

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
ОТДЕЛ БИОХИМИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

**КЛЕТОЧНЫЕ ЯДРА И ПЛАСТИДЫ
РАСТЕНИЙ:
БИОХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ**

Сборник материалов Международной конференции,
г. Минск,
26-28 мая 2004 г.

Минск
УП «ТЕХНОПРИНТ»
2004

**Клеточные
ядра
и пластиды
растений:**

биохимия и биотехнология

26-28
Май 2004 МИНСК



БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОТИПОВ КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО С ПОВЫШЕННОЙ СИМБИОТИЧЕСКОЙ СПОСОБНОСТЬЮ

Кондрацкая И.П.¹, Близнюк Л.Г.², Фоменко Т.И.¹

¹Центральный ботанический сад НАН Беларуси,
220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2В
e-mail: biolog@it.org.by

²Институт земледелия и селекции НАН Беларуси,
222160, г. Жодино, ул.Тимерязева, 1

Методы растениеводческой биотехнологии в настоящее время достаточно широко применяются в селекции как для получения исходного материала, так и для оценки по некоторым физиологическим признакам уже созданных образцов и популяций. Такой метод, как микроклональное размножение с использованием процесса прямой регенерации, позволяет более активно использовать индивидуальный отбор, считающийся наиболее эффективным в селекции перекрестников. Прямая регенерация для клевера лугового имеет неоспоримое преимущество перед каллусными культурами в создании исходного материала по причине высокой скорости процесса получения регенерантов (~40 дней) и минимальной требовательности к внешним физическим условиям культивирования. Нами установлено, что при работе с индивидуальными растениями клевера лугового в процессе создания генетического разнообразия методом *in vitro* следует учитывать концентрацию цитокинина в среде культивирования, при которой каждый генотип будет иметь наибольший коэффициент размножения и высокую степень развитости регенерантов. Коэффициент размножения и процесс ризогенеза генотипически специфичны, однако скорость ризогенеза можно стимулировать добавлением в питательную среду ИМК. Концентрация БАП, который из всех исследованных цитокининов оказался наиболее активным индуктором процесса прямой регенерации, колеблется для разных генотипов клевера лугового от 2 до 18 мг/л. Регенеранты возникают в большинстве случаев из клеток паренхимы

обкладки проводящих пучков эксплантов, клеток эпидермального и субэпидермального слоев, а также из меристематических очагов клеток в любом месте эксплантов (конусы нарастания, черешки семядольных листьев, основания тройчатых листиков.

У перекрестно опыляемых культур внутри одного сорта наблюдается большое число генотипов. Немаловажную роль в характеристике физиологического состояния растения при прохождении фаз онтогенеза играют растворимые белки, отражающие изменение уровня экспрессии генома. Одной из важнейших является проблема взаимодействия ядерной и цитоплазматических генетических систем в обеспечении тканевой и клеточной дифференцировки в ходе морфогенеза растений. При изучении генетических механизмов морфогенеза растений исследуется главным образом роль ядерных генов и не уделяется внимание роли цитоплазмы. В то же время эта проблема является важной для понимания генетических механизмов морфогенеза растений и обеспечения устойчивости к различным биотическим и абиотическим факторам.

Изучение белков цитоплазмы представляет также интерес с позиции оценки влияния клубеньковых бактерий и самого процесса инокуляции на активность растительных генов. Легкорастворимые белки цитоплазмы высоко лабильны, активацию можно рассматривать как первичный ответ растений на изменение физиологических показателей системы. Нами проведена оценка исследуемых микроклонов произрастающих в условиях модельной экосистемы по электрофоретическим спектрам легкорастворимых белков.

Показано, что полипептидные спектры легкорастворимых белков листьев регенерантов клевера лугового, выращенных на средах с 2 мг/л и 10 мг/л БАП представлены 36 дискретными зонами с молекулярной массой (М.м.) \approx от 5 кД до 100 кД и обнаруживают сходство по большинству полипептидных компонентов. Качественные изменения характеризуются отсутствием у клона 22 полипептида с М.м. 12 кД. Незначительные внутриклоновые изменения по уровню экспрессии полипептидов выявлены для регенерантов клонов 13, 22 и 25, выращенном на среде с 2 мг/л БАП и клона 7Б выращенном на среде с 10 мг/л БАП, характеризуются усиленной экспрессией полипептидов по всему

спектру. В тоже время в регенеранте 4 клона 7, выращенном на среде с 10 мг/л БАП наблюдается уменьшение экспрессии полипептидов с М.м. \approx от 70 кД до 60 кД и от 50 кД до 43 кД.

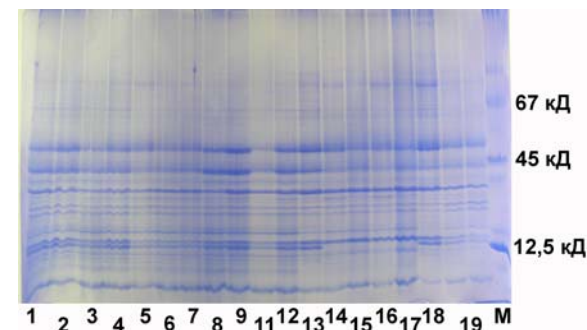


Рис. 1. Электрофоретический спектр легкорастворимых белков клевера лугового, выращенных на средах с 2 мг/л БАП и 10 мг/л БАП.

- 1-4 – клон 24, выращенный на среде с 2 мг/л БАП;
- 5-6 – клон 13, выращенный на среде с 2 мг/л БАП;
- 7-12 – клон 7, выращенный на среде с 10 мг/л БАП;
- 13-16 – клон 22, выращенный на среде с 2 мг/л БАП;
- 7-19 – клон 25, выращенный на среде с 2 мг/л БАП.

При анализе электрофореграммы легкорастворимых белков регенерантов клевера лугового, выращенных на средах с 10 мг/л и 2 мг/л БАП после инокуляции полипептидные спектры по компонентному составу в основном идентичны во всех клонах, изменения выражаются в области высокомолекулярных полипептидов. Выявлены полипептиды с молекулярной массой около 20 кД и ниже, а полипептиды с молекулярной массой 10 кД и ниже характеризуются очень высокой экспрессией белка. Возможно, после инокуляции растений не произошло стабилизации синтеза высокомолекулярных полипептидов. Наибольшей стабильностью характеризуются среднеподвижные полипептиды. Однако высказанные предположения требуют проведение повторных экспериментов и более глубоких аналитических экспериментов. На данный момент мы можем констатировать, что

полипептидные спектры легкорастворимых белков до и после инокуляции имеют существенные качественные и количественные отличия по значительному числу белковых компонентов.

Полипептидные спектры легкорастворимых белков регенерантов клевера лугового, выращенные на среде с 4 мг/л БАП, (рис. 2) сходны по большинству полипептидных компонентов. Однако у клона 12 наблюдается внутриклоновая изменчивость по спектрам легкорастворимых белков. Так в регенерантах 1-3 обнаружены низкомолекулярные полипептиды с молекулярной массой (М.м.) ниже 10 кД, которые не обнаружены в регенерантах 4-5, а регенерант 6 существенно отличается от регенерантов 1-5 отсутствием полипептида с М.м. около 80 кД. Также у регенеранта 6 не идентифицированы низкомолекулярные полипептиды.

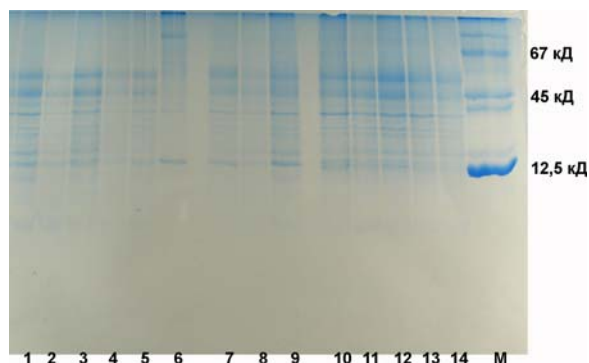


Рис. 2. Электрофорез легкорастворимых белков клевера лугового, выращенного на среде с 4 БАП (до инокуляции).
1-6 – клон 12; 7-9 – клон 3; 10-14 – клон 15.

Следует также обратить внимание на тот факт, что низкомолекулярные полипептиды с М.м. ниже 10 кД, которые не обнаружены в клоне 12 (регенеранты 1-3) и в клонах 3 и 15. Во всех регенерантах клона 15 отмечен полипептид с М.м. 12,5, который не выявлен в клонах 3 и 12. Однако клон 12 характеризуется рядом отличий. Так в регенерантах 1-3 обнаружены низкомолекулярные полипептиды с молекулярной массой (М.м.) ниже 10 кД, которые не наблюдаются в регенерантах 4-5, а регенерант

6 существенно отличается от регенерантов 1-5, он имеет полипептид с М.м. около 80 кД, который отсутствует в регенерантах 1-5, а также в регенеранте 6 не обнаружены низкомолекулярные полипептиды. Клоны 3 и 15 в отличие от клона 12 не имеют существенных внутриклоновых отличий.

Следует также обратить внимание на тот факт, что низкомолекулярные полипептиды с М.м. ниже 10 кД, которые наблюдаются в клоне 12 (регенеранты 1-3) не обнаружены в клонах 3 и 15. Однако клон 15 во всех регенерантах имеет полипептид с М.м. 12,5, а в клонах 3 и 12 он не выявлен.

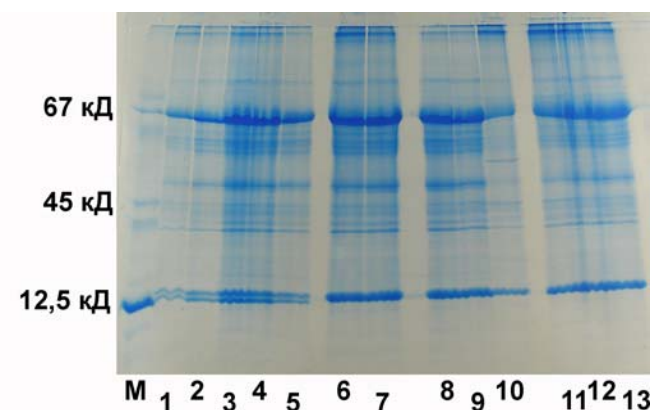


Рис. 3. Электрофоретическое разделение легкорастворимых белков клевера лугового, выращенных на среде с 4 БАП, после инокуляции.
1-5 – клон 15; 6-10 – клон 12; 11-13 – клон 3.

Анализ результатов подтверждает как наличие, так и отсутствие внутриклоновой изменчивости у генотипов клевера лугового при наличии эффекта прямой регенерации, индуцируемой бензиладенином в концентрации 4 мг/л. Количественные изменения в уровне экспрессии отдельных полипептидов могут быть связаны с прохождением разных фаз развития растений, поскольку образцы отбирались с растений находящихся в фазах кущения-стеблевания, бутонизации-цветения, цветения. Данная

закономерность сохранялась для клонов, выращенных на всех исследуемых концентрациях БАП.

При исследовании электрофореграмм легкорастворимых белков клевера лугового после инокуляции *Rh.trifolii* у всех клонов наблюдается увеличение уровня экспрессии по всему спектру полипептидов, особенно это выражено в изменении количественного содержания полипептидов с М.м. 53,0 кД и 12-12,5 кД, которые соответствуют большой и малой субъединицам РБФКО. Таким образом можно отметить что инокуляция влияет на усиление фотосинтетических процессов в растении. Следует отметить стабильность внутриклоновой изменчивости, полученной при прямой регенерации у клона 12.

Таким образом, биохимический анализ легкорастворимых белков выявил значительные изменения в уровне экспрессии и качественном составе полипептидных компонентов после проведения инокуляции растений клевера лугового бактериями *Rh.trifolii*. Значительное увеличение уровня экспрессии основного белка хлоропластов рибулезодифосфаткарбоксилазы предполагает усиление процессов фотосинтеза, что может иметь положительное влияние на продуктивность клевера лугового. Установлено как наличие так и отсутствие генотипически обусловленной внутриклоновой изменчивости по спектрам легкорастворимых белков.