

6. *Américo I.* Molecular Key to Seven Brazilian Species of Trichogramma Hymenoptera: Trichogrammatidae) Using Sequences of the ITS2 Region and Restriction Analysis // *Neotropical Entomology*. – 2001. – **30**, No 2. – P. 259–262.
7. *Susanta K.* Behura Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues // *Mol. Ecol.* – 2006. – **15**. – P. 3087–3113.
8. *Hoy M. A.* *Insect Molecular Genetics*. – San Diego: Academic Press, 1994. – P. 43.
9. *Stouthamer R., Hu J., van Kan F. J. P. M., Platner G. R.* The utility of internally transcribed spacer 2 DNA sequences of the nuclear ribosomal gene for distinguishing sibling species of Trichogramma // *BioControl*. – 1999. – **43**. – P. 421–440.
10. *Boom R., Sol C. J., Salimans M. M. et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids // *J. Clin. Microb.* – 1990. – **28**, No 3. – P. 495–503.

Національний аграрний університет, Київ

Поступило в редакцію 19.02.2007

УДК 581.1

© 2007

**В. А. Негрецкий, Е. И. Ковзун**

## **Инициация флорального морфогенеза у растений различной фотопериодической чувствительности и особенности экспрессии Ca<sup>2+</sup>-зависимой протеинкиназы С**

*(Представлено академиком НАН Украины К. М. Сытником)*

*We study the  $\alpha$ -isoform of Ca-dependent protein kinase C (CaPKC) expression during the induction of flowering in the leaves of different photoperiodic sensitive plants. As a result, the expression of Ca-dependent proteine kinase C in the leaves of 2 biotypes of tobacco and perilla plants is shown. The 5 long-day induction promoted the CaPKC expression in the leaves of long-day tobacco *Nicotiana silvestris* L. plants by 143%. A similar activation of the PKC expression was observed after 5 short-day (SD) inductions in SD plants of tobacco M. Mammoth and perilla. This allows us to discuss the Ca-dependent PKC participation in mechanisms of signal transduction during the photoperiodic induction and its involving in the initial stages of floral morphogenesis.*

Фотопериодическая индукция цветения кардинально изменяет метаболизм растительной клетки. Протеинкиназы (ПК) играют одну из главных ролей в начальных событиях передачи сигнала. Роль протеинкиназы С (ПКС) в трансдукции сигнала в клетке активно исследуется. Существует обширная литература по функционированию ПК в растительной клетке [1, 2]. Один из путей повышения экспрессии ПКС связан с фосфолипидным гидролизом, повышением концентрации ионов Ca<sup>2+</sup> в цитозоле, внутриклеточное содержание которого активирует ПКС для дальнейшего ее участия в процессах фосфорилирования. Показана важная роль ионов Ca<sup>2+</sup> в процессе зацветания растений [3, 4].

Механизм рецепции фотопериодического стимула, его передачи в клетке и между ними, амплификации сигнала у фотопериодически чувствительных растений изучен недостаточно. В настоящее время есть несколько сообщений о косвенном участии протеинкиназ

в процессе зацветания. Повышение экспрессии ПКС наблюдали при зацветании у растений ипомеи [5], и есть сообщение о вовлечении протеинкиназы СК2 в работу биологических часов (циркадных ритмов) у растений *Arabidopsis thaliana* L. [6].

При исследовании фотопериодической индукции цветения нами было показано, что начальные этапы индукции связаны с большим всплеском активности ионов  $\text{Ca}^{2+}$  у растений различных фотопериодических групп [7]. Индукция цветения короткодневного растения мари красной *Chenopodium rubrum* L. приводила к усилению экспрессии  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой  $\alpha$ -изоформы ПКС. Короткодневная индукция флорального морфогенеза также активировала в листьях и стебле мари красной экспрессию  $\eta'$ -изоформы ПКС [8].

Целью нашей работы было исследование экспрессии ПКС в процессе индукции цветения у растений различных фотопериодических групп.

В эксперименте использовали растения различной фотопериодической чувствительности: длиннодневный (ДД) табак Сильвестрис *Nicotiana glauca* L., короткодневные (КД) периллы *Perilla nankinensis* L. и табак Мамонт *Nicotiana glauca* L. Растения выращивали в условиях фотопериодического домика на длине дня, позволяющей удерживать растения в вегетирующем состоянии (для ДД растений — 8 ч света и 16 ч темноты, для КД растений — наоборот). По достижении возраста 3 мес. для табаков и 2 мес. для периллы растения переносили на благоприятную для индукции цветения длину дня. Часть растений оставалась в вегетирующем состоянии (контроль). Все экспериментальные растения в зависимости от типа фотопериодической чувствительности получали по пять циклов фотопериодической индукции (5 ДД, 5 КД), достаточной для инициации у растений флорального морфогенеза. Для исследования ПКС использовали листья экспериментальных и контрольных растений.

Для анализа ПКС белки гомогената растительной ткани разделяли методом электрофореза в ПААГ, переносили полусухим способом на нитроцеллюлозные мембраны, которые обрабатывали антителами к  $\alpha$ -изоформе ПКС (“Sigma”, США). Вторичные антитела и реагенты для хемилюминесцентной визуализации получены в виде наборов ECL (“Amersham Life Science”, США). Визуализацию проводили с использованием люминола. Цифровую денситометрию полученных фотографических снимков проводили, используя компьютерную программу “Scion Image” [8, 9].

В результате исследования в листьях двух биотипов табака и периллы была выявлена экспрессия  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ПКС. При индукции цветения пятью ДД фотопериодами экспрессия ПКС в листьях табака Сильвестрис возрастала на 143% (рис. 1, а). Аналогичную активацию экспрессии ПКС наблюдали у КД растений табака Мамонт и периллы при индукции зацветания пятью КД фотопериодами: соответственно на 144 и 126% по отношению к контролю (см. рис. 1, б, в). Полученные результаты согласуются с нашими данными по усилению экспрессии  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой  $\alpha$ -изоформы ПКС при индукции цветения КД растений мари красной [8]. Аналогичное вовлечение ПКС в процесс зацветания наблюдали у КД растения ипомеи *Pharbitis nil* [5]. Регуляторные механизмы участия ПКС в процессе индукции зацветания растений различных фотопериодических групп в настоящее время изучены мало, неизвестно что является субстратом фосфорилирования — цитоплазматические, цитоскелетные, мембранные или ядерные компоненты. Полученная нами обширная информация о всплесках активности ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в различных органах растений разных фотопериодических групп при индукции зацветания и повышении экспрессии  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ПКС в листьях и стебле ДД и КД растений указывает на общую тенденцию реакции растений на фотопериодический стимул индуцирования цветения. Это позволяет говорить

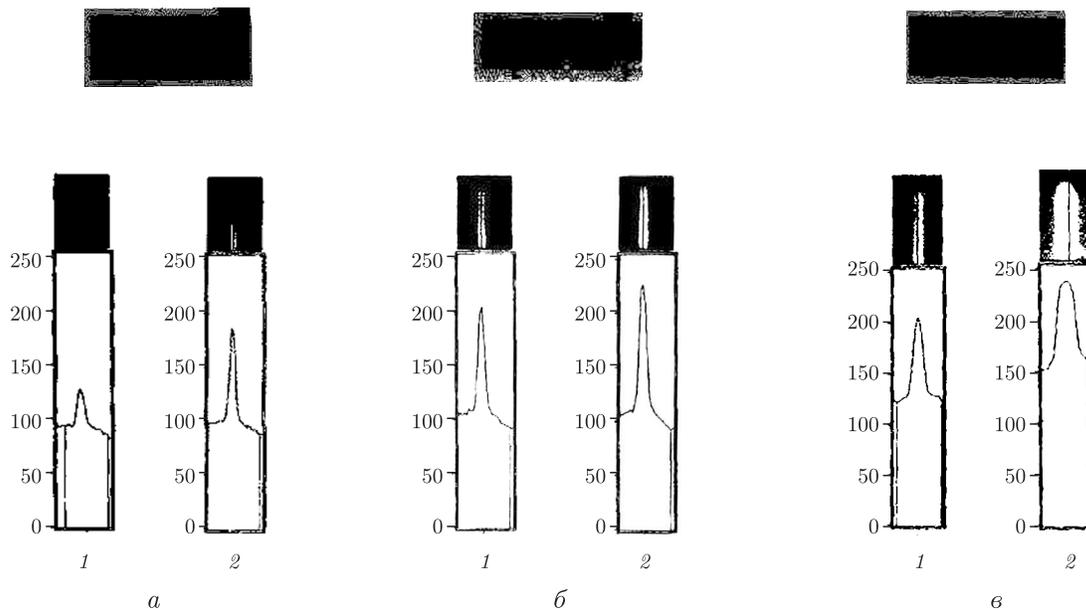


Рис. 1. Экспрессия протеинкиназы С в процессе фотопериодической индукции цветения длиннодневного растения табака Сильвестрис *Nicotiana glauca* L. (а), короткодневных растений табака Мамонт *Nicotiana glauca* L. (б) и периллы *Perilla nankinensis* L. (в):

1 — вегетирующие растения; 2 — растения, получившие фотопериодическую индукцию: 5ДД (а) и 5КД (б, в)

с определенной долей уверенности о вовлечении  $Ca^{2+}$ -зависимой ПКС в начальные этапы инициации флорального морфогенеза.

1. Холл М. А., Новикова Г. В., Мошков И. Е. и др. Протеинкиназы растений в трансдукции абиотических и биотических сигналов // Физиология растений. — 2002. — **49**, № 1. — С. 121–135.
2. Cheng S.-H., Willmann M. R., Chen H.-C., Sheen J. Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family // Plant Physiol. — 2002. — **129**. — P. 469–485.
3. Tretyn A., Cymeriski M., Czaplowska J. et al. Calcium and photoperiodic flower induction in Pharbitis nil // Physiol. plant. — 1990. — **80**. — P. 388–392.
4. Friedman H., Goldschmidt E. E., Spiegelstein H., Halevy A. A rhythm in the flowering response of photoperiodically-induced Pharbitis nil to agents affecting cytosolic calcium and pH // Ibid. — 1992. — **85**. — P. 57–60.
5. Jaworsky K., Szmidt-Jaworska A., Tretyn A., Korcewicz J. Biochemical evidence for a calcium-dependent protein kinase from Pharbitis nil and its involvement in photoperiodic flower induction // Biochemistry. — 2003. — **62**, No 7. — P. 1047–1055.
6. Sugano S., Andronis Ch., Ong M. S. et al. The protein kinase CK2 is involved in regulation of circadian rhythms in Arabidopsis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1999. — **96**, No 22. — P. 12362–12366.
7. Negretsky V. A., Gordetsky A. V. Endogenous floral stimulus, state of water and ion homeostasis in relation to flower induction of photoperiodic plants // Botany and Mycology For The Next Millenium. — Kiev: Naukova Dumka, 1996. — P. 282–290.
8. Негрецький В. А., Ковзун Е. И. Экспрессия протеинкиназы С в процессе фотопериодической индукции цветения растений короткодневной мари красной *Chenopodium rubrum* L. // Доп. НАН України. — 2004. — № 10. — С. 174–177.
9. Ковзун О. І. Ізоферментний склад протеїнінази С в умовно нормальній та пухлинній тканині надниркових залоз людини // Укр. біохім. журн. — 2002. — **74**, № 4. — С. 143.

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного  
НАН Украины, Киев

Институт эндокринологии и обмена веществ  
им. В. П. Комисаренко АМН Украины, Киев

Поступило в редакцию 14.11.2006