

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР «БИОРЕСУРСЫ»
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
Отдел биохимии и биотехнологии растений

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ
АСПЕКТЫ БИОХИМИИ
И БИОТЕХНОЛОГИИ
РАСТЕНИЙ**

Сборник научных трудов
III Международной научной конференции
14–16 мая 2008 г., Минск

*К 50-летию Отдела биохимии
и биотехнологии растений*

Минск
«Издательский центр БГУ»
2008

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55
Т33

Научные рецензенты:

д-р биол. наук, проф., акад. НАН Беларуси *В. Н. Решетников*;
д-р биол. наук, проф. *В. М. Юрин*;
д-р биол. наук, проф. *В. Л. Калер*

Редакционная коллегия:

*В. Н. Решетников, О. П. Булко, И. И. Паромчик, Т. И. Фоменко,
Е. В. Спиридович, Т. В. Антипова*

Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений : сб. науч. тр. 3-й Междунар. науч. конф., 14–16 мая 2008 г., Минск : к 50-летию Отд. биохимии и биотехнологии растений / НАН Беларуси, Центр. ботан. сад [и др.] ; редкол. : В. Н. Решетников [и др.] . — Минск : Изд. центр БГУ, 2008. — 562 с.
ISBN 978-985-476-604-1.

В сборнике изложены результаты исследований по составу, свойствам, организации интерфазных клеточных ядер и пластид высших растений, путей регулярного воздействия на ядерный аппарат, включая реконструкцию генома с помощью трансгеноза. Представлены отдельные проблемы регуляции морфогенеза растительных клеток и микрклонального размножения некоторых культур, использования молекулярных маркеров в документировании ботанических коллекций. Рассмотрены биохимические основы практического использования растительных ресурсов.

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55

ISBN 978-985-476-604-1

© Центральный ботанический сад
НАН Беларуси, 2008

УДК 581.633311+631.527

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ У РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ (*Hordeum vulgare* L.) ПОСЛЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО УДАЛЕНИЯ КОЛЕОПТИЛЯ НА РАННИХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ ПРОРОСТКОВ.

Булко О.П., Калер В.Л.

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», г. Минск, 220012, ул. Сурганова 2В, e-mail: vkaler@msn.com

Проростки ячменя, у которых удалили coleoptile в возрасте 2-3 дня, показали повышенную скорость развития, увеличенный размер ядра, меньшее количество хлоропластов в клетке и измененное соотношение нативных спектральных форм хлорофилла в первом и втором листе. Такие проростки перенесенные в открытый грунт образовали колосья большей массы в первом и втором поколениях. Предположили, что удаление coleoptile проросток воспринимает как стресс и проходит адаптацию, наследуемую на эпигенетическом уровне.

Введение. Семена растений передают генетически наследуемую информацию между поколениями. В них сохраняется программа развития будущего растения. Главную роль в этом биологическом процессе играет зародыш семени, который в значительной степени дифференцирован, морфологически сложен и каждая его часть при набухании семени и прорастании выполняет специфические функции [1]. Проросток часто используют как удобную экспериментальную систему при изучении биохимических и геномных проявлений в лабораторных исследованиях [2]. Было показано, что разные части проростка содержат различные типы клеток, количества нуклеиновых кислот и различаются по скорости синтеза информационных макромолекул [3]. Сопряженность биологических процессов в эндосперме и зародыше проростков культурных злаков удаётся модифицировать введением 24-эпибрассинолида [4]. Зародыш при этом сохраняет свою генетическую программу, однако, изменяется скорость накопления массы проростка и число хлоропластов в клетке проростка. Все части проростка связаны в ходе его развития и в т.н. «пусковых механизмах» при прорастании. Во взаимодействии корня и побега участвуют как восходящие (ксилемные), так и нисходящие (флоэмные) потоки [5]. Координация ростового ответа проростков отмечена при нарушении соотношения побег-корень путём частичного удаления первичных корней [6].

Важная часть проростка – coleoptile представляет собой полый конус, который защищает первый лист от повреждений, при прорастании семени он быстро вытягивается и через щель в его верхушке проходит первый лист эпикотила. Coleoptile прозрачен и не препятствует прохо-

ждению света для фотосинтеза в первом листе, его клетки и их ядра крупнее, чем в первом листе (собственные исследования), а биосинтез нуклеиновых кислот в колеоптиле замедлен по сравнению с первым листом. Колеоптилю присущи все закономерности биохимических превращений, его использовали при исследованиях апоптоза [7].

В настоящей работе мы попытались оценить некоторые другие функции колеоптиля, сравнивая проростки, у которых удаляли колеоптиль, с проростками, у которых его не удаляли, а также проследить последствие экспериментального стресса, связанного с удалением колеоптиля, на развитие растений вплоть до окончания их генерации.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования 2006 г. служил яровой ячмень сорта Сябра. Семена проращивали в чашках Петри на дистиллированной воде в темноте. В возрасте 72-96 ч с осевых частей этиолированного проростка удаляли колеоптиль и одинаковые по габаритам проростки с 1-м листом и хорошо развитой корневой системой выставляли на естественный свет. Позеленевшие проростки помещали в сосуды с грунтом. Контрольными были проростки (растения) с неповрежденными осями. Далее проростки выращивали в лабораторных сосудах при естественном освещении в течение 10 дней. Часть проростков высаживали в открытый грунт, где растения вегетировали до полного созревания колоса. Одним из контрольных вариантов был высеv в грунт семян традиционным способом. Полученные семена обоих вариантов использовали в 2007 г. для изучения последствия удаления колеоптиля.

В 2007 г. были проведены аналогичные эксперименты по удалению колеоптиля с растениями ячменя сорта Гонар, в которых дополнительно изучали изменения мезоструктуры листа. Высечки из 1-го и 2-го листа проростков фиксировали 4 %-ным глутаровым альдегидом в 30 % этаноле, переносили в смесь 6 н. HCl и 50 % глицерина и выдерживали в течение 18 ч. После нагревания на кипящей водяной бане в течение 30-45 секунд ткани растений разделялись на отдельные клетки. Структурные изменения клеток отслеживали в опытных и контрольных растениях, росших в лабораторных условиях. Размеры ядер и количество хлоропластов в клетке измеряли под микроскопом.

Для измерения соотношения нативных спектральных форм хлорофилла [8] снимали спектр поглощения высечек из свежих листьев на модифицированном нами регистрирующем спектрофотометре СФ 14 (ЛОМО) с интегрирующей сферой. Данные рассчитывали, используя обратную матрицу коэффициентов [9] и свою программу, составленную в среде Турбо Паскаль 7. Для обработки результатов всех измерений применяли пакет программ Statistica 6.

Результаты и их обсуждение. В 48-72-часовых проростках, у которых удален колеоптиль (рис. 1), 1-й лист остаётся и весь проросток остаётся

жизнеспособным. После высадки растений в грунт при освещенности до 10 тыс. люксов развитие таких растений опережает развитие контрольных растений (рис. 2). В опытных растениях появление 2-го листа при той же освещенности происходит на 48 часов раньше контрольных. Опытные растения отличаются низкорослостью и масса корневой системы их больше.

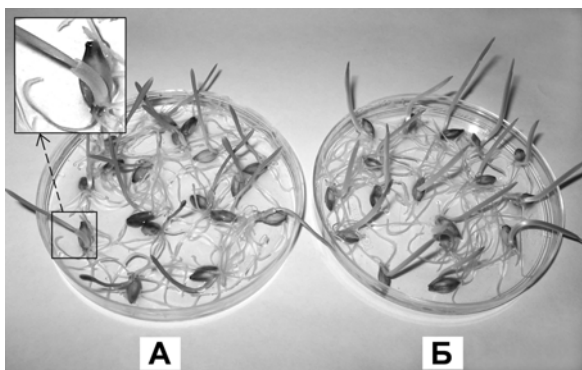


Рис. 1. Проростки растений ячменя после удаления (А) и без удаления (Б) coleoptиля (на врезке – увеличенное изображение фрагмента, где виден остаток конуса coleoptиля).

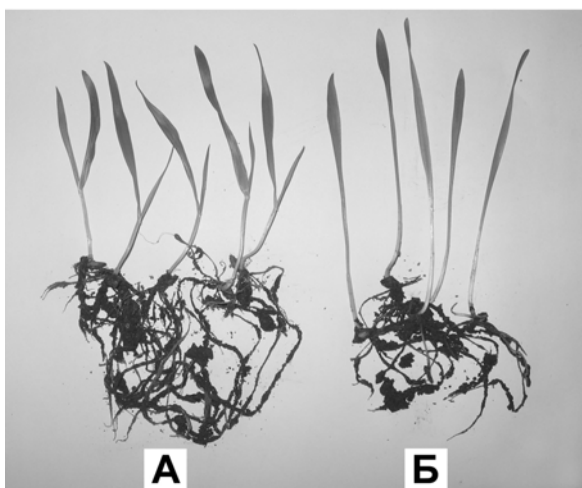


Рис. 2. Те же проростки ячменя перед высадкой в открытый грунт. В качестве теста возможных изменений клеток листьев измеряли размеры ядер.

Средние значения диаметра ядра в клетках опытных растений в 1-м и 2-м листе находятся в пределах 9-10 мкм, в контрольных – 7-8 мкм (рис. 3 А).

Подсчет хлоропластов клеток столбчатой паренхимы из высечек листьев верхней части проростков (рис. 3 Б) показал, что число хлоропластов в клетках контрольных растений существенно больше, чем в клетках опытных растений. Известно, что число хлоропластов в клетках растений коррелирует с размерами клетки [10 (рис.16), 11 (табл.33)], поэтому можно думать, что размер клеток опытных растений меньше чем контрольных, что согласуется с низкорослостью опытных растений (рис. 2 А).

Молекулы хлорофилла в зеленом листе локализованы на различных участках белков, структура которых определяет плотность «упаковки» молекул пигмента.

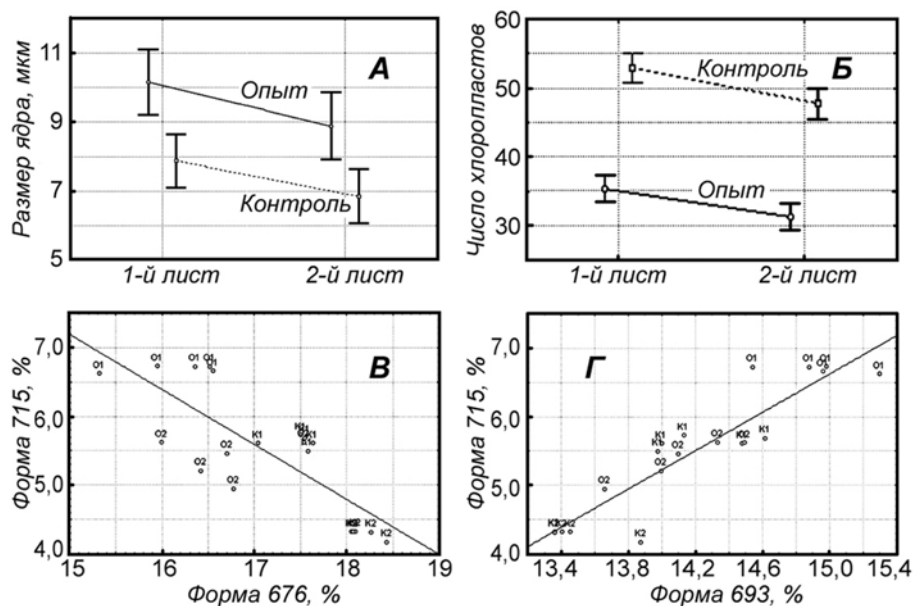


Рис. 3. А – Размер ядра клеток после удаления (Опыт) и без удаления (Контроль) колеоптиля. Б – Число хлоропластов в клетке после удаления (Опыт) и без удаления (Контроль) колеоптиля. По абсциссе – номер листа, показаны границы доверительного интервала при $p < 0.05$. В и Г – Графики рассеяния экспериментальных точек, отражающие соотношение нативных форм хлорофилла 676 (В) и 693 (Г) с формой 715 у опытных (О1 и О2) и контрольных (К1 и К2) проростков. Цифры 1 и 2 означают первый и второй лист соответственно.

Чем плотнее упаковка, тем сильнее сдвиг максимума поглощения хлорофилла в листе и чем больше ёмкость белкового носителя по хлорофиллу, тем выше максимум поглощения соответствующей нативной формы. Было показано, что имеется 9 универсальных спектральных форм хлорофилла в цельном листе (т.н. нативных спектральных форм хлорофилла) [8].

На рис. 3 В и Г в наглядной форме показаны результаты измерения (в пяти повторностях) соотношения нативных спектральных форм хлорофилла в первом и втором листе контрольных и опытных растений. Из рисунков следует, что соотношение форм, (коррелированных как положительно, так и отрицательно) как в 1-м, так и 2-м листьях контрольных растений различается. Эти различия наблюдаются и между листьями опытных растений, а также между 1-ми листьями опытных и контрольных растений. Это же справедливо и для 2-х листьев. Группирование соответствующих точек говорит о не случайном изменении соотношений.

Следовательно, морфометрические изменения на уровне клеток (рис. 3) сопровождаются изменениями распределения молекул хлорофилла на белковом носителе на уровне хлоропласта.

Растения ячменя сортов Сябра и Гонар были высажены в открытый грунт в первых числах мая 2007 г. на трех делянках каждый. Традиционный высев семян ячменя осуществляли 15 апреля. В конце вегетации по-

лучены растения с нормально выполненным колосом. Колосья главного побега сорта Гонар отличались по массе (рис. 4), во всех трех вариантах развития растений: от проростков, у которых был удален колеоптиль; от проростков, у которых сохранен колеоптиль и от семян, высеянных традиционно. В результате обнаружено, что масса колоса опытных растений достоверно превосходит массу колоса контрольных растений.

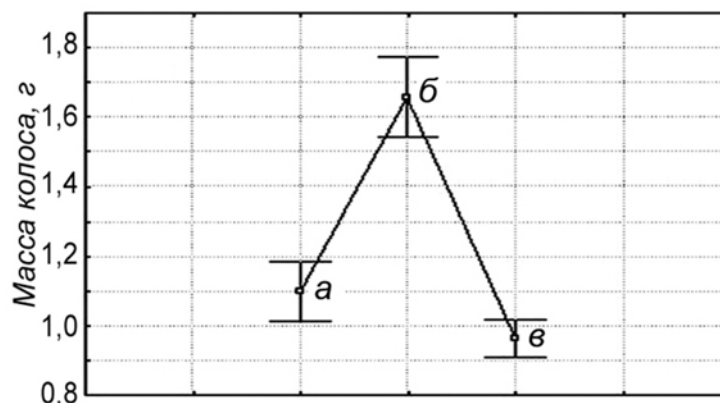


Рис. 4. Масса колоса растений, выращенных из семян (а), из проростков после удаления колеоптиля (б) и из проростков без удаления колеоптиля (в), показаны границы доверительного интервала

Семена ячменя сорта Сябра, полученные в 2006 г. по описанной выше методике, были высеяны в 2007 г. Результаты измерения массы колоса главного побега показаны в таблице. У растений поколения F2 сохранились достоверные различия по массе колоса растений между опытным и контрольным вариантами, которые наблюдались в поколении F1.

Заключение. Полученные данные позволяют заключить, что вызванные экспериментальным удалением колеоптиля изменения не ведут к гибели растения и проявляются на уровне габитуса проростка, органа растения (масса колоса), клетки (размер ядра и число хлоропластов в клетке проростка) и хлоропласта (нативные спектральные формы хлорофилла). Такие изменения наследуются, по крайней мере, по массе колоса, во втором поколении (таблица).

Таблица.

Масса колоса растений ячменя сорта Сябра (г.), выращенных из проростков

	Поколение	Среднее	t _{0.05}	p
Проростки с колеоптилем	F1	1,53 (60)	5,97	0,000000
Колеоптиль удалён	F1	1,88 (60)		
Проростки с колеоптилем	F2	0,95 (30)	6,06	0,000000
Колеоптиль удалён	F2	1,25 (30)		

Примечание: в скобках показано число измерений.

Есть основания считать, что наследование этих изменений реализуется на уровне эпигенетических механизмов. Так, показано, что когда семена растений *Arabidopsis thaliana* L. подвергали сильному ультрафиолетовому облучению [12], наблюдали защитную наследуемую рекомбинацию. Авторы предположили эпигенетический механизм передачи информации, который не затрагивает участки ДНК (гены), но влияет на экспрессию гена, и что растение воспринимает ультрафиолетовое облучение как стресс.

В проростках злаков, а в данном случае в проростках ячменя, колеоптиль и первый лист трофически связаны со щитком и эндоспермом. Колеоптиль может рассматриваться как экспортёр сигнальных молекул [5]. Можно предположить, что проростки воспринимают удаление колеоптиля как стресс. На ранних стадиях развития проросток наиболее чувствителен к экстремальным условиям и проявляет повышенные адаптивные свойства. После удаления колеоптиля он оперативно адаптируется на уровне эпигенеза и приобретают новые морфологические признаки.

Направленную модификацию взаимодействия органов в опытах, блокирование или деблокирование биологических процессов тоже можно рассматривать как стрессовое воздействие на растение. Вопрос о том, могут ли сохраняться приобретаемые в результате стресса положительные признаки в ряду последующих поколений и не появятся ли какие-либо отрицательные признаки, тема дальнейших исследований.

Литература

1. Эзау К. / Анатомия семенных растений. «Мир», М. 1980. С. 479-502.
2. Булко А.П., Гардзей І. А. // Весці Акадэміі навук БССР. Сер. біял. навук. 1989. №7. С. 44-47.
3. Булко А.П. // Весці Акадэміі навук БССР. Сер. біял. навук. 1991, №3, С. 131-135.
4. Булко О.П., Калер В.Л., Решетников В.Н. // Весці Акадэміі навук Беларусі. Сер. біял. навук. 2006, №3. С10-13.
5. Dodd I.C. // Plant and soil. 2005, V.274. P. 251-270.
6. Высоцкая Л.Б. // Физиол. Растений. 2005. Т. 52. С763-768.
7. Ванюшин Б.Ф. // Успехи биол. химии. 2001. Т. 48. С. 3-38.
8. Литвин Ф.Ф., Беляева О.Б., Гуляев Б.А., Карнеева Н.В., Синешек В.А., Стадничук И.Н., Шубин В.В. // Хлорофилл. Мн. 1974. С. 215-231.
9. Гуляев Б.А., Венедиктов Е.П., Карнеева Н.В., Литвин Ф.Ф. // Научные доклады высшей школы. Биологические науки. 1973. № 10. С. 48-56.
10. Мокронос А.Т. /Онтогенетический аспект фотосинтеза. 1981. «Наука», М. 196 С.
11. Цельникер Ю.Л. / Физиологические основы теневыносливости древесных растений. 1978. «Наука», М. 212 С.
12. Molinier J., Ries G., Zipfel C., Hohn B. // Nature. 2006. V. 442. P. 1046-1049.

Summary

Cotyledon detached 2-3 day old barley seedlings are shown to have elevated development rate, cell nuclei size, decreased number of chloroplasts per cell and changed chlorophyll native spectral forms ratio in the first and the second leaves. Such seedlings placed in open ground are shown to make more massive ears in the second generation. Cotyledon detaching is suggested to be a stress to young plantlets resulting in inheritable adaptation on epigenetic level.