

УДК 636.084.087.74

UDC 636.084.087.74

БИОХИМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МУТАЦИИ РЕГУЛЯТОРНОГО ГЕНА OPAQUE-2 В ЗЕРНЕ ВЫСОКОЛИЗИНОВОЙ КУКУРУЗЫ: 50 ЛЕТ ИССЛЕДОВАНИЙ

BIOCHEMICAL IMPACT OF OPAQUE-2 REGULATORY GENE MUTATION IN HIGH-LYSINE CORN KERNEL: 50 YEARS OF INVESTIGATION

Плотников Владимир Константинович
д.б.н., доцент
vkpbio21@mail.ru

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

Рядчиков Виктор Георгиевич
д.б.н., профессор, академик РАН
ryadchikovv@mail.ru
Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар, Россия

Ryadchikov Victor Georgievich
Dr.Sci.Biol., professor, academician of Russian Academia of Science
ryadchikovv@mail.ru
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

В обзоре обобщены результаты 50-летнего периода биохимических и молекулярно-биологических исследований особенностей метаболизма созревающего зерна высоколизинового мутанта кукурузы opaque-2

The main aim of this article is to generalize the results of biochemical and molecular research of developing opaque-2 maize seeds (high-lysine mutant of maize) metabolism peculiarities

Ключевые слова: КУКУРУЗА, ЗЕРНО, ГЕН, OPAQUE-2, МУТАЦИЯ, ЛИЗИН, ТРИПТОФАН

Keywords: MAIZE, SEEDS, OPAQUE-2, GENE, MUTATION, LYSINE, TRIPTOPHANE

Введение

Одна из сложившихся экологических систем в природе - пищевая: солнечная энергия – растение – животное – человек. Человек питается мясом животных, которые едят растения, последние используют солнечную энергию. Эффективность этой естественной кормовой цепи очень мала. По расчётам Несмеянова А.Н. и Беликова В.М обширное поле – четыре гектара, засеянные люцерной, может прокормить 4-5 телят, которые нужны для питания в течение года одного человека весом 50 килограмм и обладающего нормальным аппетитом. Из всей солнечной энергии, падающей на поле, люцерна использует для своего роста всего около 0,24%. Из энергии, накопленной люцерной, телята используют для своего роста 8%. Из энергии, накопленной телятами, человек использует для своего жизнеобеспечения 0,7%. В итоге в теле человека остаётся около миллионной доли от энергии солнечных лучей, падающих на поле. Миллионная доля человеку, 999 999 долей – потери на движение, на

испарение, на несъедобные растительные остатки, копыта, рога, шкуру, обеспечивающие сохранение вида растений или животных [6].

КПД – одна миллионная! И это ещё без учёта потерь в пути! И это ещё на относительно прекрасном корме, которым является люцерна. На практике же животные и птицы в основном питаются зерном злаков - пшеницы, ячменя и кукурузы, питательность которого значительно уступает зелёной массе люцерны, из-за несбалансированности белка по аминокислотам. В значительной мере эта несбалансированность определяет белковый голод, всемирную нехватку белков. Источники энергии – жиры и углеводы можно заменить друг другом или даже белками. Но белки не заменишь ничем.

Вот почему так остро стоит проблема повышения питательных свойств белков злаков. Вот почему уже на протяжении около 50 лет в ведущих странах мира важнейшим объектом исследований молекулярных биологов является созревающее зерно злаковых, зернобобовых и масличных культур. Важным стимулом развития этих исследований было открытие в 1964 году биохимического действия мутации регуляторного гена *opaque-2*, определяющей существенное повышение питательных свойств зерна кукурузы [41]. Основным биохимическим проявлением этой мутации является нарушение превращения свободного лизина в созревающем эндосперме кукурузы в глутамин [8, 10, 24], т.е. синтез белка в зерне мутантной кукурузы происходит в условиях аминокислотного имбаланса. Бедные лизином запасные белки злаков не могут связать лизин, токсичный для клетки в высокой концентрации, и поэтому возрастает количество богатых лизином альбуминов и глобулинов. Однако в состав этих белковых фракций входят ферменты, ответственные за различные стороны метаболизма, поэтому увеличение их количества, а соответственно, и активности приводит к дисгармонии метаболизма созревающего зерна кукурузы, выражающейся в нарушении

дифференциации тканей эндосперма зерна и изменению физических свойств зерна [10]

В настоящей статье авторы попытались проанализировать многолетние мировые и собственные экспериментальные данные по исследованию молекулярных основ действия мутантного гена *opaque-2* по изменению белкового и аминокислотного составов зерна кукурузы и показать перспективы применения этих новых знаний на практике, в ходе создания высоколизиновой кукурузы.

Общие положения селекции на улучшение питательных качеств зерна злаков

На долю растительных белков приходится около 70% всего потребляемого количества. Остальные 30% приходятся на долю белков животного происхождения. Главным источником растительных белков являются злаки. Поэтому селекция на повышенное содержание белка в зерне злаков имеет огромное значение. Белки злаков по биологической ценности уступают белкам зернобобовых и тем более белкам животного происхождения. Белки пшеницы по питательной ценности составляют 50% питательной ценности белка куриного яйца [35], а зеин кукурузы составляет 40% питательной ценности молока [25].

В связи с этим актуальнейшей задачей селекционных технологий является не только повышение валовой урожайности сельскохозяйственных растений, но и увеличение выхода белка, особенно увеличение его биологической ценности. При этом необходимо учитывать, что это связано с целым рядом трудностей. Существует отрицательная корреляция между урожайностью зерна и его белковостью. У американских высокобелковых линий кукурузы урожайность оказалась сниженной на 30%. При скрещивании с другими линиями были получены высокобелковые, но недостаточно урожайные формы, которые промышленного распространения не получили. Это явление объясняется,

по-видимому, тем, что увеличение относительного содержания белка в зерне кукурузы почти всегда связано с подавлением синтеза каких-либо других компонентов. Известные в настоящее время пути повышения содержания белка в зерне кукурузы являются компромиссными, поскольку они достигаются ценой утраты других компонентов и снижения общего содержания белка. Мутантные формы озимой пшеницы Безостая 1 с высоким содержанием протеина – 18,3-23,2% (у исходного сорта – 15,4%) по продуктивности достигали лишь 30-60% урожая сорта Безостая 1.

Весьма важным моментом, как мы упомянули, является не только количество белка, но и его качественный состав, наличие незаменимых аминокислот и, в частности, лизина.

Как правило, колебания содержания лизина в зерне составляют от 1,77 до 4,55%. Изучение коллекций пшениц ВИРа показало, что в ней имеется более 100 сортов с содержанием этой незаменимой аминокислоты до 3,8%. Высокобелковые сорта пшеницы интенсивно накапливают запасные белки, особенно проламины, бедные лизином. Прирост белка в эндосперме пшеницы обуславливается на 55% повышенным содержанием глиадина, на 31% - глютелина и только на 14% - солерастворимых белков, богатых лизином. Внесение в почву азота способствует обогащению азотом зерна, но также за счёт проламиновой фракции. Повышение же содержания проламинов вызывает понижение сбалансированности белка по незаменимым аминокислотам и тем самым снижения его питательной ценности. Снижение содержания лизина в белке зерна с повышением белковости связано с тем, что проламины злаков накапливаются в зерне в последние фазы созревания наиболее энергично. Чем более благоприятными являются условия для накопления белка в зерне, тем больше накапливается проламинов и тем больше снижается содержание лизина в белке, хотя общее его содержание в зерне повышается. В неблагоприятных же условиях синтез белка прекращается раньше,

проламинов накапливается меньше и возрастает содержание лизина в белке зерна.

Казалось бы, что подавление синтеза проламинов может явиться одним из путей увеличения содержания лизина. Но этот путь имеет ряд серьёзных отрицательных моментов. Современный сорт должен сочетать ряд свойств и качеств, урожайность, достаточное количество белка, сбалансированность по аминокислотному составу с экологической пластичностью, болезнеустойчивостью, отзывчивостью на прогрессивные агротехнические приёмы и т.д.

Был изучен аминокислотный состав зерна ряда сортов пшеницы, линий и видов *Agropyron* (житняк) и несколько видов элимусов. Больших различий в содержании большинства аминокислот не обнаружено. Наиболее изменчивым оказалось лишь содержание глутаминовой кислоты (9,2-12,7%) и пролина (11,7-34,1%) [35], (табл. 1) [26]..

С точки зрения повышения лизина в зерне, безусловно, большой интерес представляет гибридизация пшеницы с близкими ей родами, например с рожью. Известно, что тритикале (пшеница x рожь) устойчиво превышает пшеницу (на 20%) по содержанию лизина. Но особенно интересны, по мнению академика Н.В. Цицина [35], в этом отношении костры, род *Vromus* – в его семенах содержание лизина значительно выше (в 1,5 раза), чем у пшеницы. Это объясняется тем, что проламины костров отличаются исключительно высоким содержанием лизина, в 2,5-3 раза превышающим его содержание в проламинах пшеницы и ржи.

Селекционеры стремятся подавить синтез проламинов в зерне злаков, содержание которых в пшенице и ячмене составляет в среднем около 35% от общего азота, и поднять таким образом содержание лизина в зерне. Но это повлечёт за собой снижение биологической устойчивости злаков и снижение технологических качеств зерна. Если же методом отдалённой гибридизации заменить проламины пшеницы на проламины

костра, то можно получить новый злак пшеничного типа с содержанием лизина в зерне до 4% .

В 1964 году впервые было сообщено об обнаружении зерна кукурузы, имеющего высокопитательный, сбалансированный по незаменимым аминокислотам белковый комплекс [41]. К этому времени представление об ограниченности пищевых и прочих ресурсов Земли на фоне быстрого роста населения планеты привлекло к себе пристальное внимание ученых различных стран и разных областей знаний. Медицинские исследования, проводимые в развивающихся странах, а также данные ФАО по пищевым ресурсам с особой остротой поставили вопрос о необходимости обогащения белка злаков незаменимыми аминокислотами, учитывая, что именно зерновые являются основным поставщиком белков, потребляемых человечеством.

Таблица 1 – Содержание незаменимых аминокислот в белках разной биологической ценности [26]

Аминокислоты	Яйцо	Мясо	Рыба	Соя	Подсолнечник	Пшеница	Кукуруза	Эталон ФАО/ВОЗ
Лизин	7,2	8,7	8,9	6,2	3,1	3,0	2,5	5,5
Метионин	3,3	2,9	3,0	1,6	2,0	1,5	2,0	1,8
Треонин	4,8	4,6	4,5	4,3	2,5	2,6	3,1	4,0
Триптофан	1,6	1,3	1,4	1,1	1,3	1,3	0,7	1,1
Изолейцин	4,6	4,5	5,5	4,6	3,3	3,3	3,1	4,0
Лейцин	7,5	8,3	8,0	7,9	5,6	6,6	13,1	7,0
Фенилаланин	5,5	4,2	4,5	4,3	3,4	3,4	4,9	3,5
Валин	7,3	4,8	5,8	5,4	4,2	4,4	3,9	5,0

ФАО – Международная организация по сельскому хозяйству и продовольствию при ООН; ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения.

При детальном анализе было установлено, что основной лимитирующей аминокислотой является лизин. Особенно беден лизином белок зерна кукурузы, так как зеины - основные запасные белки кукурузы - практически не содержат этой аминокислоты [5, 24, 25, 42-44, 51].

Мутант кукурузы *opaque-2* описан впервые Синглетоном и Джонсоном в начале 20-х годов прошлого столетия [49]. Эта мутация определяется изменением рецессивного гена, локализованного на 7-ой хромосоме генома кукурузы, и фенотипически проявляется только в триплоидном эндосперме, где детерминирует непрозрачность обычно прозрачного зрелого зерна.

До 1964 года попытки улучшить питательные качества зерна кукурузы осуществлялись путём увеличения уровня белка в результате применения азотных удобрений. Мутант *opaque-2* впервые показал возможность нарушения взаимосвязи: увеличение азотного питания – увеличение содержания проламинов – снижение питательной ценности эндосперма, которая до открытия биохимического действия мутанта считалась почти догмой.

Нельсон, работавший в 1963 году в Университете Пардью в США, предложил концепцию, согласно которой такое уменьшение прозрачности ткани эндосперма обусловлено изменением состава белков. Он отобрал несколько зерен кукурузы с непрозрачным эндоспермом и вместе с другими образцами зерна передал их в том же университете для аминокислотного анализа Мерцу. Оказалось, что мутант *opaque-2* имеет существенно улучшенный баланс аминокислот. У него увеличилось количество лизина на 69% (с 2,0 до 3,39 %) и других незаменимых аминокислот – треонина и валина. Позднее было найдено, что содержание триптофана (аминокислоты столь же важной, как и лизин в кукурузе) значительно возрастает в семенах такого типа (табл. 2, 3). Опыты подтвердили, что питательная ценность такого зерна существенно улучшилась. Животные и даже дети хорошо росли на этой новой высоколизиновой кукурузе [24, 25, 26, 41-44] (таблица 4). Исследования Мерца и соавторов своим новым и оригинальным подходом вызвали

определённый энтузиазм среди учёных и селекционеров, работающих в области улучшения качества белка.

Главные гены, определяющие высокий лизин наследуются просто, но отличаются очень сложным фенотипическим проявлением. Мерц определил эту ситуацию как *«высоколизиновый синдром»*, уподобив её наследственной болезни обмена веществ, выражающейся в дефиците проламина или в хронической гипераминокислотности [42-44].

Таблица 2. - Влияния мутации регуляторного гена *opaque-2* на биологические и биохимические показатели зерна кукурузы [29]

Показатели	o ₂ /o ₂	+/+
Плотность зерна, г/мл	1,08	1,17
Масса (г):		
100 зёрен	21,2	24,8
100 эндоспермов	16,2	20,4
100 зародышей	3,29	2,61
100 перикарпов	1,77	1,72
Соотношение частей в зерне, %		
Эндосперм	75,7	82,3
Зародыш	15,6	10,5
Перикарп	8,5	7,0
Содержание белка, % в абсолютно сухом веществе:		
Зерно	12,3	13,0
Эндосперм	10,4	12,5
Зародыш	26,4	22,1
Перикарп	7,3	6,6
Содержание лизина, г/100 г белка		
Зерно	3,94	2,51
Эндосперм	3,25	2,08
Зародыш	5,20	5,28
Перикарп	4,15	3,22

Таблица 3 - Сравнительное содержание воды, белка и белковых фракций в % абсолютно сухого вещества в ходе созревания эндосперма зерна кукурузы линии Висконсин 64А обычной (+/+) и мутантной по гену *opaque-2* (*o₂/o₂*) [29]

Дни после опыления	Генотип	Вода	Сырой белок	Белок	Альбумины+глобулины	Зеин	Глютелины	Сумма свободных аминокислот
20	+/+	66,4	16,1	13,5	5,6	1,3	4,8	0,93
	<i>o₂/o₂</i>	68,6	12,5	6,7	3,9	Следы	1,7	1,19
30	+/+	50,4	14,6	12,7	2,4	2,1	6,8	0,51
	<i>o₂/o₂</i>	56,9	12,3	8,4	2,3	0,3	4,6	1,55
40	+/+	35,0	13,4	12,9	1,0	3,7	7,5	0,24
	<i>o₂/o₂</i>	43,0	11,8	9,4	2,6	0,6	5,4	1,34
50	+/+	29,1	12,1	11,8	0,8	3,8	6,4	0,08
	<i>o₂/o₂</i>	32,0	11,2	9,3	1,2	0,8	6,5	0,78
60	+/+	26,8	13,9	13,6	0,6	5,0	7,2	0,08
	<i>o₂/o₂</i>	24,1	11,4	10,3	1,1	1,5	7,1	0,58

С 1966 года в Краснодарском НИИ сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко академик М.И. Хаджинов первым в СССР начал селекционную работу по повышению содержания лизина в зерне кукурузы. Для реализации селекционной программы была создана биохимическая лаборатория с вивариумом, позволяющим проводить биологическую оценку новых линий и гибридов кукурузы, сортов пшеницы и ячменя

Одновременно разрабатывались теоретические основы влияния имбаланса аминокислот на биохимические и молекулярно-биологические особенности метаболизма животных и концепция

создания высоколизиновой кукурузы на основе молекулярно-биологических исследований созревающего зерна кукурузы.

Таблица 4.- Рост, затраты корма и использование азота при кормлении свиней породы Ландрас зерном обычной и высоколизиновой кукурузой [25]

Показатели	Обычная кукуруза	Обычная + 0,2 % лизин и 0,05% триптофан	Ораque-2 кукуруза
В каждой группе по 5 голов Живой вес одной головы при постановке на опыт, кг	24,4	24,5	25,2
Живой вес при снятии с опыта, кг	28,5	32,5	34,3
Привес за период опыта, кг	4,1	8,0	9,1
Среднесуточный прирост, г	205	402	455
Среднесуточное поедание корма на 1 голову, кг	1,56	2,06	2,27
Расход корма на 1 кг прироста, кг	8,91	5,12	4,99
Отложение азота, г	11,4	16,6	24,2
Коэффициент переваримости азота, %	78,0	75,4	80,1
Коэффициент отложения азота % от переваренного	50,1	60,7	67,0

Значение мутации регуляторного гена *opaque-2* как объекта научных исследований

Начало XXI века ознаменовано прорывом в области познания и практического использования в медицине и сельском хозяйстве регуляции экспрессии генов в связи с открытием явления РНК-интерференции. Это открыло принципиально новые перспективы в решении проблемы улучшения питательных свойств зерна сельскохозяйственных растений, о которых будет рассказано ниже.

Однако многие практические задачи не имеют пока что своего решения из-за слабого знания молекулярных процессов, определяющих их формирование. Как и прежде объектами исследований в науке остаются три явления, исследования которых в сравнении с нормой дают основную массу новых знаний – это мутации, стрессы и болезни. В последнее время этот весьма неширокий набор стратегических направлений исследований пополнился ещё одним компонентом, и триада превратилась в тетраду – это трансгенные организмы, исследование особенностей метаболизма которых позволяет лучше понять регуляцию экспрессии генов.

В этом ряду объектов научного поиска мутация гена *opaque-2* занимает особое место, поскольку в отличие от большого количества мутаций, являющихся предметом фундаментальных исследований, мутация этого регуляторного гена, обладающего широким плеiotропным эффектом, имеет выраженное практическое приложение в решении крупнейшей сельскохозяйственной задачи – улучшения питательных свойств зерна. В 1964 году впервые было сообщено об обнаружении зерна кукурузы, имеющего высокопитательный, сбалансированный по незаменимым аминокислотам белковый комплекс [41]. Вскоре после открытия биохимического действия гена *opaque-2* на основе закона гомологических рядов в наследственной изменчивости Н.И. Вавилова

гомологичные высоколизинные мутанты были искусственно получены или найдены у ячменя (Ризо 1508) [52], озимой пшеницы [47] и сорго (HL) [5], которым в значительной степени свойственен комплекс признаков, определённый как «высоколизинный синдром». Очевидно, что относительное перераспределение белков эндосперма (уменьшение содержания спирторастворимого проламина при недостатке лизина в нём и увеличение количества богатых лизином водорастворимых и солерастворимых белков – альбуминов и глобулинов) как следствие нарушения превращения лизина в глутамин является основным общим признаком этих мутантов [10, 24].

Открытие биохимического действия гена *opaque-2* стимулировало в 1960-е-1970-е годы, с одной стороны, селекционные работы по созданию высоколизинной кукурузы с использованием доноров мутантного гена *opaque-2*, а с другой стороны, привлекло внимание биохимиков и молекулярных биологов к исследованию созревающего зерна кукурузы.

Однако, большим надеждам на создание высоколизинной кукурузы не суждено было сбыться из-за широкого плейотропного действия мутантного гена, приводящего не только к улучшению питательных свойств зерна, но и к значительному ухудшению его физических свойств: снижению плотности и прочности, повышенной поражаемости насекомыми и патогенами, снижению урожая [41-44].

Обычно 25 лет считаются мировым опытом «рентабельными» для исследования подобных природных феноменов. Если в этот срок не получены вполне определённые практические результаты, происходит резкий отток инвестиций от не оправдавшей себя тематики. К сожалению, так произошло и с попытками создания высоколизинной кукурузы на основе мутации гена *opaque-2*.

Тем не менее, широкомасштабные биохимические и молекулярно-биологические исследования мутации этого регуляторного гена обогатили

науку представлениями о конкретных молекулярных процессах регуляции экспрессии генов, как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровне [10]. В ходе этих работ методами генной инженерии были выделены и изучены большое количество генов запасных белков кукурузы - зеинов [39], а также ряда незеиновых белков [37, 49]. Сам регуляторный ген *opaque-2* был извлечён из генома кукурузы в элегантных экспериментах с применением транспозонного мечения [45, 48].

Первичная последовательность аминокислот, считанная с кДНК *opaque-2*, показала, что продукт этого гена – белок, имеющий лейциновую «застёжку-молнию» (bZIP), является транскрипционным регулятором всех генов проламинов (зеинов) зерна кукурузы, но особенно специфичен для генов зеинов 22 кДа и гена *opaque-6*, а также гена пируват ортофосфат дикиназы.

Продукт гена *opaque-6* является рибосоморазрушающим белком (RIP), обеспечивающим в норме устойчивость зерна кукурузы к поражению фитопатогенами при прорастании, специфически разрушая их рибосомы. Поскольку РНК-связывающие белки участвуют в регуляции развития на посттранскрипционном уровне, предполагается, что b32 может влиять на трансляционную машину клеток эндосперма кукурузы, например, усиливать синтез зеиновых белков [10].

Пируват ортофосфат дикиназа – основной регулятор гликолиза, имеющего отношение, как к углеводному, так и аминокислотному метаболизму (превращает пируват в фосфопируват). Таким образом, *opaque-2* повышает уровень свободных аминокислот, оказывая влияние на различные ферментативные стадии гликолиза, цикла трикарбоновых кислот, синтеза и деградации аминокислот [10].

Данные, полученные с помощью метода биологических микрочипов, позволяют предполагать, что продукт гена *opaque-2* является

транскрипционным активатором ещё не менее 30-ти генов [39]. Однако эти гены могут регулироваться и на посттранскрипционном уровне.

Исследования *in vitro* показали, что белок *opaque-2* связывается с промоторами генов α -зеинов 22 кДа по последовательности 5'-TCCACGTAGA-3', которая имеет большое сходство со специфическими мишенями других bZIP белков [49].

Вместе с тем, терминальная полиадениловая последовательность на 3'-некодирующей области определяет как стабильности мРНК, так и её трансляционную активность: чем длиннее поли-(А)-хвост, тем стабильнее мРНК и тем выше её трансляционная активность (энхансер трансляции). Ступенчатая температурная элюция полиаденилированной мРНК с колонки поли-(У)-сефарозы в ходе аффинной хроматографии показала, что в созревающем мутантном эндосперме соотношение - $(A)_n65^\circ / (A)_n35^\circ$ - фракций мРНК, элюируемых с колонки при температуре 65°C (длиннохвостовые молекулы) и при температуре 35°C (короткохвостовые молекулы) составляло у обычной и *opaque-2* кукурузы, соответственно, для белковых тел – 0,88 и 0,75, для микросом – 0,55 и 0,36, для свободных полисом 1,10 и 0,16, для информсом 0,63 и 0,37 [11]. Укороченная терминальная поли-(А)-последовательность, по-видимому, является причиной сравнительно низкой трансляционной активности свободных и мембраносвязанных полирибосом из созревающего зерна мутанта *opaque-2* в бесклеточной системе синтеза белка (*in vitro*) [15]. Вместе с тем стабильность как суммарной мРНК, так и мРНК зеинов в созревающем зерне мутанта *opaque-2* выше, чем в зерне обычной кукурузы, что, по-видимому, определяется отсутствием у мутанта короткоживущих фракций мРНК и сравнительно низкой скоростью деаденилирования мРНК [10].

Эти факты указывают на значительную роль посттранскрипционного уровня регуляции генов при формировании высоколизинового синдрома, наряду с транскрипционным уровнем.

Созревающее зерно этого мутанта использовалось как великолепная модельная система для доказательства тождества магний-зависимого распада мРНК *in vivo* и *in vitro* (система *ommp* – от латинского выражения «*omnia mea tecum porto*» - всё своё ношу с собой) [7, 10, 17-22], а также при разработке нанобиотехнологических методов исследования нуклеиновых кислот [1, 9, 10, 23]. Тем более, что «высоколизиновый синдром» оказался весьма схожим с «адаптационным синдромом», комплексом биохимических и физиологических изменений, возникающих в клетках растений в ответ на различные виды стресса [8, 10].

**О соотношении высоколизинового и адаптационного
синдромов
в клетках растений**

Чем более благоприятными являются условия для накопления белка в зерне, тем больше накапливается проламинов и тем больше снижается содержание лизина в зерне. В неблагоприятных же условиях синтез белка прекращается раньше, проламинов накапливается меньше и возрастает содержание лизина в зерне.

Анализ литературных данных, проведенный ещё в первой половине 80-ых годов прошлого столетия [8, 10], показал, что при экстремальных факторах среды, соответствующих закалывающей зоне стресса, в клетках растений развивается комплекс биохимических изменений (адаптационный синдром), аналогичный таковому в высоколизиновых мутантах (высоколизиновый синдром). Для обоих синдромов характерны следующие основные признаки: 1) повышенная активность РНК-аз; 2) повышенное содержание лизина; 3) повышенное содержание РНК на ранних этапах созревания семян; 4) перераспределение осборновских белковых фракций: снижение содержания запасных белков (проламинов) и увеличение содержания альбуминов, глобулинов и глютелинов; 5) перераспределение фракций в составе альбуминов и глобулинов,

выявляемое методами электрофореза или изоэлектрофокусировки, что соответствует изменению активности множества ферментов; 6) повышенное содержание свободных аминокислот, сахаров и зольных элементов; 7) нарушения в синтезе и накоплении крахмала; 8) снижение урожая.

В опытах разных авторов установлено, что в нормальных условиях интенсивность различных процессов значительно ниже максимально возможных. Это приводит к заключению, что, метаболические процессы в организме растения заторможены, что видимо, является следствием и обязательным условием саморегуляции. Всякая самонастраивающаяся система должна располагать не только средствами торможения, но и запасной мощностью с тем, чтобы на основании (+), (-) – вариантов находить среднее оптимальное для данной системы [10].

Вместе с тем, при неблагоприятных условиях среды: засуха, заморозки, засоление, механическое повреждение растений, а также поражение болезнетворными агентами - в тканях растений, как правило, увеличивается активность РНК-аз. Возрастание РНК-азной активности при этом происходит за счет целого ряда изменений, связанных с изменениями интенсивности синтеза фермента, внутриклеточного его перераспределения, изменением состояния и структуры цитоплазматической рибонуклеазы, концентрации специфических ингибиторов РНК-аз. Предполагается, что повышенная активность РНК-аз в органах растений, находящихся в экстремальных условиях, способствует ускорению ответных защитно-приспособительных реакций. Описанные выше возможности при этом используются полнее, что позволяет растениям сохранять скорость многих реакций на достаточно высоком уровне за счёт специфического комплекса биохимических изменений.

Как уже отмечалось выше, в экстремальных условиях наблюдаются множественные изменения в ферментативных системах. Следуя логике

приведенной выше схемы, это можно объяснить феноменом дерепрессии широкого круга мРНК, направленной на создание нового профиля синтеза ферментов, необходимого для метаболических перестроек в адапционном плане. Это одно из вероятных проявлений так называемого «функционального резервирования» – способности биологических молекул проявлять активность большую, чем это требуется для нормального развития клетки. Так известно, что при умеренном обезвоживании не только не снижается, но даже повышается активность ферментов, активирующих аминокислоты, что, по-видимому, необходимо для приспособления растений к усилению синтеза белка – индуцированию синтеза новых ферментов, необходимых в частности для интенсификации у растений при засухе пентозофосфатного пути дыхания при ослаблении гликолитического [10].

Механическое поранение растения приводит к увеличению нормы дыхания и синтезу *de novo* многих ферментов, что детерминировано образованием полирибосом с повышенной активностью трансляции. Аналогичное усиление трансляционной активности полирибосом растений в бесклеточной системе синтеза белка (*in vitro*) наблюдается и при повышенных температурах, поражении патогенами, а также при закалывающей температуре, умеренном засолении и обезвоживании [8, 10].

Следовательно, при значительном падении в условиях стресса функциональной активности ДНК полнее реализуется белоксинтезирующая активность РНК. Изменение изоферментного состава, повышение активности одних ферментов и понижение других, катализирующих превращения тех же субстратов, - все это необходимые условия включения различных шунтовых механизмов метаболизма при неблагоприятных для растений условиях среды, что, в конечном итоге, обеспечивает создание стабильности метаболизма.

Большое значение в реализации предполагаемого молекулярного механизма процесса адаптации имеет степень стрессирующих воздействий. Описанный выше комплекс биохимических изменений в растительной клетке наблюдается обычно при сравнительно невысокой напряженности экстремального фактора (физиологический стресс или закалывающая зона стресса). Возможно, с этим комплексом связано и явление гормезиса – увеличение продолжительности жизни организмов под влиянием мягких стрессов [10]. При более жестких экстремальных условиях (разрушающая зона стресса) изменения могут быть иными до противоположности. Вероятно, это происходит вследствие интенсивной деполимеризации не только короткоживущих, но и относительно долгоживущих мРНК.

Таким образом, анализ многочисленных литературных данных показывает, что «высоколизиновый синдром» в клетках растений биохимически весьма схож с «адаптационным синдромом» – неспецифической реакцией растительных клеток на различные виды стресса. Главные черты обоих синдромов: 1) снижение синтеза запасных белков (зеинов); 2) увеличение синтеза ряда других (незеиновых) белков. В наших исследованиях эти два положения подтвердились тем, что отношение количества мРНК зеинов к сумме мРНК незеиновых белков для зерна обычной кукурузы было равно 15, а в стрессовых условиях для зерна ораце-2 и обычной кукурузы это соотношение снижалось до 6. При этом исследовали количество семи мРНК: зеина 19 кДа и шести незеиновых белков - актина, β -кеторедуктазы, эноилредуктазы, белка ораце-2, белка гена *waxu* и субъединицы α фактора элонгации трансляции 1 (рис. 1) [20].

Изучение изменения стабильности этой группы мРНК в оптимальных условиях 1995 года и засушливых условиях 1996 года (опыты закладывались в полевых условиях) показало, что стрессовые условия среды вызывают существенную дестабилизацию мРНК зеинов, но

стабилизировали мРНК *opaque-2* белка и мРНК субъединицы α фактора элонгации трансляции 1. Первая мРНК определяет синтез запасного белка, не принимающего активного участия в метаболизме созревающего зерна; вторые две – определяют синтез регуляторных белков. Вместе с тем, если рассматривать относительную стабильность мРНК остальных четырех белков, то следует отметить, что они представляли собой блок, который сохранялся в любых условиях: эноил - редуктаза>актин>waxy> β -кеторедуктаза. Стрессовые воздействия приводили к относительно пропорциональному увеличению стабильности этих мРНК, но сохранялось место каждой мРНК в ряду стабильности этих мРНК. Оба регуляторных белка (eEF1 α и O_2 -белок) являются полифункциональными [20].

W64 A +/+ 1995 г.	эн. ред.	> актин	> Z ₁₉	> O ₂	> W _x	> β кето-ред.	> eEF - 1a
	116	108	102	75	73	54	27
1996 г.	eEF - 1a	> O ₂	> эн. ред.	≥ актин	> W _x	> β кето-ред.	> Z ₁₉
	164	130	121	117	90	82	70
W64 A o ₂ /o ₂ 1995 г.	эн. ред.	> O ₂	> Z ₁₉	> W _x	> актин	> β кето-ред.	> eEF - 1a
	173	132	122	109	91	65	20
1996 г.	eEF - 1a	> β кето-ред.	> актин	> O ₂	> эн. ред.	> W _x	> Z ₁₉
	241	132	125	115	103	100	60

Рис. 1. Влияние засухи 1996 года на относительную стабильность индивидуальных мРНК созревающего зерна кукурузы (20-й день после опыления, условные единицы стабильности).

Сокращения: эн. ред. - эноил редуктаза; Z₁₉ - зеин 19 кДа; O₂ - белок *opaque-2*; W_x - белок Waxy (синтетаза амилозы); β -кеторед. - ; β -кеторедуктаза; eEF-1 α - субъединица α фактора элонгации трансляции 1.

Характерной особенностью современной биологии является доминирование идеологии и методологии молекулярной биологии и биоорганической химии в познании явления жизни и создания на этой основе новых методических разработок. Успехи этих научных дисциплин в последние годы обуславливают развитие совершенно нового

направления – интегральной молекулярной биологии, методы которой позволяют проводить анализ и синтез большого объема молекулярно-генетической и молекулярно-физиологической информации. Методы интегральной молекулярной биологии (биологические микрочипы) позволяют эффективно проводить одновременный структурный анализ несколько тысяч генов (геномика) или одновременный анализ экспрессии этих генов по количественному определению содержания в клетках индивидуальных мРНК (функциональная геномика). Эти методы уже в настоящее время позволяют проводить анализ целого генома или экспрессии генома такого растения, как арабидопсис, имеющего пять пар хромосом.

Общее число генов, экспрессирующихся во всех клетках кукурузы, составляет около 80 000, из них примерно 15 000 экспрессируются в созревающем эндосперме. Сравнительный анализ количества индивидуальных мРНК, специфичных для 1400 различных генов генома созревающего эндосперма кукурузы (18-е сутки после опыления), показал, что изменения белкового и аминокислотного состава зерна кукурузы под влиянием мутации гена *opaque-2*, сопряжен с большими изменениями в профиле экспрессии генов. Было показано наличие около 30 генов, регуляция которых, возможно, осуществляется непосредственно геном *opaque-2*. Кроме того, обнаружена большая кумулятивная редукция генной экспрессии, определяемая в первую очередь снижением экспрессии генов зеинов. Однако экспрессия ,более 130 генов была значительно выше в мутантном эндосперме. Функции большинства из этих генов связаны со стрессоустойчивостью (молекулярные шапероны, белки клеточной стенки), клеточными превращениями (деление, растяжение) и ответом на атаку патогенов или поранением [39]. Таким образом, изменения в профиле экспрессии генов вполне соответствует признакам

физиологического стресса и описанным выше изменениям в синтезе зеиновых и незеиновых белков.

По сути, характерной особенностью метаболизма созревающего зерна мутанта кукурузы по регуляторному гену *opaque-2* является генетически закреплённая биохимическая картина состояния физиологического стресса.

Вместе с тем этот вывод свидетельствует в пользу предположения о существенном вкладе посттранскрипционного уровня регуляции экспрессии генов в условиях повышенного уровня активности РНКаз в клетках эукариот.

РНК-интерференция – альтернативный путь создания высоколизиновой кукурузы

Заветной мечтой и одной из главных целей жизни и творчества академика М.И. Хаджинова было повышение питательных качеств зерна кукурузы [32-34]. Мутация регуляторного гена *opaque-2*, биохимическое действие которой было открыто в 1964 году, являлась основной надеждой на повышение содержания в зерне кукурузы незаменимых аминокислот лизина и триптофана. Однако масштабные селекционные работы столкнулись с проблемой плейотропного эффекта мутации этого гена. Повышение питательных свойств зерна кукурузы, мутантной по гену *opaque-2*, к сожалению, были сопряжены с понижением урожайности и ухудшением физических свойств зерна.

В 70-е годы и в начале 80-ых годов XX века в лаборатории оценки качества протеина КНИИСХ им. Лукьяненко (зав. лаб. В.Г. Рядчиков) проводились широчайшие работы по массовой оценке зерна кукурузы на содержание лизина [24-34]. Одновременно разрабатывались теоретические основы концепции создания высоколизиновой кукурузы. Экспериментальные исследования по изучению причин перераспределения белковых фракций в зерне мутанта по гену *opaque-2* привели к выводу, что

причиной плеiotропного эффекта является повышенная активность РНКаз в созревающем зерне мутантной кукурузы (в 2-11 раз в зависимости от линии [11, 53-55]), как следствие этого перераспределение стабильности мРНК, приводящие к усилению синтеза одних белков, но к резкому снижению синтеза других белков [8, 10, 13]. Вместе с тем, своё веское слово сказал рынок: к концу 80-ых годов в мире практически прекратились инвестиции в селекционные работы на основе мутации гена *opaque-2*, как в направлении, не оправдавшее надежд.

Однако понимание того, что причиной "высоколизинового синдрома" является дифференциальный распад мРНК, привело и к предложению альтернативного пути повышения питательных свойств зерна кукурузы. По нашему представлению уничтожение короткоживущих мРНК повышенной активностью РНКаз в зерне мутантной кукурузы усиливает с одной стороны репрессию синтеза запасных белков - зеинов, что является одной из составляющих повышения содержания лизина в зерне, но с другой стороны - нарушает синтез крахмала, основного запасного вещества, определяющего физические свойства зерна и урожайность [8, 10]. Представлялось целесообразным попытаться уничтожить часть мРНК зеинов в созревающем зерне обычной кукурузы, что теоретически должно было привести к повышению содержания лизина в зерне, без нарушения синтеза крахмала.

Перспективы в этом направлении появились в то 80-е и 90-е годы XX века в связи с открытием возможности регуляции генной экспрессии посредством антисмысловых РНК (асРНК) - комплементарных смысловым мРНК. Последние, образуя гибрид с асРНК, теряют способность связываться с рибосомой и участвовать в акте трансляции, образуя дуплекс РНК:РНК, который подвергается быстрому расщеплению рибонуклеазой H (h). Таким образом, появилась возможность дестабилизации конкретной ген-специфической мРНК [10].

Поскольку первичная структура (сиквенс) большинства генов зеинов и самого регуляторного гена *opaque-2* в то время была уже известна [40, 45, 48], открывалась перспектива активного вмешательства в синтез зеинов посредством специфических антисмысловых РНК. Этот путь открывал перспективы создания высоколизиновой кукурузы методами генной инженерии за счёт снижения синтеза зеиновых белков без отрицательных последствий, в первую очередь без нарушения синтеза крахмала. Исследованиями американских и итальянских учёных уже было показано, что продукт гена *opaque-2* (белок *opaque-2*) является транскрипционным активатором экспрессии генов зеинов. Этот ген активен в зерне обычной кукурузы и не активен в зерне мутанта, что сопровождается резким снижением синтеза зеинов в зерне последнего [45, 48].

Синтез зеинов снижается и как следствие не стабильности части мРНК зеинов, что было показано выше, а также потому что в зерне мутанта нарушен синтез фермента лизинкеторедуктаза-сахаропиндегидрогеназа (LKR-SDH), превращающего лизин в глутамин. Снижение концентрации глутамина, которым богат аминокислотный состав зеинов, также является причиной нарушения синтеза зеинов. Т.е. синтез зеинов снижен в зерне мутанта *opaque-2*, как минимум, по трём причинам [10].

Летом 1991 года для оценки принципиальной возможности регуляции синтеза зеинов при помощи асРНК мы использовали в экспериментах антисмысловые олигонуклеотиды к мРНК гена *opaque-2*, поскольку транскриптов этого гена очень мало в клетке (2-3 молекулы на клетку) и можно проще добиться ингибирования синтеза зеинов. Этот вариант опыта являлся развитием наших представлений о выборочном уничтожении мРНК зеинов соавтором этой работы доктором химических наук Ефимовым В.А. (1946-2010) из института биоорганической химии АН СССР (г. Москва), докторская диссертация которого была посвящена

полномасштабному синтезу гена зеина 22 кДа, обогащённого кодонами лизина [2, 3].

Для достижения поставленной цели в лаборатории биоинженерии генов института биоорганической химии АН СССР были синтезированы 30-ти звенные олигодезоксинуклеотиды, являющиеся антисмысловыми к мРНК гена *opaque-2*. Помимо обычных олигодезоксинуклеотидов В.А. Ефимовым были синтезированы олигонуклеотиды с модифицированным рибозофосфатным составом (метилование). Такие олигодезоксинуклеотиды устойчивы к действию ферментов, разрушающих нуклеиновые кислоты и легче проникают в клетки по сравнению с обычными олигодезоксинуклеотидами. Последовательность нуклеотидов в олигодезоксинуклеотиде была следующая:

O₂AC-5'-TGAGATGACGTGCTCCATGCCCAATAATAAG-3'.

В лаборатории молекулярной биологии КНИИСХ была проведена работа по испытанию биологической системы для инъекции ас-олигодезоксинуклеотида в кукурузу и необходимых условий для этого (концентрация и тип олигодезоксинуклеотида) (таблица 5). Во всех вариантах опыта зерно снимали со стержня початка и фиксировали жидким азотом. Из зерна выделяли РНК фенольно-детергентным методом и определяли относительное содержание мРНК зеинов семейства 19 и 22 кДа методом дот-гибридизации с соответствующими радиоактивно мечеными зондами. Инъекция не модифицированного ас-олигодезоксинуклеотида в початок не приводила к изменению содержания мРНК зеинов в зерне. По-видимому, немодифицированные олигодезоксинуклеотиды эффективно разрушались нуклеазами и не доходили до зерна. Однако модифицированные определяли снижение мРНК зеинов. Инъекция непосредственно в зерно даже не модифицированных олигонуклеотидов также приводила к снижению содержания мРНК зеинов (табл. 5).

Таблица 5 - Влияние антисмысловых олигонуклеотидов к мРНК гена *opaque-2* на содержание мРНК зеинов в созревающем зерне (20 день после опыления) линии Висконсин 64А+/+, % от контроля [10]

Метод введения и тип олигонуклеотида	Содержание суммы мРНК зеинов 19 и 22 кДа
Инъекция в початок (в ножку два раза в сутки, в течение 10 дней, с 11 по 20 дни после опыления, в концентрации ориентировочно в 100 и в 1000 раз превышающие природную или в 20000 раз, но при экспозиции не более 18 часов)	
а) немодифицированный	100
б) модифицированный	65
Инъекция в зерно (концентрированный раствор, экспозиция не более 9 часов) немодифицированный	65

Таким образом, эффект снижения концентрации мРНК зеинов в зерне кукурузы достигался, но при этом снижение содержания мРНК зеинов 19 кДа и 22 кДа происходило в равной мере, примерно на 30-35%, что являлось фактом настораживающим, так как теоретически можно было ожидать преимущественное снижение количества мРНК зеинов 22 кДа. По этому поводу тогда, в отчёте за 1991 год, мы написали "Следовательно, предстоит ещё выяснить специфичность действия олигодезоксинуклеотидов, так как могут происходить нежелательные побочные явления, например, расщепление нецелевых нуклеиновых кислот...". Наши эксперименты в этом направлении были остановлены начавшимися в России политическими и экономическими реформами, а через 5-7 лет в подобных же опытах американские исследователи Эндрю

Файр и Крейг Меллоу открыли явление РНК-интерференции, которое, в свою очередь, открыло новую эру в молекулярной биологии [10].

В настоящее время многие проблемы практики решаются путём активного вмешательства в метаболизм живых организмов при помощи методов генной инженерии на основе явления РНК-интерференции, регулирующего экспрессию генов через усиление распада мРНК определённых генов [10]. Через несколько лет идея снижения концентрации мРНК зеинов была реализована американскими исследователями на принципиально новом методическом уровне с использованием генно-инженерных конструкций на основе РНК-интерференции [38].

Вместе с тем, исходно было понятно, что уничтожение мРНК зеинов не является лучшим решением в этом направлении, поскольку генов зеинов и их мРНК много в созревающем зерне. На наш взгляд оптимальным было бы решение этой проблемы через уничтожение мРНК LKR-SDH, количество которой несравненно меньше. Когда мы практически закончили работы по доказательству того, что центральным звеном формирования высоколизинового синдрома в зерне мутанта *opaque-2* является низкая стабильность мРНК LKR-SDH [10], появилось сообщение о том, что учёные фирмы "Monsanto" приступили к реализации идеи снижения стабильности мРНК этого фермента в зерне обычной кукурузы на основе явления РНК-интерференции [36, 50].

Молекулярный механизм РНК-интерференции состоит в том, что длинные молекулы дцРНК, образующиеся в результате транскрипции с обеих нитей ДНК, а также в результате синтеза на матрице однонитевой РНК с помощью РНК-зависимой РНК-полимеразы, нарезаются (процессируются) в клетке нуклеазами семейства РНКазы III Dicer (дайсер) на короткие двухнитевые РНК длиной 20-25 нуклеотидов (siРНК), которые

в комплексе со специфическими белками осуществляют разрезание молекул мРНК-мишени в участках, полностью комплементарным коротким РНК.

Оказалось, что эти некодирующие РНК (нкРНК) выполняют множество функций с использованием не известных ранее механизмов: нкРНК участвуют в регуляции транскрипции генов, сплайсинге и регуляции деградации РНК. Они вовлечены в трансляцию и её регуляцию, в процессинг и модификацию рибосомной РНК, в защиту от вирусных инфекций и мутагенной активности мобильных генетических элементов, а также в ряд других процессов. РНК явно потеснили белки на пьедестале главных молекул, обеспечивающих жизнедеятельность клеток [10].

Генная инженерия - это мощный способ изменить жизнь, но её потенциал может представлять опасность, причём в первую очередь надо учитывать сложные и трудно предсказуемые эффекты, связанные с возможным воздействием на окружающую среду. Поэтому большое значение в практическом плане придаётся в настоящее время получению нокаутных клеток, тканей и организмов при помощи РНК-интерференции. В частности, предлагается при помощи генно-инженерной конструкции, уничтожающей мРНК решить проблему получения высоколизиновой кукурузы [36, 50]. В отличие от мутации регуляторного гена *opaque-2* в зерне такой кукурузы не будет нарушен синтез крахмала, а, следовательно, физические свойства зерна сохранятся на уровне обычной кукурузы. Таким образом, явление РНК-интерференции предоставляет возможность решать проблемы питательных и технологических качеств зерна злаков, как и многих проблем, касающихся животных организмов.

Важно отметить, что подобное генно-инженерное вмешательство в метаболизм эукариот отличается от традиционного, когда переносится чужеродный ген и продуцируется в клетке чужеродный белок, гораздо меньшим риском экологических проблем.

Заключение

Познание механизмов регуляции генной экспрессии у растений является одной из центральных проблем современной молекулярной биологии. От состояния изученности этой проблемы зависят успехи использования достижений молекулярной биологии (различного рода молекулярные маркеры, трансгенные растения) в решении важнейших задач растениеводства. Однако результаты исследований здесь очень скромные. Причина тому - сложность систем регуляции у эукариот и недостаток модельных объектов, изучение которых позволило бы эффективно разобраться в принципах саморегуляции растительного организма. Удачность выбора объекта (или случай) определяет скорость и эффективность исследований, обширность и глубину полученной информации [30].

50 лет исследований регуляторного гена *opaque-2* убедительно показали, что сравнительное изучение созревающего зерна кукурузы является великолепным источником новых знаний о функционировании молекулярно-генетических систем управления метаболизмом растительной клетки. Вывод об аналогии молекулярных механизмов неспецифической адаптации растений к неблагоприятным условиям среды и действия мутантных генов типа *opaque-2* имеет принципиальное значение. Из него вытекает правомерность использования всей совокупности экспериментальных данных, полученных как при изучении устойчивости растений к умеренным воздействиям стрессирующих факторов внешней среды, так и при исследовании высоколизиновых мутантов злаков для развития представлений о конкретных принципах регуляции экспрессии генов растений на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях.

Результаты широкомасштабных исследований молекулярного механизма действия мутации регуляторного гена *opaque-2* показывают, что возможности, которые предоставляет современная молекулярно-

биологическая методология (биологические микрочипы, функциональная геномика), позволяют реально ставить вопрос об экспериментальной проверке общих положений по вопросам регуляции функционирования генетического аппарата эукариот, что, несомненно, очень важно, поскольку представляются пророческими слова: "Медицина и сельское хозяйство должны получить доступ к регуляторным механизмам клетки, так как в этом заключены необозримые возможности для практики" [4]. При этом, в частности, появляются принципиально новые возможности для создания высоколизиновой кукурузы.

Литература

1. 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.
2. Ефимов В.А., Бурякова А.А., Пашкова И.Н., Чахмахчева О.Г. Синтез и клонирование искусственных генов зеинов // Биоорганическая химия, 1988, Т. 14, № 11, С. 1538-1547.
3. Ефимов Владимир Алексеевич Искусственные гены: проблемы химического синтеза. Автореф. дис. на соиск. степени докт. хим. наук. Ин-тут биоорганической химии им. М.М. Шемякина, Москва. 1989. 52 с.
4. Курсанов А.Л. Учёный и аудитория. - М.: Наука, 1982, 273 с.
5. Мунк Л. Селекционное улучшение питательной ценности белка злаков // В кн.: Вавиловское наследие в современной биологии - М.: Наука, 1989, С. 230-246.
6. Несмеянов А.Н., Беликов В.М. Пища будущего - М.: Педагогика, 1979, 164 с.
7. Плотников В.К. Генетико-физиологическая детерминация распада мРНК злаков *in vitro* // Успехи современной биологии, 2003, Т. 123, № 1, С. 98-109.
8. Плотников В.К. К 40-летию открытия биохимического действия мутации гена *opaque-2* в зерне высоколизиновой кукурузы // Сборник статей по материалам конференции «Аминокислотное питание животных и проблема белковых ресурсов». (23 марта, 2004, Краснодар), Краснодар, 2005, С. 257–312.
9. Плотников В.К. Нанобиотехнологические методы исследования нуклеиновых кислот и перспективы их практического применения // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии, 2009, Вып. 3, С. 270 – 276.
10. Плотников В.К. Биология РНК зерновых культур, Краснодар, Издательство «Эдви», 2009, 375 с.
11. Плотников В.К., Рядчиков В.Г., Букреева Г.И., Лебедев А.В. Некоторые особенности популяции мРНК созревающего эндосперма кукурузы *opaque-2* // Физиология растений, 1983, Т.30, вып.1, С. 63-72.
12. Плотников В.К., Филичкин С.А., Рядчиков В.Г., Неудачин В.П., Долгих Ю.Р. Распределение поли-А-содержащей РНК мембраносвязанных полирибосом в субклеточных препаратах созревающего эндосперма кукурузы // Сельскохозяйственная биология, 1983, Т.16, С. 120-125.

13 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 опак-2 // Физиология и биохимия культурных растений, 1984, Т.16, С. 59-66.

14 Плотников В.К., Киль В.И. Динамика синтеза зеина и зеина-2 в созревающем зерне обычной и опак-2 кукурузы под влиянием актиномицина и канаваина // Доклады ВАСХНИЛ, 1989, вып. 10, С. 8-10.

15 Плотников В.К., Киль В.И., Бибишев В.А., Новиков Б.Н. Влияние теплового шока на белоксинтезирующий аппарат зерна обычной и опак-2 кукурузы // Физиология растений, 1990, т.37, вып. 2, С. 302-307.

16. 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.

17. 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.

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

19. 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.

20. 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.

21. Плотников В.К., Бакалдина Н.Б., Новиков Б.Н., Алексеенко Ж.В. Роль стабильности мРНК в формировании качества зерна кукурузы // Сб. науч. тр. РАСХН «Проблемы повышения качества зерна пшеницы и других зерновых культур», Москва, 1998, С. 237-248.

22. Плотников В.К., Бакалдина Н.Б., Сметанин Д.В., Неудачин В.П., Букреева Г.И. Дифференциальная стабильность мРНК как фактор регуляции экспрессии генов в созревающем зерне кукурузы и формирования высоколизинового и адаптационного синдромов // Сб. науч. тр. КНИИСХ им. П.П. Лукьяненко «Генетика, селекция и технология возделывания кукурузы». Краснодар, 1999, С. 191-196.

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

24. Рядчиков В.Г. Улучшение зерновых белков и их оценка.- М.: Колос, 1978, 368 с.

25. Рядчиков Виктор Георгиевич «Обмен веществ у моногастричных животных при балансе и имбалансе аминокислот и пути повышения биологической ценности белка зерна злаковых культур» Автореф. дис. на соиск. степени доктора биол. наук, Московская ветеринарная академия, Москва, 1981, 51 с.

26. Рядчиков В.Г. Основы питания и кормления сельскохозяйственных животных – Краснодар: КГАУ, 2013, 616 с.

27. Рядчиков В.Г., Добровольская С.В., Филипас Т.Б., Марченко Ю.П. Биологическая ценность зерна высокобелковой опейк-2 кукурузы // В кн.: Селекция высоколизинового кукурузы, сб. науч. тр. КНИИСХ, 1976, вып. 11., С. 153-168.

28. Рядчиков В.Г., Неудачин В.П., Филипас Т.Б., Лебедев А.В. Фракционный состав белков эндосперма кукурузы и аминокислотный состав изолированных фракций // Прикладная биохимия и микробиология, 1979, Т. 15, № 6, С. 926-928.

29. Рядчиков В.Г., Лебедев А.В., Филипас Т.Б., Неудачин В.П., Ермакова П.К., Плотников В.К., Букреева Г.И., Зима К.И., Цариченко А.П. // Белки и структура зерна кукурузы opak-2 // Сб. науч. тр. КНИИСХ им. П.П. Лукьяненко «Генетика и селекция кукурузы», 1979, Краснодар, С. 236 – 258.

30. Рядчиков В.Г., Плотников В.К. Экспрессия генов животных при аминокислотном имбалансе. Часть II. // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета, 2013, Т. 88, № 4, С. 48-88.

31. Сметанин Д.В., Онуфриенко В.В., Плотников В.К., Бакалдина Н.Б., Рядчиков В.Г. Модуляция стабильности мРНК зеинов в процессе развития зерна кукурузы // Физиология растений, 2000, т. 47, № 4, С. 555-561.

32. Хаджинов М.И., Рядчиков В.Г., Зима К.И., Лебедев А.В. Вопросы селекции высоколизиновой кукурузы // В кн.: Растительные белки и их биосинтез - М.: Наука, 1975, С. 20-30.

33. Хаджинов М.И., Зима К.И., Рядчиков В.Г., Нормов А.А. Результаты и перспективы селекции на улучшение количества и качества белка в зерне кукурузы // В кн.: Проблемы белка в сельском хозяйстве, М.: Колос, 1975, С. 189-197.

34. Хаджинов М.И., Зима К.И., Нормов А.А., Пакудин В.З. Комбинационная способность высокобелковых опейк-2 линий кукурузы по содержанию протеина в диаллельных скрещиваниях // В кн.: Селекция высоколизиновой кукурузы, сб. науч. тр., Краснодар, 1976, вып. 11., с. 16-27.

35. Цицин Н.В. Теория и практика отдалённой гибридизации – М.: Наука, 1981, 158 с.

36. Frizzi A., Huang S., Gilbertson L.A., Armstrong T.A., Luethy M.H., Malvar T.M. Modifying lysine biosynthesis and catabolism in corn with a single bifunctional expression/silencing transgene cassette // Plant Biotechnol. J., 2008, V.6, P. 13-21.

37. Jia M., Wu H., Jung R., Larkins B.A., Gibbon B.C. Identification and characterization of lysine-rich proteins and starch biosynthesis genes in the opaque-2 mutant by transcriptional and proteomic analysis // BMC Plant Biol., 2013, V. 13, P. 115-127.

38. Huang S. A., Florida C.A., Kruger DE, Luethy M.H. High lysine and higher tryptophan transgenic maize resulting from the reduction of both 19- and 22-kD α -zeins // Plant Mol Biol, 2006, V.61, P. 525-535.

39. Hunter B.G., Beatty M.K., Singletary G.W., Hamaker B.R., Dilkes B.P., Larkins B.A., Jung R. Maize opaque endosperm mutations create extensive changes in patterns of gene expression // The Plant Cell, 2002. V. 14, P. 2591-2612.

40. Marks M.D., Lindell J.S., Larkins B.A. Nucleotide Sequence Analysis of Zein mRNA from maize endosperm // J. Biol. Chem., 1985, V. 260. № 30, P. 16451-16459.

41. Mertz E.T., Bates L.S., Nelson O.E. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm // Science, 1964, V. 145, № 3629, P. 279-280.

42. Mertz E.T. Case histories of existing models // In: Genetic Improvement of Seed Proteins, National Academy of Sciences, Washington DC, 1976, P. 57-70.

43. Mertz E.T. Genetic and biochemical control of grain protein synthesis in normal and high lysine cereals // Wld. Rev. Nutr. Diet., 1986, V.48, P. 222-262.

44. Mertz E.T. (ed.) Quality Protein Maize, 1992. American Association of Cereals Chemists. - St. Paul.: MN. P. 1-8.

45. Motto M., Maddoloni M., Ponziani G., Brembilla M., Marotta R., Di Fonza N., Soave C., Thompson R., Salamini F. Molecular cloning of the o2-m5 allele of *Zea mays* using transposon marking // *Mol.Gen.Genet.*, 1988, V. 232, P. 488-494.
46. Plotnikov V.K., Bakaldina N.B. Differential stability of zein mRNA in developing corn kernel // *Plant Molecular Biology*, 1996, V. 31, P. 507-515.
47. Puchkov Y.M., Alfimov V.A., Zhogin A. Ph. Estimation of high-lysine common winter wheat mutants with reduced endosperm // *Proc. 6th International Wheat Genetics Symposium, Kyoto, Japan, 1983*, P. 399-406.
48. Shmidt R.J., Burr F.A., Burr B. Transposon tagging and molecular analysis of the maize regulatory locus opaque-2 // *Science*, 1987, V. 238, P. 960-963.
49. Shmidt R.J. Opaque-2 and Zein Gene Expression // In: *Control of Plant Gene Expression*, Verma, D.P.S., Ed., Boca Raton: CRC, 1993, P. 337-355.
50. Segal G., Song R., Messing J. A New Opaque Variant of Maize by a Single Dominant RNA-Interference-Inducing Transgene // *Genetics*, 2003, V. 165, P. 387-397.
51. Ryadchikov V.G. Protein quality and nutritional value of high-lysine maize // In: *High-Quality Protein Maize*, Dowden, Hutchinson a. Ross, Inc., 1975, P. 475-482.
52. Tallberg A. Characterization of high-lysine barley genotypes // *Hereditas*, 1982, V. 96, № 2, P. 229-245.
53. Wilson C.M., Alexander D.E. Ribonuclease Activity in Normal and Opaque-2 Mutant Endosperm of Maize // *Science*, 1967, V. 155, № 3769, P. 1575-1576.
54. Wilson C.M. Plant nucleases // *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 1975, V. 26, P. 187-208.
55. Wilson C.M. Plant nucleases. VI. Genetic and developmental variability in ribonuclease activity in inbred and hybrid corn endosperms // *Plant Physiol.*, 1980, V. 66, № 1, P. 119-125.

References

1. Bogatyryov V.A., Dykman L.A., Krasnov Ja.M., Plotnikov V.K., Hlebcov N.G. Metod differencial'noj spektroskopii rassejannogo sveta dlja issledovanija biospecificheskikh reakcij v sistemah konjugatov zolotykh nanochastic s belkami ili oligonukleotidami // *Kolloidnyj zhurnal*, 2002, T. 64, № 6, S. 745-755.
2. Efimov V.A., Burjakova A.A., Pashkova I.N., Chahmahcheva O.G. Sintez i klonirovanie iskusstvennyh genov zeinov // *Bioorganicheskaja himija*, 1988, T. 14, № 11, S. 1538-1547.
3. Efimov Vladimir Alekseevich *Iskusstvennye geny: problemy himicheskogo sinteza*. Avtoref. dis. na soisk. stepeni dokt. him. nauk. In-tut bioorganicheskoy himii im. M.M. Shemjakina, Moskva. 1989. 52 c.
4. Kursanov A.L. *Uchjonyj i auditorija*. - M.: Nauka, 1982, 273 s.
5. Munk L. Selekcionnoe uluchshenie pitatel'noj cennosti belka zlakov // V kn.: *Vavilovskoe nasledie v sovremennoj biologii* - M.: Nauka, 1989, S. 230-246.
6. Nesmejanov A.N., Belikov V.M. *Pishha budushhego* - M.: Pedagogika, 1979, 164 s.
7. Plotnikov V.K. Genetiko-fiziologicheskaja determinacija raspada mRNK zlakov in vitro // *Uspehi sovremennoj biologii*, 2003, T. 123, № 1, C. 98-109.
8. Plotnikov V.K. K 40-letiju otkrytija biohimicheskogo dejstvija mutacii gena opaque-2 v zerne vysokolizinovoj kukuruzy // *Sbornik statej po materialam konferencii «Aminokislотноe pitanie zhivotnyh i problema belkovyh resursov»*. (23 marta, 2004, Krasnodar), Krasnodar, 2005, S. 257-312.

9 Plotnikov V.K. Nanobiotehnologicheskie metody issledovanija nukleinovyh kislot i perspektivy ih prakticheskogo primenenija // Izvestija Timirjazevskoj el'skohozjajstvennoj akademii, 2009, Vyp. 3, S. 270 – 276.

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

11. Plotnikov V.K., Rjadchikov V.G., Bukreeva G.I., Lebedev A.V. Nekotorye osobennosti populjacji mRNK sozrevajushhego jendosperma kukuruzy opak-2 // Fiziologija rastenij, 1983, T.30, vyp.1, S. 63-72.

12. Plotnikov V.K., Filichkin S.A., Rjadchikov V.G., Neudachin V.P., Dolgih Ju.R. Raspredelenie poli-A-soderzhashhej RNK membranosvjazannyh poliribosom v subkletocnyh preparatah sozrevajushhego jendosperma kukuruzy // Sel'skohozjajstvennaja biologija, 1983, T.16, S. 120-125.

13 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.

14 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.

15 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.

16. 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.

17. 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.

18. 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.

19. 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.

20. 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.

21. Plotnikov V.K., Bakaldina N.B., Novikov B.N., Alekseenko Zh.V. Rol' stabil'nosti mRNK v formirovanii kachestva zerna kukuruzy // Sb. nauch. tr. RASHN “Problemy povyshenija kachestva zerna pshenicy i drugih zernovyh kul'tur”, Moskva, 1998, S. 237-248.

22. Plotnikov V.K., Bakaldina N.B., Smetanin D.V., Neudachin V.P., Bukreeva G.I. Differencial'naja stabil'nost' mRNK kak faktor reguljicii jekspressii genov v sozrevajushhem zerne kukuruzy i formirovanija vysokolizinovogo i adaptacionnogo sindromov // Sb. nauch. tr. KNIISH im. P.P. Luk'janenko “Genetika, selekcija i tehnologija vozdeľyvanija kukuruzy”. Krasnodar, 1999, S. 191-196.

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

24. Rjadchikov V.G. Uluchshenie zernovyh belkov i ih ocenka.- M.: Kolos, 1978, 368 s.
25. Rjadchikov Viktor Georgievich «Obmen veshhestv u monogastrichnyh zhivotnyh pri balanse i imbalance aminokislot i puti povysheniya biologicheskoy cennosti belka zerna zlakovyh kul'tur» Avtoref. dis. na soisk. stepeni doktora biol. nauk, Moskovskaja veterinarnaja akademija, Moskva, 1981, 51 s.
26. Rjadchikov V.G. Osnovy pitaniya i kormleniya sel'skohozjajstvennyh zhivotnyh – Krasnodar: KGAU, 2013, 616 s.
27. Rjadchikov V.G., Dobrovol'skaja S.V., Filipas T.B., Marchenko Ju.P. Biologicheskaja cennost' zerna vysokobelkovoju opejk-2 kukuruzy // V kn.: Selekcija vysokolizinovoj kukuruzy, sb. nauch. tr. KNIISH, 1976, vyp. 11., S. 153-168.
28. Rjadchikov V.G. Neudachin V.P., Filipas T.B., Lebedev A.V. Frakcionnyj sostav belkov jendosperma kukuruzy i aminokislотноj sostav izolirovannyh frakcij // Prikladnaja biohimija i mikrobiologija, 1979, T. 15, № 6, S. 926-928.
29. Rjadchikov V.G., Lebedev A.V., Filipas T.B., Neudachin V.P., Ermakova P.K., Plotnikov V.K., Bukreeva G.I., Zima K.I., Carichenko A.P. // Belki i struktura zerna kukuruzy opak-2 // Sb. nauch. tr. KNIISH im. P.P. Luk'janenko «Genetika i selekcija kukuruzy», 1979, Krasnodar, S. 236 – 258.
30. Rjadchikov V.G., Plotnikov V.K. Jekspressija genov zhivotnyh pri aminokislотноm imbalance. Chast' II. // Politematicheskij setevoj jelektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, 2013, T. 88, № 4, C. 48-88.
31. Smetanin D.V., Onufrienko V.V., Plotnikov V.K., Bakaldina N.B., Rjadchikov V.G. Moduljacija stabil'nosti mRNK zeinov v processe razvitija zerna kukuruzy // Fiziologija rastenij, 2000, t. 47, № 4, S. 555-561.
32. Hadzhinov M.I., Rjadchikov V.G., Zima K.I., Lebedev A.V. Voprosy selekcii vysokolizinovoj kukuruzy // V kn.: Rastitel'nye belki i ih biosintez - M.: Nauka, 1975, S. 20-30.
33. Hadzhinov M.I., Zima K.I., Rjadchikov V.G., Normov A.A. Rezul'taty i perspektivy selekcii na uluchshenie kolichestva i kachestva belka v zerne kukuruzy // V kn.: Problemy belka v sel'skom hozjajstve, M.: Kolos, 1975, S. 189-197.
34. Hadzhinov M.I., Zima K.I., Normov A.A., Pakudin V.Z. Kombinacionnaja sposobnost' vysokobelkovykh opejk-2 linij kukuruzy po sodержaniju proteina v diallelnyh skreshhivanijah // V kn.: Selekcija vysokolizinovoj kukuruzy, sb. nauch. tr., Krasnodar, 1976, vyp. 11., s. 16-27.
35. Cicin N.V. Teorija i praktika otdaljonnoj gibrizacii – M.: Nauka, 1981, 158 s.
36. Frizzi A., Huang S., Gilbertson L.A., Armstrong T.A., Luethy M.H., Malvar T.M. Modifying lysine biosynthesis and catabolism in corn with a single bifunctional expression/silencing transgene cassette // Plant Biotechnol. J., 2008, V.6, P. 13-21.
37. Jia M., Wu H., Jung R., Larkins B.A., Gibbon B.C. Identification and characterization of lysine-rich proteins and starch biosynthesis genes in the opaque-2 mutant by transcriptional and proteomic analysis // BMC Plant Biol., 2013, V. 13, P. 115-127.
38. Huang S. A., Florida C.A., Kruger DE, Luethy M.H. High lysine and higher tryptophan transgenic maize resulting from the reduction of both 19- and 22-kD α -zeins // Plant Mol Biol, 2006, V.61, P. 525-535.
39. Nunter B.G., Beatty M.K., Singletary G.W., Hamaker B.R., Dilkes B.P., Larkins B.A., Jung R. Maize opaque endosperm mutations create extensive changes in patterns of gene expression // The Plant Cell, 2002. V. 14, P. 2591-2612.
40. Marks M.D., Lindell J.S., Larkins B.A. Nucleotide Sequence Analysis of Zein mRNA from maize endosperm // J. Biol. Chem., 1985, V. 260. № 30, P. 16451-16459.

41. Mertz E.T., Bates L.S., Nelson O.E. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm // *Science*, 1964, V. 145, № 3629, P. 279-280.
42. Mertz E.T. Case histories of existing models // In: *Genetic Improvement of Seed Proteins*, National Academy of Sciences, Washington DC, 1976, P. 57-70.
43. Mertz E.T. Genetic and biochemical control of grain protein synthesis in normal and high lysine cereals // *Wld. Rev. Nutr. Diet.*, 1986, V.48, P. 222-262.
44. Mertz E.T. (ed.) *Quality Protein Maize*, 1992. American Association of Cereals Chemists. - St. Paul.: MN. P. 1-8.
45. Motto M., Maddoloni M., Ponziani G., Brembilla M., Marotta R., Di Fonza N., Soave C., Thompson R., Salamini F. Molecular cloning of the o2-m5 allele of *Zea mays* using transposon marking // *Mol.Gen.Genet.*, 1988, V .232, P. 488-494.
46. Plotnikov V.K., Bakaldina N.B. Differential stability of zein mRNA in developing corn kernel // *Plant Molecular Biology*, 1996, V. 31, P. 507-515.
47. Puchkov Y.M., Alfimov V.A., Zhogin A. Ph. Estimation of high-lysine common winter wheat mutants with reduced endosperm // *Proc. 6th International Wheat Genetics Symposium*, Kyoto, Japan, 1983, P. 399-406.
48. Shmidt R.J., Burr F.A., Burr B. Transposon tagging and molecular analysis of the maize regulatory locus opaque-2 // *Science*, 1987, V. 238, P. 960-963.
49. Shmidt R.J. Opaque-2 and Zein Gene Expression // In: *Control of Plant Gene Expression*, Verma, D.P.S., Ed., Boca Raton: CRC, 1993, P. 337-355.
50. Segal G., Song R., Messing J. A New Opaque Variant of Maize by a Single Dominant RNA-Interference-Inducing Transgene // *Genetics*, 2003, V. 165, P. 387-397.
51. Ryadchikov V.G. Protein quality and nutritional value of high-lysine maize // In: *High-Quality Protein Maize*, Dowden, Hutchinson a. Ross, Inc., 1975, P. 475-482.
52. Tallberg A. Characterization of high-lysine barley genotypes // *Hereditas*, 1982, V. 96, № 2, P. 229-245.
53. Wilson C.M., Alexander D.E. Ribonuclease Activity in Normal and Opaque-2 Mutant Endosperm of Maize // *Science*, 1967, V. 155, № 3769, P. 1575-1576.
54. Wilson C.M. Plant nucleases // *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 1975, V. 26, P. 187-208.
55. Wilson C.M. Plant nucleases. VI. Genetic and developmental variability in ribonuclease activity in inbred and hybrid corn endosperms // *Plant Physiol.*, 1980, V. 66, № 1, P. 119-125.