

С. А. Мамедли, академик НАН Украины Д. М. Гродзинский

Роль типа опыления в проявлении радиационно-индуцированной нестабильности генома у растений

*The radiation-induced genome instability of plants of tobacco *Nicotiana tabacum* L. and onion *Allium cepa* L. is investigated. The increase of the amount of chromosomal aberrations in the plants of M_1 and M_2 is revealed. The level of chromosomal aberrations depends on the dose of irradiation and the method of plants pollination.*

Одним из главных механизмов защиты растений от действия различных стрессовых факторов, реализующихся на организменном и популяционном уровнях, является высокая пластичность генома [1, 2]. Так, усиление геномной изменчивости (нестабильности) у растений отмечается при ухудшении условий произрастания, неоптимальных температурах, засолении, засухе, вирусных и бактериальных инфекциях, высушивании и старении семян, механических повреждениях и других воздействиях.

Генетическая нестабильность проявляется в увеличении скорости (частоты) формирования изменений в геноме, которые возникают как спонтанно, так и под влиянием различных факторов. При этом мутации могут возникать не сразу после воздействия стресс-фактора, а после десятков циклов репликации (реплицирующаяся нестабильность) [3, 4]. Радиационно-индуцированная генетическая нестабильность проявляется в повышении частоты мутаций, хромосомных aberrаций, продленной клеточной гибели у потомков облученных клеток [4, 5]. Индуцированная облучением общая нестабильность хромосомного аппарата выражается в увеличении выхода хромосомных aberrаций самых различных типов [6].

В данной работе приведены результаты изучения влияния ионизирующего излучения на проявление генетической нестабильности в последующих поколениях растений. С этой целью семена табака *Nicotiana tabacum* L. и лука *Allium cepa* L. предварительно облучали в дозах 1, 2,5 и 5 Гр, а затем выращивали растения на протяжении трех поколений. Для определения уровня радиационно-индуцированной нестабильности генома у проростков поколений M_1 и M_2 подсчитывали количество хромосомных aberrаций (ХА) в корневой меристеме. Кроме того, с целью изучения влияния перекрестного опыления на уровень нестабильности генома в поколениях растений часть соцветий изолировали с помощью защитных колпачков, предохраняя от перекрестного опыления и обеспечивая тем самым принудительное самоопыление (схему опыта см. на рис. 1).

Материалы и методы исследования. Облучение семян растений проводили на установке "Исследователь" (^{60}Co) при мощности дозы 0,02 Гр/с и установке "Рхунд" (^{60}Co) при мощности дозы излучения 0,5–1 Гр/мин.

Контрольные и облученные семена проращивали на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри при 24–28 °С для лука и 30–32 °С для табака.

При появлении первичных корешков длиной 1,0–1,5 см их фиксировали в смеси Карнуа (этиловый спирт : ледяная уксусная кислота в соотношении 3 : 1), через 24 ч переносили в 80% этиловый спирт. Окрашивание производили ацетоорсеином [7]. Получали временные и постоянные препараты. На цитологических препаратах подсчитывали количество

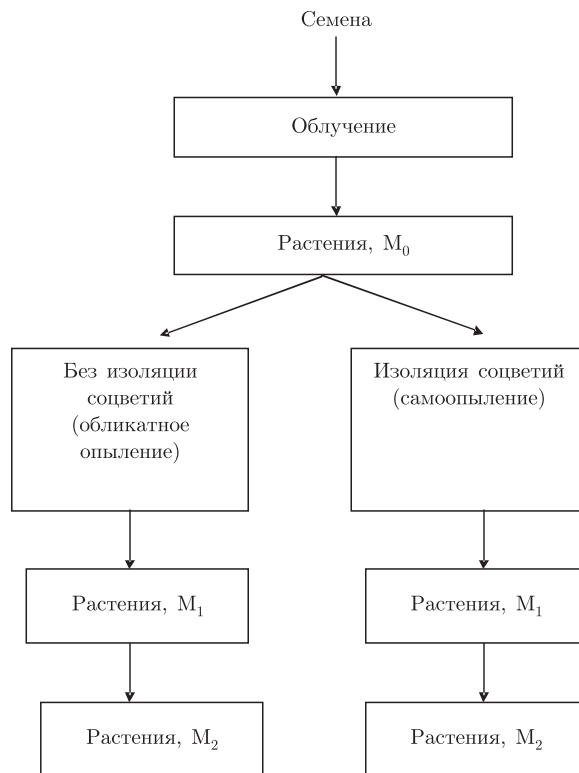


Рис. 1. Схема изучения выхода хромосомных aberrаций в поколениях облученных растений

абберантных анафаз и определяли количество ХА на клетку. При применении анафазного метода подсчитывали образующиеся мосты, хромосомные фрагменты, отстающие хромосомы и другие нарушения. В каждом варианте анализировали 100 анафаз и ранних телофаз, не разделяя ХА по отдельным категориям, как рекомендуется в [8]. Частоту абберантных анафаз выражали в процентах от просмотренных соответствующих фаз митоза.

Статистический анализ данных проведен с применением непараметрических методов — ранговый критерий Уилкоксона–Манна–Уитни, метод знаков и ранговый метод Уилкоксона. Статистический анализ качественных данных проведен с применением критерия χ^2 Пирсона. В случаях, когда число данных хотя бы в одной группе было меньше пяти, результаты проверяли точным методом Фишера. При применении этих методов для статистической обработки была использована компьютерная программа EXCEL 2000 и S-PLUS 2000.

Результаты исследования и их обсуждение. *Выход хромосомных aberrаций в поколениях растений табака Nicotiana tabacum.* Предварительно оценивали выход ХА у растений M_0 . Облучение семян вызывало значительное повышение выхода ХА у растений (табл. 1). В M_1 и M_2 поколениях растений табака, полученных из однократно облученных семян, выход ХА имеет дозозависимый характер, постепенно увеличиваясь с ростом дозы облучения. В обоих поколениях выявлены достоверные отличия между вариантами с перекрестным опылением и самоопылением (табл. 1).

При сравнении количества структурных изменений хромосом у вариантов с перекрестным опылением в поколениях M_1 и M_2 видно, что в M_2 поколении происходит уменьшение количества ХА приблизительно в 1,3 раза при всех дозах облучения. При самоопылении количество ХА во втором поколении также уменьшается, но продолжает оставаться на

достаточно высоком уровне и превышает уровень ХА, регистрируемый у вариантов с перекрестным опылением.

Известны работы по изучению выхода генетических нарушений в поколениях организмов при остром облучении. Первые работы по генетике облучения популяций были выполнены Уолесом и Кингом (1951–1956 гг.). Опыты проводились с экспериментальными популяциями *D. melanogaster*, которые создавались из особей, свободных от леталей и полuletалей по II хромосоме. Опыты показали, что под воздействием ионизирующих излучений в облученной популяции появляется большое количество леталей, полuletалей и других мутаций, которые снижают жизнеспособность через определенное количество поколений [9]. При прекращении облучения происходит очищение популяции от вредных мутаций. Стоун и Вилсон изучали последствия термоядерных взрывов, проведенных на Мариановых о-вах в 1950-х гг. На о-ве Ронгелан популяция дрозофилл восстановила свои генетические свойства через 26 поколений. В опытах Винге облученные особи *D. milistoni* вносили мутации в популяции в островных лесах Бразилии. Было обнаружено, что естественный отбор приводит к освобождению популяций от многих мутаций, которые возникли в результате облучения, и последствия облучения сказывались на протяжении 35 поколений [9].

В настоящее время основное внимание уделяется генетическим эффектам хронического облучения. В ряде исследований показано увеличение aberrаций хромосом в образовательных тканях растений, произрастающих в зоне отчуждения Чернобыльской АЭС. Анализ генетических нарушений, индуцированных радиационным воздействием, оцениваемых по количеству ХА, показал, что в проростках семян сосны после аварии на ЧАЭС в первой репродукции имел место повышенный уровень клеток с ХА, по сравнению с контролем [10]. Было показано увеличение количества клеток с aberrациями хромосом и хроматид в корневой меристеме проростков скерды кровельной *Crepis tectorum*, выращенных из семян растений, собранных на территории зоны отчуждения ЧАЭС при уровнях гамма-фона 50–100 мкГр/ч первый и 0,2–200 мкГр/ч во второй год после аварии [11]. Обнаружено увеличение в несколько раз количества клеток с aberrациями хромосом в корневых меристемах проростков ослинника *Oenothera biennis*, выращенных в лабораторных условиях из семян растений, которые сформировались при уровнях гамма-фона в 1996 г. от 0,5 до 600 мкГр/год [12]. При этом установлена прямо пропорциональная зависимость выхода мутаций от мощности дозы и обнаружены множественные aberrации хромосом [12].

При исследовании выхода клеток с aberrациями хромосом в корневых меристемах проростков ржи второго поколения, полученных из семян растений, которые сформировались

Таблица 1. Выход хромосомных aberrаций в корневой меристеме проростков табака *Nicotiana tabacum* разных поколений, полученных из облученных семян, при перекрестном опылении и самоопылении, % ($p < 0,01$)

Вариант	Доза облучения, Гр			
	0	1	2,5	5
M ₀	3,70	4,38	4,29	4,98
M ₁				
Перекрестное опыление	3,12	3,47	4,13	4,12
Самоопыление	3,59	4,31	4,96	5,71
M ₂				
Перекрестное опыление	2,23	2,59	3,25	3,17
Самоопыление	3,25	3,66	4,73	5,11

при уровнях радиоактивного загрязнения от 120 до 800 МБк/м², также отмечено существование близкой к линейной зависимости между их выходом и суммарной поглощенной дозой растениями (по бета- и гамма-активности) [12]. У семян озимой пшеницы из хронически облучающихся агроценозов установлено изменение радиочувствительности семян М₁ и М₂ поколений [13]. Показано, что в зоне ЧАЭС в 1987 г. при поглощенных дозах 0,7–1,1 Гр уровень ХА в генеративных органах сосны был в 2–3 раза выше спонтанного, а жизнеспособность пыльцы уменьшилась на 30%, возросло количество морфологических аномалий в пыльце [12].

Тем не менее не только в экспериментальных условиях, но и в реальных ситуациях организмы могут подвергаться воздействию высоких доз облучения в остром и хроническом режиме. Так, в течение первых двух недель после аварии на ЧАЭС на площади 500–600 га вблизи станции деревья получили дозы порядка 10–100 Гр, что привело к массовой гибели сосен. Было отмечено также частичное поражение крон березы и ольхи [10, 12]. В зоне площадью примерно 3000 га, где поглощенные дозы для деревьев превышали 8–10 Гр, в 1986–1987 гг. погибло 25–40% хвойных деревьев. У 90–95% сосен наблюдался некроз точек роста и молодых побегов, усыхание части крон, существенное подавление ростовых процессов, обильное образование радиоморфозов. Отмеченные эффекты определялись главным образом острым внешним облучением в начальный период после аварии [12].

Таким образом, изучение выхода ХА у растений табака, выращенных из семян, исходно получивших разные дозы острого облучения, показало увеличение количества ХА, которое сохраняется в последующих поколениях. Полученные результаты можно считать доказательством существования индуцированной облучением геномной нестабильности у растений табака, степень проявления которой зависит от дозы облучения и способа опыления растений.

Выход хромосомных aberrаций в поколениях растений лука Allium cepa. Обнаружение радиационно-индуцированной генетической нестабильности у соматических клеток табака, являющегося представителем класса двудольных, способствовало расширению нами круга объектов исследования с целью изучения индукции генетической нестабильности у высших растений, относящихся к другому классу — однодольных. В качестве объекта исследования был выбран лук *Allium cepa*.

Опыты проводили по той же схеме, что и при работе с растениями табака (см. рис. 1). Семена лука *A. cepa* предварительно облучали в дозах 1, 2,5 и 5 Гр, а затем выращивали растения на протяжении трех поколений.

Согласно полученным данным (табл. 2), облучение семян значительно повышает выход ХА в корневой меристеме проростков М₀ поколения. В М₁ и М₂ поколениях растений лука выход ХА также возрастает, имеет дозозависимый характер, постепенно увеличиваясь с ростом дозы облучения.

При сравнении количества ХА у вариантов с перекрестным опылением в поколениях М₁ и М₂ видно, что в М₂ поколении количество ХА уменьшается приблизительно в 1,4 раза при дозах облучения 1 и 2,5 Гр и примерно в 1,2 раза при дозе облучения 5 Гр. При самоопылении уменьшения количества ХА во втором поколении практически не происходит и оно остается на высоком уровне.

Таким образом, в опытах как с растениями табака, так и лука более высокий выход ХА в М₁ и в М₂ поколениях наблюдается в условиях самоопыления растений. Обнаруженная закономерность представляется весьма важной как с генетической, так и с эволюционной точек зрения.

Таблица 2. Выход хромосомных aberrаций в корневой меристеме проростков лука *Allium cepa* разных поколений, полученных из облученных семян, при перекрестном опылении и самоопылении, %

Вариант	Доза облучения, Гр			
	0	1	2,5	5
M ₀	1,87	2,99	3,63	3,25
M ₁				
Перекрестное опыление	1,88	2,49	2,97	2,97
Самоопыление	2,14	3,11	3,24	3,20
M ₂				
Перекрестное опыление	1,24	1,77	2,19	2,42
Самоопыление	2,08	2,99	2,90	3,25

В работах академика НАН Украины Г. Г. Поликарпова на полихетах было установлено, что под влиянием радионуклидного загрязнения илов в водоемах, где обитают эти организмы, заметно возрастает частота полового размножения при одновременном уменьшении уровня вегетативного размножения, свойственного им в обычных условиях [14].

Предполагают, что облучение вызывает изменение функционирования регуляторных систем клетки вследствие формирования так называемого сигнала тревоги. На этот сигнал организм реагирует разными видами адаптивных реакций, среди которых можно выделить онтогенетическую и филогенетическую адаптацию [14]. Филогенетическая или генетическая адаптация связана со сложными процессами, приводящими к возрастанию генетической изменчивости в поколениях. Для обеспечения этого возрастания в популяциях может увеличиваться частота генетических транслокаций, ошибочной репарации и гетерозиготность. Статистическим доказательством увеличения темпов изменчивости в популяциях является возрастание значений дисперсии, рассчитанных для количественных признаков [14].

Основной особенностью полового размножения является постоянное изменение аллельных комбинаций, которое может быть выгодно в нестабильной среде (при действии стрессовых факторов, при этом обеспечивается быстрый темп эволюции), либо в нестабильном геноме (при этом обеспечивается эффективное удаление вредных мутаций) [15]. Согласно гипотезе Меллера, любая новая мутация в бесполо передающемся генотипе может быть удалена из популяции только за счет гибели особей, несущих эту мутацию. Очевидно, что процессы генетической рекомбинации, являясь наиболее важной особенностью полового размножения, обеспечивают простой обход данного принципа. В соответствии с гипотезой, предложенной в [15], появление полового размножения могло быть индуцировано мобильными генетическими элементами, для которых выгоден процесс обмена генетической информацией, дальнейшее их поддержание в популяции обеспечивается долгосрочным групповым преимуществом.

Таким образом, установленное нами у растений двух разных таксономических классов (представителей двудольных и однодольных) увеличение количества ХА в поколениях потомков растений, полученных из облученных семян, имеет характер универсальной закономерности и может рассматриваться как проявление радиационно-индуцированной нестабильности генома у растений.

1. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 6. Изменчивость и отбор в процессе адаптации к условиям выращивания *in vitro* // Биополимеры и клетка. – 2000. – 16, № 3. – С. 159–185.
2. Соловьян В. Т. Приспособление клеток к неблагоприятным факторам. Индукция геномных перестроек // Там же. – 1991. – 7, № 1. – С. 50–54.

3. Гребнева Е. А. Молекулярные механизмы образования мутаций замены оснований при пострепликативной SOS-репарации двухцепочечной ДНК, содержащей тиминовые димеры // Там же. – 2001. – **17**, № 6. – С. 487–500.
4. Morgan W. F. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I radiation-induced genomic instability and bystander effects in vitro // Radiat. Res. – 2003. – **159**, No 5. – P. 567–580.
5. Lorimore S. A., Wright E. G. Radiation-induced genomic instability and bystander effects: related inflammatory-type responses to radiation-induced stress and injury? // Int. J. Radiat. Biol. – 2003. – **79**, No 1. – P. 15–25.
6. Гераськин С. А., Зяблицкая Е. Я., Удалова А. А. Закономерности выхода структурных мутаций в корневой меристеме облученных ионизирующим излучением семян ячменя // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1997. – **37**, вып. 1. – С. 82–90.
7. Методичні вказівки до спецпрактикуму “Експериментальний мутагенез” для студентів біологічного факультету / Упоряд. О. В. Проніна, С. Р. Рущковський, О. І. Александрова та ін. – Київ: Фітосоціоцентр, 2002. – 24 с.
8. Rank J., Jensen A. G., Skov B. et al. Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, Salmonella mutagenicity test, and Allium anaphase-telophase test // Mutat. Res. – 1993. – No 300. – P. 29–36.
9. Радиоэкология / Под ред. Р. М. Клечковского, Г. Г. Поликарпова, Р. М. Алексахина. – Москва: Атомиздат, 1971. – 421 с.
10. Козубов Г. М., Таскаев А. И. Радиационное воздействие на хвойные леса в районе аварии на Чернобыльской АЭС. – Сыктывкар: КНЦ УрО АН СССР, 1990. – 136 с.
11. Шевченко В. В., Гриниц Л. И., Шевченко В. А. Цитогенетические эффекты в природных популяциях *Speris tectorum*, подвергающихся хроническому облучению в районе Чернобыльской АЭС // Радиобиология. – 1995. – **35**, № 5. – С. 695–701.
12. Рабочие материалы междунар. конф. “Десятилетие после Чернобыля: воздействие на окружающую среду и дальнейшие перспективы”. – Вена, МАГАТЭ, 1996. – С. III-1–III-20.
13. Ульяненко Л. Н., Филипас А. С., Дьяченко И. В., Степанчикова Н. С. Радиочувствительность семян озимой пшеницы из хронически облучающихся агроценозов // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1995. – **35**, вып. 3. – С. 428–434.
14. Гродзинський Д. М. Парадигми сучасної радіобіології // Проблеми безпеки атомних електростанцій і Чорнобиля. – 2005. – Вип. 3, ч. 2. – С. 9–16.
15. Попадъин К. Ю. Эволюция полового размножения: роль вредных мутаций и мобильных элементов // Журн. общ. биол. – 2003. – **64**, № 6. – С. 463–478.

*Институт радиационных проблем
НАН Азербайджана, Баку
Институт клеточной биологии
и генетической инженерии НАН Украины, Киев*

Поступило в редакцию 02.03.2007