

УДК 633.1: 504. 054

БИОИНДИКАЦИЯ ТЕРРИТОРИЙ С ПОВЫШЕННОЙ РАДИОЭКОЛОГИЧЕСКОЙ НАГРУЗКОЙ

©2013 О.В. Чижик

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск

Поступила 06.06.2013

Показано, что в геноме растений разных систематических групп, подвергшихся как внешнему, так и внутреннему хроническому облучению, происходят изменения, связанные с частично неотрепарированными повреждениями в ДНК и ее связи с белками, изменения в размере клеток и ядер, а также функционировании системы биосинтеза хлорофилла и ассимиляционного аппарата как основы фотосинтетической активности растений. Разработан экспресс-метод для биоиндикации территорий на основе определения полидезоксирибонуклеотидов (ПДН) в клеточных ядрах растений. Подтверждено, что радиация по-разному влияет на морфобиологические и биохимические параметры растений разных систематических групп и разного возрастного состояния, которые могут являться индикатором воздействия среды произрастания.

Ключевые слова: радиация, радионуклиды, клетка, хлорофилл, полидезоксирибонуклеотиды, ДНК.

Экологические факторы по-разному влияют на морфобиологические и биохимические параметры растений разных систематических групп, которые могут являться индикатором состояния среды произрастания. Одним из методов оценки среды обитания является биотестирование, когда для оценки параметров среды используется стандартизованная реакция живого организма.

В результате аварии на Чернобыльской АЭС радиоактивному загрязнению подверглись обширные территории бывших республик Советского Союза (Белоруссии, России, Украины) и ряда других стран Европы. Хронический режим облучения, сложившийся на территории 30-километровой зоны ЧАЭС после острого периода облучения весной 1986 г., затрудняет понимание природы лучевого поражения растительных организмов, так как радиочувствительность всех их компонентов претерпевает существенные изменения в течение годового цикла развития. Интерпретация результатов осложняется и тем обстоятельством, что в ходе облучения, наряду с развитием эффектов поражения, протекают восстановительные процессы.

Следует подчеркнуть, что все данные относительно воздействия ионизирующего излучения на молекулу ДНК и геном в целом, а также биологической роли этих повреждений, получены, в основном, на клетках животных и микроорганизмов. Что касается высших растений, то такие сведения недостаточны. Изучение типов повреждений ДНК, а также явления генетической адаптации к радиационному воздействию остаются важными проблемами биологии в поставарийный период.

Экологический мониторинг на территориях усиленного радиоэкологического контроля Республики Беларусь предполагает в комплексе многих мероприятий увеличение числа чувствительных тест-объектов на заражение территорий радионуклидами в дополнение к существующим биотестам.

Так как радионуклиды, поступая из растений в организм животных и человека, могут накапливаться и оказывать неблагоприятное воздействие на здоровье и

генофонд, изучение данной проблемы, выработка рекомендаций по устранению негативного воздействия радионуклидов на почву и растения, а также увеличение числа чувствительных тест-объектов на заражение территорий является весьма актуальной задачей. Учитывая, что последствия аварии на ЧАЭС затронули и районы интенсивного сельскохозяйственного использования, то целесообразно проводить такие исследования на культурных растениях, в том числе злаковых (рожь, тритикале) и бобовых (люпин, бобы) и многолетних растений.

Для оценки состояния территорий усиленного радиоэкологического контроля были впервые применены современные физиологические, молекулярно-биологические и биохимические методы исследования. Так как относительно невысокие дозы радиационного воздействия на растительные объекты в ряде случаев выражаются в ускорении прорастания семян, роста растений, прохождении фаз развития, повышении фотохимической активности хлоропластов, изменении содержания хлорофилла, увеличении числа разрывов в молекулах ДНК, все эти показатели могут служить тестами на радиационное воздействие.

Целью работы было исследовать возможность использования цитоморфологических и физиолого-биохимических изменений в растительных объектах, вызванных радиоэкологическим воздействием, для разработки системы биоиндикации территорий с повышенной радиоэкологической нагрузкой.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили семена и проростки бобовых (люпин) и злаковых (тритикале) растений, а также листья березы повислой, произрастающих в зоне Полесского радиоэкологического заповедника (г. Хойники, дер. Бабчин, Могилевская обл.), с радиационным фоном почвы 1750 кБк/м², и условно чистой зоны – территории Центрального ботанического сада НАН Беларуси (экспериментальные участки).

Изучение морфологии клеток проводили совместно с О.П. Булко по [1]. Осевые части проростков без эндосперма взвешивали, их 1-сантиметровые верхние части мацерировали и получали суспензии разделенных

Чижик Ольга Владимировна, к.б.н., ведущий научный сотрудник, e-mail: alisa67@hotmail.ru

клеток для цитометрического определения размера одиночных клеток. Ядра проростков выделяли по [2]. Площадь сечения клетки в фокальной плоскости оценивали как произведение её длины на ширину, которые измеряли с помощью объект-микрометра МОВ-1-15^x под микроскопом МБИ-6 (ЛОМО). Результаты наблюдений обрабатывали в системах Statistica 5.0 и Statgraphics Plus.

Содержание хлорофиллов *a* и *b* у бобовых, злаковых и древесных растений определяли в полученной вытяжке пигментов в 96% этаноле без предварительного их разделения [3]. Оптическую плотность экстракта (E) регистрировали на спектрофотометре Agilent (США). Концентрацию пигментов рассчитывали по уравнениям: $C_{\text{хл.}a} = 13,70 E_{665} - 5,76 E_{649}$; $C_{\text{хл.}b} = 25,80 E_{649} - 7,60 E_{665}$; $C_{a+b} = 6,10 E_{665} + 20,04 E_{649}$.

Относительная сложность и длительность работ по исследованию клеточных ядер и возникающих в них однонитевых разрывов ДНК привело к необходимости отработки более быстрого метода анализа для целей биоиндикации, поскольку использование колонки с гидроксиллапатитом очень трудоемко и требует многих повторностей. В результате предложен следующий экспресс-метод для тестирования образцов.

Из изолированных клеточных ядер раствором 0,14М NaCl на 10 mM Tris-буфере извлекали суммарный экстракт, включающий ДНК различной степени целостности и полинуклеотиды, который тестировали на спектрофотометре (Amersham) против буфера. Затем из экстракта 96% этанолом осаждали высокополимерную ДНК и снова спектрофотометрировали (диапазон длин волны 220-350 нм). Считали, что после осаждения ДНК в растворе оставались полидезоксирибонуклеотиды (ПДН) и монопуклеотиды. О количестве экстрагированных ПДН судили по их процентной доле в экстракте относительно суммарного поглощения до осаждения ДНК. Отметим, что однонитевые разрывы ДНК способствуют ее фрагментации и экстракции 0,14М NaCl. Оценку количественного содержания (концентрацию) геномной ДНК определяли по величине поглощения в УФ-свете с длиной волны 260 нм, чистоту образца – по отношению величин поглощения при 260 и 280 нм. Измерения проводили в кварцевых кюветах на спектрофотометре Agilent 8453.

Все анализы проводились в трехкратной повторности. Приведенные в таблицах цифровые данные являются средними из трех повторностей и характеризуют всю выборку.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Увеличение степени цитогенетического повреждения в клетках и тканях растений считается одним из самых радиочувствительных показателей [4].

Развивающиеся органы, ткани и клетки различных видов растений могут по-разному реагировать на факторы внешней среды и быть индуктором воздействия среды обитания. Провели определение общих цитоморфологических показателей зародышей тритикале и люпина: формы, размеров клеток и клеточных ядер и их соотношений. Измерения показали, что в зоне с увеличенным радиационным фоном средний вес од-

ного зародыша семени тритикале близок к таковому в контроле ($4,03 \pm 0,60$ мг и $3,93 \pm 0,74$ мг соответственно), однако количество клеток в одном зародыше из радиационной зоны было на 11% больше. Т.е. этот показатель может свидетельствовать об уменьшении размеров клеток или изменении соотношения доли мелких и крупных клеток.

Измерения площади клетки зародыша показали, что клетки зародыша тритикале, сформировавшиеся в загрязненной зоне, характеризовались средним размером в 471 мкм^2 , тогда как в контроле – 740 мкм^2 (рис. 1). Характерно, что измерение площади ядер этих клеток показало противоположную картину: ядра облученных растений были значительно крупнее контроля (контроль – $8,54 \text{ мкм}$, опыт – $15,88 \text{ мкм}$). Соотношение «площадь клетки зародыша/площадь ядра» у контрольных растений было равным $66,1$, в опыте – $28,6$.

Подобная зависимость наблюдалась и при исследовании представителя семейства бобовых – люпина. Средняя площадь клетки зародыша люпина контрольных растений составила 854 мкм^2 , опытных – 686 мкм^2 . Средняя площадь ядра была $11,33 \text{ мкм}^2$ (контроль) и $14,91 \text{ мкм}^2$ (опыт), соотношение «площадь клетки/площадь ядра» составляло величину, равную $46,0$.

Исходя из полученных цито-морфологических показателей можно сделать вывод, что растения, подвергшиеся радиоактивному воздействию, по своим морфологическим показателям отличаются от контроля. Опытные образцы представителей как злаковых, так и бобовых растений характеризовались наличием более мелких клеток и крупных ядер. Количество клеток на единицу массы ткани увеличивалось, а соотношение «площадь клетки/площадь ядра» у опытных растений было значительно меньше, чем в контроле.

Исследование накопления пигментов в злаковых, бобовых и древесных растениях. Установлено, что гамма-излучающие радионуклиды могут вызывать ускорение онтогенеза, изменение активности пероксидазы в клеточных мембранах листьев, повышение фотохимической активности изолированных хлоропластов и содержания фотосинтетических пигментов (хлорофилла) [5].

Средние значения содержания зеленых пигментов у злаковых (тритикале, сорт Инесса), и древесных растений (береза повислая) представлены в таблице.

Полученные результаты по содержанию фотосинтетических пигментов выявили изменения в содержании хлорофилла *a* как в листьях березы повислой, так и в проростках тритикале.

Показатели содержания пигментов в проростках семян у представителя семейства бобовых (люпин) показали сходную картину при близких значениях количества пигментов в семядолях этой культуры (как части проростка с низкой метаболической активностью). Наиболее ярко изменения в содержании зеленых пигментов проявилось у березы повислой (особенно хлорофилла *a*), что позволяет отнести этот объект к ряду биоиндикаторов изучаемого техногенного фактора.

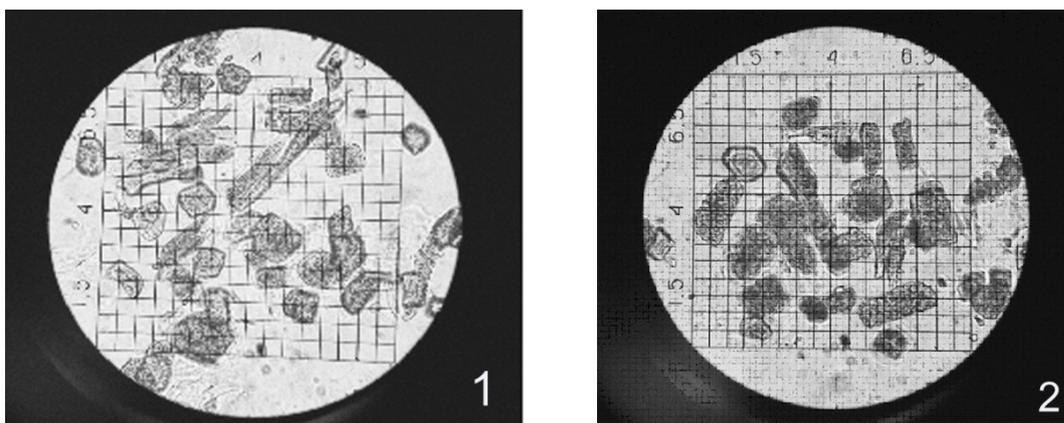


Рис. 1. Клетки зародышей тритикале: 1 – опыт, 2 – контроль

Таблица. Содержание зеленых пигментов в 72-часовых проростках тритикале (сорт Инесса) и листьях березы повислой (мкг/мг сырого веса)

| тритикале (сорт Инесса) | | | |
|-------------------------|-------------|-------------|---------------|
| наименование | хлорофилл а | хлорофилл b | хлорофилл a+b |
| Контроль, мкг/мг | 0,334 | 0,119 | 0,453 |
| Опыт, мкг/мг | 0,435 | 0,219 | 0,654 |
| береза повислая | | | |
| наименование | хлорофилл а | хлорофилл b | хлорофилл a+b |
| Контроль, мкг/мг | 1,138 | 0,542 | 1,680 |
| Опыт, мкг/мг | 1,348 | 0,893 | 2,241 |

Прим.: $p < 0,05$

Вероятно, радионуклиды, воздействуя на клеточные мембраны, вызывают усиление процессов, приводящих к изменению состояния и свойств мембран и активации фотосинтетических реакций. Это подтверждает данные о том, что ионизирующее излучение в определенных пределах оказывает влияние на функционирование пигмент-белковых систем и ассимиляционного аппарата как основы фотосинтетической активности растений [6], что может служить тест-объектом на радиационное воздействие.

Исследование ДНК и полидезоксирибонуклеотидов растений в зонах с различной экологической нагрузкой. Известно, что облучение вызывает в ДНК ряд повреждений - увеличение числа разрывов в молекулах этого полимера [7-9]. Данное обстоятельство послужило основанием для использования показателей возникновения одонитевых разрывов ДНК и ко-

личества растворимых полидезоксирибонуклеотидов как индикаторов радиационного воздействия.

В процессе работы по определению ПДН возникла необходимость отработки достаточно быстрого метода анализа для целей биоиндикации, в связи с чем был разработан экспресс-метод по определению ПДН, который можно легко применять в лабораторной практике. Степень повреждения ДНК оценивали по процентному содержанию одонитевой ДНК, образующейся при денатурации в щелочных условиях, и по накоплению в клеточных ядрах и цитоплазме ПДН, растворимых в пределах физиологических концентраций. Результаты исследований показали увеличение количества экстрагируемых ПДН и ДНК у проростков люпина из семян, полученных из зоны Радиационно-экологического заповедника по сравнению с контролем на 25 % (рис. 2).

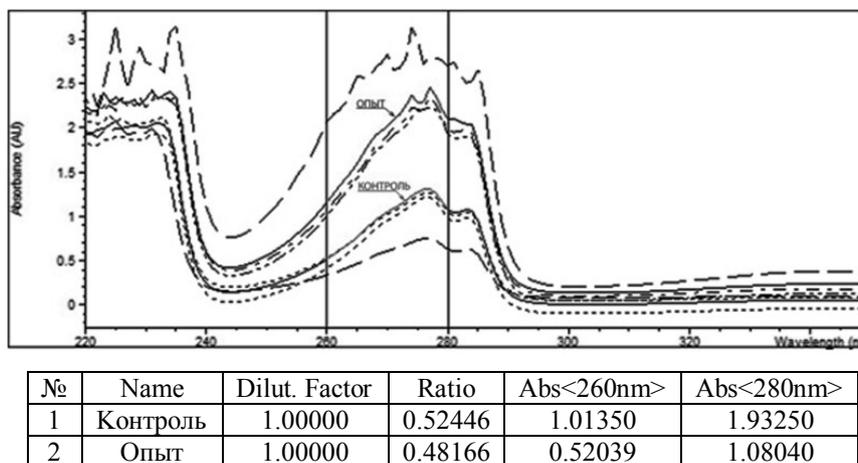


Рис. 2. Спектры поглощения экстракта 0,14М NaCl из ядер проростков люпина: контроль – растения, выращенные в ЦБС, опыт – растения, выращенные в Радиационно-экологическом заповеднике

Этот показатель отличался от таковых у злаковых (тритикале), что мы объясняем активацией систем репарации вследствие облучения у представителей этого семейства. У бобовых растений такие реакции слабо выражены, вследствие чего доля ПДН возрастает при облучении, и именно такие виды растений наиболее пригодны для биотестирования.

Результаты дальнейших исследований показали, что, в отличие от ранее полученных данных на проростках (ювенильная стадия развития), зрелые ткани растений как люпина, так и тритикале характеризовались более низким уровнем ПДН и ДНК, чем у растений из чистой экологической зоны. Этот эффект связан, по нашим данным, с более прочной связью ДНК-белок в хроматине, общей возрастающей компактизацией хроматина и снижением метаболической активности ядра. Полученные данные позволят использовать количественное содержание однонитевых разрывов ДНК и ПДН как возможные показатели индуцированных радиацией изменений в хроматине ядер.

Проведенные исследования подтвердили, что в геноме растений разных систематических групп, подвергшихся как внешнему, так и внутреннему хроническому облучению, происходят изменения в размере клеток и ядер, а также в функционировании системы биосинтеза хлорофилла как основы фотосинтетической активности растений, что аналогично процессам, происходящим при старении клетки.

Показано, что радиация влияет также на такие цитоморфологические параметры растений как количество клеток на единицу массы ткани, соотношение площадь клетки/площадь ядра.

Определено, что на ранних стадиях прорастания растения реагируют на радиационное воздействие увеличением содержания ПДН и однонитевых разрывов ДНК, что является показателем неблагоприятного воздействия на растительный организм.

Показано, что на радиочувствительность растений влияет как видовая принадлежность, так и стадия развития. Наиболее чувствительными являются представитель бобовых – люпин и представитель древесных – береза повислая. Радиационное воздействие на тритикале наблюдали только на ранних стадиях развития.

Определение тест-показателей и дальнейшая разработка системы биоиндикации территорий с разной

степенью радиоэкологической нагрузки позволит более полно определять степень воздействия радиации на геном организмов и проводить мониторинг загрязненных территорий с целью их рационального использования в сельском и лесном хозяйстве.

Автор выражает благодарность О.П. Булко за помощь в проведении исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Datta N., Schell M.B., Roux S.J.* Spermine Stimulation of a Nuclear NII Kinase from Pea Plumules and Its Role in the Phosphorylation of a Nuclear Polypeptide // *Plant Physiol.* 1987. V. 84. P. 1397-1401.
2. Способ выделения растительных клеточных ядер: а.с. 1701747 СССР, С 12 № 9/50. / Э.А. Иванова, Г.Х. Вафина (СССР). № 4785582/13; заявл. 13.02.90; опубл. 30.12.91. Бюл. № 48.
3. *Wintermans J.F., DeMots A.* Spectrophotometric characteristics of chlorophyll 'a' and 'b' and their pheophytins in ethanol // *Biochimica et Biophysica Acta.* 1965. V. 109. P. 448-453.
4. *Гудков И.Н.* Радиационный мониторинг загрязненной радионуклидами территории в зоне влияния аварии на Чернобыльской АЭС с использованием дикорастущего растения горошка мышиного (*Vicia cracca* L.) // *Навуковий вісник Чернівецького університету.* Вып. 417. Биология. Чернівці: Рута, 2008. С. 361-368.
5. *Тишкевич Т.К., Петрович И.С., Заболотный А.И.* Изменение физиолого-биохимических характеристик растений люпина под влиянием инкорпорированных радионуклидов // *Биология.* 1993. Т. 33. № 1. С. 54-57.
6. *Гапоненко В.И., Конопля Е.Ф.* Радиация и Чернобыль: состояние, хлорофилл и защита растений // *Нац. акад. наук Беларуси. Гомель: Институт радиологии. Радиация и Чернобыль.* 2007. Т. 3. С. 266.
7. *Hagen V.* Mechanisms of induction and repair of DNA double-strand breaks by ionizing radiation: some contradiction // *Radiat. Environm. Biophys.* 1994. V. 33. № 4. P. 315-322.
8. *Dianov G.L., Parsons J.L.* Low-dose irradiation of nontransformed cells stimulates the selective removal of precancerous cells via intercellular induction of apoptosis // *Cancer Res.* 2007. V. 67. № 3. P. 1246-1253.
9. *Sherif F., El-Khamisy, Gulam M Saifi, Weinfeld M.* Defective DNA single-strand break repair in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1 // *Nature.* 2005. V. 434. № 7029. P. 108-113.

BIOINDICATION OF TERRITORIES WITH ELEVATED RADIOECOLOGICAL PRESSURE

©2013 O.V. Chyzyk

Central Botanical Garden, NAS of Belarus, Minsk

It was confirmed that in plant genome of different systematic groups, growing in Radio-ecological reservation, the changes, dealing with partly not repaired DNA damages and redistribution of its parts, bounded with proteins, changes of cells and nuclei size, changes of pigment system functioning and assimilation apparatus are taking place. Express-method of PDN definition in the cell nuclei was elaborated. Radiation is differently influences on morphophysiological and biochemical parameters of plants of different systematic groups and ages, which can be the indicator of environment influence.

Key words: radiation, radionuclide, cell, chlorophyll, polydeoxyribonucleotide, DNA.