

КИРИКОВИЧ С.С., ЛЕВИТЕС Е.В.

Институт цитологии и генетики СО РАН,

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

ВЛИЯНИЕ ТРИТОНА X-100 И КОЛХИЦИНА НА ЭКСПРЕССИЮ ФЕРМЕНТНЫХ ГЕНОВ В НЕПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЕНАХ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Всхожесть семенных партий и, соответственно, доля непрорастающих семян зависит от генотипа исследуемой формы и условий прорастания. Непроросшее семя не имеет никаких отличительных признаков по сравнению с потенциально способными к прорастанию, но не проросшими семенами. Наиболее приемлемый путь изучения непроросшего семени — анализ у него биохимических и молекулярных признаков. Надежными и удобными биохимическими маркерами являются изоферменты [1, 2], позволяющие идентифицировать в потомствах гетерозиготных растений все теоретически возможные фено- и генотипические классы.

Для изучения непрорастающих семян целесообразно использовать одну и ту же генетическую форму, проращивая её в разных условиях. Менять условия можно, воздействуя на прорастающие семена веществами, дающими известный биологический эффект. К таким веществам относятся, например, колхицин [3, 4] и Тритон X-100 (ТХ-100) [5, 6]. Колхицин, вызывает увеличение содержания ДНК в клетке и связанные с этим наследуемые изменения многих признаков у растений [3], но уменьшает прорастание семян и жизнеспособность растений [4]. ТХ-100 способен снижать прорастание семян пшеницы и вызывать у обработанных растений морфологические изменения, наследуемые в половых поколениях [5]. В исследованиях, проведенных на сахарной свекле, было показано, что воздействие ТХ-100 на семена сахарной свеклы приводит к изменению динамики их прорастания и к последующему изменению морфологических признаков листа и корня [6]. Хотя в предварительных экспериментах, проведенных на сахарной свекле, не было отмечено уменьшения под влиянием ТХ-100 прорастания семян, но было выявлено уменьшение жизнеспособности обработанных растений (не опубликовано). Из этого факта можно сделать вывод о том, что не все возникающие под действием ТХ-100 изменения проявляются сразу же, но значительная их часть проявляется в последующие периоды развития растения.

Поскольку ТХ-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 таким ферментам растений, относится, например, глюкозофосфатизомераса (GPI), которая представлена изоферментами, локализуясь как в растворимой части цитоплазмы, так и в органеллах [7]. Известно, что изоферменты GPI, локализованные в растворимой части цитоплазмы, могут при определенных функциональных состояниях клетки связываться с мембранами органелл [8]. В то же время

представляет интерес исследовать влияние TX-100 на ферменты растений, которые локализованы в растворимой части цитоплазмы и не связаны с органеллами, например, алкогольдегидрогеназу (ADH) [9]. Целью настоящего исследования было изучение индивидуального и совместного воздействия TX-100 и колхицина на экспрессию ферментных генов GPI и ADH в непрорастающих семенах сахарной свеклы.

Материалы и методы

В анализ были взяты гибридные семена, полученные от опыления растения сахарной свеклы (№3) пыльцой растения красной столовой свеклы. В качестве маркерных признаков были взяты изоферментные спектры глюкозофосфатизомеразы (GPI, E.C.5.3.1.9) и алкогольдегидрогеназы (ADH, E.C.1.1.1.1), контролируемые соответственно локусами *Gpi* и *Adh* [2, 10]. Материнское растение №3 имело генотип: *Gpi2-F/Gpi2-S* и *Adh1-F/Adh1-S*, а отцовское растение — *Gpi2-F/Gpi2-F* и *Adh1-F/Adh1-F*. Поэтому в анализируемом семенном потомстве выявлялось по два фенотипических класса каждого фермента: FF и FS.

Проращивание семян проводили в термостате при 29 °С. Было проведено 4 варианта обработок семян: 1) Семена *3m* замачивали в 0,1% растворе TX-100 в течение 22 часов; 2) Семена *3c* замачивали в 0,05% растворе колхицина в течение 6 часов; 3) Семена *3mc* сначала были замочены в 0,1% растворе TX-100 в течение 22 часов, затем отмыты и сразу же замочены в 0,05% растворе колхицина в течение 6 часов; 4) Семена *3ct* были сначала замочены в 0,05% растворе колхицина в течение 6 часов, затем отмыты и тут же замочены в 0,1% растворе TX-100 в течение 22 часов. Необработанные контрольные семена обозначены как *3k*. Анализ изоферментных спектров в контрольных и опытных партиях семян проводили через 24, 48, 72, 96 и 120 часов прорастания. Электрофоретический анализ проводили на индивидуальных непроросших семенах в крахмальном геле по методам, описанным ранее [2]. Сканирование электрофореграмм проводили при помощи прибора Biodoc.

Результаты и обсуждение

Изоферментные спектры GPI и ADH изменяются в ходе прорастания семян сахарной свеклы. Стандартные изоферментные спектры наиболее четко выявляются в первые сутки прорастания. В группе контрольных семян процесс прорастания идет довольно быстро и дружно, так что через 48 часов непроросшими остается незначительное число семян, составляющих не более 5%. Воздействие TX-100 и колхицином замедляет процесс прорастания, что позволяет исследовать изменение экспрессии ферментных генов в динамике.

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

ется локусом *Gpi2*, имеющим два аллеля [10]. У гомозигот эта зона представлена либо быстромигрирующим (FF-фенотип), либо медленномигрирующим изоферментом (SS-фенотип). У гетерозигот *Gpi2-F/Gpi2-S* эта зона представлена трехполосным спектром.

В данной работе анализировали изоферментные спектры GPI2. Среди представленных на рис. 1 спектров GPI2 к стандартным можно отнести лишь гетерозиготные спектры (рис. 1, 1 и 11). К аномалиям относили спектры, в которых появились изоферменты с измененной электрофоретической подвижностью (модификации) (рис. 1, 2–10, 12); аномалией также считали полную потерю активности изоферментов стандартного спектра (рис. 1, 2–4). Важным, на наш взгляд, является тот факт, что на электрофореграмме одного и того же семени одновременно может выявляться и модифицированные изоферменты GPI2, и нулевой фенотип GPI2, у которого отсутствует ферментативная активность в области нормального спектра (рис. 1, 2–4). По мере ослабления активности изоферментов в стандартной части спектра происходит усиление активности модифицированных изоферментов (рис. 1, 7, 9), а при нулевой активности стандартного спектра GPI2, активность модифицированных изоферментов резко возрастает (рис. 1, 2–4). Это указывает на то, что модифицированные изоферменты представляют собой продукты измененной экспрессии локуса *Gpi2*, и именно полное изменение экспрессии локуса *Gpi2* приводит к потере активности стандартного спектра.

Частота появления модификаций в опытных партиях (3*m*, 3*c*, 3*mc* и 3*cm*) сходна; что позволяет предположить, что ТХ-100 и колхицин действуют на одни и те же структуры ядра и клетки. Частота модификаций в суммарной выборке опытных партий семян (3*m*, 3*c*, 3*mc* и 3*cm*) нарастает постепенно от 28,6% в первые 24 часа до 88,3% через 120 часов проращивания.

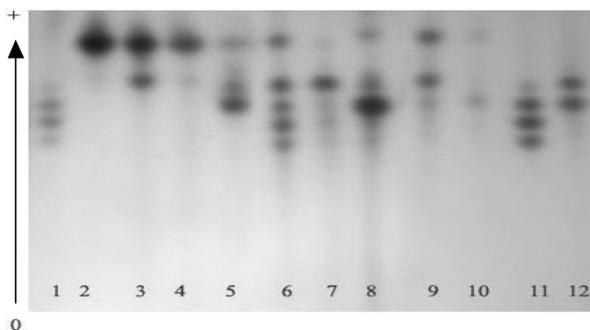


Рис. 1. Типы изоферментных спектров глюкозофосфатизомеразы (GPI) в непрорастающих семенах сахарной свеклы. 1, 11 — гетерозигота *Gpi2-F/Gpi2-S* со стандартным фенотипом; 2–4 — модифицированный спектр с нулевой активностью нормальных изоферментов GPI2; 5, 8–10, 12 — гомозиготы *Gpi2-F/Gpi2-F* с модифицированными изоферментами; 6, 7 — гетерозиготы *Gpi2-F/Gpi2-S* с модифицированными изоферментами. (0) — старт, (+) — анод

Алкогольдегидрогеназа (ADH) — один из наиболее изученных ферментов растений, активный в тканях, находящихся в анаэробных условиях. ADH находится у растений в растворимой фракции цитоплазмы [9]. По своей структуре ADH — димерный фермент, и у гетерозигот он выявляется в виде трехполосного изоферментного спектра. У большинства изученных видов растений ADH контролируется не менее чем двумя локусами: *Adh1* и *Adh2*. Для ADH сахарной свеклы четких доказательств наличия продуктов второго локуса (*Adh2*) в литературе нет.

Наряду со стандартными спектрами ADH в непрорастающих семенах сахарной свеклы выявляются модифицированные изоферменты, которые локализуются в быстромигрирующей зоне спектра, в той части, где у других видов растений обычно локализуются гетеродимеры между продуктами первого и второго локусов (рис. 2, 1–5). Анализ показал, что при всех типах обработки наблюдается достоверно низкая частота модификаций ADH по сравнению с GPI. Так, суммарная частота модифицированных изоферментов ADH, выявленная в каждой из опытных групп (*3m*, *3c*, *3mc* и *3cm*) за весь период проращивания составляла, соответственно, 9,8%, 32,5%, 29,7% и 0%, а у GPI эти показатели составляли, соответственно, 57,7%, 65,8%, 84,0% и 53,8%. Это свидетельствует о том, что механизм возникновения данных модификаций отличается от того, который характерен для GPI. Этот вывод подтверждается тем, что возникновение нулевого фенотипа по стандартному спектру ADH1 (рис. 2, 1) не приводит к усилению активности модифицированных изоферментов. Это не позволяет рассматривать модифицированные изоферменты ADH как результат изменения экспрессии локуса *Adh1*.

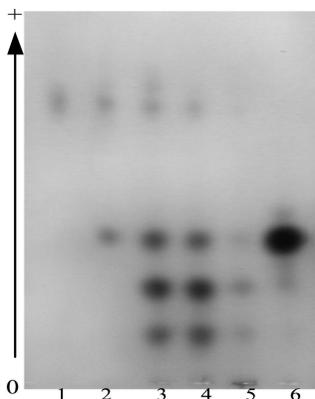


Рис. 2. Типы изоферментных спектров алкогольдегидрогеназы (ADH) в непрорастающих семенах сахарной свеклы. 1 — спектр с нулевой активностью локуса *Adh1* и изоферментами, кодируемыми локусом *Adh2*; 2 — гомозигота *Adh1-F/Adh1-F* с изоферментами, кодируемыми локусом *Adh2*; 3–5 — гетерозигота *Adh1-F/Adh1-S* с изоферментами, кодируемыми локусом *Adh2*; 6 — гомозигота *Adh1-F/Adh1-F*. (0) — старт, (+) — анод

Сделано предположение, что эти изоферменты являются продуктами локуса *Adh2*.

Таким образом, в опытных партиях семян выявились два типа изменений: модификация электрофоретической подвижности изоферментов и полная потеря активности их стандартного спектра. Согласованное увеличение интенсивности модифицированных изоферментов GPI и уменьшение активности изоферментов GPI стандартного спектра (вплоть до полного его исчезновения) позволяет предположить, что эти изменения являются следствием постепенного перехода нормальной (стандартной) экспрессии ферментного локуса к полностью измененной экспрессии, при которой нормальные изоферменты не образуются. Совершенно другая картина наблюдается в системе АДН. Появление изоферментов АДН с более быстрой, чем у стандартных изоферментов электрофоретической подвижностью, обусловлено, по-видимому, эпигенетическим процессом: активацией другого, ранее молчавшего гена *Adh2*. Появление нулевых фенотипов по АДН1 при воздействии колхицина и ТХ-100 можно рассматривать как результат ускоренной инактивации локуса *Adh1*, которая обычно происходит и в норме в тот момент, когда семена прорастают, начинают потреблять атмосферный кислород и переходят на эффективный путь использования запасенной глюкозы. Различная реакция GPI и АДН на воздействие ТХ-100 и колхицина указывает на то, что влияние этих веществ на экспрессию генов *Gpi2*, *Adh1* и *Adh2* связано с различиями во внутриклеточной локализации данных ферментов.

В контрольных семенах с очень редкой частотой выявлены аномалии, аналогичные тем, которые наблюдались в опытных группах. Это позволяет предположить, что в основе непрорастания могут лежать спонтанные нарушения в экспрессии различных генов.

Различные сочетания воздействий на семена сахарной свеклы позволили сопоставить механизм биологического действия ТХ-100 и колхицина. Частоты модификаций GPI у семян при всех типах обработок (*3m*, *3c*, *3mc* и *3cm*) совпадают; кроме того, оба вещества индуцируют активность локуса *Adh2*. Это указывает на то, что воздействие детергента ТХ-100, направленное на биологические мембраны, совпадает с действием колхицина, т.е. колхицин также действует на клеточные мембраны. Возможно, что для колхицина существует множество точек воздействия на геном. Однако, учитывая тот факт, что колхицин препятствует образованию веретена деления, можно предположить, что он действует на участки взаимодействия мембран с цитоскелетом и, соответственно, с веретеном деления. Кроме того, учитывая мутагенное влияние колхицина [11], можно предположить, что начальными точками воздействия колхицина на геном растительной клетки являются участки контакта и взаимодействия ДНК, ядерной мембраны и цитоскелета.

Выводы

Неионный детергент ТХ-100 и колхицин вызывают изменения в экспрессии ферментных генов *Gpi2*, *Adh1* и *Adh2* в непрорастающих семенах сахарной свеклы. В ферментной системе GPI происходит полная модифи-

кация изоферментов и связанная с ней потеря активности стандартных спектров. В системе АДН наблюдается потеря экспрессии стандартных спектров и появление продуктов локуса *Adh2*. Сходство реакции GPI и АДН на воздействие колхицина и ТХ-100 позволяет заключить, что оба эти вещества действуют на клеточные мембраны.

Работа финансировалась грантом №99 по интеграционному проекту СО РАН 2009–2011 гг. “Индукция эпигенетических изменений как новый эффективный метод создания исходных селекционных форм растений”.

Литература

1. *Hunter R.L., Markert C.L.* Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gel // *Science*.— 1957.— Vol.125, №3261.— P. 1294–1295.
2. *Левитес Е.В.* Генетика изоферментов растений.— Новосибирск: Наука, 1986.— 144 с.
3. *Matzke M.A., Sheid O.M., Matzke A.J.M.* Rapid structural and epigenetic changes in polyploid and aneuploid genomes // *BioEssays*.— 1999.— Vol.21.— P. 761–767.
4. *Раджабли Е.П., Рудь В.Д.* Получение и использование полиплоидных форм растений.— Новосибирск: Наука, 1972.— 132 с.
5. *Махмудова К.Х., Богданова Е.Д., Левитес Е.В.* Индукция Тритоном X-100 наследуемых изменений морфологических признаков у *Triticum aestivum* L. // *Генетика*. 2009.— Т.45, №4.— С. 564–567.
6. *Курикович 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.
7. *Weeden N.F., Gottlieb L.D.* The genetics of chloroplast enzymes // *The J. of Heredity*.— 1980.— Vol.71.— P. 392–396.
8. *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.
9. *Scandalios J.G.* Genetic control of alcohol dehydrogenase isozymes in maize // *Biochem. Genet.*— 1967.— Vol.1, №1.— P. 1–9.
10. *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.
11. *Castro C.M., Oliveira A.C., Calvaho F.I.F.* Changes in allele frequencies in colchicine treated Ryegrass population assessed with APD marker // *Agrociencia*.— 2003.— Vol.9, №2.— P. 107–112.

Резюме

Изучена экспрессия ферментных генов, контролирующих глюкозофосфатизомеразу (GPI) и алкогольдегидрогеназу (АДН), в непрорастающих семенах сахарной свеклы после воздействия Тритоном X-100 (ТХ-100) и колхицином. Выявлены два типа изменений: изменение электрофоретической подвижности изоферментов и изменение активности стандартных спектров (активация/инактивация). Предположено, что различная реакция ферментных систем GPI и АДН на воздействие ТХ-100 и колхицина связана с различной внутриклеточной локализацией этих ферментов.

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, глюкозофосфатизомеразы (GPI), представленная изоферментами, локализующимися как в растворимой части цитоплазмы, так и в органеллах [5, 6]. Известно, что изоферменты GPI, локализованные в растворимой части цитоплазмы,