

© М. Г. Новокрещенова<sup>1</sup>,  
О. П. Солдатова<sup>1</sup>,  
Л. А. Волкова<sup>2</sup>,  
А. Б. Бургутин<sup>2</sup>, Т. А. Ежова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва

<sup>2</sup> Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва

✿ Создание растений, устойчивых к стрессовым факторам, — важнейшая задача биотехнологии растений, которая приобретает все большую актуальность в условиях глобальных климатических изменений и растущего загрязнения окружающей среды. Успех в реализации этой важной задачи зависит, прежде всего, от идентификации новых генов, контролирующих устойчивость к абиотическим стрессовым факторам, и анализа всех особенностей функции генов на уровне клетки, ткани, органа. Статья посвящена изучению мутанта *nfz24 Arabidopsis thaliana* и анализу особенностей реакции мутанта на холодовой стресс. Исследование мутанта *nfz24* показало, что сниженное содержание каротиноидов и нарушение АБК-зависимого холодowego ответа является причиной повышенной чувствительности растений к холоду.

✿ **Ключевые слова:** стресс, холод, мутанты, экспрессия АБК-зависимых генов, каротиноиды, пролин, токоферол

## РОЛЬ ГЕНА *NFZ24 ARABIDOPSIS THALIANA* В КОНТРОЛЕ ОТВЕТА НА ХОЛОДОВОЙ СТРЕСС

### ВВЕДЕНИЕ

Адаптация растений к действию холода обеспечивается работой большого числа генов, контролирующих зависимые и независимые от абсцизовой кислоты (АБК) системы холодowego ответа (Ishitani et al., 1997; Thomashow et al., 1999). Содержание АБК при стрессовых воздействиях быстро повышается благодаря механизму авторегуляции экспрессии генов биосинтеза этого гормона, среди которых важную роль играет ген *ABA1*, кодирующий зеаксантиноксидазу — один из ключевых ферментов каротиноидного пути биосинтеза АБК (Xiong et al., 2003). Под действием АБК активируется транскрипция большого числа генов, в том числе *RAB18*, кодирующего гидрофильный глицин-богатый белок из семейства дегидринов, играющих важную роль в защите растений от холодowego стресса, заморозков, обезвоживания и засоления. Уровень транскрипции гена *RAB18* в растениях *A. thaliana* прямо пропорционален концентрации эндогенной или экзогенной АБК, что позволяет по уровню транскрипции этого гена косвенно оценивать уровень активной эндогенной АБК в растении (Lång et al., 1993; Parcy et al., 1997).

Существуют гены ответа на холодовой стресс, которые не зависят от действия АБК. Экспрессия гена *CBF1* у *A. thaliana* не индуцируется АБК, но повышается в ответ на холодовой воздействие (Stockinger et al., 1997). Регуляторный белок CBF1 играет ключевую роль в акклиматизации к гипотермии, активируя транскрипцию ряда генов холодowego ответа, в том числе гена *COR15a*, продукт которого — криопротекторный гидрофильный белок локализован в строме хлоропласта (Jaglo-Ottosen et al.; 1998, Thomashow et al., 1999). Ген *COR15a A. thaliana* экспрессируется не только при холодowym воздействии, но и при обработке экзогенной АБК (Baker et al., 1994; Nordin et al., 2003). Важную роль в защите от холода и засухи играет накопление пролина, уровень которого регулируется как АБК, так и независимо от АБК механизмами (Xiong et al., 2003). Проллин обладает свойствами осморегулятора, защищает белки, стабилизирует полирибосомы и мембраны и может служить энергетическим резервом клеток в условиях стресса (Кузнецов и др., 1999).

Выделенный нами мутант *A. thaliana nfz24* с измененной устойчивостью к гербициду норфлуразону, характеризуется светло-зеленой окраской семян, листьев и верхушек цветоноса, а также высокой чувствительностью к холоду, которая проявляется как у растений, так и у полученных из них гетеротрофных культур тканей (Волкова и др., 2005). Задачей данной работы является изучение экспрессии генов холодowego ответа и некоторых физиологических особенностей растений мутанта *nfz24* в целях выяснения возможных причин повышенной чувствительности мутанта к холоду.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы растения *A. thaliana* дикого типа расы Dijon-M (линия К-19) и мутант *nfz24* (линия М-24) из коллекции кафедры генетики МГУ им. М. В. Ломоносова. Растения выращивались при температуре +23 °С, относительной влажности 60 % и 14 часовом световом дне.

Анализ уровня экспрессии генов *RAB18*, *CBF1*, *COR15a* и *ABA1* проводили с помощью полуквантитативной ПЦР-продуктов обратной транскрипции (Пенин и др., 2006) с использованием специфических праймеров (табл. 1). Концентрацию мРНК в пробах выравнивали с помощью анализа количества мРНК консти-

Таблица 1

Праймеры, использованные для выявления экспрессионной активности генов *RAB18*, *ABA1*, *CBF1* и *COR15A*

Название гена	Праймеры	Размер фрагмента, тпн
<i>RAB18</i>	5'-GGGAAGCTTTTCCTTGATCTT-3' 5'-TCTTACCAGAACCGTCCAGGA-3'	0,622
<i>ABA1</i>	5'-GGAAAATTCGGTGTGCTCT-3' 5'-TGGCTTCCACTTACAAAGCA-3'	0,535
<i>CBF1</i>	5'-AGCGACACGTCCACCATCTCCT-3' 5'-CTCAACTTCGCTGACTCGGCT-3'	0,222
<i>COR15A</i>	5'-GTGACGGATAAAACAAAAGAGG-3' 5'-GACCCTACTTTGTGGCATCCTT-3'	0,210

тутивно экспрессирующегося гена *UBC* (ubiquitin-conjugating enzyme). Концентрация мРНК в пробах считалась одинаковой, если количество продукта ПЦП с праймерами к гену *UBC* (*sqRT\_UBCfw* 5'-ACAAAGAGGTACAGCGAGAG-3', *sqRT\_UBCrev* 5'-TGAGTCGCAGTTAAGAGGAC-3') в этих пробах совпадали. Программа для проведения ПЦП: 93° — 2'30", 1 раз; 93° — 30", 55° — 30", 72° — 30", N раз; 93° — 20", 54° — 30", 72° — 10' 1 раз. Количество циклов подбиралось для каждого гена эмпирическим путем и зависело от уровня его экспрессии в контроле. Количество ПЦП-продукта оценивалось по интенсивности флюоресценции в агарозном геле.

мРНК выделяли из растений линии К-19 и мутанта *nfz24*, выращенных в нормальных условиях и на стадии цветonoса подвергнутых холодovому воздействию (+4 °C на свету) в течение 2 (для гена *CBF1*) и 24 часов (для *RAB18*, *ABA1*, *COR15A*). Контролем служили растения, не подвергнутые холодovому стрессу.

Каротиноиды выделяли из 100мг измельченных листьев метанолом в пробирках Eppendorf (заключительный объем 1 мл). Экстракты центрифугировали при 13 000 x g в течение 10 минут при +4 °C. Содержание каротиноидов было проанализировано на системе HPLC, состоящей из Waters 600 контроллеров и насосов Waters 996, датчиков фотодиода (Waters, Eschborn, Германия), объединенными с датчиком флюоресценции (FP-920, JASCO, Groß-Umstadt, Германия). Определенные количества супернатанта переносили и разделяли на RP-18 колонках (LiChrospher, 5 мкм, 125-4; Merck, Дармштадт, Германия) как указано (Mock et al., 1999). Обработка полученных данных была выполнена с пакетом программ Millennium (Waters, Eschborn, Германия).

Содержание пролина определяли по методу, описанному Батес с соавт. (Bates et al., 1973). Навеску свежей растительной ткани (150–200 мг) заливали кипящей водой и экстрагировали трехкратно в кипящей водяной бане 15 мин. Смесь из полученного экстракта, ледяной уксусной кислоты и нингидринового реактива инкубировали в течение 1 ч. в кипящей водяной бане и быстро охлаждали на льду. Интенсивность окраски определяли при 520 нм, содержание пролина рассчитывали с помощью калибровочной кривой.

Для трансмиссионной микроскопии розеточные листья растений расы Dijon-M и мутанта *nfz24* фиксировали в 2,5%-м (v/v) растворе глутаральдегида и 0,1M фосфатном буфере (pH 7,2). После фиксации образцы трижды промывали двойным фосфатным буфером и проводили постфиксацию в 1%-м растворе OsO<sub>4</sub>. Образцы обезвоживали этанолом различной концентрации (от 10 до 100 %), после чего помещали их в эпоксидную смолу. Ультратонкие срезы делали на микротоме (Leica) и окрашивали уранил ацетатом (Миронов и др., 1994). Препараты анализировали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа (JEM-100B, Japan).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Влияние холода на прорастание семян

Повышенная чувствительность мутанта *nfz24 A. thaliana* была продемонстрирована ранее при изучении влияния низких положительных температур (от +2 до +4 °C) на выживаемость гетеротрофных суспензий клеток, полученных из растений дикого типа и мутанта, а также на уровень перекисного окисления липидов в растениях (Волкова и др., 2005). При субоптимальной температуре (+15 °C) у мутантной линии наблюдается более значительная, чем у исходной, задержка прорастания семян (рис. 1). На 2-е сутки у исходной линии дикого типа наблюдали 9 % проклюнувшихся семян (образование корешков) по отношению к доле проклюнувшихся семян при оптимальной температуре (23–25 °C); на 3 и 4-е сутки — 67 % и 99 % семян имели семядоли и корешок. Среди семян мутантной линии всхожие семена появились только на 4-е сутки (60 % всхожих семян по отношению к контролю при 23–25 °C). На 5-е сутки всхожесть семян мутанта не отличалась от контрольной.

### Структура хлоропластов, содержание пигментов, токоферолов и пролина

Исследование ультраструктуры хлоропластов мутантных растений *nfz24* показало, что организация этих оргanelл имеет некоторые отличия от растений дикого типа. Хлоропласты из клеток розеточных листьев молодых 2- и взрослых 4-недельных растений *nfz24* имели хорошо сфор-

мированную внешнюю мембрану и содержали крахмальные зерна. Тилакоиды большинства хлоропластов мутанта *nfz24* имели вид длинных полос, а стопки гран состояли из 3–4 ламелл в отличие от 5–9 ламелл гран хлоропластов дикого типа (рис. 2). В некоторых клетках мутантных растений отмечено увеличение размера митохондрий. Выявлен-

ные изменения в структуре хлоропластов и митохондрий могут влиять на эффективность фотосинтеза и дыхания в клетках мутанта и являться одной из причин изменения резистентности к действию гипотермии.

Мутант *nfz24* имеет светлую желто-зеленую окраску листьев и стебля. В листьях мутанта обнаружено 32 % общего содержания хлорофилла по сравнению с растениями дикого типа (рис. 3, табл. 2). Отношение хлорофилла а/в у мутанта ниже, чем у дикого типа, что связано с более выраженной редукцией содержания хлорофилла а.

Растения мутанта *nfz24* характеризуются пониженным уровнем общего содержания каротиноидов (до 30 % от дикого типа), хотя по соотношению разных форм каротиноидов растения мутанта и дикого типа практически не различались (рис. 3, табл. 2).

Содержание токоферола, образующегося из геранилгеранилпирофосфата, который является также предшественником синтеза каротиноидов и фитила, у мутанта оказалось почти в два раза выше, чем в растениях дикого типа (табл. 2). Обратная корреляция между содержанием токоферола и хлоропластных пигментов была продемонстрирована ранее на нескольких видах растений (Rise et al., 1989). Уровень пролина в растениях *nfz24*, выращенных при 24 °С на свету, ниже,

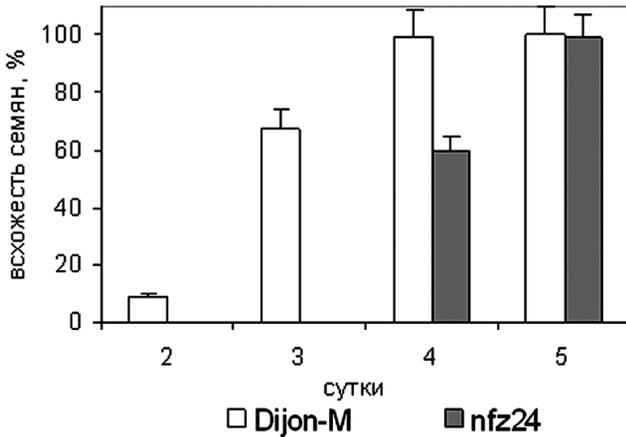


Рис. 1. Всхожесть семян линии дикого типа (белый) и мутанта *nfz24* (серый) при +15 °С (в % от величины всхожести семян при 23–25 °С)

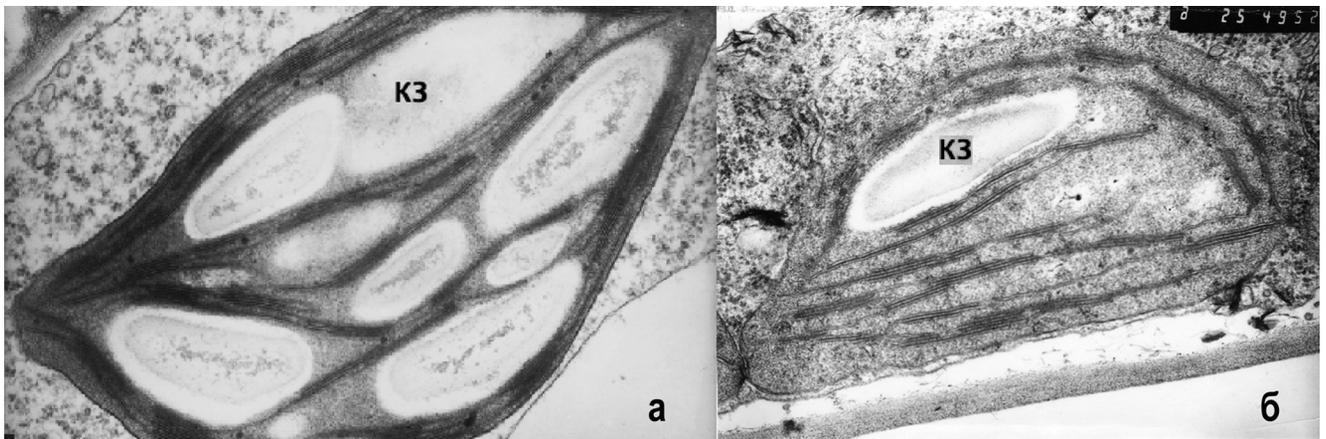


Рис. 2. Ультраструктура хлоропластов листьев растений дикого типа (А) и мутанта *nfz24* (Б), увеличение 40000; КЗ — крахмальные зерна

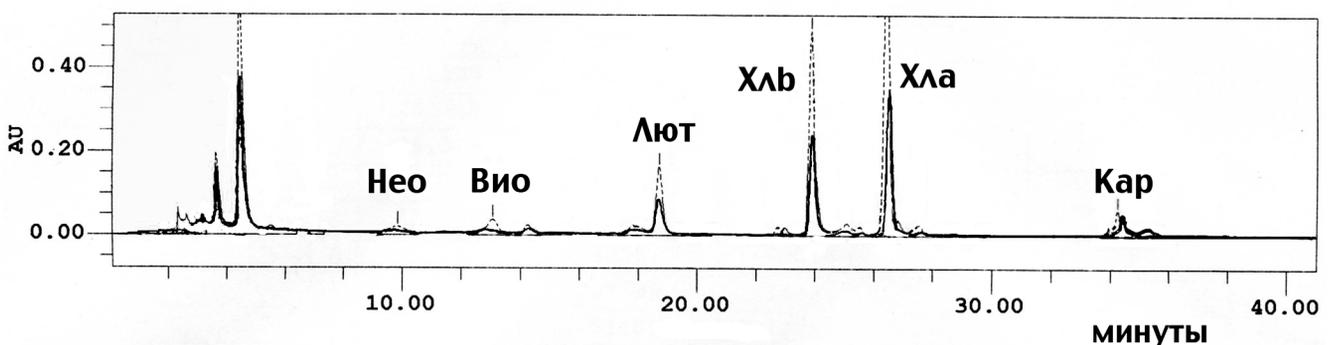


Рис. 3. Хроматограмма пигментов листьев растений дикого типа (пунктирная линия) и мутанта *nfz24* (сплошная линия). Нео — неоксантин, Вио — виолоксантин, Лют — лютеин, Хлб — хлорофилл b, Хла — хлорофилл а, Кар — β-каротин

Таблица 2

Содержание каротиноидов, токоферола и пролина в растениях дикого типа и мутанта *nfz24*

		Dijon-M	nfz24
Общее содержание хлорофилла в мкг на г сырого веса		1574 ± 150	496 ± 53
Отношение хлорофилла a/b		3,39	2,76
Общее содержание каротиноидов в мкг на г сырого веса		234 ± 15	73,5 ± 6
Спектр каротиноидов (% от общего содержания)	лютеин	39,0	43,5
	зеаксантин	0,77	2,7
	β-каротин	23,5	20,3
	неоксантин	13,3	12,6
	виолаксантин	20,7	15,6
	антероксантин	2,6	5,3
Токоферола * в мкг на г сырого веса		2,7 ± 0,2	4,4 ± 0,15
Пролина в мкг на г сырого веса	контроль	304 ± 15	246 ± 12
	4 °C 10 суток	562 ± 25	620 ± 21
	4 °C 20 суток	580 ± 23	480 ± 18

\* — суммарное содержание токоферола α и токоферола γ.

чем в исходной линии на 20 % (табл. 2). При холодовом воздействии (+4 °C, 10 суток) содержание пролина в растениях дикого типа и мутанта значительно повышалось (в 1,8 и 2,5 раза, соответственно, по сравнению с исходным уровнем). На 20-е сутки холодового воздействия содержание пролина у мутанта снизилось на 29 %, в то время как у дикого типа снижения не было (табл. 2). Отмечено увядание листьев у мутанта на 20-е сутки. Значительное повышение пролина в растениях *nfz24* может свидетельствовать о более выраженной у мутанта напряженности стрессового фактора.

#### Анализ экспрессии генов, участвующих в защите растений от холодового стресса

Методом полуколичественной обратной транскрипции изучили экспрессию генов АБК-зависимого и АБК-независимого ответа в растениях, выращиваемых при температуре +20 °C (контроль) и подвергнутых холодовому стрессу (+4 °C). Уровень экспрессии АБК-зависимого гена *RAB18* в растениях мутанта оказался в три раза ниже в контрольных условиях, чем в растениях дикого типа (рис. 4). Как говорилось выше, существует прямая зависимость концентрации мРНК гена *RAB18* от содержания АБК в растении, поэтому по уровню экспрессии этого гена можно оценивать относительный уровень эндогенной АБК в растениях (Lång et al., 1993; Parsy et al., 1997).

Выявленные различия в экспрессии гена *RAB18* в растениях дикого типа и мутанта *nfz24* косвенно указывают на снижение концентрации гормона в мутантных растениях в 2 раза. При воздействии экзогенной АБК экспрессия гена *RAB18* увеличивалась как в растениях

дикого типа, так и в мутантных растениях в сходном соотношении (рис. 4а, б), что подтверждает выявленную зависимость между уровнями экспрессии гена *RAB18* и содержанием АБК.

При холодовом стрессе количество транскрипта в растениях мутанта и дикого типа становится близким (рис. 4а, б), что можно объяснить индукцией под действием холода синтеза эндогенной АБК не только в растениях дикого типа, но и у мутанта *nfz24*. При совместном действии холода и экзогенной АБК уровень экспрессии гена *RAB18* увеличивался еще значительно в равной степени у мутанта и дикого типа.

Экспрессия гена *ABA1*, контролирующего синтез АБК, в мутантных растениях существенно ниже (более, чем в 8 раз), чем в контрольных растениях дикого типа. При холодовом воздействии в растениях дикого типа экспрессия гена *ABA1* повышалась, в то время как у мутанта она оставалась на низком уровне (рис. 4а, в). При совместном действии холода и АБК экспрессия гена *ABA1* в растениях дикого типа практически не изменялась по сравнению с холодовой обработкой, а в растениях мутанта увеличивалась в 10 раз, достигая уровня транскрипции этого гена в растениях дикого типа после воздействия холода (рис. 4а, в).

В отличие от генов АБК-зависимого ответа, уровень экспрессии гена *COR15a* (регулируется как холодом, так и АБК) и *CBF1* (регулируется только холодом) в растениях дикого типа и мутанта оказался одинаковым. Холодовое воздействие незначительно повышало экспрессию гена *CBF1* в растениях дикого типа и мутанта, но практически не влияло на уровень экспрессии гена *COR15a* (рис. 4а, в). Совместное действие холода и АБК не вызывало даль-

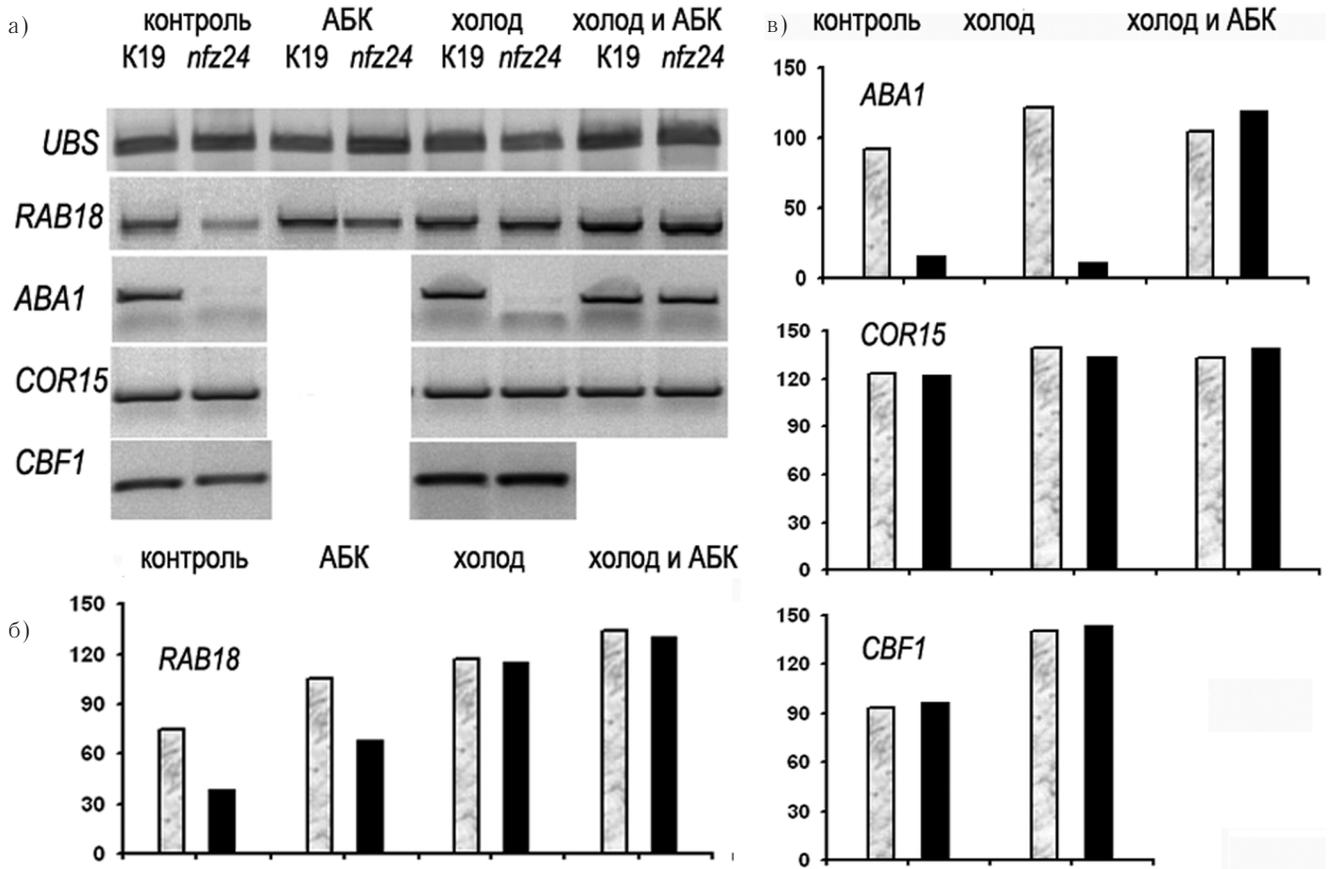


Рис. 4. Относительный уровень транскрипции генов холодового ответа в растениях дикого типа (серый) и мутанта *nfz24* (черный). Данные ОТ-ПЦР (а) и рассчитанный по ним относительный уровень экспрессии генов *RAB18* (б), *ABA1*, *COR15a*, *CBF1* (в). Содержание кДНК выравнивали по контрольному гену *UBC* (см. материалы и методы)

нейшего повышения уровня транскрипции гена *COR15a*. Полученные данные свидетельствуют о том, что нарушение работы генов АБК-зависимого ответа является одной из причин чувствительности мутанта *nfz24* к холоду.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Растения мутанта *nfz24* *A. thaliana* характеризуются высокой чувствительностью к низкой положительной температуре  $+2-+4$  °С, что свидетельствует о важной роли гена *NFZ24* в растениях дикого типа в устойчивости к гипотермии (Волкова и др., 2005). Участие гена *NFZ24* в контроле устойчивости *A. thaliana* к холодовому стрессу подтверждено данными об отличии мутанта от исходной линии дикого типа по динамике всхожести семян в условиях пониженной ( $+15-+19$  °С) температуры по сравнению с оптимальной ( $+25$  °С) (рис.1).

Наряду с чувствительностью к холоду мутант *nfz24* характеризуется снижением содержания хлорофилла и каротиноидов. Каротиноиды защищают пигменты и ненасыщенные жирные кислоты мембран от окислительного повреждения (Edge et al., 1997). При низкой температуре они способствуют снижению фазовых переходов

мембранных липидов тилакоидов в гель-структуру, тем самым увеличивая текучесть тилакоидной мембраны, что приводит к большей сопротивляемости растений к стрессу при гипотермии. От текучести мембран зависит и эффективность антиоксидантов, например — токоферола (Стржалка и др., 2003). Низкий уровень каротиноидов у мутанта не может не оказывать отрицательного влияния на физические свойства мембран тилакоидов в условиях гипотермии, несмотря на достаточный пул токоферолов (данная работа) и повышенный исходный уровень активности антиоксидантных систем (Волкова и др., 2005; Ежова и др., 2001; Новокрещенова и др., 1999).

У мутанта *nfz24* выявлено изменение экспрессии генов АБК-зависимого холодового ответа. При совместном действии холода и экзогенной АБК экспрессия гена *ABA1* в растениях мутанта достигала уровня дикого типа, что согласуется с данными о регуляции этого гена конечным продуктом. Полученные результаты свидетельствуют о снижении уровня эндогенной АБК, которое может объясняться сниженным содержанием каротиноидов у мутанта (30 % от общего содержания каротиноидов у дикого типа). Снижение у мутанта *nfz24* в отсутствие холодового воздействия уровня экспрессии гена *ABA1*, конт-

ролирующего синтез АБК, и гена *RAB18*, транскрипция которого зависит от содержания АБК в растениях (Lång et al., 1993; Parcy et al., 1997), также косвенно указывает на низкий уровень этого стрессового гормона в растениях мутанта. В отличие от *ABA1*, уровень транскрипции гена *RAB18* повышался не только при совместном действии холода и экзогенной АБК, но и при холодом воздействии без обработки АБК (рис. 4а, б). Возможно, холод может повышать эффективность работы мевалонатного пути синтеза АБК, который является альтернативным у растений (Burlat et al., 2004; Hirai et al., 2000). По-видимому, концентрация такой АБК может быть достаточной для активации транскрипции высокочувствительного к этому гормону гена *RAB18*, но ниже пороговой для стимуляции транскрипции *ABA1*.

Пониженный у мутанта исходный уровень пролина, который является важным компонентом защиты от холода и дегидратации, также может быть связан со снижением содержания эндогенной АБК, поскольку этот гормон участвует в регуляции экспрессии генов биосинтеза этого осмопротектора (Savoure et al., 1997).

Повышение в условиях гипотермии уровня пролина у мутанта предполагает включение холодом альтернативных путей метаболизма пролина. Однако повышенный уровень пролина не может компенсировать недостаток каротиноидов, которые защищают хлоропласты и растение в целом в условиях холодого стресса. Таким образом, исследование мутанта *nfz24* показало, что сниженное (в 3 раза) содержание каротиноидов и нарушение АБК-зависимого холодого ответа может являться причиной повышенной чувствительности растений к холоду.

### Благодарности

Авторы благодарят академика С. В. Шестакова за ценные комментарии и помощь в подготовке рукописи и профессора Б. Грима за помощь в экспериментальных исследованиях. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (07-04-12077-офи), гранта ФЦП (НШ-4202.2008.4), программы РАН «Динамика генофондов растений, животных и человека», гранта Германской службы академических обменов (DAAD).

### Литература

1. Волкова Л. А., Бургутин А. Б., Солдатова О. П. и др., 2005. Влияние параквата и гипотермии на устойчивые к норфлуразону мутанты *Arabidopsis thaliana* и полученные из них клеточные культуры // Физиология растений. № 52 (3): С. 421–429.
2. Ежова Т. А., Солдатова О. П., Маманова Л. Б. и др., 2001. Коллекция мутантов *Arabidopsis thaliana* с измененной чувствительностью к индукторам окислительного стресса. // Известия РАН. № 5. С. 533–543.
3. Кузнецов Вл. В., Шевякова Н. И., 1999. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений. Т. 46. С. 321–336.
4. Миронов А. А., Комиссарчик Я. Ю., Миронов В. А., 1994. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине // С.-Петербург: «Наука». С. 399.
5. Новокрещенова М. Г., Солдатова О. П., Ежова Т. А., 2007. Молекулярно-генетическое картирование и функциональный анализ гена *NFZ24*, контролирующего устойчивость растений *Arabidopsis thaliana* к стрессовым факторам // Бюллетень МОИП. Т. 112. вып. № 1. С. 74–80.
6. Пенин А. А., Будаев Р. А., Ежова Т. А., 2006. Взаимодействие гена *BRCTEA* с генами *TERMINAL FLOWER1*, *LEAFY* и *APETALA1* при формировании соцветия и цветка у *Arabidopsis thaliana* // Генетика, Т. 43. № 3, С. 370–376.
7. Стржалка К., Костецка-Пугала А., Латовски Д., 2003. Каротиноиды растений и стрессовые воздействия окружающей среды: роль модуляции физических свойств мембран каротиноидами // Физиология растений. Т. 50. № 2. С. 188–193.
8. Baker S. S., Wilhelm K. S., Thomashow M. F., 1994. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression // Plant. Mol. Biol. Vol. 24 (5). P. 701–713.
9. Bates L. E., Waldren R. P., Teare J. D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies // Plant and Soil. Vol. 39. P. 205–207.
10. Burlat V., Oudin A., Courtois M. et al., 2004. Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites // Plant J. Vol. 38 (1). P. 131–141.
11. Edge R., McGarvey D. J., Truscott T. G., 1997. The Carotenoids as Antioxidants — a Review // Photochem. Photobiol. Ser. Biol. Vol. 41. P. 189–200.
12. Ishitani M., Xiong L., Stevenson B., Zhu J. K., 1997. Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways // Plant Cell. Vol. 9 (11). P. 1935–1949.
13. Jaglo-Ottosen K. R., Gilmour S. J., Zarka D. G. et al., 1998. *Arabidopsis CBF1* Overexpression Induces *COR* Genes and Enhances Freezing Tolerance // Science: Vol. 280. N 5360. P. 104–106.
14. Hirai N., Yoshida R., Todoroki Y., Ohigashi H., 2000. Biosynthesis of abscisic acid by the non-mevalonate pathway in plants, and by the mevalonate pathway in fungi // Biosci. Biotechnol. Biochem. Vol. 64 (7). P. 1448–1458.

15. Lång V., Palva E. T., 1993. The expression of a rab-related gene, rab 18, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh // Plant Mol. Biol. Vol. 21 (3). P. 581–582.
16. Mock H. P., Heller W., Molina A. et al., 1999. Expression of uroporphyrinogen decarboxylase or coproporphyrinogen oxidase antisense RNA in tobacco induces pathogen defense responses conferring increased resistance to tobacco mosaic virus // J. Biol. Chem. Vol. 274 (7). P. 4231–4238.
17. Nordin K., Heino P., Palva E. T., 1991. Separate signal pathways regulate the expression of a low-temperature-induced gene in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh Plant Mol. Biol. Vol. 16 (6). P. 1061–1071.
18. Parcy F., Giraudat J., 1997. Interactions between the *ABI1* and the ectopically expressed *ABI3* genes in controlling abscisic acid responses in *Arabidopsis* vegetative tissues // Plant J. Vol. 11 (4). P. 693–702.
19. Rise M., Cojocar M., Gottlieb H. E., Goldschmidt E., 1989. Accumulation of  $\alpha$ -tocopherol in senescing organs as related to chlorophyll degradation // Plant Physiol. P. 1028–1030.
20. Stockinger E. J., Gilmour S. J., Thomashow M. F., 1997. *Arabidopsis thaliana* *CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 94 (3). P. 1035–1040.
21. Savoure, Hua A., Bertauche X.-J. et al., 1997. Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses. // Mol. Gen. Genet. 254. P. 104–109.
22. Thomashow M. F., 1999. Annu. Rev. Plant Physiol. // Plant Mol. Biol. 50. P. 571–599.
23. Xiong L., Zhu J. K., 2003. Regulation of abscisic acid biosynthesis // Plant Physiol. Vol. 133 (1). P. 29–36.

**Molecular genetic analysis of *Arabidopsis thaliana* cold sensitive mutant *nfz24***

M. G. Novokreschenova, O. P. Soldatova, L. A. Volkova,  
A. B. Burgutin, T. A. Ezhova

✿ **SUMMARY:** Development of stress-resistant plant varieties is a main task of plant biotechnology which is gaining popularity nowadays following the climatic changes and increased environmental pollution. This task implementation is primarily depends on identification of new genes responsible for stress resistance and also on the analysis of all functional features of genes on a cellular, tissue and organ levels. This article is dedicated to the study of *Arabidopsis thaliana* mutant *nfz24* and the analysis of the *NFZ24* gene function in cold stress response. It was demonstrated that reduced carotenoid content and alteration in ABA dependent cold response are the reasons of *nfz24* cold sensitivity.

✿ **KEY WORDS:** stress, cold, mutants, expression of ABA-dependent genes, carotenoids, prolin, tocopherol