

Expression of isozyme genes encoding glucosephosphate isomerase (GPI) and alcohol dehydrogenase (ADH) in nongerminated sugar beet seeds treated by Triton X-100 (TX-100) and colchicine was studied. Two types of changes: changing of electrophoretic mobility of isozymes and inactivation/activation of normal isozyme patterns were revealed. It was supposed that differences of GPI and ADH isozyme pattern reactions on TX-100 and colchicine are associated with different subcellular localization of these enzymes.

ЛЕВИТЕС Е.В., КИРИКОВИЧ С.С.

Институт цитологии и генетики СО РАН,

Россия, 630090, Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 10, e-mail: levites@bionet.nsc.ru

НАСЛЕДУЕМЫЙ ЭФФЕКТ ВОЗДЕЙСТВИЯ ТРИТОНА X-100 НА ЭКСПРЕССИЮ ЛОКУСА *Gpi2* У САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Взросший интерес к исследованию эпигенетической изменчивости делает необходимым изучение молекулярных и биохимических процессов, лежащих в основе этого явления. В сформировавшихся к настоящему времени представлениях о возможных механизмах эпигенетической изменчивости большая роль отводится взаимодействию хромосом с ядерной мембраной и ядерным матриксом. Согласно гипотезе о многомерности кодирования наследственной информации у растений ядерная мембрана и ядерный матрикс участвуют в детерминации генотипа клетки, вступающей в эмбриогенез [1, 2]. Из этой гипотезы следует, что воздействие на ядерную мембрану может привести не только к изменению экспрессии генов, но и к проявлению эффекта воздействия в следующих поколениях. Действительно, было показано, что прорастание семян сахарной свеклы на среде, содержащей детергент Тритон X-100 (TX-100), приводит к изменению динамики прорастания семян и к последующему изменению морфологических признаков листа и корня растения [3, 4]. Для дальнейшей проверки этой гипотезы представляло интерес оценить влияние детергента TX-100, способного нарушать связь хромосом с ядерной мембраной, на экспрессию ферментных генов. Преимущество изоферментов как маркеров обусловлено простотой их выявления, а также тем, что они являются непосредственными продуктами генной активности.

Поскольку TX-100 является детергентом, представляет интерес анализ ферментов, связанных с мембранами и субклеточными органеллами, и сравнение получаемых данных с результатами исследования ферментов, локализованных в растворимой части цитоплазмы. К ферментам, удобным для проведения такого рода исследований, относится, например, глюкозофосфатизомераза (GPI), представленная изоферментами, локализующимися как в растворимой части цитоплазмы, так и в органеллах [5, 6]. Известно, что изоферменты GPI, локализованные в растворимой части цитоплазмы,

могут при определенных функциональных состояниях клетки связываться с мембранами органелл [6]. К ферментам, которые локализованы в растворимой части цитоплазмы и не связаны с органеллами, относится, например, алкогольдегидрогеназа (ADH) [7].

Целью настоящего исследования явилось изучение экспрессии локуса *Gpi2*, кодирующего фермент глюкозофосфатизомеразу, и локуса *Adh1*, кодирующего алкогольдегидрогеназу, в семенном потомстве растений сахарной свеклы, обработанных TX-100.

Материалы и методы

В качестве исходного материала были взяты семена, полученные в 1998 г. путем саморепродукции от способного к агамоспермному размножению растения сахарной свеклы №8–3. Часть семян этого растения использовались для получения контрольных растений; эти семена замачивали в дистиллированной воде в чашках Петри в термостате при 29 °С. Опытные растения выращивали из второй части семян этого растения; их замачивали в 0,1% растворе TX-100 в течение 18 часов при температуре 29 °С. От контрольных и обработанных детергентом TX-100 растений сахарной свеклы в 2009 г. были получены семена путем саморепродукции под бязевыми изоляторами.

В качестве маркерного признака были взяты изоферментные спектры глюкозофосфатизомеразы (GPI, E.C.5.3.1.9), контролируемые локусом *Gpi2*, и алкогольдегидрогеназы (ADH, E.C. 1.1.1.1.), контролируемые локусом *Adh1* [8, 9]. Контрольные и опытные родительские растения имели одинаковый генотип по маркерным ферментным локусам: *Gpi2-S/Gpi2-S*, *Adh1-F/Adh1-F*. Электрофоретический анализ проводили на индивидуальных семенах в крахмальном геле по методам, описанным ранее [10]. Сканирование электрофореграмм проводили при помощи прибора Biodoc.

Результаты и обсуждение

Глюкозофосфатизомераза (GPI) — фермент, участвующий в гликолизе. По своей структуре GPI — димерный фермент. У сахарной свеклы GPI представлена на электрофореграммах в виде двух анодных зон ферментативной активности GPI1 и GPI2. Полиморфизм и генетический контроль изучен для медленномигрирующей зоны (GPI2); установлено, что она контролируется локусом *Gpi2*, имеющим два аллеля [8]. У гомозигот эта зона представлена либо быстромигрирующим изоферментом (FF-фенотип), либо медленномигрирующим — (SS-фенотип).

В данной работе анализировали изоферментные спектры GPI2. Среди выявленных в опытных семенах изоферментных спектров GPI2 к стандартным фенотипам SS можно отнести спектры образцов 1, 3–7, 9 (рис. 1). К модифицированным относили спектры 2 и 8 (рис. 1), напоминающие стандартный гетерозиготный спектр, но имеющий меньшую, по сравнению со стандартным спектром, электрофоретическую подвижность. Модифицированный спектр включает в себя гомодимеры SS, состоящие из нормальных субъединиц, гомодимеры S^MS^M, состоящие только из измененных субъеди-

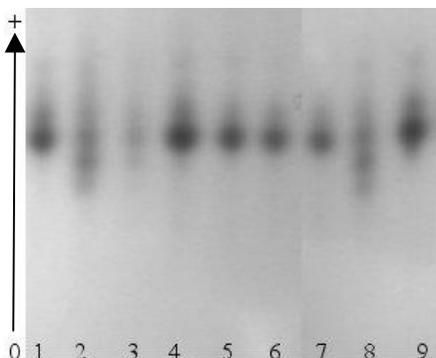


Рис. 1. Типы изоферментных спектров глюкозофосфатизомеразы-2 (GPI2) в семенах сахарной свеклы. 1, 3–7, 9 — гомозиготы *Gpi2-S/Gpi2-S* со стандартным фенотипом; 2, 8 — гомозиготы *Gpi2-S/Gpi2-S* с модифицированными изоферментами. (0) — старт, (+) — анод

ниц, а также гетеродимеры SS^M , включающие в себя нормальную и измененную субъединицы и обладающие промежуточной электрофоретической подвижностью. Частота появления модификаций в опытных партиях была следующей: в семенном потомстве растения №5 из 42 проанализированных семян в 7 был выявлен измененный спектр, в потомстве растения №6 из 4 семян в 1 был измененный спектр, в потомстве растения №7 из 5 семян ни у одного не было выявлено измененного спектра, а в потомстве растения №8 из 49 семян в 7 был измененный спектр. Таким образом, в 100 проанализированных опытных семенах число выявленных изменений спектра равно 15. В контрольной партии, состоящей из 73 семян, полученных от четырех контрольных растений, было выявлено лишь одно семя с измененным спектром GPI2. Выявленные различия между опытной и контрольной партиями семян достоверны; величина G-критерия составила 9,9652 ($P < 0,01$). Эти различия указывают на то, что изменения, вызываемые у растений под воздействием TX-100, передаются в следующее поколение. Способность TX-100 нарушать связь белков с мембранами и вызывать изменения в функционировании мембран позволяет предположить, что в данном случае мишенью для TX-100 могли бы быть как ядерные мембраны и, соответственно, организация хромосомных участков, взаимодействующих с ядерной мембраной. Мишенью могли бы быть также и мембраны органелл, воспроизводящие эти изменения при каждом клеточном делении, однако исследуемый нами спектр GPI2 аналогичен спектрам, принадлежащим растворимой части цитоплазмы и выявленным у других видов растений. Это позволяет предположить, что наблюдаемые нами изменения спектра GPI2 обусловлены воздействием TX-100 на ядерную мембрану, а не на мембраны органелл. Сохранение эффекта воздействия в следующем поколении указывает на то, что ядерная мембрана вносит свой вклад в передачу наследственной инфор-

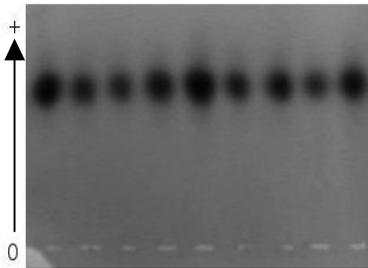


Рис. 2. Типы изоферментных спектров алкогольдегидрогеназы (ADH) в семенах гомозиготного растения сахарной свеклы генотипа *Adh1-F/Adh1-F*. (0) — старт, (+) — анод

мации. Следует отметить, что влияние TX-100 на изоферментные спектры GPI2 проявляется и в непосредственно обработанных семенах, но в этих случаях изменения спектра носят другой характер.

Алкогольдегидрогеназа (ADH) находится у растений в растворимой фракции цитоплазмы [7]. У большинства изученных видов растений ADH контролируется не менее чем двумя локусами: *Adh1* и *Adh2*. Для сахарной свеклы до недавнего времени было показано существование лишь локуса *Adh1*, а четких доказательств наличия продуктов второго локуса (*Adh2*) в литературе не было. В наших исследованиях, проведенных на сахарной свекле, выявлены изоферментные спектры ADH, позволяющие предположить наличие у данного вида растений локуса *Adh2* [11].

У 100 опытных и 73 контрольных семян не было выявлено каких-либо изменений спектра алкогольдегидрогеназы (рис. 2). Этот факт может быть объяснен, по-видимому, тем, что район гомологичных хромосом, содержащий локус *Adh1*, в момент воздействия Тритоном X-100 имел меньшее взаимодействие с ядерной мембраной, чем, например, район хромосом, содержащий локус *Gpi2*. Участки хромосом, слабо взаимодействующие с ядерной мембраной, могут быть менее подвержены изменениям при действии факторов, влияющих на мембраны. Обнаруженные различия во влиянии TX-100 на экспрессию генов *Gpi2* и *Adh1* могут быть обусловлены различиями в организации участков хромосом, несущих эти гены, и различиями во взаимодействии этих участков с ядерной мембраной в момент воздействия TX-100.

Выводы

Эффект воздействия неионного детергента TX-100 на растения сахарной свеклы может передаваться в следующее поколение и проявляться как изменение экспрессии ферментного локуса *Gpi2*, появление модифицированных изоферментных спектров GPI2. Проявление эффекта воздействия TX-100 в последующем поколении указывает на роль ядерной мембраны в передаче наследственной информации.

Работа финансировалась грантом № 99 по интеграционному проекту СО РАН 2009–2011 гг.

Литература

1. Levites E.V. Sugarbeet plants produced by agamospermy as a model for studying genome structure and function in higher plants // Sugar Tech.— 2005.— Vol.7, №2/3.— P. 67–70.
2. Levites E.V. Marker enzyme phenotype ratios in agamospermous sugarbeet progenies as a demonstration of multidimensional encoding of inherited information in plants // on-line 2007: <http://arxiv.org/abs/q-bio/0701027>.
3. Кирикович С.С., Левитес Е.В. Эпигенетическая изменчивость у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.), индуцированная Тритоном X-100 // Фактори експериментальної еволюції організмів (Збірник наукових праць). Київ: “Логос”.— 2009.— Т.7.— С. 95–99.
4. Kirikovich S.S., Levites E.V. Effect of epimutagen Triton X-100 on morphological traits in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) // Sugar Tech.— 2009.— Vol.11, №3.— P. 307–310.
5. Weeden N.F., Gottlieb L.D. The genetics of chloroplast enzymes // The J. of Heredity.— 1980.— Vol.71.— P. 392–396.
6. Graham J.W.A., Williams T.C.R., Morgan M. et al. Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling // The Plant Cell.— 2007.— Vol.19.— P. 3723–3738.
7. Scandalios J.G. Genetic control of alcohol dehydrogenase isozymes in maize // Biochem. Genet.— 1967.— Vol.1, №1.— P. 1–9.
8. Smed E., Van Geyt J.P.C., Oleo M. Genetical control and linkage relationships of isozyme markers in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Theor. Appl. Genet.— 1989.— Vol.78.— P. 97–104.
9. Малецкий С.И., Коновалов А.А. Наследование алкогольдегидрогеназы у сахарной свеклы. Сообщение 1. Анализ отклонения от моногенного расщепления // Генетика.— 1985.— Т.21, №9.— С. 1527–1540.
10. Левитес Е.В. Генетика изоферментов растений.— Новосибирск: Наука, 1986.— 144 с.
11. Кирикович С.С., Левитес Е.В. Влияние Тритона X-100 и колхицина на экспрессию ферментных генов в непрорастающих семенах сахарной свеклы // Фактори експериментальної еволюції організмів (Збірник наукових праць). Київ: “Логос”.— 2010 (Данное издание).

Резюме

Показано, что воздействие неионного детергента Тритона X-100 (TX-100) на растения сахарной свеклы может проявляться в следующем поколении как изменение экспрессии ферментного локуса *Gpi2*, а именно, как появление модифицированных изоферментных спектров GPI2. Проявление воздействия TX-100 в последующем поколении указывает на роль ядерной мембраны в передаче наследственной информации.

It was shown that action of nonion detergent Triton X-100 (TX-100) on sugar beet plants can manifest in the next generation as changing of expression of enzyme locus *Gpi2* that is in appearance of modified isozyme patterns of GPI2. Manifestation of effect of TX-100 influence in the next generation points to the role of nuclear membrane in descent of hereditary information.

**МОРГУН² Б.В., ЛЕВЧУК¹ О.Б., РУМЯНЦЕВА³ А.Є., ЮЗВЕНКО¹ Л.В.,
ЛОЗОВА¹ О.Й., ДІДЕНКО¹ Л.Ф., КУЧУК² М.В., СПІВАК¹ М.Я.**

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 154

²Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148,
e-mail: btorgun@gmail.com

³Національний технічний університет України “КПІ”, Факультет біотехнології
і біотехніки України, 03056, м. Київ, проспект Перемоги, 37

КЛОНУВАННЯ ТА АНАЛІЗ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ГЕНОМНОЇ РНК ВІРУСУ ОПІКУ ГРЕЧКИ

Вірус опіку гречки (ВОГ) був відкритий на гречаних полях біля міста Кам’янець-Подільська. Симптоматично захворювання викликає некротичні плями на листі гречки і призводить до втрат 80% врожаю [1].

За морфологічними ознаками, білковим, ліпідним та вуглеводним складом ВОГ можна віднести до родини Rhabdoviridae. Родина рабдовірусів включає в себе велику кількість вірусів, які вражають широке коло рослин, тварин та комах. Для цих вірусів характерна бацилоподібна форма, біліпідна та глікопротеїнова оболонка, наявність 5 білків та мінус РНК, що складає геном [6].

Надзвичайно цікавим та актуальним є визначення послідовності геномної нуклеїнової кислоти нового вірусу для більш точної його класифікації та розробки дієвих заходів боротьби із захворюванням.

Матеріали і методи

Вірус виділяли з листя інфікованих рослин *Nicotiana rustica* за допомогою ультрацентрифугування [2]. Вірусну геномну РНК отримували методом фенольно-хлороформної депротеїнізації [3]. Проводили ДНК-зну обробку (Dvase I, Fermentas) із застосуванням інгібіторів РНКаз (RiboLock™ RNase Inhibitor, Fermentas).

За допомогою Генетичного банку (GenBank®, NCBI) та програми ClustalW (<http://www.clustal.org/>) були підібрані праймери. При цьому порівнювались геноми фіторабовірусів, які є найкраще вивченими на сьогоднішній день — 4 нуклеорабовіруси (вірус жовтої сітчатості осоту (L32603), вірус тонкої смугастості кукурудзи (AY618417), вірус жовтої затримки росту рису (AB011257), вірус мозаїки кукурудзи (AY618418)) та 3 циторабовіруси (вірус північної мозаїки злаків (AB030277), вірус зморшкватості суниці (AY005146), вірус некротичного пожовтіння салату-латуку (AJ867584)).

Порівняння найбільш консервативних нуклеотидних послідовностей мотивів А, В, С та D домену III РНК-залежної РНК-полімерази вказаних вірусів дало змогу скомпонувати 5 праймерів. Вони обиралися на ділянках починаючи з 2000 по 11600 нуклетидів на геномах фіторабовірусів. Довжина перших чотирьох праймерів складала 26 нуклеотидів, з них 20 нуклеотидів на 5'-кінці були однаковими для всіх праймерів, тільки п’ятий (pr18)