

О. І. Мартиненко, Т. К. Кириленко, А. В. Степанюгін,
Д. П. Плоднік, член-кореспондент НАН України Д. М. Говорун

Як впливають екзогенні хімічні чинники на активність геному пшениці? Вивчення з використанням співвідношення РНК/ДНК

Досліджено відповідь рослин пшениці на дію хімічного чинника (метисазон) на рівні реакції геному із залученням співвідношення РНК/ДНК. Встановлено диференційний характер функціонування геному пшениці в процесі росту за даними співвідношення РНК/ДНК та показниками транскрипційної активності рибосомних генів. Виявлено існування різноспрямованих змін величин співвідношення РНК/ДНК та швидкості росту листків у всіх досліджуваних рослин, що підтверджується наявністю негативної кореляції між цими параметрами. Запропоновано величину співвідношення РНК/ДНК використовувати для кількісної оцінки ступеня впливу хімічних чинників на функціональну активність рослинного геному та швидкість росту.

З-поміж найбільш обговорюваних проблем сучасної фітобіології є питання, пов'язані з особливостями розвитку рослин та їхньою здатністю динамічно реагувати на впливи екзогенних чинників різної природи. Розуміння механізмів стрес-відповіді рослин важливо як для фундаментальної науки, так і для розробки практичних прийомів їхнього вирощування. Відомо, що відповідь рослин на дію екзофакторів формується на різних рівнях організації рослинного організму і ґрунтується на взаємодії молекулярних, біохімічних і фізіологічних процесів. Про ключову роль рослинного геному в адаптаційних процесах свідчить великий масив даних щодо ідентифікації генів, генних продуктів, їхніх функцій і взаємодії, отриманих новими високопродуктивними методами транскриптомного, протеомного та метаболомного аналізу, результати секвенування рослинних геномів, а також дослідження клітинних регуляторних механізмів [1]. Згідно із сучасними уявленнями [2] прояв властивостей біологічних систем, зокрема у відповідь на дію певних чинників, зумовлюється скоординованою взаємодією всіх внутрішньосистемних компонентів. Однією з важливих ланок такої системи зв'язків рослинного організму є взаємозв'язок функціонального стану геному та швидкості росту як генетично детермінованого показника інтегральної скоординованої стрес-відповіді. Останнім часом у дослідженнях реакції генетичного апарату рослин на дію різних чинників спостерігається тенденція до переходу від аналізу ролі обмеженого числа генів до моніторингу загальної динаміки біологічних циклів [3]. Функціональну активність геному як цілісної високоорганізованої структури досліджено для деяких видів рослин за допомогою ДНК-РНК-гібридизації та місгоагау-технологій [4, 5]. (Нині дані щодо особливості загального функціонування геному пшениці та у відповідь на дію хімічних чинників у літературі відсутні). Проте можливість застосування для цього співвідношення РНК/ДНК як одного із швидких надійних і загальнодоступних методів майже не розглядалася. У своїх дослідженнях як хімічний чинник ми застосували метисазон, відомий своєю антивірусною та антибактерійною дією [6]. Проте вплив цього препарату на розвиток рослин вивчено недостатньо.

© О. І. Мартиненко, Т. К. Кириленко, А. В. Степанюгін, Д. П. Плоднік, Д. М. Говорун, 2014

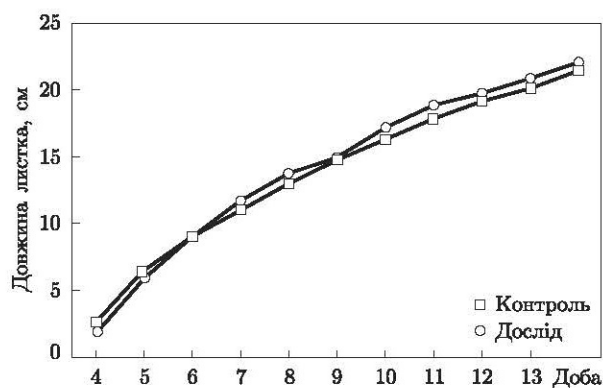


Рис. 1. Зміна середньої довжини листків контрольних і дослідних проростків пшениці у часі

У зв'язку з вищевказаним ми ставили за мету оцінити функціональну активність геному пшениці у часі (ранні фази онтогенезу) за співвідношенням РНК/ДНК та методом нозерн-гібридизації, встановити залежність між змінами показників РНК/ДНК-співвідношення і швидкості росту листків проростків пшениці та дослідити чутливість цих параметрів до дії хімічного чинника — метисазону.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проводили на проростках пшениці, вирощених у лабораторних умовах на твердому субстраті (пісок) при 23–25 °С та природному освітленні. Насіння перед посадкою зволожували та одноразово обробляли протягом 1 год препаратом метисазону (у фармації відомий під назвою ізатизон).

Щоденно, починаючи з 4-ї доби розвитку рослин, протягом 15 діб визначали швидкість росту за даними приросту листків пшениці згідно з [7], загальний вміст нуклеїнових кислот (НК) у тканинах листків та обчислювали величину співвідношення РНК/ДНК. Спектрофотометричну оцінку кількісного вмісту НК безпосередньо в листках проростків здійснювали за методом Спірина (1958) з деякими модифікаціями умов послідовного гідролізу одного і того самого рослинного зразка різними хімічними чинниками (0,5 N KOH, 67 °С, 1 год, а потім 0,5 N HClO₄, 90 °С, 20 хв [8]) з подальшим спектрофотометричним аналізом лужних (РНК) та кислотних (ДНК) фракцій стандартним способом. Для гібридизаційних експериментів виділення та очищення препаратів РНК з рослинних тканин проводили сумішшю хлороформу та спеціально розробленого нами буферу [8].

Для нозерн-дот-аналізу підготовку і нанесення на нейлонові фільтри Hybond-N (“Amersham”, Велика Британія) аліквот сумарного препарату РНК пшениці проводили відповідно до рекомендацій [9]. Мічення ДНК дигоксигеніном-dUTP (DIG), нозерн-гібридизацію фільтрів з DIG-міченим ДНК-зондом (фрагмент гена рибосомної 18S РНК гороху в складі плазміди Bluescript), відмивання фільтрів та хемілюмінесцентну детекцію гібридизаційних продуктів здійснювали за протоколом фірми Boehringer Mannheim, Німеччина.

Результати та їх обговорення. Показано, що передпосівна обробка насіння метисазоном не спричиняє у проростках пшениці помітних морфологічних змін (істотного інгібування ростових процесів, потемніння кореневої системи, появи некротичних ознак тощо) (рис. 1). Проте на рівні функціонування геному між контрольними і дослідними варіантами спостерігаються істотні відмінності.

Для опису динаміки змін загального функціонального стану геному пшениці як цілісної структури під час росту рослин було застосовано експериментальний підхід, що ґрунтується на використанні значень співвідношення РНК/ДНК. Для цього визначали щодобові рівні

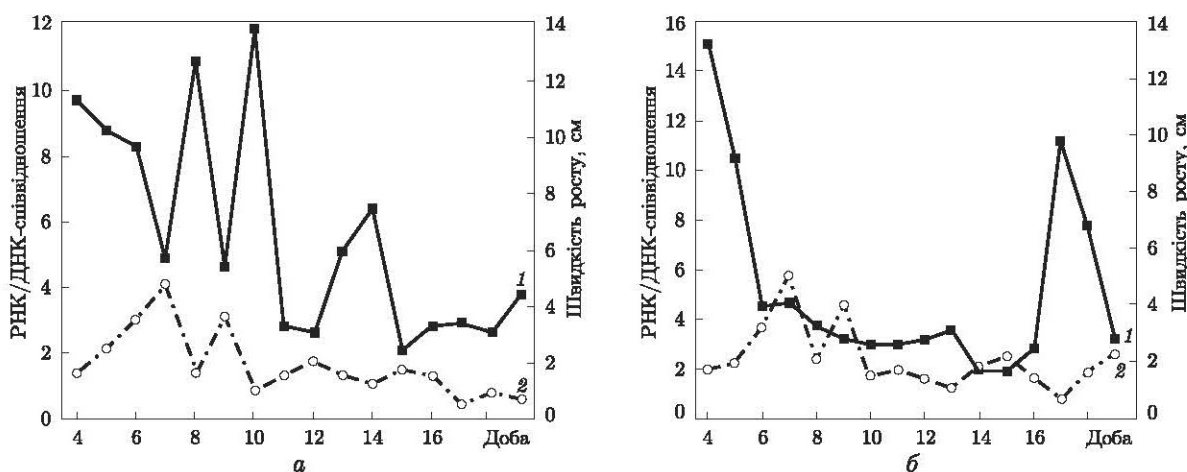


Рис. 2. Динаміка змін величин співвідношення РНК/ДНК та швидкості росту листків контрольних (а) та дослідних (б) проростків пшениці:
1 – РНК/ДНК-співвідношення; 2 – швидкість росту

вмісту РНК і ДНК у листках проростків. Розрахунок співвідношення тотальної РНК до тотальної ДНК дав змогу визначити кількість РНК на одиницю ДНК у середньостатистичній клітині листків пшениці. Оскільки кількість клітинної РНК може варіювати залежно від багатьох факторів, у тому числі і від транскрипційної активності геному, тоді як кількість ДНК на клітину є зазвичай величиною стабільною [10], співвідношення РНК/ДНК розглядається як один з основних інтегральних кінетичних індикаторів багатьох внутрішньоклітинних фундаментальних процесів, зокрема як можливий показник частини геному, що функціонує. На основі даних 15-добового моніторингу динаміки змін величини цього показника в листках пшениці побудовано відповідні графіки для контрольних та дослідних проростків пшениці (рис. 2). Встановлено, що за дії метисазону в клітинах листків пшениці порівняно з контрольними зразками майже на всіх досліджуваних проміжках часу спостерігалася різноспрямована зміна значень співвідношення РНК/ДНК: максимумам дослідних проростків (4-та, 17-та доба) відповідали мінімальні значення контрольних зразків та навпаки (8-ма, 10-та та 14-та доба). Показано, що під час росту проростків діапазон значень РНК/ДНК-індексу становив 12,3–2,1 (контроль) та 16,5–1,9 (дослід). Якщо вважати, що екстремуми спостерігаються тоді, коли максимально зростає транскрипційна активність генетичного апарату рослин, то виявлені нами варіювання максимальних значень співвідношення РНК/ДНК під час росту відображують диференційний характер перебігу цього процесу в клітинах листків пшениці, якому властива квазіперіодичність.

Отримані дані узгоджуються з інформацією щодо існування диференційної експресії рослинного геному, встановленої методами молекулярної гібридизації для рослин тютюну, гороху, буряку, соняшнику тощо [11]. Додатковою підставою вважати величину співвідношення РНК/ДНК індикатором загального функціонального стану геному та білоксинтезуючої системи клітин пшениці стали дані щодо подібності профілів онтогенетичних змін величини РНК/ДНК-індексу та транскрипційної активності рибосомних генів, які належать до тих, що найбільш функціонують у клітині. Для цього рослини відбирали в певні періоди росту (4–6-та доба; 9–12-та доба та 16–19-та доба) та досліджували вміст рРНК-транскриптів у клітинах їхніх листків. Результати нозерн-гібридизації наведено на рис. 3. У дослідних зразках зростання синтезу рРНК спостерігали на 4-ту та 16–19-ту добу росту рослин

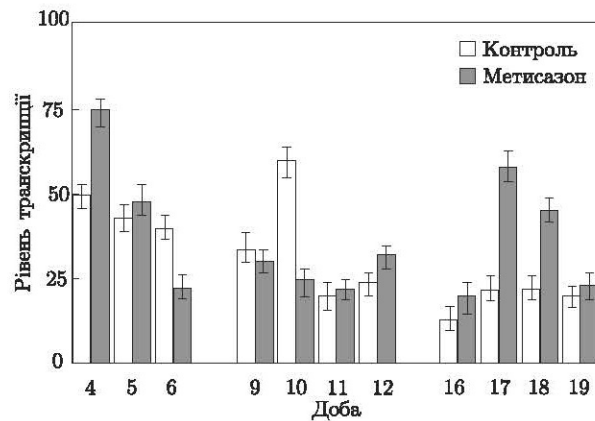


Рис. 3. Рівень транскрипційної активності рибосомних генів у листках контрольних та дослідних проростків пшениці під час росту

(максимум — на 4-ту та 17-ту добу), тоді як у контрольних подібні зміни транскрипційної активності рибосомних генів зафіксовано на 9–11-ту добу росту (максимум — на 10-ту добу). Зіставлення профілів онтогенетичних варіацій транскрипційної активності рибосомних генів і коливань значень РНК/ДНК-індексу в листках пшениці виявило повну відповідність отриманих результатів як для контрольних, так і для дослідних варіантів. Таким чином, було експериментально доведено існування узгодженості між результатами двох незалежних методів щодо оцінки функціонального стану геному пшениці.

Порівняння характеру онтогенетичних змін показників РНК/ДНК-співвідношення у дослідних і відповідних контрольних проростках пшениці виявило здатність метисазону індукувати зниження рівнів диференційної активності геному та змінювати його ритміку на протилежну порівняно з контролем майже на всіх досліджуваних проміжках часу. Згідно з отриманими результатами, превентивна обробка зерна пшениці цим хімічним чинником призводить до істотних пролонгованих змін, які виявляються на загальному рівні функціонування геному за допомогою РНК/ДНК-співвідношення. Ці дані вказують на існування в клітинах рослин пшениці метисазончутливих регуляторних механізмів, спрямованих, імовірно, на активацію адаптаційно-компенсаторних і захисних систем. Підсилює ці припущення встановлений нами за допомогою РНК/ДНК-індексу ектопічний характер диференційної активності геному пшениці під впливом метисазону. Такі зміни можуть опосередковано відображувати активацію певних наборів генів і, як наслідок, реорганізацію метаболічного статусу рослин, що може підвищувати їхню стійкість і життєздатність за різних умов [12, 13]. Крім того, показано, що ектопічна експресія навіть окремих компонентів, залучених у формування відповіді рослин на абіотичні та біотичні стреси, призводить до підвищення стрес-толерантності рослинних організмів [14].

Одночасно з визначенням значень співвідношення РНК/ДНК для контрольних та дослідних варіантів пшениці обчислювали величину щодобового приросту довжини листків відповідних проростків під час їхнього росту. Зіставлення показників активності геному, виміряного за співвідношенням РНК/ДНК, та відповідних значень швидкості росту листків пшениці виявило різноспрямовані зміни цих показників у всіх досліджуваних зразках пшениці. Це підтвердилося даними щодо наявності негативної лінійної кореляції між цими параметрами для контрольних та дослідних зразків. Лінійну регресію, яка описує зв'язок між параметрами “зміна значень РНК/ДНК-співвідношення” та “зміна швидкості росту”, можна

описати рівнянням $y = -0,61x - 0,09$ ($R^2 = 0,22$, $p < 0,05$) (контроль) і $y = -0,96x - 0,07$ ($R^2 = 0,47$, $p < 0,05$) (дослід). Отримані дані свідчать про існування скоординованого зв'язку між цими параметрами в клітинах пшениці та його чутливості до дії метисазону, який виявляється за допомогою співвідношення РНК/ДНК.

Таким чином, результати дослідження показали, що пшениця чутлива до дії метисазону. Застосування співвідношення РНК/ДНК дало можливість у стислі терміни визначити відмінності в характері функціональної активності геному пшениці під впливом хімічного чинника. Ці дані корисні для розуміння принципів функціонування рослинних геномів та пошуку відповідних змін на структурному рівні. Пропонуємо співвідношення РНК/ДНК використовувати для кількісної оцінки ступеня впливу хімічного чинника на функціональну активність рослинного геному та швидкість росту рослин.

Автори висловлюють щирю вдячність А. І. Потопальському за наданий препарат Ізатизон.

1. Hirayama T., Shinozaki K. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present, and future // Plant J. – 2010. – **61**. – P. 1041–52.
2. Ideker T., Galitski T., Hood L. A new approach to decoding life: systems biology // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. – 2001. – **2**. – P. 343–372.
3. Long T. A., Brady S. M., Benfey P. N. Systems approaches to identifying gene regulatory networks in plants // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. – 2008. – **24**. – P. 81–103.
4. Rockman M. V., Kruglyak L. Genetics of global gene expression // Nature Rev. Genet. – 2006. – **7**. – P. 862–872.
5. Heinrich S., Valentin K., Frickenhaus S. et al. Transcriptomic Analysis of acclimation to temperature and light stress in *Saccharina latissima* (Phaeophyceae) // PLoS ONE. – 2012. – **7**, Iss. 8. – P. e44342.
6. Quenelle D. C., Keith K. A., Kern E. R. In vitro and in vivo evaluation of isatin-beta-thiosemicarbazone and marboran against vaccinia and cowpox virus infections // Antiviral Res. – 2006. – **71**, Iss. 1. – P. 24–30.
7. Levin H. G., Sharek K. M., Johnson K. M. et al. Growth protocols for etiolated soybeans germinated within BRIC – 60 canisters under spaceflight conditions // Adv. space res. – 2000. – **26**, No 2. – P. 311–314.
8. Мартиненко О. І., Кириленко Т. К., Алхімова О. Г. Новий експрес-метод виділення та очищення сумарних препаратів ДНК та РНК з рослин // Доп. НАН України. – 2009. – № 2. – С. 179–183.
9. Short protocols in molecular biology / Eds. F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston et. al. – 4th ed. – New York: Wiley, 1999. – P. 4–26.
10. Chicharo M. A., Chicharo L. RNA: DNA ratio and other nucleic acid derived indices in marine ecology // Int. J. Mol. Sci. – 2008. – **9**. – P. 1453–1471.
11. Тищенко Е. Н., Курчий В. М., Петров И. А. Вариабельность ДНК в морфогенезе листьев сахарной свеклы и подсолнечника // Укр. біохім. журн. – 1999. – **71**, № 5. – С. 29–33.
12. Van Katz V. A., Thulke O. U., Conrath U. A. A benzothiadiazole primes parsley cell for augmented elicitation of defense responses // Plant Physiol. – 1998. – **117**. – P. 1333–1339.
13. Kharina A., Zaets I., Ovcharenko L. et al. Elicitation and protective effect of preventive isatizon treatment of Tobacco Mosaic Virus in *Nicotiana* // Sepsis. – 2011. – **4**, No 1. – P. 73–78.
14. Umezawa T., Fujita M., Fujita Y. et al. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future // Curr. opinion biotechnol. – 2006. – **17**, No 2. – P. 113–122.

*Інститут молекулярної біології
і генетики НАН України, Київ
Інститут високих технологій Київського
національного університету
ім. Тараса Шевченка, Київ*

Надійшло до редакції 31.07.2013

Е. И. Мартыненко, Т. К. Кириленко, А. В. Степанюгин, Д. П. Плодник,
член-корреспондент НАН Украины Д. Н. Говорун

Как влияют экзогенные химические факторы на активность генома пшеницы? Изучение с использованием соотношения РНК/ДНК

Исследован ответ растений пшеницы на действие химического фактора (метисазон) на уровне реакции генома с использованием соотношения РНК/ДНК. Установлен дифференциальный характер функционирования генома пшеницы в процессе роста согласно данным соотношения РНК/ДНК и показателям транскрипционной активности рибосомных генов. Выявлено существование разнонаправленных изменений величины соотношения РНК/ДНК и скорости роста листьев всех исследованных растений, что подтверждается наличием негативной корреляции между этими параметрами. Предложено величину соотношения РНК/ДНК использовать для количественной оценки степени влияния химических факторов на функциональную активность растительного генома и скорость роста.

O. I. Martynenko, T. K. Kyrylenko, A. V. Stepanyugin, D. P. Plodnik,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine D. M. Hovorun

How do exogenous chemical factors affect the activity of the wheat genome? A study using the RNA/DNA ratio

This paper presents a study of the wheat plant response to the effect of the chemical factor (methisazon) at the level of genome reaction using the RNA/DNA ratio. We established a differential character of the wheat genome functioning in the process of growth using the RNA/DNA ratio and indicators of the transcriptional activity of ribosomal genes. We found the opposite directionality of changes in the RNA/DNA ratio and in the growth rate of leaves in all studied plants. This finding is supported by the presence of a negative correlation between these parameters. We suggest to use the RNA/DNA ratio for the quantitative evaluation of the impact level of chemical factors on the functional activity of the plant genome and the growth rate of plants.