

ГЕРМАН О. Ю.[✉], БРАТЧЕНКО А. М., ЛИТОВЧЕНКО Є. О.

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,

Україна, 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4

[✉] elenagerman2009@gmail.com, (057) 707-51-77

ФОРМУВАННЯ ЕФЕКТУ СВІДКА В МЕРИСТЕМІ РОСЛИН *ALLIUM SEPA* L. З РІЗНИМ ГЕНОТИПОМ

Мета. Отримання й аналіз даних про зміну цитогенетичних показників у клітинах меристеми проростків неопроміненого насіння *Allium sepa* L. за сумісного пророщування з насінням, яке зазнало опромінення γ -радіацією у різних дозах. **Методи.** Цитогенетичний аналіз передбачав аналіз мітотичної активності, анафазний метод обліку мутацій хромосом, ядерцевий аналіз. Для порівняння контрольної й експериментальної вибірок використовували F-критерій. **Результати.** Показано формування ефекту свідка за сумісного пророщування опроміненого і неопроміненого насіння, ступінь виразності якого збільшується із збільшенням дози опромінення. **Висновки.** Опромінення повітряно-сухого насіння дозою гамма-радіації 40 Гр викликає формування радіаційного гормезису за критерієм мітотичної активності клітин кореневої меристеми проростків, а доза опромінення 10 Гр не впливає на рівень клітинної проліферації. Формування ефекту свідка відбувається за сумісного пророщування інтактного й опроміненого насіння як підвищення рівня мітотичної активності і збільшення кількості хромосомних мутацій.

Ключові слова: ефект свідка, γ -радіація, меристема, мітотична активність, хромосомні мутації, мікроядра.

Ефект свідка відноситься до немішених ефектів радіації і зазвичай визначається як спостереження ефектів у неопромінених клітинах і тканинах, коли останні контактують з опроміненими клітинами/тканинами. Немішені ефекти опромінення здатні ускладнювати проведення радіаційної терапії; вони мають бути враховані під час оцінки радіаційного навантаження співробітників, що працюють з джерелами випромінювання, розробки норм радіаційної безпеки.

Ефект свідка був відкритий в експериментах із культурами клітин і тривалий час досліджувався саме на клітинному рівні [1; 2]. Його

індукцію було продемонстровано як за наявності тісного міжклітинного контакту, так і за вирощування неопромінених клітин на середовищі, де деякий час перебували опромінені клітини [3]. Також було продемонстровано також формування ефекту свідка між організмами одного виду [4].

Механізм формування ефекту свідка повністю не встановлений. Припускають наявність різних способів передачі сигналу про опромінення: за допомогою системи міжклітинних контактів і шляхом секреції медіаторів у культуральне середовище. Відомо, що в інтактних клітинах, тобто в клітинах-свідках, відбуваються деякі генетичні зміни, наприклад, виникають хромосомні мутації [5], змінюється експресія певних генів [1], розвивається апоптоз.

Цитогенетичний аналіз, а саме оцінка проліферативної активності і рівня цитогенетичних пошкоджень генома, дозволяє оцінити ймовірні зміни в клітинах-свідках і зробити висновок про формування або відсутність ефекту свідка, його інтенсивність.

Метою роботи є отримання та аналіз даних про зміну цитогенетичних показників у клітинах меристеми проростків неопроміненого насіння *Allium sepa* L. за сумісного пророщування з насінням, яке зазнало опромінення γ -радіацією у різних дозах.

Матеріали і методи

У роботі були використані два сорти *Allium sepa* L.: Біляночка (08041037) і Веселка (91041001). Частину насіння опромінювали γ -радіацією Co^{60} в ХНУ ім. В. Н. Каразіна; поглинута доза для дослідних груп складає 10 Гр і 40 Гр. Пророщення насіння відбувалося у чашках Петрі на змоченому фільтрувальному папері за кімнатної температури ($\sim 22^\circ C$) протягом 66 годин. Для кожного сорту було створено 5 груп: Контроль (К) – проростки з неопроміненого насіння, які пророщували окремо; 10 Гр – проростки насіння, яке було опромінено дозою

10 Гр; 40 Гр – проростки насіння, яке було опромінено дозою 40 Гр; К + 10 Гр – сумісне пророщування неопроміненого насіння (К) із насінням, яке було опромінене дозою 10 Гр; К + 40 Гр – сумісне пророщування неопроміненого насіння (К) із насінням, яке було опромінене дозою 40 Гр.

Проростки фіксували в оцтовому алкоголі. Цитогенетичний аналіз проводили на давлених препаратах кореневої меристеми проростків, фарбування – методом Фольгена [6]. Для кожного корінця переглядали приблизно 1000 клітин для визначення мітотичної активності. Для підрахунку кількості хромосомних мутацій (мостів і фрагментів) використовували анафазний метод обліку мутацій. Для оцінки синтетичної активності клітин враховували кількість ядерця у ядрах не менш ніж у 200 клітин меристеми для кожного корінця.

Для кожного варіанта експерименту розраховували середнє арифметичне значення мітотичного індексу і похибку вибіркової частки. Переводили процентні долі у величини центрального кута. Для порівняння контрольної і експериментальної вибірок використовували F-критерій. Перевірку нульової гіпотези проводили на рівні значущості $p < 0,05$ [7].

Результати та обговорення

Оцінка мітотичної активності.

Мітотична активність відображає інтенсивність клітинних поділів у тканині. Від інтенсивності проліферації залежать ростові процеси та розвиток клітин загалом, швидкість проходження фаз онтогенезу, здатність пристосування до несприятливих умов навколишнього середовища.

У контролі для досліджуваних сортів цибулі був характерний невисокий рівень мітотичної активності: 3,0 % для сорту Біляночка, і 2,0 % для сорту Веселка (рис. 1). Статистично значущої різниці в рівні мітотичної активності між сортами в контролі не виявлено.

Опромінення гамма-радіацією в дозі 10 Гр суттєво не вплинуло на рівень мітотичної активності; значення мітотичних індексів знаходилися у межах 2,3 – 2,8 %. Доза опромінення 40 Гр стимулювала мітотичну активність: у варіанті 40 Гр значення мітотичних індексів зросли майже в 2 рази порівняно з контролем: до 5,3 % у Біляночки і 3,7 % у Веселки. Стимуляція мітотичної активності за впливу малих доз іонізуючої радіації відома як радіаційний гормезис і

була продемонстрована на ряді біологічних об'єктів [8].

Отже, у період початкового росту проростків сортових відмінностей за рівнем мітотичної активності в контролі виявлено не було; опромінення насіння дозою гамма-радіації 40 Гр викликає формування радіаційного гормезису за критерієм мітотичної активності, а доза опромінення 10 Гр не впливає на рівень клітинної проліферації.

Для дослідження можливості формування ефекту свідка під час пророщування до неопроміненого насіння додавали опромінене. Насінини були розділені фільтрувальним папером, але знаходилися у спільному водному середовищі. Час появи й інтенсивність росту проростків були однаковими, що дало змогу провести фіксацію корінців одночасно, на 66-й годині початкового росту. Результати варіантів К + 10 Гр і К + 40 Гр порівнювали з неопроміненим контролем.

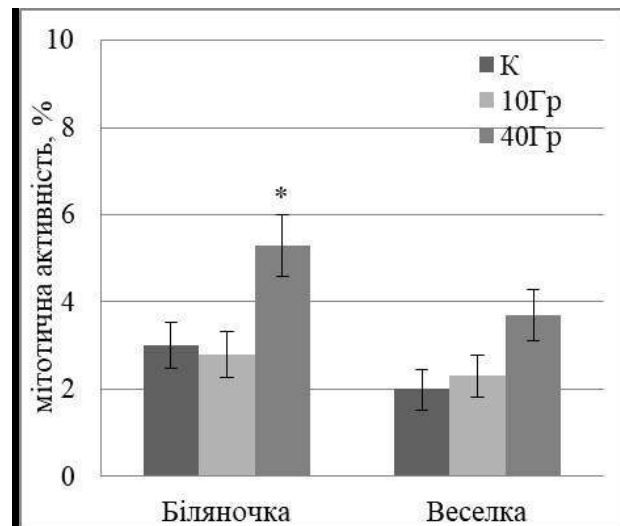


Рис. 1. Мітотична активність клітин кореневої меристеми проростків контрольного і опроміненого гамма-радіацією насіння цибулі. * – відмінності порівняно з контролем достовірні за $P < 0,05$.

Сумісне пророщування неопроміненого і опроміненого дозою 10 Гр насіння не вплинуло суттєво на інтенсивність проліферації клітин проростків неопроміненого насіння (рис. 2). У Біляночки спостерігали зменшення мітотичної активності з 3,0 % до 2,1 % ($p \geq 0,05$), а у Веселки – зростання з 2,0 % до 2,9 % ($p \geq 0,05$). Слід зауважити, що за впливу дози опромінення 10 Гр також не відбувалися зміни в мітотичній активності проростків безпосередньо опроміненого насіння. Отже, можна зробити висновок,

що доза опромінення 10 Гр знаходиться нижче від порога реакції для сухого насіння і не впливає суттєво на життєздатність проростків.

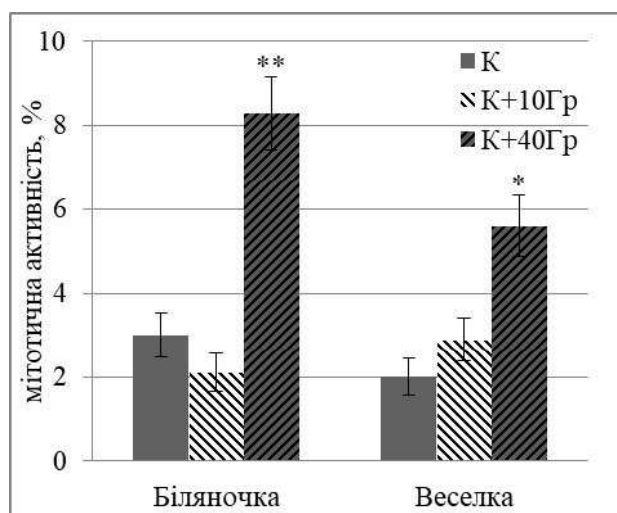


Рис. 2. Мітотична активність клітин кореневої меристеми проростків у контролі і за сумісного пророщування з опроміненим насінням. * – відмінності порівняно з контролем достовірні за $P < 0,05$; ** – відмінності порівняно з контролем достовірні за $P < 0,01$.

Сумісне пророщування неопроміненого і опроміненого дозою 40 Гр насіння вірогідно збільшувало рівень мітотичної активності клітин меристеми неопроміненого насіння в обох сортів: у варіанті К + 40 Гр у Біляночки значення мітотичного індексу знаходилося на рівні 8,3 % ($p \leq 0,01$), а у Веселки – 5,6 % ($p \leq 0,05$). Отже, відбулося формування чітко вираженого ефекту свідка.

Оцінка рівня хромосомного мутагенезу.

Іонізуюча радіація індукує пошкодження ДНК у результаті як прямої енергетичної дії, так і опосередкованої (через утворення вільних радикалів). Результатом фізико-хімічних взаємодій між іонізуючим випромінюванням і ДНК є переважно утворення одно- і дволанцюгових розривів ДНК, які за відсутності репарації сприяють формуванню різноманітних хромосомних перебудов.

Для оцінки рівня хромосомного мутагенезу враховували серед загальної кількості анафаз і телофаз мітозу клітини з хромосомними аберраціями – мостами або фрагментами. Серед інтерфазних клітин проводили облік клітин із мікроядрами, які утворюються внаслідок формування ацентричного хромосомного матеріалу в мітозі, що передуює досліджуваному мітотичному циклу.

Природний рівень хромосомного мутагенезу в меристемі сорту Біляночка був досить високий – 28 % клітин містили аберації, серед яких переважали фрагменти (рис. 3). Для сорту Веселка рівень хромосомних мутацій був нижчий – лише 5 % клітин з аберраціями. Представникам родини *Alliaceae* властивий високий рівень виникнення спонтанних мутацій, що є перевагою для використання цієї культури в якості тест-системи для оцінки мутагенного впливу. В межах родини і виду існують відмінності в чутливості до дії мутагенів. Імовірно, це пояснює знайдені розбіжності в рівні хромосомних мутацій у контролі у досліджуваних сортах.

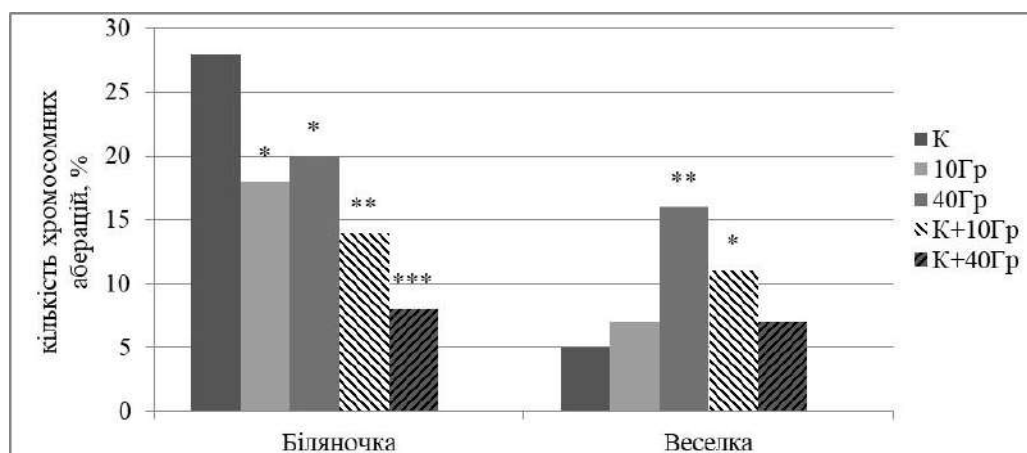


Рис. 3. Частота аберацій хромосом у меристемі проростків опроміненого і інтактного насіння в умовах окремого і сумісного пророщування. * – відмінності порівняно з контролем достовірні за $P < 0,05$; ** – відмінності порівняно з контролем достовірні за $P < 0,01$; *** – відмінності порівняно з контролем достовірні за $P < 0,001$.

В умовах опромінення (варіанти 10 Гр і 40 Гр) рівень хромосомного мутагенезу для сорту Біляночка був також вищий, ніж у сорту Веселка.

У меристемі сорту Веселка кількість клітин із мутаціями хромосом за впливу дози 10 Гр зростала незначно, але опромінення дозою 40 Гр збільшувало їх кількість у три рази. В меристемі Біляночки опромінення вже дозою 10 Гр призводило до появи 18 % клітин з абераціями, що є співставним з аналогічним показником варіанта 40 Гр – 20 %. Високий спонтанний рівень мутацій у меристемі Біляночки не дозволяє оцінити мутагенний вплив опромінення, але отримані дані в варіантах з опроміненням можуть свідчити про високу радіочутливість цього сорту загалом.

За результатами мікроядерного тесту обидва сорти характеризувалися незначною кількістю мікроядер у контролі – 0,2–0,3 %. У варіанті 10 Гр мікроядер виявлено не було. У варіанті 40 Гр частка клітин із мікроядрами зросла до 0,5–0,7 %.

Модифікація хромосомного мутагенезу сумісним пророщуванням опроміненого і неопроміненого насіння.

Ефект свідка сформувався в меристемі сорту Веселка: у варіантах К + 10 Гр і К + 40 Гр кількість ана- і телофаз з абераціями була вищою від контролю. Абсолютні показники кількості мутацій хромосом у меристемі Біляночки є співставними із сортом Веселка, але високий рівень спонтанного мутагенезу у Біляночки не дозволяє зробити висновок про формування ефекту свідка.

За сумісного пророщування опроміненого і неопроміненого насіння рівень хромосомного мутагенезу був вищий у варіанті К + 10 Гр, ніж у варіанті К + 40 Гр обох сортів (рис. 3). Зважаючи на те, що у варіанті К + 10 Гр мітотична активність знаходилася на рівні контролю, а в варіанті К + 40 Гр спостерігали стимуляцію мітотичної активності, менший рівень хромосомних мутацій у варіанті К + 40 Гр можна пояснити явищем стимульованої репопуляції, тобто сумісне пророщування з опроміненим насінням стало індуктором додаткових клітинних поділів, і в таких умовах відбулося заміщення найбільш пошкоджених клітин непошкодженими. Відомо, що стимульована репопуляція є одним із механізмів захисту організму від впливу мутагенних чинників і лежить в основі адаптації до несприятливих умов [9].

Щодо рівня мікроядер, то суттєві зміни в кількості клітин із мікроядрами стосувалися тільки варіанта К + 40 Гр сорту Веселка, де спостерігали зростання цього показника у 3 рази порівняно з контролем.

Ядерцевий аналіз.

За результатами обліку ядерцевої активності (рис. 4) в меристемі сорту Біляночка зафіксовано більшу кількість ядерць на клітину в усіх варіантах, ніж у сорту Веселка. Кількість ядерць у клітині залежить від інтенсивності синтетичних процесів. Збільшення кількості функціонуючих ядерць є наслідком потреби збільшення кількості білкових молекул. Цей параметр найбільш точно характеризує активність генів рРНК – NOR-регіонів. Процеси синтезу білків у клітинах меристеми пов'язані з підготовкою до реплікації ДНК і мітозу. Для меристеми сорту Біляночка був характерний і вищий рівень мітотичної активності, що корелює і з більшою кількістю ядерць у клітинах меристеми цього сорту порівняно з Веселкою.

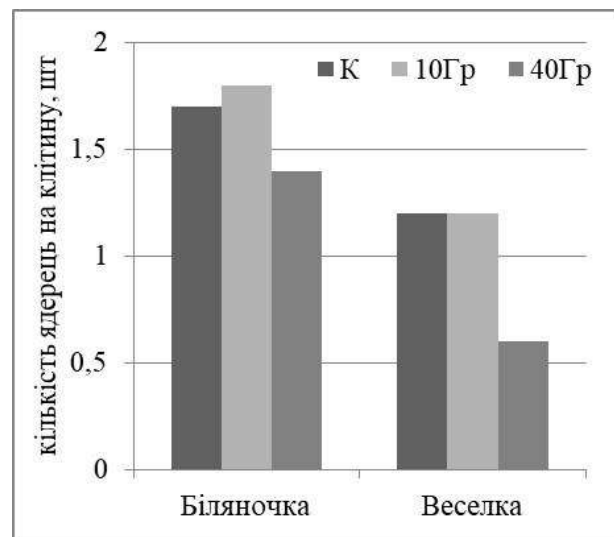


Рис. 4. Кількість ядерць на клітину в меристемі проростків опроміненого і неопроміненого насіння.

Спостерігали зменшення кількості ядерць у варіанті 40 Гр порівняно з контролем. Це зменшення можна пояснити існуванням декількох піків мітотичної активності протягом початкового росту проростків і існуванням добових ритмів клітинної проліферації. Для остаточного висновку про рівень ядерць доцільним є проведення дослідження в динаміці.

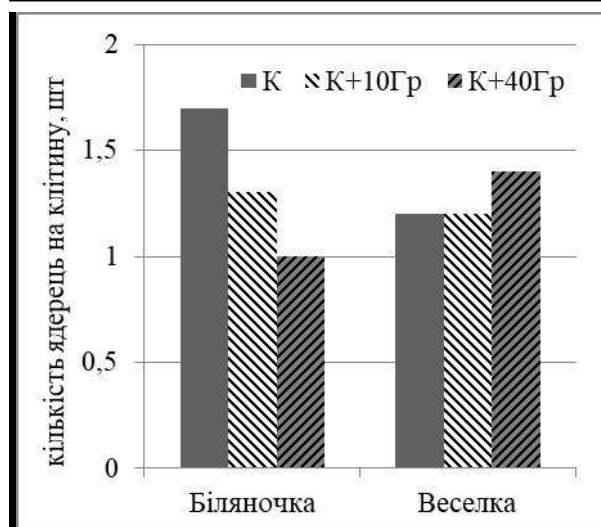


Рис. 5. Кількість ядерців на клітину в меристемі проростків опроміненого і інтактного насіння в умовах окремого і сумісного пророщування.

У меристемі проростків, що пророщували спільно з опроміненним насінням, спостерігали зменшення кількості ядерців у клітинах сорту Біляночка, причому в варіанті К + 40 Гр зменшення було максимальним (рис. 5). У меристемі сорту Веселка кількість ядерців не змінилася.

Припускають існування декількох можливих механізмів розвитку ефекту свідка. Одним із таких механізмів є секреція опроміненними клітинами сигнальних молекул у середовище [10]. Ці молекули здатні впливати на неопромінені клітини і організми, які знаходяться в цю-

му ж середовищі, і викликати в них стресові реакції, змінюючи модель генної експресії [11]. Молекулами-трансмідерами ефекту свідка виступають активні форми кисню, деякі гормони (наприклад, цитокініни і ауксини) [12]. У випадку впливу дози 10 Гр стимуляції мітотичної активності не відбувалось і ефект свідка не сформувався. Доза 40 Гр впливала на проліферацію клітин, і індукція ефекту свідка у варіанті К + 40 Гр зумовлена секрецією в водне середовище певних медіаторів.

Висновки

1. У період початкового росту проростків сортових відмінностей у проростків сортів цибулі Веселка і Біляночка за рівнем мітотичної активності у групі контролю виявлено не було.

2. Опромінення повітряно-сухого насіння дозою гамма-радіації 40 Гр викликає формування радіаційного гормезису за критерієм мітотичної активності клітин кореневої меристеми проростків, а доза опромінення 10 Гр не впливає на рівень клітинної проліферації.

3. Формування ефекту свідка відбувається за сумісного пророщування інтактного та опроміненого насіння як підвищення рівня мітотичної активності (варіант К + 40 Гр) і збільшення кількості хромосомних мутацій (варіант К + 10 Гр).

References

1. Verma N., Tiku A.B. Significance and nature of bystander responses induced by various agents. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2017. Vol. 773. P. 104–121. doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.05.003.
2. Widela M., Lalika A., Krzywona A., Poleszczuk J., Fajarewicz K., Rzeszowska-Wolny J. The different radiation response and radiation-induced bystander effects in colorectal carcinoma cells differing in p53 status. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2015. Vol. 778. P. 61–70. doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.06.003.
3. Shemetun O.V., Pilinska M.A. Radiation-induction "bystander effect". *Cytology and genetics*. 2007. Vol. 41. No. 4. P. 66–71. [in Ukrainian]
4. Choi V.W.Y., Ng C.Y.P., Kobayashi A., Konishi T., Suya N., Ishikawa T., Cheng S.H., Yu K.N. Bystander effect between zebrafish embryos *in vivo* induced by high-dose X-rays. *Environ. Sci. Technol.* 2013. Vol. 47. P. 6368–6376. doi.org/10.1021/es401171h.
5. Reis P., Lourenço J., Carvalho F. P., Oliveira J., Malta M., Mendo S., Pereira R. RIBE at an inter-organismic level: a study on genotoxic effects in *Daphnia magna* exposed to waterborne uranium and a uranium mine effluent. *Aquatic Toxicology*. 2018. doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.03.007.
6. Pausheva Z.P. Workshop on Plant Cytology. Moscow: Kolos, 1980. 304 p. [in Russian]
7. Atramentova L.O., Utevska O.M. Statistical methods in biology. Kharkiv: KhNU, 2007. 288 p. [in Ukrainian]
8. Mikheev A.N. Small "doses" of radiobiology. My little radiobiological faith. Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2016. Retrieved from: http://icbge.org.ua/re/images/b/bc/Mikheev2016-Malye_dozy.pdf. [in Russian]
9. Mikheev A.N. Hyperadaptation. Stimulated ontogenetic adaptation of plants. Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2015. Retrieved from: <http://icbge.org.ua/re/images/f/f5/Mikheev2015-Hiperadaptatsiya.pdf>. [in Russian]
10. Wang T., Xua W., Denga C., Xua S., Li F., Wua Y, Wua L., Biana P. A pivotal role of the jasmonic acid signal pathway in mediating radiation-induced bystander effects in *Arabidopsis thaliana*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2016. Vol. 791. doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2016.07.002.

11. Xu W., Wang T., Xu S., et al. Radiation-induced epigenetic bystander effects demonstrated in *Arabidopsis thaliana*. *Radiation Research*. 2015. Vol. 183 (5). P. 511–524. doi.org/10.1667/RR13909.1.
12. Rozhko T.V., Nogovitsyna E.I., Badun G.A., Lukyanchuk A.N., Kudryasheva N.S. Reactive oxygen species and low-dose effects of tritium on bacterial cells. *Journal of Environmental Radioactivity*. 2019. P. 208–209. doi: 10.1016/j.jenvrad.2019.106035.

GERMAN O.Yu., BRATCHENKO A.M., LYTOVCHENKO Ye.O.

*V.N. Karazin Kharkiv National University,
Ukraine, 61022, Kharkiv, Svobody sq., 4*

THE BYSTANDER EFFECT FORMATION IN THE MERISTEM OF *ALLIUM CEPA* L. PLANTS WITH DIFFERENT GENOTYPE

Aim. Obtaining and analysis of cytogenetic parameters in meristem cells of *Allium cepa* L. seedling sprouting from unirradiated seeds, while germinating them with seeds, that were exposed to γ -radiation in different doses. **Methods.** Cytogenetic analysis included analysis of mitotic activity, anaphase method of chromosome mutations, nucleolar analysis. The F-test was used to compare the control and experimental samples. **Results.** The formation of the bystander effect is shown in the case of joint germination of irradiated and non-irradiated seeds. The severity of bystander effect increases with increasing irradiation dose. **Conclusions.** Irradiation of seeds with a dose of gamma radiation of 40 Gy causes the formation of radiation hormesis by the criterion of mitotic activity in the root meristem cells of seedlings, and the irradiation with a dose of 10 Gy does not affect the level of cell proliferation. The bystander effect formation occurs during the joint germination of intact and irradiated seeds as an increase in the level of mitotic activity, and an increase in the number of chromosomal mutations.

Keywords: bystander effect, γ -radiation, meristem, mitotic activity, chromosomal abnormalities, micronuclei.