

Е.А. КРАВЕЦ

Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины, Киев
E-mail: elkrav@online.ua

КЛЕТОЧНЫЕ И ТКАНЕВЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ У *HORDEUM DISTICHUM* L. ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ОБЛУЧЕНИЯ



Острое и ультрафиолетовое облучение проростков ячменя индуцировало увеличение числа хромосомных aberrаций в вегетативной и генеративной меристемах, а также нарушений в микроспоро- и микрогаметогенезе. Обнаружено усиление цитомиксиса, увеличение числа патологий в мейозе и тетрадах, возрастание полиморфизма и нарушений в развитии пыльцевых зерен. Повреждения, индуцируемые разными типами облучения, в основном различаются в количественном аспекте. Динамика формирования хромосомных aberrаций в корневой меристеме обнаруживала обратную зависимость от дозы облучения. В диапазоне малых доз ультрафиолета индуцированные повреждения сохранялись в течение всего онтогенеза растений. С увеличением дозы облучения активизировались цитолитические процессы в предмейотической интерфазе, мейозе и при формировании тетрад, а также при завершении гаметогенеза. При максимальной экспозиции ультрафиолета и умеренных дозах гамма-облучения фертильность пыльцевых зерен восстанавливалась. Дегенерация микроспороцитов, микроспор и элементов пыльцевого зерна осуществлялась преимущественно по типу апоптоза. Наблюдаемый тип клеточной гибели, по-видимому, является автономным, индуцируемым самой клеточной популяцией. Полученные данные подтверждают идею о положительной роли клеточного отбора в механизмах восстановления и адаптации растений к мутагенным факторам.

© Е.А. КРАВЕЦ, 2009

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2009. № 1

Введение. Концепция отбора была впервые перенесена на организменный уровень А. Вейсманом, логически обосновавшим роль внутриорганизменной конкуренции в развитии [1]. Большое влияние на расширение представлений о клеточном отборе оказала теория самоорганизации, указавшая на существование прямых и обратных потоков информации (сверху вниз и от нижних уровней до верхних) и роль многоуровневых регуляций в поддержании гомеостаза и обеспечения управления развития [2–5]. За последние десятилетия гипотеза клеточной конкуренции (отбора) получила широкое развитие и применение в области иммунологии, неврологии, онкологии, а также в связи с изучением морфогенеза животных. Как пример острой конкуренции между клетками рассматривается опухолевый рост [6, 7]. Показана важная роль клеточной конкуренции в стабилизации процессов клеточной дифференциации [8]. Наконец, клеточная конкуренция представляет собой один из механизмов элиминации мутантных клеток и их клонов [9, 10]. Применительно к морфогенезу феномен клеточной конкуренции был впервые обнаружен у дрозофилы (*Drosophila melanogaster*) [6] и описан в контексте соматических мутаций и апоптозной элиминации [9, 10]. Клеточную конкуренцию наряду с морфогенетическим апоптозом стали рассматривать как тип клеточной гибели, имеющий решающее значение для обеспечения нормального развития и поддержания здорового состояния различных органов [8, 11]. Реализация клеточной конкуренции осуществляется через так называемый автономный апоптоз, который индуцируется снижением рецепции экстрацеллюлярного фактора *Dpp* (из *TGF-beta* суперсемейства, функционирующих у дрозофилы как морфогенетические, митотические и факторы выживания). В то же время морфогенетический апоптоз, являющийся неавтономным, запускается через межклеточную сигнализацию посредством того же фактора *Dpp* [12]. В настоящее время считают, что клеточная конкуренция является одним из механизмов гомеостаза, благодаря которому определяются численность клеток и размеры растущей ткани, в том числе и при повреждениях, стабилизируется дифференциация клеток, элиминируются мутации.

У растений механизмы апоптоза и других типов клеточной гибели изучены слабо. В це-

лом, изменения в морфологии клеток растений, претерпевающих программируемую клеточную гибель, сходны с изменениями при апоптозе у животных [13–17 и др.]. Полагают, что в механизмах апоптоза задействованы сигнальные пути, определяющие, в частности, окислительный статус (образование активных форм кислорода, которые могут служить триггерами апоптоза), гормональную регуляцию (например, через этилен и АБК, которые влияют на транскрипцию генов, связанных со старением и активацией апоптоза), метилирование ДНК (через деметилирование сайтов ДНК, кодирующих апоптогенные белки) и др. [16, 17]. Механизмы фитогормональной регуляции апоптоза практически не изучены. Остаются неясными роль эпигенетических механизмов в апоптозной элиминации и клеточном обновлении, механизмы отбора и элиминации «нежелательных» клеток, а также значение отбора для адаптации.

Между тем репродуктивные органы представляют собой широкую арену, на которой разворачиваются процессы клеточного отбора, сопровождающие избирательную дифференциацию клеток, элиминацию избыточных и невостребованных половых клеток и органов. По мнению некоторых исследователей именно клеточный отбор играет важную роль в процессах тканевой дифференцировки и адаптации растительного организма [18]. В основе клеточной конкуренции могут лежать такие факторы, как гетерогенность и избыточность клеточной популяции, а также дефицит ресурсов [2, 18, 20, 21]. Гетерогенность клеточных популяций (клеточный мозаицизм) может определяться эпигенетическим характером межклеточных различий (степенью гетерохроматизации ядер клеток, продолжительностью клеточного цикла, в том числе клеток разной пloidности, увеличением или уменьшением количества ДНК через полиплоидизацию, анеуплоидизацию, амплификацию или редукцию определенных повторов, хромосом и т.д.). Клеточная конкуренция может иметь место в восстановительных процессах при радиационном воздействии. Показано, что устранение дефектных клеток может происходить как при формировании соматических тканей (путем диплонтного клеточного отбора), так и генеративных органов

и гаметофитов (через диплонтный и гаплонтный отборы) [22, 23]. Гаплонтный клеточный отбор имеет особое значение, поскольку способствует освобождению половых клеток от мутационного груза через ликвидацию клеток, несущих рецессивные летальные мутации. Целью нашего исследования было изучение клеточных и тканевых механизмов восстановительных процессов в меристемах ячменя в ходе онтогенеза после воздействия облучения, а также выяснение роли клеточной конкуренции в восстановлении фертильности растений.

Материал и методы. Объект исследования – ячмень двухрядный (*Hordeum distichum* L., $2n = 14$), сорт Скарлет французской селекции, урожая 2005 г., высокой чистоты, низкobelковый. Использовали три серии экспериментов. В первой, предварительной серии, определяли дозовую зависимость и эффективные дозы относительно генотоксического воздействия гамма-облучения. Для этого сухие зерновки облучали в дозах 10, 20, 30 и 40 Гр, затем проращивали в чашках Петри при температуре 25°C и на третьи сутки фиксировали при длине корней в 2,5 см, что соответствовало второй волне митотических делений. Проростки характеризовали по ростовым и цитогенетическим параметрам: определяли число aberrаций, клеток с микроядрами, полиплоидных клеток (в метафазах) в корневой меристеме. После определения генотоксичности используемых доз для дальнейших исследований были отобраны две дозы острого облучения – 20 и 40 Гр. Во второй серии экспериментов облученные в 20 и 40 Гр зерновки делили на две части: первую часть проращивали в чашках Петри и на вторые, третьи и четвертые сутки после замачивания фиксировали для анализа первых митозов в корневой меристеме проростков. Вторую часть облученных зерновок высаживали в грунт для изучения микроспорогенеза и развития мужского гаметофита. В третьей серии экспериментов трехсуточные проростки на влажной фильтровальной бумаге облучали ультрафиолетом лампой *Philips TL 20 Вт*, используя светофильтр, отсекающий коротковолновый участок спектра ультрафиолета. Дозы облучения составляли 0,5; 2,2 и 4,3 кДж/м² при интенсивности 0,5 Вт/м². После облучения одну часть проростков, спустя 1 сут, фиксирова-

ли с интервалом в 24 ч, другую часть высаживали в грунт для оценки воздействия УФ-облучения на последующее развитие репродуктивных органов. Для цитогенетического анализа корневой меристемы проростков эксперименты были повторены дважды. В дальнейшем проводили темпоральную фиксацию колосьев разной степени зрелости от стадии дифференциации спорогенной ткани и микроспороцитов до созревания пыльцы. Для фиксации использовали смесь Навашина. Планировалось, что качественный и количественный анализ нарушений и их динамики на последовательных этапах онтогенеза даст возможность проследить за клеточным отбором в ходе развития вегетативной, генеративной меристем и пыльцевого зерна, а также оценить его роль в восстановительных процессах.

Давленные препараты из корневых апексов изготавливали с использованием щелочной и ферментативной мацерации по общепринятой цитологической методике [24] и ее модификации. Для окраски препаратов корневой меристемы применяли ацетоорсеин (смесь 9 частей красителя и 1 части 1 N HCl), содержимого пыльников – ацетокармин. Подсчет числа хромосомных aberrаций проводили ана-телофазным методом. Выборка составляла 8–10 корней на вариант. Общий показатель aberrаций и других нарушений на вариант выводили путем объединения слагаемых выборок [25]. Для оценки состояния репродуктивной системы изучали формирование спорогенной ткани, микроспорогенез и микрогаметогенез, а также анализ зрелых пыльцевых зерен. Степень деструктивного цитомиксиса определяли по числу разрушенных или аномальных микроспороцитов в поле зрения из содержимого пыльника. Объем выборок при анализе мейоза и тетрад микроспор составлял около 20 пыльников на стадию. Для каждого варианта было исследовано в среднем 50–70 пыльников с микроспороцитами и по 20 пыльников для анализа развития пыльцевых зерен. Статистическую обработку данных проводили согласно рекомендациям Лакина [25], а также использовали функции программы Microsoft Excel.

Результаты исследования и их обсуждение. Эффекты последствия УФ-Б- и острого облучения на корневую меристему проростков. Эф-

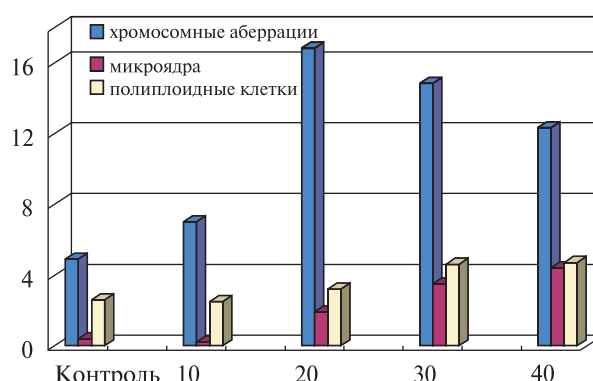


Рис. 1. Зависимость цитогенетических параметров корневой меристемы от дозы гамма-облучения: по вертикали – показатели цитогенетических нарушений, %; по горизонтали – доза облучения, Гр

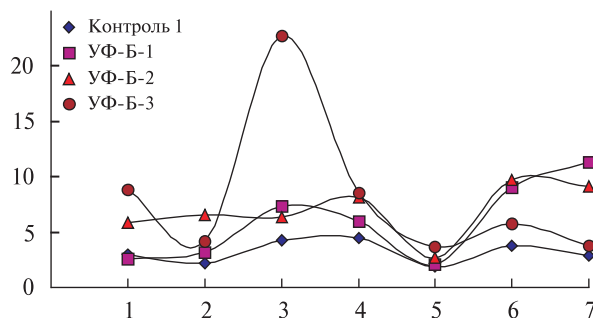


Рис. 2. Динамика цитогенетических нарушений в ходе онтогенеза растений ячменя после УФ-Б-облучения: по вертикали – показатели нарушений, %; по горизонтали – этапы онтогенеза: 1 – 1-й митоз в меристеме проростков, 2 – 2-й митоз в меристеме, 3 – спорогенная ткань (цитомиксис), 4 – тетрады, 5 – микроспоры, 6 – двухклеточные ПЗ, 7 – трехклеточные ПЗ

фективными в отношении генотоксического действия оказались все использованные дозы острого и УФ-Б-облучения (рис. 1, таблица). Повышение дозы облучения приводило к возрастанию числа хромосомных aberrаций, микроядер и полиплоидных клеток, однако в диапазоне высоких доз число хромосомных aberrаций, как правило, снижалось (рис. 1). Состояние меристемы внутри одного и того же варианта варьировало. Уровень спонтанного мутагенеза коррелировал с числом полиплоидных клеток, сохранивших способность к пролиферации. В первом митозе число хромосомных aberrаций было пропорционально дозе облучения, во втором митозе дозовая зависи-

мость изменялась (рис. 1 и 2, таблица). При максимальной экспозиции ультрафиолета и дозе острого облучения в 40 Гр число aberrаций снижалось параллельно с возрастанием числа дегенерирующих клеток. Элиминация клеток проходила по типу апоптоза, морфологически проявляющегося через сжатие протопласта, пикноз и фрагментацию хроматина, изоляцию клетки с последующей ее везикуляцией. И так, с увеличением дозы острого и УФ-Б-облучения число aberrаций в первом митозе повышалось, а во втором снижалось, т.е. динамика образования хромосомных aberrаций при разных дозах облучения обнаруживала обратную зависимость от дозы. Это может достигаться за счет клеточного отбора, что подтверждается возрастанием числа дегенерирующих клеток.

Влияние ультрафиолетового и острого облучения на репродуктивную систему. Ультрафиолетовое облучение проростков ячменя во многих случаях индуцирует ускорение дифференциации половых элементов колоса (пыльничков и пестика цветка). Воздействие острого облучения в этом отношении было неоднозначным. Повреждения, индуцируемые разными типами облучения, различались преимущественно в количественном отношении. Спектр нарушений был более широким при воздействии высоких доз острого облучения. Однако в целом спектр цитологических нарушений характеризовался неспецифичностью.

Микроспорогенез проходит по сукцессивному типу, свойственному злакам, с образованием тетрад изобилатерального строения. При ост-

ром облучении в мета-анафазе первого и второго делений мейоза в микроспороцитах обнаруживаются нарушения, указывающие на формирование хромосомных aberrаций: отсутствие конъюгации и преждевременное расхождение гомологов, образование мостов и выпадение отдельных хромосом или фрагментов из веретена деления (рис. 4). Основным типом патологии в микроспорогенезе в опытных вариантах является цитомиксис (рис. 5–7). По интенсивности цитомиксис можно подразделить на слабый (локальный), интенсивный и деструктивный [26]. Мы полагаем, что слабый цитомиксис является физиологической нормой для многих генотипов растений (например, пшеницы и ячменя). При воздействии стрессовых факторов локальный цитомиксис трансформируется в интенсивный или деструктивный цитомиксис (ДЦ). Последний служит формой устранения нежизнеспособной (или ненужной), перегруженной нарушениями клеточной системы.

В случае локального цитомиксиса в ранней профазе 1-го деления мейоза часть микроспороцитов соединяются в группы по 3–4 и более клеток межклеточными каналами, через которые иногда проходят и отдельные петли хроматина. Такие контакты не влекут за собой деструктивных явлений и не имеют негативных последствий для дальнейшего хода мейоза (рис. 5). Напротив, клетки, не охваченные сетью контактов, как правило, «выпадают из программы» развития, задерживаются в поздней профазе-метафазе первого деления мейоза и элиминиру-

Соотношение показателей цитогенетических нарушений, проц., в корневой меристеме проростков и генеративной сфере растений ячменя в процессе онтогенеза (P = 0,05)

Доза облучения	Корневая меристема		Спорогенная ткань и стадии развития пыльцы				
	Клетки с aberrациями в 1-м митозе	Клетки с aberrациями во 2-м митозе	Степень цитомиксиса	Тетрады с аномалиями	Стерильность микроспор	Стерильность двухклеточных ПЗ	Стерильность трехклеточных ПЗ
Контроль к УФ-Б	3,05 ± 0,65	2,20 ± 0,29	4,3	4,5 ± 0,3	1,9 ± 0,1	3,8 ± 0,9	2,9 ± 0,7
УФ-Б-1 – 0,5 кДж/м ²	2,61 ± 0,73	5,75 ± 0,96	7,3	6,0 ± 0,6	2,1 ± 0,3	9,0 ± 1,7	11,3 ± 1,4
УФ-Б-2 – 2,2 кДж/м ²	5,92 ± 0,96	6,24 ± 0,80	6,3	8,1 ± 1,0	2,7 ± 0,4	9,7 ± 1,5	9,1 ± 1,8
УФ-Б-3 – 4,3 кДж/м ²	8,82 ± 1,10	4,52 ± 0,82	22,7	8,5 ± 0,7	3,7 ± 0,4	5,8 ± 1,5	3,8 ± 0,8
Контроль к гамма-облучению	2,70 ± 0,43	3,71 ± 0,64	5,5	4,7 ± 0,5	3,1 ± 0,2	4,2 ± 0,8	4,4 ± 0,8
Гамма-1 – 20 Гр	8,05 ± 0,91	15,74 ± 1,23	22,6	9,6 ± 0,8	2,6 ± 0,2	9,1 ± 1,1	6,0 ± 0,9
Гамма-2 – 40 Гр	17,8 ± 2,72	12,3 ± 1,70	13,9	17,0 ± 1,6	3,0 ± 0,4	6,2 ± 1,2	19,3 ± 1,6

ются. Локальный цитомиксис часто сопровождается дифференциацию микроспороцитов и раннюю профазу мейоза у контрольных растений ячменя. Деструктивным цитомиксисом в контрольных вариантах охватываются редуцированные цветки терминальных (краевых) колосков колоса и недоразвитые колосья подгонов.

В случае интенсивного цитомиксиса, который начинается еще с формирования спорогенной ткани и предмейотической интерфазы и продолжается до окончания мейоза, в микроспороцитах повышается «липкость» или «текучесть» хроматина, появляется «блуждающий», или транзитный, хроматин в виде тяжей, перетекающих фрагментов ядра и хромосом, микроядер (рис. 6 и 7). В ядрах некоторых микроспороцитов в прометафазе происходит отделение одной или нескольких хромосом от основной метафазной пластинки. После дезинтеграции ядерной мембраны такие хромосомы могут перемещаться по клеткам, приводя к появлению сверхкомплексного хроматина и, соответственно, недокомплексации ядер клеток. В результате интенсивного цитомиксиса большая или меньшая часть популяции микроспороцитов элиминируется. Интенсивный цитомиксис индуцируется облучением, гибридизацией и другими неблагоприятными факторами. При остром облучении и максимальной экспозиции ультрафиолета у ячменя интенсивный цитомиксис может охватывать от 14 до 25 % микроспороцитов (рис. 1 и 2, таблица). При этом большинство микроспороцитов завершает мейоз с образованием тетрад микроспор (рис. 8).

Деструктивный цитомиксис представляет собой патологический процесс, который связан с дегенерацией значительной части популяции микроспороцитов, иногда почти всего содержимого пыльника (рис. 7). ДЦ усложняет картину мейоза и может приводить к серьезным генетическим последствиям — возрастанию стерильности и резкому снижению количества пыльцевых зерен в пыльнике (рис. 9). Он встречается в варианте с высокими дозами острого, реже УФ-Б-облучения, охватывая дистальную часть пыльников. Чаще ДЦ наблюдается в редуцированных цветках терминальных частей колоса и недоразвитых колосьях. В общем случае ДЦ является способом устранения нежизнеспособной (или ненужной) клеточной

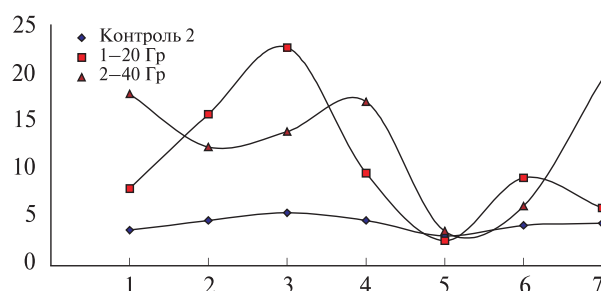


Рис. 3. Динамика цитогенетических нарушений в ходе онтогенеза растений ячменя при воздействии острого облучения: по вертикали — показатели нарушений, %; по горизонтали — этапы онтогенеза: 1 — 1-й митоз в корневой меристеме проростков, 2 — 2-й митоз в меристеме, 3 — спорогенная ткань, 4 — тетрады, 5 — микроспоры, 6 — двухклеточные ПЗ, 7 — трехклеточные ПЗ

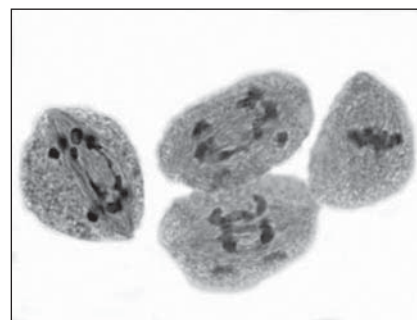


Рис. 4. Аномалии в анафазе первого мейоза микроспороцитов, указывающие на формирование хромосомных aberrаций. Вариант с облучением в 40 Гр

системы. Переход от локального до деструктивного цитомиксиса может происходить в пределах одного и того же пыльника.

Оболочка микроспороцитов, содержащая каллозу, не является барьером для миграции хроматина и органелл, поскольку пронизана межклеточными каналами [27–30], по которым, кроме хроматина, переходят цитоплазматические органеллы, сигнальные молекулы, трофические факторы [31–34]. Полагают, что благодаря межклеточным контактам достигается не только синхронизация мейоза, но и однородность клеточной популяции микроспороцитов, выравнивание качественного состояния пыльцевых зерен, необходимое для быстрого и успешного опыления [27–30].

Интенсивный цитомиксис продолжается, как уже отмечалось, и на последующих стадиях

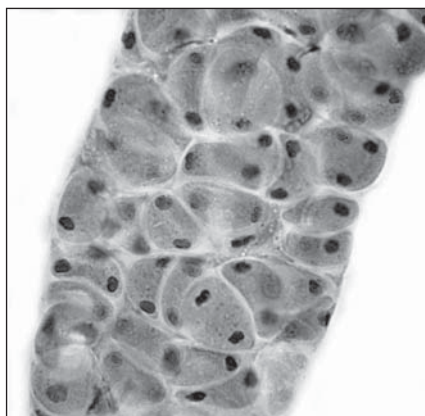


Рис. 5. Телофаза 2 деления мейоза микроспороцитов. Контроль

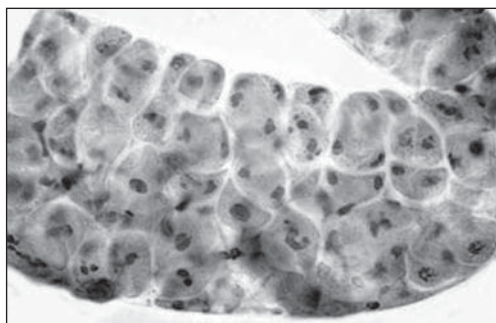


Рис. 6. Телофаза 2 деления мейоза микроспороцитов. Интенсивный цитомиксис. Вариант УФ-3 (4,3 кДж/м²)

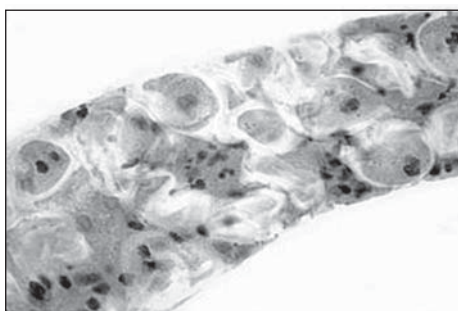


Рис. 7. Деструктивный цитомиксис в дистальной части пыльника. Вариант УФ-3 (4,3 кДж/м²)

мейоза, вплоть до его завершения. При этом большая часть микроспороцитов проходит через редукционное деление с образованием правильных (рис. 8) или же в зависимости от дозы и природы облучения генетически несбалансированных тетрад, триад или диад (рис. 9 и таблица). В профазу мейоза вступают и мик-

роспороциты, содержащие 1–2 микроядра, которые в дальнейшем смещаются в периферическую цитоплазму и могут, вероятно, выталкиваться из клетки. В противном случае при завершении мейоза формируются микроспоры с микроядром. Считается, что сверхкомплексный транзитный хроматин не входит в состав ядра клеток, через которые мигрирует, однако он может влиять на спорогенез. У ячменя сверхкомплексный хроматин обычно остается в составе синцитиев или элиминируется в межклеточном пространстве. «Недокомплектованность» микроспороцитов вероятно является причиной образования триад, карликовых микроспор и диад микроспор. Последние могут формировать гигантские микроспоры и пыльцевые зерна. Деструктивный цитомиксис приводит к элиминации значительной части микроспороцитов в пыльцевой камере и формированию полупустых или стерильных пыльников. Следует, однако, отметить, что у клейстогамных растений, к которым относится и изучаемый сорт ячменя, для успешного опыления единственной семяпочки достаточно совсем небольшое количество жизнеспособной пыльцы.

Развитие пыльцевого зерна. В норме формирование мужского гаметофита у ячменя, как и у большинства культурных злаков, включает этапы роста и поляризации микроспоры, два последовательных митотических деления с образованием трехклеточного пыльцевого зерна, содержащего пару стреловидных спермиев и вегетативную клетку, которая заполнена амилопластами. Облучение в большинстве вариантов приводит к возрастанию частоты отклонений в структуре пыльцевого зерна и повышению стерильности двух- или трехклеточной пыльцы (рис. 2 и 3, таблица). Отклонения в развитии обычно связаны с гетерогенностью в размерах, характером вакуолизации цитоплазмы и содержанием крахмала в амилопластах (рис. 10 и 11), реже – с недостаточностью синтеза цитоплазмы в микроспоре и вегетативной клетке. Наибольший вклад в возрастание полиморфизма пыльцевых зерен вносит, по-видимому, интенсивный цитомиксис.

Снижение интенсивности синтеза цитоплазмы в микроспоре и вегетативной клетке может приводить к появлению «малоплазменных» двухъядерных или двухклеточных и трехклеточных

точных пыльцевых зерен. Причина этих аномалий связана с нарушением процессов вакуолизации и полярности в микроспоре или двухклеточном пыльцевом зерне. В «малоплазменных» трехклеточных пыльцевых зернах спермии не завершают цикла своей дифференциации и остаются разрыхленными и округлыми. Некоторые зрелые пыльцевые зерна нормальной морфологии содержат дегенерирующие агглютинированные спермии. При максимальной экспозиции ультрафиолета и гамма-облучении в 20 Гр стерильность зрелых пыльцевых зерен снижалась, что указывает на интенсификацию отбора. Стерильность микроспор и пыльцевого зерна, вероятно, являются следствием нарушений в мейозе и несбалансированности тетрад микроспор, что проявляется и после распада тетрад, а также в процессе формирования мужского гаметофита (рис. 2 и 3, таблица).

Итак, реакция на облучение со стороны мужского гаметофита проявлялась в прозяпании полиморфизма, расширении спектра и числа патологий развития пыльцевых зерен. Подобные нарушения встречаются и у других генотипов растений, в частности разных сортов ржи, особенно у тетраплоидных сортов при спонтанном и индуцированном мутагенезе [23]. Дегенерация микроспор, генеративной клетки, спермиев и ядра вегетативной клетки пыльцевого зерна осуществляются по типу апоптоза.

В количественном отношении между показателями стерильности зрелой пыльцы и дозой ультрафиолета прослеживается обратная зависимость. В диапазоне малых доз ультрафиолета индуцированные повреждения не устраняются клеточным отбором и сохраняются в течение всего онтогенеза. В результате число нарушений на протяжении онтогенеза возрастает. С повышением дозы облучения усиливался цитомиксис, увеличивалось число нарушений в ходе мейоза и образование тетрад. Однако фертильность зрелых пыльцевых зерен при этом повышалась, что указывает на положительную зависимость между степенью цитомиксиса и фертильностью пыльцы в определенных диапазонах облучения (таблица, рис. 2 и 3). В диапазоне больших доз гамма-облучения (40 Гр) эффективность клеточного отбора оказывалась недостаточной и стерильность пыльцы повы-

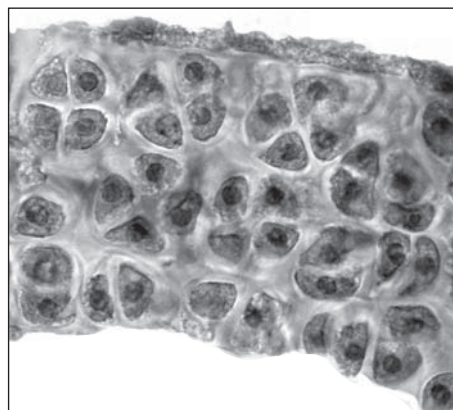


Рис. 8. Образование тетрад в варианте с облучением в 20 Гр

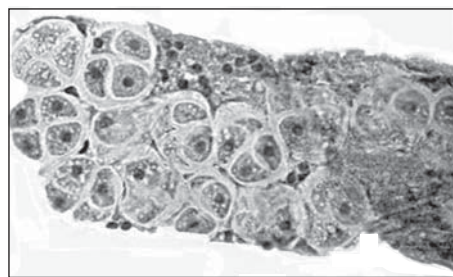


Рис. 9. Образование несбалансированных тетрад в варианте с облучением в 40 Гр

шалась (таблица, рис. 3, 9 и 11). Таким образом, в реакции растений на облучение прослеживается пороговый эффект (в случае низких доз ультрафиолета) и эффект «насыщения» при высоких значениях гамма-облучения. Ультрафиолетовое и гамма-облучение, помимо прямого повреждения ДНК и других макромолекул, запускает сигнальные пути, связанные с развитием окислительного стресса. Мутагенный эффект низких доз ультрафиолета скорее всего связан именно с этим характером воздействия. Отмечено также фотоиндуцирующее влияние ультрафиолета-Б — через ускорение дифференциации репродуктивных органов [35]. В целом, с увеличением дозы облучения наблюдается активизация апоптоза и снижение числа нарушений на стадиях микроспоры и гаметогенеза, что может достигаться за счет клеточного отбора. Интенсификация клеточной конкуренции особенно заметна при смене программы развития — завершении диплофазы и начале спорогенеза, а также в

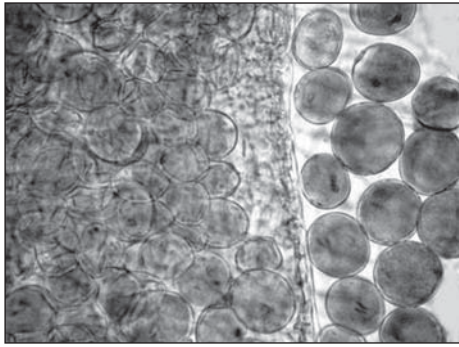


Рис. 10. Гетерогенность пыльцевых зерен в варианте УФ-В-2 (2,2 кДж/м²)

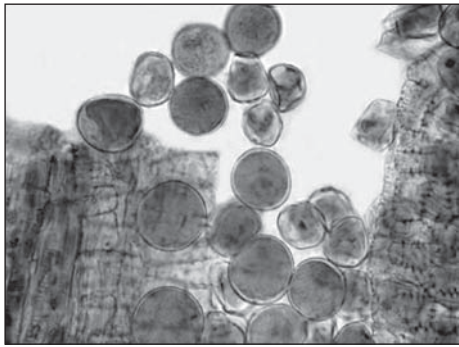


Рис. 11. Полиморфизм пыльцевых зерен в варианте с облучением в 40 Гр

конце гаплофазы – при формировании гамет.

Специального внимания, с нашей точки зрения, заслуживает цитомиксис как форма клеточного отбора в спорогенной ткани и микроспороцитах пыльника. Цитомиксис имеет особую значимость, поскольку обеспечивает подготовку, селекцию, а возможно, и репарационные процессы в инициалах мужских гамет. В ходе локального цитомиксиса осуществляется пространственная непрерывность и единство микроспороцитов как ценоцитной системы пыльника [26–31].

Цитомиксис представляет собой довольно распространенное явление, однако его происхождение, значение, генетический контроль остаются неясными и даже спорными. Если в прошлом цитомиксис считался аномальным явлением [36], артефактом фиксации или результатом травматического вмешательства [37], то в настоящее время его рассматривают как нерегулярное цитологическое явление, сопровождающее микроспорогенез у покрытосемен-

ных, а также сперматогенез у низших растений и животных [26–34, 38–41]. Стрессовые факторы – облучение, гибридизация, химические агенты (например колхицин) и гербициды, как правило, усиливают деструктивный характер цитомиксиса [38, 42–45]. Известно, что интенсивность и частота цитомиксиса коррелируют с генетической несбалансированностью клеток гибридов и мутациями, связанными со строением колоса [26, 38, 42]. Действительно, цитомиксис часто наблюдается у гаплоидов, анеуплоидов, триплоидов, полиплоидов, индуцированных линий, гибридов, мутантов, апомиктов [38, 42, 46–49]. При этом цитомиксис может свидетельствовать об отдаленности и несовместимости геномов гибридов [48], нарушении гомеостаза [42] или наличии мутации, обуславливающей мужскую стерильность [50]. Обычные условия среды, ее сезонные колебания слабо влияют на цитомиксис, природа которого, очевидно, находится под генетическим контролем [43, 46]. Интенсивный или деструктивный цитомиксис усложняет картину мейоза и может приводить к серьезным генетическим последствиям: генетическому дисбалансу микроспороцитов с последующим образованием полиад, синцитиев, aberrантных микроспор и стерильных пыльцевых зерен. Однако это свойственно в основном генетически нестабильным или стерильным формам. У лилии, например, было показано, что в период наибольшей «транзиторной» активности хроматина – зиготене – пахитене профазы мейоза, при полностью открытых межклеточных каналах ядерная мембрана оставалась интактной, а микроспороциты как до, так и после «ядерных миграций» (nuclear transfer) сохраняли нормальное диплоидное число хромосом [30].

На основании анализа экспериментального материала [19, 20, 23 и др.] и данных литературы мы полагаем, что цитомиксис отражает механизмы клеточной конкуренции, в ходе которой клеточная популяция ограничивает число функционирующих микроспороцитов, регулируя избыточность, и избавляется от мутационного груза. В пользу этого предположения косвенно указывает, например, такой факт: у видов с крупными пыльниками и многочисленными микроспороцитами цитомиксис выражен сильнее, чем у видов с мелкими пыльниками

и малочисленными популяциями микроспороцитов [51]. Локальный цитомиксис может иметь особую значимость, обеспечивая подготовку, селекцию, возможно и репарационные процессы в инициалах мужских гамет. Цитомиксис можно рассматривать и как форму горизонтального переноса информации. По нашим данным, у гомозиготных самоопылителей, таких как ячмень и пшеница, цитомиксис выражен сильнее, чем у перекрестников, например ржи. В связи с этим представляют интерес еще две точки зрения. Согласно одной из них [52] цитомиксис, обеспечивая синхронность развития, способствует одновременному созреванию пыльцы у видов с узким «окном» опыления и оплодотворения, к которым, прежде всего, и относятся самоопылители. Согласно другой точке зрения [49] цитомиксис может увеличивать генетическое разнообразие, что необходимо самоопылителям и клейстогамным видам.

Клеточный отбор в популяции микроспороцитов осуществляется через так называемый автономный апоптоз, который в отличие от морфогенетического апоптоза не запускается «сверху» (т.е. не программируется), а инициируется самой клеточной популяцией микроспороцитов. По морфологической картине проявлений между этими двумя типами клеточной гибели, как и в целом при апоптозе у разных организмов, нет принципиальных различий. Так, наблюдаются те же агрегация и фрагментация хроматина ядра, конденсация и сжатие протопласта, изоляция клетки (потеря контактов).

Что касается понятий программированности и автономности апоптоза, то у растений в силу особенностей организации растительного организма, обуславливающей относительно высокую степень свободы составляющих его компонентов, «суицидная» программа может реализовываться не только в интересах организма, но ткани или органа. Вместе с тем клеточную конкуренцию в онтогенезе растений можно толковать более широко, нежели апоптозная элиминация, как это и встречается у Лежачивюса [2] и Кунаха [18]. В таком случае в качестве клеточной конкуренции можно рассматривать примеры вытеснения одних, менее адаптированных к конк-

ретным условиям ткани или органа, (эпи)генотипов клеток другими, более адекватными.

Заключение. Гамма- и УФ-Б-облучение проростков ячменя индуцировало увеличение числа хромосомных aberrаций в вегетативной меристеме и патологии в ходе микроспорогенеза и развития пыльцевого зерна. Динамика образования хромосомных aberrаций в корневой меристеме отрицательно коррелирует с дозой облучения, что может достигаться за счет клеточного отбора — это подтверждается возрастанием процента дегенерирующих клеток. Реакция на облучение со стороны мужской генеративной сферы заключалась в усилении цитомиксиса в ходе микроспорогенеза, возрастании полиморфизма тетрад микроспор и патологии развития пыльцевых зерен. Повреждения, индуцируемые разными типами облучения, в основном отличаются в количественном аспекте. В диапазоне малых доз ультрафиолета индуцированные повреждения сохраняются в течение всего онтогенеза растений. С увеличением дозы облучения наблюдается активизация апоптоза и изменение динамики формирования нарушений. Основным типом патологии и, одновременно, формой клеточной конкуренции при формировании репродуктивных органов ячменя является цитомиксис как способ ограничения численности популяции микроспороцитов и элиминации мутантных клеток. Степень цитомиксиса, как это ни кажется парадоксальным, в конечном счете регулирует не только количество, но качество необходимой для опыления пыльцы. Дегенерация микроспор, генеративной клетки, спермиев и ядра вегетативной клетки также происходит по типу апоптоза. Наблюдаемый тип клеточной гибели, по-видимому, является автономным, инициирующимся самой клеточной популяцией генеративной ткани. Клеточную конкуренцию в ходе репродуктивного развития можно рассматривать как фактор, который ограничивает мутагенез, регулирует состояние и численность клеточной популяции микроспороцитов, способствует восстановлению фертильности и гомеостаза.

Выводы. Гамма- и УФ-Б-облучение проростков индуцировало увеличение числа хромосомных aberrаций в вегетативной и генеративной меристемах, а также патологии в мик-

роспорогенезе и микрогаметогенезе. Динамика формирования хромосомных aberrаций в корневой меристеме обнаруживала обратную зависимость от дозы облучения. Повреждения, индуцируемые разными типами облучения, различаются в основном в количественном аспекте. Обнаружено усиление цитомиксиса, увеличение патологий в микроспорогенезе, возрастание полиморфизма пыльцы спектра и количества патологий развития пыльцевых зерен. В диапазоне малых доз ультрафиолета индуцированные повреждения сохранялись в течение всего онтогенеза растений. С увеличением дозы облучения активизировались цитолитические процессы. При максимальной экспозиции ультрафиолета и умеренных дозах гамма-облучения уровень стерильности зрелых пыльцевых зерен снижался. Степень цитомиксиса положительно коррелировала с фертильностью пыльцы. Цитомиксис как тип клеточного отбора имеет особую значимость, поскольку обеспечивает подготовку, селекцию, возможно и репарационные процессы в инициалах мужских гамет. Предполагается, что благодаря цитомиксису регулируется и ограничивается число функционирующих микроспороцитов и осуществляется элиминация клеток с «генетическим грузом».

Семенной материал был любезно предоставлен д-ром биол. наук Л.А. Лисневич (Институт физиологии растений и генетики НАН Украины).

Kravets E.A.

CELLULAR AND TISSUE MECHANISMS OF RESTORATION PROCESSES IN *HORDEUM DISTICHUM* L. UNDER IRRADIATION.

The ionizing and UV-B irradiation of barley seedlings results in an increase of a number of chromosome aberrations in vegetative and generative meristems as well as pathology in the microsporo- and microgametogenesis. Dynamics of chromosome aberration formatting in root meristem has the invert correlation to the dose of irradiation. Induced damages in the range of not significant doses of irradiation were discovered during the whole ontogenesis of the plants. The increase of irradiation dose has activated the cytolysis processes during pre-meiotic interphase and early meiosis that caused the decrease of pollen grain pathology count. Fertility of pollen grains restored under the maximum exposition of ultraviolet and moderate doses of gamma irradiation. This may be result of cell competi-

tion. Cell competition under irradiation limits mutagenesis, regulates the condition and quantity of cell population, causes reparation of fertility and maintains homeostasis.

О.А. Кравець

КЛІТИННІ ТА ТКАНИННІ МЕХАНІЗМИ ВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У *HORDEUM DISTICHUM* L. ПІД ДІЄЮ ОПРОМІНЕННЯ

Гостре та ультрафіолетове опромінення проростків ячменя індукувало зростання кількості хромосомних aberrаций у вегетативній і генеративній меристемах та патології в микроспоро- і микрогаметогенезі. Динаміка утворення хромосомних aberrаций в корневій меристемі виявляла зворотну залежність від дози опромінення. В діапазоні малих доз ультрафіолету індуковані пошкодження зберігались впродовж всього онтогенезу рослин. При збільшенні дози опромінення активізувалися цитолітичні процеси в предмейотичній інтерфазі та ранньому мейозі, що призводило до зменшення кількості патологій у гаметогенезі. При максимальній експозиції ультрафіолету та помірних дозах гамма-опромінення фертильність пилкових зерен відновлювалась. Отримані дані підтверджують ідею про позитивну роль клітинного добору в механізмах відновлення та адаптації рослин до мутагенних чинників. Клітинна конкуренція за умов опромінення обмежує мутагенез, регулює стан і чисельність клітинних популяцій та сприяє відновленню фертильності рослин.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Назаров В.И. Эволюция не по Дарвину. Смена эволюционной модели. Изд. 2-е. — М.: Изд. ЛКИ, 2007. — 520 с.
2. Лежачий Э. Элементы общей теории адаптации. — Вильнюс : Моклас, 1986. — 273 с.
3. Николис Г., Пригожин И. Самоорганизация в неравновесных системах. — М.: Мир, 1979. — 242 с.
4. Пригожин И., Стенгерс И. От бытия к становлению. — М.: Мир, 1987. — 261 с.
5. Белоусов Л.В. Основы общей эмбриологии. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 2005. — 367 с.
6. Díaz B., Moreno E. The competitive nature of cells // Exp. Cell Res. — 2005. — **306**. — P. 317–322.
7. Moreno E., Basler K. dMyc transforms cells into super-competitors // Cell. — 2004. — **117**. — P. 117–129.
8. Moreno E. Discovery of «Programmed cell competition» among stem cells. Cellular Competition Group. Overview. Molecular Oncology Programme (update 31.03.2006) // <http://www.cnio.es/ing/grupos/plantillas>.
9. Li Wei, Baker N.E. Engulfment is required for cell competition // Cell. — 2007. — **129**. — P. 1215–1225.
10. Tyler D.M., Li Wei, Zhuo Ning, Pellock B., Baker N.E. Genes affecting cell competition in Drosophila // Genetics. — 2007. — **175**. — P. 643–657.

11. Gallant P. Muc, cell competition and compensatory proliferation // *Cancer Res.* – 2005. – **65**. – P. 6485–6487.
12. Yamada Takashi A., O'Connor M. B. Mechanisms for removal of developmentally abnormal cells: Cell competition and morphogenetic apoptosis // *J. Biochem.* – 2004. – **136**, № 1. – P. 13–17.
13. Wu Hen-ming, Cheung Alice Y. Programmed cell death in plant reproduction // *Plant Mol. Biol.* – 2000. – **44**. – P. 267–281.
14. Fath A., Bethke P.C., Jones R.L., Bellign M.V., Yoav N. Signalling in the cereal aleurone: hormones, reactive oxygen and cell death // *New Phytol.* – 2001. – № 1. – P. 99–107.
15. Greenberg J.T., Yao Nan. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions // *Cell. Microbiol.* – 2004. – **6**, № 3. – P. 201–211.
16. Ванюшин Б.Ф. Апоптоз у растений // *Усп. биол. химии.* – 2001. – **41**. – С. 3–38.
17. Vanyushin B.F., Bakeeva L.E., Zamyatnina V.A., Aleksandrushkina N.I. Apoptosis in plants: specific features of plant apoptotic cells and effect of various factors and agents // *Int. Rev. Cytol.* – 2004. – **233**. – P. 135–179.
18. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – Київ: Логос, 2005. – 723 с.
19. Гродзинский Д.М., Кравец Е.А., Хведынич О.А., Коломиец О.Д., Банникова В.П. Формирование репродуктивной системы растений, подвергшихся воздействию хронического облучения // *Цитология и генетика.* – 1996. – **30**, № 3. – С. 36–45.
20. Кравец Е.А., Коломиец О.Д., Фалинская Т.П., Гродзинский Д.М. Цитомиксис и программируемая клеточная гибель в микроспорогенезе у мягкой пшеницы // *Факторы экспериментальной эволюции организмов.* – Київ: Логос, 2006. – **3**. – С. 384–387.
21. Gaul H. Über die Chmarenbildung in Gerstenpflanzen nach Rongenbestrahlung von Samen // *Flora.* – 1959. – **147**, № 2. – P. 207–241.
22. Grodzinsky D.M., Kravetz E.A., Kolomietz O.D. Haplontic cell selection as reactive and adaptive action of plants at conditions of chronic irradiation // *Proc. Int. sem. Environment protection.* – Uzhorod, 1997. – **2**. – P. 7–10.
23. Кравец Е.А. Роль гаплонтного отбора в механизмах стабилизации ди- и тетраплоидных генотипов ржи под воздействием гамма-облучения // *Факторы экспериментальной эволюции организмов.* – Київ: Логос. – 2007. – **1**. – С. 95–98.
24. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1974. – 288 с.
25. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
26. Кравченко Л.Н. Особенности мейоза у пшеницы и ее гибридов. – Кишинев: Штиинца, 1977. – 159 с.
27. Heslop-Harrison J. Cytoplasmic connections between angiosperms meiocytes // *Ann. Bot.* – 1966. – **30**. – P. 221–230.
28. Heslop-Harrison J. Cytoplasmic continuity during spore formation in flowering plants // *Endeavour.* – 1966. – **25**. – P. 65–72.
29. Welan E.D.P. Discontinuities in the callose wall, intermeocyte connections and cytomixis in angiosperm meiocytes // *Can. J. Bot.* – 1974. – **52**. – P. 1219–1224.
30. Quang-Qin Guo, Guo-Chang Zheng. Hypotheses for the function of intercellular bridges in male germ cell development and its cellular mechanisms // *J. Theor. Biol.* – 2004. – **229**. – P. 139–146.
31. Zheng G.C., Yang Q.R., Zheng Y.R. The relationship between cytomixis and chromosome mutation and karyotype evolution in lily // *Caryologia.* – 1987. – **40**. – P. 243–259.
32. Souza A.M., Pagliarini M.S. Cytomixis in *Brassica napus* var. *Oleifera* (Brassicaceae) // *Cytologia.* – 1997. – **62**. – P. 25–29.
33. Risueno M.C., Gimenez-Martin G., Lopez-Saez J.F., R-Garsia M.I. Connexions between meiocytes in plants // *Cytologia.* – 1969. – **34**. – P. 262–272.
34. Hecht N.B. Intercellular and intercellular transport of many germ cell mRNAs mediated by the DNA-binding protein, testis-brain-RNA-binding protein (TB-RBP) // *Mol. Reprod. Dev.* – 2000. – **56**. – P. 252–253.
35. Кравец Е.А., Гродзинский Д.М., Гуца Н.И. Влияние УФ-Б облучения на репродуктивную функцию растений *Hordeum vulgare* L. // *Цитология и генетика.* – 2008. – **42**, № 5. – С. 9–15.
36. Morisset P. Cytomixis in the pollen mother cells of *Ononis* (Leguminosae) // *Can. J. Genet. Cytol.* – 1978. – **20**. – P. 383–388.
37. Takats S.T. Chromatin extrusion and DNA transfer during microsporogenesis // *Chromosoma.* – 1959. – **10**. – P. 430–453.
38. Поддубная-Арнольди В.А. Цитоэмбриология покрытосеменных растений. – М.: Наука, 1976. – 507 с.
39. Rezaglia K.S., Garbary D.J. Motile male gametes of land plants: diversity, development and evolution // *Crit. Rev. Plant. Sci.* – 2001. – **20**. – P. 107–213.
40. Carlson J.G., Handel M.A. Intracellular bridges and factors determining their patterns in the grasshopper testis // *J. Morphol.* – 1988. – **196**. – P. 173–185.
41. Ventela S., Toppari J., Parvinen M. Intercellular organelle traffic through cytoplasmic bridges in early spermatids of the rat: mechanisms of haploid gene product sharing // *Mol. Biol. Cell.* – 2003. – **14**. – P. 2768–2780.
42. Орлова И.Н. Цитомиксис // *Эмбриология цветковых растений.* Т.1. – СПб, 1994. – С. 115–117.
43. Bellucci M., Roscini C., Mariani A. Cytomixis in the pollen mother cells of *Medicago sativa* L. // *J. Heredity.* – 2003. – **94** (6). – P. 512–516.

44. Dwivedi N.K., Sikdar A.K., Jolly M.S., Susheelamma B.N., Suryanarayana N. Induction of tetraploidy in colchicine-induced mutant of mulberry. 1. Morphological and cytological studies in cultivar Kanva-2 // *Indian J. Genet.* – 1988. – **48**. – P. 305–311.
45. Bobak M., Herich R. Cytomixis as a manifestation of pathological changes after the application of trifluraline // *Nucleus.* – 1978. – **21**. – P. 22–26.
46. Bedi Y.S. Cytomixis in woody species // *Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.)*. – 1990. – **100**. – P. 233–238.
47. Mantu D.E., Sharma A.K. Cytomixis in pollen cells of an apomictic ornamental *Ervatamia divaricata* (L.) Alston // *Cytologia.* – 1982. – **48**. – P. 201–207.
48. Шкутина Ф.М., Хвостова В.В. Цитологический анализ пшенично-ржаных амфидиплоидов // *Экспериментальная полиплоидия в селекции растений.* – М., 1966. – С. 261.
49. Шнайдер Т.М. Особенности мейоза у отдаленных гибридов пшеницы, полученных с участием мутанта *ph* // *Цитология и генетика.* – 1988. – **22**, № 3. – С. 18–22.
50. Nirmala C., Kaul M.H. Male sterility in pea. 6. Gene action duplicity // *Cytologia.* – **59**. – P. 195–201.
51. Owen H.A., Makaroff C.A. Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Ecotype *Wassilewskija* (Brassicaceae) // *Protoplasma.* – 1995. – **185**. – P. 7–21.
52. Herrero M. Male and female synchrony and regulation of mating in flowering plants // *Philos. Trans. R. Soc. London B.* – 2003. – **358**. – P. 1019–1024.

Поступила 17.03.08