

О.А. АРТЕМЕНКО<sup>1</sup>, В.М. ТРОЯН<sup>1</sup>, М.В. АЗАРСКОВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України  
вул. Терещенківська, 2, Київ, 01601, Україна

<sup>2</sup> Науковий центр радіаційної медицини АМН України  
вул. Мельникова, 53, Київ, 04050, Україна

## **ВПЛИВ КЛІНОСТАТУВАННЯ НА КОНФОРМАЦІЙНИЙ СТАН ХРОМАТИНУ ТА КІНЕТИКУ ПЕРШОГО КЛІТИННОГО ЦИКЛУ ПІД ЧАС ПРОРОСТАННЯ НАСІННЯ ГОРОХУ**

*Ключові слова: кліностатування, клітинний цикл, хроматин, синтез ДНК, мітоз.*

У досліджах з різними видами вищих рослин спостерігається різноманітність їх ростової реакції на вплив зміненої гравітації в умовах космічних експериментів чи кліностатування: виявлено як стимуляцію росту, так і його пригнічення або відсутність помітних змін інтенсивності цього процесу [5, 9]. Встановлено також, що залежно від тривалості дії цього чинника може змінюватися характер росту. Так, в експериментах з насінням *Brassica napuss* L., що проростало в умовах кліностатування, швидкість росту кореня збільшувалася протягом перших 5 діб, але через 15 діб зменшувалася [5, 6]. Цю закономірність автори пов'язують зі змінами гормонального балансу клітин меристем, швидкість поділу яких є одним з основних факторів, що визначають інтенсивність росту рослин.

Результати вивчення впливу зміненої гравітації безпосередньо на процес поділу клітин у меристемах рослин також неоднозначні. При експозиції за таких умов тривалістю 2—9 діб спостерігали пригнічення мітотичної активності, а при короткочасній дії — або стимуляцію, або незначні відмінності порівняно з контролем [10]. Очевидно, що така різноманітність даних щодо впливу зміненої гравітації на ріст і поділ клітин вказує на потребу у подальших дослідженнях цього питання. Актуальним також є вивчення механізмів трансдукції гравітропічного сигналу в клітинах меристем рослин.

Наші попередні дослідження засвідчують, що для вивчення процесів, пов'язаних з поділом клітин, зручно використовувати модель першого клітинного циклу, в який з високим рівнем синхронності вступають клітини зародкової меристеми кореня при ініціації проростання насіння [4]. Однією з ранніх подій, якій, за експериментальними даними, належить важлива роль в регуляції просування клітин по циклу і переходу до поділу, є

зміна структурного стану хроматину, що забезпечує збільшення його транскрипційної активності. Тому нашою метою було дослідження конформаційного стану хроматину та кінетики першого клітинного циклу в меристемі кореня гороху, а також інтенсивності його росту в умовах імітації зміненої гравітації кліностакуванням.

### Матеріали і методи досліджень

Насіння гороху (*Pisum sativum* L.) сорту Інтенсивний пророщували при  $24 \pm 1$  °C у темряві за звичайних умов (контроль) та на кліностаці при швидкості обертання механічної платформи навколо горизонтальної осі 2 об./хв (дослід). Такі умови кліностакування частково відтворюють біологічні ефекти реальної мікрогравітації в умовах космічного польоту і широко застосовуються для її імітації [9]. Через кожні 3–4 год протягом процесу проростання насіння від 20 зародків відділяли зону меристеми, розмір якої до набубнявіння насінини становив 1 мм, а при прокльовуванні — 1,5 мм апікальної частини кореня.

Для оцінки конформаційного стану хроматину клітин меристем застосовували флуоресцентний барвник акридіновий оранжевий (АО), який за певних умов флуорохромування взаємодіє з ділянками у молекулі ДНК, незаблокованими білками, тобто вільними для транскрипції РНК-полімеразами. При цьому інтенсивність зв'язування ліганду відбиває конформаційні зміни у структурі хроматину, які корелюють з активністю РНК-полімераз, інтенсивністю синтезу РНК й чутливістю хроматину до дії нуклеаз. Сукупність цих тестів свідчить про те, що мікрофлуориметричний метод визначення зв'язування АО може бути надійним показником функціональної активності геному. Реакцію флуорохромування проводили з ядрами, ізольованими із клітин меристем, як описано раніше [4]. Інтенсивність зеленої флуоресценції індивідуальних ядер вимірювали при  $\lambda = 530$  нм. У кожному варіанті аналізували не менше 70 ядер.

Як показники швидкості проходження клітинами першого мітотичного циклу використовували маркерні події циклу — вступ клітин меристеми у фазу синтезу ДНК і мітоз. Інтенсивність синтезу ДНК аналізували модифікованим методом проточної цитометрії [3], який дає змогу визначати вміст ДНК у тисячах ядер протягом кількох хвилин за інтенсивністю зв'язування специфічних барвників (у наших дослідах — пропідію йодистого). Вимірювання проводили при  $\lambda = 630$  нм на лазерному проточному цитометрі FACStar plus фірми «Becton Dickinson». У кожному варіанті аналізували від 2 до 9 тис. ядер.

Мітотичну активність меристеми кореня досліджували цитологічним методом після забарвлення ядер ацетоорсеїном. У шести–восьми меристемах проглядали 1–2 тис. клітин. Усі досліди виконано не менше, ніж у трьох біологічних повторностях, кожен варіант досліду — у двох–трьох аналітичних повторностях.

### Результати досліджень та їх обговорення

На рис. 1 наведено результати дослідження зв'язування АО хроматином клітин меристем протягом 24 год проростання. Початковою точкою відліку було значення флуоресценції у меристемі кореня насіння, інкубованого упродовж 40 хв у воді при температурі 0 °С, коли стає можливим відокремлювання зародка насінини від сім'ядолей. Очевидно, можна вважати, що це значення відбиває стан хроматину в сухому насінні, коли клітини знаходяться у стані спокою. У контрольному варіанті вже через 3 год після індукції проростання при 24 °С спостерігали підвищення зв'язування АО, що свідчить про деконденсацію хроматину, яка ще збільшується на 6-ту годину. На 9—12-ту годину інтенсивність флуоресценції зменшувалася, а на 16-ту годину знову зростала, досягаючи максимального значення з наступним зниженням на 20—24-ту годину, коли починалося пророщування насіння. Таке явище періодичності активації геному, яке включало зміни його конформаційного стану, активності РНК-полімераз, інтенсивності синтезу РНК і білків, ми виявили під час проростання насіння різних видів рослин і підтвердили у цьому дослідженні нового сорту гороху. Висловлено припущення [4], що перший період деконденсації хроматину пов'язаний з репрограмуванням генетичної інформації, потрібної для виходу клітин зі стану

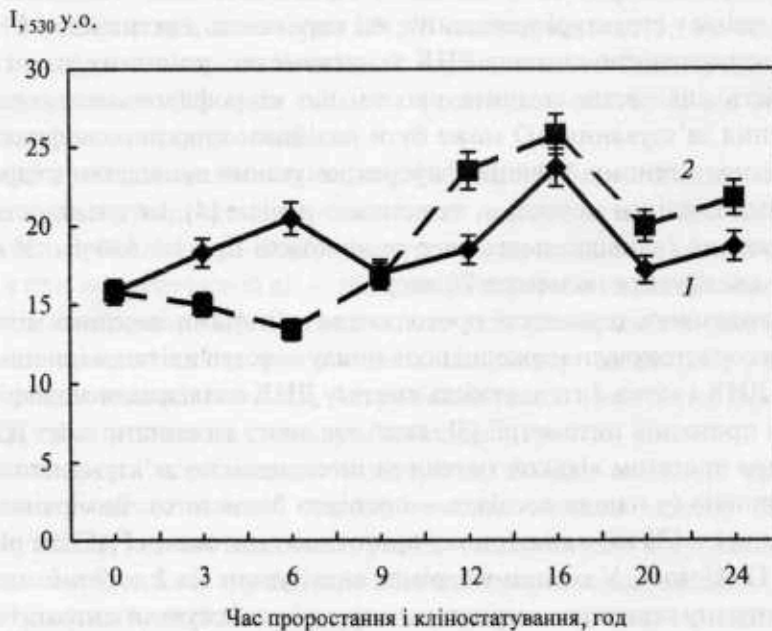


Рис. 1. Зв'язування АО хроматином ядер клітин меристеми кореня гороху протягом пререплікативного періоду. Тут і на рисунках 3, 4: 1 — контроль, 2 — кліностагування

Fig. 1. AO binding with chromatin of cells meristematic nucleus during prereplication period. Here and on the Fig. 3, 4: 1 — control, 2 — clinorotation

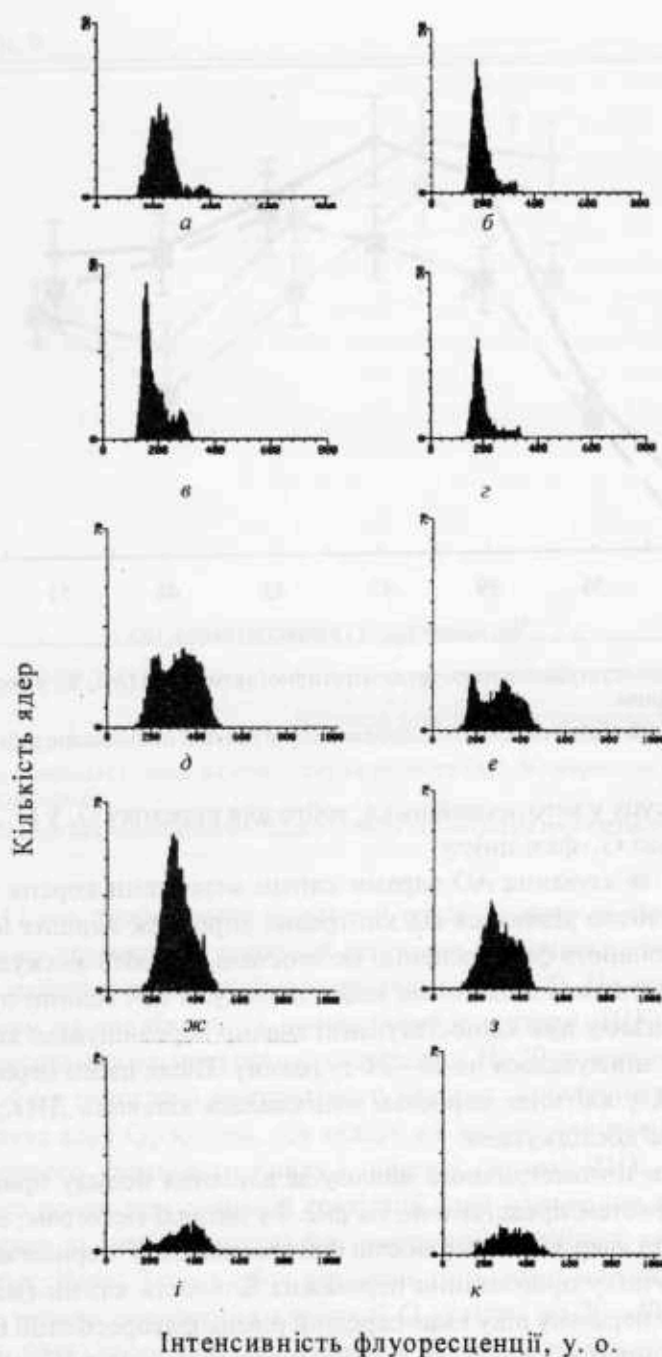


Рис. 2. Гістограма розподілу ядер клітин кореневої меристеми гороху за інтенсивністю флуоресценції (у. о.) пропідію йодиду через 40 хв (а), 17 год (б), 20 (в, г), 23 (д, е), 26 (ж, з) та 29 (і, к) год проростання, відповідно: а–д, ж, і – контроль, е, е, з, к – дослід

Fig. 2. The histograms of flow cytometric analysis of nuclei distribution in pea root meristematic cells by intensity of propidium iodid fluorescence at 17–29 hours of germination: а–д, ж, і – control, е, е, з, к – experiment correspondently

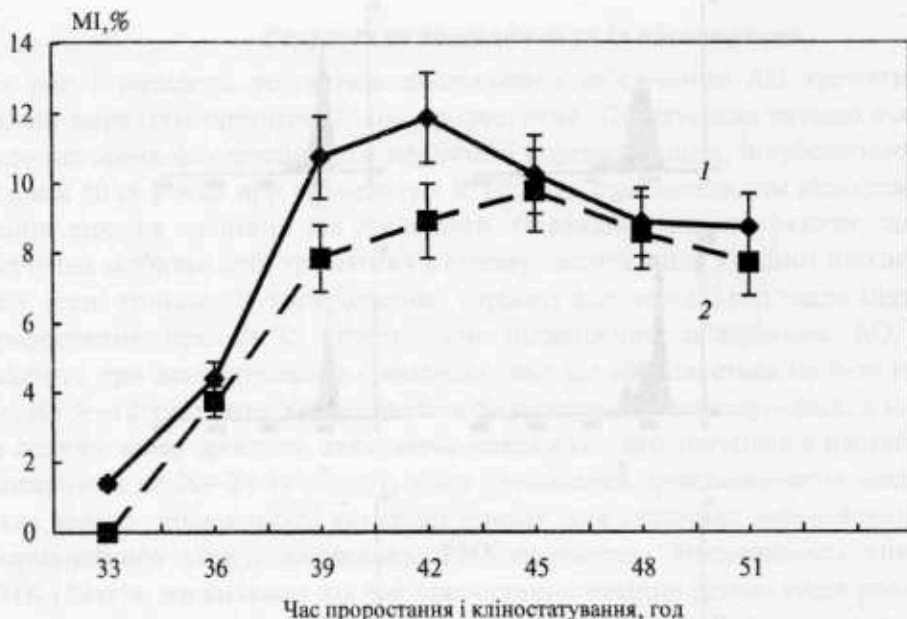


Рис. 3. Вплив кліностагування на початок мітотичної активності (MI, %) у меристемі гороху під час проростання

Fig. 3. The influence of clinorotation on mitotic activity of pea root meristematic cells

спокою та вступу у мітотичний цикл, тобто для переходу  $G_0$  у  $G_1$ , а другий — з переходом по  $G_1$ -фазі циклу.

Кінетика зв'язування АО ядрами клітин меристеми кореня у дослідному варіанті істотно різнилася від контролю: упродовж перших 6 год проростання інтенсивність флуоресценції не зростала, а навіть знижувалася, і починала підвищуватися лише після цього періоду. З 12-ї години проростання зв'язування ліганду при кліностагуванні значно перевищувало контрольний рівень, також знижувалося на 20–24-ту годину. Після цього періоду, як буде показано далі, у клітинах меристем змінювалася кількість ДНК, тому зв'язування АО не досліджували.

Результати цитометричного аналізу зв'язування йодиду пропідію ядрами клітин меристем представлено на рис. 2 у вигляді гістограм, що відображають розподіл ядер за інтенсивністю флуоресценції. У меристемах зародків насіння на початку проростання переважна більшість клітин (майже 90%), зосереджена у першому піку і має середній рівень флуоресценції близько 200 умовних одиниць (у.о.; рис. 2, *a*), що відповідає клітинам із 2С вмістом ДНК. Такий розподіл вказує на перехід до стану спокою основної популяції клітин меристеми гороху під час дозрівання насіння з  $G_1$ -фази мітотичного циклу, що характерне для зрілого насіння багатьох видів рослин. Крім того, наявна невелика популяція клітин (близько 8%) з рівнем інтенсивності флуоресценції 380 у.о., тобто 4С клітин.

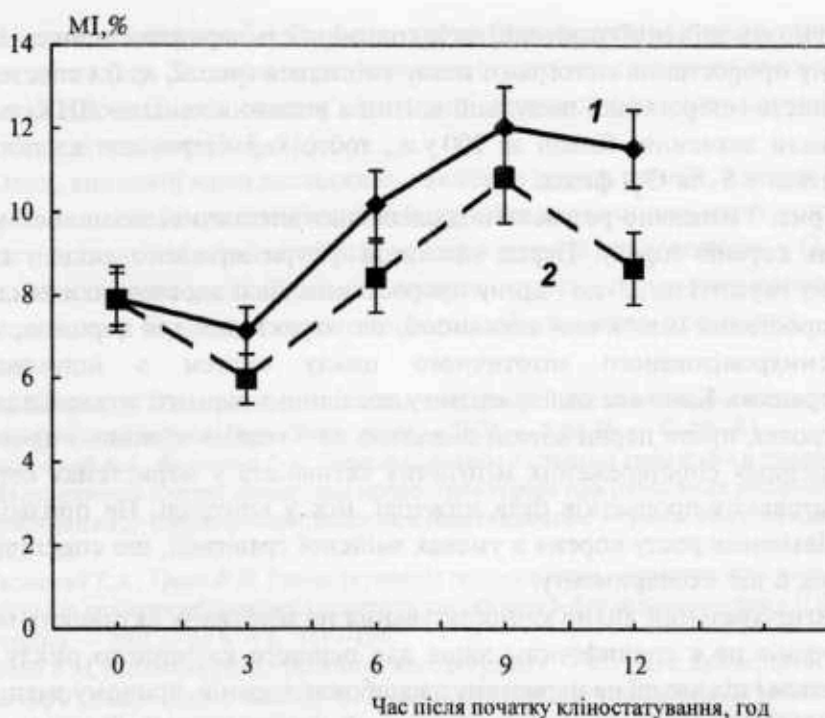


Рис. 4. Вплив кліностагування на мітотичну активність (MI, %) меристем кореня дводобових проростків гороху

Fig. 4. The influence of clinorotation on mitotic activity of 2-days pea root meristematic cells

Через 17 год проростання загальний розподіл ядер за кількістю ДНК у контрольному варіанті був подібний до такого на початку проростання, але гістограма набувала компактнішого вигляду (рис. 2, б). Це можна пояснити відновленням на ранніх етапах проростання структури ДНК, пошкодженої у процесі висихання насіння під час дозрівання. На 20-ту годину проростання (рис. 2, в, з) на гістограмі контрольного насіння спостерігали розширення правого плеча піку  $G_1$ -клітин, що вказує на закінчення пререплікативного періоду першого клітинного циклу і початок синтезу ДНК. У меристемах насіння, що росло при змінній гравітації, цей процес ще не розпочався, розподіл ядер за інтенсивністю флуоресценції подібний до контролю на 17-ту годину. Через 3 год в обох варіантах гістограми істотно змінилися, їх обрахунок виявив зменшення кількості  $G_1$ -клітин до 30–40 %, при цьому значно (до 50 %) збільшувалася кількість клітин зі значеннями ДНК, проміжними між 2С і 4С, що відповідає клітинам у S-фазі (рис. 2, д, е). Ще більше вираженим цей процес був у меристемах на 26-ту годину проростання (рис. 2, ж, з), коли популяція  $G_1$ -клітин у контролі зменшилася до 20 %. Такі дані свідчать про інтенсивний синхронний синтез ДНК у клітинах меристеми кореня протягом S-фазі першого мітотичного циклу. У насінні, що проро-

стало в умовах зміненої гравітації, ця закономірність виражена менше. На 29-ту годину проростання гістограми знову змінилися (рис. 2, *к, і*) і спостерігали наявність гетерогенної популяції клітин з різною кількістю ДНК, в якій переважали значення, більші за 200 у.о., тобто характерні для клітин, що знаходяться в S- та G<sub>2</sub>- фазах.

На рис. 3 наведено результати дослідження мітотичної активності у меристемах коренів гороху. Перші мітотичні фігури виявлено лише у контрольному варіанті на 33-тю годину проростання. Далі спостерігали хвилеподібне наростання мітотичної активності, що характерне для першого, частково синхронізованого мітотичного циклу систем з індукованою проліферацією. Кінетика поділу клітин у дослідному варіанті загалом подібна до контролю, проте перші мітози виявлено на 3 години пізніше і протягом усього періоду спостереження мітотична активність у меристемах коренів кліноостатованих проростків була нижчою, ніж у контролі. Це призводило до сповільнення росту кореня в умовах зміненої гравітації, що спостерігали упродовж 6 діб експерименту.

Пригнічувальний вплив кліноостатування на мітотичну активність меристем коренів не є специфічним лише для першого клітинного циклу. Він виявляється і під час дії на меристему дводобових коренів, причому зменшення кількості поділів спостерігали вже через 3 години (рис. 4). Очевидно, що при цьому затримується проходження клітинами G<sub>2</sub>-фази циклу, тривалість якої у меристемах гороху становить 2 години.

Проведені дослідження дали змогу виявити декілька особливостей впливу зміненої гравітації на процес індукції проліферації клітин у меристемі кореня гороху. По-перше, встановлено затримку процесу ранньої деконденсації хроматину протягом перших 6 годин проростання, що свідчить про вплив досліджуваного фактора на фазу виходу клітин меристеми зі стану спокою, тобто на перехід G<sub>0</sub> у G<sub>1</sub>. По-друге, виявлено стимуляцію деконденсації хроматину впродовж другого періоду його активації, тобто під час проходження клітин по G<sub>1</sub>- фазі циклу.

Ці дані дають підстави припустити, що протягом перших 6 годин дії зміненої гравітації відбувається адаптація клітин меристеми до її впливу, що забезпечує значне підвищення ступеня деконденсації хроматину, а також, очевидно, і його транскрипційної активності на наступному етапі циклу. Завдяки цьому скорочується початкова різниця у швидкості проходження пререплікативного періоду першого циклу клітинами контрольного і дослідного варіантів і вже у S-фазу та мітоз клітини, піддані кліноостатуванню, вступають на 3 години пізніше, ніж контрольні. Таке збільшення тривалості клітинного циклу спричинює сповільнення швидкості росту кореня в умовах кліноостатування, що ми виявили раніше [1].

По-третє, експерименти з меристемами зі стаціонарним мітотичним циклом через 2 доби проростання показали, що під впливом зміненої грав-

ітації зазнає модифікації і  $G_2$ -фаза, тобто безпосередньо період підготовки клітин до поділу. Загалом ці результати погоджуються з тими дослідженнями, в яких показано зниження мітотичної активності та росту кореня в умовах кліностакування [2, 7, 8].

Отже, виконані нами дослідження виявили досить ранній, в межах 3—6 годин, вплив зміненої гравітації на кінетику клітинного циклу, який може відбуватися на різних його фазах: під час виходу клітин зі стану спокою, у  $G_1$ -та  $G_2$ -фазах. Механізмом реалізації цього впливу, зокрема при виході клітин зі стану спокою та у  $G_1$ -фазі, є зміна конформаційного стану хроматину.

1. *Артемченко О.А.* Мітотична активність клітин кореневої меристеми паростків гороху в умовах кліностакування // Вісн. Львів. ун-ту. — 2002. — Вип. 28. — С. 80—83.
2. *Заславский В.А., Фомичева В.М.* Функциональное состояние хроматина и пролиферативная активность клеток меристемы проростков гороха при различных режимах клиностаивания // Космическая биология и биотехнология. — Киев: Наук. думка, 1986. — С. 23—28.
3. *Листопад Т.А., Троян В.М.* Ранняя активация геному клітин проростаючого насіння кукурудзи під впливом гіберелової кислоти та цитокиніну 6-бензиламінопурина // Доп. НАН України. — 2001. — № 6. — С. 151—156.
4. *Троян В.М.* Клітинний цикл рослин та його регуляція. — К.: Наук. думка, 1998. — 171 с.
5. *Aarrouf 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.
6. *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.
7. *Driss-Ecole D., Cottignies A., Jeune B. et al.* Increased mass production of *Veronica arvensis* grown on a slowly rotating clinostat // *Environ. and Exp. Bot.* — 1994. — 34. — P. 303—310.
8. *Hensel W., Iversen T.H.* Ethylene production during clinostat rotation and effect on root geotropism // *Z. Pflanzenphysiol.* — 1980. — 97. — S. 343—352.
9. *Kordyum E.* Biology of plant cell microgravity and under clinostating // *Int. Rev. of Cytol.* — 1997. — 171. — P. 1—72.
10. *Merkys A.J., Laurinavicius R.S.* Plant growth in space // *Fundamentals of Space Biology* / Ed. by M. Asashima, G.M. Malacinski. — Tokyo: Japan. Sci. Soc. Press; Berlin: Springer Verlag, 1990. — P. 69—83.

Рекомендує до друку  
Є.Л. Кордюм

Надійшла 30.03.2004

*О.А. Артемченко<sup>1</sup>, В.М. Троян<sup>1</sup>, М.В. Азарскова<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Інститут ботаники ім. Н.Г. Холодного НАН України, г. Київ  
<sup>2</sup> Научный центр радиационной медицины АМН Украины, г. Київ

#### ВЛИЯНИЕ КЛИНОСТАТИРОВАНИЯ НА КОНФОРМАЦИОННОЕ СОСТОЯНИЕ ХРОМАТИНА И КИНЕТИКУ ПЕРВОГО КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ПРИ ПРОРАСТАНИИ СЕМЯН ГОРОХА

Исследован характер изменения конформационного состояния хроматина методом цитофлюорометрии с использованием низкомолекулярного лиганда акридинового оранжевого, интенсивности синтеза ДНК методом проточной цитометрии и митотической активности в меристемах корней гороха в условиях клиностаивания (2 об/мин). Установлено



торможение ранней деконденсации хроматина в течение 6 ч в период выхода клеток меристемы из состояния покоя и стимуляцию этого процесса в  $G_1$ -фазе. За счет удлинения пререпликативного периода первого клеточного цикла вступление клеток меристемы в  $G_1$ -фазу и митоз происходят на 3 ч позже, чем в контроле, что коррелирует с уменьшением интенсивности роста корня в первые 6 суток прорастания. При действии клиноротирования на стационарный митотический цикл наблюдали замедление прохождения клетками  $G_2$ -фазы цикла. Полученные результаты показывают, что реализация действия сигнала измененной гравитации на конформационное состояние хроматина и митотическую активность меристемы, а так же реакции частичной адаптации клеток могут происходить в первые 3–6 ч влияния данного фактора.

*O.A. Artemenko<sup>1</sup>, V.M. Troyan<sup>1</sup>, M.V. Azarskova<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

<sup>2</sup> Scientific Centre of Radiation Medicine, Academy of Medicine Sciences of Ukraine, Kyiv

#### THE INFLUENCE OF CLINOROTATION ON CHROMATIN CONFORMATION STATE AND FIRST CELL CYCLE KINETICS BY PEA SEEDS GERMINATION

There was study the character of chromatin conformation state change by cytofluorometric method with acridin orange, the intensity of DNA synthesis by flow cytometry, and the mitotic activity of pea roots meristems by slow clinorotation (2 r/min). The increasing of early chromatin decondensation was established during 6 hours, when cells go out from quiet stage, but in  $G_1$ -phase this process is stimulating. The entering of meristematic cells in  $G_1$ -phase and mitosis take place on 3 hours later than in control, because prereplication period of first cell cycle is elongates. It's correlate with decrease of root growth intensity during first 6 days of germination. Under clinorotation effect on permanent mitotic cycle was observed the delay in  $G_2$ -phase of cycle cell's progression. Obtained data showed that altered gravity influences on conformation state of chromatin, on mitotic activity of meristema, and the reaction of particular cells adaptation could take place only at first 3–6 hours of present factor action.