

УДК 577.2+573.55

UDC 577.2+573.55

06.01.00 Агронмия

Agronomy

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЁРЫ ЭФФЕКТА
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ «ГЕНОТИП-СРЕДА» У
РАСТЕНИЙ НА ОСНОВЕ
ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ РАСПАДА мРНК *IN
VIVO* (РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ) И *IN VITRO*
(ОММП-СИСТЕМА)**

**MOLECULAR MARKERS OF THE EFFECT
OF INTERACTION "GENOTYPE-
ENVIRONMENT" IN PLANTS ON THE BASIS
OF THE DECAY OF mRNA IN VIVO (RNAi)
AND IN VITRO (OMMP-SYSTEM)**

Плотников Владимир Константинович
д.б.н., доцент
vkrbio21@mail.ru
ID: 3971-2200

Plotnikov Vladimir Konstantinovich
Dr.Sci.Biol., Associate Professor
vkrbio21@mail.ru
ID: 3971-2200

Салфетников Анатолий Алексеевич
д.с.-х.н., профессор
Salfetnikov39@mail.ru
ID: 428377
Кубанский государственный аграрный университет,
Краснодар, Россия

Salfetnikov Anatoliy Alexeevich
Dr.Sci.Agr., Professor
Salfetnikov39@mail.ru
ID: 428377
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

Насонов Андрей Иванович
к.б.н.
nasoan@mail.ru
Scopus ID – 56989221000,
Researcher ID – K-9142-2017

Nasonov Andrey Ivanovich
Cand.Biol.Sci.
nasoan@mail.ru
Scopus ID – 56989221000,
Researcher ID – K-9142-2017

Ненько Наталья Ивановна
д.с.-х.н., профессор
nenko.nataliya@yandex.ru
ID: 2257-0373
Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение Северо-Кавказский Федеральный
научный центр садоводства, виноградарства,
виноделия, Краснодар, Россия

Nenko Natalia Ivanovna
Dr.Sci.Agr., Professor
nenko.nataliya@yandex.ru
ID: 2257-0373
Federal State Budgetary Scientific Institution North
Caucasian Federal scientific center for horticulture,
viticulture, winemaking, Krasnodar, Russia

Обзорно-теоретическая статья посвящена рассмотрению гипотетических возможностей разработки молекулярно-кинетических маркеров сельскохозяйственных растений, позволяющих количественно оценивать эффект взаимодействия «генотип-среда» на основе исследований стабильности мРНК. В основу предполагаемой разработки положены результаты исследований тождества распада мРНК *in vivo* и *in vitro* (система *ommp*), а также широко исследуемое у растений явление РНК-интерференции (РНКи). Система *ommp* позволила установить взаимосвязь сортоспецифической ростовой реакции на действие низких положительных температур, обезвоживания, засоления, освещения и биологически активных веществ со стабильностью суммарной и ряда ген-специфических мРНК зелёных и этиолированных проростков озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и озимого ячменя (*Hordeum vulgare* L.). Аналогичные исследования стабильности мРНК были проведены на созревающем зерне кукурузы (*Zea mays* L.), где, в частности, установлено

This overview and theoretical article deals with the consideration of hypothetical possibilities for the development of molecular-kinetic markers of agricultural plants allowing to quantify the effect of genotype-environment interaction on the basis of stability studies of mRNA. The development in view is based on the results of studies of the mRNA decay identity *in vivo* and *in vitro* (the *ommp* system), as well as the phenomenon of RNA interference (RNAi), widely studied in plants. The *ommp* system has allowed to establish the relationship of the cultivar-specific growth reaction to the effects of low positive temperatures, dehydration, salinity, illumination and biologically active substances with the stability of the total and a number of gene-specific mRNAs of green and etiolated seedlings of winter soft wheat (*Triticum aestivum* L.) and winter barley (*Hordeum vulgare* L.). Similar studies of mRNA stability have been conducted on ripening grains of maize (*Zea mays* L.), with a particular result of the *in vivo* and *in vitro* decay identity confirmed for major mRNAs of stored proteins, 19

тождество распада *in vivo* и *in vitro* мажорных мРНК запасных белков зеинов 19 и 22 кДа обычной кукурузы и мутантной по регуляторному гену *opaque-2*, изменяющему количество и стабильность мРНК зеинов в созревающем зерне высоколизиновой кукурузы. Регуляторный ответ организма через РНКи также является множественным и включает в себя нейтрализацию вирусной и бактериальной инфекции, реакцию на патогены и биологически активные вещества, циркадные ритмы, водный стресс, гипоксию, механический стресс, минеральное питание, солевой стресс и изменение температуры. Неблагоприятные воздействия окружающей среды приводят к повышению или снижению экспрессии определённых микроРНК (миРНК). Изменение стабильности мРНК является важнейшим компонентом системы регуляции экспрессии генов в клетках эукариот. Главные детерминанты стабильности мРНК находятся в 3'-нетранслируемой области. Это последовательность (U)_nA и степень полиаденилирования мРНК, т.е. длина её терминальной гомонуклеотидной цепи. Именно к этой области молекулы мРНК комплементарны миРНК. Важнейшим компонентом, в значительной мере определяющий закономерности взаимодействия «генотип-среда», является полиаденилированная последовательность на 3'-конце мРНК. Её длина зависит как от генотипа, так и от условий окружающей среды. Есть данные, свидетельствующие о том, что степень полиаденилирования мРНК определяет вторичную структуру молекулы. Как известно, деаденилирование мРНК снижает время её жизни, а при достижении величины поли-А-хвоста в несколько десятков нуклеотидов происходит взрывной распад молекулы мРНК. Следовательно, представляется логичной схема распада мРНК в ивой клетке: укорочение поли-А-хвоста мРНК открывает сайты взаимодействия миРНК с 3'-некодирующей областью молекулы мРНК, что приводит к её деградации. Таким образом, можно предполагать, что в основе разрабатываемых молекулярно-кинетических маркёров лежит процесс взаимодействия мРНК и миРНК в *ommp*-системе

Ключевые слова: МОЛЕКУЛЯРНО-КИНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЁРЫ, КУКУРУЗА, *ZEA MAYS L.*, ПШЕНИЦА, *TRITICUM AESTIVUM L.*, ЯЧМЕНЬ, *HORDEUM VULGARE L.*, СТАБИЛЬНОСТЬ МРНК, *OMMP*-СИСТЕМА, РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ (РНКИ), МИКРОРНК (МИРНК), ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА РНК

Doi: 10.21515/1990-4665-141-012

and 22 kDa zeins, of normal maize and mutant according to the regulatory gene *opaque-2*, changing the amount and stability of zein mRNA in the maturing grain of high-lysine maize. Regulatory response of the organism through RNAi is also multiple and includes neutralization of viral and bacterial infections, reaction to pathogens and biologically active substances, circadian rhythms, water stress, hypoxia, mechanical stress, mineral nutrition, salt stress and temperature changes. Unfavorable environmental influences result in an increase or decrease in the expression of certain microRNAs (miRNAs). The change in mRNA stability is an important component of the gene expression regulation system in eukaryotic cells. The main determinants of mRNA stability are in the 3'-untranslated region. It is the (U)_nA sequence and the degree of polyadenylation of mRNA, i.e. length of its terminal homonucleotide chain. It is to this region that mRNA molecules are complementary to miRNA. The most important component, which largely determines the regularity of the genotype-environment interaction, is the polyadenyl sequence at the 3' end of the mRNA. Its length depends both on the genotype and on the environmental conditions. There is evidence that polyadenylation degree of mRNA determines the secondary structure of the molecule. As is known, deadenylation of mRNA reduces its lifetime, and when the poly-A-tail reaches several dozens of nucleotides, an explosive disintegration of the mRNA molecule occurs. Consequently, in a living cell the following mRNA decomposition scheme appears to be logical: shortening the poly-A-tail of the mRNA opens the sites of miRNA interaction with the 3'-non-coding region of the mRNA molecule, which causes its degradation. Thus, it is safe to assume that the interaction of mRNA and miRNA in the *ommp* system is the underlying process for molecular-kinetic markers under development

Keywords: MOLECULAR-KINETIC MARKERS, MAIZE, *ZEA MAYS L.*, WHEAT, *TRITICUM AESTIVUM L.*, BARLEY, *HORDEUM VULGARE L.*, MRNA STABILITY, *OMMP*-SYSTEM, RNA INTERFERENCE (RNAI), MICRORNAS (MIRNAS), SPATIAL STRUCTURE OF RNA

«Это, если позволено так сказать, "интрамолекулярная интеграция".

Важнейшей особенностью такого типа интеграции является то, что здесь приобретение биологическим объектом нового качества - трёхмерной пространственной конфигурации - сопровождается появлением новых свойств первостепенной важности».

Академик АН СССР В.А.Энгельгардт [35]

Введение

Сорт растений как основа технологии возделывания любой культуры является результатом сложного взаимодействия "генотип-среда", поскольку может реализовать продукционный потенциал и технологические качества только в конкретных средовых условиях. При этом под средой подразумевается широкий круг факторов - от температуры и влажности, почвенно-климатических и технологических условий возделывания, до влияния космоса и неизвестных пока человеку факторов, т.е. от агрофизики до астрологии. Эти наблюдения частично укладываются в следующую формулу: "Фенотип есть продукт взаимодействия среды и генотипа".

Фактически создание сорта предполагает не только получение и отбор новых генотипов, но и поиск экологической ниши, где этот генотип обеспечит высокую продуктивность, экологическую стабильность и качество продукции как основные цели селекции. Таким образом, селекционер, по сути, не изучает и отбирает генотипы как таковые, а оценивает их норму реакции на абиотические, биотические и антропогенные факторы среды.

Гениальность Н.И. Вавилова заключалась уже в том, что он понял взаимосвязь между, казалось бы, такими далёкими друг от друга направлениями человеческой деятельности, как генетика, прикладная

ботаника и сельскохозяйственная практика. Центральный момент этой взаимосвязи - закономерности взаимодействия "генотип-среда".

В реальной жизни это вылилось в "географические посевы" (районирование), в географический принцип Н.И. Вавилова. Что такое генотип? Это можно и нужно изучать. Но его взаимодействие со средой очевидно и практически значимо уже в настоящий момент.

Принципиально новые перспективы для селекции появились с разработкой биохимических и молекулярных маркёров. ДНК-овые и белковые маркёры являются чрезвычайно эффективным инструментом генетических исследований эукариот. Однако их статичность не позволяет количественно оценить важнейшие свойства организмов (стрессоустойчивость, реакцию на биологически активные вещества, циркадные ритмы и т.д.). Как познание электричества и развитие электротехники стало возможным только с появлением электродинамики, так и статичные молекулярные маркёры должны быть существенно дополнены молекулярно-кинетическими (биологическими) маркёрами, способными количественно оценить экспрессию основных регуляторных генов или дать интегральную характеристику всех экспрессирующихся генов определённого генотипа в конкретных условиях роста.

Возможности разработки молекулярно-кинетических маркёров появились в 1996-1998 годах в связи с установлением тождества магний-зависимого распада мРНК *in vivo* и *in vitro* [16-21, 23, 25, 43] и открытием явления РНК-интерференции [39]. В настоящей статье рассматривается возможная взаимосвязь этих двух явлений и перспективы дополнения «географических посевов» лабораторными количественными оценками эффекта взаимодействия «генотип-среда» на основе исследований стабильности мРНК.

Стабильность мРНК как основа молекулярно-кинетических маркёров

Изменение стабильности мРНК является важнейшим компонентом системы регуляции экспрессии генов в клетках эукариот. Методы генной инженерии позволили установить многие цис-факторы и транс-факторы, определяющие стабильность мРНК эукариот.

Факторы, определяющие стабильность рРНК и тРНК, изучены гораздо слабее. Однако, несомненно, что, важнейшими составляющими системы регуляции стабильности РНК являются рибонуклеазы и катионы магния. Оба этих фактора относятся к транс-факторам стабильности, т.е. факторам, наличие и количество которых определяются эффектом взаимодействия «генотип-среда», в отличие от основной массы цис-факторов, определяемых первичной структурой РНК, т.е. только генотипом.

Однако среди цис-факторов есть важнейший компонент, в значительной мере определяющий закономерности взаимодействия «генотип-среда». Это полиадениловая последовательность на 3'-конце мРНК (поли-А-хвост). Её длина зависит как от генотипа, так и от условий окружающей среды.

Биологическое значение поли-А-хвоста мРНК очень велико. Длина его прямо пропорционально определяет, как время жизни мРНК, так и её трансляционную активность, т.е. является энхансером трансляции [15, 25, 33].

Оттр-система оценки стабильности мРНК

В 1996-1998 годах было показано тождество закономерностей Mg-зависимого распада мРНК в живой клетке (*in vivo*) и в водных растворах (*in vitro*) [16-21, 43]. Это было сделано в ходе исследований с применением двуциклической аффинной хроматографии РНК на поли-(У)-сефарозе, которая является основным методом, позволяющим отделить полиаденилированную мРНК от общего пула РНК клетки.

Суть метода, как известно, состоит в том, что препарат тотальной РНК пропускают через колонку с аффинным носителем в растворе, содержащим относительно высокую концентрацию соли. В этих условиях полимеры носителя (поли-У) гибридизуются с поли-(А)⁺-мРНК и связывают её; рибосомная и транспортная РНК не связываются с аффинным сорбентом. Поли-(А)⁺-мРНК элюируется с колонки слабосолевым раствором при повышенной температуре (50-60°C). Существенным моментом выделения мРНК является возможность доочистки ее от неспецифической примеси рибосомной РНК путем повторного цикла аффинной хроматографии, т.е. получения поли-(А)⁺⁺-мРНК.

В ходе выделения суммарной и ряда ген-специфических мРНК из проростков пшеницы, ячменя и созревающего зерна кукурузы были отмечены систематические изменения процентного выхода поли-(А)⁺⁺-мРНК от количества поли-(А)⁺-мРНК, названного индексом стабильности мРНК (ИС мРНК), отражающим особенности генетики и физиологического состояния растения.

В дальнейшем на примере ряда ген-специфических мРНК было показано тождество распада мРНК *in vivo* (при блокаде транскрипции актиномицином Д) и *in vitro* (при инкубации водного раствора РНК при положительных температурах) зелёных проростков озимой мягкой пшеницы и созревающего зерна кукурузы. Таким образом появилась возможность разработки молекулярно-кинетических маркёров, позволяющих количественно оценивать эффект взаимодействия «генотип-среда», то есть, норму реакции организма, изменение которой является основной целью селекции.

Была показана сортоспецифичность действия низких положительных температур [1], зависимость от температуры, обезвоживания, засоления [16, 25], освещения [20, 25] и биологически активных веществ [1, 20, 21,

25] на стабильность суммарной и ряда ген-специфических мРНК в ходе формирования закономерностей роста зелёных и этиолированных проростков озимой мягкой пшеницы и ячменя [25]. Установлено тождество распада мРНК зеинов 19 и 22 кДа *in vivo* и *in vitro* созревающего зерна обычной кукурузы и имеющей мутацию по регуляторному гену *opaque-2*, изменяющей количество и стабильность мРНК запасных белков (зеинов) в эндосперме [14, 33, 34, 43].

Практически на всех биологических объектах (злаки: созревающее зерно кукурузы и пшеницы; проростки пшеницы и ячменя; животные : печень крыс и поросят) наблюдалась положительная взаимосвязь между длиной поли-А-хвоста мРНК и её стабильностью [33].

Исключением являлось лишь созревающее зерно кукурузы, мутантной по регуляторному гену *opaque-2*. Здесь наблюдалась стабилизация мРНК при сравнительно низкой степени полиаденилирования мРНК [13]. Это теоретически объясняется тем, что в условиях существенно повышенной активности РНКаз (в 2-11 раз, в зависимости от линии кукурузы), которая имеет место в созревающем зерне мутанта *opaque-2*, уничтожение короткоживущих регуляторных РНК (возможно РНК-интерференции) приводит к относительной стабилизации оставшихся мРНК. Важно отметить, что скорость деаденилирования мРНК варьирует в разных клетках и тканях, т.е. стабильность мРНК зависит не только от длины поли-А-хвоста, но и от скорости его укорачивания [15, 25].

Этот простой метод оценки относительной стабильности мРНК получил название *ommp*-системы, от латинского выражения “*omnia tua tecum porto*” – «все свое ношу с собой», так как есть основания предполагать наличие у самих молекул мРНК всех необходимых для дифференциального распада факторов, устойчивых к действию депротенинирующих агентов, традиционно используемых для очистки

РНК (фенол, хлороформом, додецилсульфат натрия, протеиназа К, диэтилпирокарбонат и др.).

Система не зависит полностью от основного клеточного метаболизма, хорошо воспроизводима и позволяет проводить исследования относительной стабильности как суммарной, так и ген-специфической мРНК на широком биологическом материале (как растений, так и животных) в сравнительно простых экспериментах [25, 31].

Работы по изучению закономерностей Mg-зависимого распада *in vitro* позволили понять особенности молекулярной биологии шедевра селекции сорта озимой мягкой пшеницы Безостая 1 [28], привели к разработке лабораторного метода оценки физиологического состояния [16], а также простых лабораторных методов оценки морозоустойчивости озимой мягкой пшеницы [25, 27, 28] и озимого ячменя [26, 29]. Существенный вклад *оттр*-система внесла в исследования молекулярного механизма действия мутации регуляторного гена *opaque-2*, в созревающем зерне высоколизиновой кукурузы [25, 33, 43].

РНК-интерференция

В 1998 году была обнаружена способность молекул двухцепочечных РНК (дцРНК), инъецированных в организм нематоды *Caenorhabditis elegans*, эффективно подавлять экспрессию гомологичных по нуклеотидной последовательности генов (*явление РНК-интерференции*) [39].

Впоследствии те же эффекты дцРНК были отмечены у других животных, а также у растений, грибов и простейших.

В 2006 году Нобелевская премия в области биологии (по физиологии и медицине) присуждена американским учёным Эндрю Файру и Крейгу Меллоу за открытие явления *РНК-интерференции*, представляющей собой молекулярный механизм, контролирующий в живой клетке поток

генетической информации через закономерный распад специфических мРНК и предоставляющий принципиально новые возможности регуляции экспрессии генов в практических целях [40, 42].

Суть явления, механизм которого изучен ещё слабо, состоит в том, что короткие (20-30 нуклеотидов) двуспиральные РНК определённой структуры вызывают распад мРНК мишени - гена, экспрессию которого необходимо подавить. Это широко распространённое в природе явление (по-видимому, от бактерий до млекопитающих) может эффективно использоваться для идентификации новых генов, выяснения их функциональной роли и управления их экспрессией *in vitro* и *in vivo*.

Как и мРНК, РНКi подвергаются процессингу и полиаденилированию. Известные к настоящему времени особенности биогенеза РНКи многократно описаны [2, 3, 4, 7, 11, 12, 41, 44].

Результаты исследований этого явления позволяют в настоящее время решать проблемы медицины (новый класс лекарств, новые методы диагностики заболеваний) и многие задачи, стоящие перед сельскохозяйственной наукой, в первую очередь перед растениеводством.

МикроРНК (миРНК) – ключевой компонент растительной клетки, который участвует в развитии растения, регулирует взаимодействие растения с компонентами окружающей среды и способен к саморегуляции. Знание молекулярных механизмов действия miРНК может стать эффективным инструментом в руках селекционеров, позволяющим активно вмешиваться в формирование количества и качества сельскохозяйственной продукции.

В практическом плане РНК-интерференция также является мощным инструментом в создании растений-продуцентов новых ценных метаболитов и промышленного сырья. Такие трансгенные растения имеют перспективы стать безопасными и экономически выгодными объектами для получения разнообразных биологически активных веществ,

фармацевтического, сельскохозяйственного и промышленного применения [32].

Регуляция экспрессии генов посредством миРНК – один из центральных механизмов ответа растения на биотические и абиотические стрессы. Список воздействий, запускающих регуляторный ответ организма через miРНК, включает в себя нейтрализацию вирусной и бактериальной инфекции, реакцию на патогены и биологически активные вещества, циркадные ритмы, водный стресс, гипоксию, механический стресс, минеральное питание, солевой стресс и изменение температуры. Неблагоприятные воздействия окружающей среды приводят к повышению или снижению экспрессии определённых миРНК. Адаптивный ответ растений на стрессы – сложная, многокомпонентная система. Функции миРНК направлены на достижение физиологического баланса в растении [3, 7, 11, 12].

Кроме того, эти исследования важны как для решения теоретических проблем, связанных с пониманием закономерностей развития и созревания зерна, молекулярных механизмов синтеза запасных белков и крахмала, так и для практического создания сортов и линий, улучшенных по питательной и технологической ценности [36].

Впервые растительные РНКи были обнаружены в 2002 году у *Arabidopsis thaliana*. На сегодняшний день известно более 10 000 миРНК из 121 вида растений [3]].

О возможной взаимосвязи степени полиаденилирования мРНК, её пространственной структуры и взаимодействия с РНКi

Матричные РНК цитоплазмы помимо кодирующей области имеют на 5'-конце структуру, состоящую из метилированного гуанина - "кэп", который присоединяется к нативной молекуле посттранскрипционно. Между кэпом и иницирующим AUG-триплетом расположена 5'-концевая

нетранслируемая, (некодирующая) или лидерная, последовательность нуклеотидов. Значительная часть мРНК эукариот имеет на 3'-конце полиаденилированную последовательность (поли-А-хвост) длиной до 200 адениловых остатков, присоединяемую также посттранскрипционно. Между терминирующим кодоном (UGA, UAG, UAA) и поли-А-хвостом находится 3'-концевая нетранслируемая некодирующая область, обогащённая последовательностями $(U)_nA$.

Распад любой молекулы мРНК *in vivo* обусловлен двумя группами факторов: 1) особенностями структуры самой молекулы, определяемой взаимодействием 5'-нетранслируемой, кодирующей и 3'- нетранслируемой частями молекулы (цис-фактор) и 2) локализацией мРНК, делающей её особенно чувствительной к РНКазам, активностью РНКаз, а также наличием в клетке прочих стабилизирующих и дестабилизирующих факторов, среди которых доминирующими, возможно, являются РНКi (транс-фактор).

Кодирующая и 5'-нетранслируемая области имеют нуклеотидные последовательности, детерминирующие время жизни мРНК. Однако главные детерминанты стабильности мРНК находятся в 3'-нетранслируемой области. Это последовательность $(U)_nA$ и степень полиаденилирования мРНК, т.е. длина её терминальной гомонуклеотидной цепи поли-(А)-хвоста.

Стабильность мРНК зависит от содержания аденина и урацила в 3'-нетранслируемом сегменте: чем оно выше, тем быстрее деградирует мРНК. Предполагалось, что какие-нибудь рибонуклеазы (или другие белки, которые, связываясь с мРНК, способствуют работе рибонуклеаз) узнают участок молекулы, богатый аденином и урацилом [25]. Однако теперь известно, что именно к этой области молекулы мРНК комплементарны РНКi (рис.1) [25, 12, 41,33].

Формально молекулы мРНК представляют собой цепь мономеров. Это линейное образование, объект, обладающий одним измерением. Фактически же в естественных условиях линейный характер этого образования исчезает, и оно приобретает пространственную, трехмерную конфигурацию, строго фиксированного характера.

Стабильные и нестабильные молекулы мРНК различаются степенью сложности вторичной и третичной структур. Известно, что *in vitro* пространственная структура РНК лабильна и легко меняется под влиянием температуры и ионного окружения. Вероятно, это свойство РНК играет существенную роль и в её функционировании *in vivo*.

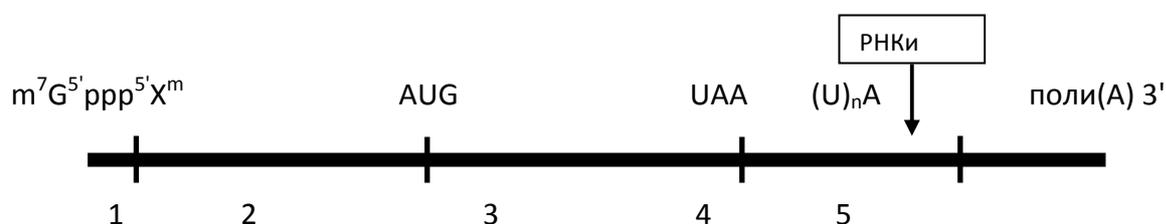


Рис. 1. Схема молекулярной организации мРНК эукариот

- 1 – $m^7G^{5'}ppp^{5'}X^m$ – кЭП
- 2 - 5' -концевая не транслируемая область;
- 3 - кодирующая область;
- 4 - 3'-концевая гетерополимерная область (здесь преимущественно осуществляется контакт с РНКи);
- 5 – поли-А-хвост

Есть данные, свидетельствующие о том, что степень полиаденилирования мРНК, т.е. длина её поли-А-хвоста, участвует в определении вторичной структуры молекулы [38]. Инкубация РНК в системе *оттр* приводит к деаденилированию мРНК. Известно, что этот процесс является первым этапом разрушения мРНК [15, 25].

Поэтому на первых этапах инкубации РНК в системе *оттр* укорачивание поли-А-хвоста приводит к распаду короткоживущих мРНК, но только к раскрытию структуры долгоживущих мРНК, что

обуславливает появление новых сайтов гибридизации с радиоактивно мечеными олигонуклеотидами при молекулярной гибридизации (рис. 2) или с праймерами при ОТ-ПЦР (табл. 1).

Поэтому распад мРНК в экспериментах *in vivo* и инкубация *in vitro* в *ommp* системе часто приводят к тому, что для стабильных мРНК абсолютные значения результатов гибридизации оказываются выше контрольных, т.е. выше 100 % (рис. 2).

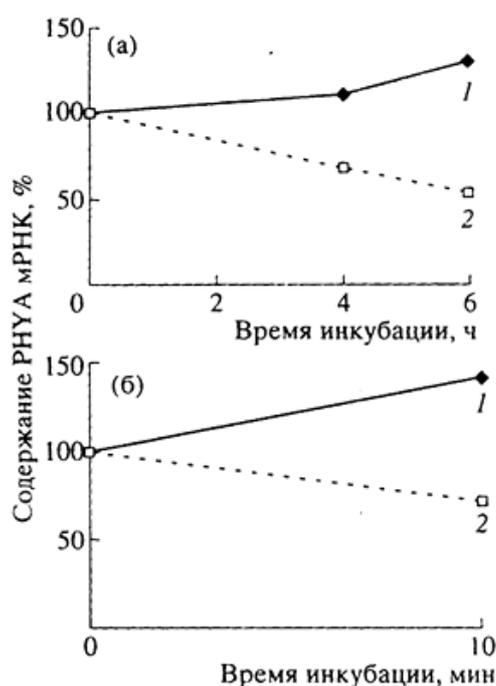


Рис. 2. Стабильность мРНК РНУА (фитохрома А) этиолированных проростков озимой мягкой пшеницы Краснодарская 39 (1) и озимого ячменя Бастион (2) *in vivo* (а) и *in vitro* (б).

а - распад мРНК РНУА в условиях блокады транскрипции генов актиномицином Д; б - распад мРНК РНУА в ходе инкубирования водных препаратов суммарной Mg^{++} -содержащей РНК в течение 10 мин при $65^{\circ}C$. Сэндвич-гибридизация мРНК с радиоактивно меченым олигонуклеотидным зондом на поли-У-сефарозе. За 100% принята суммарная радиоактивность контрольного препарата [20].

Для изучения судьбы специфических мРНК при распаде *in vivo* и в системе *ommp* (*in vitro*) использовали четыре метода: 1) дот-блот гибридизацию в случае зеинов созревающего зерна кукурузы [14]; 2) молекулярную гибридизацию радиоактивно меченного олигодезоксинуклеотидного зонда с мРНК непосредственно на колонке

поли-У-сефарозы [17-20]; 3) аналогичную гибридизацию в растворе [1]; 4) метод ОТ-ПЦР (обратная транскрипция-полимеразная цепная реакция) [34].

У каждого из этих методов есть свои достоинства и свои недостатки. При дот-гибридации часть детектируемых молекул экранируется большой массой других РНК, что снижает чувствительность метода и ограничивает его применение. Метод гибридизации на колонке поли-У-сефарозы является разновидностью метода «сэндвич-гибридации», гармонично сочетающая в себе достоинства гибридизации в растворе (высокая чувствительность) и гибридизации на фильтрах (отсутствие проблем с удалением не связавшегося

Таблица 1. Влияние закалывающей температуры (4°С) на стабильность мРНК субъединицы α фактора элонгации трансляции (eEF-1 α) зелёных 4-х суточных проростков озимой мягкой пшеницы, определённую различными методами [25, 33].

Сорт	Температура, °С	Гибридизация		ОТ-ПЦР ИС, %				
		поли(А) ⁺ мРНК на поли(У)-сефарозе ИС, %	мРНК в растворе ИС, %	Синтез кДНК				
				с oligo-d(T) ₁₂	с праймерами		LR	RR
					LL/RL	RL/RR		
Зимородок (высокая морозоустойчивость)	20	90	99	62	83	89	109	
	4	284	134	70	202	97	95	
Безостая 1 (средняя морозостойчивость)	20	230	124	85	126	240	-	
	4	85	85	63	71	124	-	

радиоактивно меченого зонда). Метод ОТ-ПЦР обладает высокой чувствительностью и позволяет обходиться без радиоактивной метки. Первые два метода и метод ОТ-ПЦР давали сходные результаты при изучении стабильности мРНК зеинов [25].

При использовании методов 2, 3 и 4 результаты исследований в значительной мере определяются конформационным состоянием молекулы мРНК и зависят от степени её полиаденилирования. Все три метода показали, что стабилизация мРНК под влиянием различных экзогенных и эндогенных факторов приводит к снижению, а дестабилизация – к увеличению эффективности гибридизации контрольных образцов. Деаденилирование приводит к плавлению трехмерной структуры мРНК и появлению дополнительных сайтов гибридизации. Для стабильной мРНК эффект плавления структуры превышает эффект распада мРНК, в то время как у нестабильных мРНК эффект плавления практически не заметен на фоне распада мРНК [21, 25].

При этом стабильность мРНК субъединицы α фактора элонгации трансляции 1 (eEF-1 α), как и суммарной мРНК проростков пшеницы и ячменя, соответствовала степени полиаденилирования: под влиянием закалывающей низкой положительной температуры длина поли-А-хвоста у зелёных проростков пшеницы сортоспецифически увеличивалась, а у ячменя – сортоспецифически снижалась (рис.3) [1, 25].

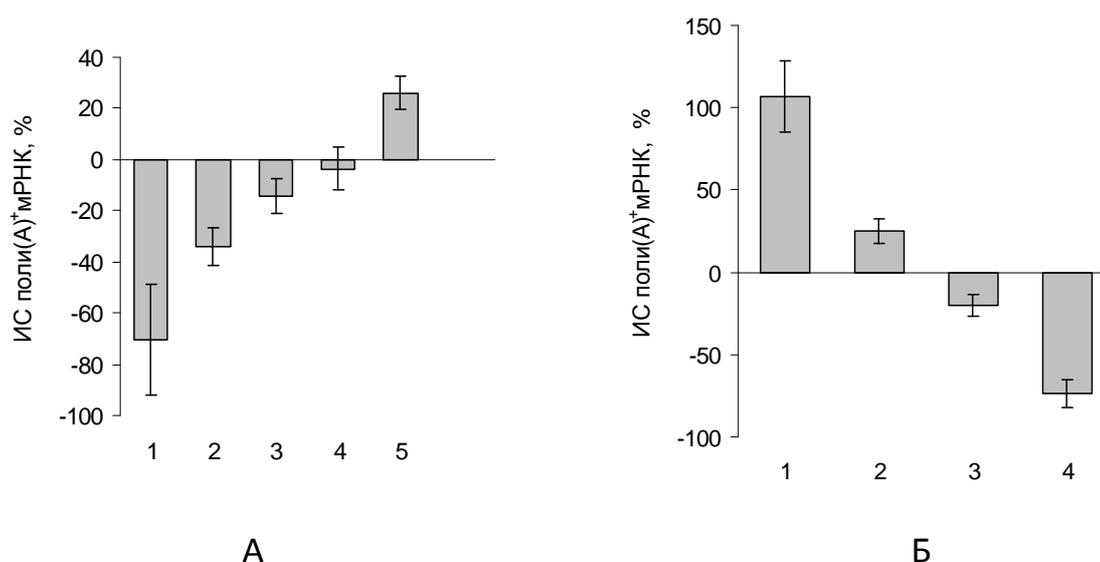


Рис. 3. Дифференциальное изменение индекса стабильности мРНК субъединицы α фактора элонгации трансляции 1 (eEF-1 α) под влиянием закалывающей температуры

(4°C) сортов озимого ячменя (А) и озимой пшеницы (Б), различающихся по морозоустойчивости [1, 25].

Четырехсуточные проростки сортов озимого ячменя Бастион (1), Радикал (2), Скороход (3), Редут (4), Вавилон (5) и озимой пшеницы, различающихся по морозоустойчивости - Зимородок (1), Купава (2), Крошка (3), Безостая-1 (4) подвергали воздействию холода (4°C) в течение 8 часов, из контрольных и опытных проростков выделяли препарат суммарной РНК, инкубировали его 5 минут в *оттп* системе, наносили на колонку поли(У)-суфарозы, гибридизовали поли(А)⁺мРНК с радиоактивно меченным зондом к мРНК eEF-1α и рассчитывали индекс стабильности (ИС). Сорты расположены по мере снижения морозоустойчивости согласно результатам прямого промораживания.

Эти теоретические положения были подтверждены в экспериментах с целитом (SiO₂). Обработка суммарного водного препарата РНК взвесью целита приводит к стабилизации мРНК. Сорбционное действие целита направлено на остановку деаденилирования в ходе инкубации мРНК и связано с утратой молекулой РНК либо катионов Mg⁺⁺, либо ассоциированных с РНК белков-рибонуклеаз, либо и того и другого. Вместе с тем действие целита на стабильные и нестабильные мРНК неодинаково, что можно объяснить разной степенью сложности пространственной структуры молекул мРНК, определяющей доступность Mg⁺⁺ или белков для целита. При инкубации препарата РНК происходит укорочение поли-А-хвоста мРНК и возрастает эффективность стабилизирующего действия целита (табл.2) [17].

Таблица 2. Влияние целита (SiO₂) на выход поли-(А)⁺⁺-мРНК *waхy* из зелёных и этиолированных проростков яровой пшеницы при аффинной хроматографии на поли-(У)-сефарозе в зависимости от соотношения мРНК с длинными и короткими поли-(А)-последовательностями на 3'-конце молекул ((А)_n65°/(А)_n35°), % от контроля [17].

Вид обработки суммарного препарата высокополимерной РНК	(А) _n 65°/(А) _n 35°						
	зелёные			этиолированные			
	2,08	1,70	0,56	2,00	1,84	1,67	0,52
Контроль	100	100	100	100	100	100	100
65°, 5 мин	95	93	58	96	93	75	38
Целит	106	124	120	105	129	110	104
Целит, 65°, 5 мин	100	147	104	91	160	180	95

Заключение

Как известно, деаденилирование мРНК снижает время её жизни, а при достижении величины поли-А-хвоста в несколько десятков нуклеотидов происходит взрывной распад молекулы мРНК [15, 25]. *Следовательно, представляется логичной схема распада мРНК в живой клетке: укорочение поли-А-хвоста мРНК открывает сайты взаимодействия РНКи с 3'-некодирующей областью молекулы мРНК, что приводит к её деградации.*

Принцип подобного молекулярно-биологического феномена был описан академиком В.А. Энгельгардтом так: «Естественно, что объёмная трёхмерная пространственная структура является организацией более высокого уровня, нежели исходная последовательность звеньев. Имеет место своеобразная внутримолекулярная пространственная интеграция. Информация, управляющая процессом интегрирования, строго зафиксирована в свойствах интегрируемого объекта нижнего уровня, в первичной структуре молекулы, т.е. в расположении отдельных звеньев одномерной цепи (нуклеотидов). Движущей силой самого процесса интеграции, ведущего к приобретению третичной структуры, служат силы слабого взаимодействия, проявляющегося между частями одной молекулы. Это так называемая "интрамолекулярная интеграция".

Важнейшей особенностью такого типа интеграции является то, что здесь приобретение биологическим объектом нового качества - трёхмерной пространственной конфигурации - сопровождается появлением новых свойств первостепенной важности. Известно, что конфигурацией и свойствами молекул биополимеров в значительной мере управляют слабые межмолекулярные взаимодействия, которые могут сообщить макромолекулам конформационные изменения (т.е. различные изгибы в пространстве и в отношении друг к другу). В результате могут открываться или закрываться их реакционные группы, делая их доступными или

недоступными для химических реакций с образованием ковалентных связей с другими веществами» [37].

Таким образом, можно предполагать, что в основе молекулярно-кинетических маркёров на основе *оттп*-системы лежит процесс взаимодействия полиаденилированной мРНК и полиаденилированных РНК_i, так как феномен генетической и физиологической детерминации Mg-зависимого распада мРНК был обнаружен при аффинной хроматографии мРНК.

Жёсткая детерминированность стабильности РНК, выражающаяся в сходстве распада РНК *in vivo* и *in vitro*, открывает перспективы использования дифференциального распада РНК как принципиально нового класса молекулярных маркеров – молекулярно-кинетических маркеров, призванных существенно дополнить статические маркеры.

Анализ судьбы мРНК, основанный на методологии и последних достижениях генной инженерии и интегральной молекулярной биологии, превосходит анализ белка по точности и предпочтительнее анализа ДНК, когда параметры экспрессии генов важнее параметров их структуры.

В области клинической медицины исследования внеклеточных РНК_i уже рассматриваются как новая эра точной, высокоспецифичной и неинвазивной диагностики, применимой не только к широкому спектру заболеваний, но и ко многим физиологическим состояниям (например, беременности и физическим нагрузкам) [5, 6, 35].

Всё это позволяет предполагать перспективность исследований в направлении дополнения (а в будущем, возможно, и замены) «географических посевов» (районирование) лабораторными количественными оценками эффекта взаимодействия «генотип-среда» на основе исследований стабильности мРНК. Практическая направленность подобных массовых исследований, несомненно, будет сопряжена с

получением принципиально новых знаний о молекулярных механизмах регуляции экспрессии генов.

Литература

1. Бакалдина Н.Б., Алексеенко Ж.В., Плотников В.К. Холодоиндуцированные изменения стабильности мРНК субъединицы альфа фактора элонгации трансляции 1 у проростков пшеницы и ячменя // Физиология растений, 2001, т.48, № 6, с. 879-885.
2. Бойко Н.В. Голиков А.Ю., Тарасов В.А., Матишов Д.Г. Роль микроРНК в регуляции активности генов у эукариота // Вестник южного научного центра РАН, 2011, т.7, с. 69-78.
3. Коробан Н.В., Кудрявцева А.В., Краснов Г.С., Садритдинова А.Ф., Федорова М.С., Снежкина А.В., Большева Н.Л., Муравенко О.В., Дмитриев А.А., Мельникова Н.В. Роль микроРНК в ответе на абиотический стресс у растений // Молекулярная биология, 2016, т. 50, № 3, с. 387-394.
4. Кузнецов В.В. РНК-интерференция. Использование метода для создания нокаутных организмов и клеточных линий // Биохимия. 2003. Т. 68. Вып. 10. С. 1301-1317.
5. Макарова Ю.А., Крамеров Д.А. Некодирующие РНК // Биохимия. 2007. Т. 72. № 11. С. 1427 - 1447.
6. Макарова Ю.А. Шкурников М.Ю., Турчинович А.А., Тоневицкий А.Г., Григорьев А.И. Внеклеточные микроРНК // Биохимия, 2015, т. 80, вып. 9, с. 1344-1355.
7. Малиновский В.И., Боровский Г.Б., Горбылева Е.Л., Федосеева И.В., Таусон Е.Л., Соколов В.А., Войников В.К. Роль коротких РНК в устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2013, т. 17, № 1, с. 96-103.
8. Насонов А.И., Полежаев С.Л., Радуль А.П., Рядчиков В.Г., Плотников В.К. Взаимосвязь содержания катионов магния (Mg^{++}), стабильности РНК и интенсивности метаболизма в клетках эукариот // Труды Кубанского государственного аграрного университета, 2008, 2(11), с.104-110.
9. Насонов А.И., Евтушенко Я.Ю., Серкин Н.В., Плотников В.К. Особенности состава зерна среднеморозоустойчивых сортов ячменя // Труды Кубанского государственного аграрного университета, 2012, Т. 1, № 38, с. 104 – 106.
10. Ненько Н.И., Плотников В.К., Кузембаева Н.А., Гаража В.Н., Суркова Е.В., Насонов А.И., Пospelова Ю.С., Малюга Н.Г. Влияние препарата фуrolан на физиолого-биохимические характеристики созревающего зерна озимой пшеницы // Прикладная биохимия и микробиология, 2007, № 6, с. 715-721.
11. Омелянчук Н.А., Кузнецова Т.Н., Катохин А.В. МикроРНК растений // Вестник ВОГиС, 2005, т. 9, № 3, с. 440-450.
12. Пашковский П.П., Рязанский С.С. Биогенез, эволюция и функции микроРНК растений // Биохимия, 2013, т. 78, вып. 6, с. 811-824.
13. Плотников В.К., Рядчиков В.Г., Букреева Г.И., Лебедев А.В. Некоторые особенности популяции мРНК созревающего эндосперма кукурузы opak-2 // Физиология растений, 1983, т.30, вып.1, с. 63 – 72.
14. 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.
15. Плотников В.К. Стабильность мРНК как фактор регуляции экспрессии генов в

клетках эукариот // Успехи современной биологии, 1992, т. 112, вып. 2, с. 186-199.

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

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., 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.

19. 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.

20. Плотников В.К., Бакалдина Н.Б., Сметанин Д.В. Фотоиндуцированная модуляция стабильности мРНК фитохрома А у проростков пшеницы и ячменя // Физиология растений, 2000, т. 47, № 2, с. 203-209.

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

22. Плотников В.К., Насонов А.И., Ладатко А.Г. Вариабельность содержания катионов магния (Mg^{++}) в РНК проростков озимой мягкой пшеницы // Сборник статей по материалам конференции «Аминокислотное питание животных и проблема белковых ресурсов», (23 марта, 2004, Краснодар) Краснодар, 2005, с.349 - 352.

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

24. Плотников В.К., Насонов А.И., Иваненко Е.Е., Кузембаева Н.А., Букреева Г.И., Каленич В.И. Взаимосвязь морозостойкости озимой мягкой пшеницы с содержанием катионов магния в РНК // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии, Москва, 2008, Вып. 2, С. 89-92.

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

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

27. Плотников В.К., Евтушенко Я.Ю., Салфетников А.А., Репко Н.В., Насонов А.И. Биологические маркёры для селекции на морозоустойчивость озимых форм мягкой пшеницы и ячменя // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета, 2014, № 104, С. 1855-1887.

28. Плотников В.К., Салфетников А.А. 60 лет в строю: особенности молекулярной биологии озимой мягкой пшеницы сорта Безостая 1 // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета, 2016, № 118, С. 627-657.

29. Плотников В.К., Смирнова Е.В., Репко Н.В., Салфетников А.А. Сортоспецифичность действия трилона Б на прорастания семян озимого ячменя // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета, 2016, № 120, С. 706-729.

30. Плотников В.К., Салфетников А.А. Концепция «Мир РНК»: теория и практика

// Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета, 2017, № 128 (04), С. 741-771.

31. Плотников В.К., Яблонская Е.К., Салфетников А.А., Ненько Н.И. Стабилизация мРНК злаков *in vitro* под влиянием кремния // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета, 2017, № 132 (08), С. 741-771.

32. Рукавцова Е.Б., Алексеева В.В., Бурьянов Я.И. Применение РНК-интерференции в метаболической инженерии растений // Биоорганическая химия, 2010, т. 36, № 2, с. 159-169.

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

34. 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.

35. Смирнова Е.В., Плотников В.К., Репко Н.В., Салфетников А.А., Бойко Е.С. Российский патент № 2643833 на изобретение «Способ оценки морозоустойчивости озимого ячменя» от 06 февраля 2018.

36. Тигунцев В.В., Иванова С.А., Серебров В.Ю., Бухарева М.Б. Малые некодирующие РНК как перспективные биомаркёры: биогенез и терапевтические стратегии // Бюллетень сибирской медицины, 2016, т. 15, № 2, с. 112-116.

37. Эльконин Л.А., Доманина И.В., Итальянская Ю.В. Генетическая инженерия как инструмент модификации состава белков и повышения питательной ценности зерна злаков // Сельскохозяйственная биология, 2016, т.51, № 1, с. 17-30.

38. Энгельгардт В.А. Познание явлений жизни. - М.: Наука, 1985. 303 с.

39. Bandyopadhyay R., Brawerman G. Secondary structure at the beginning of the poly(A) sequence of mouse β -actin messenger RNA // Biochimie. 1992. V. 74. P. 1031-1034.

40. Fire AZ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // Nature, 1998, Feb 19; v. 391(6669), P. 806-811.

41. Fire A.Z. Nobel Lecture. Gene Silencing by Double Stranded RNA delivered his Nobel Lecture on 8 December 2006 at Karolinska Institutet in Stockholm. P. 198-233.

42. Huang Y., Shen X.J., Zou Q., Zhao Q.L. Biological functions of microRNAs // Биоорганическая химия, 2010, т. 36, № 6, с. 747-752.

43. Mello C.C. Nobel Lecture. Return to the RNAi World: Rethinking Gene Expression and Evolution held his Nobel Lecture December 8, 2006, at Karolinska Institutet in Stockholm. P. 242-258.

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

45. Shriram V., Kumar V., Devarumath R.M., Khare T.S., Wani S.H. MicroRNAs Potential Targets for Abiotic Stress Tolerance in Plants // Front Plant Sci., 2016, v. 7, P. 817-834.

References

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

2. Bojko N.V. Golikov A.Ju., Tarasov V.A., Matishov D.G. Rol' mikroRNK v reguljacji aktivnosti genov u jeukariota // Vestnik juzhnogo nauchnogo centra RAN, 2011, t.7, s. 69-78.

3. Koroban N.V., Kudrjavceva A.V., Krasnov G.S., Sadritdinova A.F., Fedorova M.S., Snezhkina A.V., Bol'sheva N.L., Muravenko O.V., Dmitriev A.A., Mel'nikova N.V. Rol' mikroRNK v otvete na abioticheskiy stress u rastenij // Molekuljarnaja biologija, 2016, t. 50, № 3, s. 387-394.

4. Kuznecov V.V. RNK-interferencija. Ispol'zovanie metoda dlja sozdanija nokautnyh organizmov i kletochnyh linij // Biohimija. 2003. T. 68. Vyp. 10. S. 1301-1317.

5. Makarova Ju.A., Kramerov D.A. Nekodirujushhie RNK // Biohimija. 2007. T. 72. № 11. S. 1427 - 1447.

6. Makarova Ju.A. Shkurnikov M.Ju., Turchinovich A.A., Tonevickij A.G., Grigor'ev A.I. Vnekletochnye mikroRNK // Biohimija, 2015, t. 80, vyp. 9, s. 1344-1355.

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

8. Nasonov A.I., Polezhaev S.L., Radul' A.P., Rjadchikov V.G., Plotnikov V.K. Vzaimosvjaz' sodержanija kationov magnija (Mg⁺⁺), stabil'nosti RNK i intensivnosti metabolizma v kletkah jeukariot // Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, 2008, 2(11), s.104-110.

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

10. Nen'ko N.I., Plotnikov V.K., Kuzembaeva N.A., Garazha V.N., Surkova E.V., Nasonov A.I., Pospelova Ju.S., Maljuga N.G. Vlijanie preparata furolan na fiziologo-biohimicheskie harakteristiki sozrevajushhego zerna ozimoi pshenicy // Prikladnaja biohimija i mikrobiologija, 2007, № 6, s. 715-721.

11. Omel'janchuk N.A., Kuznecova T.N., Katohin A.V. MikroRNK rastenij // Vestnik VOGiS, 2005, t. 9, № 3, s. 440-450.

12. Pashkovskij P.P., Rjazanskij S.S. Biogenez, jevoljucija i funkcii mikroRNK rastenij // Biohimija, 2013, t. 78, vyp. 6, s. 811-824.

13. 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.

14. 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.

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

16. 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.

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., 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.

19. 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.

20. Plotnikov V.K., Bakaldina N.B., Smetanin D.V. Fotoinducirovannaja moduljacija stabil'nosti mRNK fitohroma A u prorostkov pshenicy i jachmenja//Fiziologija rastenij, 2000, t. 47, № 2, s. 203-209.

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

22. Plotnikov V.K., Nasonov A.I., Ladatko A.G. Variabel'nost' sodержaniya kationov magnija (Mg^{++}) v RNK prorostkov ozimoy m'jagkoj pshenicy // Sbornik statej po materialam konferencii «Aminokislotnoe pitanie zhivotnyh i problema belkovykh resursov», (23 marta, 2004, Krasnodar) Krasnodar, 2005, s.349 - 352.

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

24. Plotnikov V.K., Nasonov A.I., Ivanenko E.E., Kuzembaeva N.A., Bukreeva G.I., Kalenich V.I. Vzaimosvjaz' morozostojkosti ozimoy m'jagkoj pshenicy s sodержaniem kationov magnija v RNK // Izvestija Timirjzevskoj sel'skohozjajstvennoj akademii, Moskva, 2008, Vyp. 2, S. 89-92.

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

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

27. Plotnikov V.K., Evtushenko Ja.Ju., Salfetnikov A.A., Repko N.V., Nasonov A.I. Biologicheskie markjory dlja selekcii na morozoustojchivost' ozimyh form m'jagkoj pshenicy i jachmenja // Politematicheskij setevoj jelektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, 2014, № 104, S. 1855-1887.

28. Plotnikov V.K., Salfetnikov A.A. 60 let v stroju: osobennosti molekularnoj biologii ozimoy m'jagkoj pshenicy sorta Bezostaja 1 // Politematicheskij setevoj jelektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, 2016, № 118, S. 627-657.

29. Plotnikov V.K., Smirnova E.V., Repko N.V., Salfetnikov A.A. Sortospecifichnost' dejstvija trilona B na prorastaniya semjan ozimogo jachmenja // Politematicheskij setevoj jelektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, 2016, № 120, S. 706-729.

30. Plotnikov V.K., Salfetnikov A.A. koncepcija «Mir RNK»: teorija i praktika // Politematicheskij setevoj jelektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, 2017, № 128 (04), S. 741-771.

31. Plotnikov V.K., Jablonskaja E.K., Salfetnikov A.A., Nen'ko N.I. Stabilizacija mRNK zlakov in vitro pod vlijaniem kremnija // Politematicheskij setevoj jelektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, 2017, № 132 (08), S. 741-771.

32. Rukavcova E.B., Alekseeva V.V., Bur'janov Ja.I. Primenenie RNK-interferencii v metabolicheskoi inzhenerii rastenij // Bioorganicheskaja himija, 2010, t. 36, № 2, s. 159-169.

33. Rjadchikov V.G., Plotnikov V.K. Jekspressija genov jeukariot pri aminokislotnom imbalance, 2014, Krasnodar, KubGau, 375 s.
34. 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.
35. Smirnova E.V., Plotnikov V.K., Repko N.V., Salfetnikov A.A., Bojko E.S. Rossijskij patent № 2643833 na izobrenie «Sposob ocenki morozoustojchivosti ozimogo jachmenja» ot 06 fevralja 2018.
36. Tiguncev V.V., Ivanova S.A., Serebrov V.Ju., Buhareva M.B. Malye nekodirujushhie RNK kak perspektivnye biomarkjory: biogenez i terapevticheskie strategii // Bjulleten' sibirskoj mediciny, 2016, t. 15, № 2, s. 112-116.
37. Jel'konin L.A., Domanina I.V., Ital'janskaja Ju.V. Geneticheskaja inzhenerija kak instrument modifikacii sostava belkov i povyshenija pitatel'noj cennosti zerna zlakov // Sel'skohozjajstvennaja biologija, 2016, t.51, № 1, s. 17-30.
38. Jengel'gardt V.A. Poznanie javlenij zhizni. - M.: Nauka, 1985. 303 s.
39. Bandyopadhyay R., Brawerman G. Secondary structure at the beginning of the poly(A) sequence of mouse β -actin messenger RNA // Biochimie. 1992. V. 74. P. 1031-1034.
40. Fire AZ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // Nature, 1998, Feb 19; v. 391(6669), P. 806-811.
41. Fire A.Z. Nobel Lecture. Gene Silencing by Double Stranded RNA delivered his Nobel Lecture on 8 December 2006 at Karolinska Institutet in Stockholm. P. 198-233.
42. Huang Y., Shen X.J., Zou Q., Zhao Q.L. Biological functions of microRNAs // Bioorganicheskaja himija, 2010, t. 36, № 6, s. 747-752.
43. Mello C.C. Nobel Lecture. Return to the RNAi World: Rethinking Gene Expression and Evolution held his Nobel Lecture December 8, 2006, at Karolinska Institutet in Stockholm. P. 242-258.
44. Plotnikov V.K., Bakaldina N.B. Differential stability of zein mRNA in developing corn kernel // Plant Molecular Biology, 1996, V.31, P.507-515.
45. Shriram V., Kumar V., Devarumath R.M., Khare T.S., Wani S.H. MicroRNAs Potential Targets for Abiotic Stress Tolerance in Plants // Front Plant Sci., 2016, v. 7, P. 817-834.