

Експресія деяких генів, індукованих водним стресом, у проростках *Arabidopsis thaliana*, вирощуваних за умов помірного водного дефіциту

Ю. А. Бобровницький

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України
Вул. Терещенківська, 2, Київ, Україна, 01601

bobrownzyky@hotmail.com

Мета. Дослідити експресію деяких генів, індукованих водним стресом. **Методи.** Проростки вирощували на агаризованому середовищі при повільно знижуваному водному потенціалі. Для визначення експресії генів використано метод ПЛР у реальному часі. **Результати.** Виявлено помірне підвищення експресії RD29A і AtP5CS – двох АБК-залежних генів, яке не було таким значним, як в експериментах, де проростки вирощували за гострого водного дефіциту. Рівень експресії AtP5CS корелював з вмістом проліну у проростках *A. thaliana*. Водночас не відмічено істотного зростання експресії DREB2A, RD17 і ERD1 – трьох АБК-незалежних генів. **Висновки.** Характер експресії генів за умов, близьких до природних, може відрізнятися від того, що спостерігається при гострому водному стресі.

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana*, експресія генів, водний дефіцит, ПЛР у реальному часі, пролін.

Вступ. На ріст рослин значною мірою впливають абіотичні чинники, серед них водний, сольовий і холодний стреси. Останні є сильними факторами, які лімітують ріст культурних рослин та їхню продуктивність. Вони викликають різноманітні біохімічні та фізіологічні реакції рослин, направлені на досягнення толерантності до стресу. Відповідь рослин на водний стрес спричиняє закриття продихів, інгібування росту клітин і фотосинтезу та активацію дихання [1].

Молекулярний механізм реакції вищих рослин на водний стрес визначають, вивчаючи на транскрипційному рівні гени, що відповідають на водний стрес [2–5]. Нещодавно розроблена технологія мікроарей стала корисним інструментом для аналізу експресії генів на рівні геному [6, 7]. Так, вико-

ристовуючи мікроарей, що включає 7000 зразків кДНК, ідентифіковано 299 генів, які індукуються посухою, 54 гени – холодним і 213 – сольовим стресами та 245 – абсцизовою кислотою (АБК) у *Arabidopsis* [8]. Понад половина генів, експресія яких індукується посухою, активується також осмотичним стресом і/або обробкою АБК, що дає підставу для припущення щодо синергізму дії зазначених чинників. На протигагу цьому лише близько 10 % генів, експресія яких спричиняється посухою, індукують і холодний стрес.

Аналізом експресії генів, які реагують на водний, сольовий та холодний стреси, показано наявність кількох регуляторних систем, відповідальних за стрес-індуковану генну експресію. Частина генів є АБК-залежними, тоді як решта – АБК-незалежними [2, 5, 9–11], що вказує на існування комплексних регуляторних механізмів між сприйняттям сигналу

Характеристика генів, досліджуваних у роботі

Локус	Ген	«Прямий» праймер»	«Зворотний» праймер»	Функція
At5g05410	<i>DREB2A</i>	cga gtt tga aca taa cta ttg g	ttg agg ctt tgt agc gga tc	Транскрипційний фактор. АБК-незалежний
At1g20440	<i>RD17</i>	gaa caa gcc tag tgt cat cga	ggt agt gga aac tgg tac atc	Білок LEA групи 2 (дегідрин). Індукується <i>DREB2A</i> , АБК-незалежний
At5g52310	<i>RD29A</i>	gtt act gat ccc acc aaa gaa g	gtc cat tcc agt ttc agt ctt c	Білок, подібний до білків LEA групи 2. Індукується <i>DREB2A</i> та АБК
At2g39800	<i>ATP5CS</i>	gat ttg gac ttg gtg cag agg	tat gag tac taa gca gag agg a	Ключовий фермент біосинтезу проліну. АБК-залежний
At5g51070	<i>ERD1</i>	ctt tct cta tca gca cga aac g	ttt ttt cca cca ggt cca gaa c	АТФ-залежна протеаза Clp, БТШ групи 2. <i>DREB2A</i> та АБК-незалежний
At3g62250	<i>Ubg5</i>	aac cct tga ggt tga atc atc c cga	gtc ctt ctt tct ggt aaa cgt	Убіквітин 5
At4g20890	<i>Tub9</i>	gta cct tga agc ttg cta atc cta	gtt ctg gac gtt cat cat ctg ttc	Тубулін 9

про абіотичний стрес та експресією генів [9–12]. На цей час ідентифіковано два основних елементи у промоторах стрес-індукованих генів: елемент відповіді на АБК – ABRE (abscisic acid responsive element) та елемент відповіді на зневоднення – DRE (dehydration responsive element).

Продукти стрес-індукованих генів також можна розділити на дві групи: білки, які безпосередньо захищають від дії абіотичних стресів, та білки, що регулюють експресію генів і проведення сигналу у відповідь на стрес [2, 3, 5, 10]. До першої групи належать білки водних каналів, білки детоксикації, білки пізнього ембріогенезу та шаперони, ключові ферменти синтезу осмолітів, таких як пролін і цукри, та ін. Друга група включає транскрипційні фактори (*DREB2*, *AREB*, *MYC*, *MYB*), протеїнази та фосфатази, а також ферменти біосинтезу АБК.

На сьогодні не до кінця з'ясованим лишається питання стосовно того, які гени індукуються водним дефіцитом за умов, близьких до природних, оскільки у переважній більшості випадків експресійний аналіз проводили на рослинах *Arabidopsis*, вирощених за гострого водного стресу, який є дуже спрощеною імітацією природної посухи. Ця проблема набуває актуальності у зв'язку із зростанням кількості трансгенних культурних рослин.

Мета даної роботи полягала у визначенні експресії генів за умов пролонгованого водного стресу методом ПЛР у реальному часі (Real Time PCR),

який у понад 100 разів чутливіший за мікроарей [13]. Перелік досліджуваних генів та їхні характеристики наведено у таблиці.

DREB2A належить до підродини DREBA-2 родини транскрипційних факторів (ТФ) ERF/AP2. *DREB2A* кодує ТФ, що специфічно зв'язується з шістьма нуклеотидами (A/GCCGAC) корового мотиву DRE [14]. Він функціонує переважно в АБК-незалежному шляху експресії генів, індукованої водним дефіцитом, оскільки, згідно з літературними даними, експресія *DREB2A* суттєво активується водним і сольовим стресами, але не обробкою АБК. Припускають, що *DREB2A* при цьому стимулює інші гени, відповідальні за толерантність до водного стресу [15]. *RD17* кодує білок пізнього ембріогенезу групи 2 (дегідрин), містить у своєму промоторі мотив DRE і регулюється, таким чином, *DREB2A* [16]. *RD29A* кодує білок, подібний до білків пізнього ембріогенезу [17]. Промотор цього гена містить два основних *cis*-діючих елементи (*ABRE* та *DRE*), які беруть участь у стрес-індукованій експресії генів [18, 19]. *AtP5CS* кодує Δ -1-піролідін-5-карбоксилатсинтазу – білок, який лімітує швидкість реакції у процесі біосинтезу проліну [20]. Його експресія також індукується АБК і осмотичним стресом [21]. *ERD1* є регуляторною субодиницею АТФ-залежної протеази Clp (білок теплового шоку групи 2) [22]. Протеаза Clp формує комплекси у хлоропластах, які, ймовірно, причетні до деградації біл-

ків з дефектами третинної структури [23]. *ERD1* є елементом одного з міноритарних АБК-незалежних шляхів, що регулюють відповідь рослин на зневоднення [1]. Таким чином, з п'яти досліджуваних генів один (*AtP5CS*) виявився АБК-залежним, два (*RD17* і *ERD1*) – АБК-незалежними, причому *ERD1* є елементом окремого АБК-незалежного шляху передачі сигналу при водному стресі; ще один (*DREB2A*) є транскрипційним фактором і, нарешті, останній (*RD29A*) регулюється АБК та *DREB2A* одночасно.

Матеріали і методи. Перед посівом насіння *A. thaliana* (екотип Columbia) стерилізували протягом 15 хв у 5 %-му розчині гіпохлориту натрію, тричі промивали стерильною дистильованою водою і змішували з 1 %-ю агарозою для зручності висіву. Стандартні (12 × 12 см) пластикові чашки Петрі попередньо заповнювали агаризованим (1 %) середовищем Мурасіге і Скуга (MS) з додаванням 4,5 % цукрози, рН 5,7. Насіння висівали на поверхню живильного середовища і витримували упродовж 2 діб за температури 4 °С для більш рівномірної схожості.

Проростки росли за температури 22 °С при відносній вологості повітря 50 % і 16-год світловому дні. Рівень освітлення становив 80 мкмоль квантів × м⁻² · с⁻¹. Проростки вирощували упродовж 6 діб до появи добре сформованих сім'ядольних листків. У подальшому їх пересаджували на живильне середовище MS, яке містило компоненти у концентрації, зниженій до однієї чверті від норми (0,25 × MS). У ньому була відсутня сахароза для зменшення осмотичного тиску. Рівень рН середовища становив 5,7. Для імітації умов водного стресу чашки закривали спеціальною целофановою плівкою, проникною для водяної пари. Середовище (80 мл) заливали в кожну чашку Петрі під невеликим визначеним кутом, що сприяло його направленому висиханню зверху донизу. Контрольні рослини пересаджували на чашки з ідентичним середовищем, проте їх закривали стандартними пластиковими кришками, що виключало висихання субстрату. На цьому середовищі проростки зростали протягом 5 діб. Цей термін обрано з тієї причини, що на 6-ту добу проростки, вирощувані за умов водного дефіциту, гинуть внаслідок висихання субстрату.

РНК виділяли згідно з методикою виробника TRI REAGENT («Sigma», ФРН). Для досліду брали рослини безпосередньо перед пересадкою, а надалі – кожні 24 год. Розмір проби відповідав об'єму однієї чашки (20 рослин сумарною масою 20–50 мг залежно від віку). Вимірювання здійснювали в трьох біологічних і аналітичних повторностях. Для контролю якості РНК відразу після її виділення проводили електрофорез. Перед синтезом кДНК для видалення слідів геномної ДНК виділену РНК обробляли ДНКазою I («Fermentas», Литва). кДНК отримували з РНК за допомогою реакції зворотної транскрипції з використанням зворотної транскриптази M-MLV («Fermentas»). Далі її розбавляли водою у співвідношенні 1:10.

ПЛР у реальному часі проводили на ПЛР-ампліфікаторі Real-Time PCR IQ-Cycler («BioRad», США). В кожну мікропробірку вносили готову суміш для ПЛР Maxima Sybr Green Real Time PCR 2 × Master Mix («Fermentas») (0,5 мл/мл), яка містить буфер для ПЛР, MgCl₂, суміш дезоксинуклеотидів, Таq-ДНК-полімераза, а також «прямий» і «зворотний» праймери і пробу кДНК (0,05 мл/мл). Кінцева концентрація праймерів у готовому розчині становила 5 пМ; реакційний об'єм – 20 мкл. Інтенсивність флуоресценції вимірювали за температури 77–79 °С, криву плавлення – у діапазоні 50–94 °С з інтервалом 0,5 °С. Час затримки дорівнював 10 с. Одержані результати аналізували за допомогою програмного забезпечення приладу.

Для ПЛР у реальному часі використовували специфічні праймери довжиною 19–22 нуклеотидів, сконструйовані на основі бази даних TAIR (www.arabidopsis.org). Послідовності пар праймерів наведено в таблиці. Проби нормалізували з використанням генів убіквітину 5 (*Uba5*) і тубуліну 9 (*Tub9*), рівень експресії яких залишається незмінним за різних умов вирощування. Праймери для цих генів також наведено в таблиці.

Для досліду з визначення концентрації проліну рослини брали безпосередньо перед пересадкою, а надалі – кожні 24 год. Розмір проби відповідав об'єму однієї чашки (20 рослин сумарною масою 20–50 мг залежно від віку). Вимірювання здійснювали в п'яти біологічних та трьох аналітичних повторностях. Концентрацію проліну визначали за

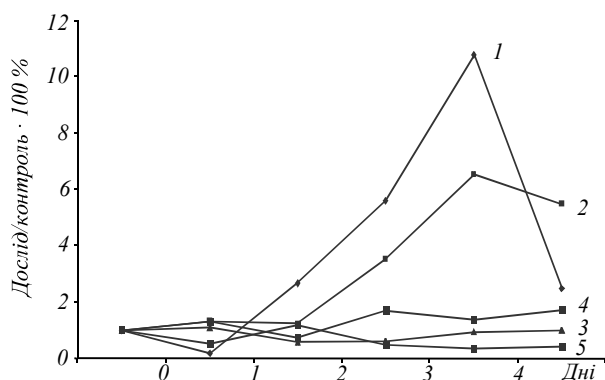


Рис. 1. Відносна експресія генів *RD29A* (1), *AtP5CS* (2), *DREB2A* (3), *RD17* (4) і *ERD1* (5) у проростках, вирощуваних за умов помірного водного стресу

методикою, заснованою на нінгідриновій реакції [24].

Результати і обговорення. До цього часу в різних дослідженнях використовували моделі імітації водного стресу, які дещо відрізняються від описаної нами. Зокрема, водний стрес у зазначених вище роботах вивчали на рослинах віком три тижні, вирощених на агаризованому середовищі. Далі ці рослини виймали з агару і висушували в пластикових чашках при розсіяному світлі за температури 22 °С. При цьому тривалість дослідження становила всього 24 год. На наш погляд, пересаджування рослин *A. thaliana* у тритижневому віці, коли вони мають достатньо розгалужену кореневу систему, є саме по собі досить травмуючим. Подальше перебування рослин з відкритою кореневою системою призводить до їхнього швидкого висихання та загибелі, внаслідок чого тривалість дослідження не перевищувала однієї доби. Через це ми запропонували новий метод імітації водного стресу (див. «Матеріали і методи»), за якого висушування середовища відбувається в процесі росту рослин на агаризованому середовищі протягом 5 днів, тобто у спосіб, більш наближений до природного.

Як видно з даних, наведених на рис. 1, відносна (дослід/контроль) експресія гена *RD29A* більша за одиницю (рівень експресії за умов стресу є вищим, ніж у контролі) протягом усього експерименту, за винятком 1-го дня. Починаючи з 2-го дня експресія поступово зростає, сягаючи максимальних значень (> 10) на 4-й день. На 5-й день, коли інтенсивність водного стресу була максимальною, експе-

сія *RD29A* знизилася до 2,48. Отримані дані, очевидно, свідчать про важливість білка *RD29A* при відносно помірних значеннях водного дефіциту.

RD29A є добре вивченим геном, експресія якого зростає під впливом гострого водного стресу вже через 1 год після його початку [25]. При цьому її рівень може сягати дуже високих значень порівняно з контролем. Так, у досліді авторів роботи [16], проведеному також на *A. thaliana*, експресія *RD29A* підвищувалася приблизно в 100 разів після 5 год дії гострого водного стресу. В іншому експерименті [8] з визначення експресії *RD29A* збільшення виявилось помірнішим – у 29 разів. Наприкінці вказаного дослідження експресія знижувалася, що було відмічено і в нашому експерименті. Загалом, порівнюючи значення рівнів експресії, обраховані нами при імітуванні умов пролонгованого водного стресу, з літературними даними, варто зазначити, що хоча в нашому досліді рівень експресії і підвищується значно, він все ж не досягає тих величин, які характерні для дослідів, де імітують умови гострого водного дефіциту.

Іншим АБК-залежним геном, обраним для дослідження експресії, став *AtP5CS*, що кодує ключовий фермент біосинтезу проліну, Δ -1-піролідін-5-карбоксилатсинтазу. Як видно з рис. 1, відносна експресія цього гена перевищує одиницю протягом усього експерименту. Щоправда, на 1-й і 2-й дні значення експресії за умов стресу лише незначно перевищують контрольні показники. Експресія починає зростати на 3-й день і сягає найвищих значень на 4-й і 5-й дні (6,52 та 5,47 відповідно).

Нами виконано дослід з вимірювання вмісту проліну у проростках, вирощуваних за умов водного стресу, та в контролі (рис. 2). У перші 2 дні після пересадки концентрація проліну за умов стресу істотно не перевищує контрольних значень. На 3-й день вона зростає і на 4-й стає у 3,56 рази вищою, ніж у контролі. На 5-й день концентрація проліну залишається приблизно на рівні 4-го дня.

Кореляція експресії *AtP5CS* та вмісту проліну за умов водного дефіциту підтверджує дані про ключову роль Δ -1-піролідін-5-карбоксилатсинтази в реакції біосинтезу проліну [26]. Порівнюючи наші дані щодо експресії *AtP5CS* та вмісту проліну з літературними [21, 26], варто зазначити, що біль-

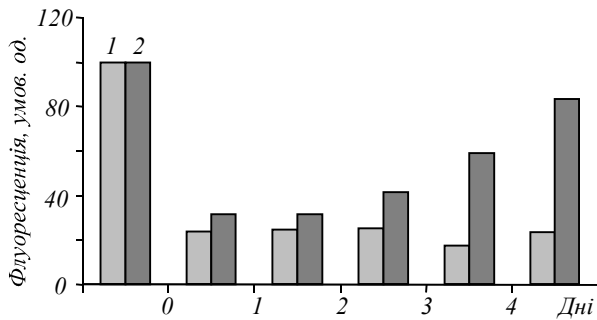


Рис. 2. Вміст проліну у проростках, вирощуваних за умов помірного водного стресу: 1 – контроль; 2 – дослід

шість літературних джерел засвідчують суттєвіші відмінності між стресом та контролем за цими двома показниками. Так, у роботі [26] концентрація проліну збільшувалася приблизно в 30 разів і приблизно у стільки ж разів зростала експресія *AtP5CS*. Менше підвищення цих двох показників (концентрації проліну та експресії *AtP5CS*) у нашому досліді можна пояснити помірнішими умовами стресу. Високий рівень кореляції між цими двома показниками (коефіцієнт кореляції становить 0,93) є одним із свідчень на користь того факту, що *AtP5CS* є ключовим ферментом синтезу проліну.

Як відомо, 40 генів (~11 % від усіх стрес-індукованих генів) різноманітних ТФ ідентифіковано як такі, експресія яких індукується посухою, холодним або осмотичним стресом. Серед цих ТФ, зокрема, виявлено шість, що належать до підродини DREB [8].

У нашому експерименті визначено експресію одного ТФ з цієї групи, а саме – *DREB2A*. Як видно з рис. 1, істотних змін експресії *DREB2A* протягом досліді не спостерігали. Значення відносної експресії були близькими до одиниці з незначними відхиленнями у той чи інший бік.

Більшість літературних даних свідчить про зростання експресії *DREB2A* при водному та осмотичному стресах. Так, при гострому водному дефіциті встановлено підвищення експресії *DREB2A* у 8–13 разів порівняно з контролем. При цьому відмічено характерну динаміку: експресія різко зростає через 2 год після впливу, а потім починає спадати [8]. В іншому дослідженні, де також імітували умови гострого водного дефіциту, спостерігали подібну динаміку експресії *DREB2A* [15]. У разі пролонгова-

ного водного стресу (у цьому досліді рослини віком 3 тижні не поливали протягом 2 тижнів) також зафіксовано значне зростання експресії *DREB2A* [14]. Водночас відомі й інші дані, які свідчать про відсутність зростання експресії *DREB2A* при водному дефіциті. Так, у роботі [1] показано, що він експресується і за нормальних умов росту, а при осмотичному стресі активується внаслідок посттрансляційної модифікації. Непрямим підтвердженням цього є і відсутність фенотипових змін у інсерційного мутанта за *DREB2A* Т-ДНК при водному стресі [14]. Причиною відсутності істотних змін в експресії *DREB2A* в нашому досліді могла бути, зокрема, надлишковість членів родини DREB2. Пошук у базі даних геному *Arabidopsis* виявив принаймні сім гомологів *DREB2A*, хоча автори й припускають, що *DREB2A* та *DREB2B* є головними ТФ [27, 28]. Іншою причиною, як уже зазначалося, могла бути швидкоплинність зростання експресії *DREB2A* при гострому стресі: вона досягала максимуму через 2 год після початку впливу, а далі поступово спадала [8]. Таким чином, ймовірно припустити, що в нашому випадку тимчасове зростання експресії не зафіксоване, оскільки вимірювання проводили з інтервалом у 24 год. Ще однією причиною могла стати регуляція активності *DREB2A* на посттрансляційному рівні, а не лише на рівні експресії. Про це свідчать численні дані, зокрема [15].

З літератури відомо, що 14 генів є безпосередніми мішенями DREB2A. Дев'ять з них кодуєть білки пізнього ембріогенезу, які захищають макромолекули, такі як ферменти і ліпіди, від дегідратації. Всі ці гени містять послідовності DRE в своїх промоторах [8, 28].

RD17 є одним із генів – мішеней для DREB2A, елементом АБК-незалежного шляху. Як впливає з даних рис. 1, суттєвих змін в експресії *RD17* протягом експерименту не відмічено. В цілому рівень експресії виявився вищим за контрольний, окрім 2-го дня, проте зростання експресії при стресі порівняно з контролем не було більшим, ніж у 2 рази. Зіставляючи наші дані щодо впливу умов гострого водного дефіциту з літературними, бачимо більші відмінності між стресом і контролем в останніх. Так, у досліді авторів роботи [8] відносна експресія *RD17* досягала значень понад 15, хоч і зазнавала

значних коливань протягом експерименту. Таким чином, можна зробити висновок про відсутність необхідності у підвищенні експресії *RD17* за умов пролонгованого водного стресу.

І, нарешті, результати вивчення експресії *ERD1*, який є елементом окремого АБК-незалежного шляху передачі сигналу при водному стресі [1], демонструють, що зростання експресії цього гена при водному стресі відсутнє (рис. 1). Навпаки, нижчу експресію *ERD1* спостерігали при водному стресі порівняно з контролем протягом усього експерименту, за винятком 2-го дня. На підставі одержаних даних можна припустити, що роль даного білка не є суттєвою при пролонгованому водному стресі на відміну від гострого дефіциту, коли має місце зростання експресії *ERD1* до 7 разів [8].

Висновки. Отже, як свідчать проведені експерименти, рослини *A. thaliana* пластично реагують на зниження вологості ростового субстрату. Це підтверджується, зокрема, підвищенням експресії АБК-залежних генів *RD29A* та *AtP5CS*. Водночас значення експресії цих генів не досягають рівня, характерного для умов гострого водного дефіциту. При цьому рівень експресії *AtP5CS* корелює з отриманими даними про рівень проліну в проростках *A. thaliana*, що є додатковим свідченням ключової ролі ферменту Δ -1-піролідин-5-карбоксилатсинтази в синтезі проліну. Що стосується *DREB2A*, *RD17* та *ERD1* – генів, незалежних від АБК, – то істотного підвищення експресії за умов стресу порівняно з контролем не визначено.

J. A. Bobrownyszky

Expression of some water stress-induced genes in the seedlings of *Arabidopsis thaliana* grown under conditions of moderate water deficit

M. G. Kholodny Institute of Botany NAS of Ukraine
2, Tereshchenkivska Str., Kyiv, Ukraine, 01601

Summary

Aim. In this study we have analyzed the expression of some water stress-inducible genes of *Arabidopsis*. **Methods.** A method of growing the *A. thaliana* seedlings at slowly lowering water potential on an agar-solidified medium was used. Gene expression was analyzed using a method of real-time PCR. **Results.** We have detected an increased expression of *RD29A* and *AtP5CS*, two ABA-dependent genes. At the same time, their expression did not reach the level observed in the experiments where the conditions of

acute water stress were imposed. The levels of expression of *AtP5CS* correlated with the concentration of proline in the seedlings of *A. thaliana*. However, there was not detected a significant increase in the expression of *DREB2A*, *RD17* and *ERD1*, three ABA-independent genes. **Conclusions.** The pattern of gene expression under conditions close to natural ones may differ from that observed under an acute water stress.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, gene expression, water deficit, real-time PCR, proline.

Ю. А. Бобровницкий

Экспрессия некоторых генов, индуцируемых водным стрессом, в проростках *Arabidopsis thaliana*, выращенных в условиях умеренного водного дефицита

Резюме

Цель. Исследовать экспрессию некоторых генов, индуцируемых водным стрессом. **Методы.** Проростки выращивали на агаризованной среде при медленно снижающемся водном потенциале. Для определения экспрессии генов использован метод ПЦР в реальном времени. **Результаты.** Обнаружено умеренное повышение экспрессии *RD29A* и *AtP5CS* – двух АБК-зависимых генов, которое не было таким значительным, как в экспериментах, где проростки выращивали при остром водном дефиците. Уровень экспрессии *AtP5CS* коррелировал с содержанием пролина в проростках *A. thaliana*. При этом не выявлено существенного возрастания экспрессии *DREB2A*, *RD17* и *ERD1* – трех АБК-независимых генов. **Выводы.** Характер экспрессии генов в условиях, близких к естественным, может отличаться от наблюдаемого при остром водном стрессе.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, экспрессия генов, водный дефицит, ПЦР в реальном времени, пролин.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance // J. Exp. Bot.–2007.–**58**, N 2.–P. 221–227.
2. Bray E. A. Plant responses to water deficit // Trends Plant Sci.–1997.–**2**, N 2.–P. 48–54.
3. Hasegawa P. M., Bressan R. A., Zhu J. K., Bohnert H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.–2000.–**51**.–P. 463–499.
4. Ingram J., Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.–1996.–**47**.–P. 377–403.
5. Thomashow M. F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.–1999.–**50**.–P. 571–599.
6. Eisen M. B., Brown P. O. DNA arrays for analysis of gene expression // Meth. Enzymol.–1999.–**303**.–P. 179–205.
7. Schena M., Shalon D., Davis R. W., Brown P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray // Science.–1995.–**270**, N 5235.–P. 467–470.
8. Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., Oono Y., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T., Satou M., Akiyama K., Taji T., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Kawai J., Hayashizaki Y., Shinozaki K. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought,

- cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray // *Plant J.*—2002.—**31**, N 3.—P. 279–292.
9. Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to drought and cold stress // *Curr. Opin. Biotechnol.*—1996.—**7**, N 2.—P. 161–167.
 10. Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Gene expression and signal transduction in water-stress response // *Plant Physiol.*—1997.—**115**, N 2.—P. 327–334.
 11. Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways // *Curr. Opin. Plant Biol.*—2000.—**3**, N 3.—P. 217–223.
 12. Zhu J. K. Cell signaling under salt, water and cold stresses // *Curr. Opin. Plant Biol.*—2001.—**4**, N 5.—P. 401–406.
 13. Horak C. E., Snyder M. Global analysis of gene expression in yeast // *Funct. Integr. Genomics.*—2002.—**2**, N 4–5.—P. 171–180.
 14. Sakuma Y., Liu Q., Dubouzet J. G., Abe H., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factor involved in dehydration- and cold-inducible gene expression // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*—2002.—**290**, N 3.—P. 998–1009.
 15. Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain, separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis* // *Plant Cell.*—1998.—**10**, N 8.—P. 1391–1406.
 16. Sakuma Y., Maruyama K., Qin F., Osakabe Y., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*—2006.—**103**, N 49.—P. 18822–18827.
 17. Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor // *Nat. Biotechnol.*—1999.—**17**, N 3.—P. 287–291.
 18. Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress // *Plant Cell.*—1994.—**6**, N 2.—P. 251–264.
 19. Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters // *Trends Plant Sci.*—2005.—**10**, N 2.—P. 88–94.
 20. Zhou G.-A., Chang R.-Zh., Qiu L.-J. Overexpression of soybean ubiquitin-conjugating enzyme gene *GmUBC2* confers enhanced drought and salt tolerance through modulating abiotic stress-responsive gene expression in *Arabidopsis* // *Plant Mol. Biol.*—2010.—**72**, N 4–5.—P. 357–367.
 21. Kishor P. B. K., Hong Z., Miao C. H., Hu Ch.-A.A., Verma D. P. S. Overexpression of Δ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants // *Plant Physiol.*—1995.—**108**, N 4.—P. 1387–1394.
 22. Simpson S. D., Nakashima K., Narusaka Y., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence // *Plant J.*—2003.—**33**, N 2.—P. 259–270.
 23. Peltier J.-B., Ytteberg J., Liberles D. A., Roepstorff P., van Wijk K. J. Identification of a 350-kDa ClpP protease complex with 10 different Clp isoforms in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* // *J. Biol. Chem.*—2001.—**276**, N 19.—P. 16318–16327.
 24. Bates S. L., Waldren R. P., Teare I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // *Plant and Soil.*—1973.—**39**, N 1.—P. 205–207.
 25. Kim J.-M., To T. K., Ishida J., Morosawa T., Kawashima M., Matsui A., Toyoda T., Kimura H., Shinozaki K., Seki M. Alterations of lysine modifications on the histone H3 N-tail under drought stress conditions in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Physiol.*—2008.—**49**, N 10.—P. 1580–1588.
 26. Yoshida Y., Kiyosue T., Katagiri T., Ueda H., Mizoguchi T., Yamaguchi-Shinozaki K., Wada K., Harada Y., Shinozaki K. Correlation between the induction of a gene for Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress // *Plant J.*—1995.—**7**, N 5.—P. 751–760.
 27. Nakashima K., Shinwari Z. K., Sakuma Y., Seki M., Miura S., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Organization and expression of two *Arabidopsis* DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression // *Plant Mol. Biol.*—2000.—**42**, N 4.—P. 657–665.
 28. Sakuma Y., Maruyama K., Osakabe Y., Qin F., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression // *Plant Cell.*—2006.—**18**, N 5.—P. 1292–1309.

UDK 582.736.3
Received 30.07.10