

ИЗМЕНЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ МОРФОГЕНЕЗА *ARABIDOPSIS THALIANA* L. ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ОБЛУЧЕНИИ СЕМЯН И ПРОРОСТКОВ МАЛЫМИ ДОЗАМИ РЕДКОИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ

Проблема влияния хронического ионизирующего облучения на онтогенез и морфогенез живых организмов является одной из ключевых в рамках системной парадигмы в современной радиобиологии. Имеющиеся данные касательно воздействия малых доз противоречивы: установлено как их угнетающее, так и стимулирующее влияние на различные процессы, протекающие в живых организмах разных таксономических групп. До сих пор неясен и механизм (механизмы) возникновения, развития и угасания радиобиологических эффектов малых доз. Малоизученным остаётся влияние хронического низкодозового облучения на морфогенез и онтогенез растений. В связи с этим цель нашей работы заключалась в выяснении влияния малых доз редкоионизирующего излучения на рост и развитие растений *A. thaliana*, облучённых на стадии семян и проростков. В нашей работе мы использовали распространённое модельное растение – резуховидку Таля (*Arabidopsis thaliana*). Данный объект считается сравнительно устойчивым к ионизирующей радиации (ЛД₅₀ γ -облучения проростков составляет около 300 Гр [1]).

Материалы и методы

В ходе экспериментов осуществляли облучение смешанным γ + β -источником на основе хлорида ¹³⁷Cs семян и проростков *A. thaliana* Col-0. Семенной материал подвергался облучению за 2 недели до проращивания, а проростки облучали непосредственно во время прорастания. Семена получили общую дозу 30 сГр в течение 28 суток (мощность дозы 0,45 мГр/ч), проростки – 3 сГр за 7 суток (мощность дозы 0,18 мГр/ч). Дозовые нагрузки были определены исходя из цели и задач работы как заведомо не превышающие верхней границы малых доз по критериям, принятым UNSCEAR и МАГАТЭ [2, 3]. Семенной материал стерилизовали в течение 5 минут смесью 70% этанола и 5% перекиси водорода в соотношении 1:1. Проростки выращивали в стерильной культуре в чашках Петри 100×20 мм на среде Мура-

сиге-Скуга. 10-дневные проростки пересаживали на поверхность почвенной смеси на основе универсального субстрата «Полесский» (рН 5,5–6,5) и просеянного автоклавированного песка – 1 часть песка на 2 части субстрата. Условия выращивания были следующими: освещённость 8 клк, световой день 16/24 ч, t = 21–22 °С. В каждой серии опытов высаживали 120 семян. Повторность опытов трёхкратная в течение года.

В ходе эксперимента раз в неделю и по окончании опыта измеряли следующие морфометрические показатели: время появления первого цветка; продолжительность вегетации; количество листьев в прикорневой розетке; длину стебля; количество нормальных стручков; итоговую сухую массу надземной части; суточный прирост сухой массы надземной части. Групповые параметры в каждой из трёх серий опытов усредняли, индивидуальные значения анализировали как отдельные статистические единицы. Сравнение групп проводили с помощью U-критерия Манна-Уитни и H-критерия Краскела-Уоллиса. Количественную меру взаимосвязи между вариацией различных показателей оценивали по значению коэффициента парной корреляции *r* Пирсона.

Результаты и обсуждение

Ранее нами показано значимое влияние малых доз хронического γ -облучения семян и проростков на онтогенез и морфогенез *A. thaliana* [4]. В новых сериях опытов мы подтвердили наличие радиационно индуцированных изменений, проявляющихся в следующих эффектах:

у облучённых проростков: 1) увеличение энергии прорастания семян из опытного варианта, стимулирование роста главного корня у облучаемых проростков вплоть до достижения ими стадии первичной розетки; 2) первые зелёные листья раньше появляются у проростков, находящихся в поле действия хронического низкодозового облучения, по сравнению с необлучённым контролем; 3) после формирования первичной

розетки различия между растениями из опытной и контрольной групп больше не наблюдаются;

у растений, выращенных из облучённых семян: 1) ускоренный рост в ранней вегетативной фазе, меньшая длительность этой фазы по сравнению с аналогичным периодом онтогенеза растений из необлучённых семян; 2) сокращение сроков начала цветения на 1–2 недели; 3) сокращение продолжительности вегетации на 2–3 недели; 4) появление растений с аномальным габитусом, который не наследуется в следующем поколении; 5) уменьшение сухой массы надземной части растения; 6) аномалии генеративных органов и стерильность у небольшой части растений, полученных из облучённых семян.

Характерно, что хроническое облучение прорастающих семян приводит к выраженной, но кратковременной стимуляции роста первичного корня. При облучении же сухих семян различия между контрольным и опытным вариантами начинают проявляться не сразу, а позже, в период перехода от вегетативной фазы развития к генеративной. На облучённых растениях после второго пика цветения созрело в среднем на 23,9% меньше нормальных стручков. Некоторое количество стручков на растениях из опытной группы оказалось стерильным или частично стерильным. Стерильные стручки короче нормальных, могут содержать несколько мелких семян или же наоборот аномально крупных семян и недоразвитые семяпочки.

Помимо фенотипических отклонений генеративных органов (фенотипическая – отклонение от нормального морфологического развития), наблюдалось также системное нарушение коррелятивных отношений морфометрических параметров вегетативных органов растений (рис., *c, d, e*). В контрольном варианте изменённый габитус проявлялся только как уменьшение размера вегетативных органов (рис., *a, b*). Среди основных признаков аномального габитуса чаще всего встречались следующие: а) временная остановка роста и развития (т.н. «growth arrest»); б) снятие апикального доминирования, активный рост стеблей второго порядка, причём часто эти стебли заметно тоньше, чем в контроле; в) главный стебель тоньше, сильнее изгибается, иногда искривляясь горизонтально (а у большинства хронически облучённых проростков искривлены первичные корни, что свидетельствует об ослаблении положительного геотропизма); г) розеточные листья имеют более тёмный в сравнении с листьями контрольных растений цветовой оттенок или приобретают тёмно-фиолетовую окраску; д) для плана строения как побега в целом,

так и его частей характерна асимметрия на всех этапах развития; е) эффект воздействия радиации проявляется в одно и то же время у большей части растений и в одно и то же время ослабевает (исчезает). Отметим, что все выявленные нами фенотипические отклонения из опытной группы оказались стерильными. Интересно, что частота и спектр фенотипических отклонений совпадает с результатом, полученным нами на арабидопсисе, облучённом в дозе 3 Гр [5]. Это наблюдение находится в согласии с установленным эмпирически фактом на порядок большей радиоустойчивости сухих семян в сравнении с вегетирующими растениями.

В пользу системного эффекта модификации онтогенеза растений, облучённых малыми дозами радиации на стадии семян, свидетельствует изменение коррелятивных связей между основными параметрами развития (табл. 1). Ряд исследователей [6, 7] и ранее отмечали, что распад или модификация системы коррелятивных отношений между морфологическими параметрами характеризует хроническое воздействие радиации в малых дозах – как в условиях лабораторного эксперимента, так и в фитоценозах на радиоактивно загрязнённых территориях.

Межгрупповые различия коэффициентов корреляции, приведённые в табл. 1, говорят в пользу того, что нарушение морфологических коррелятивных отношений в онтогенезе растений из облучённых семян можно объяснить быстрым ростом стебля без накопления сухой массы, то есть повышенной активностью апикальной меристемы верхушечной почки. Это подтверждается более высоким средним приростом стебля растений опытного варианта вплоть до начала цветения.

Согласно современным представлениям к радиации наиболее чувствительны меристемы растений. Расчёт количества прямых повреждений по методу Ли [8] показывает, что для выбранных дозовых нагрузок прямыми летальными повреждениями ДНК меристематических клеток можно пренебречь, а в случае хронически облучённых проростков и количество одноцепочечных повреждений оказывается малой величиной (табл. 2). Из этого мы можем заключить, что предполагаемое повреждение генеративной меристемы растений из облучённых семян может быть связано с ошибочной репарацией кластерных односторонних разрывов ДНК. На данный момент мы располагаем данными, что при небольших дозах облучения в ядрах клеток *A. thaliana* активны гены неточных систем репарации повреждений генома *AtKu70* и *AtRad1*. Преимущественная активность MMEJ и NHEJ путей может



Рис. Фенодевиации, характерные для растений из облучённых семян: *a* – нормальное растение, 3-я неделя вегетации, контрольный вариант; *b* – ингибированное растение, 3-я неделя вегетации, контрольный вариант; *c, d, e* – фенодевианты, полученные из облучённых семян (модальные габитусы)

Таблица 1

Коэффициенты корреляции r Спирмена между морфометрическими параметрами растений *A. thaliana* из облучённых и необлучённых семян

Корреляции между парами морфометрических признаков	Контроль	Облучённые	Статистическая достоверность различий
Сухая масса надземной части – количество стручков на растении	0,83	0,78	–
Длина стебля – количество стручков на растении	0,78	0,67	–
Длина стебля – сухая масса надземной части	0,76	0,25	$p < 0,01$
Продолжительность вегетации – количество стручков на растении	0,36	0,64	–
Длина стебля – продолжительность вегетативной фазы развития	0,06	–0,56	$p < 0,001$
Длина стебля – среднесуточный прирост сухой массы	0,65	–0,73	$p < 0,001$

Расчет среднего количества прямо радиационно индуцированных повреждений ДНК в клетках меристем облучённых объектов

Объект	Время, на протяжении которого объект облучается	Накопленные дозы, Гр	Математическое ожидание количества попаданий (из них прямых двуниевых разрывов)
Гаплоидный геном клетки инициальной меристемы эмбриона семян <i>A. thaliana</i>	672 ч	$3,0 \times 10^{-1}$	8,22 (стремится к 0)
Диплоидный геном клетки инициальной меристемы эмбриона семян <i>A. thaliana</i>	672 ч	$3,0 \times 10^{-1}$	16,44 (стремится к 0)
Гаплоидный геном клетки меристемы проростков <i>A. thaliana</i>	16 ч (средняя продолжительность клеточного цикла меристематической клетки)	$2,9 \times 10^{-3}$	0,08 (стремится к 0)
Диплоидный геном клетки меристемы проростков <i>A. thaliana</i>	16 ч (средняя продолжительность клеточного цикла меристематической клетки)	$2,9 \times 10^{-3}$	0,16 (стремится к 0)

вызвать радиационно индуцированную нестабильность генома и коррелирует с задержкой роста и фенотипическими [9].

Важно отметить, что объекты подвергались облучению на ранних стадиях развития, когда вследствие ряда физиологических и биохимических особенностей небольшое по силе воздействие способно оказать значительное влияние на онтогенез и морфогенез. Сухие стратифицированные семена арабидопсиса находятся в состоянии физиологического покоя, эмбрионы содержат мало воды, а клетки покоящихся эмбриональных тканей метаболически не активны [10]. Поэтому в качестве мишени для непосредственного воздействия малых доз ионизирующей радиации на семена можно рассматривать только хромосомный аппарат клеток эмбриональных тканей. В случае же проростков основной мишенью низкодозового хронического облучения могут быть мембраны или цитоплазматические факторы быстро делящихся и растущих клеток, поскольку за время между двумя митозами экспозиционная доза оказывается ниже порога одиночной ионизации молекулы ДНК. Отсюда можно заключить, что малые дозы радиации в наших опытах прямо воздействовали на ядра клеток эмбрионов в семенах и на клетки в целом – цитоплазму и мембранные структуры – в тканях проростков.

Выводы

Нами выявлены статистически достоверные различия с контролем по силе и/или знаку корреляционной зависимости между сухой массой надземной части, продолжительностью вегетативной фазы развития, среднесуточным приростом сухой массы и длиной стебля. Также показана индукция хроническим облучением фенотипических и аномалий строения вегетативных и генеративных органов, которые приводят к формированию у некоторой части облучённых растений габитуса, отличного от нормального.

Наблюдаемые в эксперименте эффекты связаны не с прямым повреждением каких-либо критических структур клеток, а с рецепцией слабого радиационного воздействия как иницирующего события в системе внутриклеточной и межклеточной сигнальной трансдукции. Такой сигнал может мультиплицироваться и транспортироваться через плазмодесмы в соседние клетки, а по сосудам флоэмы – в другие ткани и органы с помощью биохимических мессенджеров. Мультипликация сигнала даёт возможность объяснить несоответствие между чрезвычайно слабым по канонам теории мишени воздействием и значительным влиянием этого воздействия на онтогенез растительного организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Donini B., Sparrow A.H., Schairer L.A., Sparrow R.C. The Relative Biological Efficiency of Gamma Rays and Fission Neutrons in Plant Species with Different Nuclear and Chromosome Volumes // *Rad. Research.* – 1967. – 32. – P. 692–705.
2. Low doses of ionizing radiation: biological effects and regulatory control. Contributed papers. – Vienna: IAEA, 1997. – 696 p.
3. Biological mechanisms of radiation actions at low doses. A white paper to guide the Scientific Committee's future programme of work [Electronic resource]. – New York: UNSCEAR, 2012. – Mode of access: http://www.unscear.org/docs/reports/Biological_mechanisms_WP_12-57831.pdf.
4. Литвинов С.В. Влияние хронического облучения семян и проростков *Arabidopsis thaliana* малыми дозами γ -радиации на рост и развитие растений // *Ядерна фізика та енергетика.* – 2015. – 15, № 4. – С. 406–414.
5. Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Зв'язок транскрипційної активності генів підтримки цілісності геному з морфо-фенологічними характеристиками опромінених рослин *A. thaliana* L. // Тези доповідей XXIII щорічної наукової конференції Інституту ядерних досліджень НАН України, 1–5 лютого 2016 р. – К.: Ін-т ядерних дослідж., 2016. – С. 180–181.
6. Гродзинский Д.М. Радиобиология растений: монография / Отв. ред. И.Н. Гудков. – К.: Наукова думка, 1989. – 384 с.
7. Гродзинський Д.М., Гуца М.І., Дмитрієв О.П., Коломієць О.Д., Кравець О.А., Кравець О.П., Кутлахмедов Ю.О., Куцоконь Н.К., Міхеев О.М., Пчеловська С.А., Рашидов Н.М., Шиліна Ю.В. Радиобіологічні ефекти хронічного опромінення рослин у зоні впливу Чорнобильської катастрофи: монографія. – К.: Наукова думка, 2008. – 373 с.
8. Иванов В.И., Лысцов В.Н. Основы микродозиметрии. – М.: Атомиздат, 1979. – 192 с.
9. Litvinov S.V., Rashydov N.M. Transcription of *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* genes in leaves of *A. thaliana* L. plants under conditions of acute and fractionated X-rays irradiation // International Conference of Young Scientists-2015 (CYS-2015) «Today's challenges in molecular and cell biology»: Abstract Book, 21–25 September 2015. – Lutsk, 2015. – P. 45.
10. Николаева М.Г. Справочник по проращиванию покоящихся семян. – Л.: Наука, 1985. – 347 с.

LITVINOV S.V., RASHYDOV N.M.

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03143, Kiev, Akad. Zabolotnogo str., 148, e-mail: slitvinov83@gmail.com

CHANGES OF PARAMETERS OF THE MORPHOGENESIS IN *ARABIDOPSIS THALIANA* L. UNDER CHRONIC IRRADIATION OF SEEDS AND SEEDLINGS BY LOW DOSES OF IONIZING RADIATION

Aim. Our purpose was to evaluate influence of small doses of ionizing radiation on the growth and development of the model plant *A. thaliana* L., irradiated at the stage of dry seeds or seedlings. **Methods.** In our experiments we studied the morphometric parameters of *Arabidopsis* and the correlation between them during the process of growth and development in post-radiation period until the end of the vegetation and plant death. **Results.** We have confirmed both effect of root growth stimulation in chronically irradiated seedlings and accelerated flowering combined with shortening of vegetative period in plants which were grown from irradiated seeds. **Conclusions.** Chronic exposure of seeds to low doses of ionizing radiation induces the appearance of plants with an abnormal phenotype and also modifies correlative relationships between morphometric parameters of developing plants.

Keywords: *Arabidopsis thaliana* L., ionizing radiation, low doses, chronic exposure, plant development.