

Генерация АФК при подготовке к опылению у представителей различных таксонов семенных растений

Научный руководитель – Брейгина Мария Александровна

Бабушкина Ксения Олеговна

Сотрудник

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра физиологии растений, Москва, Россия

E-mail: tardigradedd@gmail.com

Эффективное взаимодействие между пыльцой и тканями спорофита – одно из важнейших эволюционных приобретений, которое обеспечило семенным растениям репродуктивный успех. Из низкомолекулярных сигнальных агентов наиболее универсальными считаются активные формы кислорода (АФК), которые, как было показано для ряда цветковых растений, продуцируются женскими тканями перед опылением и могут восприниматься пыльцой как сигнал [1]. Однако спектр видов, которые были проанализированы на предмет генерации АФК женскими тканями, весьма ограничен – он, в частности, не включал голосеменные растения. Кроме того, ранее исследования проводили методом окрашивания рыльца, что не позволяло дифференцировать различные АФК и количественно их оценивать.

Для цветковых растений с влажными рыльцами и большинства хвойных растений характерно наличие рецептивной жидкости: экссудата рыльца либо опылительной капли, в которой происходит активация пыльцы *in vivo*. Мы поставили перед собой задачу проанализировать рецептивные жидкости голо- и покрытосеменных растений из разных систематических групп и определить содержание в них АФК, а также выявить значимость этих регуляторных агентов для пыльцевых зёрен. В работе использовали высокочувствительную ЭПР спектроскопию (для детекции суммарных АФК и супероксид-радикала в малых объемах жидкости), а также колориметрический метод FOX-1 для измерения концентрации пероксида водорода. В исследование были включены представители трёх семейств хвойных растений, а также восьми семейств цветковых растений, включая представителей базальных и ранних дивергентных покрытосеменных.

Суммарные АФК были обнаружены в рецептивных жидкостях всех видов, однако их количество, а также соотношение между супероксид-радикалом и пероксидом водорода различались у представителей разных систематических групп. Так, для представителей семейства Орхидных был характерен низкий уровень АФК, а для представителей Бромелиевых – высокий, причем у первых преобладал пероксид водорода, а у вторых – супероксид радикал. Значимость различных АФК в качестве регуляторных факторов для пыльцы различных видов была проверена в системе *in vitro* и также сильно различалась у представителей разных таксонов.

Полученные данные демонстрируют как универсальность роли АФК в качестве регуляторных агентов в репродуктивных взаимодействиях у семенных растений, так и разнообразие паттернов их генерации. Мы установили, что одна из двух АФК всегда преобладает в рецептивной жидкости, она же оказывает на пыльцу более значимый эффект и, по-видимому, является «ведущей» в регуляторных процессах. Для представителей разных систематических групп это может быть как супероксид-радикал, так и пероксид водорода.

Источники и литература

- 1) Breygina M, Klimenko E (2020) ROS and ions in cell signaling during sexual plant reproduction. Int J Mol Sci 21:9476. doi: 10.3390/ijms21249476

Прижизненный контроль деградации хлорофилла в листьях липы мелколистной (*Tilia cordata* Mill.) с использованием портативного спектрофотометра

Научный руководитель – Тирас Харлампий Пантелеевич

Вальков Илья Николаевич

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биотехнологический факультет, Москва, Россия
E-mail: ivalkov31@gmail.com

В настоящей работе предложен неинвазивный способ спектрального контроля деградации хлорофилла на модели осеннего старения листьев липы мелколистной. Сезонный переход растений в состояние покоя сопровождается деградацией хлорофилла, обусловлен фотопериодизмом, и может быть зарегистрирован спектральными методами.

Большая часть классических спектроскопических методов не может обеспечить прижизненный контроль динамического состояния растения, поскольку предполагает работу с жидкими гомогенатами. Притом, активно разрабатываемые неинвазивные оптические методы контроля состояния растений требуют наличия стационарных установок [1].

Для получения прижизненных спектральных данных в работе использован портативный спектрофотометр X-Rite Eye-One Pro с голографической дифракционной решёткой, измеряющий интенсивность обратного рассеяния в диапазоне 380–730 нм с шагом в 10 нм [2].

Спектральные данные 24 листьев, находившихся на 5 деревьях *Tilia cordata* на протяжении периода осеннего старения (с 26.09.2023 до полного опадения: 20.10.2023 – 25.10.2023) получали с периодичностью измерений каждые 2 дня. Географические координаты объектов исследования: 55.697 с. ш., 37.514 в. д. Для каждого листа на основе спектров отражения были получены спектры поглощения согласно следующей формуле: $A = -\text{Log}_{10}(R)$, где A (Absorbance) – поглощение, R (Reflectance) – отражение [2]. Также был рассчитан вегетационный индекс SRPI (Simple Ratio Pigment Index) = R_{430}/R_{680} [3]. В процессе старения листьев значение индекса снизилось с 0,8 до 0,15, что вероятно отражает сезонную деградацию хлорофилла.

Описанные выше методы позволяют зафиксировать разрушение хлорофилла по изменению формы спектральной кривой и снижению SRPI, не нарушая целостности растения, и могут быть использованы для прижизненного контроля состояния растений, например, для раннего выявления хлороза. Данный подход может быть использован в полевых исследованиях, для решения фундаментальных и прикладных задач.

Источники и литература

- 1) Тимченко Е. В. и др. Дифференциальные оптические методы контроля состояния растений. Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук. Самара, 2009;
- 2) Apyari V. V. et al. Non-invasive in vivo spectroscopy using a monitor calibrator: A case of planarian feeding and digestion statuses //Microchemical Journal. 2021. Т. 166. С.106255;
- 3) Barták M., Mishra K. B., Marečková M. Spectral reflectance indices sense desiccation induced changes in the thalli of Antarctic lichen *Dermatocarpon polyphyllum* //Czech Polar Reports. – 2018. – Т. 8. – №. 2. – С. 249-259.

Влияние совместимых осмолитов на эффективность ингибиторов фотосинтеза — DBMIB и DCMU

Научный руководитель – Волошин Роман Александрович

Гончарова Мария Александровна

Студент (бакалавр)

Российский государственный аграрный университет МСХА имени К.А. Тимирязева, Агрономии и биотехнологии, Генетики и биотехнологии, Москва, Россия

E-mail: gon.mary.sweet@gmail.com

Совместимые осмолиты, такие как сахароза, трегалоза, глицин-бетаин, способны стабилизировать изолированные фотосинтетические белки [1,2]. Данные соединения способны работать не только на уровне отдельных изолированных белковых глобул, но и на уровне целых тилакоидных мембран [3]. Интегральный механизм действия осмолитов на тилакоидные мембраны, содержащие фотосистемы 1 и 2, а также b_6f комплекс, до конца не известен. Можно оценить влияние осмолитов на трехмерную структуру фотосистем и выявить основные мишени для осмолитов в мембранах с помощью ингибиторного анализа. Классические ингибиторы фотосинтеза, а именно DCMU и DBMIB, действуют на разные сайты фотосинтетической электрон-транспортной цепи. DCMU действует на акцепторной стороне фотосистемы 2, а DBMIB действует на донорной стороне b_6f комплекса [4]. Анализ того, как осмолиты изменяют ингибирующий эффект этих соединений, позволит понять, насколько осмолиты влияют на молекулярное окружение сайтов связывания этих ингибиторов.

В данном исследовании были проведены полярографические и флуориметрические измерения активности первичных процессов фотосинтеза в тилакоидных мембранах шпината в присутствии ингибиторов (DCMU и DBMIB) и осмолитов (сахароза, трегалоза, глицин-бетаин) и проанализировано, как наличие осмолитов изменяет активность ингибиторов.

Было показано, что ингибирующий эффект диурона (DCMU) проявляется слабее в присутствии глицин-бетаина, по сравнению с использованием сахарозного буфера. При этом в отсутствие ингибитора в сахарозном буфере фотосинтетическая активность тилакоидных мембран выше, чем в буфере с глицин-бетаином. На ингибирующее действие DBMIB глицин-бетаин не оказывал значимого влияния. Данные результаты позволяют сделать вывод, что глицин-бетаин, в отличие от дисахаридов, заметно влияет на акцепторную сторону фотосистемы 2, за счет чего снижается эффект диурона.

Источники и литература

- 1) Yancey, P.H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses// J. Exp. Biol. 208 (2005) 2819–2830.
- 2) Allakhverdiev, S.I., Hayashi, H., Nishiyama, Y., Ivanov, A.G., Aliev, J., Klimov, V. V., Murata, N., Carpentier, R. Glycinebetaine protects the D1/D2/Cytb559 complex of photosystem II against photo-induced and heat-induced inactivation// J. Plant Physiol. 160 (2003) 41–49.
- 3) Voloshin, R.A., et al. Influence of osmolytes on the stability of thylakoid-based dye-sensitized solar cells// Int. J. Energy Res. 43 (2019) er.4866.

- 4) Guo, Y., et al. Comparative effect of tenuazonic acid, diuron, bentazone, dibromothymoquinone and methyl viologen on the kinetics of Chl a fluorescence rise OJIP and the MR820 signal// Plant Physiol. Biochem. 156 (2020) 39–48.

Клонирование кодирующих последовательностей генов высокоаффинных нитратных транспортеров SaNRT2.1 и SaNRT2.5 из галофита *Suaeda altissima* (L.) Pall и анализ экспрессии этих генов при различных условиях засоления питательной среды

Научный руководитель – Балнокин Юрий Владимирович

Коношенкова А.О.¹, Ростовцева Е.И.², Храмов Д.Е.³

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра физиологии растений, Москва, Россия, *E-mail: alenakonoshenkova@gmail.com*; 2 - Российский государственный аграрный университет МСХА имени К.А. Тимирязева, Агрономии и биотехнологии, Физиологии растений, Москва, Россия, *E-mail: ni-fir-titi@mail.ru*; 3 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра физиологии растений, Москва, Россия, *E-mail: plasm2010@yandex.ru*

Нитрат является доминирующей формой среди азотных соединений в аэробных почвах и служит главным источником азота для растений. Растения поглощают нитрат из почвы с помощью специализированных транспортных систем, расположенных в плазматических мембранах клеток корня. В условиях почвенного засоления NO_3^- конкурирует с Cl^- за переносчики нитрата, что приводит к снижению поступления нитрата в растение. Предполагается, что нитрат-транспортирующие белки галофитов в условиях дефицита нитрата и одновременно засоления хлористым натрием питательной среды способны успешно связывать нитрат и переносить его через мембрану. Для модельного растения-гликофита *Arabidopsis thaliana* показано, что при низких концентрациях нитрата в наружной среде важную роль в азотном питании играют высокоаффинные нитратные транспортеры семейства NRT2. Мы предполагаем, что у галофитов в этих условиях ключевую роль в поглощении корнем нитрат-ионов также играют высокоаффинные нитратные транспортеры этого семейства. Основная цель нашей работы состоит в идентификации кодирующих последовательностей (CDS) генов семейства *NRT2* из эугалофита *Suaeda altissima* (сведа высокая) и выявлении физиологической роли белков NRT2 у этого растения.

Были клонированы полноразмерные кодирующие последовательности двух генов семейства *NRT2* из *S. altissima*, *SaNRT2.1* и *SaNRT2.5*, для чего сначала были определены последовательности их 3'- и 5'-концевых фрагментов методом Step-Out RACE, с использованием праймеров, подобранных к ранее идентифицированным срединным фрагментам этих генов (GenBank ID: MK580128.1 и MK580129.1, соответственно), а затем были амплифицированы полноразмерные CDS. Амплификацию искомым CDS осуществляли на матрице кДНК из корней сведы. *In silico* анализ показал, что клонированные последовательности кодируют белки, относящиеся к семейству высокоаффинных нитратных транспортеров NRT2: SaNRT2.1 (524 а.а., Mw 56,96 kDa) и SaNRT2.5 (500 а.а., Mw 54,38 kDa).

В органах растений *S. altissima*, растущих при высоких (15 мМ) и низких (0,5 мМ) концентрациях нитрата, а также при различных концентрациях NaCl в питательном растворе, исследовали экспрессию генов *SaNRT2.1* и *SaNRT2.5* методом ПЦР в реальном времени. Найдено, что оба гена экспрессируются, преимущественно, в корнях сведы при низком содержании нитрата в питательном растворе. При засолении среды уровень экспрессии этих генов значительно увеличивается, достигая максимальных значений при 500 мМ NaCl в среде. Полученные данные свидетельствуют о возможном участии транспортеров SaNRT2.1 и SaNRT2.5 в поглощении нитрата растением *S. altissima* в условиях засоления.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-24-00378.

Протеомный анализ *Triticum aestivum* в условиях засухи

Научный руководитель – Мамаева Анна Станиславовна

Макеева Арина Андреевна

Студент (магистр)

Московский физико-технический институт, Москва, Россия

E-mail: aryamakeeva@gmail.com

Недостаток влаги - это одна из наиболее распространенных причин потерь урожая во всём мире, которые могут достигать 50% [1]. Ответ растений на недостаток влаги является сложным процессом, включающим в себя разнообразные физиологические и молекулярные реакции, а именно: биосинтез абсцизовой кислоты, синтез дегидринов, ферментов окислительного стресса и осмотиков для повышения водного потенциала, активация и перераспределение аквапоринов. Идентификация белков и пептидов, регулирующих стрессовый ответ растений, позволит лучше понять механизмы адаптации сельскохозяйственных культур к абиотическим стрессам и разработать новые агротехнологии для повышения урожайности.

Данное исследование представляет собой количественный протеомный анализ растений мягкой пшеницы сорта Н2455/2 в условиях недостатка влаги. Растения пшеницы выращивали на среде Хогланда в течение 6 дней, после чего к ним добавляли полиэтиленгликоль (20%) для имитации условий засухи. Пробы для анализа отбирали через 4 и 8 дней инкубации. Белок экстрагировали фенольным методом, далее проводили трипсинолиз в растворе и масс-спектрометрический анализ. Методика масс-спектрометрического анализа описана в опубликованной ранее статье [2]. Анализ полученных данных проводили при помощи программного обеспечения PEAKS Studio.

Мы выявили, что засуха ингибирует рост как корней, так и листьев пшеницы. С использованием набора изобарных меток для качественного и количественного анализа (iTRAQ), было выявлено изменение представленности 3498 белковых групп в корнях и 3264 в листьях. Среди ключевых изменений, происходящих в условиях засухи, было обнаружено увеличение активности антиоксидантных ферментов, таких как пероксидаза, алкоголь дегидрогеназа и другие, а также изменения в белках, связанных с биосинтезом полисахаридов клеточной стенки (SGNH гидролаза, бета-фруктофуранозидаза, UDP-глюкуронат декарбоксилаза). Такие изменения соответствуют ранее наблюдаемым реакциям растений на засуху [3]. Кроме того, было обнаружено изменение содержания рибосомных белков как в корнях, так и в побеговой части растений. В последней также наблюдались изменения в белках, связанных с ответом на абиотический стресс и апоптозом, а также в белках, ответственных за деградацию аминокислот. Эти изменения фенотипически проявляются в образовании хлорозов на концах листьев.

Таким образом, данное исследование показывает, что реакция растений мягкой пшеницы на засуху сопровождается изменениями в представленности различных групп белков, включая антиоксидантные белки, рибосомные белки и белки, связанные с формированием клеточной стенки. Это имеет важное значение для понимания механизмов адаптации растений к стрессовым условиям и может способствовать разработке новых агротехнологий для повышения урожайности в условиях недостатка влаги.

Исследование было выполнено при поддержке Российского научного фонда (Грант № 23-66-10013).

Источники и литература

- 1) Ahmed, H. G. M., Zeng, Y., Shah, A. N., Yar, M. M., Ullah, A., & Ali, M. (2022). Conferring of drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes using seedling indices. *Frontiers in plant science*, 13, 961049.
- 2) Fesenko, I., Shabalina, S. A., Mamaeva, A., Knyazev, A., Glushkevich, A., Lyapina, I., et al. (2021). A vast pool of lineage-specific microproteins encoded by long non-coding RNAs in plants. *Nucleic Acids Res.* 49, 10328–10346.
- 3) Tenhaken R. (2015). Cell wall remodeling under abiotic stress. *Frontiers in plant science*, 5, 771.

**Разработка технологии получения биомассы культур клеток и органов
(адвентивные корни) *Maackia amurensis***

Научный руководитель – Титова Мария Владимировна

Нагаева Анастасия Сергеевна

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра физиологии растений, Москва, Россия

E-mail: nastya-nagaewa24@mail.ru

Maackia amurensis – древесное лекарственное растение, широко используемое в косметологии и медицине. Показано, что препараты, полученные из ядровой древесины этого вида, обладают гепатопротекторной, антиоксидантной, противоопухолевой, антитромбоцитарной активностью [1]. Данный объект является эндемичным реликтовым видом, единственным кустарником сем. Бобовые амурского экорегиона. Лесного массива не образует, изредка встречается в составе подлеска, создание плантаций сопровождается значительными трудностями [2]. В связи с возрастающими запросами на сырье *M. amurensis* разработка альтернативных биотехнологических подходов для получения ее биомассы весьма актуальна. Целью данной работы было охарактеризовать по ростовым, цитологическим, характеристикам 4 линии суспензионных культур клеток и 1 линию адвентивных корней *M. amurensis*. Суспензионные культуры клеток получали из каллусов стеблевого и листового происхождения, для выращивания использовали питательную среду с минеральной основой по Гамборгу с добавлением фитогормонов 2,4-Д, кинетина и НУК, а также среду с минеральной основой по Шенку и Хильдебрандту (SH) с добавлением 2,4-Д и кинетина. Адвентивные корни получали из каллусов листового происхождения, для выращивания использовали среду SH с добавлением ИМК. Необходимо отметить, что для данного вида культура адвентивных корней была получена впервые. Показано, что для всех исследованных линий характерны достаточно высокие и стабильные показатели роста, причем показатели адвентивных корней были сопоставимы либо превосходили таковые, полученные для суспензий (продуктивность по биомассе составляла $0,27-0,3 \text{ г} \times \text{л}^{-1} \times \text{сут}^{-1}$ и $0,16-0,23 \text{ г} \times \text{л}^{-1} \times \text{сут}^{-1}$ соответственно). Для суспензионных линий также показана значительная степень гетерогенности популяций по размеру агрегатов и морфологии клеток. Проведено выращивание адвентивных корней *M. amurensis* в барботажных 20 л биореакторах в периодическом режиме с сохранением продуктивности. На данный момент проводятся работы по подбору условий пробоподготовки для проведения дальнейшего химического анализа. Таким образом, исследованные штаммы являются перспективными объектами для дальнейшей разработки биотехнологии промышленного получения клеточной биомассы *M. amurensis*.

Источники и литература

- 1) Федореев С. А., Веселова М. В., Кулеш Н. И. и др. Разработка лекарственных средств на основе полифенолов из дальневосточного растения маакии амурской // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2018. № 1(73). С. 35-39.
- 2) Полещук В. А., Моисеенко Л. И., Создание плантаций маакии амурской (*Maackia amurensis* Rupr. Et Maxim.) в естественных и культурных фитоценозах // Экологические проблемы природопользования и охрана окружающей среды в азиатско-тихоокеанском регионе: Среды жизни, их охрана и восстановление. Владивосток 2016. С. 65-70.

**Влияние гипоксии на каталитическую активность
 γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы и уровень малонового диальдегида в
листьях кукурузы (*Zea mays* L.)**

Научный руководитель – Епринцев Александр Трофимович

Плотникова Е.В.¹, Анохина Г.Б.²

1 - Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, *E-mail:*
kate_plotnikova36@mail.ru; 2 - Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия,
E-mail: dowi2009@mail.ru

Известно, что гипоксия приводит к каскаду негативных метаболических перестроек в растительной клетке, среди которых важную роль играет нарушение функционирования ЦТК и ГАМК-шунта, в результате чего в клетке происходит накопление токсичного метаболита – янтарного полуальдегида [2]. Для его детоксикации и возобновления жизнедеятельности клетки существует альтернативный путь, функционирование которого обеспечивает γ -гидроксibuтиратдегидрогеназа (ГБДГ, КФ 1.1.1.61), которая катализирует восстановление янтарного полуальдегида до γ -гидроксibuтирата, при этом НАДН окисляется до НАД⁺[1]. Целью работы являлось исследование динамики каталитической активности γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы и изменения уровня малонового диальдегида в листьях кукурузы в условиях гипоксии.

Объектом исследования служили листья двенадцатидневных проростков кукурузы (*Zea mays* L.) сорта «Воронежская 76», выращенных гидропонно.

Перед экспериментом опытная группа растений инкубировалась 24 ч в темноте в вакуум-эксикаторах. Спустя сутки в эксикатор подавали со скоростью 18 см³/сек. Контрольная группа находилась в условиях с постоянным притоком кислорода воздуха.

Активность ГБДГ в листьях кукурузы определяли на спектрофотометре по скорости образования НАДН при длине волны 340 нм [3]. Определение концентрации малонового диальдегида (МДА) проводилось с помощью реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой и регистрацией образования триметинового комплекса при длине волны 532 нм [4].

В результате проведенного эксперимента было доказано наличие стрессового воздействия гипоксических условий по уровню накопления МДА в листьях кукурузы. Увеличение МДА наблюдалось с первого часа инкубации растений в условиях пониженного содержания кислорода, при этом максимум наблюдался на 24 час проведения эксперимента (Рис. 1).

Было показано, что инкубация проростков кукурузы в условиях гипоксического стресса вызывает увеличение активности ГБДГ к 3 часу эксперимента (Рис. 2).

Таким образом, полученные данные изменения уровня МДА показали развитие стрессового ответа в ответ на дефицит кислорода, а также интенсификацию работы ГБДГ для детоксикации янтарного полуальдегида.

Источники и литература

- 1) Breitkreuz K. E. et al. A novel γ -hydroxybutyrate dehydrogenase: identification and expression of an Arabidopsis cDNA and potential role under oxygen deficiency // Journal of Biological Chemistry. – 2003. – Т. 278. – №. 42. – С. 41552-41556.
- 2) Herrera A. Responses to flooding of plant water relations and leaf gas exchange in tropical tolerant trees of a black-water wetland // Frontiers in plant science. – 2013. – Т. 4. – С. 106.

- 3) Taxon E. S., Halbers L. P., Parsons S. M. Kinetics aspects of Gamma-hydroxybutyrate dehydrogenase //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. – 2020. – Т. 1868. – №. 5. – С. 140376.
- 4) Uchiyama M., Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test //Analytical biochemistry. – 1978. – Т. 86. – №. 1. – С. 271-278.

Иллюстрации

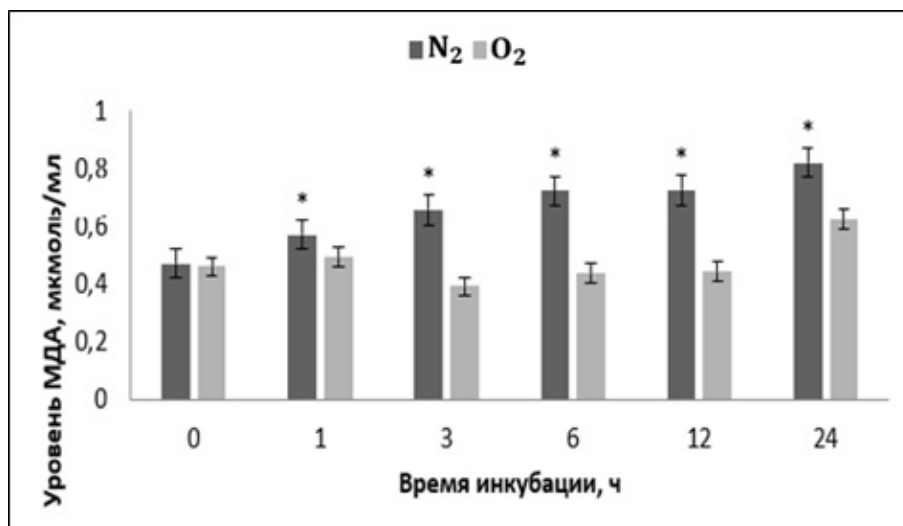


Рис. : 1. Динамика изменения уровня малонового диальдегида в листьях кукурузы в гипоксических условиях. O₂– контрольная группа растений; N₂– опытная группа растений. * – разница по сравнению с контролем достоверна при P = 0.01

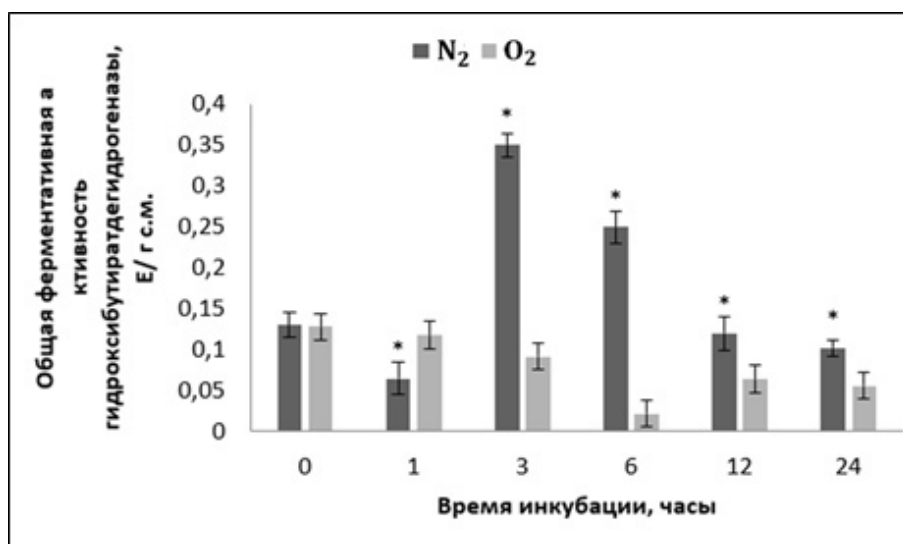


Рис. : 2. Изменение ферментативной активности гамма-гидроксибутиратдегидрогеназы в листьях кукурузы в условиях гипоксии. O₂– контрольная группа растений; N₂– опытная группа растений. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны (p≤0.05).

Влияние гипоксии на содержание микроРНК775А во внеклеточных везикулах в листьях кукурузы

Хомутова Анна Евгеньевна

Студент (бакалавр)

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

E-mail: anna.khomutova2002@gmail.com

В условиях гипоксии происходит адаптивная перестройка клеточного метаболизма растений. Наиболее чувствительным процессом к уровню кислорода является митохондриальное дыхание, изменение функционирования которого находит отражением в энергетическом статусе клетки, а также перестройке пластического обмена клетки. Регуляция транскрипционной активности генов при гипоксии осуществляется, в том числе, и за счет малых некодирующих РНК (микроРНК), подавляющих экспрессию целевых генов на посттранскрипционном уровне.

Для оценки количества микроРНК775А методом полимеразной цепной реакции был разработан специфический зонд, представляющий собой вариант «стебель-петля». Количественные изменения свободной микроРНК775А были показаны в листьях кукурузы при развитии гипоксических условий. Показано изменение внутривезикулярного содержания микроРНК775А при развитии гипоксического стресса в листьях кукурузы. С помощью дифференциального ультрацентрифугирования было получено две фракции везикул (Р40 и Р100), анализ размеров которых позволил установить, что в фракции Р40 преобладают более крупные везикулы, размер которых составляет от 0,170 до 0,658 нм, в то время как данный показатель для везикул фракции Р100 составлял от 0,087 до 0,147 мкм. Идентификация микроРНК775А на основе использования специфического зонда «стебель-петля» показала ее наличие только во внеклеточных везикулах фракции Р100. Применение ингибиторного анализа показало различие количественного распределения микроРНК775А в рамках фракции Р100 в листьях кукурузы в норме и при развитии гипоксии, с их преобладающим расположением на поверхности везикул. Доля микроРНК775А, расположенных внутри внеклеточных везикул, составляла не более 34% от ее общего количества, ассоциированного с везикулами фракции Р100. С помощью ПЦР в реальном времени показано изменение количества микроРНК775А, расположенных на поверхности везикул Р100 и внутри их по мере развития гипоксического стресса в сторону увеличения данного показателя. Следовательно, большая часть микроРНК775А располагается на поверхности внеклеточных везикул, ассоциируясь с белком AGO1, который защищает их от действия протеаз. С помощью BLAST показано, что микроРНК775А может ассоциироваться с транскрипционными факторами семейства MYB, участвующими в различных биологических функциях, в том числе, в стрессовом ответе клетки на гипоксию.

Результаты проведенного исследования по анализу содержания и расположения микроРНК775А во внеклеточных везикулах показали, что внеклеточные везикулы могут переносить микроРНК775А, выполняя функцию межклеточной коммуникации. Транспорт анализируемой микроРНК, вероятно, обеспечивает межклеточную сигнализацию развития гипоксического стресса. Увеличение общего содержания свободной микроРНК775А, в том числе, увеличение в составе внеклеточных везикул фракции Р100, обеспечивает развитие адаптивной реакции клеточного метаболизма в ответ на гипоксию.