

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.05.091>

УДК 582.736.3

**С.М. Романчук**

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

E-mail: rrrsm@ukr.net

## **Вплив X-опромінення на експресію гена $\beta$ -глюкозидази РУК 10 в проростках *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.**

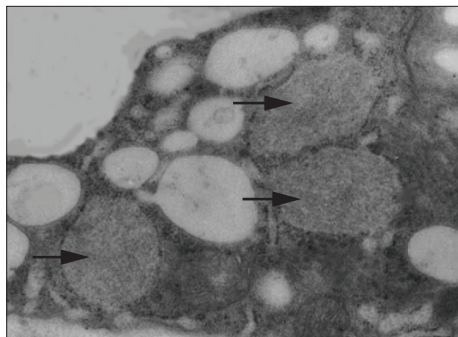
*Представлено членом-кореспондентом НАН України Є.Л. Кордюм*

*Вперше досліджено експресію гена  $\beta$ -глюкозидази РУК 10 в проростках *A. thaliana* під дією X-опромінення в дозах 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 та 12 Гр. Встановлено, що за умов X-опромінення збільшення кількості ЕР-тілець та підвищення активності  $\beta$ -глюкозидази відбувається за рахунок високої експресії гена РУК 10. Вперше показано роль ЕР-тілець, які містять  $\beta$ -глюкозидазу (РУК 10), в адаптації проростків *A. thaliana* на дію X-опромінення. Підвищення експресії гена РУК 10 за цих умов є частиною внутрішньої програми захисту на вплив зовнішніх чинників.*

**Ключові слова:** ген РУК 10,  $\beta$ -глюкозидаза, ЕР-тільця, X-опромінення, *Arabidopsis thaliana*.

На сьогодні поглиблюються дослідження щодо механізмів адаптації рослин до мікрогравітації та іонізуючої радіації, оскільки рослини є головним компонентом автотрофної ланки біореєнеративних систем життєзабезпечення космонавтів [1]. Згідно з даними НАСА (США) на орбітальній станції в межах кабіни космічного корабля дози іонізуючої радіації, які впливають на живі організми, коливаються в діапазоні від 5 до 12 мкГр/год [2]. Серед видів рослин, які використовувалися в космічних і наземних експериментах, найбільш стійкими до радіаційного випромінювання вважаються представники родини Brassicaceae, для яких описані ЕР-тільця (рис. 1), що є похідними гранулярного ендоплазматичного ретикулула (ЕР).

ЕР-тільця в клітинах *Arabidopsis thaliana* [3] вибірково накопичують фермент  $\beta$ -глюкозидазу (глюкозидглюкогідролазу, КФ 3.2.1.21 (РУК10)) [4] із сигналом утримання в компартментах ЕР [5]. У попередніх дослідженнях нами встановлено, що ЕР-тільця є чутливими до кліностагування (симульованої мікрогравітації) та дії X-опромінення, оскільки відбувалося збільшення кількості та площі ЕР-тілець на зрізах статоцитів і клітин дистальної зони розтягу (ДЗР) кореневих апексів *A. thaliana* у середньому в два рази відносно контролю [6, 7]. Також нами виявлено збільшення активності  $\beta$ -глюкозидази під дією X-опромінення порівняно з контролем [8]. Підвищення або зниження рівня експресії під впливом чинників космічного польоту відомо для великого числа генів, залучених у широке коло



**Рис. 1.** Фрагмент клітини дистальної зони розтягу кореневого апекса *A. thaliana*. Стрілками вказані ЕР-тілця (трансмисійна електронна мікроскопія). Масштаб — 200 нм

клітинних процесів, у тому числі  $\text{Ca}^{2+}$  і ліпід-сигналінг, біосинтез клітинної оболонки, загальний метаболізм, насамперед вуглеводний і ліпідний, реакції на стрес, синтез білків [9, 10]. Основними моделями у цих експериментах слугували проростки *A. thaliana*. У на-

ших дослідженнях з моделювання мікрогравітації встановлено, що за умов кліностакування у проростках *A. thaliana* відбувається значне підвищення відносної експресії гена *РУК 10* порівняно зі стаціонарними умовами росту [11]. Вивчення впливу Х-опромінення на експресію гена  $\beta$ -глюкозидази *РУК 10* у проростках *A. thaliana* доповнить розуміння ролі ЕР-тілця в адаптації рослин до зовнішніх чинників.

Для досліджень використовували проростки *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh., екотип Columbia (Col-0), вирощені з попередньо стерилізованого та стратифікованого насіння, яке висівали на живильне середовище Мурасіге та Скуга у чашки Петрі діаметром 120 мм по 100–120 насінин у кожному. Проростки росли за умов освітлення  $93 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  із фото-періодом 16/8 год (світло/темрява) при температурі 22–24 °С та вологості  $67 \pm 1 \%$  протягом 3 та 13 діб з моменту проростання насіння. 3-добові проростки, що росли в окремих чашках Петрі, опромінювали рентгенівськими променями на приладі РУМ-17 (Росія) (потужність дози 0,43 сГр/с) у дозах 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 та 12 Гр. У експерименті брали проростки через 2 год та 10 діб після Х-опромінення. Контролем слугували 3- та 13-добові проростки, які не були опромінені.

Для виділення РНК брали по 100 мг проростків відразу після закінчення експериментів. Операцію проводили з використанням набору реактивів TRI-REAGENT (“Sigma”, Німеччина) за інструкцією, наданою виробником реактивів. Для контролю якості РНК відразу після її виділення проводили електрофорез в 1%-му агарозному гелі в *трис*-ацетатному буфері (ТАЕ). Перед синтезом кДНК для видалення слідів геномної ДНК виділену РНК обробляли ДНКазою I (“Fermentas”, Литва). кДНК отримували з РНК за допомогою реакції зворотної транскрипції з використанням набору реактивів “Fermentas” зі зворотною транскриптазою M-MLV (“Fermentas”, Литва) за інструкцією, наданою виробником реактивів, на приладі “Терцик” (“ДНК-Технологія”, Росія). ПЛР у реальному часі проводили з використанням набору реактивів “Maxima Sybr Green Real Time” (“Fermentas”, Литва) за інструкцією, наданою виробником реактивів, на приладі “Real-Time PCR IQ-Cycler” (“BioRad”, США). Для визначення відносної експресії гена  $\beta$ -глюкозидази *A. thaliana* *РУК 10* (*At3g09260*) вибрано праймери з бази даних NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>):

прямий: 5'-AGGATTGTGAAGGATTTCCGAGA-3';

зворотний: 5'-AGAAGAGCAACGACCAGGTG-3'.

Кінцева концентрація праймерів у готовому розчині становила 5 пМ; реакційний об'єм — 20 мкл. Інтенсивність флуоресценції вимірювали при температурі 77–79 °С, криву плавлення — у діапазоні 60–94 °С з інтервалом 0,5 °С. Час вимірювання становив 10 с.

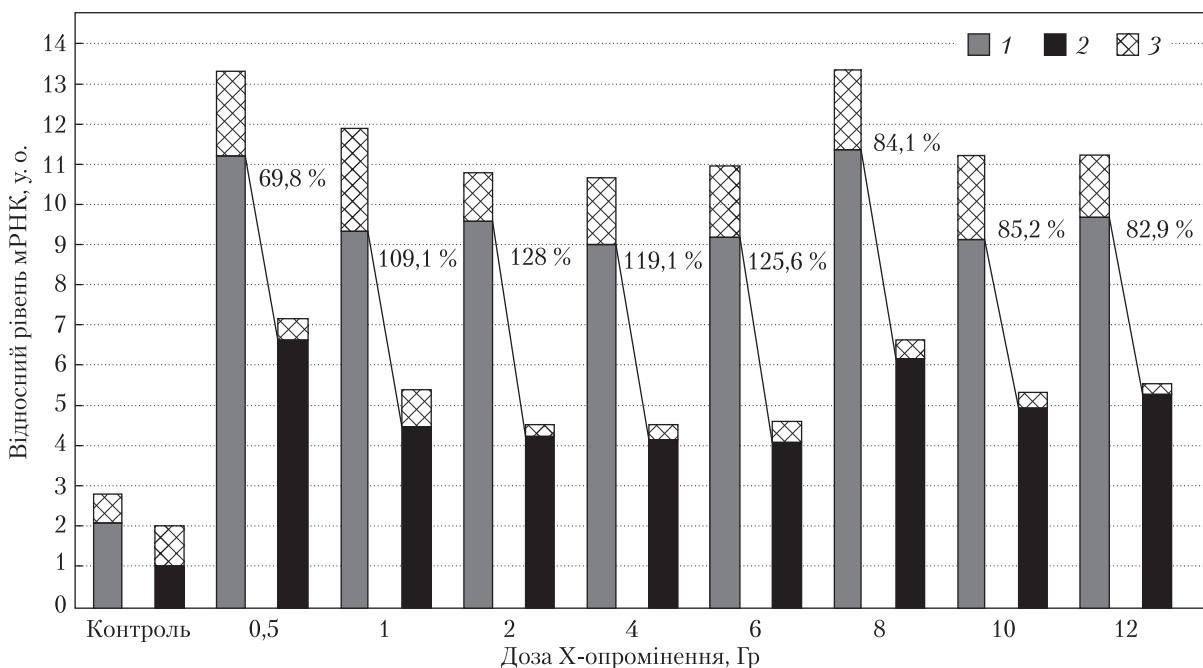
Одержані результати аналізували за допомогою програмного забезпечення приладу. Рівень відносної експресії гена *PYK 10* виражали в умовних одиницях (у. о.).

Усі дослідження проводили не менше ніж у трьох біологічних та трьох аналітичних повторях. Статистичну обробку даних здійснювали за критерієм Стьюдента (*T*-test) ( $p \leq 5\%$ ) та з використанням дисперсійного аналізу (ANOVA). Побудову діаграми виконано в програмі Excel пакета Microsoft Office 2010.

Отримані результати ПЛР у реальному часі показали значне зростання щодо контролю відносної експресії гена *PYK 10* у 3-добових проростках через 2 год після дії кожної дози X-опромінення (рис. 2). Найбільші значення відносної експресії гена *PYK 10* спостерігали за умов впливу X-опромінення в дозах 0,5 та 8 Гр, яка була вищою порівняно з контролем у 5,4 та 5,5 раза відповідно. X-опромінення у дозах 2 та 12 Гр спричиняло підвищення відносної експресії гена *PYK 10* у 4,7 раза, 1 та 6 Гр — у 4,6 раза, 10 Гр — у 4,5 раза, 4 Гр — у 4,4 раза щодо контролю.

Через 10 діб після X-опромінення у 13-добових проростках також встановлено значне зростання відносної експресії гена *PYK 10* під дією кожної дози порівняно з контролем (див. рис. 2). Найбільші значення відносної експресії гена *PYK 10* також відмічали у разі дії доз 0,5 та 8 Гр, яка була вищою від контролю у 6,6 та 6,2 раза відповідно. X-опромінення в дозі 12 Гр спричиняло зростання відносної експресії гена *PYK 10* у 5,3 раза, 10 Гр — у 4,9 раза, 1 Гр — у 4,5 раза, 2 та 4 Гр — у 4,2 раза, 6 Гр — у 4,1 раза порівняно з контролем.

Варто відзначити, що відносна експресія гена *PYK 10* через 2 год після X-опромінення була значно вищою за таку через 10 діб після X-опромінення (див. рис. 2), а саме: у разі



**Рис. 2.** Відносна експресія гена  $\beta$ -глюкозидази *PYK 10* в контролі, через 2 год та через 10 діб після X-опромінення 3-добових проростків *A. thaliana* в різних дозах. 1 — 3-добові проростки; 2 — 13-добові проростки, 3 — стандартне відхилення

опромінення в 0,5 Гр — на 69,8 %; 1 Гр — на 109,1 %; 2 Гр — на 128 %; 4 Гр — на 116,1 %; 6 Гр — на 125,6 %; 8 Гр — на 84,1 %; 10 Гр — на 85,2 %; 12 Гр — на 82,9 %.

Вперше отримані нами результати щодо підвищення відносної експресії гена  $\beta$ -глюкозидази *РУК 10* у проростках *A. thaliana* за умов Х-опромінення в дозах 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 та 12 Гр по відношенню до контролю узгоджуються з результатами, отриманими під час дослідження ультраструктури ЕР-тілець, головним компонентом яких є  $\beta$ -глюкозидаза. Виявлено, що їхня кількість та площа на зрізах статоцитів і клітин ДЗР кореневих апексів *A. thaliana* також збільшувалася після Х-опромінення порівняно з контролем більш ніж удвічі [7]. Також ці результати узгоджуються з даними визначення активності  $\beta$ -глюкозидази через 2 год та 10 діб після Х-опромінення в дозах від 0,5 до 12 Гр [8]. Таким чином, результати ПЛР у реальному часі засвідчили, що за умов Х-опромінення збільшення кількості ЕР-тілець та підвищення активності  $\beta$ -глюкозидази відбувається за рахунок високої експресії гена *РУК 10*. Також нами встановлено, що як експресія гена *РУК 10*, так і активність  $\beta$ -глюкозидази через 10 діб після Х-опромінення були меншими порівняно з такими через 2 год після Х-опромінення. Цей факт може свідчити про те, що за період 10 діб захисні реакції клітин *A. thaliana* на дію іонізуючої радіації набувають адаптивного характеру, ключову роль в яких виконує  $\beta$ -глюкозидаза. Результати багатьох експериментів інших дослідників також показали, що під дією на проростки *A. thaliana* зовнішніх чинників, таких як механічне пошкодження поверхневих тканин рослини [12, 13], дія гормонів [12, 14], колонізація коренів рослини ендоефітними грибами [15], зростала експресія гена  $\beta$ -глюкозидази *РУК 10* порівняно з контролем. Отримані нами результати повною мірою підтверджують літературні відомості щодо накопичення мРНК  $\beta$ -глюкозидази (*РУК 10*) в проростках *A. thaliana* під дією зовнішніх чинників.

#### ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Sychev V.N., Levinskikh M.A., Podolsky I.G. Biological component of life support systems for a crew in long-duration space expeditions. *Acta Astronaut.* 2008. **63**. P. 1119–1125. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2008.01.001>
2. International Space Station Internal Radiation Monitoring (ISS Internal Radiation Monitoring) – 05.04.2017. URL: [https://www.nasa.gov/mission\\_pages/station/research/experiments/1043.html](https://www.nasa.gov/mission_pages/station/research/experiments/1043.html)
3. Hayashi Y., Yamada K., Shimada T., Matsushima R., Nishizawa N.K., Nishimura M., Hara-Nishimura I. A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 2001. **42**. P. 894–899. doi: <https://doi.org/10.1093/pcp/pce144>
4. Ketudat Cairns J.R., Esen A.  $\beta$ -glucosidases. *Cell Mol. Life Sci.* 2010. **67**, № 20. P. 3389–3405. doi: <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0399-2>
5. Matsushima R., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a  $\beta$ -glucosidase with an ER retention signal in Arabidopsis. *Plant J.* 2003. **33**. P. 493–502. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01636.x>
6. Romanchuk S.M. Ultrastructure of the statocytes and cells of the distal elongation zone of *Arabidopsis thaliana* under the conditions of clinorotation. *Cytol. Genet.* 2010. **44**, № 6. P. 329–333. doi: <https://doi.org/10.3103/S0095452710060010>
7. Romanchuk S. ER bodies in *Arabidopsis thaliana* root apices under clinorotation and after X-Ray irradiation. Plant functioning under environmental stress: Proceedings of the 9th International conference (Cracow, Poland, 12–15 Sept. 2012). Cracow, 2012. P. 185–192.
8. Романчук С.М. Активність  $\beta$ -глюкозидази в проростках *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh при дії іонізуючого випромінювання. *Вісн. Харків. нац. ун-ту ім. В. Н. Каразіна. Сер. Біологія.* 2017. Вип. 29. С. 103–108. doi: <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2017-29-13>

9. Paul A.-L., Zupanska A., Ostrow D.T., Zhang Y., Sun Y., Li J.-L., Shanker S., Farmerie W.G., Amalfitano C.E., Ferl R.J. Spaceflight transcriptomes: Unique responses to a novel environment. *Astrobiology*. 2012. **12**. P. 40–56. doi: <https://doi.org/10.1089/ast.2011.0696>
10. Correll M.J., Pyle T.P., Millar K.D.L., Sun Y., Yao J., Edelman R.E., Kiss J.Z. Transcriptome analyses of *Arabidopsis thaliana* seedlings grown in space: implications for gravity-responsive genes. *Planta*. 2013. **238**. P. 519–533. doi: <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1909-x>
11. Romanchuk S.N., Kordyum E.L. ER bodies in *Arabidopsis thaliana* seedlings are sensitive to simulated microgravity and ionizing radiation. *ELGRA Newsletter*. 2014. **9**. P. 10–11.
12. Matsushima R., Hayashi Y., Kondo M., Shimada T., Nishimura M., Hara-Nishimura I. An endoplasmic reticulum derived structure that is induced under stress conditions in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2002. **130**. P. 1807–1814. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.009464>
13. Ogasawara K., Yamada K., Christeller J.T., Kondo M., Hatsugai N., Hara-Nishimura I., Nishimura M. Constitutive and inducible ER bodies of *Arabidopsis thaliana* accumulate distinct  $\beta$ -glucosidases. *Plant Cell Physiol*. 2009. **50**, № 3. P. 480–488. doi: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp007>
14. Matsushima R., Fukao Y., Nishimura M., Hara-Nishimura I. NAI1 gene that encodes a basic-helix-loop-helix-type putative transcription factor that regulates the formation of a novel ER-derived structure, the ER body. *Plant Cell*. 2004. **16**. P. 1536–1549. doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.021154>
15. Sherameti I., Venus Y., Drzewiecki C., Tripathi S., Dan V.M., Nitz I., Varma A., Grundler F.M., Oelmüller R. PUK10, a  $\beta$ -glucosidase located in the endoplasmic reticulum, is crucial for the beneficial interaction between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic fungus *Piriformospora indica*. *Plant. J.* 2008. **54**. P. 428–439. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03424.x>

Надійшло до редакції 28.02.2019

## REFERENCES

1. Sychev, V. N., Levinskikh, M. A. & Podolsky, I. G. (2008). Biological component of life support systems for a crew in long-duration space expeditions. *Acta Astronaut*, 63, pp. 1119-1125. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2008.01.001>
2. International Space Station Internal Radiation Monitoring (ISS Internal Radiation Monitoring) – 05.04.2017. Retrieved from [https://www.nasa.gov/mision\\_pages/station/research/experiments/1043.html](https://www.nasa.gov/mision_pages/station/research/experiments/1043.html)
3. Hayashi, Y., Yamada, K., Shimada, T., Matsushima, R., Nishizawa, N. K., Nishimura, M. & Hara-Nishimura, I. (2001). A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*, 42, pp. 894-899. doi: <https://doi.org/10.1093/pcp/pce144>
4. Ketudat Cairns, J. R. & Esen, A. (2010).  $\beta$ -glucosidases. *Cell Mol. Life Sci.*, 67, No. 20, pp. 3389-3405. doi: <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0399-2>
5. Matsushima, R., Kondo, M., Nishimura, M. & Hara-Nishimura, I. (2003). A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a  $\beta$ -glucosidase with an ER retention signal in Arabidopsis. *Plant J.*, 33, pp. 493-502. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01636.x>
6. Romanchuk, S. M. (2010). Ultrastructure of the statocytes and cells of the distal elongation zone of *Arabidopsis thaliana* under the conditions of clinorotation. *Cytol. Genet.*, 44, No. 6, pp. 329-333. doi: <https://doi.org/10.3103/S0095452710060010>
7. Romanchuk, S. (2012, September). ER bodies in *Arabidopsis thaliana* root apices under clinorotation and after X-Ray irradiation. Proceedings of the 9th International Conference Plant functioning under environmental stress (pp. 185-192). Cracow.
8. Romanchuk, S. M. (2017). The  $\beta$ -glucosidase activity in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh seedlings under exposure to ionizing radiation. *J. V.N. Karazin Kharkiv National University*, Iss. 29, pp. 103-108. doi: <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2017-29-13>
9. Paul, A.-L., Zupanska, A., Ostrow, D. T., Zhang, Y., Sun, Y., Li, J.-L., Shanker, S., Farmerie, W. G., Amalfitano, C. E. & Ferl, R. J. (2012). Spaceflight transcriptomes: Unique responses to a novel environment. *Astrobiology*, 12, pp. 40-56. doi: <https://doi.org/10.1089/ast.2011.0696>
10. Correll, M. J., Pyle, T. P., Millar, K. D. L., Sun, Y., Yao, J., Edelman, R. E. & Kiss, J. Z. (2013). Transcriptome analyses of *Arabidopsis thaliana* seedlings grown in space: implications for gravity-responsive genes. *Planta*, 238, pp. 519-533. doi: <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1909-x>

11. Romanchuk, S. N. & Kordyum, E. L. (2014). ER bodies in *Arabidopsis thaliana* seedlings are sensitive to simulated microgravity and ionizing radiation. ELGRA Newsletter, 9, pp. 10-11.
12. Matsushima, R., Hayashi, Y., Kondo, M., Shimada, T., Nishimura, M. & Hara-Nishimura, I. (2002). An endoplasmic reticulum derived structure that is induced under stress conditions in *Arabidopsis*. Plant Physiol., 130, pp. 1807-1814. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.009464>
13. Ogasawara, K., Yamada, K., Christeller, J. T., Kondo, M., Hatsugai, N., Hara-Nishimura, I. & Nishimura, M. (2009). Constitutive and inducible ER bodies of *Arabidopsis thaliana* accumulate distinct  $\beta$ -glucosidases. Plant Cell Physiol., 50, No. 3. pp. 480-488. doi: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp007>
14. Matsushima, R., Fukao, Y., Nishimura, M. & Hara-Nishimura, I. (2004). NAI1 gene that encodes a basic-helix-loop-helix-type putative transcription factor that regulates the formation of a novel ER-derived structure, the ER body. Plant Cell, 16, pp. 1536-1549. doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.021154>
15. Sherameti, I., Venus, Y., Drzewiecki, C., Tripathi, S., Dan, V. M., Nitz, I., Varma, A., Grundler, F. M. & Oelmüller, R. (2008). PYK10, a  $\beta$ -glucosidase located in the endoplasmic reticulum, is crucial for the beneficial interaction between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic fungus *Piriformospora indica*. Plant J., 54, pp. 428-439. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03424.x>

Received 28.02.2019

С.Н. Романчук

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев  
E-mail: rrsn@ukr.net

#### ВЛИЯНИЕ X-ОБЛУЧЕНИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА $\beta$ -ГЛЮКОЗИДАЗЫ PYK 10 В ПРОРОСТКАХ *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH.

Впервые исследована экспрессия гена  $\beta$ -глюкозидазы PYK 10 в проростках *A. thaliana* при действии X-облучения в дозах 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 и 12 Гр. Установлено, что при X-облучении увеличение количества ЭР-телец и повышение активности  $\beta$ -глюкозидазы происходит за счет высокой экспрессии гена PYK 10. Впервые показана роль ЭР-телец, которые содержат  $\beta$ -глюкозидазу (PYK 10), в адаптации проростков *A. thaliana* на действие X-облучения. Повышение экспрессии гена PYK 10 при этих условиях является частью внутренней программы защиты на воздействие внешних факторов.

**Ключевые слова:** ген PYK 10,  $\beta$ -глюкозидаза, ЭР-тельца, X-облучение, *Arabidopsis thaliana*.

S.M. Romanchuk

M.G. Kholodny Institute of Botany of the NAS of Ukraine, Kiev  
E-mail: rrsn@ukr.net

#### THE EFFECT OF X-IRRADIATION ON $\beta$ -GLUCOSIDASE PYK 10 GENE EXPRESSION IN *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. SEEDLINGS

We have firstly investigated the expression of  $\beta$ -glucosidase PYK 10 gene in *A. thaliana* seedlings under X-radiation doses of 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, and 12 Gy. An increase in the number of ER-bodies and the  $\beta$ -glucosidase activity correlates with the enhancement of the PYK 10 expression. The increased PYK 10 expression in *A. thaliana* seedlings under X-radiation is a part of the internal program of plant protection against the action of environmental factors. ER-bodies containing  $\beta$ -glucosidase may be one of the main components of a plant protection system from the influence of X-radiation.

**Keywords:** gene PYK 10,  $\beta$ -glucosidase, ER-bodies, X-radiation, *Arabidopsis thaliana*.