

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS
CENTRAL BOTANICAL GARDENS
Laboratory of Plant Biochemistry and Biotechnology

CELL NUCLEI OF PLANTS — EXPRESSION AND RECONSTRUCTION

After Materials of I Regional Conference,
Minsk, 28th-29th of July, 2001)

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
Лаборатория биохимии и биотехнологии растений

Клеточные ядра растений — Экспрессия и реконструкция

Материалы I Региональной научной конференции
г. Минск, 28–29 мая 2001 г.

Минск
2001

УДК 582.31/9:581.17

Научные рецензенты:

В.М.Юрин, доктор биологических наук, профессор (БГУ)
З.Я.Серова, доктор биологических наук (ИЭБ им. В.Ф.Купревича)

Изложены результаты исследований по составу, свойствам, организации интерфазных клеточных ядер высших растений, путей регуляторного воздействия на ядерный аппарат, включая реконструкцию генома с помощью трансгенеза. Представлены отдельные проблемы взаимодействия генома и пластома, чужеродных геномов, а также вопросы регуляторного воздействия на органеллы и клетки фитогормонов.

Редакционная коллегия:

В.Н.Решетников, Н.В.Гетко, О.П.Булко,
Т.И.Фоменко, Е.В.Спиридович

Материалы конференции изданы благодаря финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОК И ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПУЛА ДНК И РНК КЛЕТОЧНЫХ ОРГАНЕЛЛ ПРИ ДЕДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ЗАРОДЫШЕЙ ЗЛАКОВЫХ

Булко О.П.

Центральный ботанический сад НАН Белоруси, 220012, ул.

Сурганова 2В, Минск.

biolog@it.org.by.

Проведены исследования отдельных клеток и клеточных структур дифференцированных (зародышевых) и дедифференцированных (калусных) тканей пшеницы, ржи, тритикале, секалотритикум. Массы клеток калусов превышают массы клеток зародышей и имеют больший объем ядер. При развитии калусов увеличиваются массы клеток при постоянном объеме ядер и, как следствие, изменяется отношение ядро : цитоплазма. Содержание ДНК и РНК калусных тканей как в клетках в целом, так и в ядрах превосходит таковое в набухших зародышах. В то же время относительное содержание нуклеиновых кислот выше в клетках зародышей. В процессе развития калусов в лейкопластах и митохондриях изменяется абсолютное и относительное содержание ДНК и РНК. Клетки калусов, индуцированные из зародышей различных генотипов злаковых, имеют индивидуальные особенности метаболизма нуклеиновых кислот, что свидетельствует о включении информационных механизмов зародышей в калусные ткани.

Введение. Злаки характеризуются большим разнообразием уровней плоидности и различным содержанием ДНК в клеточных ядрах, включая внутривидовые вариации [1,2]. Удобным объектом для изучения клеточных структур и клеток в целом являются зародыши семян в которых содержится информация о развитии будущего растения. При изучении дедифференцировки и калусообразования у растений в многочисленных работах содержатся сведения о количестве хромосом, биосинтезе нуклеиновых кислот, влияние на рост клеток гормональных и питательных сред, роли генотипа в клетках исходного экспланта, а также сведения о геномных вариациях [3]. Поэтому представляет большой интерес наблюдение последствий реконструкции генома при использовании зародышей в системе *in vitro* при образовании калусов. Целью работы было получение данных о морфологических особенностях клеток зародышевых тканей на примере различных видов и сортов злаковых, распределение нуклеиновых кислот в клетках

и наблюдение последствий при дедифференциации в культуре *in vitro*. Исследования также предполагали получение сведений об информационных особенностях клеток зародышей при переходе их в каллусы.

Материалы и методы. В экспериментах использовались зародыши семян ржи сорта Восход и Эврика, тритикале Дар Беларуси, зародыши пшеницы сорта Полукарлик 71, ржи Чулпан и полученные на их основе тритикале, зародыши ржи сорта Вересень, озимой линии тритикале АД206 и полученный на их основе секалотритикум. Каллусы культивировали из зародышей, набухавших в течение суток, на среде Мурасиге-Скуга с использованием гормона 2,4-Д в концентрации 4 мг на литр среды. Для выделения клеточных органелл (ядер, пластид, митохондрий) использовался гомогенат растительной ткани содержащий 0,4 М сахарозы, 25% глицерина, 0,01М $MgCl_2$, 0,001М $CaCl_2$, 0,01М Трис-НСl (рН 7,2-7,4), поливинилсульфат. Часть гомогената после фильтрации использовалась для осаждения ядер, другая часть для осаждения пластид и митохондрий. Содержание (доля) каждого осажденного компонента выражалась в процентах и был возможен подсчет содержания ДНК и РНК в органеллах и надосадочной фракции в одной усредненной клетке. Содержание ДНК и РНК определяли по методу Шмидта и Таннгаузера или по реакции с индолом [4]. Активность предшественника РНК 3H -уридина для включения в РНК каллусов и зародышей составляла 0,2МБк на 1 мл среды с экспозицией 48 ч для каллусов и 4 ч для зародышей. Этанольные осадки постмитохондриальной фракции наносились на мембранные фильтры и радиоактивность РНК измеряли на стинтилляционном счетчике. Подсчет клеток осуществляли в камере Горяева и Фукса-Розенталя после мацерации тканей в смеси глицерин- $^{12}_H$ НСl [5]. Усредненные массы клеток рассчитывали, исходя из массы тканей и количества клеток.

Результаты и обсуждение. При дедифференциации клеток зародышей формируются гигантские клетки каллусов, которые превышают по размерам клетки эксплантов и клетки вегетативных органов растений. С увеличением возраста каллусов размер клеток возрастает. Площадь видимой под микроскопом цитоплазмы больше площади ядра в 1.5 раза, в то время как площадь цитоплазмы в каллусах в возрасте 30-ти дней превышает площадь ядра более чем в 10 раз.

Другие опыты на многочисленных сортах и формах ржи, пшеницы, тритикале, секалотритикум подтверждает увеличение размеров ядер в процессе каллусогенеза.

Таблица 1
Площадь клеток и ядер в зародышах семян сорта Белта и каллусах, мкм²

	Зародыши	Каллусы 14 дней	Каллусы 30 дней
Клетки	349	1740	2744
Ядро	136	194	212
Цитоплазма	213	1546	2532
Цитоплазма/ядро	1.5	7.9	11.9

Таким образом, при дедифференциации тканей зародышей происходит значительное изменение параметров клеток с изменением ядерноплазменных отношений. При развитии каллусов величина ядра изменяется мало, в то же время ядро осуществляет контроль увеличивающейся массы клетки.

Таблица 2
Величина ядер в зародышах и каллусах ржи, пшеницы, тритикале, секалотритикум, d,мк

	Зародыши	Каллусы
Восход	9.5	12.0
Полукарлик	8.8	10.5
Полукарлик 71* *Чулпан, л.151	9.1	11.2
Вересень	9.5	12.0
АД 206	11.4	13.6
Секалотритикум	10.5	13.6

Содержание ДНК в клетках каллусов превосходит таковое в клетках зародышей (табл. 3). Однако, кажущееся превосходство нивелируется, если подсчитать долю ДНК от массы клетки. В этом случае относительное содержание ДНК составляет от 0.07 до 0.18%.

Таблица 3
Количество, масса клеток, содержание ДНК, РНК в зародышах и каллусах тритикале Дар Беларуси.

Ткань		Количество клеток	Масса клетки, мкг	ДНК, мкг	РНК, мкг
Зародыши	24 ч.	145000	6400	64.3	260.5
Каллусы	15 дней	208300	25500	42.7	153.2
	30 дней	330000	26400	99.0	325.3
	45 дней	350000	31400	97.3	290.1

Аналогичные результаты были получены при дедифференциации зародышевых тканей других сортов и форм злаковых. Уменьшение относительной доли ДНК в процессе развития растений возможно является общебиологическим признаком. Так, масса ДНК и масса клеток при прорастании и развитии проростков увеличивается непропорционально. Если доля ДНК на сухую массу клетки составляет более 1% у пшеницы и ржи и 1.5% в зародышах тритикале, доля ДНК в клетках проростков не превышает 0.5%. Доля ДНК в клетках каллусов, как было отмечено, еще ниже.

В процессе азвития растений происходит значительное увеличение содержания РНК, как свидетельство возрастания метаболической активности. Чем выше эта активность, тем выше отношение РНК:ДНК. В зародышах злаковых культур в неделящихся клетках это отношение составляет 2.5–3.0. В метаболически активных каллусах эта величина равна 1.5–3.0. По отношению к массе клетки зародышей РНК составляет 2.5%, в то время как в клетках каллусов 0.07–0.08%. При включении ЗН-уридина в каллусную ткань

определен низкий уровень радиоактивности препаратов РНК – 600–700 имп.мин./мг РНК, в то время как удельная радиоактивность РНК набухших зародышей на порядок выше. Большая доля РНК клетки содержится в постмитохондриальной фракции, поскольку в надосадочной фракции при высокоскоростном центрифугировании находится основная масса рибосомной РНК. РНК постмитохондриальной фракции каллусов, индуцированных из зародышей Дар Беларуси, показала различную удельную радиоактивность в зависимости от длительности развития. На стадиях 15, 30, 45 дней удельная радиоактивность составляла соответственно 550, 700, 450 имп./мин./мг РНК. Самый высокий пик РНК-синтезирующей активности приходится на 30-й день развития каллусов.

Определенный интерес представляет зависимость РНК-синтезирующей активности от величины клеток. В каллусах, индуцированных из зародышей ржи сорта Эврика и Восход 2, масса клеток составляла 10600 и 16000 мкг. В каллусах, имеющих меньшую массу клеток, радиоактивность РНК постмитохондриальной фракции составляла 900 имп./мин./мг, в то время как каллусы с большей массой клеток 700 имп./мин./мкг. Таким образом, каллусы с меньшей массой клеток имели более высокую РНК-синтезирующую активность по сравнению с клетками большей массы. Содержание ДНК в клетках каллусов в течение 45 дней культивирования остается относительно постоянным и составляет 92–97 мкг на клетку (табл. 3). Однако, в течение 30-ти дней содержание ДНК в ядре увеличивается и затем до 45-и дней остается без изменений (табл. 4). Относительное количество ДНК и РНК по отношению ДНК и РНК всей клетки в процессе развития каллусов неоднозначно.

Пик синтеза РНК намечается на 30-й день культивирования каллусов в постмитохондриальной фракции, что соответствует наибольшей радиоактивности этой части клетки в этот период. В лейкопластах и митохондриях изменяется абсолютное и относительное содержание ДНК и РНК в течение 45-ти дней развития каллусов. Как свидетельствуют литературные источники, растения, имеющие различный уровень ploидности, различаются по размерам клеток [6]. Гаплоидные формы достоверно превосходят диплоидные по интенсивности синтеза ядерной, рибосомальной и транспортной РНК. Найден более интенсивный синтез поли-(А+)РНК в диплоидных формах ржи по сравнению с тетраплоидными и содержащими различное количество клеток в зародыше [7].

Таблица 4

**Распределение нуклеиновых кислот
в усредненной клетке каллусов, инициированных
из зародышей тритикале Дар Беларуси**

Возраст, дни	Клеточные органеллы	ДНК, мкг	РНК, мкг	РНК/ ДНК	ДНК, %	РНК, %
15	Ядро	51.0	6.8	0.11	55.1	4.5
	Лейкопласты	22.3	10.5	0.4	24.1	6.9
	Митохондрии	6.4	19.3	2.9	7.0	12.6
	Постмитохон- дриальная фракция	12.6	115.5	—	13.6	75.4
30	Ядро	72.4	10.7	0.14	73.2	3.9
	Лейкопласты	13.1	77.2	5.8	13.3	28.1
	Митохондрии	6.5	55.8	8.5	6.6	20.3
	Постмитохон- дриальная фракция	6.5	217.8	—	6.6	79.2
45	Ядро	70.1	10.1	0.14	72.1	3.5
	Лейкопласты	9.0	29.0	3.2	9.3	10.0
	Митохондрии	3.0	31.9	10.6	3.1	11.0
	Постмитохон- дриальная фракция	18.9	217.5	—	14.5	75.1

Сведения о количественных изменениях ДНК в клетках свидетельствуют о пластичности генома высших растений. При каллусогенезе доказательством этого служит различное количество ДНК на клетку и ядро, когда происходит значительное увеличение его содержания. При этом под контролем ядра в дифференцированных и дедифференцированных тканях оказываются клетки с различной массой.

Дедифференциация тканей зародышей связана со стрессом для клеток со всеми вытекающими последствиями. Каллусогенез при 4°C в течение 6-ти месяцев приводил к образованию мелкоклеточности тканей при очень низкой массе клеток (16000 мкг). При

этом, количество ДНК в клетке составило 17,4 мкг, или значительно меньше, чем в каллусах, которые развивались при 26°C.

Клетки каллусов, индуцированные из зародышей различных генотипов злаковых, имеют индивидуальные особенности метаболизма нуклеиновых кислот. Зародыши с инкорпорированными радионуклидами (226 Бк/кг по цезию-137) содержали больше клеток с меньшей массой и меньшим содержанием ДНК по сравнению с зародышами с низким содержанием радионуклидов (7 Бк/кг). При дедифференциации каллусы приобретали свойства клеток эксплантов с высоким или низким содержанием ДНК в ядре. Таким образом, информационные механизмы зародышей могут включаться в клетки каллусов, как на уровне генотипа, так и на уровне фенотипа.

Благодарности

Выражаю глубокую благодарность доктору биологических наук Гордею И.А. за оказанную помощь в подборе злаковых культур при проведения настоящих исследований.

Литература

- 1 Бойко Е.В., Бадаев Н.С. Сравнительное определение количества ДНК в ядрах клеток сельскохозяйственных злаков. //Цитология 1985. № 5. С. 611-614.
- 2 Bennet M.D. Variation in nuclear DNA in the genus *Secale*. // Chromosoma.1977. V.61. № 1. P. 149-176.
- 3 Кунах В.А. Изменчивость растительного генома в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro*. //Физиол. растений. 1999г. Т.46, №6. С.919-929.
- 4 Булко О.П., Горбачевич В.И., Королева Н.Ю. Методические подходы к определению содержания нуклеиновых кислот в каллусных тканях, полученных от эксплантов зародышей тритикале. //Весці АН Беларусі. 1995. №3. С.100-101.
- 5 Вечер А.С., Булко О.П. Количественное определение содержания субклеточных структур в растительной клетке. //Весці АН Беларусі. 1985. №3. С.104-105.
- 6 Бормотов В.Е., Лопатина Т.И. Полиплоидия и полиморфизм растений по величине клеток. 1986. Минск. 165с.
- 7 Булко О.П. Информационные макромолекулы в клетках проростков ржи на начальных этапах развития. //Весці АН БССР. 1991. №3. С.131-135.

Summary.

The paper contains morphological and biochemical parameters characterizing cereal embryo and callus tissue cells. The cells, nucleus, absolute DNA and RNA amount in callus is much more than in the embryo. But the relative nucleic acid amount exceed in embryo. It is possible that information mechanisms of the embryos may be transmitted into the calluses.