

2. Кунах В. А. Биотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – Київ: Логос, 2005. – 724 с.
3. Кунах В. А., Можилевская Л. П., Алтатова Л. К., Губарь С. И. Устойчивость к 5-метилтриптофану и накопление алкалоидов в каллусной культуре раувольфии змеиной *Rauwolfia serpentina* Benth. // Биотехнология. – 2001. – № 3. – С. 3–10.
4. Кунах В. А., Можилевская Л. П., Губарь С. И. Особенности получения и продуктивность суспензионных клонов раувольфии змеиной *Rauwolfia serpentina* Benth. in vitro // Там же. – 2001. – № 4. – С. 9–21.
5. Кунах В. А., Аль-Аммури Ю., Мирюта Н. Ю., Можилевская Л. П. Накопление индолиновых алкалоидов клеточными линиями раувольфии змеиной при поверхностном и глубинном выращивании // Биополимеры и клетка. – 2006. – 22, № 2. – С. 149–156.
6. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство / Под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена. – Москва: Мир, 1991. – 408 с.
7. Спиридонова Е. В., Адноф Д. М., Андреев И. О., Кунах В. А. Изменение условий выращивания существенно не влияет на геном высокопродуктивной клеточной линии К-27 *Rauwolfia serpentina* Benth. // Биополимеры и клетка. – 2007. – 23, № 2. – С. 86–92.
8. Yeh F. C., Rongcai Y., Boyle T. POPGENE. Ver. 1.31. University of Alberta, Edmonton, Canada. – 1999.

Институт молекулярной биологии
и генетики НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 14.03.2007

УДК 578

© 2007

О. А. Артеменко, член-корреспондент НАН Украины Є. Л. Кордюм

Експресія генів δ -циклінів у кореневій меристемі проростків гороху (*Pisum sativum* L.) за умов кліноостатування

*By the methods of hybridization in situ and RT-PCR, we show, for the first time, the expression of genes of $\delta 1$ - and $\delta 3$ -cyclins in cells of the root meristem of pea (*Pisum sativum* L.) under slow horizontal clinorotation and stationary conditions of growing. We detect the clinorotation effect on the expression of genes of $\delta 3$ -cyclin after 24 h of the wetting of seeds. The presence of transcripts of this cyclin can be a cause for the prolongation of G1-G1/S phases and, as a result, for the delay of the beginning of DNA replication in this period.*

Цикліни та цикліназалежні кінази (ЦЗК) є одними з основних регуляторів клітинного циклу у тварин та рослин [1]. Виявлено існування декількох класів циклінів, які відповідають за послідовне проходження клітини по фазах циклу. Виділені з *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. δ -цикліни високогомологічні δ -циклінам ссавців, які включають три типи білків — $\delta 1$, $\delta 2$ та $\delta 3$, що регулюють події пресинтетичної фази циклу та вступ у фазу синтезу ДНК [1]. У результаті з'єднання пресинтетичних циклінів з ЦЗК відбувається їх активація та утворюється активний ЦЗК-цикліновий комплекс, який стимулює просування клітини до S-фази. У кінці певного проміжку кожної фази клітинного циклу відбувається деградація відповідних циклінів, що необхідно для переходу до наступного [2]. $\delta 1$ -циклін може бути присутній в клітині протягом усієї пресинтетичної фази циклу, а флуктуації рівня $\delta 3$ -цикліну надають йому додаткові регуляторні властивості [3]. Попередні дослідження впливу

реальної мікрогравітації в космічному польоті та симульованої мікрогравітації (кліностакування) показали зміни проліферативної активності клітин апікальної меристеми коренів за цих умов [4, 5], що підтверджує положення про найбільшу гравічутливість рослинних клітин, які діляться або активно метаболізують [6]. Оскільки було встановлено, що уповільнення клітинного циклу в умовах зміненої гравітації відбувається в основному за рахунок подовження G1-фази [7], як і при дії інших несприятливих факторів [8], ми поставили за мету дослідити експресію генів $\delta 1$ - та $\delta 3$ -циклінів в апікальній меристемі зародкових коренів гороху в першому клітинному циклі в процесі індукції проростання насіння.

Насінини гороху сорту “Інтенсивний” калібрували та пророщували в трубочках з фільтрувального паперу, змоченого дистильованою водою, при $(24 \pm 1) ^\circ\text{C}$ у темряві в стаціонарних умовах та на повільному горизонтальному кліностаті (2 об./хв). Морфологічним критерієм початку реплікації ДНК в клітинах апікальної меристеми кореня гороху є наклеювання зародкового кореня [9], яке у даного сорту гороху (“Інтенсивний”) припадає на 30-ту год проростання насіння. Тому для дослідження брали апікальну меристему зародкових коренів через 24 год (триває G1-фаза циклу) та 30 год після замочування насіння, фіксували у ФОС (3,7% формальдегід : 5% оцтова кислота : 50% спирт) протягом 1,5 год, зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації та толуолі і заключали в парафін. Зрізи отримували завтовшки 7 мкм на мікромомі REICHERT.

Локалізацію транскриптів генів циклінів визначали за допомогою методу гібридизації *in situ* [10], який адаптували для об’єкта досліджень. Зонди циклінів були отримані від професора Дж. Мюррея з Інституту біотехнології Кембріджського університету (Великобританія).

Для якісного визначення експресії генів $\delta 1$ -та $\delta 3$ -циклінів (через 40 хв після замочування сухого насіння у воді при $0 ^\circ\text{C}$ (вихідна точка), 24 та 30 год) використовували метод РТ-ПЛР. Вміст РНК та кДНК визначали спектрофотометрично [11]. ПЛР проводили на ампліфікаторі “Терцик” (Росія) з використанням специфічних праймерів довжиною 18–20 нуклеотидів. Продукти ПЛР реакції виявляли за допомогою горизонтального гель-електрофорезу в 1,7% агарозі при 45 В/199 мА протягом 40 хв і подальшого забарвлювання етидієм бромідом.

Методом гібридизації *in situ* транскрипти гена $\delta 1$ -цикліну через 24 та 30 год після замочування насіння були виявлені в ядрах майже всіх клітин протодерми (майбутній епідерміс), у більшості клітин периблеми (майбутня кора) та плероми (майбутній центральний циліндр) у контролі. Транскрипти гена $\delta 3$ -цикліну спостерігалися лише в окремих клітинах. За умов кліностакування транскрипти гена $\delta 1$ -цикліну також виявлялися в ядрах меристематичних клітин у ці проміжки часу. Транскрипти $\delta 3$ -цикліну виявлено через 24 год кліностакування в окремих клітинах, через 30 год — майже в усіх клітинах меристеми — протодермі, периблемі та плеромі (рис. 1).

Визначення рівня експресії генів $\delta 1$ -та $\delta 3$ -циклінів методом РТ-ПЛР у вихідній точці показало наявність обох типів δ -циклінів, хоча інтенсивність забарвлювання $\delta 3$ -цикліну була вищою (рис. 2). Наявність транскриптів у вихідній точці пов’язана з присутністю в сухому насінні мРНК [12]. Через 24 год після замочування в контролі рівень транскриптів $\delta 1$ -цикліну значно збільшується у порівнянні з вихідною точкою і тримається на такому рівні до 30-ї год включно. Експресія $\delta 3$ -цикліну через 24 год не виявляється, але знову спостерігається на 30-ту добу.

За умов кліностакування через 24 та 30 год після замочування насіння кількість продуктів $\delta 1$ -цикліну збільшується, як і в контролі (див. рис. 2). На відміну від контролю, експе-

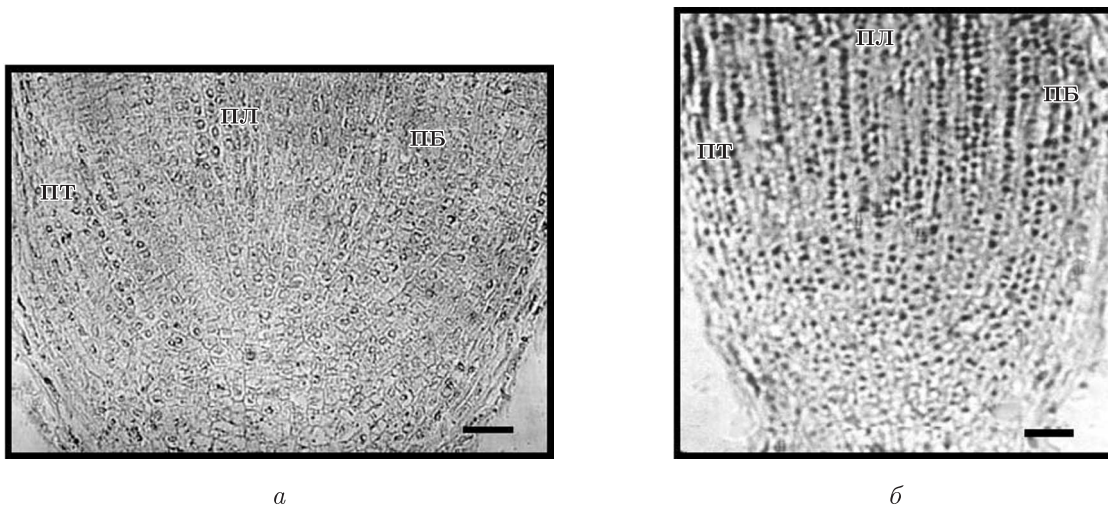


Рис. 1. Експресія гена $\delta 3$ -цикліну в клітинах кореневої меристеми гороху через 30 год проростання в стаціонарних умовах (а) та за умов кліноостатування (б). Реперна мітка: 10 мкм. ПЛ — плерома; ПБ — периблема; ПТ — протодерма

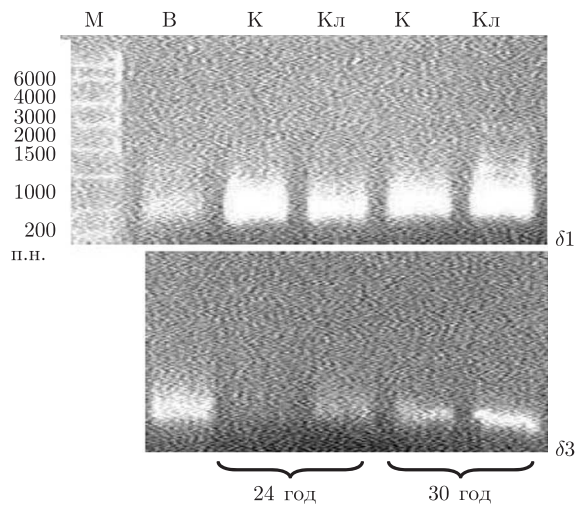


Рис. 2. Продукти ампліфікації $\delta 1$ -та $\delta 3$ -циклінів в клітинах кореневої меристеми проростків гороху в контролі та за умов кліноостатування в процесі індукції проростання. М — маркер; В — вихідна точка; К — контроль; Кл — кліноостатування

сія $\delta 3$ -цикліну виявляється через 24 год і посилюється на 30-ту год. Відсутність транскриптів $\delta 3$ -цикліну в контролі через 24 год після замочування насіння свідчить про припинення експресії та руйнування транскриптів цього гена на даному етапі клітинного циклу. Селективна деградація мРНК, як відомо, є розповсюдженим механізмом регуляції експресії генів у клітинах еукаріот. Експресія $\delta 3$ -цикліну за умов кліноостатування не припиняється і наявність транскриптів є можливою причиною подовження G1-фази та затримки G1-S переходу. По-перше, у присутності транскриптів $\delta 3$ -цикліну неможлива експресія наступного E-цикліну, який безпосередньо відповідає за вступ і просування клітини по S-фазі [1]; по-друге, присутність цих транскриптів може пояснюватися блокуванням утворення комплексів RISCs (RNA-induced silencing complexes), які необхідні для деградації мРНК [13].

Така різниця в експресії $\delta 3$ -циклінів у контролі та за умов кліностакування пов'язана з унікальною чутливістю цього класу білків до дії зовнішніх факторів [14].

Таким чином, експресія гена $\delta 1$ -цикліну за умов повільного горизонтального кліностакування відбувається подібно до контролю в G1-фазі і триває під час G1/S переходу. На відміну від контролю, транскрипція гена $\delta 3$ -цикліну продовжується в цей проміжок часу в ядрах клітин кореневої меристеми гороху при кліноставанні, що може бути причиною подовження G1 — G1/S-фаз і, як наслідок, затримки початку реплікації ДНК за цих умов.

1. Kitazono A., Fitz Gerald J., Kron S. Cell cycle: regulation by cyclins // Encyclopedia of life sciences / Nature Publishing Group. – 2001. – 8 p.
2. Murray A. W., Kirschner M. W. What controls the cell cycle // Sci. Amer. – 1991. – **264**, No 3. – P. 34–41.
3. Novak B., Sible J., Tyson J. Checkpoints in the cell cycle // Encyclopedia of life sciences / Macmillan Publishers Ltd / Nature Publishing Group. – 2002. – 8 p.
4. 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.
5. 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, 1990. – P. 69–83.
6. Kordyum E. L. Biology of plant cell microgravity and under clinostating // Int. Rev. Cytol. – 1997. – **171**. – P. 1–72.
7. Артеменко О. А., Троян В. М., Азарскова М. В. Вплив кліностакування на конформаційний стан хроматину та кінетику першого клітинного циклу при проростанні насіння гороху // Укр. бот. журн. – 2005. – **62**, № 1. – С. 122–130.
8. Гудков И. Н. Регуляция клеточного цикла растений. – Киев: Наук. думка, 1985. – 180 с.
9. Троян В. М. Клітинний цикл рослин та його регуляція. – Київ: Наук. думка, 1998. – 171 с.
10. *In situ* hybridization using GeneDetect oligonucleotide probes // Laboratory methods GeneDetect. com Limited. – Auckland, 2004. – 8 p.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. – Москва: Мир, 1984. – 479 с.
12. Макеев А. В. Основы биологии. – Москва, 1997. – 196 с.
13. Worby C. A., Simonson-Leff N., Dixon J. E. RNA interference of gene expression (RNAi) in cultured *Drosophila* cells // Sci. STKE. – Aug. 14, 2001. – **95**. – PL1.
14. Huntley R., Healy S., Freeman D. et al. The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb – 1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins // Plant Mol. Biol. – 1998. – **37**. – P. 155–169.

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 21.02.2007