

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ В НОРМАЛЬНОЙ И МОРФОЛОГИЧЕСКИ АНОМАЛЬНОЙ ХВОЕ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩЕЙ В ЗОНЕ ОТЧУЖДЕНИЯ ЧАЭС

Л. Б. Зеленая, Б. В. Сорочинский

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев

Проведен сравнительный анализ экспрессии 373 генов в нормальной и морфологически аномальной хвое сосны обыкновенной, произрастающей в зоне отчуждения ЧАЭС. Обнаружены отличия в уровне экспрессии ряда генов, при этом отмечена закономерность возрастания в тканях морфологически аномальной хвои уровня экспрессии нуклеотидных последовательностей, кодирующих убиквитин-связывающий фермент и аскорбат пероксидазу.

Введение

Известно, что ионизирующее излучение влияет на процессы роста и развития хвойных растений, что, в свою очередь, может привести к возникновению разнообразных морфологических аномалий. В частности, возросший уровень аномального морфогенеза отмечен в зоне отчуждения ЧАЭС, что может быть обусловлено хроническим облучением хвойных растений. Спектр морфологических аномалий, выявленных у хвойных растений, довольно широк [1]. Среди них - многопочечность, израстание почечных чешуй, вторичные приросты, гигантизм листового аппарата, побеги с укороченным приростом. Одной из наиболее распространенных аномалий морфогенеза является изменение линейных размеров хвои. По-видимому, изменение морфологических характеристик должно быть обусловлено изменением экспрессии генов. С целью изучения биохимических особенностей аномальных и контрольных органов был проведен сравнительный анализ экспрессии генов, ответственных за сохранение и обработку информации и отвечающих за разные внутриклеточные процессы. Одним из методов, позволяющих изучать экспрессию генов, является метод микроматриц (microarray analysis) [2]. Данный метод основан на гибридизации транскриптов с матрицей, состоящей из молекул ДНК, связанных с носителем, и позволяет анализировать экспрессию десятков тысяч генов одновременно.

Материалы и методы исследований

Как объект исследования использовали хвою пяти 7 - 12-летних растений сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*), произрастающей в зоне ЧАЭС. Образцы хвои собирали в январе 2001 г. в районе с. Янов на посадках, расположенных в пунктах временного захоронения и локализации радиоактивных отходов (ПВЗЛРО). Мощность внешнего облучения составляла 1мР/ч.

Измерение линейных размеров экспериментальных образцов показало, что длина контрольной хвои 60 ± 4 мм, а морфологически аномальной – 19 ± 3 мм.

Таблица 1. Функциональные группы исследуемых транскриптов

№ группы	Название функциональной группы	Количество генов
1	Сохранение и обработка информации	33
2	Клеточные процессы	164
3	Метаболизм	86
4	Неохарактеризованные	90
	Всего	373

Проводили гибридизацию РНК, выделенной из нормальной и морфологически аномальной хвои сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*), с 373 нуклеотидными последовательностями, полученными из ДНК сосны ладанной (*Pinus taeda*), согласно [3]. Исследуемые гены были разделены на четыре функциональные категории согласно информации на сайте <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/> (табл. 1).

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты проведенной гибридизации показали, что уровень экспрессии анализируемых нуклеотидных последовательностей отличается в тканях нормальной и морфологически аномальной хвои. Используя t-test, были отобраны гены, изменение уровня экспрессии для которых оказалось статистически достоверным ($p < 0.01$). Общее количество таких генов варьировало от 32 до 64 генов, при этом изменение уровня экспрессии в морфологически аномальных тканях по отношению к контрольным показателям наблюдалось среди генов, относящихся ко всем функциональным группам (табл. 2). Данный факт может свидетельствовать о том, что процесс аномального морфогенеза затрагивает гены, продукты которых принимают участие во многих клеточных процессах.

При объединении генов, проявивших разный уровень экспрессии в контрольных и аномальных тканях хвои сосны, было обнаружено, что общий спектр дифференциально экспрессирующихся генов состоит из 185 генов, что составляет половину всех анализируемых транскриптов. При распределении 185 отобранных генов между функциональными группами сохранялась закономерность уменьшения количества генов приблизительно в два раза по отношению к количеству транскриптов, представленных для исследования, а процентные доли каждого из наборов практически совпадают (табл. 3).

Таблица 2. Распределение генов, уровень экспрессии которых отличается в тканях морфологически аномальной хвои сосны, между функциональными группами

№ группы	№ образца				
	1	2	3	4	5
1	3	5	3	4	4
2	28	22	16	21	16
3	14	12	11	14	4
4	19	14	9	9	8
Всего	64	53	39	48	32

Таблица 3. Распределение генов, уровень экспрессии которых отличается в контрольных и морфологически аномальных тканях сосны, и генов, используемых для анализа, между функциональными категориями (см. табл. 1)

Всего	№ группы			
	1	2	3	4
185 (100 %)	17 (9 %)	74 (40 %)	45 (24 %)	50 (27 %)
373 (100 %)	33 (8.85 %)	164 (43.97 %)	86 (23.05 %)	90 (24.13 %)

Дальнейший анализ генов, уровень экспрессии которых отличается в морфологически аномальной хвое по сравнению с контрольной хвоей, выявил, что изменение уровня 42 транскриптов отмечено при сравнении образцов, собранных с двух деревьев. Из 42 для генов, кодирующих арабиногалактан-подобный белок и белок клеточной стенки, возрастание уровня экспрессии обнаружено в морфологически аномальной хвое с трех растений сосны, а уровень экспрессии гена убиквитин-связывающего фермента и гена аскорбат пероксидазы повысился во всех образцах морфологически аномальной хвои по отношению к контрольным данным. Следует отметить, что убиквитин-связывающий фермент и аскорбат пероксидаза принимают участие в процессах развития растения и в ответе организма на стрессовые условия [4, 5].

Изменение морфологических показателей является результатом ряда изменений, происходящих на различных уровнях организации организма. Как было показано ранее, в морфологически аномальной хвое сосны обыкновенной обнаружено увеличение количества

клеток с нарушениями митотического аппарата и хромосомными абберациями по сравнению с контрольными показателями [6]. В результате проведенных в данной работе исследований было показано, что процесс аномального морфогенеза может быть обусловлен изменением уровня экспрессии значительной части генов (в нашей работе изменение уровня экспрессии происходило у каждого второго анализируемого гена). Кроме того, было отмечено увеличение или уменьшение уровня транскриптов, которые отвечают за основные процессы, происходящие в клетке: сохранение и обработка информации, клеточные процессы (включающие транспорт ионов и механизм сигнальной трансдукции) и метаболизм. Таким образом, в процессе аномального морфогенеза происходят изменения в функциональной части генома, что отображается в увеличении или уменьшении уровня экспрессии ряда генов. Воздействие внешнего хронического облучения на хвойные растения в зоне отчуждения ЧАЭС, по-видимому, является тем фактором, который способен вызвать изменение экспрессии отдельных генов, что, в свою очередь, проявляется в нарушениях процесса морфогенеза и образовании морфологических аномалий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Козубов Г.М., Таскаев А.И. Радиобиологические и радиозэкологические исследования древесных растений. - СПб: Наука, 1994. - 256 с.
2. Schena M., Shalon D., Davis R., Brown P. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray // Science. - 1995. - Vol. 270. - P. 467 - 470.
3. van Zyl L., von Arnold S., Bozhkov P., Chen Y., Egertsdotter U., MacKay J., Sederoff R., Shen J., Clapham D. Heterologous array analysis in Pinaceae: Hybridization of high density arrays of *Pinus taeda* cDNA with cDNA from needles and embryogenic cultures of *P. taeda*, *P. sylvestris* or *Picea abies* // (in press).
4. Cushman J., Bohnert H. Genomic approaches to plant stress tolerance // Curr. Opin. Plant Biol. - 2000. - Vol. 3. - P. 117 - 124.
5. Ingvarsdson C., Veierskov B. Ubiquitin- and proteasome-dependent proteolysis in plants // Physiol. Plant. - 2001. - Vol. 112. - P. 451 - 459.
6. Зеленая Л.Б., Сорочинский Б.В., Гродзинский Д.М. Особенности кариотипа тканей сосны *Pinus sylvestris*, сформировавших морфологические аномалии в условиях зоны отчуждения ЧАЭС // Доп. НАН України. - 2002. - № 1. - С. 171 - 174.

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ГЕННОЇ ЕКСПРЕСІЇ В НОРМАЛЬНІЙ ТА МОРФОЛОГІЧНО АНОМАЛЬНІЙ ХВОЇ СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ, ЩО РОСТЕ В ЗОНІ ВІДЧУЖЕННЯ ЧАЭС

Л. Б. Зелена, Б. В. Сорочинський

Проведено порівняльний аналіз експресії 373 генів у нормальній та морфологічно аномальній хвої сосни звичайної, що росте в зоні відчуження ЧАЭС. Виявлено відмінності в рівні експресії ряду генів, при цьому відмічено закономірність зростання у тканинах морфологічно аномальної хвої рівня експресії нуклеотидних послідовностей, що кодують убіквітин-зв'язуючий фермент та аскорбат пероксидазу.

THE COMPARATIVE ANALYSIS OF GENE EXPRESSION BETWEEN NORMAL AND MORPHOLOGICALLY ABNORMAL NEEDLES OF SCOTS PINE GROWING IN THE CHERNOBYL EXCLUSION ZONE

L. B. Zelena, B. V. Sorochinsky

The comparative analysis of 373 genes expression between normal and morphologically abnormal needles of Scots pine growing in the Chernobyl Exclusion zone was carried out. Differences among genes expression of genes number were revealed, the increasing of expression level of genes coding ubiquitin-conjugating enzyme and ascorbate peroxidase was registered.

Поступила в редакцію 11.02.02,
после доработки - 17.09.02.