

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



## **БИОХИМИЯ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР РАСТЕНИЙ**

Решетников В.Н., Спиридович Е.В., Гончарова Л.В.,  
Касилович Н.В., Зубарев А.В.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси,  
220012, Беларусь, г. Минск, ул. Сурганова, 2В,  
e-mail: [biolog@it.org.by](mailto:biolog@it.org.by)

Познание растений проводится на разных уровнях: популяционном, целостного растения, тканевом, субклеточном, молекулярном. Основываясь на положении, что минимальной единицей живого является клетка, биохимические исследования лаборатории биохимии и биотехнологии растений традиционно связаны с изучением клетки и внутриклеточных органелл, в

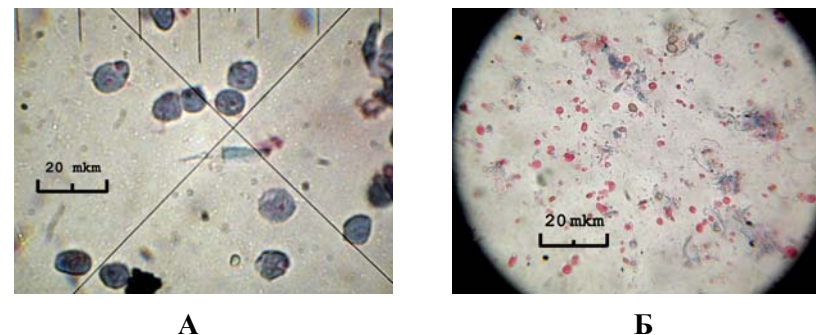
которых локализованы важные процессы накопления и утилизации веществ и энергии.

Такие исследования были начаты А.С. Вечером и касались в первую очередь пластид растений – хлоропластов, амилохлоропластов, лейкопластов. Изучались их состав, структура, функции. В 80-е годы в число анализируемых структур было включено клеточное ядро, поскольку именно эта органелла является центром информационного обеспечения клетки и организма – примерно 95% общего числа генов сосредоточено в ядре. В последние годы основные исследования были направлены на изучение организации надмолекулярных дезоксирибонуклеопротеидных (ДНП) и липидных комплексов, локализованных в клеточных ядрах. Цель исследований – нахождение новых путей и условий регуляции активности генома растений, включая генно-инженерную реконструкцию клетки для получения трансгенных растений.

Эта комплексная задача имеет ряд составляющих разной степени сложности. Значительная часть экспериментальной работы была направлена на изучение «фондов» нуклеиновых кислот, поскольку ДНК в высших организмах находится в составе ДНП-комплексов той или иной степени компактизации и по-разному связана с белками этого комплекса. Проведены исследования состава ДНП-комплекса, уровня его компактизации и активности в целом. Поэтому использовались ядра органов и тканей растений в состоянии физиологического покоя (репрессированный геном) и в процессе прорастания и роста (экспрессирующийся геном). Как правило, анализировались клеточные ядра зародышей сухих зерновок злаковых (тритикале, рожь) и проростки семян (от 00 до 11 – по десятичному коду стадий роста Задокса), клубни и листья картофеля, а также каллусные (недифференцированные) ткани этих культур.

Важной экспериментальной задачей является получение препарата чистых ядер растений. В зависимости от поставленных задач исследователи используют различные методики выделения интерфазных ядер из растительного материала. Наряду с методами, разработанными в нашей лаборатории, хорошие результаты по получению чистых препаратов ядер дает метод Ивановой и Вафиной [1]. На рис. 1А представлена

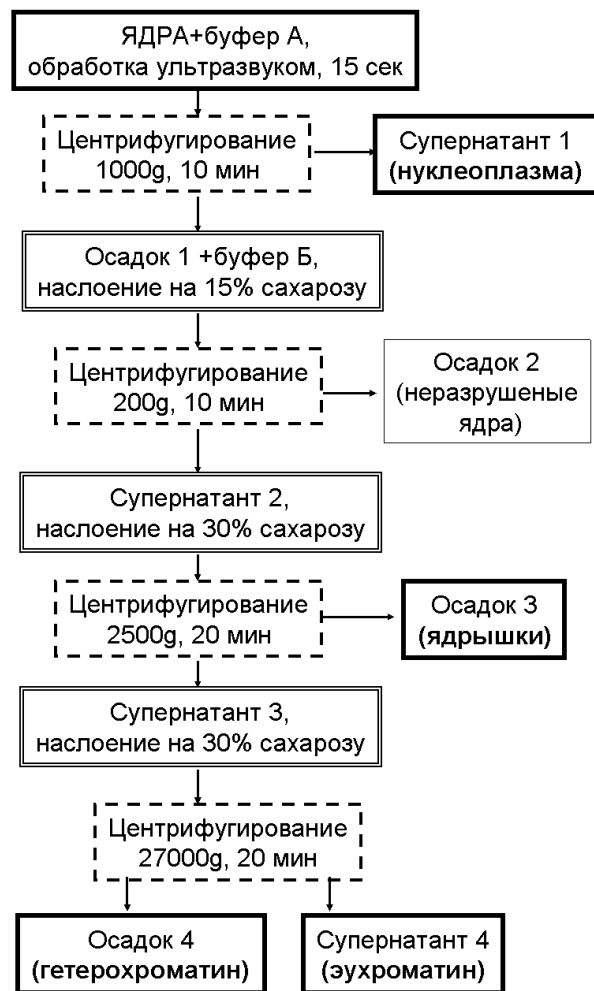
фотография микропрепарата интерфазных ядер 72-часовых этиолированных проростков ржи Пуховчанка. Для фракционирования клеточных ядер растений на компартменты мы впервые применили метод, ранее используемый на тканях животных [2] и основанный на обработке препарата ультразвуковым дезинтегратором с последующим дифференциальным центрифугированием (рис. 2). Белковый электрофорез полученных фракций (рис. 3) проводили по методу Laemmli [3].



**Рис. 1.** Фотографии микропрепаратов сделанные при помощи светового микроскопа (объект – рожь Пуховчанка):  
А – ядра; Б – ядрышки.

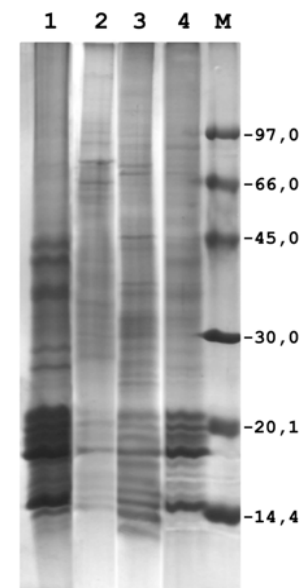
Нами представлена общая характеристика изолированного интерфазного ядра и его основных морфологических структур – кариоплазмы, ДНП-комплекса (хроматина) и ядерного матрикса, составляющего жесткую основу ядра и представляющего собой белково-липидо-нуклеиновый комплекс высокой степени компактизации [4].

В настоящее время ядерный матрикс привлекает внимание исследователей в связи с тем, что, кроме механической роли каркаса, он играет существенную роль в метаболических процессах ядра и их регуляции. Ядерный матрикс обуславливает высший порядок организации хроматина [5], участвует в регуляции и инициации репликации ДНК, транскрипции и транспорте РНК как внутри ядра, так и из ядра в цитоплазму. Указанная структура состоит из немембранных образований:



**Рис. 2.** Схема разделения интерфазных ядер на компартменты.

наружного фиброзного слоя и внутренней фибриллярно-гранулярной сети.



**Рис. 3.** Электрофореграмма белков ядерных фракций 72-часовых проростков ржи Пуховчанка: 1 – суммарная фракция; 2 – нуклеоплазма; 3 – эухроматин; 4 – гетерохроматин. М – маркеры.

Необходимо отметить, что все сведения о структуре и функции ядерного матрикса получены на примере животных тканей. Каркасные образования ядер растительных клеток почти не изучались, что объясняется многими методическими трудностями, которые возникают при изучении ядер растений и их компартментов. Тем не менее, исследование особенностей матрикса ядер растений, определение структуры и функции отдельных его компонентов необходимо для детального изучения организации и функционирования наследственного аппарата эукариотической клетки.

При изучении зародышей злаковых в состоянии физиологического покоя (неактивный геном) и 24-, 72-часовых проростков (активно функционирующий геном) ядерный матрикс получали последовательной обработкой изолированных интерфазных ядер неионным детергентом, буфером с высокой ионной силой и нуклеазами по методу [4].

Биохимические исследования подтвердили, что получаемый матрикс представляет собой сложную белковую структуру, с которой ассоциировано 5-15% от общего содержания в ядре ДНК, РНК и липидов. Ядерный матрикс покоящихся зародышей отличается от ядерного матрикса 24- и 72-часовых проростков повышенным содержанием РНК и липидов, что обусловлено, по-видимому, наличием связанной с белками матрикса про-иРНК и осенним накоплением липидов, способствующих инактивации структуры в период покоя.

Электрофоретические исследования белков матрикса показали наличие в нем до 30 отдельных полипептидных компонентов [6]. Явно проявляется «триплет» белков с молекулярной массой 69, 65 и 63 кД, который считается характерной приметой ядерного матрикса – белками его фиброзного слоя, именуемыми ламинами А, В и С. «Триплет» наиболее ярко выражен в ядрах проростков. Исходя из этого можно считать, что количественные изменения белков ламин связаны с переходом ядра из инертного в активное метаболическое состояние. Наибольшие изменения при прорастании семян наблюдаются в зоне электрофоретически высокоподвижных белковых компонентов матрикса (11-17 кД), количество которых уменьшается в ядрах проростков.

Таким образом, ядерный матрикс растений (например, озимой ржи) является динамической белковой структурой, которая подвержена изменениям в процессе развития растения. Вместе с тем, морфологические и биохимические данные показывают, что ядерный матрикс растительной клетки подобен матриксу животной клетки, что свидетельствует об общих принципах организации ядер разных эукариот.

Как отмечалось выше, основной морфологической структурой ядра является контактирующий с ядерным матриксом надмолекулярный ДНП-комплекс – хроматин, разделяемый по степени компактизации на эу- и гетерохроматин (диффузный и конденсированный). Важнейшая функциональная часть хроматина – ДНК, а также ядерные белки (гистоны и негистоновые белки (НГБ)), которые образуют фибриллы и структуры разной морфологической сложности: нуклеосомы, 30- и 100-нанометровые фибриллы, петли, розетки и др.

Согласно существующим представлениям, транскрипционно активная часть хроматина в интерфазных клеточных ядрах находится в деконденсированном состоянии (ДНК легко экстрагируется растворами с низкой ионной силой), в то время как неактивная часть характеризуется высоким уровнем компактизации, где ДНК прочно связана с белковой составляющей комплекса.

Сравнительное изучение особенностей хроматина зародышей семян в состоянии физиологического покоя и проростков

озимой ржи показало, что с помощью ультразвуковой обработки и ограниченного гидролиза ДНК-азой 1 хроматин разделяется на конденсированную и диффузную части, каждая из которых отличается по соотношению ДНК : РНК, ДНК : гистоны : НГБ. Конденсированный хроматин обогащен жестко связанной с белками РНК, имеет повышенное содержание гистонов и НГБ. В диффузном хроматине соотношение ДНК : гистоны : НГБ наиболее выровнено и приближается к единице.

Исследование компонентного состава гистонов диффузного хроматина 24-часовых проростков ржи показало, что в их электрофоретическом спектре не обнаруживается гистон Н1, в то время как среди гистонов конденсированного хроматина этого срока прорастания и обеих форм хроматина сухих зародышей он четко выявляется и представлен тремя подзонами. Коровые гистоны (Н2А, Н2В, Н3 и Н4) представлены во всех формах хроматина разных сроков прорастания, хотя субфракционный состав их непостоянный (видимо, из-за модификаций, вызванных метилированием, ацетилированием и др.). Исчезновение гистона Н1 в активном хроматине 24-часовых проростков объясняется тем, что структурную основу этого хроматина составляют нуклеосомные 11-нанометровые фибриллы, в которых гистон Н1 слабо связан с линкерными участками ДНК и нуклеосомным кором. Поэтому он легко удаляется в процессе получения препарата хроматина, например, при отмывке белков кариоплазмы, где Н1 затем и обнаруживается.

Важной группой структурных и функциональных белков являются НГБ, в числе которых значатся основные ферменты и ферментные комплексы ядер, исследование их гетерогенности показало наличие 150-200 индивидуальных белков, число которых может быть гораздо больше (ограничено методом исследования). Эта группа белков отражена в наших исследованиях, работы по ней продолжаются, включая группу ДНК-связывающих белков. В значительной части эти белки димерны, они опознают большой желобок ДНК своими спиралями, расстояние между которыми в димере близко к периоду двойной спирали ДНК (33,8 Å). Для связывания с ДНК структура белка должна быть приблизительно комплиментарна поверхности двойной

спирали. В этом случае возможно тонкое опознание конкретной ДНК-овой последовательности и осуществление регуляторных функций – стимулирующих и ингибирующих. Эта группа белков еще недостаточно изучена, особенно в области биохимии растений.

Особый интерес представляет та незначительная часть липидов ядра, которая ассоциируется с внутриядерными структурами (отметим, что до 90% фосфолипидов локализовано в наружной оболочке ядра). В настоящее время в литературе имеются данные, указывающие на участие липидов как в синтетических процессах, так и в регуляции генной активности. Показано, что фосфолипиды животных тканей принимают участие в репликации и транскрипции как на стадии изменения структуры ДНК-матрицы, так и на уровне энзиматической модификации полимераз. Обычно относительно высокие концентрации липидов и ненасыщенных жирных кислоты обладают дестабилизирующим действием на ДНК и хроматин, тогда как низкие концентрации (вернее, оптимальные) имеют обратное действие – стабилизируют ДНК- и ДНП-комплексы. Среди возможных функций липидов хроматина предлагается осуществление фосфолипидами гидрофобного взаимодействия ДНК с ядерным матриксом и специфическими белками [7].

Оценка количества отдельных классов липидов в ядре показала резкое возрастание доли фосфолипидов в общей сумме липидов при выходе зерна из состояния покоя. Если в сумме липидов хроматина покоящихся зародышей содержалось 19% фосфолипидов, то уже к 24 ч проращивания в конденсированном хроматине – 72% и в диффузном – 86%. Характерная черта диффузного хроматина – повышенное содержание фосфолипидов. В целом на миллиграмм ДНК приходилось большее количество фосфолипидов (360 мкг) именно в диффузном хроматине 24-часовых проростков (против 220 мкг/мг в конденсированном хроматине).

Анализ состава фосфолипидов показал, что основными соединениями являются фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилинозитол и фосфатидилсерин, причем отмечено, что количество фосфатидилхолина резко возрастает в диффузном хроматине (в 1,5-2 раза по сравнению с конденсиро-

ванным). Существует ряд косвенных данных о наличии в ядре комплекса полярных липидов с гистонами и другими белками хроматина. Можно также считать, что фосфолипиды (особенно фосфатидилхолин), в молекуле которых есть специфические группы, способны связывать гистоны и изменять прочность связи ДНК с ядерными белками, стимулируя тем самым процесс репликации и синтез иРНК. Что касается нейтральных липидов, то они в ядрах растений исследованы незначительно из-за низкого содержания и трудностей выделения. Нами показано, что нейтральные липиды в диффузном хроматине составляют 4-11% от суммы липидов и в конденсированном – 26-28%. Определено, что нейтральные липиды ядер проростков представлены стеринами (8-38% от суммы), их эфирами (32-62%), триглицеридами (21-26%) и жирными кислотами (7-10%).

Отметим, что конденсированный хроматин отличается от диффузного повышенным количеством всех групп нейтральных липидов. В целом, относительное количество липидов к ДНК хроматина характеризует степень диффузности этого комплекса и, как следствие, его функциональную активность.

Определение жирнокислотного состава общих липидов ядер проростков ржи показало, что они включают кислоты от С14 до С18. Основными жирными кислотами ядра являются пальмитиновая (27-42%), линолевая (21-39%), линоленовая (12-13%) и олеиновая (11-17%). Границы колебаний зависят от возраста растения и функционального состояния ядра. Так, для ядра, которое находится в функционально активном состоянии, характерно наибольшее количество пальмитиновой кислоты. В ядрах семян ржи, находящихся в состоянии покоя, основной кислотой является линолевая.

В ходе развития организма существенные изменения в структурной организации происходят и в клеточных органеллах. В стареющем организме наблюдается разрушение ядерной оболочки, причем этому предшествуют значительное уменьшение размеров ядра и исчезновение диффузного хроматина. Что же касается изменения количества компонентов, входящих в состав хроматина, то такие данные имеются преимущественно по тканям животных организмов. Нами установлено, что количество ДНК в интерфазном ядре в онтогенезе растения

изменяется мало (составляет около 10%), наибольшим колебаниям подвержено количественное содержание РНК и НГБ, которое резко возрастает (относительно ДНК) в стареющих тканях. Увеличение содержания негистоновых белков обусловлено в основном возрастанием доли так называемых остаточных белков и белков ядерного матрикса. Количество гистона H1 относительно общего содержания гистонов увеличивается от 0,39 до 0,52. Это свидетельствует о том, что при старении клетки компактизация хроматина растет. Из негистоновых белков в процессе старения на электрофореграммах появляются фракции (молекулярная масса 25-45 кД), которые, вероятно, выполняют репрессорные функции, являясь так называемыми белками старения. Рост количества связанной РНК пока трудно объяснить. В целом однозначное усиление степени компактизации хроматина с увеличением возраста ткани, бесспорно, отражается на характере экспрессии генома. Отметим также, что детальные знания структуры ядра, его биохимии будут способствовать успеху биотехнологии растений.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. А.с. № 1701747, СССР.
2. Prusov A.N., Zatssepina O.V. Isolation of the Chromocenter Fraction from Mouse Liver Nuclei // Biochemistry (Moscow). - 2002.- Vol. 67, № 4.- P.423-431.
3. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during- the assembly of head of bacteriophage T4 // Nature.- 1970.- Vol. 227.- P. 89-99.
4. Решетников В.Н. Клеточные ядра высших растений. Мн.: Наука и техника, 1992, 87 с.
5. Вечер А.С. Пластиды растений, их свойства и строение. Мн : Изд. АН БССР, 1961, 92 с.
6. Клеточные ядра растений. Экспрессия и реконструкция. Барановичи: Баранов. укрупн. тип., 2001, 170 с.
7. Qumsiyeh M.B. Structure and function of the nucleus: anatomy and physiology of chromatin // Cell Mol. Life Sci. - 1999.- Vol. 55, № 8-9.- P. 1129-1140.

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ В БЕЛАРУСИ СОРТОВ ГОЛУБИКИ ВЫСОКОЙ НА ОСНОВЕ RAPD-МАРКЕРОВ

Решетников В.Н., Спиридович Е.В., Филипена В.Л.,  
Чижик О.В., Зубарев А.В., \*Баранов О.Ю.

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

\*Институт леса НАН Беларуси,  
246001, Беларусь, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71,  
e-mail: betula-belarus@mail.ru

Голубика высокая (*Vaccinium corymbosum* L.) – ценное пищевое и лекарственное растение. Начиная с 1983 г., Центральный ботанический сад НАН Беларуси проводит целенаправленную работу по интродукции сортов данной культуры. В результате многолетних исследований доказана перспективность выращивания голубики высокой в Беларуси, показано преимущество этого вида перед местным видом – голубикой топяной (*Vaccinium uliginosum* L.) [1]. Определен перечень сортов голубики, которые имеют стабильные урожаи и высокое товарное качество ягод. Установлены климатические зоны промышленного выращивания голубики в Беларуси, а также разработана технология её возделывания. Создана коллекция, содержащая более 30 сортов этого вида, разработана технология получения посадочного материала из одревесневших и зеленых черенков, а также методом микроклонального размножения *in vitro*, что позволяет обеспечить потребности Республики в элитном посадочном материале. В этой связи актуальны исследования по паспортизации имеющегося сортового материала. Современные аналитические способы исследования специфичности биологических макромолекул позволяют на принципиально новой основе решить проблему идентификации генотипов, а также ряд вопросов, касающихся охраны прав собственности на селекционные достижения, сохранения и реализации сортов, контроля безопасности материала (наличие вирусов) и т.п. В