

УДК: 575.2:57.04

Влияние метионина на радиобиологическую реакцию клеток корневой меристемы проростков лука *Allium cepa* L.

Е.Ю.Герман, Л.Д.Дикая, Е.Н.Эткало, Е.А.Гаркуша

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
elenagerman2009@gmail.com*

Изучена модификация метионином радиобиологической реакции клеток корневой меристемы проростков лука *Allium cepa* L. сортов Мавка и Веселка. Доза гамма-радиации 40 Гр оказывает стимулирующее действие на митотическую активность, а доза 200 Гр – угнетающее, при этом обе дозы увеличивают уровень цитогенетических повреждений. Метионин в концентрации 1 мг/мл не вызывает радиопротекторный эффект, а наоборот, достоверно снижает активность клеточных делений у обоих сортов и в контроле, и при действии радиации, а также обуславливает достоверное увеличение уровня цитогенетических повреждений. Высказано предположение, что рост уровня цитогенетических повреждений в вариантах с метионином вызван его метилирующим действием, при котором метилированию подвергаются среди прочих и гены белков репарации, что препятствует репарации потенциальных повреждений ДНК, возникших при облучении, и ведет к их преобразованию в хромосомные aberrации. Хотя метилирование ДНК является необходимым процессом для прохождения некоторых фаз онтогенеза растительного организма, в период прорастания семян, а также в условиях стресса избыток метильных групп препятствует нормальному развитию и адаптации растений.

Ключевые слова: радиомодификаторы, метионин, митотическая активность, хромосомные aberrации, малые дозы.

Вплив метіоніну на радіобіологічну реакцію клітин кореневої меристеми проростків цибулі *Allium cepa* L.

О.Ю.Герман, Л.Д.Дика, К.М.Еткало, Є.О.Гаркуша

Досліджено модифікацію метіоніном радіобіологічної реакції клітин кореневої меристеми проростків цибулі *Allium cepa* L. сортів Мавка і Веселка. Доза гамма-радіації 40 Гр стимулює митотичну активність, а доза 200 Гр – пригнічує, при цьому обидві дози збільшують рівень цитогенетичних пошкоджень. Метіонін в концентрації 1 мг/мл не спричиняє радіопротекторний ефект, а навпаки, достовірно знижує активність клітинних поділів у обох сортів і в контролі, і при дії радіації, а також обумовлює достовірне збільшення рівня цитогенетичних пошкоджень. Висловлено припущення, що зростання рівня цитогенетичних пошкоджень в варіантах з метіоніном викликано його метилуючою дією, при якій метилуванню піддаються серед інших і гени білків репарації, що перешкоджає репарації потенційних ушкоджень ДНК, що виникли при опроміненні, і веде до їх перетворення в хромосомні aberrації. Хоча метилування ДНК є необхідним процесом для проходження деяких фаз онтогенезу рослинного організму, в період проростання насіння, а також в умовах стресу надлишок метильних груп перешкоджає нормальному розвитку і адаптації рослин.

Ключові слова: радіомодифікатори, метіонін, митотична активність, хромосомні aberrації, малі дози.

Effect of methionine on the radiobiological response of root meristem cells of *Allium cepa* L. seedlings

O.Yu.German, L.D.Dyka, K.M.Etkalo, Ye.O.Garkusha

The modification of radiobiological reaction by methionine has been studied in root meristem cells of onion seedlings of varieties Mavka and Veselka. The dose of gamma radiation of 40 Gy has a stimulating effect on mitotic activity and the dose of 200 Gy – depressing; both doses increase the level of cytogenetic damages. Methionine at a concentration of 1 mg/ml does not cause radioprotective effect, but on the contrary, significantly reduces the activity of cell divisions in both varieties in the control and under the action of radiation. In addition, methionine causes a significant increase of the level of cytogenetic damages. It has been suggested, that methionine methylating action causes the methylation of reparative proteins genes, which leads to the increase of cytogenetic damages level in variants with methionine. Although DNA

methylation is a necessary process for passing of some phases of plant ontogenesis, in the period of seed germination, and in the conditions of stress excess of methyl groups inhibits normal development and adaptation of plants.

Key words: radiomodifiers, methionine, mitotic activity, chromosomal aberrations, low doses.

Введение

Биологические объекты – от одноклеточных до высших растений, животных и человека – реагируют по-разному на действие радиации в больших и малых дозах (Кузин, 2002). Угнетающий эффект больших доз связан с прямым или опосредованным действием радиации на ядерную ДНК, что приводит к нарушению ее целостности, возникновению разрывов цепи, появлению мутаций, изменениям генетического кода. Эти изменения угнетают деление клеток, рост и развитие организма, снижают иммунитет, плодовитость, приводят к гибели организма. Гамма-облучение, являясь при больших дозах губительным фактором для живых организмов, в малых дозах может индуцировать положительные биологические процессы и оказывать благоприятное, стимулирующее действие на организм. При облучении малыми дозами наблюдается стимуляция деления клеток, роста и развития организма, повышение плодовитости, увеличение продолжительности жизни и сопротивляемости к действию неблагоприятных факторов среды. Основным биологическим эффектом ионизирующей радиации является повреждение генетических структур, следствием которого – появление мутаций.

Известен широкий круг веществ – радиомодификаторов, способных изменять радиобиологическую реакцию организма. Одним из них являются тиозефир, способные улавливать свободные радикалы, которые образуются при автоокислении многих органических соединений. Метионин – серосодержащая α -аминокислота, тиозефир, входит в число незаменимых аминокислот, которые организм млекопитающих не способен синтезировать самостоятельно и должен получать с продуктами питания растительного происхождения. Аминокислота метионин синтезируется в растительном организме из цистеина, участвует во многих клеточных процессах, среди которых биосинтез белков и синтез этилена в растительной клетке. Являясь серосодержащим соединением, метионин может выступать в качестве радиопротектора, уменьшая негативные последствия действия ионизирующей радиации (Верещако и др., 2008).

Также метионин, выступая в качестве донора метильных групп, может повышать уровень метилирования ДНК, изменяя при этом модель генной экспрессии. Можно предположить, что избыток экзогенного метионина, добавленный в среду при проращивании семян, может изменить степень метилирования ДНК, увеличив количество метилированного цитозина, что вызовет гетерохроматинизацию эухроматиновых участков. Это приведет к торможению клеточного метаболизма, пролиферации клеток, роста растения. Известно, что избыток метионина снижает жизнеспособность дрозофилы (Волкова та ін. 2013), приводит к дефектам развития у грибов (Saint-Macary et al., 2015). Тем не менее, в низких концентрациях метионин широко используется в качестве экзогенного регулятора, улучшающего посевные качества семян и интенсифицирующего рост проростков растений (Яблонская, 2014).

Целью работы было выявить модификацию метионином радиобиологической реакции клеток корневой меристемы проростков лука *Allium cepa* L. на облучение гамма-радиацией в дозах 40 Гр и 200 Гр.

Методика

Материалом для исследования были семена лука *Allium cepa* L. сортов Мавка и Веселка, предоставленные Институтом овощеводства и бахчеводства НААН Украины, г. Харьков. Оба сорта салатного направления, среднеспелые, со сходным вегетационным периодом и урожайностью, наружные чешуи фиолетово-красного цвета.

Воздушно-сухие семена облучали гамма-радиацией Co^{60} в Харьковском национальном университете им. В.Н.Каразина в дозах 40 Гр и 200 Гр соответственно, стимулирующее и угнетающее действия которых на растительный организм было установлено в работах кафедры генетики и цитологии ХНУ ранее (Баева, 2006).

В эксперименте были выделены следующие варианты:

1. контроль – необлученные семена, проращиваемые в водопроводной воде;
2. необлученные семена, проращиваемые с добавлением метионина в концентрации 1 мг/мл;

3. 40Гр – семена, облученные гамма-радиацией в дозе 40Гр, проращиваемые в водопроводной воде;
4. 40Гр+метионин – семена, облученные гамма-радиацией в дозе 40 Гр, проращиваемые с добавлением метионина в концентрации 1 мг/мл;
5. 200Гр – семена, облученные гамма-радиацией в дозе 200Гр, проращиваемые в водопроводной воде;
6. 200Гр+метионин – семена, облученные гамма-радиацией в дозе 200Гр, проращиваемые с добавлением метионина в концентрации 1 мг/мл.

Семенной материал проращивали в рулонах фильтровальной бумаги в термостате при температуре 22°C. Для исследования отбирали семена с одинаковой скоростью прорастания, фиксировали зародышевые корешки в фиксаторе Кларка, в течение первых митотических циклов через каждые 2 часа (с 62 по 72). На давленных препаратах, окрашенных по Фельгену, учитывали митотический индекс и частоту aberrаций хромосом. Для выявления влияния метионина на ростовые процессы, полученные показатели сравнивали с контролем.

Статистический анализ проводили по стандартной методике. Для каждого времени фиксации находили среднее арифметическое значение митотического индекса и рассчитывали статистическую ошибку выборочной части для каждого из них. Достоверность различий между контролем и опытными вариантами оценивали по критерию Фишера. Для проверки нормальности распределения использовали тест Шапиро-Уилка для выборок менее 30 дат. Нормальность распределения позволила использовать параметрический двухфакторный дисперсионный анализ для анализа влияния метионина и облучения на митотическую активность клеток и уровень хромосомного мутагенеза (Атраментова, Утевська, 2007). Расчеты производили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Влияние метионина на митотическую активность. Данные учета митотической активности клеток меристемы изученных сортов были получены в период с 62 часа роста проростков, когда появлялись первые митозы, по 72 час. На рис. 1 и 2 показаны средние результаты учета митотической активности. В контрольном варианте митотическая активность находилась на уровне 5,5–6,7 % и была выше у сорта Мавка. Действие облучения в дозе 40 Гр оказало стимулирующее действие: увеличило интенсивность и количество делящихся клеток, и повысило значения митотического индекса до 6,8–8,2 %.

Достоверное ($p \leq 0,01$) снижение митотического индекса было отмечено в варианте с облучением дозой 200 Гр у обоих сортов, причем в большей степени снижалась митотическая активность у сорта Веселка.

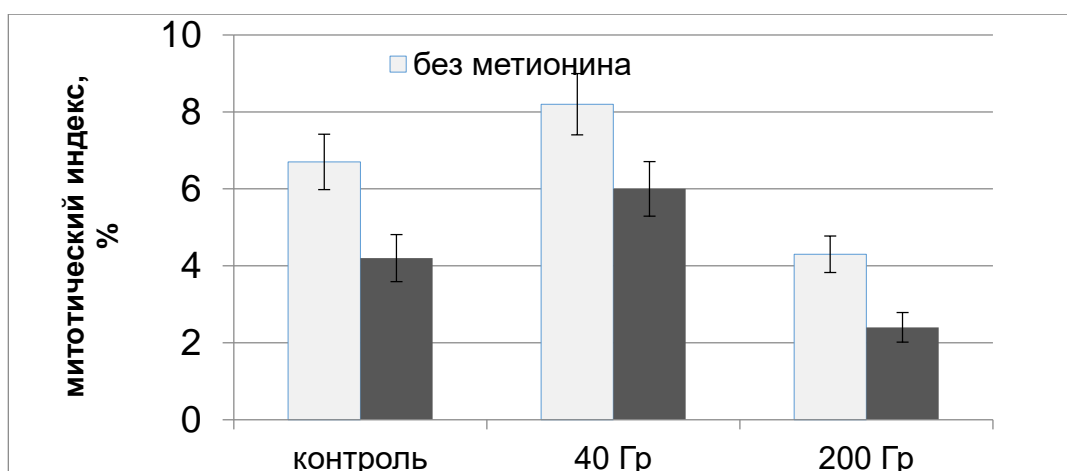


Рис. 1. Изменение митотической активности клеток меристемы проростков семян сорта Мавка при облучении и действии метионина

Полученные данные о стимулирующем действии дозы 40 Гр и угнетающем – 200 Гр согласуются с данными литературы (Гродзинский, 1989) и данными, полученными ранее на кафедре генетики и цитологии (Баева, 2006).

Различия в уровне митотической активности и чувствительности к действию радиации между исследованными сортами можно объяснить разным содержанием эндогенных радиопротекторных соединений. По вкусу сорта лука делят на острые, полуострые и сладкие. Острота лука зависит от количества летучего эфирного масла, содержащего серу. Серосодержащие соединения оказывают радиопротекторный эффект, обусловленный их способностью связывать свободные радикалы, образующиеся при радиационном воздействии. Тем самым снижается уровень цитогенетических и других повреждений в клетке. Исследованные сорта лука Веселка и Мавка относятся к полуострым сортам лука, причем вкус лука Веселка ближе к сладкому, соответственно содержание эфирного масла в нем должно быть ниже, чем у лука Мавка.

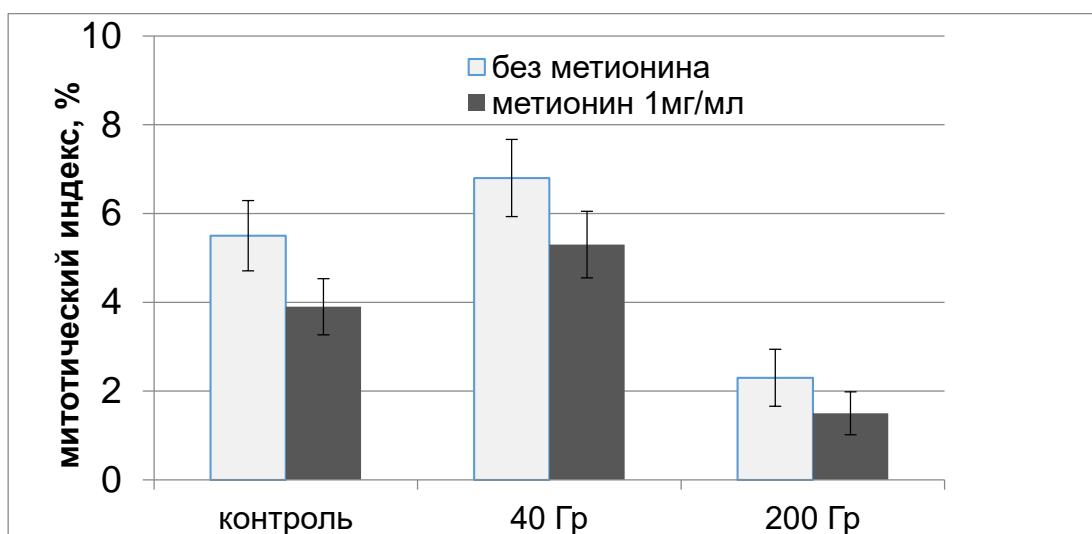


Рис. 2. Изменение митотической активности клеток меристемы проростков семян сорта Веселка при облучении и действии метионина.

Метионин в концентрации 1 мг/мл не оказал радиопротекторного эффекта, который мог бы проявиться в увеличении митотической активности в вариантах с облучением, а наоборот, достоверно ($p \leq 0,05$) снижал активность клеточных делений у обоих сортов и в контроле, и во всех опытных вариантах (рис.1 и 2, табл. 1).

Таблица 1.

Влияние метионина и облучения на митотическую активность и частоту aberrаций хромосом в меристеме проростков лука сортов Мавка и Веселка

Вариант эксперимента	Митотическая активность, %		Аберрации хромосом, %	
	без метионина	метионин 1 мг/мл	без метионина	метионин 1 мг/мл
Мавка				
контроль	6,7±0,7	4,2±0,6	1,5±1,7	17,8±5,4
40 Гр	8,2±0,8	6,0±0,7	30,2±3,7	41,5±4,9
200 Гр	4,3±0,6	2,4±0,4	29,8±5,9	57,7±3,2
Веселка				
контроль	5,5±0,7	3,9±0,6	1,0±0,8	10,6±4,3
40 Гр	6,8±0,7	5,3±0,7	30,0±2,8	38,0±2,9
200 Гр	2,3±0,4	1,5±0,3	32,0±6,0	47,4±5,3

Влияние метионина на уровень хромосомного мутагенеза. Процессы деления клеток и, следовательно, роста растений зависят от структурно-функционального состояния генетической системы клеток. Действие гамма-радиации нарушает целостность ДНК, приводит к возникновению различных типов повреждений. Количество этих повреждений зависит от ряда факторов, в том числе от величины дозы облучения и эффективности процессов репарации (Куцоконь та ін., 2003). Уровень цитогенетических повреждений является информативным показателем при изучении проявления радиационной адаптации и отражает активность защитных систем клетки.

Результаты учета клеток с абберациями хромосом представлены на рис. 3 и 4. Для лука исследуемых сортов характерен невысокий уровень спонтанного мутагенеза, всего 1,0–1,5 % клеток были с абберациями.

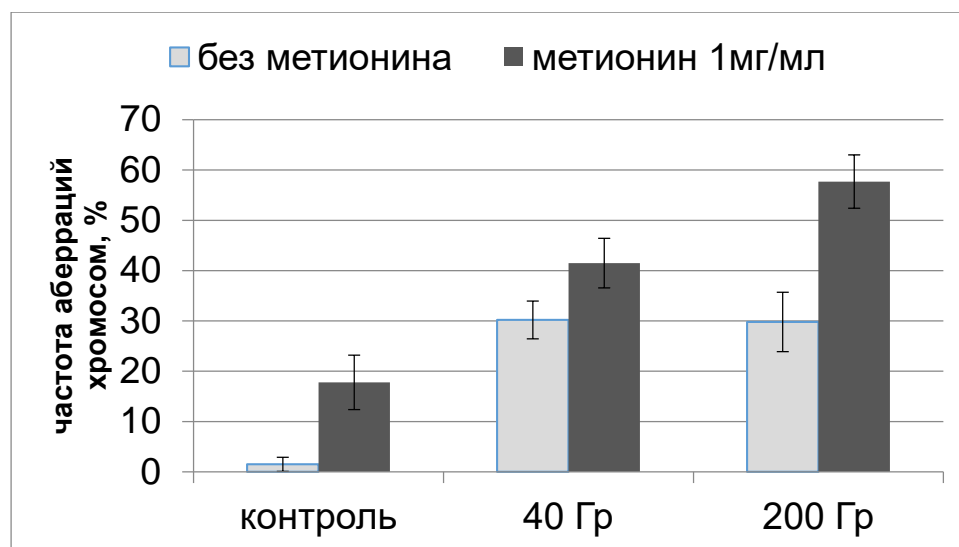


Рис. 3. Изменение уровня хромосомного мутагенеза в клетках меристемы проростков семян сорта Мавка при облучении и действии метионина

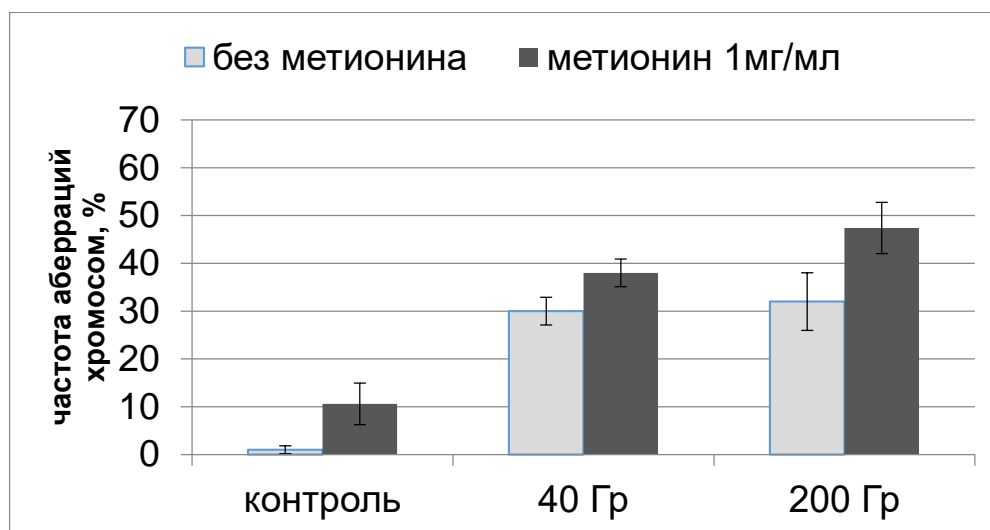


Рис. 4. Изменение уровня хромосомного мутагенеза в клетках меристемы проростков семян сорта Веселка при облучении и действии метионина

Облучение гамма-радиацией как в дозе 40 Гр, так и в дозе 200 Гр увеличило количество клеток с цитогенетическими повреждениями до 30,0–32,0 % у обоих сортов. При этом количество

делящихся клеток в варианте 200 Гр было меньше, чем в варианте 40 Гр (рис. 1 и 2). Большое количество хромосомных мутаций в сочетании с низкой митотической активностью может свидетельствовать о наступлении блока митозов, вызванного облучением.

Задержка делений клеток является проявлением биологического действия высоких доз ионизирующей радиации. Предполагают (Петин, 1987), что во время задержки пролиферации в клетке происходит восстановление повреждений.

Проращивание облученных семян с добавлением в водную среду метионина обусловило существенное и достоверное ($p < 0,05$ в варианте 40 Гр и $p < 0,001$ в вариантах контроль и 200 Гр) увеличение уровня цитогенетических повреждений.

Согласно концепции потенциальных повреждений (Демина и др., 2009) действие мутагена может вызывать как повреждение молекулы ДНК, так и образование потенциальных повреждений, которые в отсутствие репарации или под влиянием внутриклеточных условий могут реализоваться и образовать новые повреждения ДНК. Можно предположить, что рост количества aberrаций в вариантах с метионином вызван метилирующим ДНК действием метионина, при котором метилированию подверглись среди прочих и гены белков репарации (эндонуклеазы, экзонуклеазы, ДНК-полимеразы, лигазы). В отсутствие активных систем репарации произошло преобразование потенциальных повреждений в реальные разрывы хромосом, которые реализовались в хромосомные aberrации.

Дисперсионный анализ показал (табл. 2), что оба фактора – и облучение, и метионин – оказывают влияние на митотическую активность меристемы ($p \leq 0,001$) и частоту возникновения хромосомных aberrаций ($p \leq 0,01$). Различия в уровне пролиферации клеток и хромосомных aberrаций между сортами статистически недостоверны ($p \geq 0,05$).

Таблица 2.

Результаты дисперсионного анализа учета влияния облучения, метионина и сорта семян на митотическую активность и уровень хромосомного мутагенеза

Фактор	Митотическая активность			Аберрации хромосом		
	<i>F</i> эксперим.	<i>F</i> критич.	<i>p</i>	<i>F</i> эксперим.	<i>F</i> критич.	<i>p</i>
Облучение	40,0	5,0	$\leq 0,001$	20,2	5,0	$\leq 0,01$
Метионин	51,7	6,6	$\leq 0,001$	25,1	6,6	$\leq 0,01$
Сорт	0,8	4,9	$\geq 0,05$	2,4	4,9	$\geq 0,05$

Следовательно, хотя метилирование ДНК является необходимым процессом для прохождения некоторых фаз онтогенеза растительного организма (Gallusci et al., 2016; Xing et al., 2015), в период прорастания семян, а также в условиях стресса избыток метильных групп препятствует нормальному развитию и адаптации растений.

Таким образом, на основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

1. Доза гамма-радиации 40 Гр оказывает стимулирующее действие на митотическую активность, а доза 200 Гр – угнетающее, при этом обе дозы увеличивают уровень цитогенетических повреждений.
2. Метионин в концентрации 1 мг/мл не вызывает радиопротекторный эффект, а наоборот, достоверно снижает активность клеточных делений у обоих сортов и в контроле, и при действии радиации.
3. Проращивание облученных семян с добавлением в водную среду метионина обуславливает достоверное увеличение уровня цитогенетических повреждений.

Список литературы

Атраментова Л.О., Утевська О.М. Статистичні методи в біології: Підручник. – Х.: ХНУ імені В.Н.Каразіна, 2007. – 288с. /Atramentova L.O., Utevska O.M. Statystychni metody v biologiyi: Pidruchnyk. – Kh.: KhNU imeni V.N.Karazina, 2007. – 288s./

Баева Е.Ю. Индукция и проявление радиоадаптивного ответа клеток корневой меристемы линий и гибрида подсолнечника // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2006. – Вип.3, №729. – С. 47–52. /Bayeva Ye.Yu. Induktsiya i proyavleniye radioadaptivnogo otveta kletok

kornevoy meristemy liniy i gibrida podsolnechnika // Visnyk Kharkivs'kogo natsional'nogo universytetu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2006. – Vyp. , №729. – S. 47–52./

Волкова Н.Є., Філіпоненко Н.С., Красовська В.В. та ін. Вплив фолієвої кислоти і метіоніну на пристосованість *Drosophila melanogaster* // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2013. – Вип.17, №1056. – С. 69–83. /Volkova N.Ye., Filiponenko N.S., Krasovs'ka V.V. ta in. Vplyv foliyevoyi kysloty i metioninu na prystosovanist' *Drosophila melanogaster* // Visnyk Kharkivs'kogo natsional'nogo universytetu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2013. – Vyp.17, №1056. – S. 69–83./

Верещако Г.Г., Ходосовская А.М., Конопля Е.Ф. Оценка радиопротекторных свойств некоторых биологически активных веществ // Радиация и экосистемы: Мат. межд. научн. конференции. – Гомель: РНИУП «Институт радиологии», 2008. – С. 277–280. /Vereshchako G.G., Khodosovskaya A.M., Konoplya Ye.F. Otsenka radioprotekturnykh svoystv nekotorykh biologicheskii aktivnykh veshchestv // Radiatsiya i ekosistemy: Mat. mezhd. nauchn. konferentsii. – Gornel: RNIUP «Institut radiologii», 2008. – S. 277–280.

Гродзинский Д.М. Радиобиология растений. – К.: Наукова думка, 1989. – 384с. /Grodzinskiy D.M. Radiobiologiya rasteniy. – K.: Naukova dumka, 1989. – 384s./

Демина Э.А., Пилинская М.А., Петунин Ю.И., Ключин Д.А. Радиационная цитогенетика. Русско-английский словарь-справочник. – К.: Здоровье, 2009. – 368с. /Demina E.A., Pilinskaya M.A., Petunin Yu.I., Klyushin D.A. Radiatsionnaya tsitogenetika. Russko-angliyskiy slovar'-spravochnik. –K.: Zdorov'ye, 2009. – 368s./

Кузин А.М. Роль природного радиоактивного фона и вторичного биогенного излучения в явлении жизни. – М.: Наука, 2002. – 79с. /Kuzin A.M. Rol' prirodnoy radioaktivnoy fona i vtorichnoy biogennoy izlucheniya v yavlenii zhizni. – M.: Nauka, 2002. – 79s./

Куцоконь Н.К., Безруков В.Ф., Лазаренко Л.М. та ін. Кількість аберацій на аберантну клітину як параметр хромосомної нестабільності. 1. Характеристика дозових залежностей // Цитологія і генетика. – 2003. – Т.37, №4. – С. 20–25. /Kutsokon' N.K., Bezrukov V.F., Lazarenko L.M. ta in. Kil'kist' aberatsiy na aberantnu klitynu yak parametr khromosomnoyi nestabil'nosti. 1. Kharakterystyka dozovykh zalezhnostey // Tsitologiya i genetyka. – 2003. – T.37, №4. – S. 20–25./

Петин В.Г. Генетический контроль модификаций радиочувствительности клеток. – М.: Энергоатомиздат, 1987. – 208с. /Petin V.G. Geneticheskii kontrol' modifikatsiy radiochuvstvitel'nosti kletok. – M.: Energoatomizdat, 1987. – 208s./

Яблонская Е.К. Изучение воздействия экзогенных регуляторов метионина, фуrolана и их композиции на посевные качества семян пшеницы // Universum: Химия и биология: эл. научн. журн. – 2014. – №9 (9). /Yablonskaya Ye.K. Izucheniye vozdeystviya ekzogennykh regul'yatorov metionina, furoлана i ikh kompozitsii na posevnyye kachestva semyan pshenitsy // Universum: Khimiya i biologiya: el. nauchn. zhurn. – 2014. – №9 (9). (<http://7universum.com/ru/nature/archive/item/1566>)

Gallusci P., Hodgman Ch., Teyssier E. et al. DNA methylation and chromatin regulation during fleshy fruit development and ripening // Front. Plant Sci. – 2016. – Vol.7, art.807. – 14p. (<http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.00807>)

Saint-Macary M.E., Barbisan C., Gagey M.J. et al. Methionine biosynthesis is essential for infection in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* // PLoS ONE. – 2015. – 10(4). – 22p. (<http://journals.plos.org/plosone/article/asset?id=10.1371/journal.pone.0111108.PDF>)

Xing M.-Q., Zhang Y.-J., Zhou S.-R. et al. Global analysis reveals the crucial roles of DNA methylation during rice seed development // Plant Physiology. – 2015. – Vol.168, no 4. – P. 1417–1432. (<http://www.plantphysiol.org/content/168/4/1417.long#fn-6>)

Представлено: Т.А.Долгова / Presented by: T.A.Dolgova

Рецензент: Н.В.Багацька / Reviewer: N.V.Bagatska

Подано до редакції / Received: 23.06.2016