

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. ПАЛЛАДІНА

На правах рукопису

МАРЧЕНКО Михайло Маркович

ОСОБЛИВОСТІ БІОХІМІЧНИХ ПРОЦЕСІВ
ПРИ ГІБРИДИЗАЦІЇ РОСЛИН

03.00.04 - біохімія

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ - 1993

№ 27.486

Робота виконана на кафедрі біохімії Чернівецького державного університету ім. В.Федьковича.

Офіційні опоненти: академік АН України,
доктор біологічних наук,
професор МАЦУКА Г.Х.

доктор біологічних наук
МЕЛЬНИЧУК Ю.П.

доктор біологічних наук,
професор МУСІЄНКО М.М.

Провідна установа - Харківський державний університет

ЛНБ України ім. В. Стефаніка
00814274 (Q)

Захист дисертації відбудеться 21 червня 1993 р.
о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 016.07.01
для захисту дисертацій в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна
АН України за адресою: 252001, м. Київ-30, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту
біохімії ім. О.В. Палладіна АН України.

Автореферат розісланий 20 травня 1993 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук

Кирсенко О.В.

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Одним із основних завдань сучасної біохімії та молекулярної біології є з'ясування інтимних механізмів протікання різноманітних процесів як на молекулярному, так і на організмовому рівні. Особливого значення набувають дослідження, спрямовані на розуміння складних загальнобіологічних явищ, до яких належить і гетерозис. Під терміном "гетерозис" звичайно розуміють *hybrid vigor* (гібридну силу), тобто будь-яку перевагу гібридів у порівнянні з батьківськими формами. Результати досліджень підвищення життєздатності організму та різні гіпотези природи цього явища наведені в оглядах Shull (1911), East (1936), Mather (1955), Турбіна (1961), Шевцова (1983), Sprague (1984), Хотильової (1990), Шахбазова (1990) розкривають різні підходи до з'ясування об'єктивно складної природи гетерозису. Однак жодна з концепцій не пояснює безпосередньо внутрішні причини гетерозису, бо основну увагу було надано дослідженню структурних перебудов, а особливості функціонування геному не досліджували. Міно (1981), Костишин (1984), Конарев (1991), Созінов (1992), проаналізувавши власні експериментальні дані, справедливо вважають, що генетичний потенціал клітини гетерозисних рослин може реалізуватись через регуляторні системи.

На основі викладеного обґрунтованим є вивчення особливостей протікання біохімічних та регуляторних процесів, що лежать в основі експресії геному у гібридних рослин, які характеризуються гетерозисом за продуктивністю, для пояснення суті цього явища. Важливим залишається питання про "ієрархію" регуляторних ланок в гібридних організмах, тобто отримання вагомих доказів для встановлення певного порядку дії контролюючих факторів у складному ланцюгу перманентної регуляції. Тому одне з основних завдань полягає у виділенні з біохімічних процесів, наявних при гібридизації рослин, процесів, які є ключовими в розвитку явища гетерозису.

Так, результати сучасних досліджень не дають можливості уявити цільну картину функціонування апарату транскрипції і трансляції при гібридизації, особливості змін у роботі їх окремих компонентів, які приводять до різкої зміни біосинтезу білка, однієї з центральних ланок обміну речовин, що може визначати підвищену життєдіяльність гетерозисних організмів.

Розуміння біохімічних та молекулярно-біологічних механізмів гетерозису – обов'язкова умова створення науково-обґрунтованих підходів до одержання перспективних гібридів кукурудзи з підвищеною продуктивністю і стійкістю.

Мета і завдання дослідження. Враховуючи актуальність зазначеної проблеми, дана робота присвячена вивченню біохімічних основ підвищеної життєздатності гетерозисних рослин, зокрема дослідження особливостей біохімічних механізмів експресії геному та порядку протікання певних процесів, що мають відношення до її регуляції.

Відповідно до мети поставлено такі завдання:

- 1) з'ясувати динаміку ранніх змін біосинтезу РНК *in vivo* і *in vitro* у системі ізольованих ядер, виділених із паростків гібридних та інбредних форм кукурудзи;
- 2) дослідити інтенсивність біосинтезу ядерних білків і особливостей фосфорилування гістенів та негістонових білків в досліджуваних формах кукурудзи;
- 3) вивчити синтез білка в ранній період розвитку досліджуваних форм і порівняти спектри легкорозчинних білків з паростків гетерозисних гібридів та інбредних ліній кукурудзи;
- 4) встановити особливості функціонування тРНК і АРСаз та їх високомолекулярних комплексів, виділених з гібридних та інбредних форм;
- 5) вивчити активність біосинтезу білка в безклітинних системах, отриманих з паростків і зародків гібридних та інбредних форм кукурудзи;
- 6) з'ясувати вплив материнської цитоплазми на біосинтез РНК та легкорозчинних білків паростків рецiproкних гібридів.

Для виконання поставлених завдань використовували виробничі гібриди та розроблена експериментальна модельна система, перевага якої полягає в тому, що можна досліджувати гібриди з різним ефектом гетерозису і материнські лінії, які відрізняються за комбінаційною здатністю в єдиній системі схрещування з спільною батьківською формою.

Наукова новизна і практична значимість. При вивченні біосинтезу тотальної РНК вперше виявлені особливості включення ^3H -ури-

дину РНК зародків високогетерозисних гібридів та інбредних форм кукурудзи, що виражається в наявності першого збільшення його інтенсивності на самих ранніх етапах і двох послідовних максимумів протягом другої доби.

Встановлені зміни включення ^{32}P -АТФ і ^{14}C -гідролізату білка в негістонові і гістонові білки при гібридизації рослин. Показано, що гібриди, держані на основі схрещування вихідних форм з значними відмінностями в інтенсивності фосфорилування негістонових білків і гістонів, характеризуються високим ступенем прояву гетерозису та переважають за рівнем біосинтезу ядерних білків батьківські форми.

Вперше проведено комплексне порівняльне вивчення інтенсивності біосинтезу білка та активності окремих компонентів апарату трансляції у високогетерозисних гібридів кукурудзи та їх інбредних ліній. Виявлено збільшення включення ^{14}C -амінокислот у білки паростків високогетерозисних гібридів у порівнянні з інбредними лініями й низькопродуктивними формами. При загальній тенденції до підвищення біосинтезу білка в зародках відзначена неоднорова інтенсивність у окремі періоди цього процесу в різних формах.

Показано збільшення рівня аміноацилювання *in vitro* сумарних тРНК, специфічних до гліцину, лізину, лейцину, фенілаланіну, та зростання вмісту відповідних ендогенних аміноацил-тРНК у високогетерозисних гібридів. Ці гібриди також характеризуються підвищенням лейцил- і фенілаланіл-тРНК синтетазних активностей, функціонуючих в еукаріотичних клітинах у складі високомолекулярних комплексів.

Встановлено більш високий відносний вміст полісом у паростках високогетерозисних гібридів. Дослідження біосинтезу білків рибосомами різних генотипів кукурудзи в безклітинній системі показали, що активність полісом із паростків гетерозисних гібридів вища у порівнянні з полісомами лінійних форм.

Вперше встановлено за допомогою екзогенної матриці, що рівень рибосом, не включених в процеси трансляції, значно вищий у інбредних ліній по відношенню до рівня у високогетерозисних гібридів.

Встановлена деяка специфічність білкового складу гетерозисних гібридів, у фракції альбумінів виявлена група "зверхрозчинних білків", характерних для високогетерозисних гібридів і знайдено два види білків, імунологічно відмінних від вихідних форм.

Вперше, на прикладі реципрокних гібридів, показано вплив материнських цитоплазматичних факторів на біосинтез РНК і легкорозчинних білків, що ймовірно, є одним з механізмів впливу на морфофізіологічні показники та продуктивність досліджуваних гібридів.

На основі одержаних експериментальних даних автором запропонована схема регуляції біохімічних процесів, що лежать в основі прояву явища гетерозису. Згідно до цієї схеми прояв гетерозису, певною мірою, пов'язаний з рівнем взаємодії материнських цитоплазматичних факторів з батьківським геномом у складі гібридного ядра.

Дослідження біохімічних основ гетерозису вперше дало можливість показати, що ступінь прояву гетерозису визначається на етапі трансляції, в той час, як комбінаційна здатність ліній більше пов'язана з процесами транскрипції.

Виконана праця є частиною науково-дослідної теми "Дослідження особливостей прояву гетерозису в сільськогосподарських рослин на молекулярному рівні", затвердженої постановою Президії АН України № 604 від 25.12.1980 р., постановою Президії АН України № 151 від 29/30.12.1986 р. і постановою ДКНТ України № 12 від 04.05.1992 р.

Практичне значення роботи полягає в тому, що охарактеризовані в процесі наукових досліджень лінії 101, 102, 103 і гібриди Г 1 /л, 101 x Г 0/, Г 2 /л, 102 x Г 0/, Г 3 /л, 103 x Г 0/ постійно з 1986 р. використовуються в селекційній роботі і на їх основі одержані перспективні гібриди.

Модифіковані методи виділення сумарних препаратів тРНК і аміноацил-тРНК синтетаз, одержання безклітинної білоксинтезуючої системи з рослин кукурудзи вклучені в навчально-методичні посібники "Рекомендації до вивчення курсу "Молекулярна біологія" (Костинин С.С., Марченко М.М. - Чернівці, 1983, 71 с.), "Методичні вказівки до великого практикуму з біохімії" (у співавторстві з Костининим С.С., Свербівусом Я.А. - Чернівці, 1986, 70с.) і використовуються в навчальному процесі.

Основні положення, які виносяться на захист:

- розробка і обґрунтування експериментальної моделі, що складається з різних за комбінаційною здатністю ліній кукурудзи в єдиній системі скрещування для вивчення біохімічних процесів безпосередньо зв'язаних з ступенем прояву гетерозису;

- доказ зв'язку ступеня гетерозису у кукурудзі з рівнем біосинтезу РНК і білків та активності окремих компонентів апарату трансляції.

- обґрунтування ймовірної схеми регуляції біохімічних процесів, що лежать в основі прояву явища гетерозису.

Апробація роботи. Основні положення дисертаційної роботи викладені на IV Українському біохімічному з'їзді (Дніпропетровськ, 1982), V Всесоюзному біохімічному з'їзді (Київ, 1986), V з'їзді генетиків і селекціонерів України (Умань, 1986), VI Українському біохімічному з'їзді (Івано-Франківськ, 1987), V з'їзді Всесоюзного товариства генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова (Москва, 1987), 3-му Всесоюзному з'їзді фізіологів рослин (Мінськ, 1990), VI Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1992), конференціях в Мінську (1981), Чернівцях (1983), Душанбе (1987), Харкові (1988), симпозіумах в Каневі (1983, 1984).

Публікації. Основний зміст дисертаційної роботи викладено в 46 наукових працях та монографії.

Структура і об'єм роботи. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, методичної частини (два підрозділи), а також результатів досліджень (п'ять підрозділів) та їх обговорення, узагальнення, висновків і списку літератури (342 джерела). Робота викладена на 244 сторінках, має 44 таблиці та 54 рисунки.

МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ ДО ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єкти досліджень та їх характеристика. В роботі використовувались виробничі гібриди кукурудзи з різним ступенем виявлення гетерозису щодо продуктивності та їх батьківські форми: прості мішлініанні гібриди високогетерозисні Дніпровський 415 (лінія 153 x лінія 619), Піонер 3978 (лінія П 346 x лінія П 502) та його зворотний гібрид (лінія П 502 x лінія П 346), Ізумруд (лінія ВІР 44 x лінія МВ 201), Іскра (лінія ВІР 26 x лінія ВІР 27); сортолінійні Буковинський 3 ТВ (сорт Глорія Янецького x лінія ВІР 44); Буковинський 11 Т (сорт Кремниста 880-ТС x гібрид Садгорець ТВ), Буковинський 35 (гібрид Піонер 3978 x лінія РС); подвійні мішлініанні гібрид Молдавський 102 МВ (гібрид Ізумруд x гібрид

Іскра), ВІР 42 (гібрид Слава х гібрид Світоч), які за продуктивністю знаходяться на рівні батьківських форм.

Як експериментальну модель використовували різні форми кукурудзи, одержані за схемою схрещування, в якій підібрана група ліній (материнська форма), достовірно відмінних за комбінаційною здатністю, вирашеною в продуктивності гібридів, і спільна батьківська форма (Г J). Цінність даної системи в тому, що можна досліджувати гібриди з різним ефектом гетерозису і лінії, які відрізняються за комбінаційною здатністю в єдиній системі схрещування (рис. 1).



Рис. 1. Схема одержання гібридів кукурудзи.

Біохімічні дослідження проводили на 4-х денних паростах і зародках насіння кукурудзи.

Методи біохімічних досліджень. Для визначення ендогенної РНК-синтезуючої активності ядра виділяли з етиольованих паростків за методом, описаним Slater, Venis (1978). Оптимальні умови реакції в безклітинній системі підбирали в спеціальних експериментах.

Швидкість синтезу РНК *in vivo* вивчали, інкубуючи зародки або паростки в розчині, що містив ^3H -уридин (пит. активність 26,6 кКі/моль). Активність РНК-полімераз *in vivo* визначали з використанням α -аманітину (Марзлаф та інші, 1987). Вміст РНК і ДНК – спектрофотометрично (Конарев, Титерев, 1970). Фосфорильовані ядерних білків проводили в системі *in vitro* з використанням ^{32}P -АТФ (Van Loon et al., 1975). Гістони і НГБ одержували хроматографією на оксипатиті із попередньо виділеного ДНП (Mac Gillivray, 1972). Синтез гістонів і НГБ вивчали *in vivo* інкубуючи паростки з ^{14}C -

гідролізатом білка (пит. зктивність 40 мкКі/мг атом С, концентрація 2,7 мкКі/мл). Концентрацію білка визначали за Lowry et al. (1951). Визначення рівня включення радіоактивних амінокислот *in vivo* в легко- і важкорозчинні білки проводили, інкубуючи етиольовані паростки в розчині мічених амінокислот (Прошина, 1978).

Сумарні препарати тРНК з паростків виділяли депротейнізацією гомогенату тканини фенолом з послідуючою хроматофією РНК на ДЕАЕ-целюлозі (Vingraber, 1962). Здатність сумарного препарату тРНК до акцептування амінокислот визначали за кількістю утворення ¹⁴С-аміноацил-тРНК в умовах рівноваги реакції аміноацилювання (Berg et al., 1961). Ренатурацію біологічно неактивних форм тРНК проводили за методом Lindahl et al. (1966). Препарати сумарних аміноацил-тРНК отримували за методом Keller, Zamechnic (1956), а високомолекулярні комплекси АРСаз за методом Deutscher (1971). Ліпиди в складі комплексів визначали за методом Folch (1957). Активність вільних АРСаз і в складі високомолекулярних комплексів визначали за початковою швидкістю реакції аміноацилювання тРНК при наявності нелімітуючих концентрацій субстратів.

Препарати рибосом виділяли за методом Davies et al. (1972). Активність трансляції полісомами з паростків кукурудзи аналізували за методом Marcus et al. (1974), і Mans, Novelli (1961). S₂₃ фракцію виділяли за методом Roberts, Petterson (1973) і використовували в реакції безклітинного синтезу білка. В дослідках по вивченню полі(У) залежного синтезу поліпептида в систему добавляли 50 мкг полі(У) на 0,1 мл.

Фракціонування легко- і важкорозчинних білків проводили методом диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі (Davis, Ornstein, 1964). Електрофорез альбумінів в денатуруючих умовах (за наявності ДДС-На) проводили за Laemmli (1970), гідрофобну хроматографію за Остерманом (1985). Для проведення імунохімічних аналізів використовували методики, описані Гаврилук і інш. (1973), Берестенем і інш. (1987), Габібовим і інш. (1986).

Радіоактивність проб вимірювали на сцинтиляційних лічильниках SL-30 (Intertechnique, Франція), Delta-300 (США), БЕТА-1.

Математична обробка експериментальних даних проводили за методом варіаційної статистики (Маслов, 1976).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Синтез РНК та ядерних білків в зв'язку з гетерозисом кукурудзи

Особливої уваги заслуговує вивчення синтезу РНК у ранній період проростання зародків насіння в зв'язку з повною відсутністю даних про можливий зв'язок активації синтезу РНК при проростанні з ефектом гетерозису. Важливо з'ясувати, на якому етапі проростання з'являються відмінності у кінетиці вклучення ^3H -уридину в РНК у гібридів та їх батьківських форм.

Отримані експериментальні дані представлені на рис. 2.

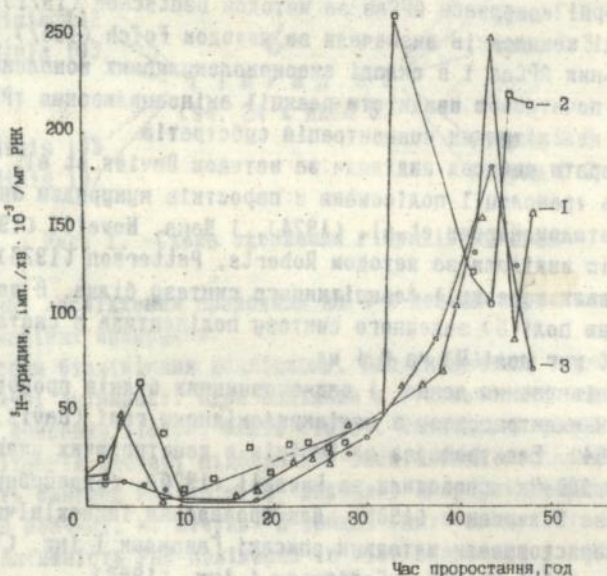


Рис. 2. Кінетика вклучення ^3H -уридину в РНК зародків гібридних і вихідних форм кукурудзи при проростанні насіння: 1-лінія П 346 (♀); 2-гібрид Піонер 3978; 3-лінія П 502 (♂)

Синтез РНК починається на самих ранніх етапах проростання і між 4-12 год у високогетерозисних гібридів та їх материнських формах спостерігається перше збільшення його інтенсивності. На другу добу проростання (30-34 год) вклучення ^3H -уридину у заноно

синтезовану РНК зародків збільшується, причому набагато більше, ніж протягом першої доби. У високогетерозисного гібриду Піонер 3978 уже на другу добу появляється перевага над батьківськими формами, яка виражається раннім підвищенням інтенсивності біосинтезу РНК. До 46-48 год цей гібрид переважає вихідні форми за рів-

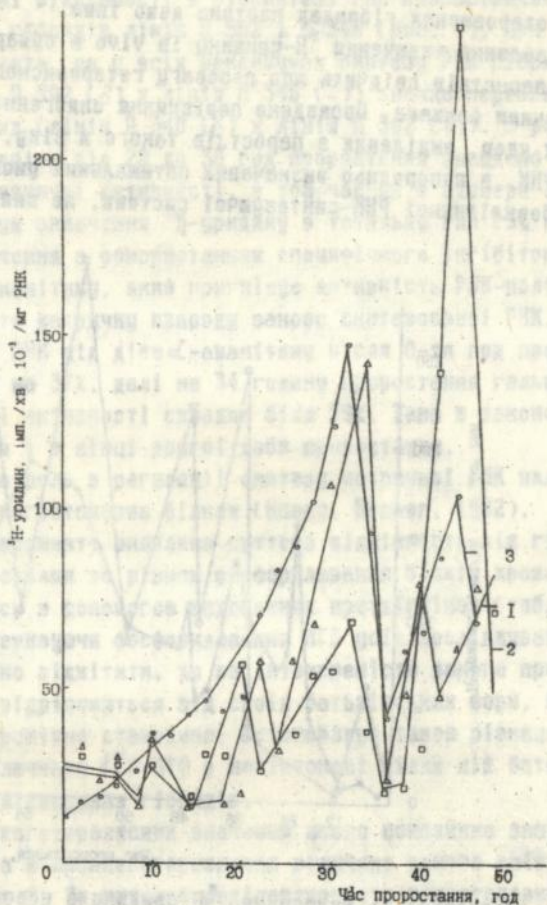


Рис. 3. Кінетика включення ^3H -уридину в РНК із зародків кукурудзи гібрида Г 1 та його вихідних форм при проростанні насіння: 1-лінія 101 (♀); 2-гібрид Г 1; 3-гібрид Г 0 (♂)

нем біосинтезу РНК у зародках і перевага зберігалась надалі. У високогетерозисних гібридів Г 1, Г 2, Г 3 (рис. 3) є два максимуми вкличення мітки в РНК протягом другої доби проростання, при цьому в період 44-46 год інтенсивність вкличення міченого попередника у РНК цих гібридів значно вища, ніж у їх інбредних батьків. У низькогетерозисних гібридах картина демо інша.

Зіставлення вкличення ^3H -уридину *in vivo* в сумарну РНК чотириденних паростків свідчить про перевагу гетерозисного гібрида над вихідними формами. Проведене порівняння ендогенної здатності клітинних ядер, виділених з паростків такого ж віку, *in vitro* до синтезу РНК, в попередньо визначених оптимальних умовах функціонування безклітинної РНК-синтезуючої системи, не виявило перевагу

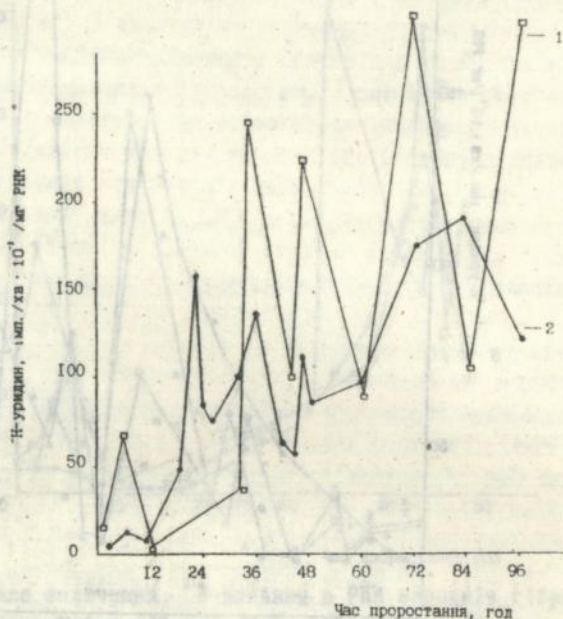


Рис. 4. Інтенсивність вкличення ^3H -уридину в новосинтезовану тотальну РНК зародків проростаючого насіння реципрокних гібридів кукурудзи: 1-гібрид Піонер 3978; 2-реципрокний гібрид (лінія П 502 x лінія П 346)

гетерозисних рослин.

Більш високий рівень переваги гібридні: рослин чад вихідними формами біосинтезу РНК *in vivo* порівняно з біосинтезом РНК у системі ізольованих ядер припускає участь цитоплазматичних факторів у прояві ефекту гетерозису. Підтвердженням таких суджень є встановлені відмінності в біосинтезі РНК проростаючих зародків реципрокних гібридів ліній П 502 і П 346 (рис. 4). При цьому варто відмітити, що у всіх максимумах синтезу РНК гібрид Піонер 3978 (лінія П 502 (♂) x лінія П 346 (♀)) значно переважає реципрокний гібрид (лінія П 346 (♂) x лінія П 502 (♀)). У реципрокного гібрида в період від 22 до 36 год проростання знайдено 2 максимуми РНК-синтезуючої активності, в той час як в Піонера 3978 лише один максимум включення ^3H -уридину в тотальну РНК (34 год).

Дослідження з використанням специфічного інгібітора транскрипції α -аманітину, який пригнічує активність РНК-полімерази II підтверджують матричну природу заново синтезованої РНК. У Піонера 3978 синтез РНК під дією α -аманітину після 6-ти год проростання гальмується на 37%, далі на 34 годину проростання гальмування РНК-полімеразної активності складає біля 59%. Така ж закономірність проявляється і в кінці другої доби проростання.

Важлива роль в регуляції синтезу матричної РНК належить гістоновим та негістоновим білкам (Huang, Bonner, 1962).

В експерименті виявлена суттєва відмінність між гібридами і вихідними формами за рівнем фосфорилування білків хроматину, яке здійснювалось з допомогою ендогенних протеїнкіназ (табл. 1).

Характеризуючи фосфорилування НГБ усіх досліджуваних гібридів, потрібно відмітити, що за інтенсивністю даного процесу, вони достовірно відрізняються від своїх батьківських форм, займаючи при цьому проміжне становище. Встановлено також різниця за інтенсивністю включення ^3P -АТФ в негістонові білки між батьківськими формами досліджуваних гібридів.

У високогетерозисних значення цього показника знаходиться в межах 4-5, а в низькогетерозисних величина даного співвідношення не переважає 2. За питомою радіоактивністю негістонових білків висококомбінаційні лінії переважають низькокомбінаційні в 2,5-2,6 рази, що може мати значення для оцінки комбінаційних властивостей інбредних ліній.

Одержані суттєві відмінності за інтенсивністю включення ^3P -

Таблиця 1

Інтенсивність фосфорилування негістонових білків (над ризком) і гістонів (під ризком) з паростків гібридних та інбредних форм кукурудзи ($\delta^{32}\text{P}$, імп/хв на мкг білка, $\text{M} \pm \text{m}$)

Об'єкт дослід- ження	Питома радіо- активність	Об'єкт дослід- ження	Питома ра- діоактивність
Лінія 102 (♀)	$830 \pm 11,83^{***}$ $157 \pm 3,61^{***}$		
Гібрид Г 2	$694 \pm 17,17^{*,**}$ $127 \pm 5,01^{*,**}$	Лінія 105 (♀)	$372 \pm 8,55^{***}$ $71 \pm 3,02$
Гібрид Г 0 (♂)	$177 \pm 5,31$ $74 \pm 2,70$	Гібрид Г 5	$292 \pm 11,22^{*,**}$ $64 \pm 2,31$
Лінія 103 (♀)	$941 \pm 17,17^{***}$ $180 \pm 2,41^{***}$	Гібрид Г 0 (♂)	$177 \pm 5,31$ $74 \pm 2,70$
Гібрид Г 3	$799 \pm 13,90^{*,**}$ $147 \pm 3,14^{*,**}$	Лінія 107 (♀)	$306 \pm 11,22^{***}$ $57 \pm 1,92^{***}$
Гібрид Г 0 (♂)	$177 \pm 5,31$ $74 \pm 2,70$	Гібрид Г 7	$255 \pm 5,10^{**}$ $69 \pm 2,32^*$
Лінія П 348 (♀)	$1900 \pm 60,53^{***}$ $351 \pm 12,12^{***}$	Гібрид Г 0 (♂)	$177 \pm 5,31$ $74 \pm 2,70$
Гібрид Піонер 3978	$1035 \pm 31,05^{*,**}$ $286 \pm 10,02^{*,**}$		
Лінія П 502 (♂)	$480 \pm 13,80$ $107 \pm 5,10$		

Примітка. Вірогідність різниці гібриду і материнської форми *, гібриду і батьківської форми **, між вихідними формами ***

АТФ в гістони і негістонові білки досліджуваних форм кукурудзи, виражені в закономірностях фосфорилування ядерних білків гібридних рослин порівняно з інбредними. За інтенсивністю вклучення мітки у гістонові білки високогетерозисні гібриди займали проміжне становище по відношенню до своїх батьківських форм, а в низькогетерозисних різниця була недостовірною. Вихідні лінії високогетерозисних гібридів характеризуються статистично вірогідною різницею за інтенсивністю вклучення ^{32}P -АТФ в гістони, тоді як між вихідними формами низькогетерозисних гібридів різниця відсутня взагалі. Встановлена також відмінність за цим показником між висококомбінаційними і низькокомбінаційними лініями.

Для дослідження синтезу ядерних білків використовували за-

Таблиця 2

Інтенсивність вклучення мічених попередників в негістонові та гістонові білки паростків гібридних та інбредних форм кукурудзи (імп/хв на 1 мкг білка, $M \pm m$)

Форма	Питома радіоактивність	
	НГБ	ГБ
Лінія 102 (♀)	242 ± 4,0 ***	110 ± 3,3
Гібрид Г 2	619 ± 12,8 **, **	228 ± 2,5 **, **
Гібрид Г 0 (♂)	110 ± 3,3	100 ± 3,3
Лінія 103 (♀)	253 ± 5,7 ***	131 ± 2,4 ***
Гібрид Г 3	487 ± 9,4 **, **	179 ± 4,1
Гібрид Г 0 (♂)	110 ± 3,3	100 ± 3,3
Лінія 105 (♀)	122 ± 1,3 ***	91 ± 1,7
Гібрид Г 5	209 ± 4,3 **, **	139 ± 1,9 **, **
Гібрид Г 0 (♂)	110 ± 3,3	100 ± 3,3
Лінія 107 (♀)	115 ± 2,8	82 ± 3,2
Гібрид Г 7	185 ± 2,9 **, **	123 ± 2,0 **, **
Гібрид Г 0 (♂)	110 ± 3,3	100 ± 3,3
Лінія П346 (♀)	390 ± 7,8 ***	128 ± 1,2 ***
Гібрид Піонер 3978	920 ± 18,4 **, **	285 ± 5,3 **, **
Лінія П502 (♂)	244 ± 8,6	220 ± 6,4

гальномічений гідролізат суміші амінокислот білка хлорели і результати досліджень показали, що гібриди переважають свої батьківські форми за інтенсивністю включення ^{14}C -гідролізату в білки (табл. 2), і ця перевага більше виражена у високогетерозисних гібридів.

Не можна не зауважити, що найвищою мірою гетерозис проявляється в гібридів, одержаних на основі схрещування вихідних форм, що значно різняться за інтенсивністю включення ^{14}C -гідролізату в негістонові білки. Між батьківськими формами низькогетерозисних гібридів вірогідної різниці не знайдено. Відмічено також перевагу гібридів над вихідними компонентами за інтенсивністю синтезу гістонів, однак значно меншу, ніж негістонових білків, а характеризують лінії з різною комбінаційною здатністю чітких закономірностей не виявлено.

Значний інтерес на фоні цих даних являє собою вивчення процесів біосинтезу цитоплазматичних білків.

Синтез легкорозчинних та структурних білків гібридних і інбредних форм кукурудзи

В експериментах, за допомогою мічених амінокислот, встановлено, що у гібридів різного походження спостерігаються характерні особливості включення ^{14}C -лейцину в білки паростків (рис. 5).

Так, питома радіоактивність сумарної білкової фракції високогетерозисного гібриду Піонер 3978 значно вища, ніж у інбредних ліній. Підвищене включення ^{14}C -лейцину при одноденній інкубації в розчині м'якоти виявлено, як у легкорозчинні, так і важкорозчинні білки. Треба зазначити, що вихідні форми високогетерозисних гібридів різняться за швидкістю включення ^{14}C -лейцину в білки паростків і, в основному, відмічається перевага материнських форм над батьківськими.

З аналізу досліджень випливає, що включення ^{14}C -лейцину в легкорозчинні і важкорозчинні білки паростків високогетерозисних гібридів Г 1, Г 2, одержаних на основі схрещування ліній 101, 102 з батьківськими формами Г 0 вище, ніж у батьківських формах (табл. 3).

Нами не знайдено вірогідної різниці за включенням міченого попередника в легкорозчинні низькогетерозисних гібридів порівня-

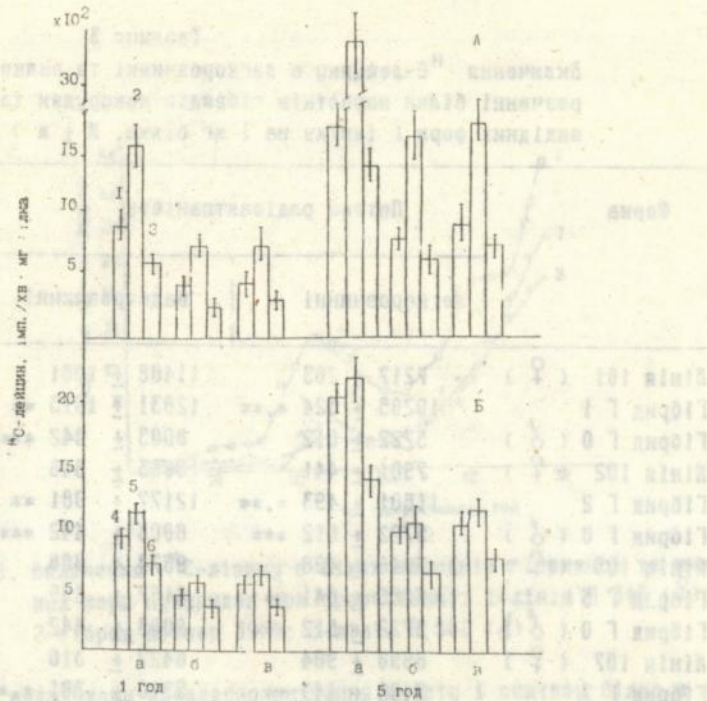


Рис. 5. Включення ^{14}C -лейцину в білки паростків гетерозисних гібридів кукурудзи та їх вихідних форм: 1-лінія П 346 (♀); 2-гібрид Піонер 3978; 3-лінія П 502 (♂); 4-сорт Глорія Янецького (♀); 5-гібрид Буковинський 3; 6-лінія ВР 44 (♂); а-сумарні білки; б-легкорозчинні; в-важкорозчинні.

но з вихідними формами, що свідчить про однакову швидкість процесу.

Для в'ясування впливу материнської цитоплазми на протікання процесів біосинтезу білка використовувались 24-годинні зародки і 4-денні паростки, що викликано описаними в гібрида двома максимумами включення ^{14}C -амінокислоти в білки (Костишин і ін., 1988).

Експериментальні результати вказують на вірогідні відмінності в інтенсивності включення ^{14}C -фенілаланіну і ^{14}C -лейцину в легкорозчинні білки 24-годинних зародків проростаючого насіння

Таблиця 3

Включення ^{14}C -лейцину в легкорозчинні та важкорозчинні білки паростків гібридів кукурудзи та їх вихідних форм (імп/хв на 1 мг білка, $\text{M} \pm \text{m}$)

Форма	Питома радіоактивність	
	легкорозчинні	важкорозчинні
Лінія 101 (♀)	7217 \pm 283	11488 \pm 1061
Гібрид Г 1	10285 \pm 324 *,**	12831 \pm 1013 **
Гібрид Г 0 (♂)	5722 \pm 612	8003 \pm 442 ***
Лінія 102 (♀)	7981 \pm 441	10553 \pm 646
Гібрид Г 2	11601 \pm 493 *,**	12177 \pm 981 **
Гібрид Г 0 (♂)	5722 \pm 612 ***	8003 \pm 442 ***
Лінія 105 (♀)	7946 \pm 488	9574 \pm 868
Гібрид Г 5	7685 \pm 641 **	8157 \pm 459
Гібрид Г 0 (♂)	5722 \pm 612 ***	8003 \pm 442
Лінія 107 (♀)	8998 \pm 984	6427 \pm 316
Гібрид Г 7	7498 \pm 449 **	5910 \pm 281 *,**
Гібрид Г 0 (♂)	5722 \pm 612 ***	8003 \pm 442 ***

реципрокних гібридів.

Вивчення включення ^{14}C -лізину в білки зародків різних генотипів кукурудзи показало, що при проростанні збільшилась швидкість синтезу розчинних білків. Максимум активності трансляції припадав на 48 год (рис. 6).

Слід відзначити, що при загальній тенденції до підвищення швидкості синтезу білка в зародках інтенсивність цього процесу в окремі відрізки часу у різних форм неоднакова.

Включення ^{14}C -лізину в білки зростало в період 16-24 год, а також після 34 год проростання зародків. При цьому рівень радіоактивності у гібридної форми був вищий, ніж у батьківської на 73% і 35%, а материнської - на 57% і 23% відповідно на кінець 1-ї та 2-ї доби. Підвищення швидкості синтезу білка в зародках високогетерозисного гібрида Піонер 3978 починалось значно раніше, ніж у вихідних ліній.

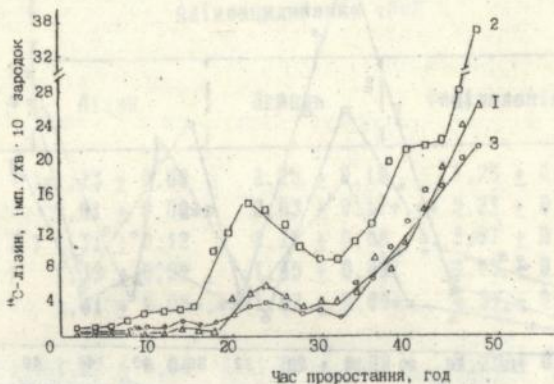


Рис. 6. Включення ^{14}C -лізину в білки зародків гібридної та вихідних форм кукурудзи при проростанні: 1-лінія П 346 (♀); 2-гібрид Піонер 3978; 3-лінія П 502 (♂)

У подальшому проведено вивчення вмісту і синтезу білка в зародках гібридів, одержаних у експериментальній модельній системі, та їх вихідних форм (рис. 7). У високогетерозисних гібридів відмічено два максимуми радіоактивності в зародках вивчених генотипів (24, 36–38 год) і їх подальше збільшення цього показника після 44 год проростання. Порівняльний аналіз рівня включення міченого попередника в білки зародків, виділених із гібридів з низьким ефектом гетерозису, дозволяє зазначити, що гібрид займає проміжне положення від 0 до 40 год проростання і далі наближається до рівня лінійної форми.

Підвищене включення міченого попередника в білки гетерозисних рослин ставить питання про необхідність в'яснення молекулярних особливостей біосинтезу білків. Тим більше, що про рибосомний етап в зв'язку з гетерозисом є одиничні праці (Кудоярова, 1983), а передрибосомний етап зовсім не досліджувався.

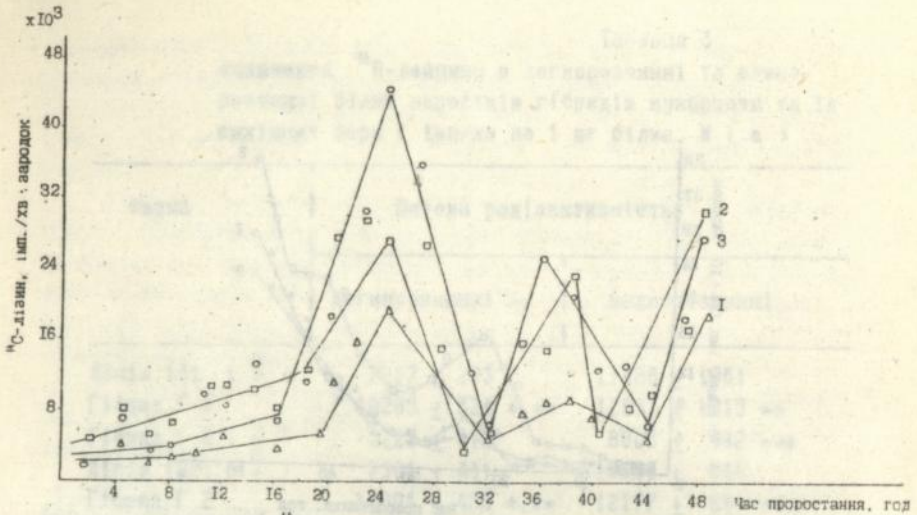


Рис. 7. Включення ^{14}C -лізину в білки зародків високогетерозисного гібрида Г 1 і його вихідних форми: 1-лінія (♀); 2-гібрид Г 1; 3-гібрид Г 0 (♂)

Особливості функціонування тРНК і аміноацил-тРНК синтетаз, та їх високомолекулярних комплексів з паростків гетерозисних рослин

Максимальний рівень аміноацилювання тРНК *in vitro* визначали при оптимальних концентраціях амінокислоти, ферменту і часу інкубації, відповідному плато кінетичної кривої.

Вивчення рівня аміноацилювання тРНК з гомологічними АРСазами, виділеними, як і тРНК, з паростків гібридів та їх батьківських форми при оптимальних умовах реакції дозволило встановити, що на ранніх етапах розвитку спостерігається відмінності між високогетерозисними гібридами та їх вихідними формами, пов'язані з початковим етапом білкового синтезу (табл. 4). Так, високогетерозисний гібрид Піонер 3978 вірогідно переважає свої вихідні лінії П 346 і П 502 за максимальним рівнем аміноацилювання тРНК, специфічних до гліцину, лейцину і фенілаланіну. За акцепторною активністю тРНК^{леу} і тРНК^{фен} високогетерозисні гібриди Г 1, Г 2, Г 3,

Таблиця 4

Рівень аміноацилювання тРНК гібридних та інбредних форм кукурудзи (нмоль амінокислоти на 1 мг тРНК, $M \pm m$)

Форма	Аміноацилювання тРНК		
	Лізин	Лейцин	Фенілаланін
Лінія П 346 (♀)	1,23 ± 0,06	2,25 ± 0,10	3,75 ± 0,11
Піонер 3978	1,81 ± 0,08**	2,83 ± 0,11*,**	5,21 ± 0,10*,**
Лінія П 502 (♂)	1,31 ± 0,12	2,27 ± 0,08	3,67 ± 0,09
Ізумруд М (♀)	1,35 ± 0,07	1,45 ± 0,09	4,05 ± 0,08
Молдавський 102 МВ	1,61 ± 0,05*,**	1,87 ± 0,09*	4,39 ± 0,09*
Іскра МВ (♂)	1,27 ± 0,04	1,63 ± 0,08	4,25 ± 0,07

одержані на основі батьківських ліній 101, 102, 103, переважають свої материнські форми на 20-50%, крім Г 1, а також низькогетерозисні Г 5, Г 7 близько на 30%.

Одержані результати *in vitro* ставлять питання про те, чи спостерігаються ці зміни в клітині *in vivo*. Для відповіді на нього визначено вміст ендогенних аміноацил-тРНК в паростках різних форм. В досліджах показано, що вміст ендогенних гліцил-, лізил-, лейцил- і фенілаланіл-тРНК вище в високогетерозисних гібридів. Серед причин, які зумовлюють підвищений рівень аміноацилювання деяких тРНК при гетерозисі, можуть бути: зміни каталітичної активності аміноацил-тРНК синтетаз (Berg, 1975), більша кількість у препаратах тРНК молекул з добудованим акцепторним кінцем (Bester, Gevers, 1973), вищий рівень активних конформерів у препаратах тРНК гібридних рослин (Lindhahl et al., 1966; Мацука, 1973).

Вивчення змін активності тРНК паростків показало, що акцепторна активність тРНК гібридних рослин і їх вихідних форм в гетерологічній системі аміноацилювання не відрізняється від активності тРНК в гомосистемі при максимальній концентрації фермента. Тому зроблено припущення, що знайдені відмінності в акцепторній

активності тРНК не зв'язані із зміною каталітичних властивостей аміноацил-тРНК синтетаз.

Подальші експерименти показують, що додання ЦТФ, крім АТФ до інкубаційного середовища не приводить до зміни акцепторної активності тРНК досліджуваних форм, що опосередковано підтверджує однакове збереження акцепторного кінця в молекулах тРНК.

Нами встановлено (табл. 5), що короткочасне прогрівання тРНК в умовах переходу неактивних конформерів в активні збільшує акцепторні властивості препаратів тРНК інбредних ліній, в той же час, як акцепторна активність тРНК, виділеної з паростків гібридів, не змінюється при активації її в присутності Mg^{2+} . Ймовірно, в інб-

Таблиця 5

Вплив прогрівання у присутності Mg^{2+} на акцепторну активність сумарних препаратів тРНК із паростків кукурудзи гібрида Піонер 1 його вихідних форм (нмоль амінокислоти на 1 мг тРНК, $M \pm m$)

^{14}C аміно- кислота	Акцепторна активність	Лінія П 346 (♀)	Піонер 3978	Лінія П 502 (♂)
Гліцин	До прогрівання	1,67±0,12	2,14±0,16**	1,21±0,17
	Після прогрівання	2,10±0,10 $p < 0,05$	2,20±0,14** $p > 0,05$	1,70±0,12 $p < 0,05$
Лізин	До прогрівання	1,07±0,08	1,63±0,04*,**	1,16±0,06
	Після прогрівання	1,36±0,10 $p < 0,05$	1,70±0,06*,** $p > 0,05$	1,49±0,05 $p < 0,05$
Лейцин	До прогрівання	2,17±0,04	2,67±0,12*,**	2,05±0,09
	Після прогрівання	2,41±0,04 $p < 0,05$	2,73±0,10*,** $p > 0,05$	2,35±0,07 $p < 0,05$
Феніл- аланін	До прогрівання	3,69±0,09	5,16±0,13*,**	3,53±0,07
	Після прогрівання	4,05±0,13 $p < 0,05$	5,11±0,15*,** $p > 0,05$	3,94±0,09 $p < 0,05$

редних лініях частина молекул тРНК знаходиться в неактивній формі.

Для порівняння АРСазних активностей в реакції аміноацилювання використовували гетерологічну тРНК, виділену з етиольованих паростків пшениці в концентраціях, що не лімітують швидкість утворення аміноацил-тРНК.

Одержані дані свідчать про те, що по активності всіх вивчених АРСаз (табл. 6) гібриди знаходяться на рівні батьківських форм.

Таблиця 6

Активність аміноацил-тРНК синтетаз в сумарних препаратах і в складі високомолекулярних комплексів з паростків гібрида Піонер 3978 та його вихідних форм (пмоль аміноацил-тРНК на 100 мкг білка за 1 хв, $M \pm m$)

Активність фермента	Форми кукурудзи		
	Лінія П 346(♀)	Піонер 3978	Лінія П 502(♂)
Гліцил-тРНК синтетаза			
В сумарних препаратах	31,16 ± 2,85	30,80 ± 3,03**	43,26 ± 3,17
В складі комплексів	109,80 ± 11,51	115,30 ± 9,13	99,20 ± 6,88
Лізил-тРНК синтетаза			
В сумарних препаратах	53,78 ± 4,51	48,20 ± 3,20	41,86 ± 7,80
В складі комплексів	49,90 ± 9,54	74,69 ± 13,12	63,75 ± 11,75
Лейцил-тРНК синтетаза			
В сумарних препаратах	91,90 ± 3,90	84,89 ± 6,50*,**	87,29 ± 4,00
В складі комплексів	36,83 ± 10,70	116,02 ± 13,50*,**	54,85 ± 9,81
Фенілаланіл-тРНК синтетаза			
В сумарних препаратах	78,45 ± 7,50	84,15 ± 6,31	71,21 ± 4,89
В складі комплексів	106,79 ± 9,40	114,27 ± 11,09*,**	95,99 ± 11,17

Важливо відзначити, що АРСазн у вищих організмів функціонують в складі високомолекулярних комплексів (Tange et al., 1982; Яремчук і ін., 1984).

В експериментах по вивченні АРСазних активностей в складі таких комплексів з паростків показано підвищення лейцил- і фенілаланін-тРНК синтетазних активностей у високогетерозисного гібрида, на відміну від подвійних сортолінійних гібридів і батьківських форм. При цьому комплекси, виділені з паростків високогетерозисного гібрида Піонер 3978, містять на 26-32% більше фосфоліпідів, ніж його вихідні лінії, що може бути пов'язано з підвищенням стабільності високомолекулярних комплексів АРСаз гетерозисних форм.

Результати досліджень показали, що при гібридизації на гетерозис відбуваються суттєві зміни, пов'язані з початковим етапом біосинтезу білка.

Дослідження біосинтезу білка рибосомами паростків різних форм кукурудзи

Для в'яснення причин, що викликають підвищення активності білоксинтезуючої системи у гетерозисних гібридів Міно, Іноуе (1980), досліджували склад популяції рибосом, а також їх ефективність до трансляції в безклітинній системі. Аналіз одержаних профілів седиментації рибосомної фракції в градієнті сахарози (рис. 8) свідчить, що відносний вміст полісом у паростках гетерозисних гібридів вищий, ніж вихідних ліній. Необхідно відзначити, що седиментаційний аналіз полісом, виділених із паростків низькогетерозисних гібридів та їх вихідних форм не виявив відмінностей кореляції між досліджуваними генотипами за складом полісом та їх співвідношенням з моносомами.

Одержані нами результати з фракціонування полісом із паростків гібридів та інбредних ліній кукурудзи експериментально підтверджують припущення про збільшення кількості активних у синтезі білка рибосом при гетерозисі. Для того, щоб перевірити чи тільки збільшення кількості полісом забезпечує підвищення білоксинтезуючої здатності у гетерозисних гібридів, ми дослідили активність виділених полісом із паростків кукурудзи в стандартній безклітинній системі з зародків пшениці, як описано в праці Klyachko et al. (1982).

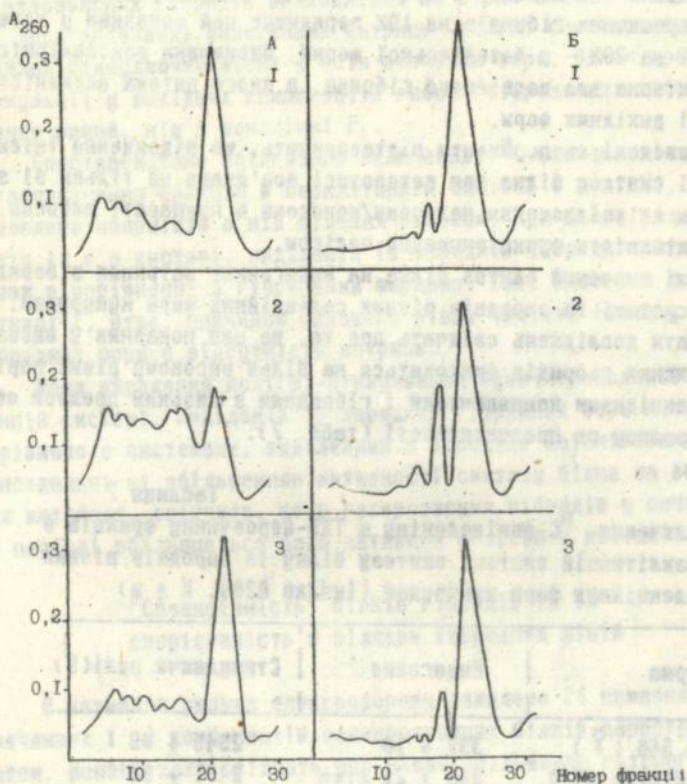


Рис. 8. Профілі седиментації полірибосом із паростків гібриду Піонер 3978 і його вихідних форм: 1-лінія П 346 (♀); 2-гібрид Піонер 3978; 3-лінія П 502 (♂). А-препарати полірибосом до обробки РНКазом; Б-полірибосоми, оброблені РНКазом.

Виявлено підвищення активності рибосомної фракції в цілому у випадку паростків високогетерозисних гібридів, але оскільки ендогенні мРНК транслюються на полісомах, було цікаво розракувати

питому активність полісом в кожній рибосомній фракції. Виявилось, що включення ^{14}C -лейцину в білки відносно вмісту полісом паростків гетерозисних гібридів на 10% перевищує цей показник у материнської і на 20% - у батьківської форми. Визначена закономірність не характерна для подвійного гібрида, в якого питома активність на рівні вихідних форм.

Проведені експерименти підтверджують, що підвищення інтенсивності синтезу білка при гетерозисі пов'язане не тільки зі збільшенням співвідношення полісоми/моносоми в препараті рибосом, а і з ефективністю функціонування полісом.

Далі вивчений синтез білка на ендогенних матрицях в безклітинній системі із зародків різних селекційних форм кукурудзи. Результати досліджень свідчать про те, що цей показник у високогетерозисних гібридів знаходиться на більш високому рівні порівняно з вихідними компонентами і гібридами з низьким проявом ефекту гетерозису по продуктивності (табл. 7).

Таблиця 7

Включення ^{14}C -фенілаланіну в ТКУ-нерозчинну фракцію в безклітинній системі синтезу білку із зародків різних селекційних форм кукурудзи (імпл/хв А200, $\bar{M} \pm m$)

Форма	Ендогенне	Стимульоване полі(У)
Лінія П 346 (♀)	397 ± 16	2345 ± 85
Гібрид Піонер 3978	846 ± 21 **, **	2481 ± 92
Лінія П 502 (♂)	282 ± 12 ***	2124 ± 101
Лінія 101 (♀)	452 ± 24	2426 ± 78
Гібрид Г 1	730 ± 31 **, **	2352 ± 54
Гібрид Г 0 (♂)	446 ± 47	2581 ± 31
Лінія 107 (♀)	327 ± 59	2300 ± 232
Гібрид Г 7	453 ± 37	2274 ± 151
Гібрид Г 0 (♂)	445 ± 47	2581 ± 30
Лінія 105 (♀)	229 ± 34	1924 ± 46
Гібрид Г 5	492 ± 34 *	3441 ± 95 **, **
Гібрид Г 0 (♂)	445 ± 47 ***	2581 ± 30 ***

Активність рибосом в безклітинній системі із зародків низькогетерозисних гібридів знаходиться на рівні вихідних форм.

При додаванні екзогенних матриць (поліУ) спостерігається значний стимулюючий ефект у всіх вивчених форм. Однак процент стимуляції у вихідних компонентів високогетерозисних гібридів значно вищий, ніж в поколінні F_1 .

Спостережуване збільшення вкличення ^{14}C -фенілаланіну в кислотонерозчинну фракцію в безклітинній системі з полі(У), ймовірно, зумовлено наявністю в ній вільних рибосом. При цьому велика кількість їх є в системі, виділеній із зародків інбредних ліній кукурудзи в порівнянні з гібридними формами. Такі рибосоми потенційно активні і, отже, причиною низького рівня синтезу білка у зародках інбредних форм є відсутність матриць.

Менш виражений полі(У)-стимулюючий ефект трансляції в безклітинній системі, виділеній із зародків гібридних форм кукурудзи, порівняно з системами, виділеними з зародків батьківських форм у поєднанні зі збільшенням активності синтезу білка на ендогенних матрицях, свідчить, що у гетерозисних гібридів у початковому періоді збільшується доля активних полісом у клітині.

"Специфічність" білків гібридів та їх спорідненість з білками інбредних ліній

У нативних умовах електрофорезу виявлено 24 компоненти легко-розчинних і 14 компонентів важкорозчинних білків паростків кукурудзи. Наявні дані свідчать про деяке збільшення гетерогенності легкорозчинних і структурних білків гетерозисних гібридів у період активного росту в порівнянні з інбредними. Так, при електрофоретичному розділенні легкорозчинних білків паростків високогетерозисного гібрида спостерігається поява мінорної смуги в зоні повільнорухливих компонентів з відносною електрофоретичною рухливістю ($\text{RFR } 0,17$), не виявленої в інбредних ліній. Таке явище не характерне для подвійного гібрида, в білковому спектрі якого йодних якісних відмінностей за компонентним складом, у порівнянні з батьківськими формами в наших дослідженнях, не виявлено.

Одержані результати показують значні зміни в кількісних характеристиках окремих компонентів білкового спектра досліджуваних генотипів. Порівнявши денситограми електрофоретичного розділення

білків паростків гібриду та інбредних форм кукурудзи встановлено, що при гетерозисі вміст білка збільшується в окремих зонах, особливо в повільнорухливій частині спектра, де знаходяться білки з ВЕР від 0,01 до 0,10 (рис. 9).

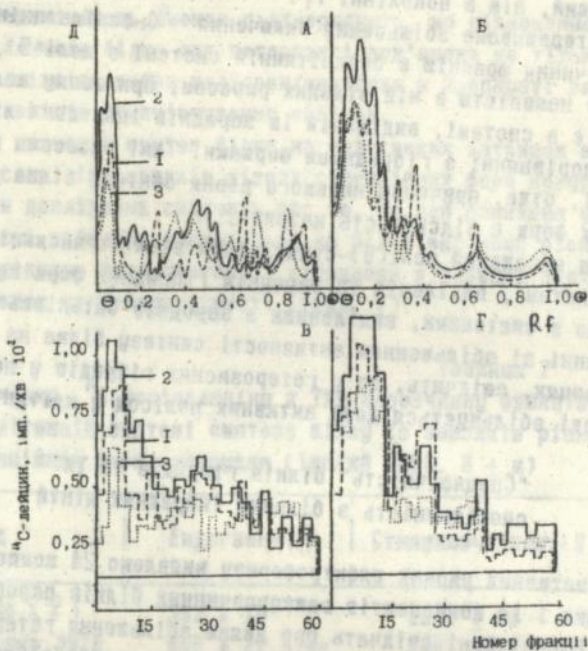


Рис. 9. Денситограми (А,Б) і радіоактивність (В,Г) білків паростків гетерозисного гібрида Піонер 3978 та вихідних форми: А,В-характеристики легкорозчинних; Б,Г-важкорозчинних білків; 1-лінія П 346 (♀); 2-гібрид Піонер 3978; 3-лінія П 502 (♂).

Показана нерівномірність розподілу радіоактивності в білкових спектрах. Найвищий рівень вклучення ^{14}C -лейцину спостерігається для білків з ВЕР 0,05-0,22 (легкорозчинні білки) і 0,02-0,2 (важкорозчинні білки) у всіх досліджуваних формах кукурудзи. Варто відзначити значну швидкість вклучення ^{14}C -лейцину в зоні повільно рухливих білків у високогетерозисної гібридної форми (ВЕР

0,13-0,22) при порівняно невисокому їх вмістові, тобто їх значно вищу питому радіоактивність. У низькогетерозисних гібридів радіоактивність компонентів як легкорозчинних, так і структурних білків паростків знаходиться на рівні вихідних форм. Таким чином, ми виявили, що у високогетерозисного гібрида кукурудзи спостерігається певна "специфічність" компонентів складу легкорозчинних білків паростків і збільшення інтенсивності синтезу деяких з них. В літературі є альтернативні думки відносно специфічності білків гібридних форм (Штирякова, 1976; Geric et.al., 1980; Hadjinov et.al., 1982; Marson et.al., 1982). Виявлення "специфічності" білкового складу гетерозисних організмів вивчає проблему, так званого, гібридного білка. Використаний метод електрофорезу в ПААГ скоріше вказує на подібність за білковим складом гібридів та їх вихідних форм, оскільки вона набагато більша, ніж відмінність.

Проте застосування гідрофобної хроматографії дозволило нам у фракції альбумінів вичленити групу "зверхрозчинних білків", в якій були виявлені відмінності між високогетерозисними ($\Gamma 1$, $\Gamma 2$) і низькогетерозисними ($\Gamma 5$, $\Gamma 7$) гібридами (рис. 10). Пік А

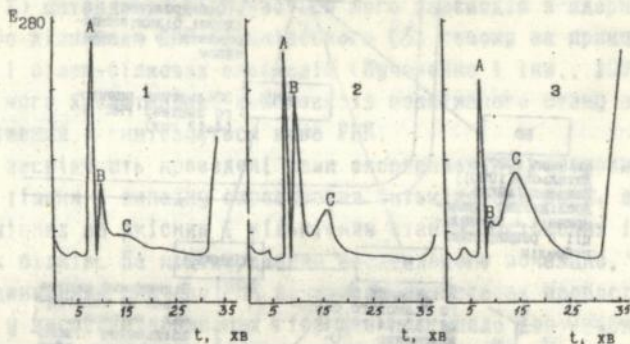


Рис. 10. Профіль елюції "зверхрозчинної" фракції альбумінів гібриду Піонер 3978 та його вихідних форм: 1-лінія П 346 (♀); 2-гібрид Піонер 3978; 3-лінія П 502 (♂).

є у всіх формах і відмінності маємо тільки кількісні. Другий пік В явно виражений тільки у високогетерозисних гібридів, а пік С - у низькогетерозисних. Для вивчення питання про існування гібридного білка використовували імунохімічні методи.

У результаті проведених досліджень у високогетерозисного гібрида виявлено два види білків, імунологічно відмінних від білків вихідних форм. Для низькогетерозисного гібрида, який має ту ж батьківську форму, таких білків не знайдено.

Таким чином, проведені експериментальні дослідження підтверджують деяку "специфічність" білкового складу гібридів і наявність нових білків, специфічних для гібридної рослини.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Проведена робота спрямована на подальшу розробку уявлень про природу гетерозису, виходячи з аналізу молекулярно-біохімічних аспектів цього явища.

Одержані експериментальні дані дозволили біохімічно осмисли-

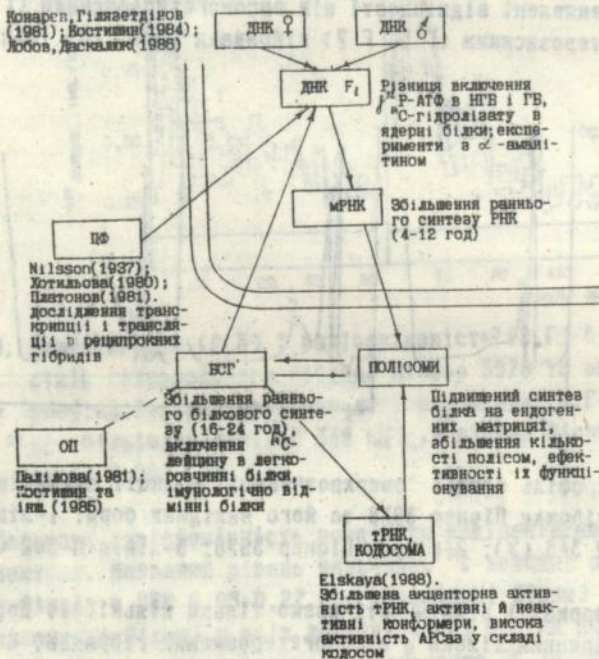


Рис. 11. Схема рівня регуляції біохімічних процесів у гетерозисних рослин.

ти і постулювати один із можливих шляхів регуляції експресії генному гібридних рослин (рис. 11).

При схрещуванні двох батьківських організмів відбувається взаємодія їх ядерних геномів, і при цьому ускладнюється їх структура (Костишин, Масікевич, 1983), що свідчить на нашу думку, перш за все про значний генетичний потенціал гібридної клітини. Важливо знайти механізми, що призводять, в окремих випадках, до реалізації цього потенціалу при гібридизації на гетерозис. Необхідно відзначити, що одночасно з потоком інформації з ядра для забезпечення біосинтезу білків здійснюється зворотній зв'язок цитоплазма-ядро, об'єднуючий процеси ядерно-цитоплазматичного транспорту і регуляторної взаємодії з цитоплазмою клітини (Nilsson, 1937; Хотькова, 1965; Paul, 1970).

Виявлені нами відмінності в біосинтезі РНК і білка разом з морфо-фізіологічними характеристиками реципрокних гібридів свідчать про суттєвий вплив цитоплазматичних факторів на характер перебігу процесів транскрипції і трансляції при гібридизації рослин. Тому обґрунтованим є припущення, що під впливом неспецифічного для батьківського (♂) геному цитоплазматичного фактора (ЦФ) материнської (♀) цитоплазми відбувається його взаємодія з ядерними білками або ділянками ДНК батьківського (♂) геному за принципом білок-ДНК і білок-білкових взаємодій (Кучеренко і ін., 1983), внаслідок чого хроматиновий комплекс із неактивного стану переходить в активний і синтезується нова РНК.

Як засвідчують проведені нами експерименти, гетерозис проявляється тільки у випадку схрещування батьківських форм, досить різко відмінних за якісним і кількісним станом гістонових і негістонових білків. На підтвердження висловленого показано, що за різким підвищенням синтезу РНК на найраніших етапах проростання (4-6 год) у високогетерозисних гібридів наступало достовірне підвищення синтезу розчинних білків за вклученням ^{14}C -лейцину в період від 16-24 год, а отже, підвищення синтезу РНК випереджувало збільшення синтезу білка.

Проведені нами експерименти, з використанням високочутливих імунохімічних методів підтверджують одиничні відомості про наявність специфічного білка для високогетерозисного гібридного організму (Руго, 1973). У високогетерозисному гібриді було виявлено два піки білків, імунологічно відмінних від білків вихідних форм,

що підтверджує специфічність білкового складу гібридів. Можливо, ці білки ініціюють більш ранній і активний синтез певних РНК у гібридної рослини, що в початком цілого ланцюга реакцій, властивих для явища гетерозису.

З іншого боку, новий білок може брати участь у формуванні рибосом і функціонуванні білоксинтезуючої системи, а регуляція швидкості його синтезу на рівні трансляції може бути пов'язана з тРНК системою в такій же мірі, як з кількістю відповідної мРНК.

Подальше вивчення може з'ясувати ймовірність нашого припущення, що в основі стимулювання гетерозису лежить взаємодія цитоплазматичних факторів материнської цитоплазми зі схрещуваними геномами зумовлена, на наш погляд, рівнем спорідненості цитоплазматичних факторів і батьківського геному в складі ядра високогетерозисного гібрида.

Треба окремо підкреслити, що результати проведеної роботи дали можливість вважати, що ступінь прояву гетерозису визначається на рівні трансляції, в той час, як комбінаційна здатність ліній більше пов'язана з процесом транскрипції.

ВИСНОВКИ

1. Виявлені особливості включення ^3H -уридину в тотальну РНК при проростанні зародків гетерозисних гібридів кукурудзи у порівнянні з вихідними формами. У високогетерозисних гібридів та їх материнських формах, відмічено підвищення біосинтезу РНК на ранніх етапах (4-12 год), наступні два максимуми включення міченого попередника в РНК гібридів спостерігається протягом другої доби.

2. Інтенсивність включення ^{32}P -АТФ у негістонові і гістонові білки паростків, як показник фосфорилування, корелює з комбінаційною здатністю інбредних ліній. Гібриди, одержані від схрещування батьківських форм із значними відмінностями в інтенсивності фосфорилування, характеризуються більш високою продуктивністю.

3. У гетерозисних гібридів швидкість включення ^{14}C -лейцину в легко- та важкорозчинні білки паростків вища, ніж у батьківських форм. Електрофорезом в ПААГ легкокорозчинних білків високогетерозисних гібридів виявлено мінорну фракцію з $\text{BER } 0,17$, яка характеризується відносно високою інтенсивністю включення ^{14}C -лейцину.

4. Високогетерозисні гібриди характеризуються підвищеною ацепторною активністю тРНК^{GAI}, тРНК^{Ala}, тРНК^{Leu}, тРНК^{Met} в сумарних препаратах, виділених з паростків; підвищеним вмістом відповідних ендогенних аміноацил-тРНК та підвищеною активністю АРСаз у складі високомолекулярних комплексів. Вихідні лінії з різною комбінаційною здатністю різняться між собою за кількістю активних і неактивних конформерів у сумарних препаратах тРНК.

5. Відносний вміст полісом у паростках гібридів вищий, ніж у вихідних ліній і складає 76-80%. Активність безклітинних систем біосинтезу білка вірогідно вища у високогетерозисних гібридів, в той час, як низькогетерозисні не відрізняються за цим показником від вихідних форм.

6. У досліджуваних формах кукурудзи спостерігається значний стимулюючий ефект при додаванні екзогенних матриць до безклітинних систем біосинтезу білка, виділених з зародків. Рівень стимулювання для вихідних форм значно вищий, ніж для високогетерозисних гібридів, що свідчить про більшу кількість рибосом, не включених в процес трансляції у інбредних ліній.

7. Знайдено, що високогетерозисні гібриди відрізняються за складом альбумінової фракції білків, зокрема, у гібриді Г 2 виявлено два компоненти, які імунологічно відмінні від білків вихідних форм. Для низькогетерозисного гібриду Г 5, що має таку ж батьківську форму, таких білків не знайдено.

8. Порівняльне визчення реципрокних гібридів виявило вплив материнських цитоплазматичних факторів на біосинтез РНК і легкорозчинних білків, що, ймовірно, є одним з механізмів впливу на морфо-фізіологічні показники та продуктивність досліджуваних гібридів.

9. Аналіз експериментальних даних свідчить про те, що у прояві ефекту гетерозису значна роль належить процесам, що детермінують біосинтез білка на рівні трансляції, комбінаційна ж здатність ліній більше визначається, за нашими даними, процесами пов'язаними з рівнем транскрипції.

Запропонована схема регуляції біохімічних процесів, що лежать в основі прояву явища гетерозису.

СПИСОК ОСНОВНИХ ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ З ДИСЕРТАЦІЙНОЇ ТЕМИ

1. Костишин С.С., Марченко М.М., Оплачко Л.Т. Различная интенсивность биосинтеза белка у гетерозисных гибридов кукурузы // Физиология и биохимия культ. растений.- 1982.- Т. 14, № 2.- С. 123-126.
2. Синицина Н.І., Оплачко Л.Т., Наумчук П.Л., Марченко М.М., Горшинський Ю.М. Вивчення ядерних і цитоплазматичних білкових систем гетерозисних гібридів кукурудзи // Матеріали ІV Українського біохімічного з'їзду.- К., 1982.- Ч. 2.- С. 173.
3. Оплачко Л.Т., Григорьева Н.Ф., Марченко М.М. Изучение активности белоксинтезирующей системы при гибридизации у растений // Тезисы докладов республиканского симпозиума "Биохимические механизмы регуляции генетической активности".- К., 1984.- С. 91.
4. Оплачко Л.Т., Масикевич Ю.Г., Костишин С.С., Марченко М.М. Изучение функциональной активности 70 S и 80 S рибосом в связи с гетерозисом у растений // Физиология и биохимия культ. растений.- 1985.- Т. 17, № 1.- С. 85-88.
5. Оплачко Л.Т., Костишин С.С., Яковлева Л.А., Марченко М.М. Активность рибосом проростков гибридных и инбредных форм кукурузы в бесклеточной системе синтеза белка // Физиология растений.- 1985.- Т. 32, Вып. 4.- С. 710-714.
6. Костишин С.С., Марченко М.М., Должицкая А.Г., Босак Я.Н., Хлус Л.Н. Биохимические подходы к выяснению природы гетерозиса кукурузы // Тезисы стендовых сообщений V Всесоюзного биохимического съезда.- М.: Наука, 1986.- Т. 3.- С. 208-209.
7. Марченко М.М., Костишин С.С., Оплачко Л.Т., Борис Л.Н., Григорьева Н.Ф. Биохимические механизмы регуляции генетической активности при гибридизации растений // Тезисы стендовых сообщений V Всесоюзного биохимического съезда.- М.: Наука, 1986.- Т.3.- С. 382-383.
8. Григорьева Н.Ф., Костишин С.С., Толстик С.М., Бевзо В.В., Марченко М.М. Регуляция генетической активности продуктами трансляции при гибридизации растений // Тезисы докладов V съезда генетиков и селекционеров Украины.- К., 1986.- Ч. 1.- С. 67-68.
9. Марченко М.М., Должицкая А.Г., Хлус Л.Н., Беляева Т.И., Петрик С.И. Особенности биосинтеза нуклеиновых кислот при гибридизации растений // Тезисы докладов V съезда генетиков и селекционе-

- ров України.- К., 1986.- Ч. 1.- С. 78-79.
10. Костишин С.С., Григор'єва Н.П., Марченко М.М. Біологічна активність тРНК при гібридизації рослин // Доп. АН УРСР. Сер. "Б".- 1987.- № 4.- С. 68-70.
11. Костишин С.С., Марченко М.М. Молекулярно-біохімічна концепція гібридної потужності рослин // Тезиси наукових повідомлень Всесоюзної конференції "Проблеми генетики, селекції та інтенсивності технології сільськогосподарських культур".- Душанбе, 1987.- С. 25-26.
12. Костишин С.С., Марченко М.М., Оплачко Л.Т., Григор'єва Н.Ф. Некоторые особенности компонентов аппарата трансляции гетерозисных гибридов кукурузы // Биополимеры и клетка.-1987.- Т. 3, № 3.- С. 142-145.
13. Костишин С.С., Марченко М.М., Григор'єва Н.Ф. Активність аміноацил-тРНК синтетаз гібридних та інбредних форм кукурузи // С.-х. біологія.- 1987.- № 8.- С. 19-21.
14. Костишин С.С., Марченко М.М. Біохімічні механізми гетерозису рослин у світлі нестабільних генетичних структур // Тези доповідей V Українського біохімічного з'їзду. - К., 1987.- Ч. 1.- С. 79-80.
15. Марченко М.М., Квашук О.А., Бевзо В.В., Копильчук Г.П., Петрик С.Я., Горшинський Б.М. Імунохімічне вивчення білкового складу проростків кукурудзи в зв'язку з гетерозисом // Тези доповідей V Українського біохімічного з'їзду. - К., 1987.- Ч. 2.- С. 82.
16. Марченко М.М., Костишин С.С., Оплачко Л.Т., Квашук О.А. Электрофоретические и иммунобиологические исследования белков при гибридизации растений // Молекуляр. генетика и биофизика.- 1987.- Вып. 12.- С. 84-91.
17. Костишин С.С., Марченко М.М., Оплачко Л.Т., Григор'єва Н.Ф. Новые подходы к изучению природы гетерозиса // Молекуляр. генетика и биофизика.- 1987.- Вып. 12.- С. 95-103.
18. Хлус Л.Н., Оплачко Л.Т., Марченко М.М., Язловицкая Л.С. Сопряженность транскрипции и трансляции в клетках гибридных и инбредных зародышей кукурузы // Труды V Всесоюзной межуниверситетской конференции "Биология клетки".- Тбилиси, 1987.- Ч. 1.- С. 384-386.
19. Марченко М.М., Хлус Л.Н., Оплачко Л.Т., Григор'єва Н.Ф. Раннее проявление эффекта гетерозиса кукурузы в параметрах синтеза

- РНК и белка // Тезисы докладов V съезда Всесоюзного общества генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова. - М., 1987. - Т. 4, Ч. 2. - С. 12-13.
20. Костышин С.С., Марченко М.М., Славетная Г.П., Оплачко Л.Т. Электрофоретическое исследование растворимых белков в связи с гетерозисом кукурузы // Гетерозис (теория и практика). - Харьков, 1988. - С. 62-63.
21. Марченко М.М., Григорьева Н.Ф., Оплачко Л.Т. Особенности предрибосомного и рибосомного этапов биосинтеза белка гетерозисных гибридов кукурузы // Гетерозис (теория и практика). - Харьков, 1988. - С. 81-82.
22. Костышин С.С., Хлус Л.Н., Оплачко Л.Т., Марченко М.М. Синтез РНК и белка в ранний период прорастания зародышей кукурузы в связи с гетерозисом // С.-х. биология. - 1988. - № 1. - С. 35-38.
23. Костышин С.С., Марченко М.М. Молекулярно-биохимическая концепция гетерозиса растений. // Молекуляр. генетика и биофизика. - 1988. - Вып. 13. - С. 104-109.
24. Марченко М.М., Костышин С.С., Хлус Л.Н., Должицкая А.Г. Исследование синтеза РНК в условиях *in vitro* и *in vivo* в связи с гетерозисом кукурузы // Физиология и биохимия культ. растений. - 1988. - Т. 20, № 2. - С. 171-175.
25. Копыльчук Г.П., Костышин С.С., Марченко М.М. Фосфорилирование ядерных белков при гибридизации // Докл. АН УССР, сер. "Б". - 1989. - № 1. - С. 69-71.
26. Марченко М.М., Копыльчук Г.П., Костышин С.С. О молекулярно-биохимических подходах к прогнозированию комбинационных свойств инбредных линий кукурузы // С.-х. биология. - 1989. - № 5. - С. 44-46.
27. Марченко М.М., Квашик О.А., Бевзо В.В., Мойса И.И. Прогнозирование комбинационной способности и гетерозиса на основе сравнительной характеристики альбуминов проростков кукурузы // Пути повышения продуктивности, эффективности использования и охраны природных ресурсов Украинских Карпат и Прикарпатья. - К., 1989. - С. 133-138.
28. Кривошея Л.К., Марченко М.М., Гончарук М.И., Пендерецкая А.Г., Томяк Б.П. О возможности прогнозирования комбинационной способности по морфобиологическим признакам и создание модели для молекулярно-биохимических исследований // Пути повышения продук-

- тивности, ефективності використання і охорони природних ресурсів Українських Карпат і Прикарпаття.- К., 1989.- С. 145-152.
29. Марченко М.М., Олчак Л.Т., Костишин С.С., Язловицкая Л.С. Эндогенный и поли (У) стимулируемый синтез в бесклеточной системе из зародышевой гибридных и инбредных форм кукурузы // Биополимеры и клетка.- 1989.- Т. 5, № 4.- С. 103-106.
30. Костишин С.С., Григорьева Н.Ф., Кривошея Л.К., Гончарук М.И., Копильчук Г.П., Пендерецька А.Г., Хлус Л.Н. Регуляция генома при гибридизации растений // Молекуляр. генетика и биофизика.- 1990.- Вып. 15.- С. 84-90.
31. Хлус Л.Н., Марченко М.М. Эндогенная активность ядерных РНК-полимераз кукурузы в связи с гибридизацией // Изучение и рациональное использование природных ресурсов.- Уфа, 1991.- С. 16.
32. Марченко М.М. Претрансляционный и трансляционный уровни регуляции биосинтеза белков при гибридизации растений // Тезисы докладов Всесоюзной конференции "Достижения биотехнологии - агропромышленному комплексу".- Черновцы, 1991.- Т. 1.- С. 19.
33. Хлус Л.Н., Марченко М.М. Синтез РНК в зародышах прорастающих семян линий и гибридов кукурузы // Физиология и биохимия культур. растений.- 1991.- Т. 23, № 2.- С. 138-141.
34. Костишин С.С., Марченко М.М., Копильчук Г.П., Томюк Б.П., Гончарук М.И., Пендерецька А.Г. Біохімічні механізми регуляції експресії геному при гібридизації рослин // Тези доповідей VI Українського біохімічного з'їзду.- К., 1992.- Ч. 1.- С. 39.
35. Марченко М.М., Хлус Л.М., Копильчук Г.П. Регуляція геному на транскрипційному рівні при гібридизації рослин // Тези доповідей VI Українського біохімічного з'їзду.- К., 1992.- Ч. 1.- С. 44.
36. Хлус Л.М., Костишин С.С., Марченко М.М. Ранній синтез РНК в реципрокних гібридах кукурудзи // Доп. АН України.- 1992.- № 6.- С. 138-140.
37. Марченко М.М., Хлус Л.Н. Ранний синтез РНК и белка в реципрокных гибридах кукурузы // Тезисы докладов VI съезда Украинского общества генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова.- Полтава, 1992.- Т. 1.- С. 24-25.

Марченко

1. ...

2. ...

3. ...

4. ...

5. ...

6. ...

7. ...

8. ...

9. ...

10. ...

11. ...

12. ...

13. ...

14. ...

15. ...

16. ...

17. ...

18. ...

19. ...

20. ...

21. ...

22. ...

23. ...

24. ...

25. ...

26. ...

27. ...

28. ...

29. ...

30. ...

31. ...

32. ...

33. ...

34. ...

35. ...

36. ...

37. ...

38. ...

39. ...

40. ...

41. ...

42. ...

43. ...

44. ...

45. ...

46. ...

47. ...

48. ...

49. ...

50. ...

51. ...

52. ...

53. ...

54. ...

55. ...

56. ...

57. ...

58. ...

59. ...

60. ...

61. ...

62. ...

63. ...

64. ...

65. ...

66. ...

67. ...

68. ...

69. ...

70. ...

71. ...

72. ...

73. ...

74. ...

75. ...

76. ...

77. ...

78. ...

79. ...

80. ...

81. ...

82. ...

83. ...

84. ...

85. ...

86. ...

87. ...

88. ...

89. ...

90. ...

91. ...

92. ...

93. ...

94. ...

95. ...

96. ...

97. ...

98. ...

99. ...

100. ...

Handwritten signature: M. Kozlov

Підписано до друку 6.05.93 р.
Формат 60x84/16. Папір друкарський № 2.
Офсетний друк. Ум.друк. аркушів 2,2.
Обл.-вид. аркушів 2,3. Тираж 100.
Замовлення 233. Безплатно

Лабораторія копіювально-розмножувального друку

Чернівецького державного університету

м.Чернівці, вул.Копишинського,2

AB 27.486

AB 27.486