

УДК 582.683.2:581.14:57.084.1:539.1.047

КИНЕТИКА ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН КАК ИНФОРМАТИВНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ ДЛЯ ОЦЕНКИ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ (НА ПРИМЕРЕ АБК-МУТАНТНЫХ ЛИНИЙ *Arabidopsis thaliana*)

© 2023 г. Е. В. Бондаренко^{1,*}, Д. Д. Бабина¹, М. Ю. Подобед¹, А. С. Миценьк¹, П. Ю. Волкова¹

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии, Обнинск, Россия

*E-mail: bev_1408@mail.ru

Поступила в редакцию 01.07.2022 г.

После доработки 14.12.2022 г.

Принята к публикации 21.12.2022 г.

Проведен анализ динамики прорастания семян модельного растения *Arabidopsis thaliana* после воздействия γ -излучения в дозах 50, 100 и 150 Гр. Объектами исследования выбраны линии: *abi3-8* с мутацией в гене *ABI3* и со сниженной чувствительностью к природной форме абсцизовой кислоты и генотип *aba3-1* с мутацией в гене *ABA3* и пониженным уровнем эндогенной абсцизовой кислоты. В качестве контроля использован дикий тип Col-8. Для изучения влияния γ -излучения на различные аспекты прорастания семян (всхожесть, время и скорость прорастания, синхронность прорастания партии семян) проведена оценка кинетики прорастания при помощи пакета Germinationmetrics для среды программирования R. Контрольные и облученные семена (источник излучения — ⁶⁰Co) выращивали на питательной среде Мурасиге–Скуга половинной концентрации в контролируемых условиях. Прорастание оценивали в течение первых 6 сут после переноса в фитотрон по разрыву эндосперма и появлению корешка. Всего проведены три независимых эксперимента с тремя биологическими повторностями в каждом. Отмечено более выраженное влияние γ -излучения в дозе 150 Гр на все исследуемые генотипы. Кластеризация всхожести показала, что распределение процента прорастания семян по дням больше зависит от генотипа, чем от дозы воздействия. Лучшие показатели всхожести, скорости и временного интервала между прорастанием 10 и 90% семян отмечены у необлученных семян линии *abi3-8*. Полученные результаты и сравнительный анализ с ранее опубликованными данными позволяют утверждать, что оценка кинетики прорастания при помощи пакета Germinationmetrics для R — наглядный и достаточно информативный инструмент для изучения влияния ионизирующего излучения и иных абиотических факторов на различные аспекты прорастания семян.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, кинетика прорастания, γ -излучение, абсцизовая кислота

DOI: 10.31857/S0869803123020030, **EDN:** EOKPNW

Выход из стадии покоя и прорастание семян являются одним из ключевых и, в то же время, хрупких этапов в жизненном цикле растений и определяет начало роста растений в естественных или сельскохозяйственных экосистемах. Одним из основных фитогормонов, регулирующих покой семени, является абсцизовая кислота (АБК). Прорастание семян, в свою очередь, контролируется балансом АБК и гибберелловых кислот [1]. Во время развития семян АБК контролирует поздние стадии созревания зародыша и устойчивость к десикации с помощью семейства факторов транскрипции с доменом В3, в том числе *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3, AT3G24650)* [2]. *ABI3* кодирует ДНК-связывающий белок, являющийся важным компонентом передачи сигналов АБК

и регулятором перехода от стадии зародыша к ранним этапам развития проростков [3].

АБК участвует в ответе семени, прошедшего стратификацию, на водный стресс. В условиях дефицита воды прорастающий зародыш проходит АБК-опосредованную контрольную точку развития, которая перезапускает программы позднего эмбриогенеза, и его дальнейшее превращение в автотрофный проросток блокируется. Зародыши, прорастание которых заблокировано, остаются жизнеспособными, но находятся в состоянии покоя и осмотолерантности, пока в их клетках присутствует АБК [4].

Синтез АБК начинается в пластидах из ксантофиллов и после серии последовательных превращений предшественник АБК выходит в цито-

плазму, где превращается в абсцизовый альдегид. Ключевым компонентом последнего этапа биосинтеза АБК является сульфураса молибденового кофактора (*Мосо*-сульфураза, альдегид-оксидаза), кодируемая геном *АВА3* (*AT1G16540*) [5]. *Мосо*-сульфураза регулирует превращение абсцизового альдегида в АБК и участвует во множестве биологических процессов, таких как активируемый ауксином сигнальный путь, движение устьиц, защитная реакция на бактериальные инфекции, реакция на абиотический стресс (холод, тепло, осмотический стресс) [6–8].

Кроме контроля прорастания семян АБК также участвует в вегетативном развитии растений, стимулируя рост при низких концентрациях и подавляя его при высоких [9]. При этом одной из ключевых функций АБК является не только участие в процессах роста и развития растений, но и контроль внутриклеточного ответа на воздействие разнообразных стрессоров, включая ионизирующее излучение [10]. В рамках исследования эффектов хронического радиационного воздействия в популяциях *Pinus sylvestris*, расположенных на территориях, загрязненных радионуклидами в результате аварии на Чернобыльской АЭС, был проведен анализ транскриптома хвои *P. sylvestris* методом высокопроизводительного секвенирования РНК и выявлены дифференциально экспрессирующиеся гены, общие для загрязненных радионуклидами популяций: Масаны, Кулажин и Заборье Кладбище [11]. Из пяти выявленных генов с пониженной экспрессией четыре были связаны с ответом на стресс: транскрипт анионной пероксидазы, вовлеченный в апоптоз, и три транскрипта, связанные с сигналингом абсцизовой кислоты (АБК) — *CIPKK_ARATH*, *CIPKA_ARATH* и *SLAC1_ARATH* [11]. Концентрации АБК, как ингибитора прорастания семян [12], снижались в проростках ячменя после облучения семян в стимулирующих малых дозах γ -излучения [13].

Учитывая роль АБК в прорастании семени и в ответе растения на стресс, кинетика прорастания семян АБК-мутантов представляется информативным параметром для оценки воздействия стрессовых факторов на раннем этапе жизненного цикла растений. Цель данной работы заключалась в изучении влияния γ -излучения на различные аспекты прорастания семян при помощи пакета *Germinationmetrics* (версия 0.1.3 [14]) для среды программирования R (версия 3.6.3 [15]).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Объект исследования

Для изучения динамики прорастания семян *Arabidopsis thaliana* после γ -облучения в дозах 50, 100 и 150 Гр объектами исследования выбраны

линии, мутантные по генам, связанным с АБК-сигналингом: *abi3-8* маловосприимчивая к природной форме S-(+)-АБК, содержит мутацию в гене *ABI3*, что препятствует S-(+)-АБК-опосредованному сигналингу [16]; *aba3-1*, с нарушением синтеза АБК, содержит рецессивную мутацию гена *АВА3*, кодирующего *Мосо*-сульфуразу [17]. Экотип Col-8 был использован в качестве контроля. Семена были получены из коллекции Института Жан-Пьера Буржена (Национальный институт сельскохозяйственных исследований, Версаль, Франция).

Облучение и проращивание семян *A. thaliana*

Семена дикого типа и мутантных линий подвергали воздействию γ -излучения на уникальной научной установке ГУР-120 (Россия) в ФГБНУ ВНИИРАЭ (источник излучения — ^{60}Co) в бумажных пакетах. Дозы острого облучения составили 50, 100 и 150 Гр при мощности дозы 460 Гр/ч.

Семена выращивали на питательной среде Мурасиге—Скуга половинной концентрации, содержащей растворы макро- и микроэлементов, хелат железа, агар-агар и MES буфер с добавлением 0.3% сахарозы. После облучения семена помещали в холодильник (+4°C) на 48 ч для стратификации, после чего их переносили в фитотрон (+21°C, 55% влажности и плотности фотосинтетического фотонного потока 80 мкмоль/с м²) для индукции прорастания.

Всхожесть семян оценивали в течение первых 6 сут после переноса в фитотрон по разрыву эндосперма и появлению корешка.

Всего проведены три независимых эксперимента с тремя биологическими повторностями в каждом. Одна биологическая повторность одного эксперимента состояла из 20–36 семян каждой исследуемой линии (Col-8, *abi3-8*, *aba3-1*) на дозу. Итого использованы около 1000 семян каждой линии.

Расчет показателей прорастания

Для вычисления показателей (всхожесть, время и скорость прорастания), необходимых для построения кривой прорастания семян, в *Germinationmetrics* используется четырехпараметрическая функция Хилла [18], описываемая следующей формулой:

$$f(x) = y = y_0 + (ax^b / (x^b + c^b)),$$

где x — время (в днях); y_0 (y intercept) — отрезок, отсекаемый на оси y (интерцепт), позволяет оценить время начала прорастания (lag); a (asymptote , %) — асимптота, эквивалент процента всхожести; b ($\text{shape and steepness}$, условные единицы) — показатель скорости прорастания, определяющий форму и крутизну кривой прорастания; c (half

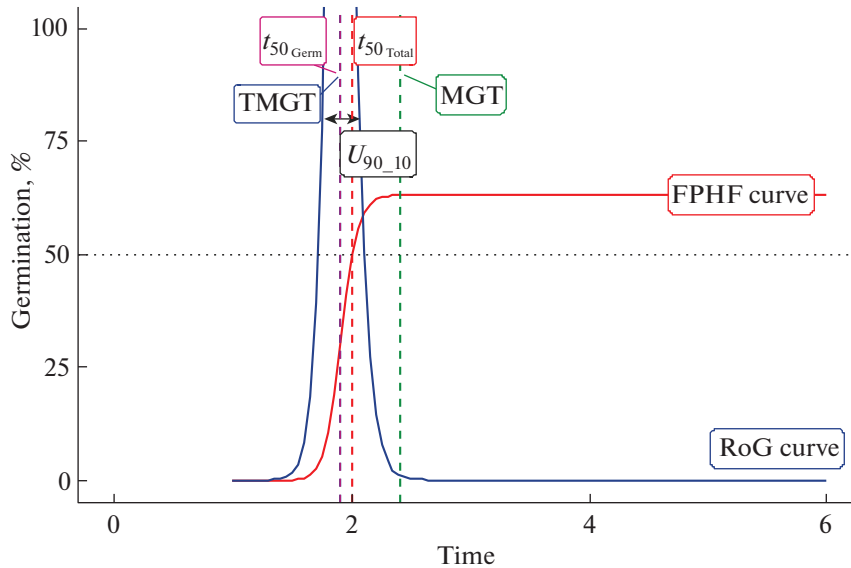


Рис. 1. Кривая прорастания семян генотипа Col-8. Вертикальная ось – всхожесть, %; горизонтальная ось – время, дни. *FPHF curve* – кривая прорастания, основанная на четырехпараметрической функции Хилла; *RoG curve* – кривая скорости прорастания; *TMGR* – время максимальной скорости прорастания; $t_{50,germ}$ – вертикальная линия, указывающая время, необходимое для прорастания 50% жизнеспособных семян; $t_{50,total}$ – вертикальная линия, указывающая время, необходимое для прорастания 50% семян, уложенных на субстрат; *MGT* – вертикальная линия, указывающая среднее время прорастания; $U_{90,10}$ – горизонтальная линия, показывающая временной интервал между прорастанием 10 и 90% семян.

Fig. 1. Seed germination curve of Col-8 genotype. The vertical axis – germination, %; the horizontal axis – time, days. *FPHF curve* – germination curve based on the four-parameter Hill function; *RoG curve* – germination rate curve; *TMGR* – time at maximum germination rate; $t_{50,germ}$ – vertical line indicating the time required for germination of 50% of viable seeds; $t_{50,total}$ – a vertical line indicating the time required for the germination of 50% of the seeds sown on the substrate; *MGT* is a vertical line indicating the average germination time; $U_{90,10}$ is a horizontal line showing the time interval between the germination of 10 and 90% of seeds.

maximal activation level, дни⁻¹) – полумаксимальный уровень активации; отражает скорость прорастания 50% жизнеспособных (проросших) семян.

Кривые прорастания семян, построенные с помощью четырехпараметрической функции Хилла, основаны на медианных значениях трех повторностей каждого экспериментального условия в трех независимых экспериментах.

Статистический анализ

Для статистического анализа экспериментальных данных и визуализации полученных результатов использовали набор пакетов tidyverse, rstatix и Hmisc для R. Для изучения связи между показателями прорастания использовалась непараметрическая ранговая корреляция Спирмена. Статистическая значимость различий принималась при уровне $p \leq 0.05$. Для построения иерархической кластеризации использовали библиотеки pandas и seaborn языка программирования Python 3.8.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для построения кривой прорастания семян использовалась четырехпараметрическая функция Хилла, как метод аппроксимации кривой

[18], определяющая всхожесть, время и скорость прорастания. Пример кривой прорастания семян представлено на рис. 1. Кривые прорастания контрольных и γ -облученных семян *A. thaliana* дикого типа (Col-8) и линий с нарушениями синтеза (*aba3-1*) и рецепции (*abi3-8*) АБК наглядно представлены на рис. 2. Количественные параметры кривых прорастания даны в табл. 1.

Кроме основных четырех показателей (y_0, a, b, c), функция рассчитывает и другие параметры, в том числе: *TMGR* (time at maximum germination rate) – время максимальной скорости прорастания – временная точка, после которой мгновенная скорость прорастания (instantaneous rate of germination) снижается; $U_{90,10}$ (uniformity) – временной интервал между прорастанием 10 и 90% семян (табл. 1).

Из необлученных семян максимальное значение асимптоты a , т.е. всхожести, отмечено у линии *abi3-8* ($a = 93.05\%$). У контрольных семян этого же генотипа зарегистрированы самые высокие значения скорости прорастания 50% жизнеспособных семян и максимальной скорости прорастания ($c = 1.64$ дней⁻¹, $TMGR = 1.61$ дней), а также самый крутой подъем к асимптоте ($b = 10.71$). Линия *abi3-8* характеризуется самым коротким

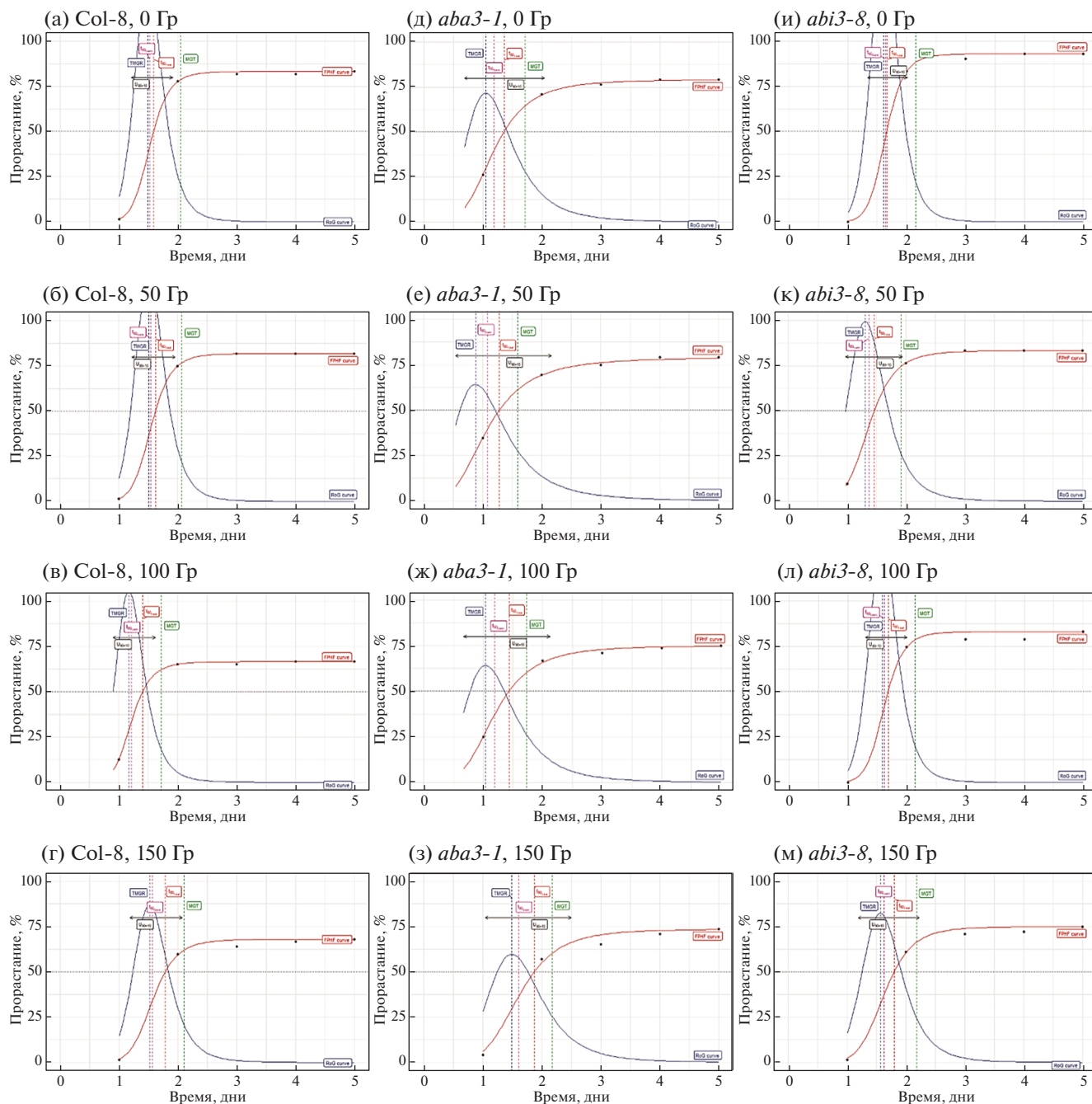


Рис. 2. Кумулятивные кривые прорастания необлученных и γ -облученных семян Col-8 (дикий тип), *aba3-1* (АБК-дефицитная линия), *abi3-8* (линия с нарушениями восприимчивости к АБК). Вертикальная ось – прорастание, %; горизонтальная ось – время, дни. Красная кривая основана на четырехпараметрической функции Хилла и описывает прорастание; синяя кривая – кривая скорости прорастания.

Fig. 2. Cumulative germination curves of non-irradiated and γ -irradiated seeds Col-8 (wild type), *aba3-1* (ABA-deficient line), *abi3-8* (line with impaired susceptibility to ABA). The vertical axis is germination, %; the horizontal axis is time, days. The red curve is based on the four-parameter Hill function and describes the germination; blue curve – germination rate curve.

временным интервалом между прорастанием 10 и 90% семян ($U_{90-10} = 0.68$ дней у необлученных семян).

Влияние ионизирующего излучения было более выражено для дикого типа Col-8 и АБК-дефицит-

ного генотипа (*aba3-1*). Самая низкая всхожесть наблюдалась у облученных в дозе 100 Гр семян Col-8 ($a = 66.67\%$). У семян *aba3-1*, облученных в дозе 50 Гр, отмечены минимальные значения крутизны кривой прорастания ($b = 3.17$), скоро-

сти прорастания 50% жизнеспособных семян ($c = 1.08$ дней⁻¹) и времени максимальной скорости прорастания ($TMGR = 0.88$). Самое высокое значение временного интервала между прорастанием 10 и 90% семян также обнаружено у облученных в дозе 50 Гр семян линии *aba3-1* ($U_{90-10} = 1.62$ дня).

С помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (рис. 3) была выявлена статистически значимая отрицательная корреляция между параметрами b и U_{90-10} ($\rho = -0.97$), $TMGR$ и U_{90-10} ($\rho = -0.66$) и между c и U_{90-10} ($\rho = -0.55$). Сильная статистически значимая положительная корреляция обнаружена между c и $TMGR$ ($\rho = 0.97$).

Пик прорастания семян линии с нехваткой эндогенной АБК *aba3-1* пришелся на 1-й и 2-й дни. Для семян дикого типа Col-8 и линии *abi3-8* наивысшие значения процента прорастания зафиксированы во 2-й день (рис. 4). В целом иерархическая кластеризация всхожести показала, что распределение процента прорастания семян по дням больше зависит от генотипа, чем от дозы воздействия. γ -Облучение в дозе 150 Гр, однако, позволило выделить исследуемые генотипы в отдельный подкластер, что наглядно представлено на рис. 4.

ОБСУЖДЕНИЕ

Биологическая интерпретация динамики прорастания семян на основе кумулятивных кривых прорастания, построенных при помощи 4-параметрической функции Хилла

В практике семенного контроля для определения посевных качеств семян, т.е. совокупности свойств семян, характеризующих степень их пригодности для посева, используются показатели лабораторной всхожести и энергии прорастания [19]. Всхожесть – способность семян образовывать нормально развитые проростки [20] – рассчитывается как доля проросших семян (в %) за определенный срок (в основном, 7–10 дней) от числа заложенных на проращивание. Энергию прорастания (в %) – способность семян быстро и дружно прорасти [20] – вычисляют на конкретный день прорастания, определенный для каждого вида растений и указанный в ГОСТ 12038-84 [19]. Упомянутые два параметра свидетельствуют о способности семян прорасти за определенный срок при благоприятных для данной культуры условиях субстрата, температуры и влажности, однако они недостаточны информативны для оценки влияния абиотических факторов на прорастание и определения потенциальной стрессоустойчивости растений.

Было предпринято несколько попыток упростить определение параметров прорастания семян путем объединения различных показателей в

Таблица 1. Параметры кривой прорастания контрольных и γ -облученных семян *A. thaliana* дикого типа (Col-8) и линий с нарушениями синтеза (*aba3-1*) и рецепции (*abi3-8*) абсцизовой кислоты

Table 1. Parameters of the germination curve of control and γ -irradiated seeds of *A. thaliana* wild type (Col-8) and lines with impaired synthesis (*aba3-1*) and reception (*abi3-8*) of abscisic acid

Генотип	Доза γ -облучения, Гр	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>TMGR</i>	U_{90-10}
Col-8	0	83.33	9.60	1.52	1.49	0.70
	50	81.94	9.30	1.55	1.51	0.74
	100	66.67	7.57	1.21	1.17	0.72
	150	75.00	7.53	1.52	1.47	0.90
<i>aba3-1</i>	0	79.17	4.04	1.19	1.05	1.36
	50	79.17	<i>3.17</i>	<i>1.08</i>	<i>0.88</i>	1.62
	100	75.00	3.82	1.20	1.04	1.45
	150	73.61	5.04	1.61	1.49	1.45
<i>abi3-8</i>	0	93.05	10.71	1.64	1.61	<i>0.68</i>
	50	83.33	6.40	1.37	1.31	0.96
	100	83.10	10.11	1.62	1.58	0.71
	150	75.00	7.02	1.63	1.56	1.04

Примечание. Параметры рассчитаны на основе медианных значений трех повторностей каждого экспериментального условия в трех независимых экспериментах. Минимальные значения параметра указаны курсивом, максимальные – полужирным шрифтом.

единый индекс или значение [18, 21]. Однако сведение нескольких параметров прорастания к одному показателю дает неполную картину динамики прорастания. Четыре параметра функции Хилла позволяют как прямую, так и косвенную биологическую интерпретацию динамики прорастания семян и влияния предварительной обработки семян на прорастание [18].

Форма и крутизна кривой прорастания контролируются параметром b . Чем больше b , тем круче подъем к асимптоте a и тем короче время между началом прорастания и максимальным прорастанием. El-Kassaby et al., анализируя кривые прорастания стратифицированных и нестратифицированных семян сосны скрученной широкохвойной (*P. contorta*) показали, что параметр b кривой прорастания стратифицированных семян не коррелировал с их всхожестью (a), что указывает на то, что крутизна кривой прорастания не связана с более высокой всхожестью [18]. В наших экспериментальных данных также наблюда-

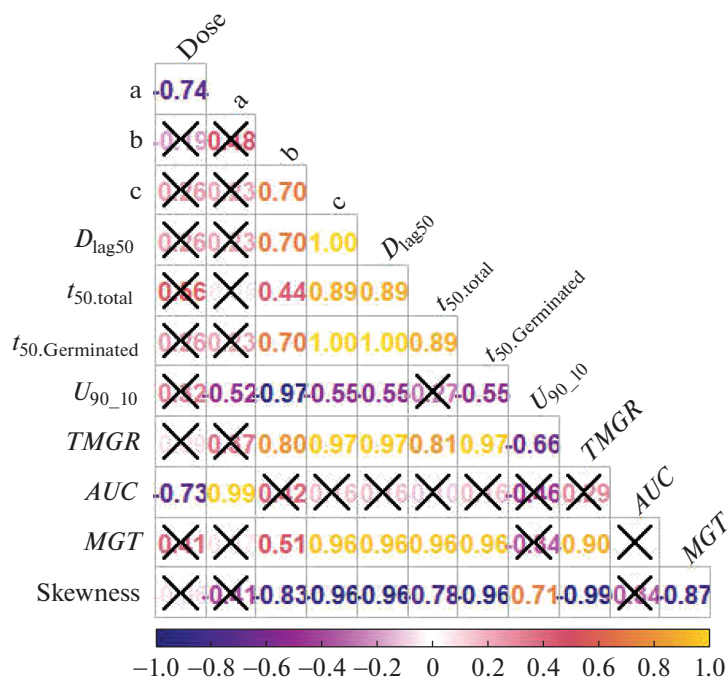


Рис. 3. Корреляционная матрица на основе расчетных показателей функции Хилла. Статистически незначимые значения перечеркнуты (X). Dose – доза (0, 50, 100, 150 Гр); *a* – асимптота; *b* – показатель скорости прорастания, определяющий форму и крутизну кривой прорастания; *c* – полумаксимальный уровень активации; D_{lag50} – продолжительность времени между началом прорастания и прорастанием 50% жизнеспособных семян; $t_{50.total}$ – прорастание 50% семян, уложенных на субстрат; $t_{50.Germinated}$ – прорастание 50% жизнеспособных семян; *TMGR* – время максимальной скорости прорастания; U_{90_10} – временной интервал между прорастанием 10 и 90% семян; *AUC* – площадь под эмпирической кривой; *MGT* – среднее прорастание; *Skewness* – коэффициент асимметрии.

Fig. 3. Correlation matrix based on the calculated parameters of the Hill function. Statistically insignificant values are crossed out (X). Dose – dose (0, 50, 100, 150 Gy); *a* – asymptote; *b* – shape and steepness of the germination curve; *c* – the half-maximal activation level; D_{lag50} – the duration between the time at germination onset and that at 50% germination; $t_{50.total}$ – germination of 50% of the seeds laid on the substrate; $t_{50.Germinated}$ – germination of 50% of viable seeds; *TMGR* is the time of maximum germination rate; U_{90_10} – time interval between germination of 10 and 90% of seeds; *AUC* is the area under the empirical curve; *MGT* – medium germination; *Skewness* – coefficient of skewness.

ется отсутствие значимой корреляции между параметрами *a* и *b*. Оценка коэффициента ранговой корреляции Спирмена, однако, выявила высокую отрицательную корреляцию между параметрами *b* и U_{90_10} ($\rho = -0.97$, $p \leq 0.05$). Таким образом, чем выше *b* и круче подъем кривой, тем меньше промежуток времени между прорастанием 10 и 90% семян и соответственно тем более однородно прорастание.

Полумаксимальный уровень активации *c* является эквивалентом параметра скорости прорастания [R50'], предложенного [22]. Продолжительность времени между началом прорастания и прорастанием 50% жизнеспособных семян *c* определено параметром D_{lag-50} , являющимся эффективным индикатором скорости прорастания, равномерности и энергии прорастания. Чем выше значение D_{lag-50} , тем быстрее и равномернее прорастание и круче кривая прорастания (т.е. выше значение *b*) [18]. D_{lag-50} и *b*, таким образом, яв-

ляются положительно коррелирующими параметрами (рис. 3).

TMGR – время максимальной скорости прорастания, т.е. временная точка, после которой мгновенная скорость прорастания (instantaneous rate of germination) снижается (максимальная точка на кривой скорости прорастания (instantaneous slope)) [14, 18]. Чем меньше времени необходимо для достижения максимальной скорости, тем выше энергия прорастания семян и короче время прорастания 50% жизнеспособных семян, т.е. выше скорость ($[R50'] = c$) [18] и соответственно меньше временной интервал, необходимый для прорастания 10–90% семян. Таким образом, были ожидаемы положительная корреляция между полумаксимальным уровнем активации *c* и *TMGR*, и отрицательная – между *TMGR* и U_{90_10} (рис. 3). Примечательно, что *TMGR* отличается от величины пика (Szabator's peak value, PV), которое представляет собой максимальное частное, полученное путем деления последовательных ку-

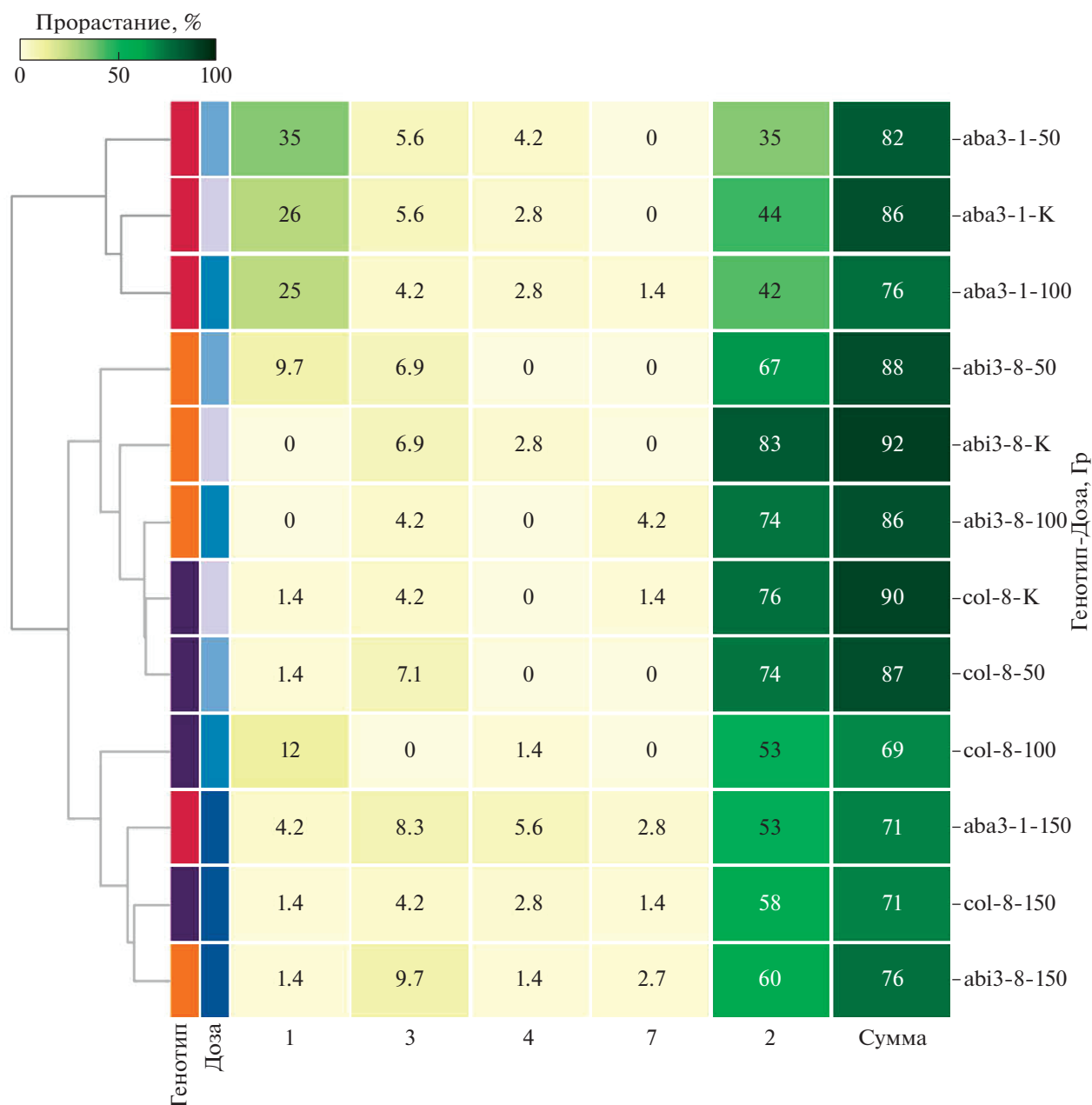


Рис. 4. Кластеризация всхожести, выраженной в процентах по дням с цветовым распределением по дозе (К – необлученный контроль, 50, 100, 150 Гр) и генотипу, необлученных и γ -облученных семян Col-8 (дикий тип), *aba3-1* (АБК-дефицитная линия), *abi3-8* (линия с нарушениями восприимчивости к АБК).

Fig. 4. Clustering of germination, expressed as a percentage by day, with color distribution by dose (0 – non-irradiated control, irradiated at doses 50, 100 or 150 Gy) and genotype of Col-8 (wild type), *aba3-1* (ABA-deficient line), *abi3-8* (line with impaired susceptibility to ABA).

мулятивных значений всхожести на соответствующее время инкубации [21]. Другими словами, PV – это максимальная всхожесть, деленная на общее время прорастания, тогда как $TMGR$ представляет собой максимальную скорость прорастания в определенный момент или небольшой интервал времени, который альтернативно можно

назвать мгновенной скоростью прорастания [18]. $TMGR$ определяет точку перегиба кривой прорастания, в то время как в определении уникальной формы и масштаба сигмовидной кривой, PV равноценно любой другой точке кривой. Таким образом, с биологической точки зрения, $TMGR$ является более значимым параметром [18].

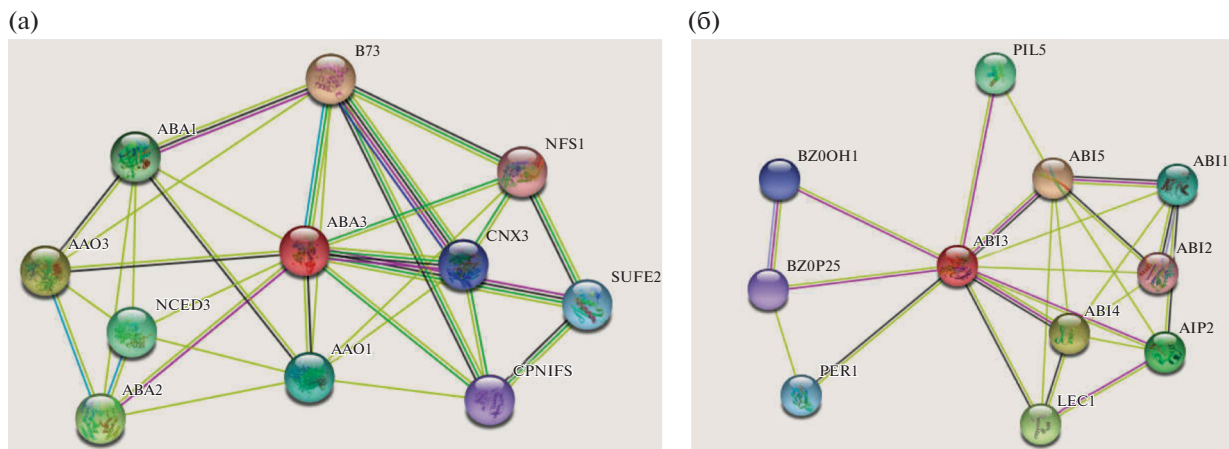


Рис. 5. Предсказанные функциональные партнеры белков (а) АВА3 и (б) АВІ3 по данным функционального обогащения в программной среде STRING [31].

Fig. 5. Predicted functional partners of proteins (a) ABA3 and (b) ABI3 according to functional enrichment in the STRING software environment [31].

Прорастание семян АБК-мутантных линий

Генотип *abi3-8* содержит “слабый” *abi3* аллель и характеризуется нормальным цветом семян, в отличие от семян “сильных” аллелей (таких как *abi3-3*, *abi3-4*, *abi3-5* и *abi3-6*), которые остаются зелеными на протяжении всего развития [23]. Мутации в гене *ABI3* нарушают покой семян [4] и, при благоприятных условиях окружающей среды (свет, температура, влажность), даже свежесобранные семена прорастают. Линия *abi3-8*, маловосприимчивая к природной форме АБК, содержит аминокислотную замену в домене В1 продукта гена *ABI3* с превращением лейцина в позиции 298 в фенилаланин [16]. Эта мутация, предположительно, нарушает взаимодействие белков АВІ3 и АВІ5 (рис. 5), что приводит к избирательной нечувствительности к S-(+)-АБК [16]. Известны три фактора транскрипции, ингибирующие прорастание семян (P1L5, АВІ3 и АВІ5, рис. 5, б), которые образуют функциональный модуль, как посредством регуляции транскрипции, так и межбелкового взаимодействия [4, 24]. АВІ3 и P1L5 совместно активируют экспрессию *SOMNUS* (ключевой обратный регулятор прорастания семян), напрямую связываясь с его промотором во впитавших воду семенах *A. thaliana*, тогда как P1L5 регулирует светозависимую экспрессию мРНК *SOMNUS* даже в отсутствие АВІ3 [24]. Паттерн экспрессии *SOMNUS* во время созревания семян аналогичен паттерну экспрессии *ABI5* и *Em1* – двух семя-специфичных генов, также регулируемых АВІ3 [24].

Ранее сообщалось, что у генотипа *abi3-8* с нарушениями S-(+)-АБК-опосредованного сигналинга не отмечено статистически значимых различий между облученными в дозах 100 и 150 Гр се-

менами и контролем, а γ -излучение в дозе 50 Гр вызвало быстрое прорастание в ранние часы [25], проявив стимулирующий эффект. В нашей работе лучшие показатели всхожести, скорости и временного интервала между прорастанием 10 и 90% семян отмечены у необлученных семян линии *abi3-8* (табл. 1).

Chan и соавт. показали, что на фоне абиотического стресса (кроме повышенной температуры и окислительного стресса) уровни транскриптов АВА3, NCED3 и ААО3 повышаются [26]. Эти три функциональных партнера (рис. 1, а) являются ключевыми ферментами в биосинтезе АБК.

Линия *aba3-1* содержит мутацию G-to-A в положении 3707 в гене *ABA3*, кодирующем Мосоульфуразу [27]. Учитывая роль молибден-содержащих ферментов во многих аспектах жизни растений, мутантные по *ABA3* линии демонстрируют плейотропные фенотипы [28]. Растения линии *aba3-1* характеризуются пониженными уровнями АБК в вегетативных тканях в нормальных и стрессовых условиях, которые, тем не менее, выше, чем у большинства других АБК-дефицитных мутантов (*aba1*, *aba2*) [17].

Из-за дефицита АБК семена *aba3-1* проросли быстрее семян других исследуемых генотипов (пик прорастания семян пришелся на 1-й и 2-й дни, рис. 4). Пониженный уровень АБК, вероятно, является также причиной чувствительности генотипа *aba3-1* к острому воздействию γ -излучения, которое уменьшает скорость и однородность прорастания. В ранее опубликованном анализе 22 индивидуальных параметров прорастания в идентичном эксперименте [25] показано, что γ -излучение в максимальной исследованной дозе 150 Гр отрицательно влияло на параметры, характеризу-

ющие всхожесть, время, энергию и синхронность прорастания АБК-дефицитного генотипа.

Процент прорастания или всхожесть (%), безусловно, является одним из основных параметров оценки партии семян, который, однако, не может характеризовать кинетику процесса прорастания. Даже совокупность процента прорастания и среднего времени недостаточна для описания активности прорастания партии семян в заданный период времени [29]. Период времени между прорастанием первых и последних семян, вариация скорости прорастания и время прорастания большинства семян — одни из параметров, влияющих на период внесения удобрения, сбор урожая и полевое созревание сельскохозяйственных культур, также эти параметры могут выступать показателями жизнеспособности и стрессоустойчивости семян [29].

Время, скорость, однородность и синхронность являются важными измеряемыми аспектами, информирующими о динамике процесса прорастания. Поскольку эти параметры являются характеристикой сельскохозяйственных культур, они важны для физиологов, семеноводов, экологов, агрономов [30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Кривые прорастания семян, построенные с помощью четырехпараметрической функции Хилла из пакета *Germinationmetrics* в среде программирования R, являются наглядным инструментом для анализа динамики процесса прорастания партии семян, который может быть использован для оценки кинетики прорастания семян после стимулирующего или угнетающего воздействия ионизирующего излучения и других абиотических факторов на различные аспекты прорастания семян, и, как следствие, для оценки стрессоустойчивости генотипа.

Проведенные исследования показали выраженное влияние γ -излучения в дозе 150 Гр на семена всех исследуемых генотипов, выделив при анализе иерархической кластеризации эту дозу в отдельный подкластер.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования проведены в рамках Государственного задания “Фундаментальные генетические и биотехнологические исследования для сельского хозяйства” по Программе деятельности ФГБУ “Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Verma V., Ravindran P., Kumar P. Plant hormone-mediated regulation of stress responses // BMC Plant Biol. 2016. V. 16. Art. 86. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0771-y>
2. Finkelstein R., Reeves W., Ariizumi T. et al. Molecular aspects of seed dormancy // Ann. Rev. Plant Biol. 2008. V. 59. № 1. P. 387–415. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092740>
3. Nambara E., Nambara E., McCourt P. et al. A regulatory role for the ABI3 gene in the establishment of embryo maturation in *Arabidopsis thaliana* // Development. 1995. V. 121. № 3. P. 629–636. <https://doi.org/10.1242/dev.121.3.629>
4. Lopez-Molina L., Mongrand S., McLachlin D.T. et al. ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination // Plant J. 2002. V. 32. № 3. P. 317–328. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2002.01430.x>
5. Watanabe S., Sato M., Sawada Y. et al. Arabidopsis molybdenum cofactor sulfurase ABA3 contributes to anthocyanin accumulation and oxidative stress tolerance in ABA-dependent and independent ways // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 16592. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34862-1>
6. Eckert M., Kaldenhoff R. Light-induced stomatal movement of selected *Arabidopsis thaliana* mutants // J. Experim. Bot. 2000. V. 51. № 49. P. 1435–1442. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.349.1435>
7. Xiong L., Ishitani M., Lee H. et al. The Arabidopsis LOS5/ABA3 Locus Encodes a Molybdenum Cofactor Sulfurase and Modulates Cold Stress- and Osmotic Stress-Responsive Gene Expression // Plant Cell. 2001. V. 13. № 9. P. 2063–2083. <https://doi.org/10.2307/3871428>
8. Llorente F., Oliveros J.C., Martinez-Zapater J.M. et al. A freezing-sensitive mutant of Arabidopsis, frs1, is a new aba3 allele // Planta. 2000. V. 211. № 5. P. 648–655. <https://doi.org/10.1007/s004250000340>
9. Barrero J.M., Piqueras P., Gonzalez-Guzmán M. et al. A mutational analysis of the ABA1 gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. № 418. P. 2071–2083. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri206>
10. Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K. ABA signaling in stress-response and seed development // Plant Cell Rep. 2013. V. 32. № 7. P. 959–970. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1418-1>
11. Duarte G.T., Volkova P., Geras'kin S. The response profile to chronic radiation exposure based on the transcriptome analysis of Scots pine from Chernobyl affected zone // Environ. Pollut. 2019. V. 250. P. 618–626. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.064>
12. Cutler S.R., Rodriguez P.L., Finkelstein R.R. et al. Abscisic acid: emergence of a core signaling network // Ann. Rev. Plant Biol. 2010. V. 61. № 1. P. 651–679. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112122>
13. Bitarishvili S.V., Volkova P.Y. & Geras'kin S.A. γ -Irradiation of Barley Seeds and Its Effect on the Phytohor-

- monal Status of Seedlings // Russ. J. Plant Physiol. 2018. V. 65. P. 446–454.
https://doi.org/10.1134/S1021443718020024
14. Aravind J., Vimala D.S., Radhamani J. et al. Germinationmetrics: Seed Germination Indices and Curve Fitting. R package version 0.1.3. 2019. Available at: <https://github.com/aravind-j/germinationmetrics><https://cran.r-project.org/package=germinationmetrics>. Accessed May 25, 2021.
 15. R Core Team, 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: <https://www.R-project.org/>. Accessed May 25, 2021.
 16. Nambara E., Suzuki M., Abrams S. et al. A screen for genes that function in abscisic acid signalling in *Arabidopsis thaliana* // Genetics. 2002. V. 161. № 3. P. 1247–1255.
https://doi.org/10.1093/genetics/161.3.1247
 17. Leon-Kloosterziel K.M., Gil M.A., Ruijs G.J. et al. Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci // Plant J. 1996. V. 10. № 4. P. 655–661.
https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10040655.x
 18. El-Kassaby Y.A., Moss I., Kolotelo D. et al. Seed germination: Mathematical representation and parameters extraction // Forest Sci. 2008. V. 54. P. 220–227.
https://doi.org/10.1093/forestscience/54.2.220
 19. ГОСТ 12038-84. Межгосударственный стандарт. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести (с Изменениями N 1, 2). [GOST 12038-84. Agricultural seeds. Methods for determination of germination (In Russ.)]
 20. ГОСТ 20290-74. Семена сельскохозяйственных культур. Определение посевных качеств семян. Термины и определения. [GOST 20290-74. Seeds of crops. Determination of seed sowing quality. Terms and definitions (In Russ.)]
 21. Czabator F.J. Germination value: An index combining speed and completeness of pine seed germination // Forest Sci. 1962. V. 8. P. 386–396.
 22. Thomson A., El-Kassaby Y. Interpretation of seed-germination parameters // New Forests. 1993. V. 7. P. 123–132.
https://doi.org/10.1007/BF00034195
 23. Nambara E., Naito S., McCourt P. A mutant of *Arabidopsis* which is defective in seed development and storage protein accumulation is a new *abi3* allele // Plant J. 1992. V. 2. № 4. P. 435–441.
https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1992.00435.x
 24. Park J., Lee N., Kim W. et al. ABI3 and PIL5 collaboratively activate the expression of SOMNUS by directly binding to its promoter in imbibed *Arabidopsis* seeds // Plant Cell. 2011. V. 23. № 4. P. 1404–1415.
https://doi.org/10.1105/tpc.110.080721
 25. Babina D., Podobed M., Bondarenko E. et al. Seed Gamma Irradiation of *Arabidopsis thaliana* ABA-Mutant Lines Alters Germination and Does Not Inhibit the Photosynthetic Efficiency of Juvenile Plants // Dose-Response. 2020. P. 1–13.
https://doi.org/10.1177/1559325820979249
 26. Chan Z. Expression profiling of ABA pathway transcripts indicates crosstalk between abiotic and biotic stress responses in *Arabidopsis* // Genomics. 2012. V. 100. P. 110–115.
https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2012.06.004
 27. Plessis A., Cournol R., Effroy D. et al. New ABA-hypersensitive *Arabidopsis* mutants are affected in loci mediating responses to water deficit and *Dickeya dadantii* infection // PLoS One. 2011. V. 6. № 5. P. e20243.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020243
 28. Schwartz S.H., Leon-Kloosterziel K.M., Koornneef M. et al. Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana* // Plant Physiol. 1997. V. 114. P. 161–166.
 29. Kader M. A comparison of seed germination calculation formulae and the associated interpretation of resulting data // J. & Proc. Royal Society of New South Wales. 2005. V. 138. P. 65–75.
 30. Talská R., Machalová J., Smýkal P., Hron K. A comparison of seed germination coefficients using functional regression // Appl Plant Sci. 2020. V. 8. № 8. P. e11366.
https://doi.org/10.1002/aps3.11366
 31. Szklarczyk D., Gable A.L., Lyon D. et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets // Nucl. Acids Res. 2019. V. 8. № 47 (D1). P. D607–D613.
https://doi.org/10.1093/nar/gky1131

Seed Germination Kinetics as an Informative Tool for Assessing the Impact of Ionizing Radiation (on the Example of *Arabidopsis Thaliana* ABA-mutant Lines)

E. V. Bondarenko^{a, #}, D. D. Babina^a, M. Yu. Podobed^a, A. S. Mitsenyk^a, and P. Yu. Volkova^a

^aAll-Russian Research Institute of Radiology and Agroecology, Obninsk, Russia

[#]E-mail: bev_1408@mail.ru

We have analyzed the kinetics of seed germination of the model plant *Arabidopsis thaliana* after γ -irradiation at doses of 50, 100 and 150 Gy. The following lines were selected as study objects: *abi3-8* with a mutation in the ABI3 gene and with reduced sensitivity to the natural form of abscisic acid and *aba3-1* genotype with a

mutation in the ABA3 gene and a reduced level of endogenous abscisic acid. Wild type Col-8 was used as a control. To study the effect of γ -radiation on various aspects of seed germination (germinability, germination time and rate, synchrony of germination, etc.), the germination kinetics was assessed using the Germinationmetrics package for the R programming environment. Control and irradiated seeds (radiation source – ^{60}Co) were grown on half-strength Murashige-Skoog medium under controlled conditions. Germination was assessed during the first six days after transfer to the phytotron by the rupture of the endosperm and the appearance of a root. In total, three independent experiments were carried out with three biological replications in each. A more pronounced effect of γ -radiation at a dose of 150 Gy on all studied genotypes was noted. Germination clustering showed that the distribution of the percentage of seed germination by day depends more on the genotype than on the dose of exposure. The best indicators of germination, speed and time interval between germination of 10% to 90% of seeds were noted for non-irradiated seeds of the *abi3-8* line. The results obtained and a comparative analysis with previously published data suggest that the assessment of germination kinetics using the Germinationmetrics package for R is a clear and quite informative tool for studying the effect of ionizing radiation and other abiotic factors on various aspects of seed germination.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, germination kinetics, γ -radiation, abscisic acid