

ВЛИЯНИЕ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ Cs-137 НА РОСТ КОРНЕЙ РАСТЕНИЙ *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. ДИКОГО ТИПА И ЛИНИЙ, ЛИШЕННЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО КАЛИЕВОГО КАНАЛА GORK

В. В. САМОХИНА¹, В. А. ПАВЛЮЧЕНКО¹, В. С. МАЦКЕВИЧ¹,
М. А. МАКОВИЦКАЯ¹, Т. И. МИЛЕВИЧ², А. И. СОКОЛИК¹, В. В. ДЕМИДЧИК¹

¹Белорусский государственный университет,
пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

²ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси»,
ул. Куревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь

Отмечено, что клеточные механизмы радиационного стресса у высших растений изучены недостаточно. В последние годы определено, что K⁺-каналы плазматической мембраны клеток корня высших растений являются сенсорами окислительного стресса и участвуют в адаптивных реакциях при воздействии различных абиотических стресс-факторов. Выполнен сравнительный анализ ростовых ответов на γ -излучение у растений дикого типа и линий, лишенных функциональных K⁺-каналов GORK. Установлено, что малые дозы γ -излучения стимулируют рост корня растений арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), в то время как высокие дозы подавляют данный процесс. Показано, что растения, лишенные функционального наружувыпрямляющего калиевого канала GORK, демонстрируют полное отсутствие стимуляции роста под действием малых доз и менее выраженное угнетение роста под действием высоких доз γ -излучения. Полученные результаты указывают на вовлечение K⁺-зависимых реакций в адаптивный ответ клеток корня высших растений на радиационный стресс.

Ключевые слова: гамма-излучение; калиевые каналы; корень; арабидопсис; GORK; рост и развитие растений.

Образец цитирования:

Самохина В. В., Павлюченко В. А., Мацкевич В. С., Маковицкая М. А., Милевич Т. И., Соколик А. И., Демидчик В. В. Влияние гамма-излучения Cs-137 на рост корней растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. дикого типа и линий, лишенных функционального калиевого канала GORK // Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География. 2016. № 1. С. 36–40.

For citation:

Samokhina V. V., Pauliuchenka V. A., Mackievic V. S., Makavitskaya M. A., Milevich T. I., Sokolik A. I., Demidchik V. V. Effect of gamma-irradiation Cs-137 on root growth of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. in wild type and lines deficient in functioning potassium channel GORK. *Vestnik BGU. Ser. 2, Khimiya. Biol. Geogr.* 2016. No. 1. P. 36–40 (in Russ.).

Авторы:

Вероника Валерьевна Самохина – аспирант кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – А. И. Соколик.

Валентина Александровна Павлюченко – студентка биологического факультета.

Вера Сергеевна Мацкевич – аспирант кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Мария Аркадьевна Маковицкая – аспирант кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Татьяна Ивановна Милевич – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией экспериментальных биологических моделей.

Анатолий Иосифович Соколик – кандидат биологических наук, доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Вадим Викторович Демидчик – доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Authors:

Veronika Samokhina, postgraduate student at the department of plant cell biology and bioengineering, school of biology. veronica.bukhovets@gmail.com

Valentina Pauliuchenka, student at the school of biology. pauliuchenkav@gmail.com

Vera Mackievic, postgraduate student at the department of plant cell biology and bioengineering, school of biology. v.mackievic@gmail.com

Mariya Makavitskaya, postgraduate student at the department of plant cell biology and bioengineering, school of biology. makovitskayama@gmail.com

Tat'yana Milevich, doctor of biology; head of the laboratory of experimental biological models. t_milevich@mail.ru

Anatolii Sokolik, doctor of biology; associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, school of biology. sokolik@bsu.by

Vadim Demidchik, doctor habilitatus of biology, docent; head of the department of plant cell biology and bioengineering, school of biology. dzemidchik@bsu.by

EFFECT OF GAMMA-IRRADIATION Cs-137 ON ROOT GROWTH OF *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. IN WILD TYPE AND LINES DEFICIENT IN FUNCTIONING POTASSIUM CHANNEL GORK

V. V. SAMOKHINA^a, V. A. PAULIUCHENKA^a, V. S. MACKIEVIC^a,
M. A. MAKAVITSKAYA^a, T. I. MILEVICH^b, A. I. SOKOLIK^a, V. V. DEMIDCHIK^a

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

^bInstitute of Radiobiology at the National Academy of Sciences of Belarus,
Kuprevich street, 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus

Cellular mechanisms of radiation stress in plants are poorly understood. In recent years, it was shown that plasma membrane K^+ -channels of root cells can function as sensors of the oxidative stress and take part in adaptive reactions in response to various stress conditions. The aim of this study was to explore of the growth response to gamma-radiation (Cs-137) in wild type and mutant lines lacking functional outwardly-rectifying potassium channel K^+ channel GORK. It was shown that the low doses of gamma-radiation increased the rate of root growth in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (30–40 % stimulation), while the high doses decreased this process. The growth stimulation effect was not found in *gork1-1* mutants (lacking GORK). Moreover, high doses of radiation caused less pronounced inhibition of growth in *gork1-1* mutants. Overall these data strongly suggest that K^+ -dependent reactions are involved in an adaptive response induced by gamma-radiation in cells of higher plants.

Key words: gamma-irradiation; potassium channels; root; arabidopsis; GORK; plant growth and development.

Более 80 % радионуклидов, выделившихся в атмосферу в результате чернобыльской катастрофы, выпали на территории Беларуси. В связи с этим для нашей республики проблема воздействия радиации на живые системы имеет особое значение, притом не только на животные, но и на растительные, составляющие доминирующую по биомассе часть биоты. Воздействие радиации на организм растения остается не до конца понятным, так как у растений не наблюдаются лучевая болезнь и рак, свойственные животным. Недостаточно изучены молекулярные детерминанты воздействия радиации на клетки растений. Неизвестно, как в ответе на радиоактивное излучение участвуют конкретные белковые системы стресс-сигнализации, обеспечивающие чувствительность растений к внешним воздействиям [1–3].

В работе [4] показано, что растения в целом обладают более высокой устойчивостью к воздействию радиации, чем животные. Растения намного более пластичны в плане морфологии, метаболизма и физиологии и обычно демонстрируют ответы на радиацию в виде изменений ростовых процессов и различных модификаций развития. Так, при воздействии малых доз γ -излучения (0,5–5,0 Гр) они реагируют усилением роста и ускорением развития некоторых органов, быстрее набирают биомассу [5]. Высокие дозы (>10 Гр) ингибируют рост и развитие растений, вызывают окислительный стресс, подавляют дыхание, фотосинтез и работу ион-транспортных систем мембран и др. [4].

Воздействие γ -излучения на биологические системы может вызывать два вида эффектов: прямые и косвенные. Прямые эффекты связаны с непосредственным *прямым* окислением биомолекул, в то время как косвенные обуславливаются активными формами кислорода (АФК), генерируемыми при радиолизе воды и других веществ. Наиболее реакционно-способными АФК, образующимися под действием γ -излучения, являются гидроксильные радикалы ($\cdot\text{OH}$), вызывающие окисление любых молекул клетки [6].

Калиевые каналы плазматической мембраны клеток растений играют важную роль в первичном стрессовом ответе (выброс калия переводит метаболизм на катаболический путь) при длительной адаптации (поддержание K^+ -баланса) [6–8]. Они обладают способностью активироваться под действием $\cdot\text{OH}$ и поэтому могут быть потенциальной мишенью γ -излучения. Гипотетически выход K^+ из клеток растения, опосредованный $\cdot\text{OH}$ -зависимой активацией K^+ -каналов, может являться ключевым триггером физиологических перестроек адаптивного характера в ответ на γ -излучение. В связи с этим представлялось актуальным исследовать ростовой ответ на γ -излучение у растений, лишенных функциональных K^+ -каналов клеток корня, в частности доминирующего наружувыпрямляющего K^+ -канала GORK, и сравнить его с ответом растений дикого типа.

Цель настоящей работы – установление характера воздействия различных доз экзогенного γ -излучения (0,5–30,0 Гр) на скорость роста основного корня растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. дикого типа (Wassilevskija; WS-0) и трансгенной линии *gork1-1*, лишенной функционального наружувыпрямляющего K^+ -канала GORK.

Материалы и методика исследования

В качестве объекта исследования были использованы корни проростков *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. природного экотипа Wassilevskija (WS-0), а также мутанты арабидопсиса *gork1-1* (у которого отсутствует ген GORK, кодирующий основной наружувывпрямляющий K^+ канал) [9]. Культура целых растений выращивалась вертикально из семян на чашках Петри (100 % среды Мурашиге и Скуга, 0,35 % фитогеля, 1 % сахарозы, pH 6) с использованием стандартных протоколов [10].

Для верификации отсутствия транскриптов GORK у растений *gork1-1* общая РНК выделялась из корней 10-дневных растений с использованием реагента RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, США) согласно инструкции производителя. Качество РНК проверялось путем применения 2 % агарозного геле-электрофореза, для измерения концентрации использовался спектрофотометр NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, США). Обратная транскрипция аликуот по 1 мкг РНК проводилась согласно протоколу RevertAid™ First Strand cDNA synthesis Kit (Fermentas, Литва). Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) проводилась в трех повторах при помощи Light Cycler 480 SYBR Green I Master (Roche, США). Реакционная смесь общим объемом 10 мкл содержала 1 мкмоль/л специфических праймеров (GORK: 5'ACTCAGTTTAGCCGAGACGT3' и 5'CGCGATCTGACCAACAATGT3') и 1 мкл тестируемой кДНК в заранее измеренной концентрации. Использовался стандартный протокол, рекомендованный производителем (Roche, США). В качестве контрольного гена выступал ген β -тубулина (TUB9: 5'GCGATATAGCTCCCACTGGT3' и 5'CCTCTTCACCGACTGTAGCA3').

Чашки Петри с растениями (в возрасте 5 сут) облучались дозами 0,5; 1; 3; 10 и 30 Гр при помощи установки Игур на базе Института радиобиологии НАН Беларуси. После облучения ежедневно измерялась длина корня в 30 растениях для каждой дозы на протяжении 6 сут. Для обработки полученных результатов использовались стандартные методы вариационной статистики. Вычислялись средняя арифметическая величина, среднее квадратичное отклонение и ошибка средней величины. Для расчета достоверности отличий между группами величин производился анализ на основе ANOVA-теста (среда SigmaPlot 10).

Результаты исследований и их обсуждение

Анализ скорости роста корня наиболее важен при оценке изменений в развитии растений и определении степени фитотоксичности химических агентов и физических факторов [11]. Прирост длины основного корня арабидопсиса был измерен в контрольной группе (необлученные растения) и у растений, подвергшихся воздействию γ -излучения (рис. 1 и 2). Необлученные растения дикого типа демонстрировали прирост длины основного корня на $35,2 \pm 1,0$ мм ($X \pm Sx$; $n = 30$) в течение 6 сут культивирования. Дозы 0,5; 3 и 10 Гр не вызывали статистически значимых изменений в ростовых показателях, в то время как при дозе 1 Гр наблюдалось стимулирующее воздействие. При 1 Гр длина основного корня была на $22,7 \pm 3,7$ % больше, чем в контроле ($X \pm Sx$; $n = 30$; $P < 0,01$; ANOVA-тест). Самая высокая протестированная доза составляла 30 Гр, в этом случае рост растений ингибировался. Длина основного корня на 6-е сутки была на $39,8 \pm 3,3$ % меньше, чем у контрольных растений ($X \pm Sx$; $n = 30$; $P < 0,01$; ANOVA-тест (см. рис. 1 и 2)).

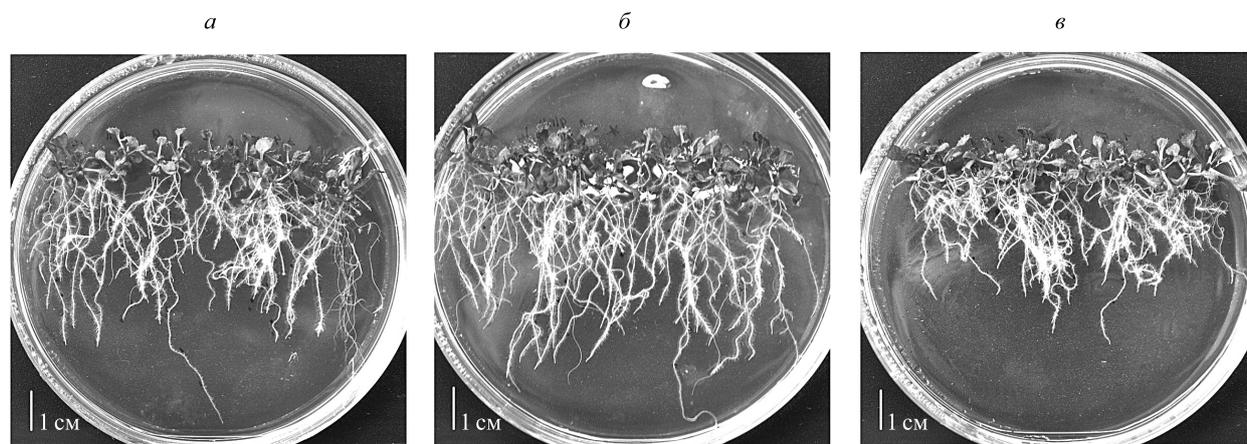


Рис. 1. Асептическая культура проростков *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. WS-0 (10-е сутки), подвергшихся воздействию γ -излучения в различных дозах, Гр: а – 0; б – 1; в – 30

Мутант *gork1-1* рос приблизительно на 20–25 % медленнее, чем дикий тип WS-0. Прирост его основного корня за 6 сут составил $27,3 \pm 1,3$ мм ($X \pm Sx$; $n = 30$). Реакция на γ -излучение у *gork1-1* значительно отличалась от реакции растений дикого типа (см. рис. 2). У *gork1-1* было отмечено отсутствие стимулирующего влияния низких доз радиации. Потенциально данный эффект может быть связан с вовлечением K^+ -зависимой регуляции метаболизма и физиологических функций в процессы адаптации к радиационному стрессу. Известно, что выход K^+ наблюдается при различных стрессовых воздействиях и, вероятно, способствует перестройке метаболизма при умеренной силе стрессового фактора и запуску запрограммированной клеточной гибели при более сильных стрессах [12, 13].

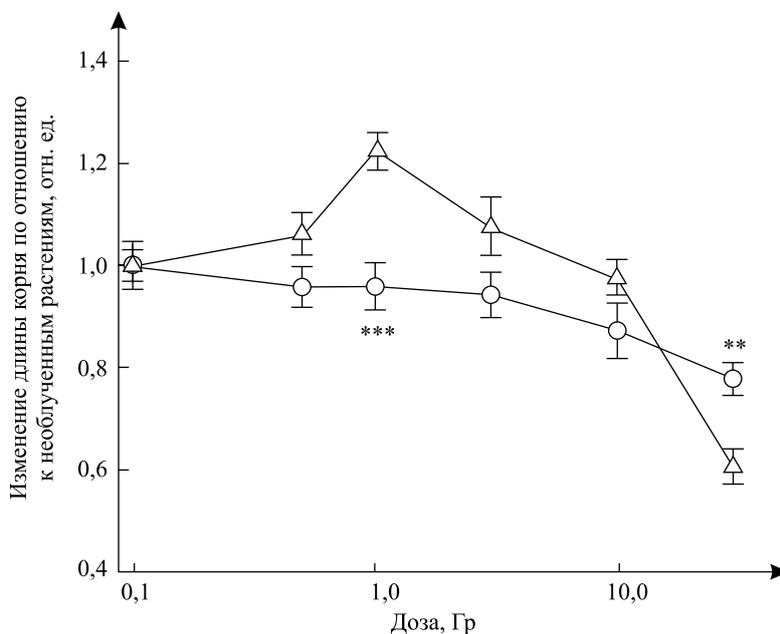


Рис. 2. Воздействие различных доз γ -излучения на длину основного корня растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. дикого типа (WS-0) и нокаутного мутанта, лишённого наружувыврямляющего K^+ -канала GORK: —○— *gork1-1*; —△— дикий тип (WS-0); ** $P < 0,001$; *** $P < 0,0001$

Реакция растений *gork1-1* на облучение дозой 30 Гр была гораздо менее значительной, чем у растений дикого типа. Также происходило торможение роста, но оно было приблизительно в 2 раза слабее ($22,7 \pm 3,2$ % *gork1-1* против $39,8 \pm 3,3$ % у дикого типа; $X \pm Sx$; $n = 30$; $P < 0,01$; ANOVA-тест). Данный эффект может быть объяснен тем, что мутация в K^+ -канале и потенциально меньшая потеря K^+ дают растению преимущества при адаптации к высоким дозам облучения. Такие дозы, как 30 Гр, могут стимулировать сильный окислительный стресс и продукцию АФК, включая $\cdot OH$, вызывая у растений дикого типа чрезмерную потерю K^+ , приводящую к остановке роста и запуску протеаз и эндонуклеаз программ клеточной гибели. В то же время у растений-мутантов *gork1-1* потеря K^+ станет ниже и, соответственно, будут ослабляться негативные последствия высоких доз облучения.

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы:

- малые дозы (1 Гр) γ -излучения стимулируют рост корня арабидопсиса, в то время как высокие (30 Гр) подавляют данный физиологический процесс;
- растения, лишённые функционального наружувыврямляющего калиевого канала GORK, демонстрируют полное отсутствие стимуляции роста под действием малых доз γ -излучения (1 Гр) и значительно менее выраженное угнетение роста под влиянием высоких доз (30 Гр), что указывает на потенциальное вовлечение K^+ -зависимых реакций в адаптивный ответ корня высших растений на радиационный стресс.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК (REFERENCES)

1. Kovács E., Keresztes Á. Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells // *Micron*. 2002. Vol. 33. P. 199–210 [Kovács E., Keresztes Á. Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. *Micron*. 2002. Vol. 33. P. 199–210 (in Engl.)].
2. Ashraf M., Cheema A. A., Rashid M., Zia-ul-Qamar. Effects of gamma rays on M1 generation in Basmati rice // *Pak. J. Bot.* 2003. Vol. 35. P. 791–795 [Ashraf M., Cheema A. A., Rashid M., Zia-ul-Qamar. Effects of gamma rays on M1 generation in Basmati rice. *Pak. J. Bot.* 2003. Vol. 35. P. 791–795 (in Engl.)].

3. Kim J. H., Lee M. H., Moon Y. R., Kim J. S., Wi S. G., Kim T. H. Characterization of metabolic disturbances closely linked to the delayed senescence of Arabidopsis leaves after γ -irradiation // *Environ. Exp. Bot.* 2009. Vol. 67. P. 363–371 [Kim J. H., Lee M. H., Moon Y. R., Kim J. S., Wi S. G., Kim T. H. Characterization of metabolic disturbances closely linked to the delayed senescence of Arabidopsis leaves after γ -irradiation. *Environ. Exp. Bot.* 2009. Vol. 67. P. 363–371 (in Engl.)].
4. Гроздинский Д. М. Радиобиология растений. Киев, 1989. С. 10.
5. Гудков И. Н., Винничук М. М. Сельскохозяйственная радиобиология. Житомир, 2003. С. 22.
6. Demidchik V. Reactive oxygen species and oxidative stress in plants // *Plant Stress Physiology* / ed. S. Shabala. Wallingford, 2012. P. 24–58.
7. Demidchik V., Cuin T. A., Svistunenko D., Smith S. J., Miller A. J., Shabala S., Sokolik A., Yurin V. Arabidopsis root K^+ efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death // *J. Cell Sci.* 2010. Vol. 123. P. 1468–1479 [Demidchik V., Cuin T. A., Svistunenko D., Smith S. J., Miller A. J., Shabala S., Sokolik A., Yurin V. Arabidopsis root K^+ efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *J. Cell Sci.* 2010. Vol. 123. P. 1468–1479 (in Engl.)].
8. Demidchik V., Maathuis F. J. M. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. Tansley review // *New Phytol.* 2007. Vol. 175. P. 387–405 [Demidchik V., Maathuis F. J. M. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. Tansley review. *New Phytol.* 2007. Vol. 175. P. 387–405 (in Engl.)].
9. Hosal E., Vavasseur A., Mouline K., Dreyer I., Gaymard F., Poree F., Boucherez J., Lebaudy A., Bouchez D., Very A.-A., Simonneau Th., Thibaud J.-B., Sentenac H. The Arabidopsis outward K^+ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003. Vol. 100, № 9. P. 5549–5554 [Hosal E., Vavasseur A., Mouline K., Dreyer I., Gaymard F., Poree F., Boucherez J., Lebaudy A., Bouchez D., Very A.-A., Simonneau Th., Thibaud J.-B., Sentenac H. The Arabidopsis outward K^+ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003. Vol. 100, No. 9. P. 5549–5554 (in Engl.)].
10. Demidchik V. Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plant plasma membrane of protoplasts from Arabidopsis roots // *Plant Physiol.* 2002. Vol. 128, № 2. P. 379–387 [Demidchik V. Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plant plasma membrane of protoplasts from Arabidopsis roots. *Plant Physiol.* 2002. Vol. 128, No. 2. P. 379–387 (in Engl.)].
11. Foreman J., Demidchik V., Bothwell J. H. F., Mylona P., Miedema H., Torres M. A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J. D. G., Davies J. M., Dolan L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth // *Nature.* 2003. Vol. 422. P. 442–446 [Foreman J., Demidchik V., Bothwell J. H. F., Mylona P., Miedema H., Torres M. A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J. D. G., Davies J. M., Dolan L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature.* 2003. Vol. 422. P. 442–446 (in Engl.)].
12. Shabala S., Demidchik V., Shabala L., Cuin T. A., Smith S. J., Miller A. J., Davies J. M., Newman I. A. Extracellular Ca^{2+} ameliorates NaCl-induced K^+ loss from Arabidopsis root and leaf cells by controlling plasma membrane K^+ -permeable channels // *Plant Physiol.* 2006. Vol. 141, № 4. P. 1653–1665 [Shabala S., Demidchik V., Shabala L., Cuin T. A., Smith S. J., Miller A. J., Davies J. M., Newman I. A. Extracellular Ca^{2+} ameliorates NaCl-induced K^+ loss from Arabidopsis root and leaf cells by controlling plasma membrane K^+ -permeable channels. *Plant Physiol.* 2006. Vol. 141, No. 4. P. 1653–1665 (in Engl.)].
13. Demidchik V., Straltsova D., Medvedev S., Pozhvanov G., Sokolik A., Yurin V. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K^+ -permeable channels and involvement to programmed cell death and metabolic adjustment // *J. Exp. Bot.* 2014. Vol. 65, № 5. P. 1259–1270 [Demidchik V., Straltsova D., Medvedev S., Pozhvanov G., Sokolik A., Yurin V. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K^+ -permeable channels and involvement to programmed cell death and metabolic adjustment. *J. Exp. Bot.* 2014. Vol. 65, No. 5. P. 1259–1270 (in Engl.)].

Статья поступила в редколлегию 16.11.2015.
Received by editorial board 16.11.2015.