

Р. Т. Ріпецький, Я. Д. Хоркавців, О. В. Лобачевська, Н. А. Кіт

**Адаптація клону моху *Pottia intermedia* до ртуті***(Представлено академіком НАН України Д. М. Гродзинським)*

*To differentiate between the physiologic and genetic adaptations in the clone from an individual gametophyte cell of moss *Pottia intermedia*, the small explants of leaf plates were regenerated on the Knop-agar medium containing 0.5–1.7  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$ . The survival percentage was found to be 38.5–1.1%, respectively, elevating with increase of the explant size in plants and recloned from a lower  $\text{HgCl}_2$  concentration to higher ones. As compared with the mutation rate, the high survival percentage can be regarded as a consequence of metal-induced permanent adaptive epigenetic changes. The area of unilaminate leaflets of mosses recloned from the metal-containing medium on the control one is enlarged by 2.4–3.2 times, while the leaf cell area remains constant, indicating the increase of the cell division rate. The intensity of the luminescence of nuclear DNA-acridine orange in plants adapted to mercury exhibited the pronounced tendency to increase, while a decrease of the DNA-AO luminescence of nuclei after the treatment with DNase 1 was more weakly expressed in plants survived on mercury than in control ones. The results suggest that the genetic adaptation in the moss clone can be caused by the amplification of certain DNA sites related to the mitotic activity.*

Останнім часом дедалі більше дослідників дотримуються думки, що генотипна адаптація відбувається внаслідок відбору не лише випадкових генних мутацій, а й епігенетичних змін, які звичайно мають пристосувальний характер і виникають значно частіше, ніж мутації, та з більшою або меншою стійкістю зберігаються в клітинних поділах [1]. Такі зміни не стосуються первинної послідовності нуклеотидів ДНК, а пов'язані переважно з метилюванням ДНК та модифікацією гістонів [2, 3]. Більшість дослідників надають перевагу з'ясуванню молекулярних механізмів епігенетичних змін, тоді як дослідження їх ролі у генотипній адаптації лише розпочинається.

Листяні мохи — зручна модель експериментального дослідження епігеномного успадкування, тому що у цих рослин можна легко отримати клони з окремих клітин. Клоном слід вважати дернинку моху, що утворилася з однієї гаплоїдної мейоспори, а здатність окремих клітин гаметофіта і спорофіта регенерувати протонемою дає можливість отримувати клони із різно диференційованих клітин. Оскільки листостеблові пагони (гаметофори) мохів утворюються із бокового відгалуження однієї клітини каулонами, клоном слід вважати [4] і регенерант окремого гаметофора.

Щоб з'ясувати, як клон моху з однієї клітини адаптується до дії іонів ртуті — найтоксичнішого для мохів важкого металу, експлантати клону, максимально вирівняні морфологічно та фізіологічно, вирощували на живильному агаризованому середовищі з чимраз більшими концентраціями  $\text{Hg}^{2+}$ . Моделюючи ситуацію дистресу [5], коли доза стресового фактора сягає порогу, поза яким рослина не може вже компенсувати його дію, ми намагалися розрізнити фенотипну, фізіологічну адаптацію [6] від генотипної, що неминуче повинна б супроводжуватися відмиранням частини експлантатів. Епігенетичний характер змін оцінювали, враховуючи частоту виживання експлантатів на середовищі з ртуттю та аналізуючи ріст дернинок після реклонування рослин, що вижили за дії ртуті, на середовище з металом і без металу.

Згідно із сучасними даними [7, 8], стабільність змін активності генів в умовах стресу пов'язують із змінами в кількості та якості повторів нуклеотидів некодуєчої ДНК. Остання зосереджена переважно в більш компактному хроматині і функціонує як медіатор між стрес-фактором і експресією гена. Оскільки активні гени звичайно чутливіші до дії нуклеази, ніж неактивні [9], ми аналізували вплив ртуті на функціональний стан ядерної ДНК залежно від чутливості до ДНКази I.

**Методика досліджень.** У роботі використано клон, отриманий регенерацією одного листка гаметофора із стерильної культури моху *Pottia intermedia* (зразок № 85). На живильному середовищі листок моху регенерував протонемою, на якій утворювалися гаметофори. Завдяки періодичній регенерації та пересадженню підтримували стерильну культуру клону різного віку — від протонемі до 1–2-місячних гаметофорів.

Листки площею приблизно  $0,05 \text{ мм}^2$ , з верхньої частини гаметофорів одного віку регенерували на Кноп-агарі з різним вмістом  $\text{HgCl}_2$ . До 10 мл розплавленого теплового Кноп-агару вносили 10, 20 і 30 мкл розчину  $0,55 \text{ мМ HgCl}_2$ , агар розливали у 6-см чашки Петрі та отримували кінцеві концентрації 0,5; 1,0 і 1,7 мкМ  $\text{HgCl}_2$ . В одну чашку клали на регенерацію 60–70 листків. Дослід проводили у контрольованих умовах освітлення — 2200–2500 лк, температури —  $20\text{--}25^\circ$  і 16 год фотоперіоді. Через 5–7 діб під біокулярним мікроскопом МБС-1 визначали відсоток експлантатів, що вижили. На 30-ту добу досліді під мікроскопом “Jenaval” вимірювали висоту гаметофорів, які росли на середовищах з різною концентрацією  $\text{HgCl}_2$ , довжину і ширину одношарових листків та їх клітин.

Для аналізу ДНК використовували методику флуорохромування акридиноним оранжевим (АО) Р. Ріглера [10], а для обробки протонемою ДНКазою I — метод, описаний у роботі Р. Блокленда [9]. Матеріалом для дослідження була протонема, що росла на середовищі без металу і на середовищі за наявності 0,5 нМ та 0,5 мкМ  $\text{HgCl}_2$ . Протонему фіксували у ФОС (3,7% формальдегід : 5% оцтова кислота : 50% спирт) протягом 20 хв при кімнатній температурі. Для обробки матеріалу ферментом ДНКазу I („Sigma”) розводили до робочої 0,1 U концентрації трис-буфером (50 мМ *трис*-HCl, рН 8,0, 0,3 М сахароза, 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1,5 мМ NaCl, 5 мМ меркаптоетанол). Для припинення реакції протонему обробляли 50 мМ розчином ЕГТА + ЕДТА, рН 8,0, протягом 20 хв. Контролем була протонема, яку витримували в буфері без ДНКази I. Матеріал забарвлювали, витримуючи протягом 15 хв у 0,1 мМ розчині АО на фосфатному буфері, рН 5,9, і тричі по 15 хв відмивали фосфатним буфером. Після відмивання препарати протонемою у фосфатному буфері монтували на предметні стекла і вимірювали інтенсивність люмінесценції ДНК · АО на мікроскопі ЛЮМАМ.

Досліди повторювали два–три рази, вираховуючи середнє значення кожного параметра не менше ніж з 50 вимірів. Отримані дані опрацьовували статистично.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Толерантність експлантатів потії до ртуті в наших дослідіах зростала зі збільшенням їх розміру. Так, невеликі ізольовані листки потії площею  $0,05 \pm 0,001 \text{ мм}^2$  регенерували 1–3 протонемними столонами і давали початок дернинкам, кількість яких зменшувалась з  $97,7 \pm 0,3\%$  у контролі до  $38,5 \pm 1,5\%$  за наявності у середовищі ртуті в концентрації 0,5 мкМ (табл. 1, рис. 1), за вищих концентрацій ртуті — 1,0 і 1,7 мкМ, відсоток живих листків різко знижувався. Проте стебла гаметофорів з листками чи без листків та їх гомогенати регенерували і за дії значно вищих концентрацій — 2–2,5 мкМ  $\text{HgCl}_2$ , але всі ізольовані листки за таких умов гинули. Вищу регенераційну здатність мала й протонема. Відсоток протонемних столонів, що вижили за дії найвищих концентрацій ртуті, був значно більший порівняно з таким для листків (20% проти 3%). Очевидно, це пов'язано з тим, що клітини фрагментів протонемою під час регенерації швидко

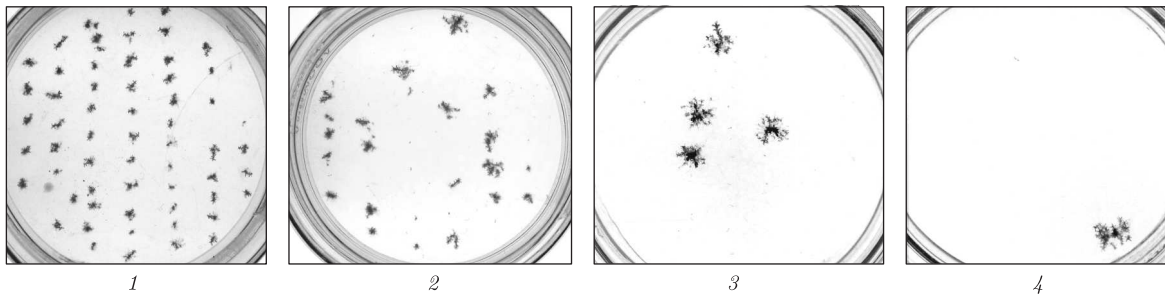


Рис. 1. Вживаність експлантів *Pottia intermedia* на середовищі без ртуті (1) і на середовищах з різною концентрацією  $\text{HgCl}_2$ : 2 — 0,5 мкМ; 3 — 1,0 мкМ; 4 — 1,7 мкМ

відновлюють ріст і поділи, тоді як регенерація протонею стebel чи листків є результатом досить тривалого процесу клітинної дедиференціації. Проте в усіх дослідах встановлена зворотна кореляція між регенераційною здатністю і концентрацією  $\text{HgCl}_2$  у середовищі.

Останнім часом зазнає серйозного критичного перегляду класична концепція генетичної однорідності клонів. Із вдосконаленням методів оцінки рівень інтраклональної мінливості часто виявляється значно вищим, ніж вважалося раніше [11]. Про її високий рівень свідчать спостереження за односпоровими дернинками мохів [12] та дернинками, отриманими внаслідок регенерації окремих гаметофорів моху. Під час вирощування регенерантів гаметофорів *Funaria hygrometrica* інтраклональна мінливість дернинок підвищувалася на середовищі з міддю [4]. Показано, що в корінцях проростків цибулі під впливом важких металів помітно зростала частота хромосомних аберацій [13].

Яким би, однак, широким не був діапазон випадкової інтраклональної мінливості регенерантів потії, практично неможливо уявити, як це могло забезпечити такий високий рівень спрямованості на виживання, що спостерігався на середовищі з ртуттю (див. табл. 1). Залишається припустити, що толерантність до ртуті зумовлена індукцією пристосувальних епігенетичних змін. Наші спостереження не дають підстав стверджувати, що епігенетичні зміни мали характер епімутацій, проте свідчать про значну стійкість та клітинне успадкування індуктованих змін. Дернинки потії якимось чином “запам’ятали” на клітинному рівні події, які дозволили їм вижити на середовищі з ртуттю, і виявилися толерантнішими до металу, ніж контрольні. Так, попереднє вирощування рослин на середовищі з 0,5 мкМ  $\text{HgCl}_2$  посилювало стійкість наступного регенеративного покоління до 1,0 мкМ і навіть 1,7 мкМ  $\text{HgCl}_2$  (рис. 2).

Відзначимо, що пригнічення росту протонеми на субстраті з ртуттю спостерігалось лише на початкових етапах регенерації, а надалі ріст дернинок був такий же, як на середовищі без металу або навіть інтенсивніший (див. рис. 1). Характерно, що гаметофори дернинок, які вижили на середовищі з ртуттю, під час клонування на середовище без металу, формували

Таблиця 1. Регенерація листків *Pottia intermedia* на середовищі з  $\text{HgCl}_2$

| Концентрація $\text{HgCl}_2$ , мкМ | Кількість листків, взятих для регенерації | Кількість листків, що прорегенерували, % |
|------------------------------------|---|--|
| 0                                  | 1183                                      | 97,7 ± 0,4                               |
| 0,5                                | 1091                                      | 38,5 ± 1,5                               |
| 1,0                                | 234                                       | 5,1 ± 1,4                                |
| 1,7                                | 279                                       | 1,1 ± 0,6                                |

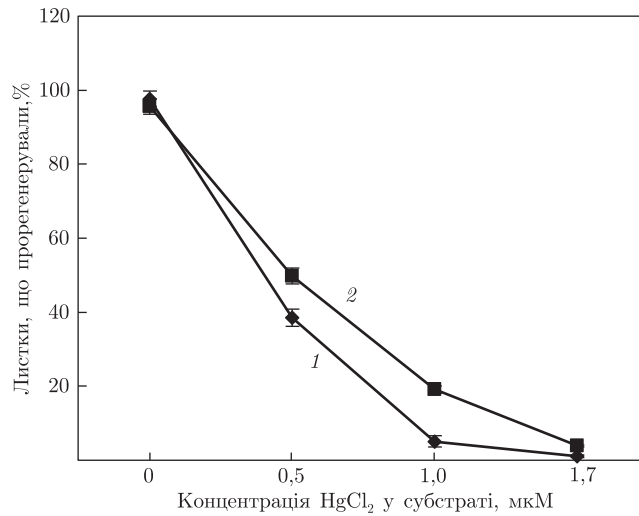


Рис. 2. Регенераційна здатність листків *Pottia intermedia* на середовищі з ртуттю: листки гаметофорів, що виростили в субстраті без ртуті (1) і за наявності 0,5 мкМ HgCl<sub>2</sub> (2)

дернинки з гаметофорами, які росли значно швидше, ніж ті, що утворилися і весь час росли на контрольному середовищі. Так, післядія 1,0 та 1,7 мкМ HgCl<sub>2</sub> виявилася у збільшенні довжини гаметофорів у 1,5 раза і чітко позначилася на розмірах листків, довжина і ширина яких зростала у 1,4 і 2,3 раза відповідно (табл. 2).

Середня площа листків, що приблизно дорівнює добутку довжини листка на ширину, у рослин, які клонували із середовища з 1,0 і 1,7 мкМ HgCl<sub>2</sub> на середовище без металу, була відповідно у 2,3 та 3,5 раза більшою, ніж у контролі. У той же час середня площа клітин листків в обох випадках істотно не відрізнялася від контролю. Це вказує на те, що прискорення росту під впливом ртуті пов'язане зі зростанням темпів клітинних поділів. Очевидно, що стійкі епігенетичні зміни, індуковані ртуттю, стосувалися генів, які контролюють ріст, передусім інтенсивність клітинних поділів. У зв'язку із сказаним варто згадати, що в природі моху *Pottia lanceolata* виявлено хромосомні раси [14], а у печіночника *Conoccephalum conicum* — популяції [15], що відрізнялися між собою лише за інтенсивністю росту.

Деякі зовнішні фактори, нетипові для середовища зростання рослин, іноді спричиняють поліплоїдизацію геному. Відомо, однак, що під впливом різноманітних стресорів, у тому числі важких металів, унаслідок ампліфікації та транспозицій часто відбуваються істотні зміни в кількості та якості нуклеотидних повторів некодуєчої ДНК. Остання зосереджується переважно в більш компактному хроматині і функціонує як медіатор між стрес-фактором і експресією генів. У дослідях з *F. hygrometrica* при застосуванні АТ- та GC-специфічних

Таблиця 2. Післядія (ПД) HgCl<sub>2</sub> на розміри гаметофорів, листків і клітин листків лабораторного клону *Pottia intermedia*

| Варіант дослідю, ПД HgCl <sub>2</sub> | Довжина гаметофорів, мкм | Листки       |             | Клітини      |             |
|---------------------------------------|--------------------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
|                                       |                          | Довжина, мкм | Ширина, мкм | Довжина, мкм | Ширина, мкм |
| Контроль                              | 957,5 ± 132,5            | 464,5 ± 11,5 | 72,6 ± 5,4  | 29,7 ± 1,5   | 14,6 ± 0,6  |
| 0,5 мкМ                               | 1065,0 ± 97,7            | 507,5 ± 28,7 | 157,4 ± 5,5 | 24,5 ± 1,4   | 14,6 ± 0,3  |
| 1,0 мкМ                               | 1502,5 ± 102,1           | 507,5 ± 34,3 | 154,2 ± 8,5 | 26,7 ± 1,5   | 15,8 ± 0,3  |
| 1,7 мкМ                               | 1517,0 ± 91,3            | 648,3 ± 15,6 | 166,8 ± 6,0 | 27,7 ± 0,7   | 13,9 ± 0,2  |

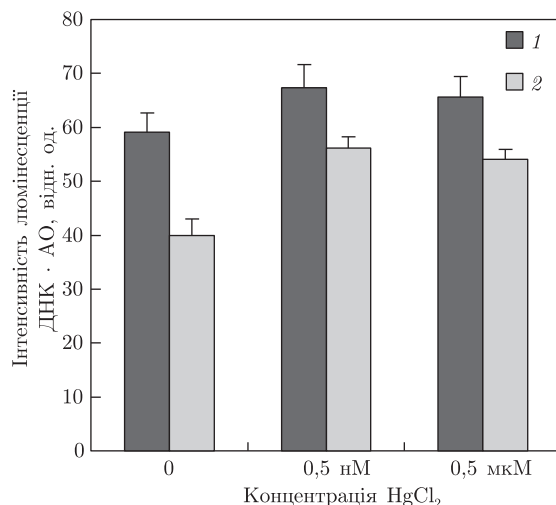


Рис. 3. Залежність вмісту ДНК (відн. од.) у клітинах протонеми *Pottia intermedia* від наявності у середовищі HgCl<sub>2</sub>: 1 — протонема, не оброблена ДНКазою, 2 — після дії ДНКазу I

флуорохромів було встановлено, що свинець стимулює значне збільшення кількості та розмірів нуклеотидних повторів ДНК, збагачених GC-основами. Такі ділянки утворювали чітко виражені конгломерати в тій частині хромосом, що прилягала до ядра [7].

Відомо, що в експериментальних апоспоричних поліплоїдів мохів відповідно до підвищення рівня плоідності збільшується розмір клітин листків. У наших дослідах розміри клітин листків гаметофорів *P. intermedia*, що росли на середовищі з ртуттю та без неї, істотно не відрізнялися (див. табл. 2). Таким чином, можливість поліплоїдизації під впливом іонів Hg<sup>2+</sup> слід відкинути. Тоді явно виражена тенденція до посилення інтенсивності люмінесценції ДНК · АО в ядрах протонеми *P. intermedia*, що росла на середовищі з металом (рис. 3), може свідчити на користь ампліфікації окремих сайтів ДНК.

Як можна бачити з рис. 3, послаблення інтенсивності зеленого світіння ДНК · АО після дії ДНКазу I у ядрах тих клітин, що зазнали впливу ртуті, виражене менше, ніж у контролі. Отже, активних, чутливіших до дії нуклеази, генів у контролі було порівняно більше, ніж у варіанті з металом. Цілком імовірно, що це зумовлено згаданою вище металозалежною інтенсифікацією клітинних поділів. Є дані про те, що зв'язок між селективною ампліфікацією в умовах стресу й мітотичною активністю дійсно існує [8]. Зміни кількості повторів нуклеотидів ДНК в умовах стресу мають звичайно тимчасовий характер, оскільки ампліфікована під впливом стресора екстрахромосомна ДНК поступово елімінується з клітин. Іноді, однак, ампліфіковані нуклеотидні послідовності можуть вставлятися в певні сайти хромосом і надалі реплікуватися в геномі. У такому випадку ефект стрес-фактора може бути тривалим [7, 8]. Імовірно, що саме таким чином зберігався вплив ртуті під час клонування потії.

1. Jablonka E., Lamb M. J. Epigenetic inheritance in evolution // J. Evol. Biol. – 1998. – **11**. – P. 159–183.
2. Turner B. M. Histon acetylation as an epigenetic determination of long-term transcriptional competence // Cell Mol. Life Sci. – 1998. – **54**. – P. 21–31.
3. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory // Genes a. development. – 2002. – **16**. – P. 6–21.
4. Shaw A. J. Intrakononal variation in morphology, growth rate, and copper tolerance in the moss, *Funaria hygrometrica* // Evolution. – 1990. – **44**, No 2. – P. 441–447.

5. Кордюм Е. Л., Сытник К. М. Концепция стресса // Клеточные механизмы адаптации растений. – Киев: Наук. думка, 2003. – С. 11–20.
6. Shaw A. J. Adaptation to metals in widespread and endemic plants // Environ. Health Perspect. – 1994. – **12**. – P. 105–108.
7. Bassi P. The effect of environmental stress on repetitive DNA behavior in plants // Plant Response to Environmental Stresses / Ed. H. R. Lerner. – New York: Marcel Dekker, 1999. – P. 161–170.
8. Imhoft A., Bonaldi T. “Chromatomics” the analysis of the chromatome // Mol. Biosyst. – 2005. – **1**. – P. 112–116.
9. Blokland R. van, Lohuis M. ten, Meyer P. Condensation of chromatin in transcription regions of an inactivated plant transgene: evidence for an active role of transcription in gene silencing // Mol. and Gen. Genet. – 1997. – **257**. – P. 1–13.
10. Зеленін А. В. Люмінесцентна цитохімія нуклеїнових кислот. – Москва: Наука, 1967. – 136 с.
11. Lushai G., Loxdale H. The biological improbability of a clone // Genet. Res. – 2002. – **79**. – P. 1–9.
12. Лазаренко А. С. Динаміка кількісної змінливості спорофіта *Desmatodon randii* (Kenn.) Lazar. в естественої популяції і в односпорових культурах // Бюл. Моск. о-ва испыт. природы. Отд. биол. – 1963. – **68**, № 6. – С. 133–148.
13. Довгалюк А. І. Порівняння цитогенетичної та антимікротрубочкової активності фітотоксичних металів: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Київ, 2004. – 24 с.
14. Рупецкий Р. Т., Даниливі І. С., Лесняк Е. Н. О генетической дивергенции морфологически неразличимых цитотипов мха *Pottia lanceolata* // Цитология и генетика. – 1983. – **6**. – С. 49–55.
15. Szwedkowski J. Species problems and taxonomic methods in bryophytes // New Manual of Bryology / Ed. R. M. Schuster. – Nichinan, 1984. – Vol. 2. – P. 1130–1171.

Інститут екології Карпат  
НАН України, Львів

Надійшло до редакції 23.05.2007

УДК 594.124:591.134(262.5)

© 2008

С. А. Щербань, О. Ю. Вялова

## Половые и фенотипические особенности содержания РНК в гонадах черноморских мидий

(Представлено членом-корреспондентом НАН України Г. Е. Шульманом)

*Data on the total RNA contents of gonads of males and females of mussels *Mytilus galloprovincialis* at different stages of maturity are presented. Gonads are characterized by various synthesis activities depending on the stage of maturity. The RNA contents increase during maturing, and their values are maximum at the spawning period. No reliable differences between male and female investigated parameters are noted ( $P > 0.05$ ). Phen groups of mussels with typical colour shell (black, black-brown, brown) and albino-mussels (no pigmentation of shell, mantle, foot) are first investigated. Brown and albino molluscs have maximum contents of nucleic acids and levels of protein synthesis.*

В вопросах структурно-функционального разнообразия популяций гидробионтов немаловажную роль играет изучение половых особенностей белкового синтеза генеративной ткани, а также особенностей, связанных с принадлежностью к определенным фенотипическим