

На правах рукописи

РГБ ОД

24 НОЯ 1997

Иванова Эвила Александровна

АНАЛИЗ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР И ИХ НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ
ФРАКЦИЙ ПРИ ПРОРАСТАНИИ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ

(03.00.04-биохимия)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва, 1997

Работа выполнена в лаборатории математической и молекулярной генетики Института биологии Уфимского научного центра РАН.

Официальные оппоненты -

академик РАН, доктор биологических наук, профессор Збарский И.Б.

доктор биологических наук, профессор Ванюшин Б.Ф.

член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, Обручева Н.В

Ведущая организация -

Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН.

Защита состоится "19" декабря 1997 года в 14 час.
на заседании диссертационного совета Д 053.22.02 в Российском
Университете дружбы народов по адресу: 117198, Москва,
ул. Миклухо-Маклая, дом 8, медицинский факультет.

С диссертационной работой можно ознакомиться в научной
библиотеке Российского Университета дружбы народов по адресу:
117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, дом 6.

Автореферат разослан "14" ноября 1997 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

В.Э.Торбек

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Исследование молекулярно-генетических основ онтогенеза относится к разряду фундаментальных проблем как общей, так и физико-химической биологии.

В 1987 г. вышло две отечественные книги: "Теоретические и математические аспекты морфогенеза" и "Биологический морфогенез" Л.В.Белоусова. Общим для них является то, что основательно рассмотрены теоретические и экспериментальные проблемы эмбрионального формообразования у животных организмов. Определяя биологический морфогенез как процесс возникновения и усложнения форм и структур в течение онтогенетического развития организма, исследователи отчетливо понимают необходимость системного подхода при анализе закономерностей структуризации организма от субклеточного уровня до "макроскопического" целого [Белоусов, 1987]. Экспериментальный анализ молекулярных и субклеточных основ механизмов развития животного организма с точки зрения физико-химических событий формообразовательных процессов был впервые начат в 1936 г. Т.Морганом [см.Белоусов, 1987] и продолжен - на растительном объекте В.Г.Конаревым в 1958 г. [Нуклеиновые кислоты и онтогенез растительной клетки; Нуклеиновые кислоты и морфогенез растений; 1959]. Анализ этих проблем в лабораториях Дж.Боннера [1968], А.Мирского [см. Олфри и др., 1968], способствовал молекулярно-генетическому направлению как в биологии индивидуального развития, так и в биологии гена.

Молекулярная биология открыла "целый мир" взаимосвязанных внутриклеточных процессов, лежащих в основе цитоскелетно-мембранных преобразований (ЦСМП) клеток в морфогенезе [Исаева, Божкова, 1987]. Но понимание проблемы - на каких все-таки принципах основана формообразовательная самоорганизация живых систем - до сих пор остается дискуссионным. Особенно остро стоит вопрос о биологической организации индивидуального развития организма во взаимосвязи с механизмами генетических и эпигенетических процессов. Эпигенез определяется как изменение экспрессии генов в организме с дифференцированными клетками, наследуемыми митотически [Robin, 1994]. С этой позиции важным в процессе понимания молекулярных движущих основ морфогенеза является интегрирование в одно функциональное целое: цитоскелетно-мембранных преобразований (ЦСМП) совместно с надмолекулярной структурированностью всех компонентов клеточного ядра.

В отечественной литературе в последние годы появились две книги И.Б.Збарского: "Организация клеточного ядра" [1988] и "Скелетные структуры клеточного ядра [Збарс-

кий, Кузьмина, 1991], в которых делается заключение о том, что ядерный матрикс, выполняя регулирующую роль в процессах репликации и транскрипции, "управляет кардинальными биологическими явлениями роста, развития и клеточной дифференцировки". Возможная регуляция морфогенетических процессов при вовлечении определенных последовательностей ДНК, во взаимосвязи с структурированностью ядра, обсуждается в работах К.Шерера [1984]. Общим для всех работ в области исследования индивидуального развития является то, что в них рассматривается биология развития отдельных геннов эмбрионального морфогенеза главным образом животных организмов. Процессы ростового морфогенеза основанные на размножении и растяжении клеток практически не обсуждаются.

Таким образом, чтобы понять закономерности механизмов индивидуального развития молекулярно-генетических осннов, в данном контексте - постэмбрионального онтогенеза (т.е. ростового морфогенеза у растений), не теряя целостности индивидуального развития организма, целесообразно представить биологическую организацию в иерархии системного подхода: популяция-> организм-> орган-> клетка (субклеточные органеллы - клеточное ядро) -> надмолекулярные структуры клеточного ядра (нуклеоплазма, хроматин, ядерный матрикс).

Цель и задачи исследования. Основная цель - исследовать включение эндогенных внутриядерных механизмов на уровне белковых компонентов, вовлеченных в регуляцию морфопроцессов, индуцированных влиянием тепловых свойств воды, прошедшей через эндосперм в покоящиеся зародыши пшеницы.

В связи с этим были поставлены следующие основные задачи:

1. Провести отбор относительно физиологически однородных покоящихся зародышей (0 ч) и растущих проростков (24 ч -> 48 ч... через интервалы в 24 ч до остановки роста coleoptила), используемых для выделения популяции клеточных ядер и их надмолекулярных (фракций) структур (нуклеоплазмы, хроматина, ядерного матрикса).
2. Определить компонентный состав (белок, ДНК, РНК, углеводы) надмолекулярных структур (фракций) клеточных ядер.
3. Определить динамику содержания эндогенного ауксина в надмолекулярных структурах (фракциях) клеточных ядер.
4. Определить активность сериновых протеиназ и их ингибиторов на фоне общей антиоксидантной активности пероксидазной системы в надмолекулярных структурах (фракциях) клеточных ядер.
5. Выделить из надмолекулярных структур клеточных ядер ме-

тодом аффинной хроматографии трипсиноподобные протеиназы (ТП-) и ингибиторы трипсина (ИТ-), определить их компонентный состав (белок, ДНК, РНК, углеводы, эндогенный ауксин).

6. Провести анализ молекулярных масс белков ТП- и ИТ-комплексов методом электрофореза.
7. Провести электронномикроскопический анализ ТП- и ИТ-комплексов
8. Определить аминокислотный состав гистонов и негистонов, фракционированных на колонках с амберлитом ИРЦ-50, провести их электрофоретический анализ и определить включение ^{32}P и ^{14}C в гистоновые и негистоновые фракции хроматина.

Научная новизна результатов исследования. Впервые проведено экспериментальное комплексное исследование с учетом закономерностей индукции прорастания: организм→орган→клеточное ядро, во взаимосвязи с индукцией включения внутриядерных механизмов закономерностей структуризации на уровне белковых компонентов нуклеоплазмы, хроматина, ядерного матрикса.

Примененный экспериментальный подход позволил рассмотреть один из главных механизмов процессинга ядерных белков (молекулярно-генетических основ онтогенеза) - активность ядерных протеиназ, вовлеченных в регуляцию экспрессии генов, на уровне биологической организации: организм → орган → клеточное ядро → надмолекулярные структуры → фермент.

Получены новые экспериментальные данные общей антиоксидантной активности пероксидазной системы, главным образом, функционирующей на уровне нуклеоплазмы и хроматина.

Получены новые экспериментальные данные о динамике содержания эндогенного ауксина в надмолекулярных структурах (фракциях) клеточных ядер, которая взаимосвязана с физиологическими особенностями онтогенетического роста и развития колеоптиля.

Получены новые экспериментальные данные о локализации в ядерном матриксе трипсиноподобных протеолитических и ингибитортрипсиновых комплексов, содержание которых также взаимосвязано с физиологическими особенностями роста органов проростков.

Предложена концепция, позволяющая объяснить включение внутриядерных механизмов структурной реорганизации клеточных ядер на уровне белковых компонентов нуклеоплазмы, хроматина, ядерного матрикса при индукции ростового морфогенеза у растений.

Научно-практическая ценность работы. Разработанный комплекс методов анализа эндогенных механизмов ростового морфогенеза был доложен в 1993 г. на II-й Московской кон-

Ференца "Регуляторы роста в развитии растений" в качестве планарного доклада: "Ортогенетическая модель для оценки экологической безопасности и механизма действия применяемых химических регуляторов роста". Результаты диссертационной работы не связаны для автора с лабораторией генетических основ селекции растений профессора И.И.Иванова и др., 1987, 1989), а также при чтении спецкурса "Функциональная активность клеточных ядер" в Башкирском ГУ. Разработаны и заданы авт., свои содерательства на способы выделения растительных клеточных ядер, ядерно-протенназ.

Выводы выносятся на защиту: 1. Надмолекулярные структуры клеточных ядер содержат эндогенный ауксин, динамика которого зависит от физиологии роста проростков. 2. Триизинологические протеиназы присутствуют в структурах ядер, их активность и содержание зависят от физиологии роста проростков. 3. Ядерные надмолекулярные структуры проявляют общую антиоксидантную активность, которая зависит от физиологии проростков.

Аннотация работы. Материалы диссертации доложены на Всесоюзном Экологическом собрании "Гастительные белки и их биосинтез" (Москва, 1975); Третьей Уральской конференции генетиков и селекционеров "Генетики и селекционеры Урала - народному хозяйству" (Свердловск, 1984); Втором Всесоюзном симпозиуме "Механизмы клеточной адаптации" (Нарадаг, 1985); всесоюзной конференции "Молекулярная биология генов высших растений" (Москва, 1987); всесоюзной научной конференции "Экогенетика высших растений" (Кущинск, 1989); X Всесоюзном симпозиуме "Структура и функции клеточного ядра" (Гродно, 1990); 20-th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies (Budapest, 1990); Втором съезде Всесоюзного общества физиологов растений (Минск, 1990); Третьем Всесоюзном симпозиуме "Клеточные механизмы адаптации" (Черногорь, 1991); 15-th International Congress of Biochemistry (Israel, 1991); Third International Congress of Plant Molecular Biology (Tucson, Arizona, USA, 1991); Третьем съезде Общества физиологов растений (С-Петербург, 1993); Одиннадцатом Всероссийском симпозиуме "Структура и функции клеточного ядра" (С-Петербург, 1993); Второй конференции "Регуляторы роста и развития растений" (Москва, 1993); I-ом съезде Завиловского общества генетиков и селекционеров (Саратов, 1994); International Plant Protection Congress (Nagye, 1995); всероссийском симпозиуме "Биология клетки в культуре" (С-Петербург, 1995); всероссийском симпозиуме "Физико-химические основы физиологии растений" (Пенза, 1996); 10-th FESPP Congress "From molecular mechanisms to the plant: an integrated approach" (Italy, 1996); 8-th International Congress of Mycology Division (Israel, 1996); XII Всероссийский симпозиум "Структура и функция клеточного ядра" (С-Петербург, 1996).

Публикации. Материалы диссертации опубликованы в ви-

де 40 работ в отечественных и зарубежных изданиях.

Объем и структура работы. Работа изложена на 427 страницах, состоит из введения, общего обзора литературы, описания методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа иллюстрирована 99 рисунком и 22 таблицами и схемами. Список цитируемой литературы содержит 584 работы, из них 357 на русском и 227 на иностранных языках.

Фактический материал диссертации включает в себя результаты изучения функционирования гидролитической и общей антиоксидантной активностей эндогенных механизмов в надмолекулярных фракциях (структурах: нуклеоплазме, хроматине, ядерном матриксе) клеточных ядер, индуцированных инициацией ростовых процессов под действием комплекса внешних факторов в течение гетеротрофной фазы роста и развития проростков пшеницы. Все результаты по изучению эндогенных внутриядерных механизмов, представленные в экспериментальной части работы, методически разработаны и получены автором.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выбор объекта. Опыты проводили на воздушно-сухих зародышах (0 ч), 24 ч проклюнувшихся зародышах и 48 ч → 72 ч → 96 ч → 120 ч органах (колеоптилях, первых настоящих листьях, междоузлиях, корневой системе) пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сортов Московская 35, Мироновская яровая, озимая; а также на 48 ч проростках сорта пшеницы Башкирская-4 (*Triticum vulgare* L.) и кукурузы сорта Глория (*Zea mays* L.). Подбор воздушно-сухих зародышей и растущих органов регистрировался графически, путем составления карт относительной физиологической оценки популяции семян и проростков, используемых для выделения клеточных ядер и их надмолекулярных структур. Семена были получены из селекционных и селекционно-семеноводческих учреждений (п.Мироновка, Ровенки: Украина; п.Чишмы, Удряк: Башкортостан).

Стерильные семена проращивали в темноте при 22°C или 26°C в термостате. Наклюнувшимися (24 ч) считали семена, у которых из трещины в коже виден алекс корня ^{0,5} мм.

Физиологическую оценку проростков осуществляли по росту и развитию колеоптиля (покровного органа первого настоящего листа), совершающего полный цикл развития в гетеротрофной фазе онтогенеза и прекращающего свой рост в связи с выходом первого листа в условия автотрофного питания.

Выделение клеточных ядер проводили глицириновым методом очистки по способу [Иванова, Вафина, 1991]. Получение ядерных фракций, обладающих протеиназной и ингибирую-

щей активностью, а также количественный анализ белка на основе модификации метода Бредфорд осуществляли по способу [Иванова, Вафина, 1992]. Из очищенных препаратов ядер нуклеоплазму экстрагировали при низкой ионной силе 0,14 М NaCl в 0,01 М трис-буфере с pH 6,8. Непрочносвязанный с ядерным матриксом хроматин (Хр-I) выделяли экстракцией 0,35 М NaCl на том же буфере. Далее осадок суспендировали в 2 М NaCl. После экстракции основной фракции тотального хроматина (Хр-II) в осадке оставалась фракция, содержащая ядерный матрикс (ЯМ), который экстрагировали последовательно 6 М гуанидин гидрохлоридом с 0,004% β-меркаптоэтанолом в вышеуказанном буфере и 0,2 н. NaOH (ядерный остаток - ЯО). Ядерные фракции хранили при -196°C в азоте.

Количество белка определяли по методам Лоури, турбидиметрии, Бредфорд в модификации [Иванова, Вафина, 1990].

Количество ДНК и РНК оценивали [Спирин, 1958].

Микроколичества углеводов в ядерных фракциях определяли по методике Деше [1967], модифицированной в нашей лаборатории [Иванова, Вафина, 1992]. Сущность метода заключается в том, что при кипячении в присутствии концентрированной серной кислоты от пептидов отщепляются гликозильные группы, которые легко распадаются на моносахара и превращаются в тиоацетали, дающие с антроном синюю окраску с максимумом поглощения при λ_{220} .

Трипсиноподобную активность и ее ингибирование в надмолекулярных фракциях клеточных ядер оценивали: по активности трипсиноподобных сериновых протеиназ, расщепляющих Arg-X, Lys-X связи в протамине; по активности ингибиторов трипсина, препятствующих расщеплению Arg-X, Lys-X связей в протамине. Мерой активности ферментов служило количество растворимых аргининсодержащих пептидов, образующихся при протеолизе экзогенного субстрата - протамина (Merck) (низкомолекулярного ядерного белка) при его расщеплении трипсином или трипсиноподобными протеиназами [Иванова, Вафина, 1990, 1992]. Активность протеиназ и ингибирование трипсина выражали в нмоль аргинина \cdot с⁻¹ \cdot мг белка.

Общую антиоксидантную активность пероксидазной системы определяли с субстратом бензидином (Reanal) (донор водорода) и акцептором водорода - H₂O₂ (пероксид водорода), приняв за основу метод [Гамбург и др., 1977]. Активность реакции выражали в условных единицах образования бензидина голубого \cdot с⁻¹ \cdot мг белка.

Иммуноферментный анализ проводили по методике Г.Р.Кудояровой и др. (1986), с некоторыми модификациями. На первом этапе анализируемый материал сорбировался (сенсibilизация) на стенки лунок полистеролового планшета (Linbro, США). В отдельных вариантах при сенсibilизации к анализируемому материалу добавляли ауксин (β-индолилуксус-

ную кислоту (ИУК), 10 нг/лунку). После промывки к анализируемому материалу добавляли антитела к ИУК. Количество аффинносорбированных антител к ИУК оценивали с помощью антител диагностических против иммуноглобулинов кролика, меченных пероксидазой. В случае определения пероксидазной активности самого ядерного материала последняя стадия опускалась.

Аффинная хроматография. Надмолекулярные структуры ядер (нуклеоплазму, Хр-I, Хр-II, ЯМ, ЯО) пропускали через колонки (0,5 см × 1,0 см) с иммобилизованным трипсином или ингибитором трипсина. Трипсиноподобные протеолитические (ТП-) и ингибитортрипсиновые (ИТ-) комплексы элюировали при pH 3,0 ацетатным буфером [Иванова, Вафина, 1992].

Фракции, полученные кислотной элюцией, диализовали против 0,1 М фосфатного буфера pH 7,0 и использовали для определения в них содержания белка, нуклеиновых кислот, углеводов, ИУК, протеолитической, ингибиторной активности, а также гетерогенности белков по их молекулярной массе.

Электрофоретический анализ белков ТП- и ИТ- комплексов проводили методом тонкослойного электрофореза в градиенте полиакриламидного геля (9%, 25%, 4%) с додецилсульфатом pH 8,37. Белковые полосы красили кумасси G-250. Вся эта работа была выполнена в лаборатории химии белка (зав. лаб. д.б.н. Ю.Б.Аллахов; г.Пушино).

Электронномикроскопический анализ был проведен на ЭВМ-100 АК при увеличении 55 000. Сеточку покрывали формваровой подложкой (0,25% формвар в диоксиде). Пробы промакивали сеточкой, сушили при комнатной температуре в защищенном от пыли месте и контрастировали 1% уранилацетатом (растворенным в 70% спирте) от 5 до 30 мин. При печати фотографий увеличение было в 1,5 раз. Общее увеличение на фотографиях - в 85 000.

Фракционирование негистоновых и гистоновых белков. Определение интенсивности включения $2-^{14}C$ ацетата и ^{32}P фосфата, аминокислотный состав, методика работы с физиологически активными веществами выполнены по методу [Иванова, 1977].

Числа в таблицах и точки на графиках представляют среднеарифметическое трех-пяти химических и четырех-пяти биологических повторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Физиологическая характеристика популяции семян и проростков пшеницы, используемых для анализа ростового морфогенеза гетеротрофной фазы онтогенеза

За стандартизацию физиологической оценки роста и

развития проростков пшеницы приняли рост колеоптиля (см) (орган проростка пшеницы, покрывающий первый настоящий лист до выхода его из-под колеоптиля в условия автотрофного питания). Эффект формообразования проростка у растений достигается за счет инициации взаимосвязанно функционирующих апикальных, меристематических зон клеток, определяющих индивидуальное развитие отдельных органов побег-корень [Барлоу, 1994]. В данном контексте инициация роста покоящихся зародышей (0 ч), рассматривается с момента поступления в эндосперм тепловой водной среды и начала ростовых процессов в интервалах: от 0 ч->24 ч->48 ч->72 ч->96 ч и т.д. до окончания роста колеоптиля [рис. 1; 4; 9].

2. Анализ надмолекулярных структур клеточных ядер постэмбрионального развития зародышей Мироновской пшеницы (репродукция R-3)

Схема биохимического анализа гетеротрофного ростового морфогенеза развития зародышей Мироновской пшеницы (семена урожая 1984 г.) представлена на рис.1. Компонентный состав надмолекулярных ядерных структур представлен на рис.2. Анализ данных показывает, что нуклеоплазма и ЯМ являются главным образом рибонуклеопротеидными; Хр-I, Хр-II - дезоксирибонуклеопротеидными структурами. Во всех надмолекулярных структурах содержатся гексозы. В корневой системе они особенно мешали выделению клеточных ядер и нуклеиновых кислот. Однако способ выделения клеточных ядер и их очистки от цитоплазматических загрязнений (в данном контексте работы) был специально стандартизирован, ориентируясь на 24 ч зародыши, так как нас интересовало возрастание в процессе роста проростков прочности межклеточных->внутриклеточных->внутриядерных связей, способных выявиться при биохимическом анализе в составе ЯМ или в других его компонентах за счет стягивания внутрь ядер.

На роль веществ - посредников в пространственно-временной координации ростовых процессов у растений, по мнению Уоринга и Филлипа [1984], претендуют фитогормоны. Взаимосвязь гормональной системы с молекулярно-генетической основой у растений представлена на рис. 3.

Проблема присутствия и функционирования эндогенных фитогормонов - ауксинов - на уровне организации клеточных ядер практически не освещена в мировой литературе. Анализ выявления эндогенного ауксина иммуноферментным методом показал динамику иммунореактивности надмолекулярных ядерных структур (рис. 3), которая четко коррелирует со скоростью роста колеоптиля и корневой системы. В период максимально-

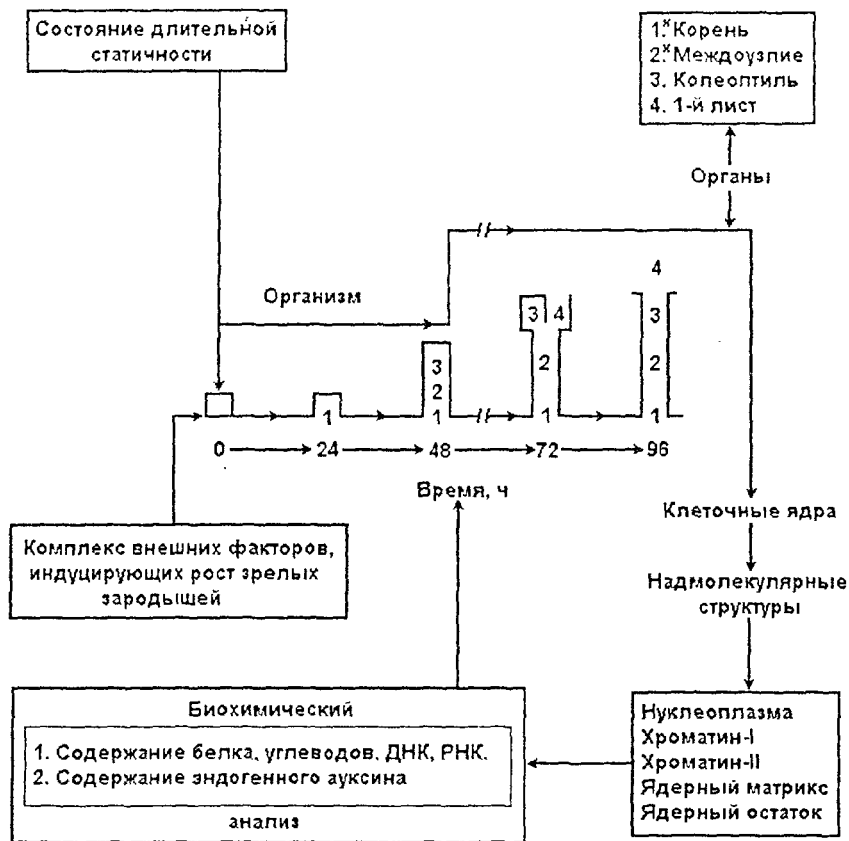


Рис.1. Схема биохимического анализа постэмбрионального развития зародышей Мироновской пшеницы (репродукция R-3).

1* 2* - корневая система была отделена вместе с междоузлием

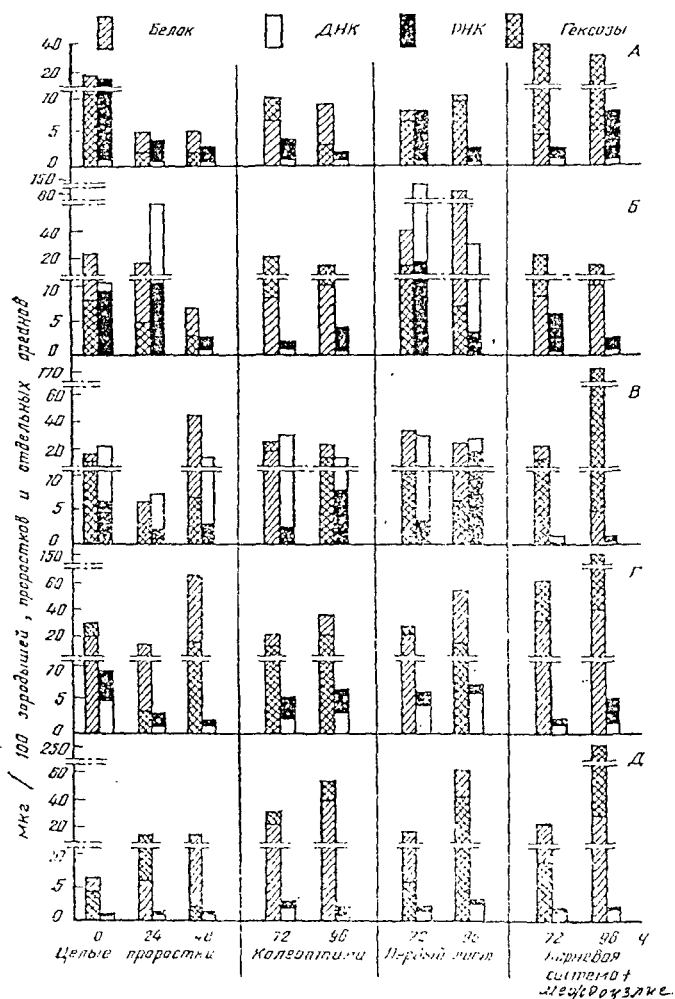


Рис. 2. Компонентный состав надмолекулярных структур клеточных ядер при ростовом морфогенезе гетеротрофной фазы онтогенеза проростков Мирской пшеницы: А-нуклеоплазма; Б-хроматин-I; В-хроматин-II; Г-ядерный матрикс; Д-ядерный остаток.

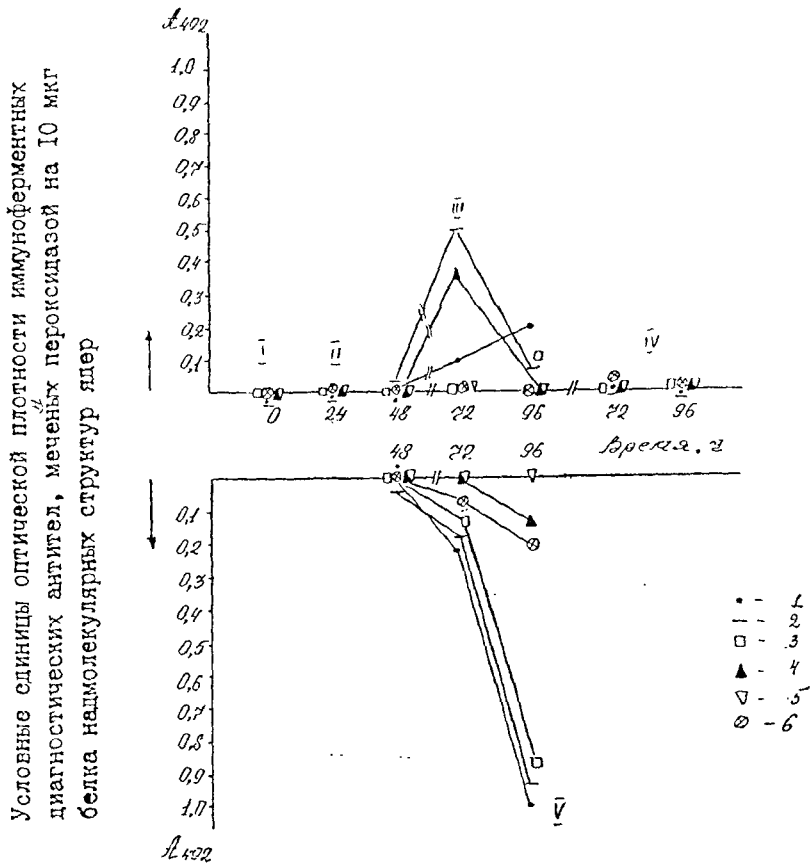


Рис. 3. Иммунологический анализ эндогенного ауксина в ядерных структурах проростков Мироновской пшеницы.

I - 0 ч - покоящиеся зародыши;
 II - 24 ч > 48 ч - растущий целый проросток;
 III - 72 ч > 96 ч - coleoptиль;
 IV - 72 ч > 96 ч - первый настоящий лист;
 V - 72 ч > 96 ч - первичная корневая система с междоузлем.

1-нуклеоплазма;
 2-хроматин-I (непрочносвязанный с ЯМ);
 3-хроматин-II (прочносвязанный с ЯМ);
 4-ядерная матрица (ЯМ);
 5-ядерный остаток (ЯО);
 6-целые ядра.

го роста колеоптиля (рис. 1; 72 ч) максимум иммунореактивности антител приходится на 72 ч (рис. 3, III; 72 ч). окончанием роста колеоптиля содержание эндогенного ауксина резко падает и, по-видимому, при участии нуклеоплазматических структур перемещается по внутриклеточным компонентам в активно растущую корневую систему (рис. 3, 96 ч). Следует отметить, что целые ядра колеоптиля (рис. 3, 72 ч) не проявляют иммунореактивности и только при экстракции из них надмолекулярных структур становится возможным обнаружить эндогенный ауксин. В литературе имеются многочисленные данные о том, что в надмолекулярных структурах нуклеоплазмы, хроматина, ядерного матрикса имеются коровые филаменты [см. Збарский, Кузьмина, 1991], которые связаны промежуточными филаментами, а через них - с цитоскелетом клетки и межклеточной системой [Поликар, 1976]. На основе такой системы организации клеточных ядер мы предполагаем, что эндогенный ауксин продвигается по фиброзным и фибриллярным структурам ядер, оказывая физиологическое действие на растущие органы и ткани проростков пшеницы.

С помощью иммуноферментного метода мы не обнаружили эндогенного ауксина в ядерных структурах покоящихся (0 ч) и прорастающих зародышей (24 ч), а также 48 ч → 72 ч листьях. Однако из этого не следует, что в этих тканях отсутствует эндогенный ауксин. Просто в данном случае, на наше мнение, чувствительность иммуноферментного метода необходимо настраивать на нанограммы белка. В нашем случае мы иммуноферментный метод скорректировали на 10 мкг бел в ядерных структурах.

3. Анализ надмолекулярных структур клеточных ядер постэмбрионального развития зародышей пшеницы Московской-35 (суперэлита)

Схема биохимического анализа гетеротрофного роста морфогенеза индивидуального развития зародышей пшеницы Московской-35 (семена урожая 1988г.) представлена рис. 4.

Компонентный состав внутриядерных надмолекулярных структур. Все внутриядерные надмолекулярные структуры покоящихся зародышей (0 ч) и растущих проростков (48 ч, 120 ч), помимо белковых, содержат также и углеводные компоненты. При использовании растущих 48 ч → 72 ч → 96 ч, 120 ч органов мы также, как и в предыдущем эксперименте специально оставили способ очистки ядер, примененный в 24 ч проростков. Известно, что меристематические зоны стеблей растения, осуществляющие интенсивные процессы репликации хроматина, деления ядер, синтеза веществ цитоплазмы образуют новую трехмерную сеть клеточных стенок [Барнс

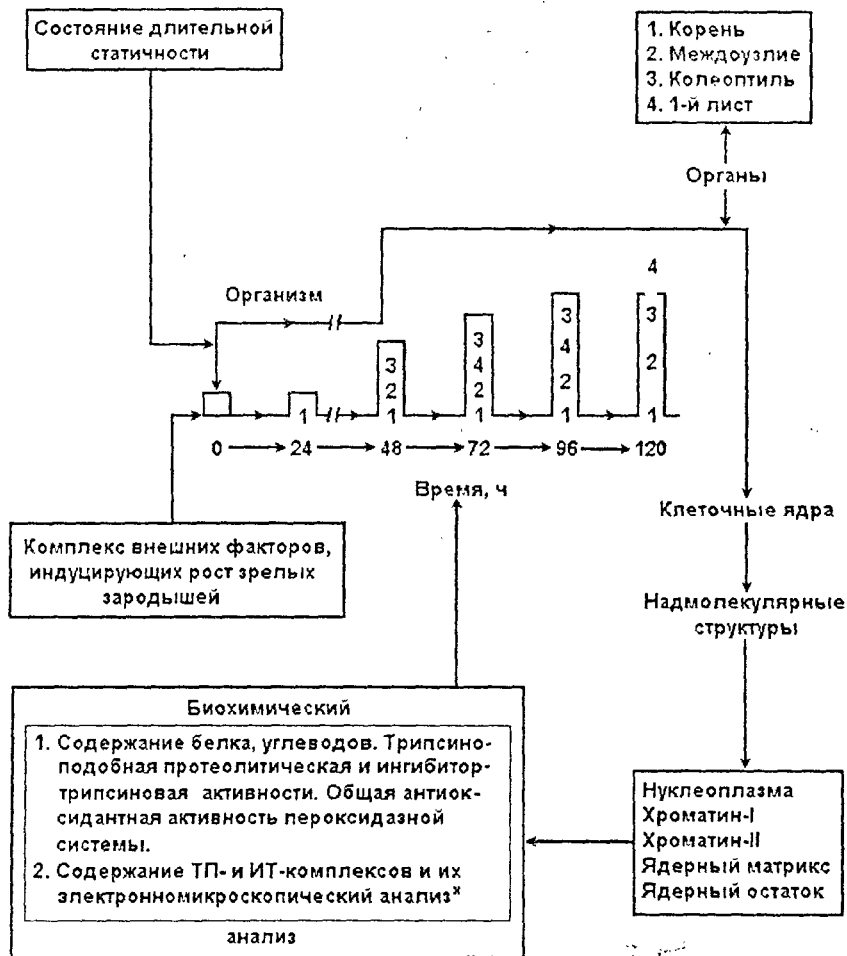


Рис.4. Схема биохимического анализа постэмбрионального развития зародышей пшеницы Московской - 35 (суперэлита).

ТП - трипсиноподобные, ИТ - ингибитортрипсиновые комплексы, выделенные методом аффинной хроматографии на колонках с иммобилизованным ингибитором трипсина или трипсином, соответственно.

* - эксперимент проведен только на 96 ч колеоптилях

1994], в основе которых лежит остов, состоящий из агрегированных полимерных цепей целлюлозных микрофибрилл, погруженных в матрикс нецеллюлозных полисахаридов [Уоринг, Филлипс, 1984]. До последнего времени в растительных клетках не обнаружено промежуточных филаментов белковой природы [Lloyd et al., 1987]. Возможно, промежуточные филаменты растений, связывающие ядерно-цитоскелетно-межклеточный матрикс, имеют главным образом углеводное происхождение и при разрушении клеток коллапсируют на поверхность ядер. Обсуждая формообразование с позиции клеточного аспекта можно еще раз подчеркнуть, что клеточные стенки и связанный с ними цитоскелет (добавив, а также и ЯМ), вместе взятые, являются основой эпигенетической информации для морфогенетического процесса, который определяется развитием формы органа [Барлоу, 1994]. Развитие проростка, начиная со стационарных (находящихся в состоянии покоя) основ побег-корень, прекрасная модель для исследования эпигенетической информации (рис. 4).

Ограниченный протеолиз. На основании данных по процессингу белков [Локшина, Былинкина, 1990], мы предположили, что в клеточных ядрах может работать механизм биологического контроля путем ограниченного протеолиза и его ингибирования по Arg-X, Lys-X группам, которыми богаты ядерные белки. В свое время уделялось много внимания исследованию модификации ядерных белков в связи с реализацией генетической информации [Гистоны и перенос генетической информации, 1968]. Появились работы по ацетилированию, фосфорилированию гистонов [Иванова, 1977]. Представление одной из стадий процессинга ядерных белков путем их ограниченного протеолиза и возможности его ингибирования - одна из сторон посттрансляционной модификации белков при реализации генетической информации. Многочисленные ранние работы по реконструкции хроматина с применением трипсина, специфически расщепляющего Arg-X, Lys-X связи главным образом были направлены именно на расщепление лизин- и аргининбогатых гистонов [Crampton et al., 1957; Дебабов и др., 1981; Marks et al., 1976].

Данные, представленные на рис. 5 показывают, что генетические гетерополимерные структуры (нуклеоплазма, Хр-I, Хр-II, ЯМ) подвергаются трипсиноподобному протеолизу и его возможному ингибированию. В некоторых случаях ингибирование (в отдельных фракциях ядер) проявляет сопряженность с трипсиноподобным протеолизом (рис. 5, I: Хр-I, 48 ч; II: Хр-I, 96 ч; IV: ЯМ, 72 ч; Хр-II, 96 ч). В опытах *in vitro* такой тип реакции доказан [Sweadner, 1991]. В данном случае мы пока не можем утверждать происходит в одних и тех же клеточных ядрах сопряженная реакция или это итог работы с популяцией клеточных ядер принадлежащих разным тканям

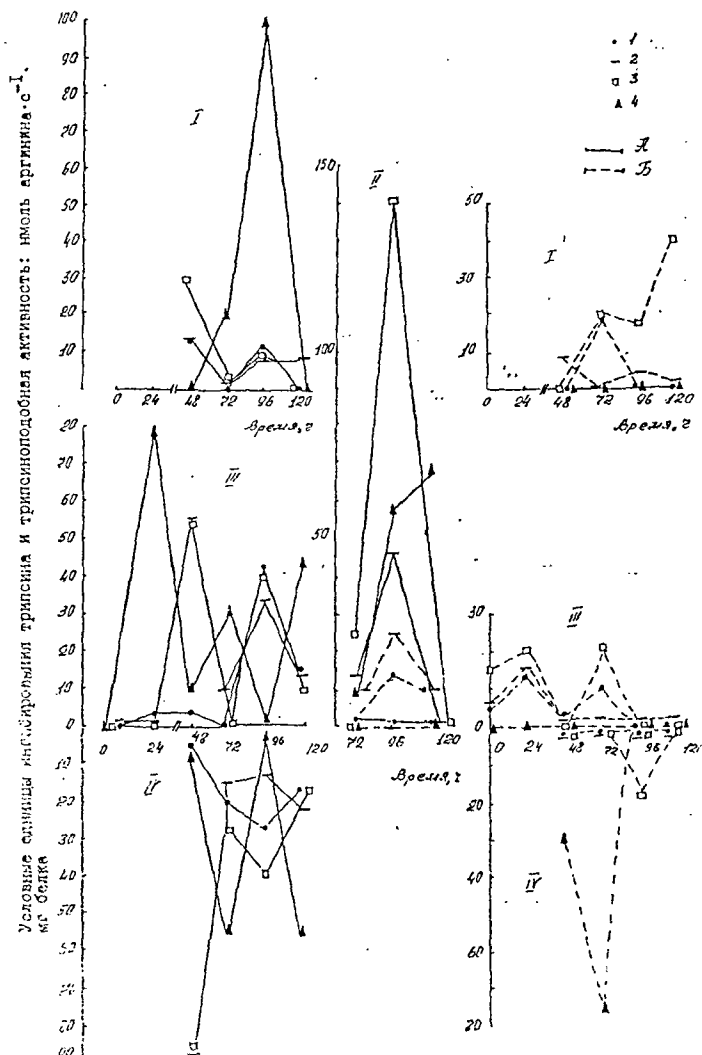


Рис. 5. Трипсиноподобный протеолиз и ингибирование трипсина в надмолекулярных структурах клеточных ядер при постэмбриональном развитии зародышей Московской-35 (суперэлиты) пшеницы.

A—трипсиноподобный протеолиз;

B—ингибирование трипсина;

1—нуклеоплазма; 2—хроматин-I; 3—хроматин-II; 4—ядерный матрикс; I—колеоптиль; II—первый настоящий лист; III—междоузлие; IV—корневая система

растущего органа. Роль ингибиторов трипсиноподобного протеолиза могут выполнять поли-АДФ-рибозы [Suzuki et al. 1978] или белковые ингибиторы [Hirasawa et al., 1978]. Мы пока также не можем утверждать белковой или небелковой природы функционируют ингибиторы трипсиноподобных протеиназ. Мы просто констатируем, что на уровне гетерополимерных структур ядра могут проявляться реакции как сопряженного, так и разобщенного трипсиноподобного протеолиза и его ингибирования (рис. 5).

Анализ трипсиноподобного протеолиза, представленный на рис. 5 (III, 24 ч, сплошная кривая) показал, что при индукции ростовых процессов в зародыше (рис. 4, 24 ч), вследствие прохождения тепловой водной среды через эндосперм в гетерополимерные структуры ядер, наиболее активно разворачивается трипсиноподобный протеолиз на уровне ядерной матрикса (рис. 5, III: 24 ч, сплошная кривая) при сопряженном ингибировании (рис. 5; III: 24 ч, пунктир) трипсиноподобных процессов на других гетерополимерных структурах (Хр-I, Хр-II; нуклеоплазма). В процессе разворачивания "программы" ростового морфогенеза в период гетеротрофной фазы онтогенеза наблюдается пространственно-временная разобщенность трипсиноподобного протеолиза на уровне хроматина и ядерного матрикса, то есть, если трипсинолиз осуществляется в ЯМ, то в хроматине он или полностью отсутствует или слабо проявляется. Особенно это хорошо видно в междоузлии (рис. 5; III: 0 ч→120 ч, сплошная кривая), корневой системе (рис. 5, IV: 48 ч→120 ч, сплошная кривая), в колеоптиле, в период активного роста за счет растяжения клеток (рис. 4, 72 ч→96 ч; рис. 5, I: 72 ч→96 ч, сплошная кривая); с окончанием роста колеоптиля (рис. 4, 120 ч) трипсинолиз сразу прекращается (рис. 5, I: 120 ч, сплошная кривая). В период роста апекса колеоптиля (рис. 4; 48 ч) активные процессы по ограниченному протеолизу осуществляются только в хроматине и нуклеоплазме (рис. 5, I: 48 ч, сплошная кривая). Возможно, это связано с запуском и распределением генетических программ на уровне роста апекса колеоптиля, где некоторые клетки растут за счет их деления. Мы склонны думать, что высокая трипсиноподобная активность Хр-II (рис. 5, II: 96 ч, сплошная кривая) также связана со слоями тех клеточных тканей первого настоящего листа, которые растут за счет митотического деления клеток. Однако увеличение трипсиноподобного протеолиза на уровне ЯМ (рис. 5, II: 72 ч→120 ч, сплошная кривая) может свидетельствовать о том, что ряд тканевых слоев первого настоящего листа растет за счет растяжения клеток.

Таким образом, мы предполагаем, что ограниченный протеолиз и его ингибирование в процессе ростового морфогенеза связан с генетическими структурными реорганизациями

хроматина при митотическом делении клеток (например, рис. 5, I: 48 ч; II: 96 ч; III: 48 ч, 96 ч; IV: 48 ч, 96 ч) и организацией на ЯМ при растяжении клеток мест сборки ферментативных комплексов репликации и транскрипции (например, рис. 5; III: 24 ч; I: 96 ч, сплошная кривая).

Общая антиоксидантная активность пероксидазной системы. Рассматривая один из возможных молекулярных морфогенезных аспектов процессинга ядерных белков в надмолекулярных ядерных структурах (рис. 5), индуцированных к структурно-функциональным преобразованиям при поступлении в покоящийся организм зародыша тепловой водной среды, прошедшей через эндосперм (рис. 4) представляется, что активные динамические события, причастные к ускоренным темпам репликации хроматина, делению ядер, синтезу веществ цитоплазмы, образованию новой трехмерной сети клеточных стенок, разворачиваются с вовлечением генерации активных форм кислорода (АФК) (например, H_2O_2 (рис. 6)). Такому предположению способствовали данные Дион и др. [см. Дубинина, Шугалей, 1993], которые считают, что радикальная атака вначале направлена на белки плазматических мембран, способных вызывать их деполимеризацию, а не на липиды. Что касается эндогенного механизма действия трипсина, то показано, что он активнее расщепляет окисленные, чем нативные белки [Дубинина, Шугалей, 1993]. В представленной работе мы не полагаем данными о связи антиоксидантной активности пероксидазной системы с окислительной модификацией белковых молекул, но мы представляем данные по общей окислительно-восстановительной (или антиоксидантной) активности пероксидазной системы, разворачивающейся в процессе ростового морфогенеза в структурах клеточных ядер (рис. 6).

В литературе есть данные, из которых следует, что генерация АФК (H_2O_2) может быть вызвана активностью сериновых протеиназ [Никандров, 1988].

Как видно на рис. 6, наибольшая общая активность пероксидазной системы проявляется на уровне нуклеоплазмы (рис. 6: III; IV; 72 ч), в период подготовки проростка к максимальному росту колеоптиля (рис. 4, 72 ч → 96 ч). Возможно, это связано с активным ядерно-цитоплазматическим обменом веществ или трансформацией энергетических процессов, направленных в русло формообразования ЦСМП. Рассматривая в качестве генератора механических сил морфогенеза цитоскелетно-мембранные преобразования (ЦСМП) во взаимосвязи с ЯМ и Хр, а биохимические реакции с позиции потоков энергии [Фокс, 1992], можно утверждать, что инициация морфопроцессов происходит при участии хроматиновых и нуклеоплазматических гетерополимерных структур (рис. 6, 0 ч → 120 ч). Возможно, наблюдаемая динамика общей антиоксидантной активности пероксидажной системы гетерополимерных

структур (нуклеоплазмы, хроматина) клеточных ядер есть проявление сил сокращения, растяжения и гидростатического внутриядерного давления в процессе ростового морфогенеза (рис. 6). На уровне ЯМ мы практически не обнаружили общей антиоксидантной активности пероксидазной системы (рис. 6). Таким образом, анализируя на уровне ядерных гетерополимерных структур нуклеоплазмы, хроматина – процессы гидратации с последующей вероятной дегидрогенизацией субстратов (в ряде случаев которых образуется пероксид водорода (H_2O_2)), можно предположить, что донором водорода в образуемой пероксидазной системе может стать любое вещество, например белок, нуклеиновая кислота, углеводы, липиды внутриядерных структур. Обычно реакции окисления-восстановления это сопряженные процессы, идущие со скоростью в долях секунд.

Локализация трипсиноподобных протеиназных (ТП-) и ингибитортрипсиновых (ИТ-) комплексов в надмолекулярных структурах клеточных ядер. Следующий этап работы заключался в установлении с какими структурами клеточного ядра могут быть взаимосвязаны ядерные протеиназы и их ингибиторы. С этой целью мы пропустили надмолекулярные структуры ядер через колонки с иммобилизованным трипсином или ингибитором трипсина. Анализ этих данных показал, что трипсиноподобные протеиназы и ингибитор трипсина, главным образом, локализируются в ядерном матриксе (рис. 7), причем их локализация в ЯМ, по-видимому, взаимосвязана с его структуризацией, так как в покоящихся зародышах мы не обнаружили трипсиноподобных протеиназ и ингибитора трипсина. О том, что в покоящихся клетках ядерный матрикс слабо развит, свидетельствуют и литературные данные на животных объектах [см. Збарский, 1988]. Биохимический анализ трипсиноподобных протеиназ и ингибитора трипсина показал наличие в них помимо белков, ДНК, РНК, гексоз. Поэтому в дальнейшем мы называем трипсиноподобные протеиназы и ингибитор трипсина трипсиноподобными (ТП-) и ингибитортрипсиновыми (ИТ-) комплексами, которые к тому же оказываются подвижными в ЯМ по компонентному содержанию белка (рис. 7) в процессе формирования организм→орган в течение гетеротрофной фазы онтогенеза (рис.4). Электронномикроскопический анализ по контрастированию с уранилацетатом трипсиноподобных протеолитических и ингибиторнтрипсиновых комплексов (рис. 8), выделенных с колонок с иммобилизованным ингибитором трипсина (рис. 7, I, 96 ч), выявил плотный зернистый слой ядерного матрикса с четкоподобными структурами (рис. 8, IIa) и крупные розеткоподобные мегакомплексы (рис. 8, IIb), напоминающие реплицомы [см. Nelson et al., 1986]. Все эти структуры, ассоциированные с ядерным матриксом, выявляются также и с колонок с иммобилизованным трипсином (рис. 8; I). Однако зернистый слой практически полностью

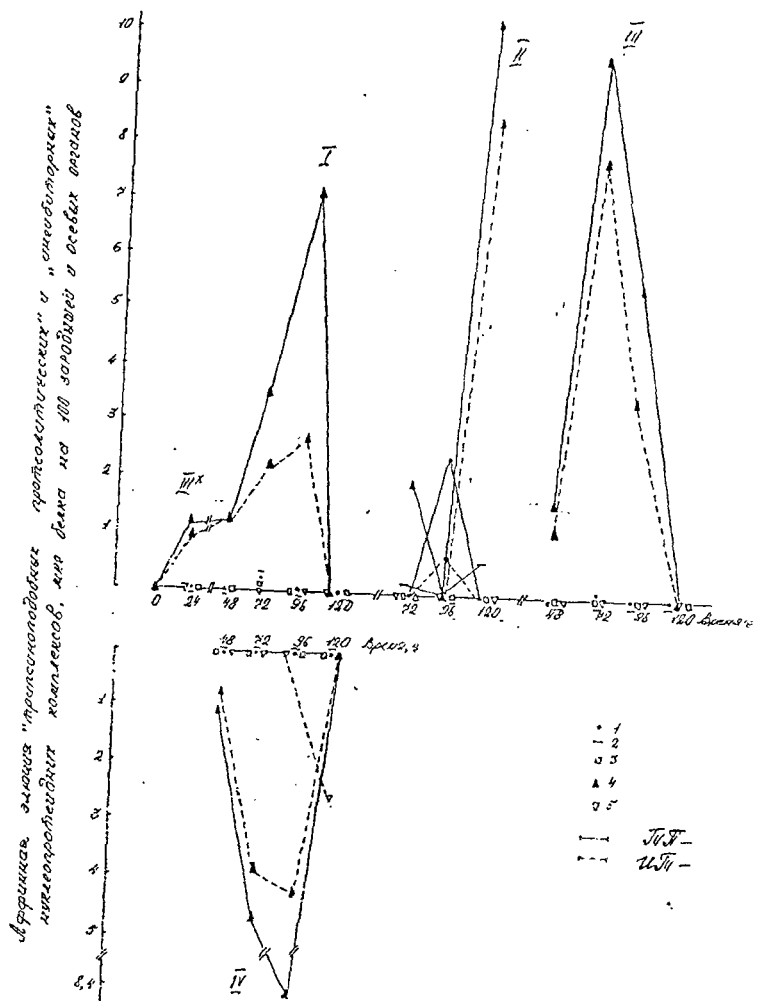


Рис. 7 Содержание трипсиноподобных протеолитических (ТП-) и ингибитор-трипсиновых (ИТ-) комплексов в ядерных фракциях растущих зародков пшеницы Московской-35 (суперэлита): 1-нуклеоплазма; 2-хроматин-I; 3-хроматин-II; 4-ядерный матрикс; 5-ядерный остаток; I-колесопаль; II-первый лист; III-междоузлие; IV-корневая система; III^x-покоящийся (0 ч) и проросший зародыш (24 ч)

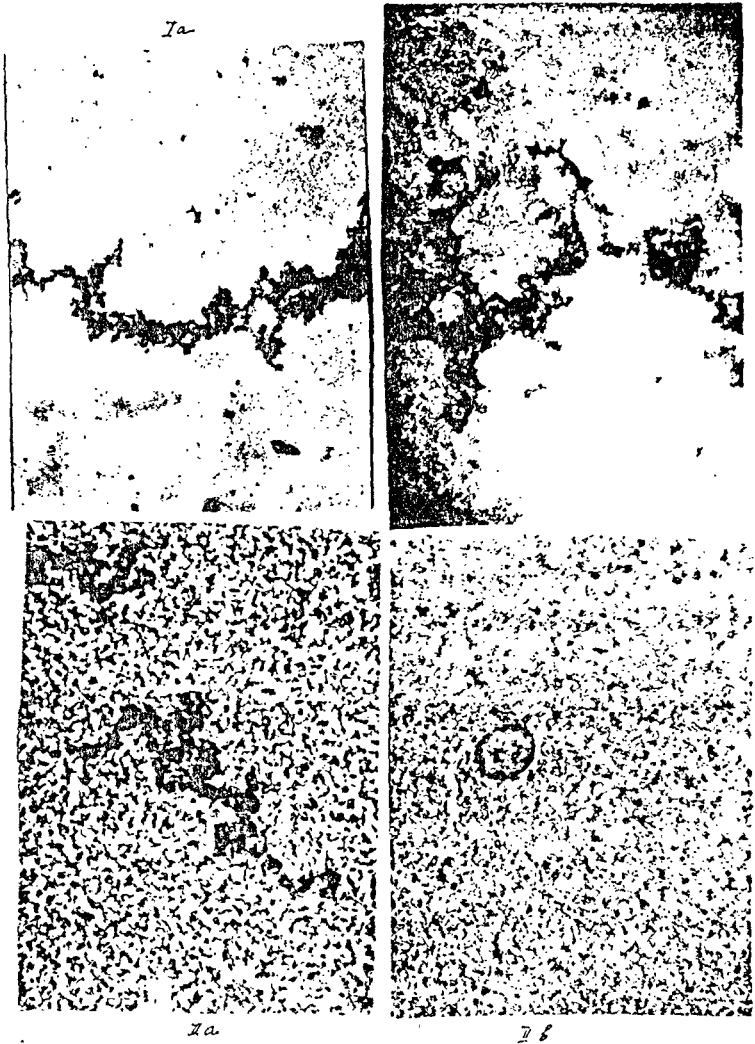


Рис. 8. Электронномикроскопический анализ (контрастирование уранилацетатом) трипсиноподобных (ТП-) (II а, в); выделенных на колонке с иммобилизованным ингибитором трипсина); ингибитор-трипсиновых комплексов (ИТ-) (I а, в); выделенных на колонках с иммобилизованным трипсином).
Общее увеличение на фотографии 85 000

протеолизируется трипсином. Фактически мы пока предприняли первые шаги на пути к электронномикроскопическому анализу рибонуклеопротеидных трипсиноподобных и ингибитортрипсиновых комплексов, ассоциированных с ядерным матриксом и проявляющих подвижную взаимосвязь с ним в процессе реализации морфогенеза в гетеротрофной фазе онтогенеза проростков пшеницы.

4. Анализ трипсиноподобных (ТП-) и ингибитортрипсиновых (ИТ-) комплексов ядерного матрикса постэмбрионального развития зародышей пшеницы Московской-35 (репродукция R-1)

На рис. 9 представлена схема биохимического анализа гетеротрофного ростового морфогенеза индивидуального развития зародышей пшеницы Московской-35 (семена урожая 1986 г.).

Содержание ТП- и ИТ- комплексов представлено на рис. 10. Как и в эксперименте представленном на рис.7, ТП- и ИТ- комплексы проявляют "морфогенезную подвижность", которая связана с динамикой содержания в них белковых компонентов. В данном эксперименте клеточные ядра выделяли из всех растущих органов проростков без учета их физиологических особенностей, проявляющихся в течение суток. То есть в эксперимент брали и медленно растущие проростки. Электрофоретическое исследование ТП- и ИТ- комплексов, представленное на рис. 11, выявило гетерогенность белкового состава в пределах ММ 67-57, 39-30, 30-20, 20-14 кДа. Такие же пределы ММ обнаруживают в составе гранулярных частиц, прикрепленных к ЯМ, известных как информатин [см.: Збарский, 1988]. Эти же пределы ММ обнаруживают на участках прикрепления ДНК к ЯМ [см.: Збарский, 1988]. Нужно отметить, что электрофоретически белки ЯМ разделяются на нечеткие полосы, создавая сильно мажущий фон, а часть белков даже не входит в 4% разделяющий слой геля. Мы предполагаем, что мажущий фон создают гликопротеиды. На животных тканях было доказано, что гликозаминогликаны скрепляют гранулярные структуры ЯМ [см.: Збарский, Кузьмина, 1991].

В настоящее время мы пока не можем сказать, какой из белков, входящих в состав ТП-, ИТ- комплексов, является истинной протеиназой или ее ингибитором. Анализ нуклеопротеидных комплексов на протеолитическую и ингибиторную активности, проведенный в сравнении с активностью трипсина и его ингибированием, показал, что ИТ- комплексы ЯМ 96 ч листьев проростков пшеницы ингибировали трипсин на ~75%, а собственные протеиназы - на ~24% от первичной активности.

Таким образом, в данной работе показано, что ТП-,

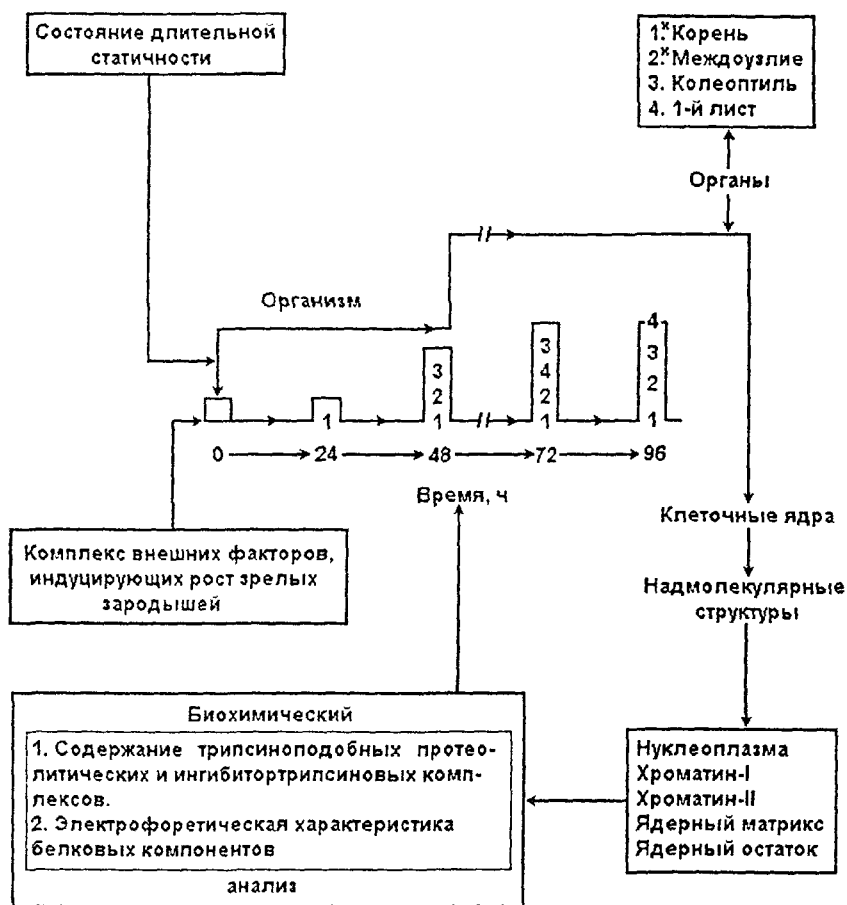


Рис.9. Схема биохимического анализа постэмбрионального развития зародышей пшеницы Московской - 35 (репродукция R - 1).

Примечание: * - не исследовали

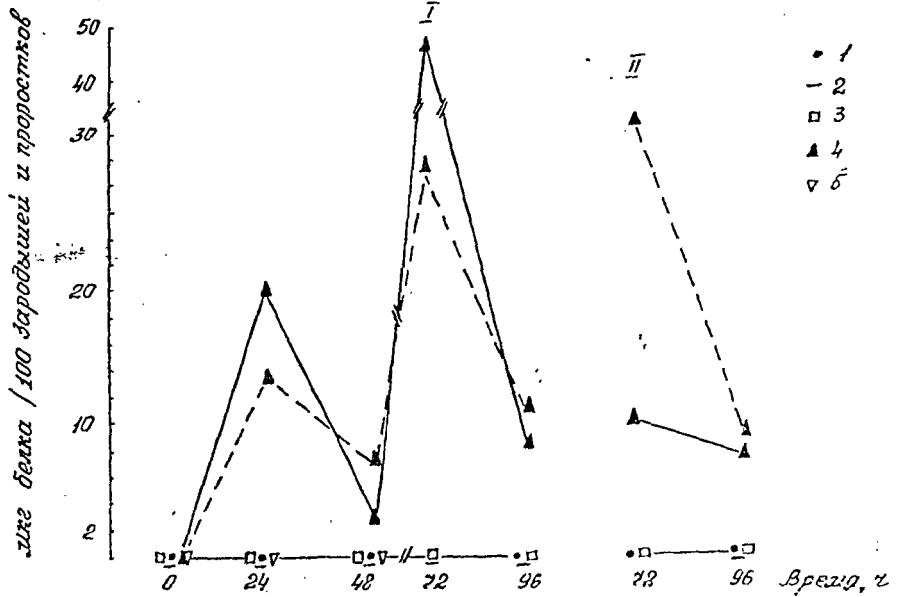


Рис. 10. Содержание трипсиноподобных (ТП-) (сплошная кривая) и ингибитортрипсиновых (ИТ-) (пунктирная кривая) комплексов в ядерном матриксе покоящихся (0 ч), проросших (24 ч) зародышей, проростков (48 ч); I-колеоптилей (72 ч, 96 ч); II-листьев (72 ч, 96 ч) пшеницы Московской-35 (репродукция Я-1). Определение белка выполнено по методу турбидиметрии. 1-нуклеоплазма; 2-хроматин; 3-хроматин-II; 4-ядерный матрикс; 5-ядерная оболочка.

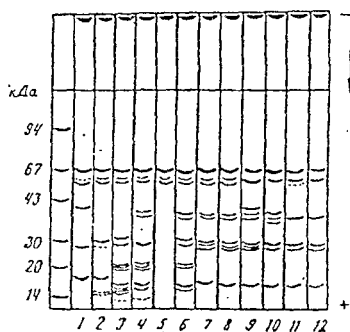


Рис. 11. Схема элетрофореграмм ТП-, ИТ- комплексов ЯМ (6 М гуанидин гидрохлорид + β -меркаптоэтанол). Элетрофорез проводили в токослойном градиентном полиакриламидном геле (9%, 25%, 4%) с додецилсульфатом натрия рН 8,37:

1. ИТ-комплексы 24 ч проростков;
2. ТП- -"-
3. ИТ-комплексы 48 ч проростков;
4. ТП- -"-
5. ИТ-комплексы 72 ч настоящих листьев (обработка хлороформом);
6. ТП-комплексы 72 ч первых настоящих листьев;
7. ИТ-комплексы 96 ч первых настоящих листьев;
8. ТП- -"-
9. ИТ-комплексы 72 ч колеоптилей;
10. ТП- -"-
11. ИТ-комплексы 96 ч колеоптилей;
12. ТП- -"-

ИТ- комплексы, главным образом, связаны с ЯМ. Причем - белковые компоненты с ММ от 43 до 14 кДа являются липидорастворимыми, а от 67 до 57 кДа липидонерастворимыми (рис. 11, N 5). Белки с ММ от 43 до 30 кДа обладают ДНК-аза защитным свойством, так как, в эксперименте с обработкой ИТ-комплексов ДНК-азой (Serva) при нагревании, ДНК-аза четко сохраняет свою зону, а в слоте без ИТ-комплексов она разрушается от предварительной тепловой обработки до нанесения в ее слот. Спектр белков ТП-, ИТ- комплексов ЯМ проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) имеет большое сходство со скаффолдом митотических хромосом (*Triticum monosocsum* L.), представленных в работе [Hadlazky et al., 1982].

6. Заключение

Предпринята первая попытка анализа молекулярно-генетических основ онтогенеза на примере постэмбриональной фазы роста и развития проростков пшеницы, начиная с покоящихся зародышей (0 ч), их ростом (24 ч→120 ч) и кончая выходом первого настоящего листа в условия автотрофного питания. Первичность этой попытки заключается в том, что в работе основное внимание обращено на координацию всех уровней биологической организации растущего организма: организм → орган → клеточное ядро, с описанием биохимических внутриядерных процессов, происходящих в надмолекулярных (нуклеоплазма, Хр-I, Хр-II, ЯМ) структурах. Предложенный методический подход биохимического анализа (рис. 1, 4, 9) позволил проследить за движением эндогенного ауксина по надмолекулярным структурам (рис. 3) клеточных ядер в течение дифференцированного роста проростков (рис. 1); провести анализ "включения" ограниченного протеолиза и его возможного ингибирования (рис. 4; 5), сделать предположение, что протеолитическая гидролитическая система *in vivo* может быть связана с генерированием активных форм кислорода (АФК) (рис. 6). Обнаружение "подвижных" трипсиноподобных (ТП-) и ингибитортрипсиновых (ИТ-) комплексов (рис. 7; 10) обращает внимание на взаимосвязь цитоскелетно-мембранных преобразований с ядерным матриксом с позиции молекулярных основ ростового морфогенеза гетеротрофной фазы онтогенеза. Данная работа представляет собой проект методического подхода к исследованию молекулярно-генетических основ постэмбрионального онтогенеза у растений, но может быть с успехом использована и при работе с животным объектом.

ВЫВОДЫ

1. Выявлена на уровне надмолекулярных структур (нуклеоп-

- лазмы, хроматина, ядерного матрикса) внутриядерная активность трипсиноподобных протеиназ и ингибитора трипсина.
2. Показана разобщенность трипсиноподобного ограниченного протеолиза в ядерном матриксе и хроматине.
 3. Выявлена общая пероксидазная активность на уровне надмолекулярных структур клеточных ядер.
 4. Показана связь общей пероксидазной активности с надмолекулярными структурами: нуклеоплазмой и хроматином клеточных ядер.
 5. В надмолекулярных структурах клеточных ядер иммуноферментным методом обнаружен эндогенный ауксин.
 6. Выделены из надмолекулярных структур клеточных ядер трипсиноподобные протеолитические (ТП-) и ингибитор-трипсиновые (ИТ-) комплексы методом аффинной хроматографии с иммобилизованным ингибитором трипсина и трипсином соответственно.
 7. Показана связь ТП-, ИТ- комплексов с ядерным матриксом.
 8. ТП-, ИТ- комплексы - гетерополимерные структуры, в состав которых входят: белок, ДНК, РНК, углеводы. По соотношению РНК/ДНК - это рибонуклеопротеидные структуры (РНП-структуры).
 9. Содержание ТП-, ИТ- рибонуклеопротеидных комплексов в ядерном матриксе коррелирует с физиологическими особенностями растущих проростков пшеницы.
 10. Показано, что электрофоретический белковый спектр ТП-, ИТ-комплексов находится в пределах от 67 до 18 кДа.
 11. Белки ИТ- комплексов с ММ от 43 до 14 кДа липидорастворимые.
 12. Белки ИТ-комплексов с ММ 67-57 кДа липидонерастворимые.
 13. Область белков от 43 до 30 кДа обладает ДНК-аза протекторным свойством.
 14. ТП-, ИТ- комплексы способны "связывать" эндогенный ауксин.
 15. Электронномикроскопический анализ по контрастированию с уранилацетатом выявляет в ТП-, ИТ- комплексах четкоподобные и розеткоподобные структуры.
 16. Взаимосвязанные с четкоподобными и розеткоподобными структурами сопутствующие "гранулярные" структуры ЯМ сохраняются в присутствии иммобилизованного ингибитора трипсина.
 17. Взаимосвязанные с четкоподобными и розеткоподобными структурами "гранулярные" структуры ЯМ протеолизуются в присутствии иммобилизованного трипсина.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. Негистоновые белки проростков пшеницы и кукурузы // Физиолого-биохимические основы формирования хозяйственно полезных признаков растений. Уфа, 1986. С.56-64.
2. Изучение модификации белков хроматина растений// Тезисы докладов всесоюзной конференции "Молекулярная биология генов высших организмов", Тез. докл.-М, 1987.- С. 16 (совместно с Ахметовым Р.Р.).
3. Активность протеиназ и их ингибиторов в клеточных ядрах проростков озимых и яровых пшениц// В кн.: Биохимические и физиолого-генетические основы гетерозиса и гомеостаза растений. Уфа, 1986. С. 56-61 (совместно с Давлетовой Р.Г.).
4. Модификация негистоновых белков в проростках растений// Физиология растений. - 1987.- Т.34.№ 3.-С. 507-512 (совместно с Ахметовым Р.Р.).
5. Новые подходы исследования системы хозяин - патоген// Применение достижений биотехнологии в народном хозяйстве. Уфа, 1987.-С.107-108 (совместно с Вафиной Г.Х., Ямалеевым А.М.).
6. Исследование функциональной роли белковых компонентов клеточных ядер при патогенезе пшеницы// Тезисы докладов на конференции: "Физиолого-биохимические основы иммунитета к грибным болезням растений", Уфа, 1988.-С.36 (совместно с Вафиной Г.Х., Ямалеевым А.М.).
7. Молекулярно-физиологические особенности развития сорта пшеницы Московской-35 восприимчивой к пыльной головне// 2-е Всесоюзное совещание "Физиолого-биохимические основы иммунитета растений к болезням и вредителям". Уфа, 1988 (совместно с Вафиной Г.Х.).
8. Исследование функциональной активности клеточных ядер при патогенезе пшеницы// Микология и фитопатология-1989.- Т.23.-№ 2.- С.141-146 (совместно с Вафиной Г.Х., Ямалеевым А.М.).
9. Участие ядерных ауксинсвязывающих белков в формировании онтогенетических адаптивных реакций пшеницы// Тезисы докладов на всесоюзной конференции: "Онтогенетика высших растений", Кишинев. 1989.-С.320-321 (совместно с Кудяровой Г.Р., Вафиной Г.Х.).
10. Иммуноферментный анализ гормонсвязывающих белков в "протеолитических" и "ингибиторных" комплексах проростков пшеницы//Тезисы докладов на Всесоюзной конференции молодых ученых, Уфа, 1989 (совместно с Вафиной Г.Х., Кудяровой Г.Р., Мустафиной А.Р.);
11. Применение иммуноферментного метода в исследованиях растительных ядерных белков//Тезисы докладов школы-семинара "Иммуноферментный анализ регуляторов роста растений. Применение в физиологии растений и экологии", Уфа, 1990, С.104-116 (совместно с Кудяровой Г.Р., Вафиной Г.Х.).

2. Методика выделения протеиназ и ингибиторов из клеточных ядер проростков пшеницы// Физиология растений. - 1990. Т.37. №3. - С.609-616 (совместно с Вафиной Г.Х.).
3. Роль ядерных протеиназ и их ингибиторов в функциональной активности клеточных ядер прорастающих семян пшеницы// Тезисы докладов: на X Всесоюзном симпозиуме "Структура и функции клеточного ядра", Гродно, М., 1990. - С.138 (совместно с Вафиной Г.Х.);
4. Proteinases of nuclei and their role in the plant cellular nuclei function// 20-th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, Budapest, 1990. P.421 (совместно с Вафиной Г.Х.).
5. Функциональная активность клеточных ядер при патогенезе пшеницы// Тезисы докладов на 2-ом Всесоюзном съезде Общества физиологов растений, Минск, 1990. - С.36 (совместно с Вафиной Г.Х., Ямалеевым А.М.).
6. Возможность участия ядерных протеиназ и их ингибиторов в молекулярно-генетических механизмах клеточной адаптации у растений//Тезисы докладов на 3-ем Всесоюзном симпозиуме "Клеточные механизмы адаптации", Киев, Чернигов. 1991. "Цитология". N 6. - С. 8 (совместно с Вафиной Г.Х.).
7. Способ выделения растительных клеточных ядер. Авторское свидетельство N 1701747 // Би. 1991. N 48. - С. 93 (совместно с Вафиной Г.Х.).
8. Формирование антиоксидантной системы как адаптивной реакции на уровне морфогенетических программ развития проростков пшеницы//Тезисы докладов на IV Всесоюзной конференции "Экологическая генетика растений, животных, человека", Кишинев, 1991 (совместно с Вафиной Г.Х.).
9. Анализ ядерных "протеолитических" и "ингибиторных" комплексов в процессе прорастания семян пшеницы// Физиология растений. - 1991. Т.38. №3. - С.574-579 (совместно с Вафиной Г.Х.);
0. Molecular-genetic and biochemical approaches to study of early stages of plant ontogenesis// 15-th International Congress of Biochemistry, Israel. 1991. nr.663 (совместно с Вафиной Г.Х.).
1. The role of nuclear proteinases and their inhibitors in the early of unfolding of genetic programmes during development in wheat seedlings// Therd International Congress of Plant Molecular Biology. USA. 1991 (совместно с Вафиной Г.Х.).
2. Физиолого-биохимический анализ интерфазных ядер в процессе прорастания семян пшеницы// Физиология и биохимия культурных растений. 1992. Т.24. №6. - С.577-584 (совместно с Вафиной Г.Х.).
3. Способ получения ядерных фракций обладающих протеиназной и ингибирующей активностью. Авторское свидетельство N

- 1733471//БИ.1992. Т.18. С.96 (совместно с Вафиной Г.Х.).
24. Молекулярно-генетические основы онтогенеза растений//Тезисы докладов VI Съезда Общества генетиков и селекционеров им. Н.И.Вавилова. Авторский указатель, ч.1.-С.12. Минск. 1992 (совместно с Вафиной Г.Х.).
 25. Молекулярные механизмы адаптации и устойчивости надмолекулярных структур клеточных ядер в процессе прорастания семян пшеницы//3-й Всероссийский съезд физиологов растений. С-Петербург. 1993. Т.6.-С.587 (совместно с Вафиной Г.Х.).
 26. Структурная и временная организация клеточных ядер при разворачивании метаболических процессов прорастания семян пшеницы// 3-й Всероссийский съезд физиологов растений. С-Петербург. 1993. Т.2.-С.113 (совместно с Вафиной Г.Х., Бикбулатовой И.Э.).
 27. Функциональная активность надмолекулярных структур клеточных ядер в процессе разворачивания морфогенетической программы развития проростков пшеницы// 3-й съезд физиологов растений. С-Петербург. 1993. Т.2.-С.114 (совместно с Вафиной Г.Х., Бикбулатовой И.Э.).
 28. Динамика содержания эндогенного ауксина клеточных ядер в процессе разворачивания морфогенетической программы развития прорастающих семян пшеницы//2-я конференция "Регуляторы роста и развития с.-х. растений". М., 1993.-С.27 (совместно с Вафиной Г.Х., Кудояровой Г.Р.).
 29. Онтогенетическая модель для оценки экологической безопасности и механизма действия химических регуляторов роста// Тезисы докладов на 2-й конференции "Регуляторы роста и развития с.-х. растений". М., 1993.-С.3 (совместно с Вафиной Г.Х., Бикбулатовой И.Э.).
 30. Возможность конформационных перестроек надмолекулярных структур клеточных ядер при участии ядерных протеиназ //Цитология. 1993. N 6.-С.73 (совместно с Вафиной Г.Х.).
 31. The use of immunoassay for detecting endogenic auxins of cellular nuclei of wheat seedlings// Biology. 1994. N 1. P.78-79 (совместно с Вафиной Г.Х.).
 32. Возможность пространственно-временной организации метаболонов в хроматине клеточных ядер при индукции ростовых процессов у растений// Генетика. 1994. Т.30.- С.58-59 (совместно с Вафиной Г.Х., Бикбулатовой И.Э.).
 33. Molecular and genetic bases of wheat seed dormancy and germination. 9-th Congress FESPP. Brno. 1994 (совместно с Вафиной Г.Х., Бикбулатовой И.Э.).
 34. Analysis of molecular mechanism of the plant-pathogen system. International Plant Protection Congress. Hague. 1995. nr.:3011/0451 (совместно с Вафиной Г.Х., Бикбулатовой И.Э., Чернышевой Е.Э.).

35. Использование иммуноферментного метода для обнаружения эндогенного ауксина в клеточных ядрах проростков пшеницы. Известия РАН, Серия биологическая. 1995. N 2. С. 252-253 (совместно с Вафиной Г.Х., Кудяровой Г.Р.).
36. Analysis of molecular mechanisms of fungus-plant interaction in the root system of wheat seedlings// 8-th International Congress of Mycology Division. Israel. 1996 (совместно с Вафиной Г.Х., Чернышевой Е.Э.).
37. Molecular-genetic basis of development of wheat seedlings organs. 10-th FESPP Congress. Italy. 1996 (совместно с Вафиной Г.Х.).
38. Biochemical analysis of functional activity of cell nuclei of growth morphogenesis of heterotrophic phase of wheat ontogenesis. Всероссийский симпозиум по "Физико-химическим основам физиологии растений". Пенза, 1996 (совместно с Вафиной Г.Х.).
39. Физиологическая роль пероксидазной активности клеточных ядер на ранних этапах онтогенеза растений пшеницы// Физиология и биохимия культурных растений. 1997. Т.29. 2. С.129-132 (совместно с Вафиной Г.Х.).
40. Выявление эндогенного ауксина в субъядерных фракциях прорастающих семян пшеницы // Цитология. 1997. Т.39. 1. С.65 (совместно с Вафиной Г.Х.).