

О.А. АРТЕМЕНКО

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України,
01601, Київ, вул. Терещенківська, 2
oartymenko@yahoo.com

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ $\delta 1$ - ТА $\delta 3$ -ЦИКЛІНІВ В КОРЕНЕВІЙ МЕРИСТЕМІ *PISUM SATIVUM L.* ЗА УМОВ КЛІНОСТАТУВАННЯ



За допомогою методу гібридизації *in situ* показано експресію генів $\delta 1$ - та $\delta 3$ -циклінів в клітинах кореневої меристеми гороху (*Pisum sativum L.*) в умовах повільного горизонтального кліностатування та в стаціонарних умовах вирощування. Дані щодо експресії генів δ -циклінів за умов кліностатування в меристемах коренів гороху були отримані вперше. Виявлено вплив кліностатування на експресію цих генів на ранніх стадіях розвитку кореня гороху. Затримка руйнування циклінових субодиниць при кліностатуванні є причиною подовження фази G_1 в цих умовах, що в свою чергу призводить до затримки прокльовування насінин, а також може пояснити збільшення тривалості клітинного циклу.

© О.А. АРТЕМЕНКО, 2006

Вступ. На основі експериментальних даних про істотний вплив мікрогравітації на клітинний метаболізм сформульовано положення про найбільшу чутливість до зміненої гравітації клітин, які знаходяться в активному фізіологічному стані та діляться [1]. Показано збільшення тривалості клітинного циклу у ряду видів вищих рослин під впливом мікрогравітації [2–4]. Як відомо, зміна тривалості клітинного циклу відбувається переважно через подовження пресинтетичної фази циклу G_1 . Тривалість S-, G_2 - та M-фаз під дією мікрогравітації суттєво не змінюється. Тому вивчення G_1 -фази є найбільш важливим для подальшого з'ясування ступеня гравічутливості клітинного циклу.

Регуляторами клітинного циклу в еукаріот є білки — цикліни та циклінзалежні кінази (ЦЗК), які регулюють вихід клітини із стану спокою та просування по циклу. Існують декілька типів циклінів, які відповідають за здійснення різних фаз циклу і мають високу гомологію в клітинах рослин та тварин. Однак із *Arabidopsis thaliana* (Heynh.) були виділені специфічні для рослин δ -цикліни, подібні до D-циклінів ссавців, що відповідають за події пресинтетичної фази циклу [5]. Даний клас складається з декількох типів циклінів, в тому числі з $\delta 1$ - та $\delta 3$ -циклінів. Циклін $\delta 1$ відповідає за початок пресинтетичної фази, а $\delta 3$ — за вступ у фазу синтезу, хоча його присутність виявляється протягом всієї пресинтетичної фази циклу.

Метою даної роботи було дослідження експресії генів $\delta 1$ - та $\delta 3$ -циклінів в клітинах кореневої меристеми в умовах повільного горизонтального кліностатування для визначення ролі δ -циклінів в процесах затримки прокльовування насіння та зниження проліферативного пулу. Дані щодо експресії генів δ -циклінів за умов кліностатування в меристемах коренів гороху були отримані вперше.

Матеріали та методи. Об'єктом досліджень було обрано меристему зародкових коренів гороху (*Pisum sativum L.*) сорту Інтенсивний в процесі проростання насіння, оскільки відомо, що її клітини в сухому насінні заблоковані в G_1 -фазі, синхронно вступають в перший мітоз і тому є зручною моделлю для вивчення G_1 -фази клітинного циклу. Насіння гороху замочували у воді на 30 хв, потім пророщували при 24 ± 1 °C у темряві в стаціонарних умовах

та на повільному горизонтальному кліноостаті (2 об/хв). Оскільки початок реплікації ДНК в клітинах меристеми кореня гороху через 24 год проростання насінин корелює з часом їх прокльовування, що є морфологічним критерієм початку S-фази [6], досліджували клітини меристеми коренів гороху після 24 год досліду та після 32 год, коли насінини вже проклюнулися.

Метод визначення експресії генів циклінів був адаптований для даної рослини. Після встановленого в досліді часу у паростків відрізали корінці і фіксували в ФОС (3,7 % формальдегід : 5 % оцтова кислота : 50 % спирт) протягом 1,5 год. Після промивки та повного збездонення матеріал просочували парафіном (заміщення проміжної рідини парафіном: толуол-парафін — 3:1, толуол-парафін — 1:1, толуол-парафін — 1:3. Цю суміш залишали в термостаті (56—57 °С) до повного випаровування толуолу та заміщення його в матеріалі на парафін протягом 3—6 діб. З отриманих парафінових блоків із матеріалом робили зрізи за допомогою мікротому. Зрізи, наклеєні на знежирені предметні скельця, підсушували в термостаті при 37 °С. З апексів коренів отримували парафінові зрізи кожного варіанту товщиною 7 мкм на мікротомі REICHERT. Після депарафінізації проводили гібридизацію з дігксигенін-міченими (ДІГ) зондами $\delta 1$ - та $\delta 3$ -циклінів протягом 16 год при 42 °С та детекцію Анти-ДІГ-Антитілами фірми «Roshe». Було модифіковано час депарафінізації зрізів до 2 год та час фарбування в хромогенному барвнику NBT/BCIP (Nitro blue tetrazolium chloride/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidine salt) фірми «Roshe» до 24 год. Гібридизацію, детекцію та фарбування проводили за описаною методикою [7—9]. Використані зонди циклінів, отримані від професора Джима Мюррея з Інституту біотехнології Кембріджського Університету (Велика Британія), попередньо були клоновані в *Arabidopsis thaliana*. Дослідження проводили у п'яти повторностях для кожного варіанту. Результати аналізували за допомогою світлового мікроскопа AXIOSKOP (Zeiss) та задокументували цифровою та фотокамерами.

Негативний контроль використовували як маркер гібридизації. Стадія детекції антитіла-

ми була виключена, решту процедур проводили аналогічно до експериментального матеріалу.

Результати досліджень та їх обговорення. Через 24 год проростання насінин гороху експресія генів $\delta 1$ - та $\delta 3$ -циклінів в клітинах кореневої меристеми виявилася в стаціонарних умовах вирощування (рис. 1, рис. 4, а). В умовах кліноостатування експресія $\delta 1$ -цикліну також добре виявилася (рис. 2), але експресія $\delta 3$ -цикліну була зниженою у порівнянні з контрольним варіантом (рис. 4, б).

Через 32 год проростання насінин експресії гена $\delta 1$ -цикліну в контролі не виявилось (рис. 5, а), як і експресії гена $\delta 3$ -цикліну (рис. 6, а). За умов кліноостатування накопичення транскриптів гена $\delta 1$ -цикліну спостерігалось в окремих клітинах (рис. 5, б), тоді як експресію гена $\delta 3$ -цикліну було видно у більшості клітин кореневої меристеми (рис. 6, б).

Негативний контроль гібридизації без використання Анти-ДІГ-Антитіл використовували як маркер (рис. 3).

Наявність експресії генів обох типів δ -циклінів в контролі та при кліноостатуванні після 24 год і відсутність в контролі після 32 год проростання підтверджують існуючі дані про їх присутність в пресинтетичній фазі циклу в нормальних умовах.

Відомо, що роз'єднання циклінів з циклінзалежними кіназами та їх руйнування є важливим для переходу клітини з однієї фази до наступної [10]. Отримані в нашій роботі результати щодо відсутності транскриптів δ -циклінів в контролі після 32 год проростання свідчать про деградацію циклінових субодиниць. Акумуляція транскриптів $\delta 1$ - та $\delta 3$ -циклінів за умов кліноостатування після 32 год проростання є ознакою подовження пресинтетичної фази в цих умовах.

Раніше було показано затримку прокльовування насінин та проліферативної активності при кліноостатуванні [11]. За рахунок збільшення тривалості клітинного циклу уповільнюється швидкість росту кореня в цих умовах. Можна припустити, що наявність транскриптів генів $\delta 1$ - та $\delta 3$ -циклінів в ядрах або затримка їх деградації за умов кліноостатування є причиною затримки переходу клітин з G_1 -фази до фази синтезу.

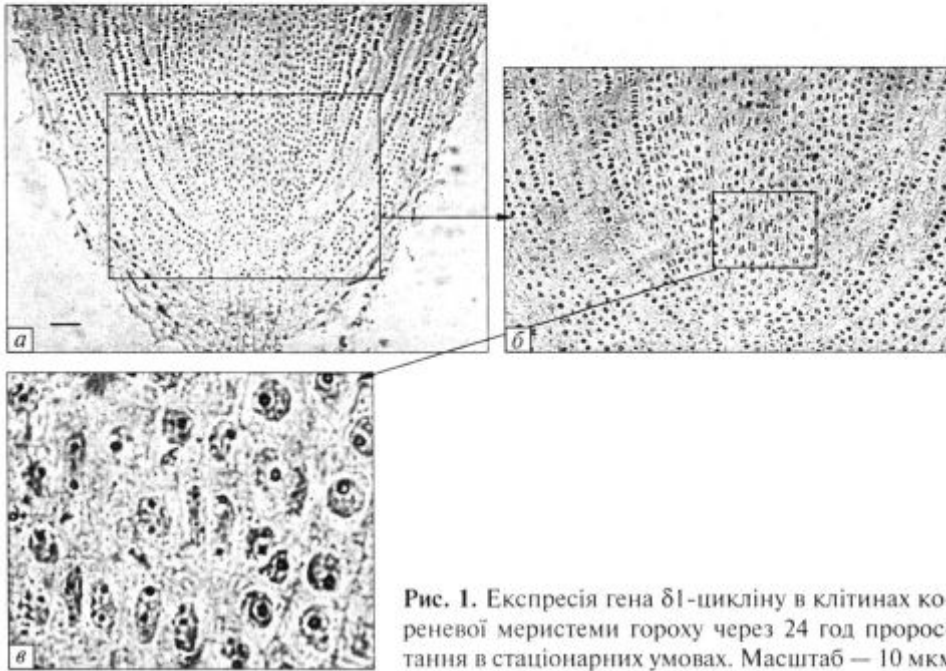


Рис. 1. Експресія гена $\delta 1$ -цикліну в клітинах кореневої меристеми гороху через 24 год проростання в стаціонарних умовах. Масштаб — 10 мкм

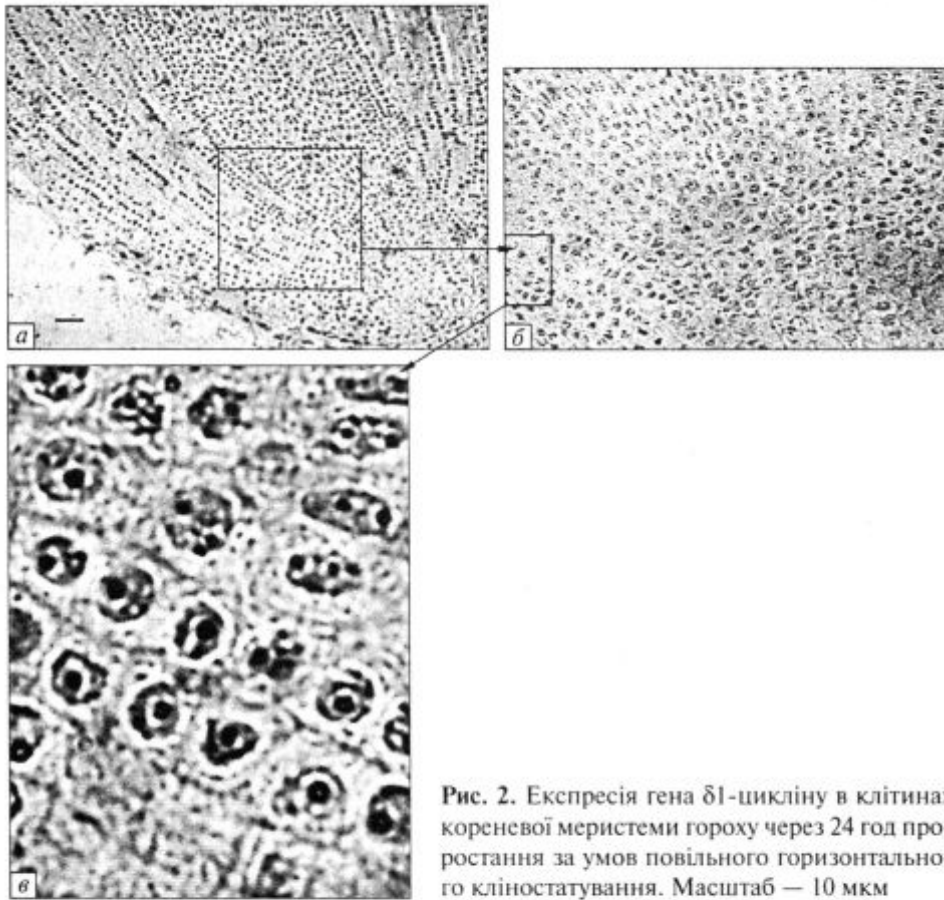


Рис. 2. Експресія гена $\delta 1$ -цикліну в клітинах кореневої меристеми гороху через 24 год проростання за умов повільного горизонтального кліноштатування. Масштаб — 10 мкм

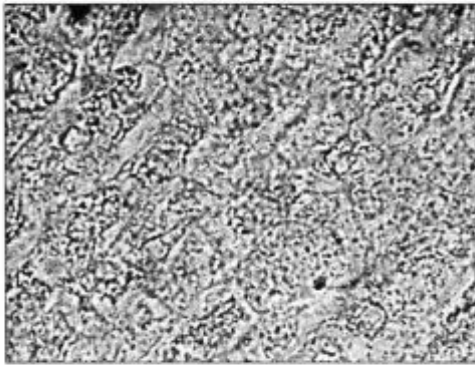


Рис. 3. Негативний контроль гібридизації без використання анти-ДІГ-антитіл. Клітини кореневої меристеми гороху через 24 год проростання. Зафарбування гібридизованих ділянок з цикліном не відбулося; $\times 400$

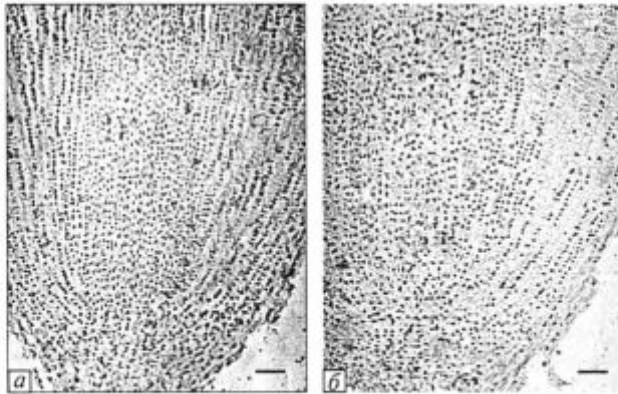


Рис. 4. Експресія гену $\delta 3$ -цикліну в клітинах кореневої меристеми гороху через 24 год проростання в стаціонарних умовах (а) та за умов кліностагування (б). Масштаб — 10 мкм

Отже ми виявили вплив повільного горизонтального кліностагування на експресію генів $\delta 1$ - та $\delta 3$ -циклінів на ранніх стадіях розвитку кореня гороху. Отримані результати погоджуються з відомими даними про роль δ -циклінів в подіях G_1 -фази та їх важливість в клітинному циклі в цілому [5]. Встановлено, що в умовах повільного горизонтального кліностагування відбувається подовження часу експресії δ -циклінів. Накопичення транскриптів генів $\delta 1$ - та $\delta 3$ -циклінів в клітинах кореневої меристеми гороху за умов кліностагування веде до затримки переходу клітини до S-фази, що призводить в свою чергу до затримки прокльовування насінин. Таке подовження G_1 -фази циклу може пояснити збіль-

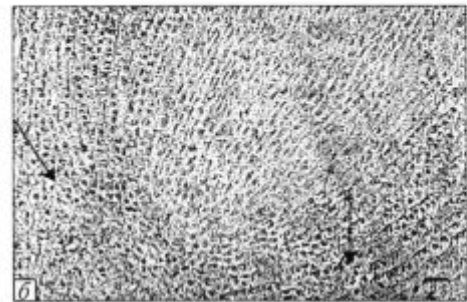
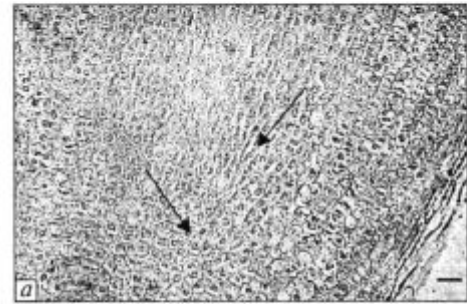


Рис. 5. Експресія гену $\delta 1$ -цикліну в клітинах кореневої меристеми гороху через 32 год проростання в стаціонарних умовах (а) та за умов кліностагування (б). Стрілки вказують на клітини, гібридизовані з $\delta 1$ -цикліном. Масштаб — 10 мкм

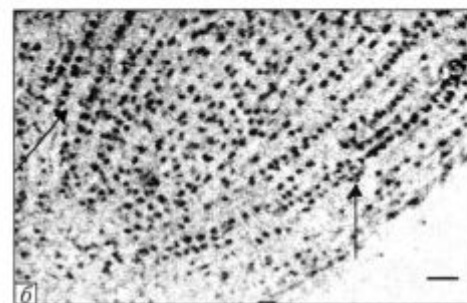
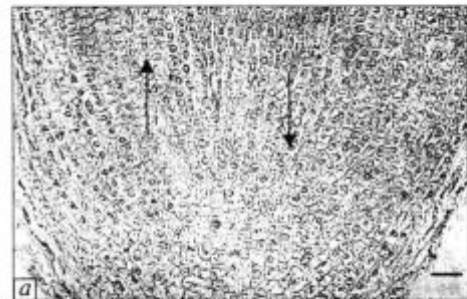


Рис. 6. Експресія гену $\delta 3$ -цикліну в клітинах кореневої меристеми гороху через 32 год проростання в стаціонарних умовах (а) та за умов кліностагування (б). Стрілки вказують на клітини, гібридизовані з $\delta 3$ -цикліном. Масштаб — 10 мкм

шення тривалості клітинного циклу, описане раніше [11].

SUMMARY. Using in situ hybridization the $\delta 1$ - and $\delta 3$ -cyclin gene expression has been shown in pea (*Pisum sativum* L.) root meristem cells under slow horizontal clinorotation and in the stationary conditions. The clinorotation effect on expression of these genes during pea root germination was detected. The delay of degradation of cyclin subunits is the cause of G₁-phase prolongation under clinorotation leading to delay of pea seed germination. This may explain the increase of cell cycle duration.

РЕЗЮМЕ. С помощью метода гибридизации in situ показано экспрессию генов $\delta 1$ - и $\delta 3$ -циклинов в клетках корневой меристемы гороха (*Pisum sativum* L.) в условиях медленного горизонтального клиноротирования и стационарных условиях выращивания. Данные относительно экспрессии генов δ -циклинов в условиях клиноротирования в меристемах корней гороха были получены впервые. Обнаружено влияние клиноротирования на экспрессию этих генов на ранних этапах развития корня гороха. Задержка деградации циклиновых субъединиц при клиноротировании является причиной удлинения пресинтетической фазы в этих условиях, что в свою очередь приводит к задержке прорастания семян, а также может объяснить увеличение длительности клеточного цикла.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Kordyum E.* Biology of plant cell microgravity and under clinostating // *Int. Rev. Cytol.* — 1997. — **171**. — P. 1—72.
2. *Driss-Ecole D., Schoevaert D., Noin M., Perbal G.* Densitometric analysis of nuclear DNA content in lentil roots grown in space // *Biol. Cell.* — 1994. — **81**. — P. 59—64.
3. *Perbal G., Driss-Ecole D., Rutin J., Salle G.* Gravitropism of lentil roots grown in space (spacelab D1 Mission) // *Physiol. Plant.* — 1987. — **70**. — P. 119—126.
4. *Aarouf J., Schoevaert D., Maldiney R., Perbal G.* Changes in hormonal balance and meristematic activity in primary root tips on the slowly rotating clinostat and their effect on the development of the rapeseed root system // *Physiol. Plant.* — 1999. — **105**. — P. 708—718.
5. *Sony R., Carmichael J. et al.* A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif // *Plant Cell.* — 1995. — **7**. — P. 85—103.
6. *Троян В.М.* Клітинний цикл рослин та його регуляція. — Київ : Наук. думка, 1998. — 171 с.
7. *DIG Application Manual for nonradioactive in situ hybridization.* — Roche, 2003. — 242 p.
8. *Schwarzacher T., Leitch A.R., Heslop-Harrison J.S.* DNA : DNA in situ hybridization — method for light microscopy // *Plant cell biology: a practical approach.* edired. — Oxford : Univ. press, 1994. — P. 127—155.
9. *In situ hybridization using GeneDetect oligonucleotide probes* // *Laboratory methods GeneDetect.com Limited.* — Auckland, New Zealand, 2004. — 8 p.
10. *Martin-Castellanos C., Moreno S.* Recent advances on cyclines, CDKs and CDK inhibitors // *Trends Cell Biol.* — 1997. — **7**. — P. 95—98.
11. *Артеменко О.А., Троян В.М., Азарскова М.В.* Вплив кліноротування на конформаційний стан хроматину та кінетику першого клітинного циклу при проростанні насіння гороху // *Укр. бот. журн.* — 2005. — № 1. — С. 122—130.

Надійшла 11.07.05