

РАДІОБІОЛОГІЯ

УДК 575.222.7:633.16

ВЛИЯНИЕ ХРАНЕНИЯ ОБЛУЧЕННЫХ СЕМЯН НА ПРОЯВЛЕНИЕ РАДИОАДАПТИВНОГО ОТВЕТА КЛЕТОК КОРНЕВОЙ МЕРИСТЕМЫ ПРОРОСТКОВ *HELIANTHUS ANNUUS L.* С РАЗНЫМ ГЕНОТИПОМ

© 2007 г. Е. Ю. Баева

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина
(Харьков, Украина)

Изучали возможность длительного сохранения радиоадаптивного ответа (РАО) при хранении и происходящем при этом ускоренном старении инбредных и гетерозисных семян *Helianthus annuus L.* Снижение способности клеток к делению в меристеме проростков гибрида происходило в меньшей степени по сравнению с линиями. После трехлетнего хранения облученных семян стимулирующий эффект адаптирующей дозы сохранялся, проявлялся по критерию митотической активности клеток меристемы инбредных линий и не был обнаружен у гибрида. РАО сохранялся и четко проявлялся по критерию стимуляции митотической активности предоблучением в адаптирующих режимах. РАО по частоте клеток с абберациями хромосом проявлялся у отцовской линии и как слабо выраженная тенденция у материнской линии и гибрида.

Ключевые слова: *Helianthus annuus L., радиоадаптивный ответ, старение, инбредные линии, гетерозисный гибрид, митотическая активность, абберации хромосом*

В связи с комплексным загрязнением окружающей среды генотоксическими агентами проблема повышения устойчивости растений составляет одну из задач современной биологии. Одним из механизмов защиты клеток и организмов является индуцированный радиоадаптивный ответ (РАО), который проявляется в уменьшении последствий воздействия высоких, ударных, доз радиации после предварительного облучения семян малыми, адаптирующими, дозами.

Предполагают, что в реализации механизма РАО принимает участие индуцибельная система репарации повреждений ДНК, активируется экспрессия генов и синтез *de novo* ферментов [4, 21]. Также под воздействием адаптирующего предоблучения происходит стимуляция

пролиферации клеток, лежащая в основе репопуляции [11, 18].

Проблема РАО сложна и остается недостаточно изученной. Проявление РАО исследовали в ранний пострадиационный период [18], в онтогенезе облученных особей [22, 16], в поколениях потомков облученных родителей [6]. Семена растений являются удобной моделью для изучения возможности длительного сохранения индуцированной адаптации. Вопросы формирования РАО в связи со старением генотипически различных семян пока не изучались.

Механизмы естественного старения семян связаны с окислительными повреждениями, происходящими вследствие дыхания, накоплением повреждений в структурах биомолекул, в том числе и в ДНК [2, 20], что повышает чувствительность генома к действию ионизирующей радиации [8], уменьшает пролиферативные и адаптивные возможности. Известно, что облученные семена быстро стареют, причем процессы, происходящие при ради-

Адрес для корреспонденции: Баева Елена Юрьевна, Харьковский национальный университет им. В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, г. Харьков, 61077, Украина;
e-mail: bayeva@mail.ru

ационном старении, принципиально не отличаются от процессов, лежащих в основе естественного старения.

Цель настоящей работы состояла в изучении возможности длительного сохранения радиационной адаптации при хранении и происходящем при этом ускоренном старении инбредных и гетерозисных семян *Helianthus annuus* L.

МЕТОДИКА

Материалом для исследования были клетки корневой меристемы проростков семян подсолнечника *Helianthus annuus* L. инбредных линий Сх503А (материнская линия, Р1), Х711В (отцовская линия, Р2) и гетерозисного гибрида Харьковский 58 (F1), полученного от их скрещивания, селекции Института растениеводства им. В.Я.Юрьева УААН.

Семена одного года урожая облучали гамма-радиацией ⁶⁰Со (мощность облучения – 3,21 Гр/мин) в адаптирующей дозе 50 Гр, ударной дозе 200 Гр, последовательно по схемам 50 Гр-200 Гр и радиоволны(р)-50 Гр-200 Гр для индукции РАО. Радиоволны мм-диапазона (ППЭ – 100 мкВт/см², f – 61,5 ГГц, время воздействия – 20 мин) применили как известный радиопротекторный и стимулирующий фактор [17].

Облученные и контрольные семена хранили в течение 3 лет, после чего проращивали в рулонах фильтровальной бумаги при температуре 21-23⁰С. Семена с одинаковой скоростью прорастания фиксировали в уксусном спирте (3:1) в течение первых митотических циклов через каждые 2 часа (с 29-го по 45-й) и на 53-м часу роста. Готовили постоянные давленные препараты, окрашенные реактивом Шиффа. В каждом корешке просматривали 1000 клеток для определения митотической активности (МА) и 150-200 анафаз для определения частоты

клеток с абберациями хромосом. Митотическую активность (МА) меристемы определяли по митотическому индексу (МИ).

Стимулирующее и угнетающее действие адаптирующей и ударной доз определяли при сравнении с контролем. Проявление РАО оценивали при сравнении варианта 200 Гр и вариантов с предварительным воздействием адаптирующих режимов. Полученные данные сравнивали с показателями свежееоблученных семян, изучение реакции меристемы проростков которых было проведено ранее [1].

Статистический анализ проводили по стандартной методике [10]. Достоверность разницы оценивали по критерию Фишера (P≥0,95).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При хранении семян наблюдали естественное снижение пролиферативной активности клеток корневой меристемы проростков (табл. 1), а также увеличение доли проростков, в меристеме которых отсутствовали делящиеся клетки или встречались единичные митозы (рис. 1).

В контрольном варианте средние значения МИ (за весь срок наблюдения) в меристеме Р1, Р2 и F1 составили 29 %, 53 % и 76 % от уровня свежееоблученных семян, т.е. после хранения семян у гибрида снижение способности клеток к делению происходило в меньшей степени.

Появление первых митозов наблюдали на 31-33 ч от начала замачивания семян. Клетки меристемы гибрида вступали в митоз раньше и более синхронно, чем клетки меристем линий. О синхронизации делений можно судить по резкому подъему МА до 7,5 % на 31 ч, что может происходить в результате увеличения пролиферативного пула вследствие гетерозисного эффекта.

Таблица 1

Средние значения МИ в корневой меристеме проростков свежееоблученных (СВ) и хранившихся (ХР) семян, (%)

Форма	Вариант опыта					
	Контроль		50 Гр		200 Гр	
	СВ	ХР	СВ	ХР	СВ	ХР
P1	5,2 ± 0,7	1,5 ± 0,2	6,4 ± 0,8	5,8 ± 0,7	4,2 ± 0,6	3,8 ± 0,4
P2	5,6 ± 0,7	3,0 ± 0,5	5,7 ± 0,7	3,9 ± 0,5	4,1 ± 0,6	1,2 ± 0,2
F1	7,5 ± 0,8	5,7 ± 0,7	8,1 ± 0,8	4,3 ± 0,6	3,4 ± 0,4	2,7 ± 0,4

ВЛИЯНИЕ ХРАНЕНИЯ ОБЛУЧЕННЫХ СЕМЯН

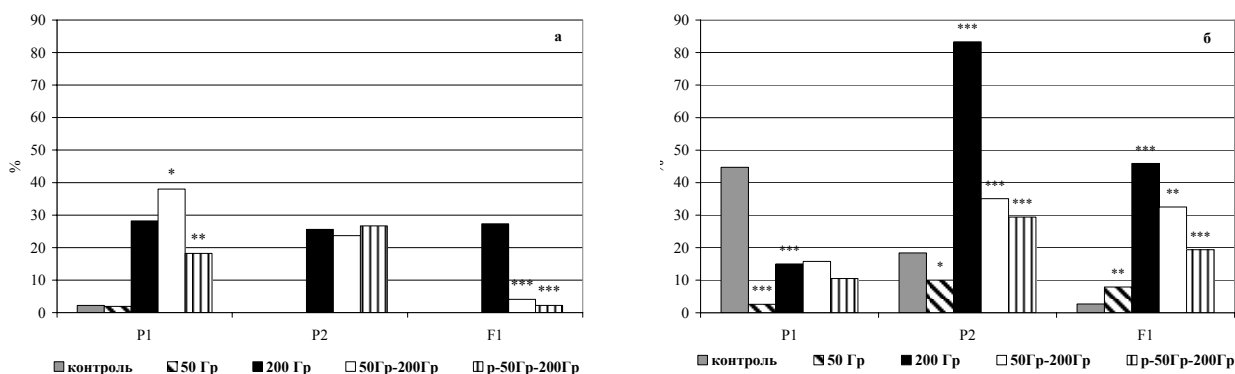


Рис. 1. Количество проростков с единичными делениями клеток, в % от общего числа проростков за весь срок наблюдения (а – свежееоблученные семена; б – хранившиеся семена). Здесь и на рис. 2, 3: * – $P \geq 0,95$; ** – $P \geq 0,99$; *** – $P \geq 0,999$.

Известно [15], что у гибридных организмов в единицу времени готовится к митозу и вступает в него большее, чем у исходных форм, число клеток. Это связано с увеличением доли клеток, находящихся в S-фазе, и с синхронным прохождением клетками меристемы зародышей гетерозисных гибридов фазы G2, что обусловило не только более высокую, но и более раннюю, чем у родительских форм, первую волну митозов. Стимуляция и синхронизация пролиферативных процессов отражают более раннюю и более полную дерепрессию генома при прорастании гибридных гетерозисных семян.

Стимулирующее воздействие адаптирующей дозы состояло в снижении доли проростков без митозов (рис. 1) у линий (с 44,7 % и 18,4 % в контроле до 2,6 % и 10,0 % в варианте 50 Гр у P1 и P2 соответственно). У гибрида стимулирующий эффект по этому критерию не выявлен.

Под влиянием адаптирующего режима облучения максимальные значения МИ (рис. 2), отражающие синхронизацию первых митозов, достоверно не отличались от контроля у гибрида и повысились у P1 ($1,6 \pm 0,4$ в К, $8,3 \pm 0,8$ в 50 Гр) и P2 ($4,4 \pm 0,5$ в контроле, $6,1 \pm 0,6$ в 50 Гр).

По средним показателям МА (табл. 1) наибольшая стимуляция пролиферации клеток была отмечена у материнской формы, незначительная – у отцовской.

Таким образом, стимуляцию МА наблюдали у линий, для которых в контроле она была в несколько раз ниже по сравнению с гибридом. Отсутствие четко выраженной стимуляции клеточной пролиферации в меристеме гибрида связано, по-видимому, с ее высоким естественным уровнем.

Следует отметить, что реакция проростков свежееоблученных семян на адаптирующее воздействие была сходной [1].

Угнетение МА и задержка делений клеток являются проявлениями биологического действия высоких доз ионизирующей радиации. Предполагают, что во время задержки пролиферации в клетке происходит восстановление индуцированных излучением повреждений [9]. В зависимости от степени повреждения генома и интенсивности репарационных процессов продолжительность задержки делений клеток различна. После воздействия дозы 200 Гр в первые часы наблюдения в меристеме гибрида встречались только единичные деления, массовое вступление клеток в митоз происходило на 6 ч позже, чем в контроле. У отцовской линии ударная доза существенно снизила интенсивность размножения клеток, как по сравнению с контролем (рис. 2), так и с остальными исследуемыми формами (табл. 1). До 45-го ч митозы не наблюдали, появлялись единично делящиеся клетки на 37-39 ч, формирование волны митозов произошло только к 53 ч. Таким образом, для отцовской линии была характерна самая продолжительная задержка делений – до 14 ч.

Хранение облученных семян гибрида не оказало существенного влияния на степень угнетения пролиферативной активности (табл. 1): в варианте 200 Гр МА составляла 45 % (свежееоблученные) и 47% (хранившиеся) от контроля. У отцовской линии длительное хранение семян значительно усугубило действие ударной дозы.

Ранее нами была показана индукция РАО предварительным воздействием адаптирующих режимов у свежееоблученных семян подсолнечника [1]. После трехлетнего хранения семян

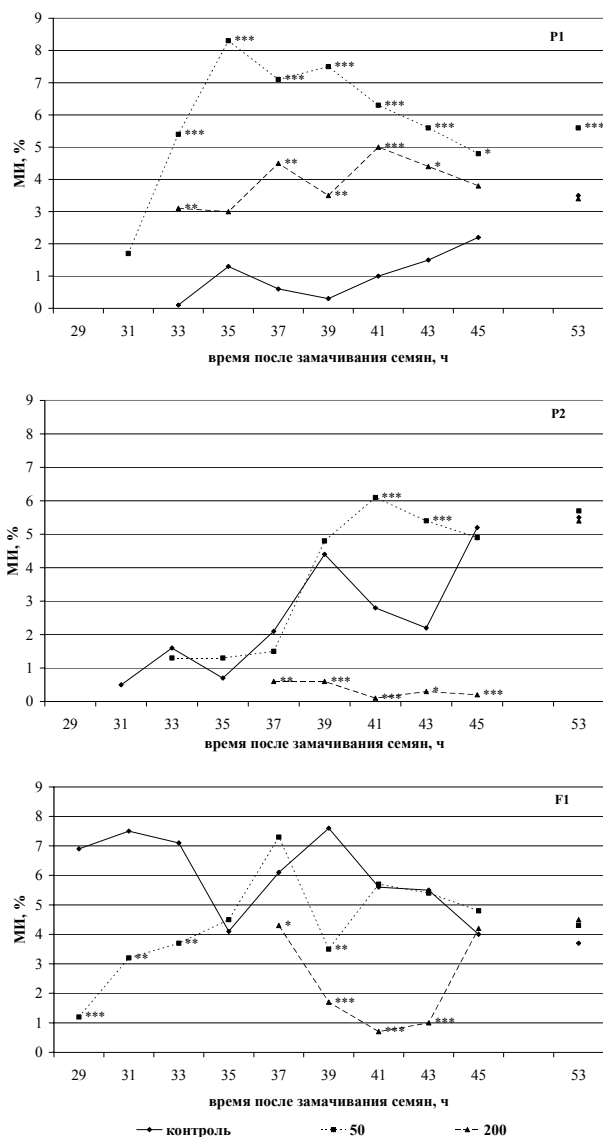


Рис. 2. Влияние адаптирующей (50 Гр) и ударной (200 Гр) доз гамма-радиации на МА клеток корневой меристемы проростков хранившихся после облучения семян линий и гибрида.

способность к радиационной адаптации сохранилась (рис. 3).

Предварительное воздействие адаптирующих факторов сократило длительность задержки делений у всех исследуемых форм, в вариантах с предоблучением первые митозы появлялись на 2-4 ч раньше, чем в варианте 200 Гр.

Радиопротекторное влияние предоблучения в малых дозах отчетливо выражено в меристеме отцовской линии. Облучение дозой 200 Гр и последующее хранение семян обусловили подавление способности клеток к пролиферации, что выразилось в отсутствии митозов, тогда как в вариантах 50-200 и р-50-200 МА находилась на достаточно высоком уровне.

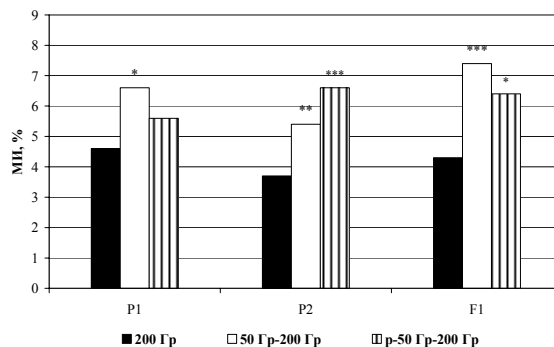


Рис. 3. Проявление РАО по критерию МА клеток корневой меристемы хранившихся после облучения семян линий и гибрида.

Увеличение числа делящихся клеток после воздействия адаптирующих режимов облучения наблюдали и в меристеме материнской линии.

В связи с отсутствием стимулирующего эффекта дозы 50 Гр у гибрида можно было ожидать и отсутствие способности клеток к индукции РАО, так как одним из условий развития реакции адаптивного ответа является стимуляция пролиферации адаптирующей дозой. Тем не менее, РАО был четко выражен в меристеме проростков гибрида, показатели МА в вариантах 50-200 и р-50-200 достоверно превышали аналогичные показатели варианта 200 Гр.

В меристеме проростков свежееоблученных семян воздействие радиоволн как дополнительного адаптирующего фактора в большей мере, чем предоблучение только гамма-радиацией, индуцировало повышение МА клеток. При хранении семян наблюдали обратный эффект, выраженность РАО по показателю МА в варианте р-50-200 была выше, чем в 50-200 только у отцовской формы. Стимулирующее воздействие радиоволн проявилось в увеличении доли проростков с митозами (рис. 1), в варианте эксперимента р-50-200 проростки с единичными делениями клеток встречались на 6-13 % реже, чем в варианте 50-200.

В связи с тем, что повышенная интенсивность размножения клеток является условием формирования РАО, а также отсутствия стимулирующего эффекта адаптирующей дозы у гибрида, можно предположить, что механизмы повышения МА линий и гибридов различны. У линий стимуляция пролиферации вызывается воздействием на семена адаптирующих режимов гамма-радиации и радиоволн мм-диапазона, а повышенный естественный уровень МА клеток меристемы гибридов является

Частота aberrантных ана- и телофаз в корневой меристеме проростков свежееоблученных и хранившихся после облучения семян

Вариант	Ана-телофазы с aberrациями хромосом, %	
	меристема проростков свежееоблученных семян	меристема проростков хранившихся семян
P1		
К	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,2
50 Гр	5,1 ± 0,9	17,5 ± 1,5
200 Гр	18,0 ± 1,6	37,7 ± 2,6
50Гр-200Гр	15,2 ± 1,3	46,3 ± 2,8
р-50Гр-200Гр	18,6 ± 1,7	36,0 ± 2,2.
P2		
К	0,3 ± 0,1	6,6 ± 0,9
50 Гр	3,4 ± 0,8	18,9 ± 1,7
200 Гр	13,4 ± 1,5	54,5 ± 2,9
50Гр-200Гр	8,2 ± 1,4	50,6 ± 3,0
р-50Гр-200Гр	6,7 ± 1,1	35,2 ± 2,3
F1		
К	0,9 ± 0,2	3,3 ± 0,8
50 Гр	4,5 ± 1,1	11,8 ± 1,5
200 Гр	11,7 ± 2,2	31,0 ± 2,3
50Гр-200Гр	11,1 ± 2,4	31,3 ± 2,4
р-50Гр-200Гр	10,3 ± 1,2	29,2 ± 1,9

в основном следствием развития гетерозиготы и проявлением гетерозиса.

Процессы роста и развития растений зависят от структурно-функционального состояния генетической системы клеток. Хранение семян сопровождается потерей их жизнеспособности [7], изменением целостности генетического материала [12]. В связи с тем, что при старении закономерно снижается надежность многих систем организма, в том числе и отвечающих за репарацию повреждений ДНК [5], элиминация повреждений происходит медленно и с меньшей эффективностью [3], что затрудняет нормальное течение митоза и способствует накоплению aberrаций хромосом [19].

Уровень цитогенетических повреждений является информативным показателем при изучении проявления радиационной адаптации.

Усредненные данные учета уровня частоты aberrантных ана-телофаз (ЧАА) проростков свежееоблученных и хранившихся семян представлены в табл. 2. С возрастом семян и увеличением дозы облучения ЧАА возрастала более существенно в меристеме инбредных линий: до 37,7 % (P1) и 54,5 % (P2). У гибрида при облучении как 50 Гр, так и 200 Гр уровень aberrан-

тных клеток был ниже, чем у линий, а при хранении ЧАА возросла только до 31,3 %.

Выявленные различия в реакции линий и гибрида могут быть обусловлены разницей в интенсивности метаболических процессов [13], в том числе и процессов репарации повреждений. Известно, что в течение первого митотического цикла у гетерозисных гибридов восстанавливается в два раза больше клеток, чем у исходных родительских форм [14].

Индукция PAO произошла в клетках меристемы свежееоблученных и хранившихся семян отцовской линии под влиянием обоих адаптирующих режимов предоблучения. У материнской линии и гибрида наблюдали слабо выраженную тенденцию: у P1 – в меристеме свежееоблученных семян, а у F1 – в меристеме свежееоблученных и хранившихся семян.

Воздействие радиоволн как дополнительного адаптирующего фактора снижало уровень ЧАА в большей мере, чем предоблучение только 50 Гр.

Результаты исследования позволяют заключить, что после трехлетнего хранения облученных семян стимулирующий эффект адаптирующей дозы сохраняется, проявляется по критерию МА клеток меристемы инбредных

линий и не обнаруживается у гибрида. При хранении гибридных семян снижение способности клеток к делению происходит в меньшей степени по сравнению с линиями. После трехлетнего хранения облученных семян РАО сохраняется и четко проявляется по критерию стимуляции МА предоблучением в адаптирующих режимах. РАО по частоте клеток с абберациями хромосом проявляется у отцовской линии, что связано с длительной задержкой делений и репарацией возникших повреждений, и как слабо выраженная тенденция у материнской линии и гибрида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баева Е.Ю. Индукция и проявление радиоадаптивного ответа клеток корневой меристемы линий и гибрида подсолнечника // Вестн. Харьк. нац. ун-та. Сер. Биология. – 2006. – Вып. 3, № 729. – С. 47-52.
2. Бочваров П.З., Николова А.К., Алехина Н.Д., Андреевко С.С. Оценка жизнеспособности семян сои при естественном старении // Биол. науки. – 1983. – № 6. – С. 73-78.
3. Газиев А.И. Репарация ДНК в составе хроматина клеток млекопитающих // Тез. 1 Всесоюз. радиобиол. съезда. – Пушино. – 1989. – Т. 1. – С. 99.
4. Гродзинський Д.М. Радіобіологія. – К.: Либідь, 2000. – 448 с.
5. Гродзинский Д.М., Войтенко В.П., Кутлахмедов Ю.Л., Кольтовер В.К. Надежность и старение биологических систем. – Киев: Наук. думка, 1987. – 176 с.
6. Долгова Т.А. Індукція і прояв радіоадаптивної відповіді у поколіннях рослин з різним генотипом. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 2004. – 22 с.
7. Жизнеспособность семян / Под ред. Робертса Е.Г. – М.: Колос, 1978. – 415 с.
8. Лазаренко Л.М., Безруков В.Ф. Динамика хромосомной нестабильности батона (*Allium fistulosum* L.): гамма-облучение семян разного срока хранения. // Цитология и генетика. – 2006. – № 4. – С. 31-36.
9. Петин В.Г. Генетический контроль модификаций радиочувствительности клеток. – М.: Энергоатомиздат, 1987. – 208 с.
10. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Вышэйш. школа, 1973. – 320 с.
11. Серебряный А.М., Зоз Н.Н., Морозова И.С. К механизму антимуtagenеза у растений // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 5. – С. 676-679.
12. Соколов Н.В., Сорочинский Б.В. Влияние ускоренного старения на характер деградации ДНК клеток зародышей семян люпина, сформированных в условиях хронического облучения в зоне отчуждения ЧАЭС // Физиология и биохимия культ. растений. – 2001. – Т. 33, № 2. – С. 127-134.
13. Титок В.В., Юренкова С.И., Титок М.В., Хотылева Л.В. Характеристика энергетического метаболизма в онтогенезе льна-долгунца при гетерозисе // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 5. – С. 668-675.
14. Турбин Н.В., Володин В.Г., Гордей И.А. Гетерозис и радиоустойчивость растений. – Минск: Наука и техника, 1977. – 152 с.
15. Шестопалова Н.Г. Репродукция клеток при гетерозисе. – Харьков: Вища школа. Изд-во при Харьк. ун-те, 1981. – 84 с.
16. Шестопалова Н.Г., Баева Е.Ю. Митотический потенциал корневой и листовой меристемы гетерозисных растений в период раннего и позднего онтогенеза // Вісн. Харк. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2004. – Вип. 1 (4). – С. 64-69.
17. Шестопалова Н.Г., Винокурова Л.В., Баева Т.И. Изучение возможности защиты сельскохозяйственных растений от повреждающего действия ионизирующей радиации // 1-й Всесоюз. радиобиол. съезд. – М., 1989. – Т. 2. – С. 321.
18. Шестопалова Н.Г., Долгова Т.А. Радиационная адаптация на ранних этапах онтогенеза растений // Биол. вестник. – 2001. – Т. 5, № 2. – С. 112-115.
19. Bohr V.A., Anson R.M. DNA damage, mutation and fine structure DNA repair in aging // Mutation Research. – 1995. – V. 338, № 1-6. – P. 25-34.
20. Lesnefsky E.J., Hoppelb Ch.L. Oxidative phosphorylation and aging // Ageing Res. Rev. – 2006. – V. 5, № 4. – P. 402-433.
21. Shimizu T., Kato T., Tachibana A., Sasaki M.S. Coordinated Regulation of Radioadaptive Response by Protein Kinase C and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase // Exp. Cell Res. – 1999. – V. 251, № 2. – P. 424-432.
22. Wang B., Ohyama H., Haginoya K. et al. Adaptive response in embryogenesis: II. Retardation of postnatal development of prenatally irradiated mice // Radiation Res. – 1999. – V. 152. – P. 119-123.

Поступила в редакцию
25.04.2007 г.

ВЛИЯНИЕ ХРАНЕНИЯ ОБЛУЧЕННЫХ СЕМЯН

AN EFFECT OF IRRADIATED SEEDS KEEPING ON RADIOADAPTIVE RESPONSE DISPLAY OF ROOT MERISTEM CELLS IN *HELIANTHUS ANNUUS* L. PLANTLETS WITH DIFFERENT GENOTYPE

E. Yu. Bayeva

*V.N. Karazin Kharkiv National University
(Kharkiv, Ukraine)*

The possibility of radioadaptive response maintenance when keeping irradiated inbred and heterotic seeds *Helianthus annuus* L. was studied. Cellular ability to divide was descent to a lesser degree in hybrid meristem as compared with lines. Stimulative effect of challenging dose was preserved and displayed in inbred lines at mitotic activity criterion, but was not obtained in hybrid. Radiation-induced adaptation also was preserved. Preirradiation in challenging conditions was increase mitotic activity in all investigated forms. Radioadaptive response was clearly defined at criterion of aberrant cells frequency in paternal line and as feebly marked tendency in maternal line and hybrid.

Key words: *Helianthus annuus* L., radioadaptive response, ageing, inbreeding lines, heterotic hybrid, mitotic activity, chromosome aberrations

ВПЛИВ ЗБЕРІГАННЯ ОПРОМІНЕНОГО НАСІННЯ НА ПРОЯВ РАДІОАДАПТИВНОЇ ВІДПОВІДІ КЛІТИН КОРЕНЕВОЇ МЕРИСТЕМИ ПРОРОСТКІВ *HELIANTHUS ANNUUS* L. З РІЗНИМ ГЕНОТИПОМ

О. Ю. Баєва

*Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна
(Харків, Україна)*

Досліджували можливість тривалого збереження радіоадаптивної відповіді за умов зберігання опроміненого насіння інбредного та гетерозисного насіння *Helianthus annuus* L. Зниження проліферативної здатності клітин в меристемі проростків гібрида відбувалося меншою мірою порівняно з лініями. Після трирічного зберігання опроміненого насіння стимулюючий ефект адаптивної дози зберігався, виявлявся за критерієм стимуляції мітотичної активності клітин меристеми інбредних ліній і не був виявлений у гібрида. Радіоадаптивна відповідь зберігалась і чітко виявлялась за критерієм стимуляції мітотичної активності попереднім опроміненням в адаптивних режимах. За частотою хромосомних аберацій радіоадаптивну відповідь спостерігали у батьківської лінії і як слабо виражену тенденцію у материнської лінії та гібрида.

Ключові слова: *Helianthus annuus* L., радіоадаптивна відповідь, старіння, інбредні лінії, гетерозисний гібрид, мітотична активність, хромосомні аберації