

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 трансгенеза. 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

582.951.4:57.04:581.19:576.315.42

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕАЛИЗАЦИИ ПРОГРАММЫ ЛИСТОВОГО СТАРЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ *NICOTIANA TABACUM*.

1. ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ НУКЛЕОПРОТЕИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЯДЕР СТАРЕЮЩИХ ЛИСТЬЕВ

Кузовкова А.А., Шабуня П.С., Спиридович Е.В.

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», г. Минск, 220012, ул. Сурганова 2В, e-mail: floraia@nm.ru

На трансгенных растениях табака, экспрессирующих ген β -1,4-глюканазу – один из генов, связанных со старением, исследовались особенности состояния надмолекулярных нуклеопротеидных комплексов ядер в процессе листового старения. Первичные результаты исследований позволили предположить, что процессы листового старения листьев, по-видимому, контролируются модифицированными гистонами H2В и H3.

Введение. Старение и смерть – важные аспекты развития всех живых организмов, в том числе и растений. В настоящее время старение растений рассматривают не столько как финальную стадию развития, ведущую к смерти всего организма, сколько как сложный высоко регулируемый процесс, проходящий через всю жизнь растения. Сегодня наиболее пристальное внимание оказывается исследованию механизмов старения листьев, которое может быть индуцировано внешними (высокие или низкие температуры, засуха, затенение, повышенное содержание озона, недостаток питательных веществ, атака патогена и поранение) и внутренними сигналами (возраст растения и стадия развития репродуктивных органов). Первому видимому признаку старения листьев (начальному хлорозу) обычно предшествует усиление синтеза белка, на более поздних стадиях происходят заметные изменения в структуре клетки, метаболизме и экспрессии генов. Наблюдается мобилизация питательных веществ из стареющих в молодые ткани и репродуктивные органы, для чего до самых поздних стадий старения поддерживается в рабочем состоянии сосудистая ткань. Одновременно происходит координированная деградация таких макромолекул как белки, РНК, липиды мембран. Напротив, содержание ДНК остается довольно постоянным, и конденсацию хроматина с последующей фрагментацией ДНК можно наблюдать только на очень поздних стадиях старения [1]. Данные физиолого-биохимические изменения состояния листовых клеток связаны с изменением экспрессии многих генов. Гены, экспрессия которых существенно повышается или вовсе инду-

цируется *de novo*, были названы как SAGs (senescence-associated genes). К ним относятся гены ферментов деградации (различные РНКазы, протеазы, липазы, гидролазы), гены, чьи продукты участвуют в транспорте питательных веществ, а также гены 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатоксидазы, альдегиддегидрогеназы, ауксинрегулируемого белка, циннамоил-КоА-редуктазы, цистеин-синтазы, гистона H2B, НАДФ-изоцитратдегидрогеназы, различных киназ [2]. Гены, чья экспрессия снижается во время старения, названы SDG (senescence-downregulated genes). Эти гены в большинстве своем кодируют белки, связанные с фотосинтезом. Сегодня определена функция лишь немногих изолированных генов, чья экспрессия изменяется при старении. Это одна из задач текущих исследований в области старения листьев и его регуляции [1].

Одной из наших целей было изучение особенностей состояния надмолекулярных нуклеопротеидных комплексов ядер в процессе листового старения, используя модельные трансгенные растения *Nicotiana tabacum*, конститутивно экспрессирующие бактериальный ген *cel7*, относящийся к SAGs и кодирующий фермент β -1,4-глюканазу. Предполагается, что происходящее при старении листьев выключение одной генетической программы и инициация другой связаны с модификациями данных клеточных структур.

Материалы и методы исследований. Растения табака выращивали в колбах в стерильных условиях на 1/2 среде Мурасиге – Скуга [3] при температуре 22 – 25⁰С, освещенности 3-5 тыс.лк, 16-тичасовом световом дне. Исследовались листья 40- и 70-дневных растений. Выбор временных экспозиций обусловлен различным физиологическим состоянием растений (40-дневные – зрелые, 70-дневные – активно стареющие). Выделение ядер из листьев табака проводили как описано в [4]. Белки эухроматина экстрагировали из ядер при +4 °С 20мМ трис-НСl (рН 7.4) буфером с 0,35М NaCl, 6 мМ CaCl₂, 2 мМ MgCl₂, 8 мМ меркаптоэтанола. Кислоторастворимые белки экстрагировали из ядер 0,2М Н₂SO₄. Концентрацию белков во фракциях анализировали микрометодом Bredford [5] или с использованием набора реагентов «2-D Quant Kit» (производство GE Healthcare, США). Для дальнейшего электрофо-ретического исследования образцы уравнивались по содержанию белка (15 мкг – для 1D-электрофореза, 50 мкг – для 2D-электрофореза). Белки эухроматина электрофоретически разделяли в щелочной системе по [6]. Ядерные кислоторастворимые белки анализировали 2D-электрофорезом (1-ое направление – АУТ- электрофорез по [7], 2-ое направление – SDS-электрофорез по [6]). Белки в ПААГ окрашивали серебром, используя набор фирмы Amersham Biosciences (Швеция). В качестве белков-маркеров применяли стандарты фирм Sigma (14,2–66 кДа) и Fermentas (14,4–116 кДа).

Результаты исследования и их обсуждение. Для экстракции из ядер растений белков эухроматина – транскрипционно активной части хроматина – нами использовался буфер с 0,35М NaCl. Данный буфер позволяет преимущественно выделить негистоновые белки (в частности, НМГ-белки) и коровые гистоны классов 2, 3 и 4.

1-D-электрофорез эухроматиновых полипептидов листьев 40- и 70-дневных контрольных и трансгенных ре2 растений табака в денатурирующих условиях в щелочной системе показал (рис.1А), что в процессе старения (в исследуемых точках), действительно, существенным образом меняется накопление белков, молекулярная масса (Мм) которых (в диапазоне от 20,1 кД и ниже) совпадает с таковой у НМГ-белков и коровых гистонов Н2, Н3 и Н4. Естественное старение листьев существенным образом снизило уровень накопления полипептида с Мм 18 кД и повысило – полипептида с Мм 19,4 кД, которые предположительно могут составлять субклассы гистонов Н2. Также в процессе листового старения наблюдалось некоторое ослабление накопления белка, по Мм близкого к гистону Н3. Действительно, модификация гистонов является одним из ключевых моментов в регуляции экспрессии генов растений, и поэтому можно предположить, что процессы листового старения в табаке также будут сопровождаться образованием разных субклассов гистонов Н2 и Н3.

Для получения более детальной информации из ядер 40- и 70-дневных растений табака с использованием 0,2М H₂SO₄ были прямо экстрагированы сильноосновные белки, большую часть которых составляют коровые гистоны. Для их анализа применили 2-D- электрофоретическое разделение (1-ое направление – АУТ-электрофорез, 2-ое направление – SDS – электрофорез). При данном типе электрофореза разделение белков в 1-м направлении идет по их заряду и массе, а во 2-ом – только по массе. Такой подход позволяет выявить субклассы гистонов, что соответствует нашим целям исследований. Однако, как видно из рисунков 1Б и В, двумерные электрофореграммы сильноосновных ядерных белков листьев 40- и 70-дневных растений табака практически идентичны, за исключением белкового пятна, присутствующего на 2-D-электрофореграмме белков стареющих листьев и выделенного рамкой. Опираясь на результаты исследований Andersson et al. [2] по осеннему старению листьев тополя дрожащего, которые с использованием DNA-microarray-анализа доказывают принадлежность генов гистона Н2В к SAGs, мы предположили, что данное белковое пятно может соответствовать одному из субклассов гистона Н2В. Однако масс-спектрометрический анализ идентифицировал его как гистон Н3, а точнее – димер гистона Н3.

Таким образом, данный тип 2-D- электрофореза не позволил нам вы-

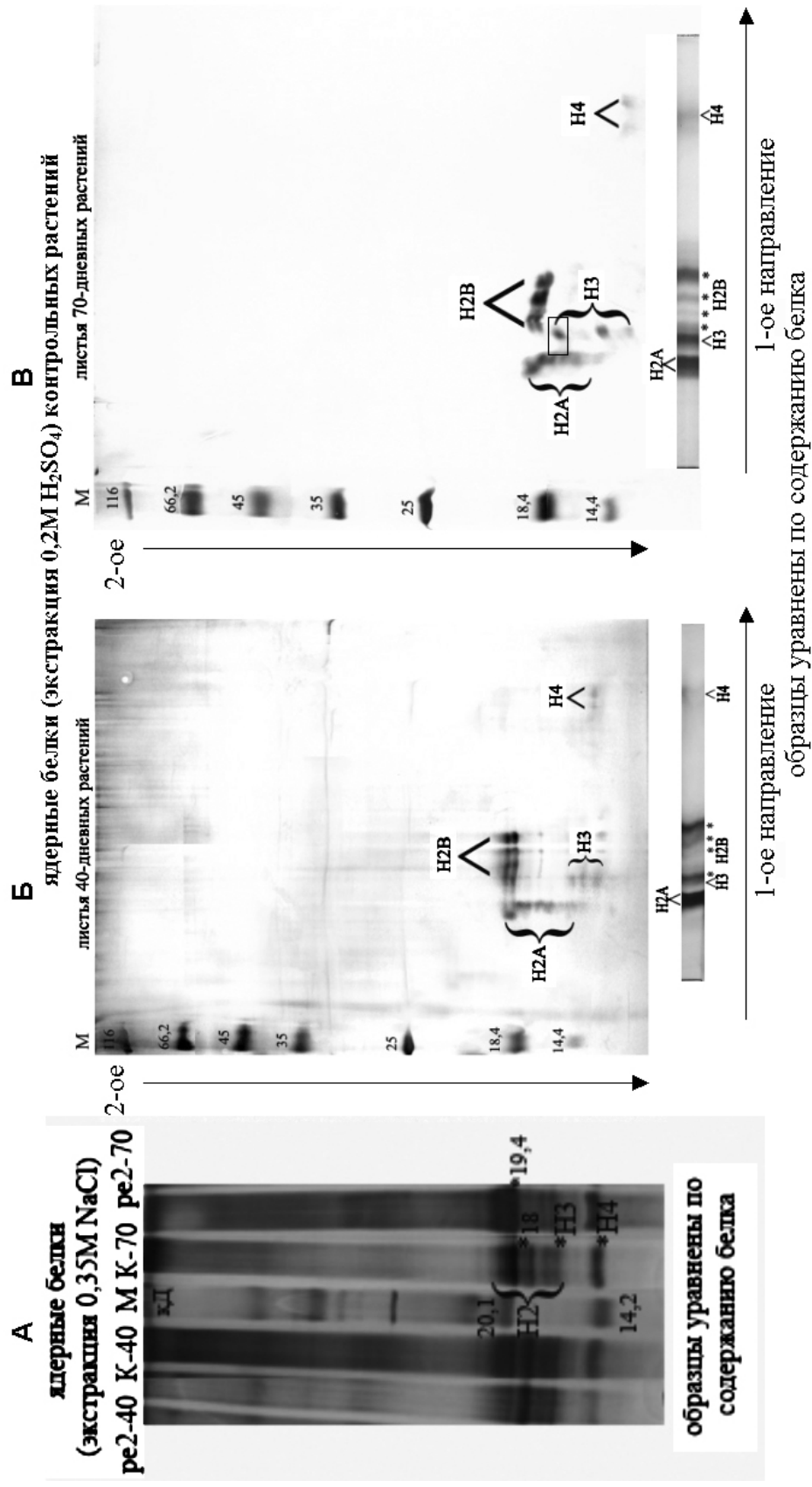


Рис. 1. 1-D-электрофореграмма эухроматинных белков (А) и 2-D-электрофореграммы ядерных сильноосновных белков (Б, В) листьев 40- и 70-дневных растений табака: К-контрольные; ре2 – трансгенные растения

явить в листьях 70-дневных растений табака какие-то новые субклассы гистонов H2B и H3, которые бы были ответственны за реализацию программы листового старения. Наши исследования в этом направлении будут продолжены. Сотрудники выражают благодарность Чумаковой И.М. за выращивание трансгенных растений табака.

Литература

1. Zimmermann, P. The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development / P. Zimmermann, U. Zentgraf // Cellular and Molecular Biology Letters. – 2005. – Vol. 10. – P. 515-534.
2. A transcriptional timetable of autumn senescence / A. Andersson [et al] // Genome Biology. – 2004. – Vol. 5, Issue 4, Article R24. – P. 1-13.
3. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // Ibid. - 1962. - Vol. 15. - P.473-497.
4. Техника биохимического исследования субклеточных структур и биополимеров растительной клетки / О.П. Булко [и др.]; под ред. А.С. Вечера. – Минск: Наука и техника, 1986. - С.11-24.
5. Bradford, M.M. A rapid sensitive method for the action of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein –dye binding / M.M. Bradford // Anal. Biochem. - 1976. - Vol. 72. - P. 248-254.
6. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. - 1970. - Vol. 227. - P. 680-685.
7. Chromatin techniques for plant cells / Ch. Bowler [et al.] // Plant J.- 2004.- Vol. 39. – P.776-789.

Summary

Features of nucleic-protein complexes from nuclei were investigated during leaf senescence on transgenic plants of *Nicotiana tabacum* expressing β -1,4-glucanase (senescence associated gene). Primary research results allow us to suppose that, processes of leaf senescence, probably, are controlled by modified H2B and H3 histones.