

Н.Г. ШЕСТОПАЛОВА, Е.Ю. БАЕВА

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина,
пл. Свободы, 4, Харьков, 61077
E-mail: bayeva@mail.ru

РАДИОАДАПТИВНЫЙ ОТВЕТ КЛЕТОК ЛИСТОВОЙ МЕРИСТЕМЫ ИНБРЕДНЫХ И ГЕТЕРОЗИСНЫХ РАСТЕНИЙ *HELIANTHUS ANNUUS* L. В ОНТОГЕНЕЗЕ



Изучали возможность индукции, степень выраженности и характер проявления радиоадаптивного ответа (РАО) клеток листовой меристемы гибрида и родительских линий подсолнечника. Показано формирование индуцированной радиорезистентности у всех исследуемых форм. Степень выраженности феномена была различна и зависела от генетического статуса, уровня метаболизма и периода индивидуального развития объектов. Обязательным условием формирования РАО является повышение интенсивности размножения клеток, которое у линий вызывается воздействием на семена адаптирующих режимов, а у гибрида является в основном следствием гибридизации, развития гетерозиготы и проявлением гетерозиса.

© Н.Г. ШЕСТОПАЛОВА, Е.Ю. БАЕВА, 2007

Введение. Для настоящего времени характерны изменения условий окружающей среды, связанные с увеличением техногенной стрессорной нагрузки на биологические объекты. Радиационный фактор по интенсивности воздействия на природные и сельскохозяйственные объекты является одним из наиболее значимых. В связи с этим актуальны исследования, направленные на защиту клеток и организмов, повышение их радиорезистентности к высоким дозам радиации.

Одним из механизмов защиты является индукция радиоадаптивного ответа (РАО), который выражается в повышении устойчивости к ионизирующему излучению после предварительного действия на объекты относительно малых доз.

Эффект малых доз разнообразен и свидетельствует как об активизации физиолого-генетических процессов, так и о негативных изменениях в организме [1]. Стимуляционные эффекты оптимальных малых доз на уровне генома показаны в ряде исследований [2–5]. Под влиянием малых доз ускоряются темпы метаболизма и деление клеток [6], происходит депрессия генома, увеличивается проницаемость мембраны, снижается содержание гистонов, ускоряется реализация генетических программ развития [3, 5]. В результате перестройки геномов и уменьшения размеров репликонов стимулируется синтез ДНК [7].

Облучение в малых дозах изменяет активность мобильных генетических элементов, что может привести к изменению экспрессии генов и стимуляции [8], к возникновению вторичного биогенного излучения и возможного его влияния на адаптивные процессы [9]. Согласно современным данным под влиянием малых доз происходит реорганизация хроматина, активация экспрессии ранее молчавших генов, включая гены различных ферментов репарации ДНК, ослабляющих радиационное поражение [10].

Биологические объекты подвергаются воздействию различных по своей природе средовых факторов. Из уже известных компонентов среды заметным экологическим фактором стали электромагнитные поля радиочастотного диапазона. Излучения в миллиметровом диапазоне длин волн относятся к нетепловому излучению низкой и раздражителю слабой и средней интенсивности [11]. Изучению действия радиоволн уделялось значительное внимание.

Показано возможное влияние определенных режимов миллиметровых волн на регуляцию генной активности [12], синтеза ДНК [13], синхронизацию митозов [14] и радиопротекторную роль [15], стимуляцию раннего развития животных [16] и движение цитоплазмы в клетках растений [17].

Сказанное выше послужило аргументом для изучения оценки последствий комбинированного влияния адаптирующих режимов миллиметровых волн и гамма-радиации в связи с индукцией и проявлением РАО у растений. Такой подход представляется интересным в плане поиска новых, более эффективных путей активизации резервных защитных систем клеток и организмов.

В предыдущих работах было установлено, что после предоблучения семян двумя физическими факторами РАО выражен в большей мере, чем после влияния только малой дозы гамма-радиации [18].

Индукция РАО выявлена в опытах с культивируемыми клетками [19–21]. Изучению РАО растений уделялось меньше внимания. Повышение их радиостойчивости после облучения семян малыми дозами радиации было описано в 1971 г. [22] и выявлено в ряде исследований, выполненных в последнее время [1, 18, 23–27]. Насколько нам известно, РАО в связи с явлением гетерозиса до сих пор не изучался и, соответственно, нет данных о проявлении защитной радиобиологической реакции клеток в онтогенезе растений с разным генотипом. Феномен РАО связывают с повышением активности репарации ДНК [7, 28], стимуляцией пролиферации и репопуляции [26, 29], экспрессией генов, синтезом ферментов репарации ДНК дополнительно к конститутивным ферментам [1, 30–32].

Задачей настоящей работы было изучение возможности индукции, степени выраженности и характера проявления РАО клеток листовой меристемы гибрида и родительских линий подсолнечника, т.е. объектов, различающихся генетически детерминированной активностью метаболизма, а именно инбредной депрессией и гетерозисом.

Материалы и методы. Цитологические исследования проводили на клетках листовой меристемы вегетирующих растений гетерозис-

ного гибрида подсолнечника и его родительских форм. Семена получали в институте растениеводства им. В.Я. Юрьева УААН (Харьков). Материнская форма – линия Сх503А создана с помощью химического мутагенеза из коллекционного образца подсолнечника W-501. Высота растений 110–130 см, диаметр корзинки 18 см, содержание масла 53 %, урожайность 17,1 ц/га.

Отцовская форма, линия X711В, создана путем инцухта и индивидуального отбора из коллекционного образца югославской селекции (Нови Сад, Сербия). Растения ветвистые, низкорослые (до 80 см), диаметр корзинки 9,5 см.

Простой межлинейный гибрид масличного направления использования Харьковский 58 относится к средней группе спелости, высота растений 130–150 см, диаметр корзинки 21 см, содержание масла 52 %, урожайность 42 ц/га.

Зрелые воздушно-сухие семена облучали гамма-радиацией, источником которой был ^{60}Co , на установке «Исследователь» (мощность облучения – 3,21 Гр/мин) и радиоволнами миллиметрового диапазона (ППЭ=100 мкВт/см², $f=61,5$ ГГц, время воздействия – 20 мин) на генераторе Г4-142. Адаптирующие режимы и ударные дозы облучения были установлены ранее [14] и взяты из литературы [33].

Варианты опыта: 1 – контроль (необлученные семена); 2 – адаптирующее облучение гамма-радиацией в дозе 50 Гр (А); 3 – воздействие ударной дозы 200 Гр (У); 4 – облучение адаптирующей дозой перед действием ударной (А → У); 5 – облучение двумя адаптирующими факторами перед действием ударной (ммВ → А → У). Время между облучениями составляло 3–4 ч.

Для приготовления давленных постоянных окрашенных реактивов Шиффа по Фельгену [34] препаратов использовали меристему сформированных листовых пластинок одинакового собственного возраста в период раннего онтогенеза (4–5-й лист) и перед цветением. Листья фиксировали в уксусном спирте (3 : 1). На препаратах анализировали митотическую активность и частоту клеток с хромосомными абберациями. Митотическую активность меристемы определяли по митотическому индексу (МИ, отношение количества делящихся клеток к общему количеству проанализированных клеток, %). На каждый срок фиксации

просматривали 4–6 тыс. клеток и 150–200 анафаз. Достоверность различий оценивали с помощью критериев Стьюдента и Фишера. Разница признавалась достоверной при $p \leq 0,05$ [35].

Результаты исследований. Влияние адаптирующих режимов и ударной дозы облучения семян на митотическую активность клеток листовой меристемы родительских форм и гибрида в период раннего онтогенеза показано на рис. 1. Видно, что в контрольном варианте МИ гибрида превышала МИ материнской (P1) и отцовской (P2) форм в 1,8 и 1,6 раза соответственно ($p \geq 0,999$), что подтверждает полученные ранее данные [36, 37]. Стимуляция митотической активности под влиянием А-дозы больше выражена у P1, для которой характерен самый низкий показатель в норме. Так, если в контроле МИ составлял 3,8 %, то в опытном варианте 6,1 % ($p \geq 0,999$). Сходные результаты получены и для растений P2. Стимуляционный эффект адаптирующего режима в наименьшей мере был выражен у гибрида. Так, если в контроле МИ составлял 7,1 %, то под влиянием А-дозы показатель увеличивался до 7,8 % ($p \geq 0,95$).

Угнетение пролиферации клеток под влиянием ударной дозы больше проявлялось в меристеме гибрида, и МИ снижался до 5,5 % ($p \geq 0,999$). У исходных форм различия между контрольными и опытными (У) вариантами находились в пределах 1 %, что, по-видимому, обусловлено различной продолжительностью митотических циклов клеток инбредных и гетерозисных растений [36].

Основная задача работы состояла в изучении возможности формирования и сохранения РАО в онтогенезе растений, который выявляется при сравнении вариантов У, А → У, ммВ → А → У. Данные рис. 1 показывают наличие РАО, т.е. превышение показателей митотической активности клеток меристемы листьев после предоблучения семян линий и гибрида одним и двумя физическими факторами, но степень выраженности феномена различна. Максимальное проявление РАО наблюдали у материнской линии только в варианте ммВ → А → У, когда МИ достигал 5,0 % по сравнению 3,3 % в варианте У ($p \geq 0,99$), что является следствием значительной стимуляции митотической активности А-воздействием. РАО клеток P2 и F1 формировался

под влиянием обоих адаптирующих предоблучений, но у последнего феномен проявлялся лишь как хорошо выраженная тенденция.

На рис. 2 показано влияние облучения семян в указанных режимах на митотическую активность листовой меристемы в период позднего онтогенеза – перед цветением. Видно, что активность пролиферации клеток с возрастом растений снижалась до $1,6 \pm 0,3$, $1,8 \pm 0,4$, $3,0 \pm 0,5$ % у линий и гибрида соответственно. Стимуляционный эффект А-дозы сохранялся, наиболее существенное его снижение происходило у линий – в 2 раза и более, у гибрида – в 1,4 раза. В данный срок определения эффект стимуляции митотической активности в большей мере, чем в начале онтогенеза, был выражен у гибрида: МИ – 3,0 % в контроле и 5,2 % в варианте А ($p \geq 0,99$).

Проявление РАО инбредных растений в конце вегетационного периода сохранялось: у материнской линии превышение МИ вариантов А → У и ммВ → А → У над вариантом У составляло менее 1 %, а у отцовской – 1,5–2 %. Достоверное проявление РАО наблюдали в клетках меристемы гибрида: превышение значения У-дозы в 1,6 (А → У) и 1,8 (ммВ → А → У) раза. Защитный эффект комбинированного адаптирующего предоблучения у гибрида отмечали и по увеличенным на 40 и 70 % диаметрам корзинок. По-видимому, миллиметровые волны как радиопротектор усиливали положительный эффект А-дозы у гибрида в большей степени, чем у родительских форм.

Анализ частоты клеток с абберациями хромосом не выявил абберантных ана-телофаз в листовой меристеме растений, выросших из облученных семян.

Обсуждение полученных данных. Учет митотической активности как критерия РАО в начальные и конечные этапы онтогенеза показал, что инбредные и гибридные растения способны формировать индуцированную радиорезистентность, но степень выраженности феномена различается и зависит от генетического статуса, уровня метаболизма объектов и периода их индивидуального развития [38, 39].

Известно, что в жизни растений определяющую роль играет биоэнергетический метаболизм, его уровень различается у разных генотипов и изменяется в течение онтогенеза. Уровни

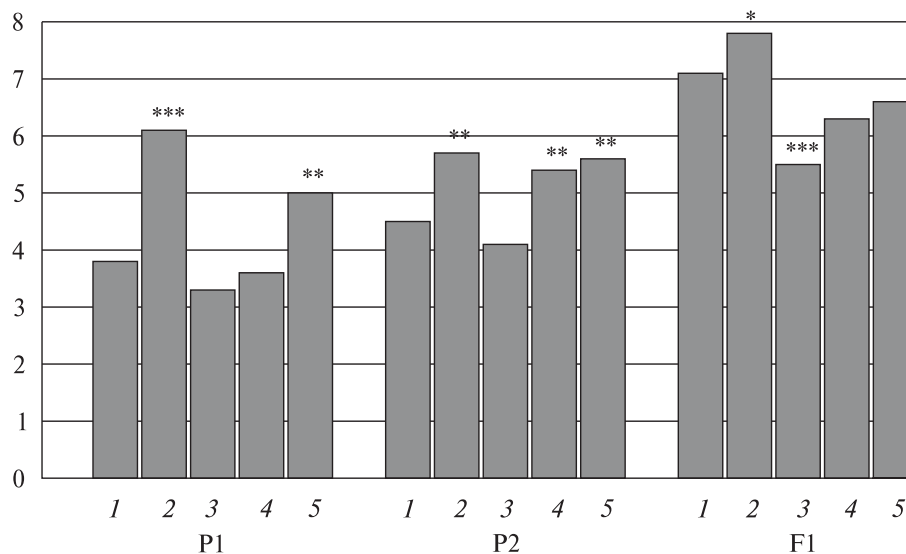


Рис. 1. Митотическая активность клеток листовой меристемы гетерозисного гибрида F1 и родительских форм (P1 – материнская линия, P2 – отцовская линия) подсолнечника в начале вегетации: по вертикали – МИ, %; 1 – контроль; 2 – 50 Гр; 3 – 200 Гр; 4 – 50–200 Гр; 5 – мМВ-50–200 Гр. * $p > 0,95$; ** $p > 0,99$; *** $p > 0,999$

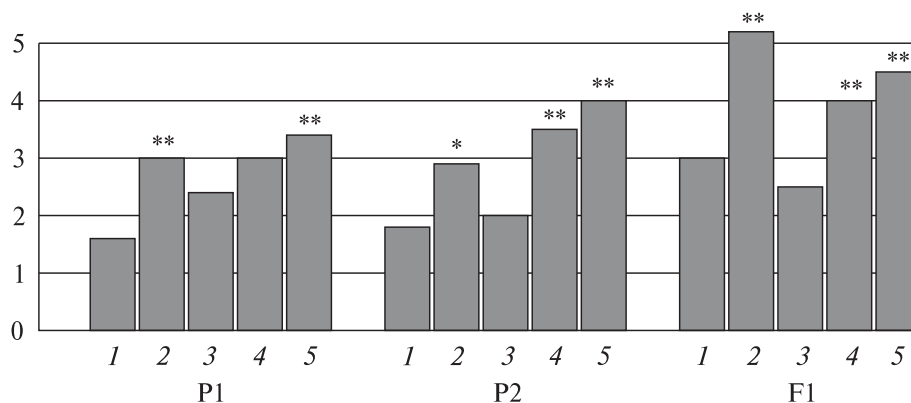


Рис. 2. Митотическая активность клеток листовой меристемы гетерозисного гибрида F1 и родительских форм (P1 – материнская линия, P2 – отцовская линия) подсолнечника в конце вегетации. Обозначения те же, что и на рис. 1

и темпы деления клеток находятся в тесной зависимости от структурно-функционального состояния и активности митохондрий и хлоропластов.

Функции АТФ множественные: это радиопротектор и источник энергии для обеспечения событий в митотическом цикле и митозе, процессов восстановления клеток, подвергнутых действию радиации [40–43].

Инбридинг оказывает депрессивное влияние на структуру хлоропластов, ингибирует процессы фотофосфорилирования и размножения

клеток [38]. По уровню энергетического потенциала, фертильности, выживаемости, масличности семян гетерозисные растения превосходят линии на поздних этапах онтогенеза [44]. У гибридов более активно и сбалансированно функционируют энергетические системы клеток [45, 46].

Четкое проявление РАО клеток листовой меристемы гибридных растений в ответственный период онтогенеза, когда происходит формирование генеративных органов и компонентов структуры урожая, отражает активацию

систем защиты растений, представляющих собой комплекс взаимосвязанных механизмов репарации ДНК, пролиферации, энергообеспечения клеток и других процессов [1].

Результаты исследований позволяют заключить, что обязательным условием формирования РАО как инбредных линий, так и гибридов является повышенная интенсивность размножения клеток.

Механизмы повышения митотической активности линий и гибридов различны — у первых стимуляция пролиферации вызывается воздействием на семена адаптирующих режимов гамма-радиации и радиоволн миллиметрового диапазона.

Повышенный естественный уровень митотической активности клеток меристемы гибридов является в основном следствием гибридизации, развития гетерозиготы и проявлением гетерозиса.

Меристема гетерозисных растений, обладающая высокой генетически детерминированной степенью пролиферации и биоэнергетического метаболизма, играет существенную роль в формировании РАО и в стимулированном тканевом репродукционном восстановлении растений.

SUMMARY. The possibility of radioadaptive response (RAR) induction, its intensity and display in sunflower leaf meristem cells of hybrid and parental lines was studied. It was shown that induced radioresistance has developed in all studied forms. The intensity of the phenomena depends on the genetic state, the metabolic level and the period of ontogenesis. The increase of cell proliferation intensity is a necessary condition for RAR induction. In parental plants this increase is generated by adaptive preirradiation and in the hybrid ones it is a hybridization consequence.

РЕЗЮМЕ. Досліджували можливість індукції, ступінь вираженості та характер прояву радіоактивної відповіді (РАВ) у клітин листової меристеми гібрида та батьківських ліній соняшника. Показано можливість формування індукованої радіорезистентності. Ступінь вираженості феномену був різний і залежав від генетичного статусу, рівня метаболізму та періоду індивідуального розвитку об'єктів. Підвищення інтенсивності розмноження клітин є обов'язковою умовою формування РАВ. У ліній стимуляція проліферації відбувається під впливом на насіння адаптувальних режимів, а підвищений рівень проліферації клітин листової меристеми гібрида є більшою мірою наслідком гібридизації, розвитку гетерозиготи та проявом гетерозису.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гродзинський Д.М. Радіобіологія. — К.: Либідь, 2000. — 448 с.
2. Бреславец Л.П. Растение и лучи Рентгена. — М.: Изд-во АН СССР, 1946. — 194 с.
3. Кузин А.М. Проблема малых доз и идеи гормезиса в радиобиологии // Радиобиология. — 1991. — 31, вып. 1. — С. 16–21.
4. Березина. Н.М. Предпосевное облучение семян сельскохозяйственных растений. — М.: Атомиздат, 1964. — 211 с.
5. Кузин А.М. Стимулирующее действие ионизирующего излучения на биологические процессы. — М.: Атомиздат, 1977. — 133 с.
6. Тимофеев-Рессовский Н.В. Биофизическая интерпретация явления радиостимуляции растений // Биофизика. — 1956. — 1, вып. 7. — С. 616–627.
7. Сызыныс Б.Н., Саенко А.С., Пелевина И.И. Репликация ДНК в облученных клетках — М.: ВИНТИ, 1990. — С. 114–213. (Итоги науки и техники. Сер. Радиобиология; т. 9).
8. Зайнуллин В.Г. Генетические эффекты хронического облучения в малых дозах ионизирующего излучения. — С.-Петербург: Наука, 1998. — 102 с.
9. Кузин А.М. Вторичные биогеенные излучения — лучи жизни. — Пушкино, 1997. — 37 с.
10. Эйдус Л.Х. Мембранный механизм инициации радиационных эффектов, специфичных для малых доз // III з'їзд з радіаційних досліджень: Тези доп. — Київ, 2003. — С. 79.
11. Нетепловые эффекты миллиметрового излучения / Под ред. Н.Д. Девяткова. — М.: ИРЭ АН СССР, 1981. — 338 с.
12. Алипов Л.Х., Беляев И.Я. Модификация радиационного поражения электромагнитным излучением крайне высокой частоты // I Всесоюз. радиобиол. съезд: Тез. докл. — М., 1989. — Т. 3. — С. 683.
13. Шестопалова Н.Г., Винокурова Л.В., Баева Т.И., Головина Л.Н. Изучение возможности защиты сельскохозяйственных растений от повреждающего действия ионизирующей радиации // Там же. — Т. 2. — С. 321.
14. А.с. № 1692408 СССР. Шестопалова Н.Г., Головина Л.Н., Корнеев В.К. и др. Способ предпосевной обработки семян для синхронизации клеточных делений в зародышевой меристеме зерновых культур, 1991.
15. Шестопалова Н.Г. Радиоадаптивный ответ клеток в поколениях растений ячменя // III съезд по радиационным исследованиям: Тез. докл. — Пушкино, 1997. — С. 39.
16. Галат В.В., Межевкина Л.М. и др. Действие миллиметровых волн на раннее развитие зародышей мышей и морских ежей // Биофизика. — 1999. — 44, вып. 1 — С. 157–140.
17. Тордія Н.В., Гродзинський Д.М. Дослідження швид-

- кості руху цитоплазми як цитофізіологічний метод в радіобіологічному експерименті // Цитология и генетика. — 2004. — **38**, № 1. — С. 63–71.
18. Долгова Л.М. Индукция і прояв радиоадаптивної відповіді у поколіннях рослин з різним генотипом: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К., 2004. — 22 с.
 19. Oliveri G., Bodycote J., Wolff S. Adaptive response of human lymphocytes to low concentration of radioactive thymidine // Science. — 1984. — **223**. — P. 594–597.
 20. Засухина Г.Д. Механізми зашити кліток чловека, связаннє с генетическим полиморфизмом // Генетика. — 2005. — **41**, № 4. — С. 520–535.
 21. Wang B., Ohyama H. et al. Adaptive response in embryogenesis : Retardation of postnatal development of prenatally irradiated mice // Radiat Res. — 1999. — **152**. — P. 119–123.
 22. Куликов Н.В., Альшиц Л.К., Позолотин А.А. и др. Изменение радиочувствительности растений в результате предварительного лучевого воздействия // Радиобиология. — 1971. — **11**, вып. 4. — С. 630–632.
 23. Гродзинский Д.М. Радиобиология растений. — К.: Наук. думка, 1989. — 384 с.
 24. Данильченко О.О., Гродзинский Д.М. Радиоадаптивна відповідь у *Arabidopsis thaliana* // Доп. НАН України. — 2001. — № 3. — С. 165–169.
 25. Серебряный А.М., Зоз Н.Н., Морозова И.С. К механизму антимутагенеза у растений // Генетика. — 2005. — **41**, № 5. — С. 676–679.
 26. Долгова Т.А., Шестопалова Н.Г. Индукция и проявление радиоадаптивного ответа на уровне меристемных клеток проростков и вегетирующих растений ячменя // Serctari radiationale in republica Moldova. Materiale conferintei internationale stiintificopractice. — Chisinau (Moldova), 2000. — P. 240–242.
 27. Kuglik P. Characterization of cytogenetic adaptive response induced by γ -radiation in *Vicia faba* root // Folia Biol. — 1992. — **38**. — P. 14–15.
 28. Газиев А.И., Безлепкин В.Г. Репарация ДНК в составе хроматина клеток млекопитающих // I Всесоюз. радиобиол. съезд : Тез. докл. — М., 1989. — Т. 1. — С. 48.
 29. Серебряный А.М., Зоз Н.Н. Стимулированная репопуляция как основа феноменов антимутагенеза и адаптивного ответа у растений // Генетика. — 2002. — **38**, № 3. — С. 340–346.
 30. Филиппович И.В. Феномен адаптивного ответа клеток в радиобиологии // Радиобиология. — 1991. — **31**, вып. 6. — С. 803–813.
 31. Samson L., Cairns J.A. A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli* // Nature. — 1977. — **267**. — P. 281–283.
 32. Ikushima T. Radioadaptive response: efficient repair of radiation-induced DNA damage in adapted cells // Mutat. Res. — 1996. — **356**, № 2. — P. 193–198.
 33. Преображенская Е.И. Радиоустойчивость семян растений. — М.: Атомиздат, 1971. — 232 с.
 34. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. — М.: Колос, 1980. — 304 с.
 35. Лакин Г.Ф. Биометрия : Учеб. пособие. — М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.
 36. Шестопалова Н.Г. Репродукция клеток при гетерозисе. — Харьков : Вища школа, 1981. — 84 с.
 37. Шестопалова Н.Г., Баева Е.Ю. Митотический потенциал корневой и листовой меристемы гетерозисных растений в период раннего и позднего онтогенеза // Вестн. Харьк. нац. аграр. ун-та. Сер. Биология. — 2004. — Вып. 1 (4). — С. 64–69.
 38. Naik N., Power B. Heterosis in sunflower // Maharashtra Agr. Univ. — 1998. — **13**, № 1. — P. 39–42.
 39. Макляк К.М. Гетерозис і генетичні властивості ліній соняшника : Автореф. дис. ... канд. с-г. наук. — Харків, 1998. — 16 с.
 40. Гудков И.Н., Гродзинский Д.М. Роль асинхронности клеточных делений и гетерогенности меристемы в радиоустойчивости растений // Механизмы радиоустойчивости растений. — К.: Наук. думка, 1978. — С. 116–138.
 41. Szeinfeld D. The multifunctional role of ATP in repair process and radioprotection // Med. Hypotesa. — 1990. — **32**, № 3. — P. 225–229.
 42. Козырева Е.В., Красногорская Н.В., Антонов О.Е. Роль митохондрий в гомеостазе клетки при лучевых поражениях // III съезд по радиационным исследованиям : Тез. докл. — Пушкино, 1997. — С. 195.
 43. Бецкий О.В. Механизмы биологических эффектов взаимодействия мм волн с живыми организмами // Миллиметровые волны нетепловой интенсивности в медицине : Материалы Междунар. симпоз. — М., 1991. — Ч. 3. — С. 521–528.
 44. Гончарова Ю.К. Наследование признака продолжительности работы листовой поверхности у риса // Актуальные проблемы генетики : Тез. докл. II конф. МОГиС им. Н.И. Вавилова. — М., 2003. — Т. 1. — С. 54.
 45. Титок В.В., Юренкова С.И., Титок М.В., Хотылева Л.В. Характеристика энергетического метаболизма в онтогенезе льна-долгунца при гетерозисе // Генетика. — 2005. — **41**, № 5. — С. 668–675.
 46. Облова Л.А., ЧуGUNкова Т.В. Ультраструктура корневой меристемы сахарной свеклы при инбридинге и гетерозисе // Гетерозис. Теория и практика. — Харьков, 1988. — С. 90.

Поступила 13.06.06