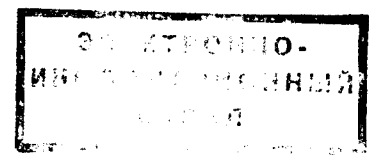


546
Г85

А



На правах рукописи

А/м

ГРИНЬЛАТ АНТОН ИОСИФОВИЧ

**РАЗРАБОТКА БИОИНФОРМАЦИОННОЙ МОДЕЛИ
АПОПТОЗА И НЕКРОЗА У РАСТЕНИЙ**

03.00.23 – Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Орел – 2007



А

биот
унив

регионального центра
привлеченный аграрный

А.И.
Биоин-
ль Ефимовна

и нек
2 и нек
ких наук, профессор
др Абдуллаевич;

Б/м
заявленных наук,
и Иосифович

ийский научно-
институт
пленных культур

часов на заседании
У ВПО «Орловский
у: 302019, г. Орел,

иотеке Орловского

мреля 2007г.

Т.Ф. Макаева
Макаева Т.Ф.

А

3

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. До изобретения компьютеров изучение биологических явлений основывалось на экспериментах in vivo и in vitro. С появлением и развитием ЭВМ, компьютерный анализ превратился в самостоятельную область науки – биоинформатику. Исследования in silico, то есть в компьютере, уже привели ко многим важным достижениям биоинформатики.

Представляемая работа посвящена разработке биоинформационной системы на базе результатов собственного эксперимента, связанного с различными формами клеточной гибели в растениях, такими как некроз и апоптоз.

У растений относительно давно доказано существование запрограммированной гибели клеток (ЗГК), в том числе и апоптоза. Однако изучение ЗГК растений до сих пор слабо развито из-за малого удельного веса биохимии растений в естественных науках и сильного перевеса активности исследований в области ЗГК животных и человека. Изучение апоптоза у растений – относительно новая и потому еще слабо наполненная данными область науки. До недавнего времени существование запрограммированной гибели клеток часто не только игнорировали, но иногда и вовсе не признавали, подобно тому, как существование биологических часов и генов смерти вообще считались абсурдным и это также является причиной неполноты данных в области ЗГК вообще и апоптоза у растений в частности. Исследование механизмов старения и гибели клетки откроет возможность управления временем жизни и создания препаратов-фитоиммуномодуляторов направленного действия.

Цель и задачи исследований. Цель работы – разработать биоинформационную модель апоптоза и некроза растений на примере пшеницы и гороха.

Задачи:

1. Исследовать антиоксидантную систему пшеницы и гороха в норме, при апоптозе и при некрозе.
2. Исследовать влияние апоптоза и некроза на фрагментацию ДНК методом ПЦР-анализа.
3. Установить влияние биотических факторов на проявления апоптоза и некроза у пшеницы и гороха.
4. Установить влияние абиотических факторов на проявления апоптоза и некроза у пшеницы и гороха.
5. Установить влияние апоптоза и некроза на состав белков пшеницы и гороха.

А

6. На основе полученных данных идентифицировать тип клеточной гибели в опадающих плодозлементах люпина.
7. Разработать компьютерный программный комплекс для администрирования и обработки собственных экспериментальных данных.
8. Создать биоинформационную модель апоптоза и некроза пшеницы и гороха.

Научная новизна работы. Впервые на примере растений проведен достаточно широкоспектральный динамический биохимический анализ процессов естественного и индуцированного апоптоза и некроза, вызванного как биотическими, так и абиотическими факторами. Впервые на основе корреляционного и дифференциального анализа построена биоинформационная модель апоптоза и некроза растений.

Практическая значимость работы. Изучение механизмов запрограммированной и спонтанной гибели клеток растения и базированная на полученных данных разработка средств управления обеими формами гибели клеток растения имеют крайне важное значение как для фундаментальной, так и для прикладной биотехнологии. Контроль над некрозом и апоптозом позволит повышать устойчивость растений к патогенам, увеличивать урожайность сельскохозяйственных культур, бороться с сорной растительностью, ускорять или увеличивать синхронность созревания урожая, обеспечит возможность управлять длительностью вегетационного периода и упростит работу селекционеров.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены на научно-методической конференции “Физиологические аспекты продуктивности растений”, Орел 2004; на 2 съезде Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Москва, 2004, на 4 съезде Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Пушкино, 2006 и на конференции, посвященной 40-летию отдела биохимии и молекулярной биологии ВИР им. Н.И. Вавилова, С.-Петербург, 2007.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 работ, в том числе 1 патент на изобретение.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 156 листах компьютерного текста, 88 страницах приложений и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, предложений производству, списка литературы, включающего 58

отечественных и 93 иностранных источников. Работа иллюстрирована 79 таблицами и 146 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Диссертационная работа выполнена в период с 2003 по 2006 гг. в рамках программы 04.02.01 РАСХН: “Разработать новые эффективные методы оценки мирового разнообразия культурных растений по признакам качества, устойчивости к неблагоприятным абиотическим факторам среды, болезням и вредителям”.

Экспериментальная работа проводилась на базе Орловского регионального центра биотехнологии ФГОУ ВПО «Орловский государственный аграрный университет».

Материалом исследований являлись образцы пшеницы, гороха и люпина селекции ВНИИ ЗБК. Схема эксперимента представлена на рис. 1 на следующей странице.

Активность супероксиддисмутазы определяли фотохимическим методом (C.N. Giannopolities, S.K. Ries, 1977) на приборе, разработанном автором (патент № 2293969); активность пероксидазы – спектрофотометрическим методом по Бояркину (А.И. Ермаков, 1983); активность каталазы – волюмометрическим методом (А.И. Ермаков, 1983). Все методы анализа активностей ферментов были модифицированы.

Концентрации витамина С и глутатиона определяли методом Петта в модификации Прокошева (Н.Н. Третьяков, 1990).

Для определения концентрации токоферола была использована объединенная спектрофотометрическая методика (ГОСТ 30417-96, 1996 и www.sibpatent.ru, 2006).

Анализ белковых фракций проводили методом SDS-ПААГ электрофореза (А.В. Конарев и др. 2000); анализ ДНК – методом ПЦР в модификации; статистическую обработку результатов проводили методами дисперсионного анализа с использованием компьютерных программ «Excel», «Biotest-D» и собственного программного комплекса соискателя (разд. 9).

Биоинформационная модель была построена с помощью встроенных в «Excel» функций статистической обработки данных.