дисс. ...биол. наук. Краснодар, 2003. 172 с.

2. Бакалдина Н.Б., Алексеенко Ж.В., Плотников В.К. Холодоиндуцированные изменения стабильности мРНК субъединицы альфа фактора элонгации трансляции 1 у проростков пшеницы и ячменя // Физиология растений. 2001. т. 48, № 6. С 879-885.

3. Богатырёв В.А., Дыкман Л.А., Краснов Я.М., Плотников В.К., Хлебцов Н.Г. Метод дифференциальной спектроскопии рассеянного света для исследования биоспецифических реакций в системах конъюгатов золотых наночастиц с белками или олигонуклеотидами // Коллоидный журнал. 2002. Т. 64. № 6. С 745-755.

4. Богатырёв В.А., Дыкман Л.А., Хлебцов Б.Н., Плотников В.К., Хлебцов Н.Г. Оптические свойства конъюгатов коллоидного золота с олиготимидином и их изменение при реакции гибридизации с полиадениловой кислотой // Коллоидный журнал. 2005. Т.67. № 4. С 458-468.

5. Батыгин Н.Ф. К вопросу о теории зимостойкости и построении модели сорта // Повышение зимостойкости озимых зерновых: Сборник научных работ; Колос, Москва, 1993. С. 14-22.

6. Драгавцев В.А. Молекулярный, онтогенетический, популяционный и фенотипический уровни генетической организации хозяйственно-ценных признаков растений // Сельскохозяйственная биология, 2006, №1, с. 115-123.

7. Иваненко Е.Е., Скаженник М.А. Идентификация подвидов риса *Indica* и *Japonica* при помощи молекулярно-физиологических признаков // Зерновое хозяйство России. 2013, Т. 27, № 3, С. 11-17.

8. 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. № 4. С.730-735.

9. Кильчевский А.В. Генетико-экологические основы селекции растений // Вестник ВОГиС, 2005, Т. 9, № 4, С. 518-526.

10. Климов С.В. Пути адаптации растений к низким температурам // Успехи современной биологии, 2001, т. 121, № 1, С. 3-22.

11. Конарев А.В. Использование молекулярных маркёров в решении проблем генетических ресурсов растений и селекции // *Аграрная Россия*, 2006, № 6, С. 4-22.

12. Малиновский В.И., Боровский Г.Б., Горбылёва Е.Л., Федосеева И.В., Таусон Е.Л., Соколов В.А., Войников В.К. Роль коротких РНК в устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам // *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 2013, Т. 17, № 1, С. 96-103.

13. Насонов А.И., Сметанин Д.В., Плотников В.К. Генетико-физиологическая предопределённость щелочного гидролиза РНК из проростков пшеницы // *Сборник научных трудов КНИИСХ, Краснодар*, 2002. С. 122-128.

14. Насонов Андрей Иванович Гетерогенность свойств основных РНК-компонентов белоксинтезирующей системы клетки в связи с биологическими особенностями зерновых культур. Дисс. ... канд. биол. наук, Саратов, ИБФРМ РАН, 2008. 145 с.

15. Насонов А.И. Гетерогенность свойств РНК зерновых культур. Связь с биологическими особенностями линий и сортов, Saarbruken, LAP Lambert Academic Publishing, 2010. 190 с.

16. Насонов А.И., Полежаев С.Л., Радуль А.П., Рядчиков В.Г., Плотников В.К. Взаимосвязь содержания катионов магния (Mg^{++}), стабильности РНК и интенсивности метаболизма в клетках эукариот // *Труды Кубанского государственного аграрного университета*, 2008, № 2(11), С.104-110.

17. Насонов А.И., Евтушенко Я.Ю., Серкин Н.В., Плотников В.К. Особенности состава зерна среднеморозоустойчивых сортов ячменя // *Труды Кубанского государственного аграрного университета*, 2012, Т. 1, № 38, с. 104 – 106.

18. Насонов А.И., Степанов И.В., Евтушенко Я.Ю., Плотников В.К. Дифференциальная стабильность 25S и 18S рибосомной РНК растений // *Труды Кубанского аграрного университета*, 2012, т. 1., № 38, С. 121-125.

19. Овчаров К.Е. Физиология формирования и прорастания семян. - М.: Колос, 1976. 255 с.

20. Плотников В.К. Стабильность мРНК как фактор регуляции экспрессии генов в клетках эукариот // *Успехи современной биологии*, 1992, т. 112, вып. 2, с. 186-199.

21. 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.

22. Плотников В.К., Бакалдина Н.Б., Бибишев В.А. Российский патент № 2084133 на изобретение «Способ диагностики физиологического состояния зерновых культур» от 20 июля 1997.

23. Плотников Владимир Константинович Биохимические признаки стабильности мРНК в связи с регуляцией синтеза белка в клетках злаков и их устойчивостью к стрессам с целью создания новых методов селекции // *Диссертация в виде научного доклада на соискание учёной степени доктора биологических наук. Краснодар.1997. 42 с.*

24. 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.

25. 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.

26. 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.

27. Плотников В.К. Генетико-физиологическая детерминация распада мРНК злаков *in vitro*//Успехи современной биологии, 2003, Т. 123, № 1, с. 98-109.

28. Плотников В.К., Насонов А.И., Кузембаева Н.А., Букреева Г.И., Каленич В.И., Беспалова Л.А. Особенности молекулярной физиологии озимой мягкой пшеницы сорта Безостая 1 // «Безостая 1 - 50 лет триумфа» Сборник материалов международной конференции, посвящённой 50-летию создания сорта озимой мягкой пшеницы Безостой 1. Краснодар. 2005. С. 212 - 220.

29. Плотников В.К. Генетический контроль и экологическая обусловленность стабильности мРНК в клетках эукариот//Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии, Москва, 2007, №5 (Юбилейный выпуск: 120 лет Н.И. Вавилову), с.110 – 119.

30. 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.

31. Плотников В.К., Евтушенко Я.Ю. Перспективы практического применения нанобиотехнологических методов исследований в молекулярной биологии// Наука Кубани. Приложение. 2008. С. 6-15.

32. Плотников В.К., Насонов А.И., Иваненко Е.Е., Кузембаева Н.А., Евтушенко Я.Ю. Морозостойкость озимой мягкой пшеницы как функция стабильности РНК// «Проблемы аридизации Юго-Востока Европейской части России» (материалы международной научно-практической конференции, посвящённой 100-летию Краснодарской селекционно-опытной станции, 29 июня – 30 июня 2009 г.), Саратов, РАСХН ГНУ научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока, 2009, с. 140-143.

33. Плотников В.К. Нанобиотехнологические методы исследования нуклеиновых кислот и перспективы их практического применения // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии, 2009. Вып. 4. С. 58-70.

34. Плотников В.К. Биология РНК зерновых культур, Краснодар, Издательство «Эдви», 2009, 375 с.

35. Плотников В.К., Евтушенко Я.Ю., Серкин Н.В. Сравнительный анализ морозоустойчивости сортов озимого ячменя по результатам промораживания и по гигроскопичности зрелого зерна // Физиология растений, 2012, т. 59, №2, с. 316-319.

36. Плотников В.К., Евтушенко Я.Ю., Серкин Н.В. Способ определения морозоустойчивости озимого ячменя //Патент РФ на изобретение № 2479991, Зарегистрирован в государственном реестре изобретений Российской Федерации 27 апреля 2013 г.

37. Пылаев Т.Е. Исследование комплексов ДНК-золотые наночастицы методами спектроскопии поглощения и динамического рассеяния света: Дисс. ... канд. биол.наук. Воронеж, 2012. 177 с.

38. Руковцова Е.Б., Алексеева В.В., Бурьянов Я.И. Применение РНК-интерференции в метаболической инженерии растений // Биоорганическая химия, 2010, Т. 36, № 2, С. 159-169.

39. Рядчиков В.Г., Плотников В.К. Экспрессия генов эукариот при аминокислотном имбалансе, 2014, Краснодар, КубГау, 375 с.

40. Сметанин Д.В., Плотников В.К. Теоретические и экспериментальные предпосылки создания нового метода оценки относительной длины терминального

поли(А)сегмента мРНК проростков пшеницы//Сб. науч. тр. КНИИСХ, посвященный 100-летию В.А. Невинных, Краснодар, 2000, с. 220-224.

41. Федулов Ю.П. Системный анализ морозоустойчивости озимых культур. Автореф. дис. на соиск. степени докт. биол. наук. - Санкт-Петербург, 1994, С.45.

42. Шевцов В.М., Серкин Н.В., Фоменко Н.П., Костяной Д.В. Проблемы повышения зимостойкости озимого ячменя на Северном Кавказе // Доклады РАСХН, 2007, № 4, С. 3-5.

43. Basra A.S. (ed.) Crop responses and adaptations to temperature stress, 2001, New York; Food Products Press, 302 P.

44. Fedulov Y.P. System analysis of frost resistance in winter wheat and its use in breeding // Euphytica, 1998, V. 100, P. 101-108.

45. Fialcowitz E.J., Brewer B.Y., Keenan B.P., Wilson G.M. A Hairpin-like Structure within an AU-rich mRNA-destabilizing Element Regulates trans-Factor Binding Selectivity and mRNA Decay Kinetics // J. Biol. Chem., 2005, V. 280, P. 22406 – 22417.

46. Magashi A.I. The effect of light, temperature and desiccation on differential stability of mRNA, from spring and winter wheat seedlings // Bayero Journal of Pure and Applied Sciences, 2010, V. 3, N 1, P. 69-73.

47. Morelli J.K., Shewmaker Ch.K., Vayda M.E. Biphasic stimulation of translational activity correlates with induction of elongation factor 1 subunit α upon wounding in potato tubers // Plant Physiol., 1994, V. 106, P. 897-903.

48. Morelli J.K., Zhou W., Yu J., Lu C., Vayda M.E.. Actin depolymerization affects stress-induced translational activity of potato tuber tissue // Plant Physiol., 1998, V. 116, N 4, P. 1227-1237.

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

50. Seidel A., Brunner S., Fritz G.I., Herbarth O. Modified nucleosides: an accurate tumor marker for clinical diagnosis of cancer, early detection and therapy control // British Journal of Cancer, 2006, V. 94, P. 1726-1733.

51. Sperrazza J.M., Spremulli L.L. Quantitation of cation binding to wheat germ ribosomes: influences on subunit association equilibria and ribosome activity // Nucleic Acids Research. 1983. V.11. № 9. P. 2665 – 2679.

52. Vayda ME, Shewmaker CK, Morelli JK. Translational arrest in hypoxic potato tubers is correlated with the aberrant association of elongation factor EF-1 alpha with polysomes // Plant Mol Biol., 1995. V. 28(4), P. 751-757.

References

1. Alekseenko Zhanna Vladimirovna Differencial'nyj raspad mRNK zlakov in vitro kak molekularno-kineticheskij markjor jeffekta vzaimodejstvija «genotip-sreda»: Diss. ...biol. nauk. Krasnodar, 2003. 172 s.

2. Bakaldina N.B., Alekseenko Zh.V., Plotnikov V.K. Holodoinducirovannye izmenenija stabil'nosti mRNK sub#edinicy al'fa faktora jelongacii transljicii 1 u prorostkov pshenicy i jachmenja // Fiziologija rastenij. 2001. t. 48, № 6. С 879-885.

3. Bogatyrjov V.A., Dykman L.A., Krasnov Ja.M., Plotnikov V.K., Hlebcov N.G. Metod differencial'noj spektroskopii rassejannogo sveta dlja issledovanija biospecificheskijh reakcij v sistemah kon#jugatov zolotyh nanochastic s belkami ili oligonukleotidami // Kolloidnyj zhurnal. 2002. T. 64. № 6. S 745-755.

4. Bogatyrjov V.A., Dykman L.A., Hlebcov B.N., Plotnikov V.K., Hlebcov N.G. Opticheskie svojstva kon#jugatov kolloidnogo zolota s oligotimidinom i ih izmenenie pri

reakcii gibridizacii s poliadenilovoj kislotoj // Kolloidnyj zhurnal. 2005. T.67. № 4. S 458-468.

5. Batygin N.F. K voprosu o teorii zimostojkosti i postroenii modeli sorta // Povyshenie zimostojkosti ozimyh zernovyh: Sbornik nauchnyh rabot; Kolos, Moskva, 1993. S. 14-22.

6. Dragavcev V.A. Molekuljarnyj, ontogeneticheskiy, populjacionnyj i fenocenoticheskiy urovni geneticheskoy organizacii hozjajstvenno-cennyh priznakov rastenij // Sel'skohozjajstvennaja biologija, 2006, №1, s. 115-123.

7. Ivanenko E.E., Skazhennik M.A. Identifikacija podvidov risa Indica i Japonica pri pomoshhi molekuljarno-fiziologicheskikh priznakov // Zernovoe hozjajstvo Rossii.2013, T. 27, № 3, S. 11-17.

8. Kil' V.I., Bibishev V.A., Plotnikov V.K. Nespecificheskiy prirost transljacionnoj aktivnosti polisom prorostkov pshenicy i jachmenja pod dejstviem stressov // Fiziologija rastenij. 1991. T. 38. № 4. S.730-735.

9. Kil'chevskij A.V. Genetiko-jekologicheskie osnovy selekcii rastenij // Vestnik VOGiS, 2005, T. 9, № 4, S. 518-526.

10. Klimov S.V. Puti adaptacii rastenij k nizkim temperaturam // Uspehi sovremennoj biologii, 2001, t. 121, № 1, S. 3-22.

11. Konarev A.V. Ispol'zovanie molekuljarnyh markjorov v reshenii problem geneticheskikh resursov rastenij i selekcii // Agrarnaja Rossija, 2006, № 6, S. 4-22.

12. Malinovskij V.I., Borovskij G.B., Gorbyljova E.L., Fedoseeva I.V., Tauson E.L., Sokolov V.A., Vojnikov V.K. Rol' korotkih RNK v ustojchivosti rastenij k bioticheskim i abioticheskim stressam // Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii, 2013, T. 17, № 1, S. 96-103.

13. Nasonov A.I., Smetanin D.V., Plotnikov V.K. Genetiko-fiziologicheskaja predopredeljonost' shhelohnogo gidroliza RNK iz prorostkov pshenicy // Sbornik nauchnyh trudov KNIISH, Krasnodar, 2002. S. 122-128.

14. Nasonov Andrej Ivanovich Geterogenost' svojstv osnovnyh RNK-komponentov beloksintezirujushhej sistemy kletki v svjazi s biologicheskimi osobennostjami zernovyh kul'tur. Diss. ... kand. biol. nauk, Saratov, IBFRM RAN, 2008. 145 s.

15. Nasonov A.I. Geterogenost' svojstv RNK zernovyh kul'tur. Svjaz' s biologicheskimi osobennostjami linij i sortov, Saarbruken, LAP Lambert Academic Publishing, 2010. 190 s.

16. Nasonov A.I., Polezhaev S.L., Radul' A.P., Rjadchikov V.G., Plotnikov V.K. Vzaimosvjaz' sodержaniya kationov magnija (Mg⁺⁺), stabil'nosti RNK i intensivnosti metabolizma v kletkah jeukariot // Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, 2008, № 2(11), S.104-110.

17. Nasonov A.I., Evtushenko Ja.Ju., Serkin N.V., Plotnikov V.K. Osobennosti sostava zerna srednemorozoustojchivyh sortov jachmenja // Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, 2012, T. 1, № 38, s. 104 – 106.

18. Nasonov A.I., Stepanov I.V., Evtushenko Ja.Ju., Plotnikov V.K. Differencial'naja stabil'nost' 25S i 18S ribosomnoj RNK rastenij // Trudy Kubanskogo agrarnogo universiteta, 2012, t. 1., № 38, S. 121-125.

19. Ovcharov K.E. Fiziologija formirovaniya i prorastaniya semjan. - M.: Kolos, 1976. 255 s.

20. Plotnikov V.K. Stabil'nost' mRNK kak faktor reguljicii jekspressii genov v kletkah jeukariot//Uspehi sovremennoj biologii, 1992, t. 112, vyp. 2, s. 186-199.

21. 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.

22. Plotnikov V.K., Bakaldina N.B., Bibishev V.A. Rossijskij patent № 2084133 na izobrenenie «Sposob diagnostiki fiziologicheskogo sostojanija zernovyh kul'tur» ot 20 ijulja 1997.

23. Plotnikov Vladimir Konstantinovich Biohimicheskie priznaki stabil'nosti mRNK v svjazi s reguljaciej sinteza belka v kletkah zlakov i ih ustojchivost'ju k stressam s cel'ju sozdanija novyh metodov selekcii // Dissertacija v vide nauchnogo doklada na soiskanie uchjonoj stepeni doktora biologicheskikh nauk. Krasnodar.1997. 42 s.

24. 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.

25. 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.

26. 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.

27. Plotnikov V.K. Genetiko-fiziologicheskaja determinacija raspada mRNK zlakov in vitro//Uspehi sovremennoj biologii, 2003, T. 123, № 1, s. 98-109.

28. Plotnikov V.K., Nasonov A.I., Kuzembaeva N.A., Bukreeva G.I., Kalenich V.I., Bepalova L.A. Osobennosti molekularnoj fiziologii ozimoy mjagkoj pshenicy sorta Bezostaja 1 // «Bezostaja 1 - 50 let triumfa» Sbornik materialov mezhdunarodnoj konferencii, posvjashhjonnoj 50-letiju sozdanija sorta ozimoy mjagkoj pshenicy Bezostoj 1. Krasnodar. 2005. S. 212 - 220.

29. Plotnikov V.K. Geneticheskij kontrol' i jekologicheskaja obuslovlennost' stabil'nosti mRNK v kletkah jeukariot//Izvestija Timirjzevskoj sel'skohozjajstvennoj akademii, Moskva, 2007, №5 (Jubilejnij vypusk: 120 let N.I. Vavilovu), s.110 – 119.

30. 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.

31. Plotnikov V.K., Evtushenko Ja.Ju. Perspektivy prakticheskogo primenenija nanobiotehnologicheskikh metodov issledovanij v molekularnoj biologii// Nauka Kubani. Prilozhenie. 2008. S. 6-15.

32. Plotnikov V.K., Nasonov A.I., Ivanenko E.E., Kuzembaeva N.A., Evtushenko Ja.Ju. Morozostojkost' ozimoy mjagkoj pshenicy kak funkcija stabil'nosti RNK// «Problemy aridizacii Jugo-Vostoka Evropejskoj chasti Rossii» (materialy mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoi konferencii, posvjashhjonnoj 100-letiju Krasnokutskoj selekcionno-opytnoj stancii, 29 ijunja – 30 ijunja 2009 g.), Saratov, RASHN GNU nauchno-issledovatel'skij institut sel'skogo hozjajstva Jugo-Vostoka, 2009, s. 140-143.

33. Plotnikov V.K. Nanobiotehnologicheskije metody issledovanija nukleinovyx kislot i perspektivy ih prakticheskogo primenenija // Izvestija Timirjzevskoj sel'skohozjajstvennoj akademii, 2009. Vyp. 4. S. 58-70.

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

35. Plotnikov V.K., Evtushenko Ja.Ju., Serkin N.V. Sravnitel'nyj analiz morozustojchivosti sortov ozimogo jachmenja po rezul'tatam promorazhivanija i po gigroskopichnosti zrelogo zerna // Fiziologija rastenij, 2012, t. 59, №2, s. 316-319.

36. Plotnikov V.K., Evtushenko Ja.Ju., Serkin N.V. Sposob opredelenija morozoustojchivosti ozimogo jachmenja //Patent RF na izobrenenie № 2479991, Zaregistririvan v gosudarstvennom reestre izobrenenij Rossijskoj Federacii 27 aprelja 2013 g.
37. Pylaev T.E. Issledovanie kompleksov DNK-zolotye nanochasticy metodami spektroskopii pogloshhenija i dinamicheskogo rassejanija sveta: Diss. ... kand. biol.nauk. Voronezh, 2012. 177 s.
38. Rukovcova E.B., Alekseeva V.V., Bur'janov Ja.I. Primenenie RNK-interferencii v metabolicheskoj inzhenerii rastenij // Bioorganicheskaja himija, 2010, T. 36, № 2, S. 159-169.
39. Rjadchikov V.G., Plotnikov V.K. Jekspressija genov jeukariot pri aminokislotnom imbalanse, 2014, Krasnodar, KubGau, 375 s.
40. Smetanin D.V., Plotnikov V.K. Teoreticheskie i jeksperimental'nye predposylki sozdanija novogo metoda ocenki odnositel'noj dliny terminal'nogo poli(A)segmenta mRNK prorostkov pshenicy//Sb. nauch. tr. KNIISH, posvjashhjonnyj 100-letiju V.A. Nevinnyh, Krasnodar, 2000, s. 220-224.
41. Fedulov Ju.P. Sistemnyj analiz morozoustojchivosti ozimyh kul'tur. Avtoref. dis. na soisk. stepeni dokt. biol. nauk. - Sankt-Peterburg, 1994, S.45.
42. Shevcov V.M., Serkin N.V., Fomenko N.P., Kostjanov D.V. Problemy povyshenija zimostojkosti ozimogo jachmenja na Severnom Kavkaze // Doklady RASHN, 2007, № 4, S. 3-5.
43. Basra A.S. (ed.) Crop responses and adaptations to temperature stress, 2001, New York; Food Products Press, 302 P.
44. Fedulov Y.P. System analysis of frost resistance in winter wheat and its use in breeding // Euphytica, 1998, V. 100, P. 101-108.
45. Fialcowitz E.J., Brewer B.Y., Keenan B.P., Wilson G.M. A Hairpin-like Structure within an AU-rich mRNA-destabilizing Element Regulates trans-Factor Binding Selectivity and mRNA Decay Kinetics // J. Biol. Chem., 2005, V. 280, P. 22406 – 22417.
46. Magashi A.I. The effect of light, temperature and desiccation on differential stability of mRNA, from spring and winter wheat seedlings // Bayero Journal of Pure and Applied Sciences, 2010, V. 3, N 1, P. 69-73.
47. Morelli J.K., Shewmaker Ch.K., Vayda M.E. Biphasic stimulation of translational activity correlates with induction of elongation factor 1 subunit α upon wounding in potato tubers // Plant Physiol., 1994, V. 106, P. 897-903.
48. Morelli J.K., Zhou W., Yu J., Lu C., Vayda M.E.. Actin depolymerization affects stress-induced translational activity of potato tuber tissue // Plant Physiol., 1998, V. 116, N 4, P. 1227-1237.
49. Plotnikov V.K., Bakaldina N.B. Differential stability of zein mRNA in developing corn kernel // Plant Molecular Biology, 1996, V. 31, P. 507-515.
50. Seidel A., Brunner S., Fritz G.I., Herbarth O. Modified nucleosides: an accurate tumor marker for clinical diagnosis of cancer, early detection and therapy control // British Journal of Cancer, 2006, V. 94, P. 1726-1733.
51. Sperrazza J.M., Spremulli L.L. Quantitation of cation binding to wheat germ ribosomes: influences on subunit association equilibria and ribosome activity // Nucleic Acids Research. 1983. V.11. № 9. P. 2665 – 2679.
52. Vayda ME, Shewmaker CK, Morelli JK. Translational arrest in hypoxic potato tubers is correlated with the aberrant association of elongation factor EF-1 alpha with polysomes // Plant Mol Biol., 1995. V. 28(4), P. 751-757.