

УДК: 575.2:57.04

Исследования по цитофизиологии и радиационной генетике растений на биостанции Харьковского национального университета имени

В.Н.Каразина

Е.Ю.Герман¹, Т.А.Долгова²

¹Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

²Харьковский национальный аграрный университет имени В.В.Докучаева (Харьков, Украина)
elenagerman2009@gmail.com

На Северско-Донецкой биологической станции им. проф. В.М.Арнольди под руководством доктора биологических наук, профессора Н.Г.Шестопаловой соискателями, аспирантами и дипломниками проводились многолетние исследования в области цитофизиологии и цитогенетики растений. Изучены генетические последствия влияния гамма-радиации на растения основных сельскохозяйственных культур, вопросы индукции и степени проявления радиоадаптивного ответа в онтогенезе растений и в поколениях, а также его проявление в связи с эффектом гетерозиса. Путем радиационного мутагенеза получены новые формы тритикале и озимой ржи. Изучена суточная кинетика пролиферативной активности меристемы растений в связи с эффектом гетерозиса. По результатам исследований защищены кандидатские диссертации, получены несколько авторских свидетельств.

Ключевые слова: радиационный мутагенез, гетерозис, суточные ритмы, радиоадаптивный ответ, митотическая активность, онтогенез.

Дослідження з цитофізіології і радіаційної генетики рослин на біологічній станції Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна

О.Ю.Герман, Т.А.Долгова

На Сіверсько-Донецькій біологічній станції ім. проф. В.М.Арнольді під керівництвом доктора біологічних наук, професора Н.Г.Шестопалової пошукачами, аспірантами і дипломниками проводились багаторічні дослідження в області цитофізіології і цитогенетики рослин. Вивчені генетичні наслідки впливу гамма-радіації на рослини основних сільськогосподарських культур, питання індукції, ступеня прояву і можливості зберігання радиоадаптивної відповіді в онтогенезі рослин і поколіннях, а також у зв'язку з ефектом гетерозису. Шляхом радіаційного мутагенезу отримані нові форми тритикале й озимого жита. Вивчена добова кінетика проліферативної активності меристеми рослин у зв'язку з ефектом гетерозису. За результатами досліджень захищені кандидатські дисертації, отримано декілька авторських свідоцтв.

Ключові слова: радіаційний мутагенез, гетерозис, добові ритми, радиоадаптивна відповідь, митотична активність, онтогенез.

Researches on plant cytophysiology and radiation genetics at the biological station of V.N.Karazin Kharkov National University

O.Yu.German, T.A.Dolgova

Researches on plant cytophysiology and cytogenetics have been carried out for many years on the professor V.Arnoldi Seversky Donetsk Biological Station under the direction of professor N.G.Shestopalova. The genetic consequences of gamma radiation effect on the main agricultural plants, the problems of radioadaptive response induction and manifestations in plant ontogeny and in generations, as well as its manifestation in connection with the effect of heterosis have been studied. The new forms of triticale and rye have been produced by radiation mutagenesis. The daily kinetics of the proliferative activity of plant meristem has been studied in connection with the effect of heterosis. On the basis of results of these researches PhD dissertations have been defended and several patents have been received.

Key words: radiation mutagenesis, heterosis, circadian rhythms, radioadaptive response, mitotic activity, ontogenesis.

Введение

В 1979 г. на кафедре генетики и цитологии Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина доктором биологических наук, профессором Надеждой Григорьевной Шестопаловой

была создана лаборатория цитофизиологии и цитогенетики растений. Многолетние исследования велись в нескольких направлениях, основными из которых были исследование структурно-функционального состояния клеток сельскохозяйственных растений в связи с эффектом гетерозиса, изучение цитогенетических механизмов формирования устойчивости к действию мутагенных физических факторов, в первую очередь радиации.

Под руководством Н.Г.Шестопаловой исследованы особенности репродукции клеток у растений инбредных линий и гибридов с разной степенью проявления гетерозиса, показана связь стартового митотического потенциала с хозяйственно-ценными признаками, продуктивностью растений, выявлены однонаправленные различия между исходными формами и гибридами по суточной ритмике пролиферативных процессов (Баева, 1996). В работах сотрудников лаборатории показано влияние широкого диапазона доз гамма-радиации на пролиферативную активность клеток, адаптивные и продукционные возможности растений (Шестопалова, 1981), процессы мутагенеза на уровне клеток и организмов (Винокурова, 1996). Н.Г.Шестопаловой и сотр. доказана возможность модификации радиобиологической реакции различными физическими факторами (Шестопалова и др., 1989, 1991; Долгова, 2004; Баева, 2008). Впервые установлена роль радиоволн миллиметрового диапазона как фактора стимулированной репопуляции – одного из механизмов формирования эффекта радиоадаптивного ответа. Показано сохранение этого эффекта в онтогенезе и в ряду половых поколений растений (Долгова, 2004; Баева, 2008). Изучены клеточные механизмы естественного старения семян в зависимости от условий сохранения генофонда и генотипа объекта (Толстоплет, 1994), выявлен общий характер цитофизиологических и цитогенетических изменений при естественном и радиационном старении.

Полевая часть работ, исследования возможности сохранения и степени проявления изучаемых явлений в онтогенезе, их передача в поколениях растений проводились на опытном поле Северско-Донецкой биологической станции им. проф. В.М.Арнольди. Цель данной статьи – обобщить наиболее значимые полученные результаты исследований по цитофизиологии и радиационной генетике растений, проведенных сотрудниками нашей лаборатории в условиях опытного поля биологической станции.

Изучение суточной кинетики пролиферативной активности меристемы инбредных линий и гибридов растений с разной степенью проявления гетерозиса

Проблема получения и использования экономически значимого гетерозиса у сельскохозяйственных культур привела к необходимости поиска способов выбраковки низкогетерозисных гибридов на ранних этапах селекционного процесса и отбора форм интенсивного типа. В связи с этим в лаборатории цитофизиологии и цитогенетики была сформулирована задача раскрытия внутренних факторов, обуславливающих уровень продуктивности растений. На момент проведения исследований в научной литературе было достаточно данных о физиолого-биохимических, биофизических, морфологических проявлениях гетерозиса, однако сведения о цитологической основе этого явления были единичны. В работах сотрудников нашей лаборатории было изучено деление клеток корневой меристемы проростков семян пшеницы, подсолнечника, лука, кукурузы и установлено, что следствием гетерозисной гибридизации является стимуляция и повышенная естественная синхронизация первых митозов при прорастании семян (Шестопалова, 1981; Шестопалова и др., 1990).

Вместе с тем известно, что одним из фундаментальных свойств живых организмов является периодичность метаболических процессов, в том числе суточная репродукция клеток и связанные с ней молекулярно-генетические процессы. Исследование кинетики и уровня пролиферативной активности клеток листовых меристем в зависимости от времени суток, степени проявления гетерозиса проводили у сельскохозяйственных растений в ранний (7–8 лист) и поздний (22–23 листья) периоды вегетации. Были изучены 3 гибридные формы подсолнечника *Helianthus annuus* L. с различной степенью проявления эффекта гетерозиса и их исходные формы (Баева, 1996). Установлено, что в меристеме высокогетерозисного гибрида формируется циркадный ритм с двумя подъемами митотической активности в утренние (4 часа) и вечерние часы (20 часов). У родительских линий синхронность и ритмичность делений проявлялись слабо. В конце вегетации, перед цветением, у высокогетерозисного гибрида сохранялась ритмичность делений, повышение митотической активности наблюдалось в те же часы, что и в ранний период вегетации; у линий синхронность митозов практически отсутствовала. Амплитуда митотической активности в конце вегетации была

снижена как у гибридов, так и у их родительских форм. Таким образом, было показано, что преимущество высокогетерозисного гибрида по показателям митотического потенциала сохраняется в течение длительного периода онтогенеза и отображает более активное функциональное состояние клеток, которое может благоприятно повлиять на формирование структуры урожая.

Гибриды с меньшим гетерозисным эффектом по уровню митотической активности в начале вегетации не демонстрировали четко выраженную ритмичность делений, хотя и превышали исходные формы по уровню митотической активности. В конце вегетации активность деления клеток в меристеме низкогетерозисных гибридов и их родительских линий находилась на одном уровне, преимущество гибридов перед линиями наблюдали только в утренние часы.

В целом к периоду цветения митотическая активность снижалась на 20–30 %, по сравнению с ранним сроком вегетации. При сравнении пролиферативной активности меристемы первичных корешков подсолнечника с интенсивностью делений клеток в листьях установлено, что в листьях митотическая активность клеток была в 2 раза ниже, чем в корнях.

Таким образом, исследование суточной ритмики митозов в течение онтогенеза показало, что интенсивность деления клеток с возрастом растений снижается, а ритмичность митозов становится менее выраженной. Установлено, что различие между гибридами и исходными формами, а также между гибридами с различным гетерозисным эффектом по изучаемым показателям в листьях вегетирующих растений несущественно, хотя оно четко выражено в меристеме корней проростков.

Генетические проявления реакции тритикале *Triticosecale* Wittm. & A.Camus и его исходных форм – пшеницы *Triticum aestivum* L. и ржи *Secale cereale* L. – на гамма-облучение семян

Исследования тритикале, геном которого экспериментально сконструирован, а устойчивость к физическим факторам, в отличие от других видов растений, не формировалась в ходе эволюции, имеет и фундаментальное, и прикладное значение. Сотрудниками нашей лаборатории проводились работы по изучению радиобиологической реакции тритикале на уровне клеток и вегетирующих растений при отдельном и комбинированном действии ионизирующего излучения и радиоволн миллиметрового диапазона на семена (Винокурова, 1996). В работе использовали тритикале Амфидиплоид-206 (АД-206), содержащий 42 хромосомы, который был создан А.Ф.Шулындиным в институте растениеводства им. В.Я.Юрьева методом межвидовых и межродовых скрещиваний.

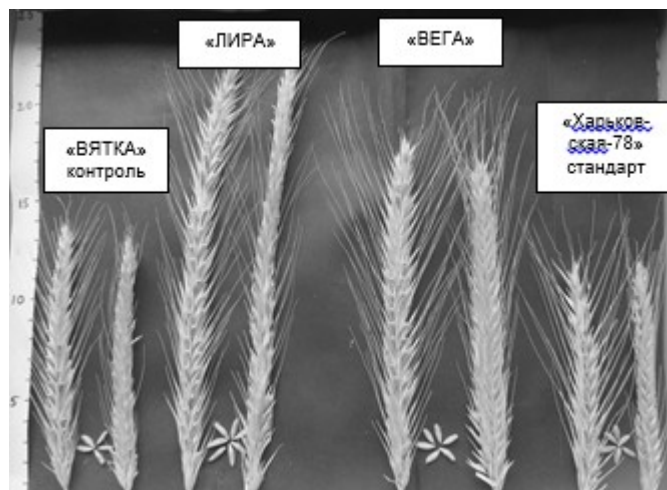


Рис. 1. Колосья озимой ржи исходного сорта «Вятка», созданных из него при сочетании естественного и радиационного мутагенеза форм «Лири», «Вега», и стандартного для лесостепи сорта «Харьковская-78»

В процессе выполнения радиобиологических исследований были получены данные о стимулирующем влиянии дозы 50 Гр гамма-радиации на цитогенетические и хозяйственно-полезные признаки озимой ржи и тритикале АД-206. Учитывая эти данные, с целью улучшения качества зерна

были облучены «старые» семена озимой ржи сорта «Вятка», срок хранения которых составил 13 лет. В результате были получены новые формы озимой ржи «Лири» и «Вега» (рис. 1), которые характеризовались повышенным митотическим потенциалом семян и ценными хозяйственно-полезными признаками.

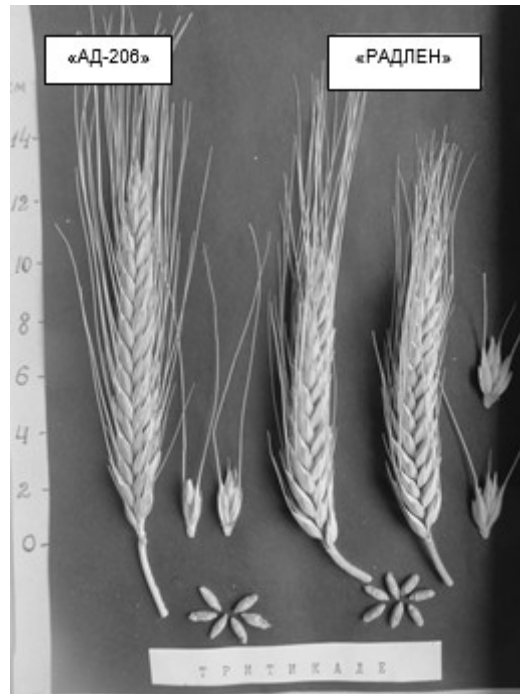


Рис. 2. Колосья тритикале исходного сорта «АД-206» и полученного на его основе радиомутанта «Радлен»

Одним из способов создания генетических ресурсов является получение мутантных форм с полезными показателями и получение на их основе новых гибридов и сортов. Важным средством улучшения сортов и обогащения генофонда многих сельскохозяйственных растений является радиационный мутагенез. Наибольшее количество сортов из радиационных мутантов было получено для наиболее распространенных сельскохозяйственных культур – пшеницы, ячменя, гречихи, риса и др. Благодаря сложному гибриднему происхождению тритикале является удачным объектом для исследования в области экспериментального мутагенеза.

Под руководством Н.Г.Шестопаловой был получен новый скороспелый, среднерослый, радиоустойчивый мутант тритикале «Радлен» путем предпосевного гамма-облучения семян сорта тритикале АД-206 в дозе 50 Гр (Шестопалова и др., 1990). Выявление измененных форм тритикале проводили в первом поколении после облучения, а наследование признаков изучали в течение 10 поколений. «Радлен» отличался от исходного сорта сокращенным на 7–10 дней вегетационным периодом, снижением высоты растения на 30–40 см и, как следствие, повышенной устойчивостью к полеганию. Зерно «пшеничного» типа, более выполненное, чем у исходного сорта. Мутанты синхронно колосились и дружно созревали, были устойчивы к бурой ржавчине и мучнистой росе, более зимостойки.

Исследование уровней пролиферативной активности клеток корневой меристемы проростков у радиомутанта «Радлен» и его исходной формы, сорта тритикале АД-206, показало сходство уровня пролиферации в период начального роста растений. В то же время облучение семян в высокой дозе гамма-радиации 300 Гр выявило повышенную радиоустойчивость мутанта. У исходного сорта тритикале наблюдали задержку деления клеток, снижение митотической активности на самых ранних этапах роста, по сравнению с необлученным контролем. У радиомутанта «Радлен» облучение задерживало наступление второй волны митотической активности, а деление клеток в начальный пострадиационный период не угнеталось. Снижение частоты клеток с такими цитогенетическими

повреждениями, как хромосомные aberrации и микроядра, более активно происходило в меристеме мутанта.

В 1987 г. радиомутант тритикале «Радлен» был передан в Генетический центр Международного института генетических ресурсов им. Н.И.Вавилова.

Изучение эффекта радиоадаптивного ответа

Последние десятилетия характеризуются увеличением техногенной стрессорной нагрузки на биологические объекты, повышением концентрации мутагенных факторов в окружающей среде. Одним из наиболее значимых по интенсивности воздействия на природные и сельскохозяйственные объекты является радиационный фактор. В этой связи приобретают актуальность исследования, направленные на защиту клеток и организмов, повышение их радиорезистентности к высоким дозам радиации. Одним из механизмов защиты организмов от повреждающего действия радиации является индукция радиоадаптивного ответа, который выражается в повышении устойчивости к ионизирующему излучению после предварительного действия на объекты относительно малых доз. Радиоадаптивный ответ – неспецифическая реакция, выявлена в экспериментах с различными биологическими организмами, на разных уровнях организации живой материи. Изучение эффекта радиоадаптивного ответа на уровне меристем растений имеет важное значение в связи с тем, что в основе процессов роста растения, реализации его генетической программы развития, а, следовательно, и формирования урожайных качеств, лежит структурно-функциональная целостность клеток меристемы и активность их восстановления от повреждений.

Исследовали возможность индукции и проявления радиационно-индуцированного адаптивного ответа на клеточном и организменном уровнях при воздействии излучений на покоящиеся семена двух видов лука *Allium cepa* L. и *Allium fistulosum* L., и трех сортов ячменя *Hordeum distichon* L. (Долгова, 2004). Предварительное облучение воздушно-сухих семян адаптирующим воздействием гамма-радиации в дозах 40 Гр, 50 Гр и радиоволнами мм-диапазона перед повреждающей дозой гамма-радиации 200 Гр приводило к повышению устойчивости растений в период раннего онтогенеза, в M_1 и M_2 поколениях по сравнению с вариантом без адаптирующего предоблучения. Проявление радиоадаптивного ответа наблюдали после прорастивания семян по увеличению морфологических показателей роста проростков и митотической активности корневой меристемы, а также снижению количества проростков без корня или колеоптиля, частоты клеток с хромосомными aberrациями и микроядрами.

Радиационная стимуляция деления клеток после адаптирующего воздействия, депрессия – после повреждающего облучения, а также эффект радиоадаптивного ответа сильнее проявлялся у ячменя сорта Спомын, естественный митотический потенциал корневой меристемы которого в 2 раза ниже, чем у сорта Джерело. В M_1 и M_2 поколениях растений стимулирующее и угнетающее действие использованных режимов облучения, а также проявление радиоадаптивного ответа по показателям митотической активности воспроизводилось, но изменялась степень их проявления в зависимости от режима облучения и восстановительных способностей генотипа растений. У выживших и достигших M_2 поколения растений ячменя сорта Джерело митотическая активность и частота клеток с хромосомными aberrациями в варианте с облучением дозой 200 Гр достигли контрольного уровня, что свидетельствовало о полном восстановлении этих растений от повреждающего воздействия радиации. В M_2 поколении радиоадаптивный ответ наблюдали по снижению уровня хромосомного мутагенеза и увеличению показателей структуры урожая у сорта с менее высокой митотической активностью клеток корневой меристемы. Исследования показали, что одним из маркеров проявления радиоадаптивного ответа является синхронизация первого митоза при прорастании облученных семян. Дополнительное воздействие радиоволн мм-диапазона перед адаптирующей дозой гамма-радиации усиливало реакцию радиоадаптивного ответа как у непосредственно облученных семян (M_0), так и в M_1 и M_2 поколениях растений ячменя.

Исследование возможности сохранения радиоадаптивного ответа в онтогенезе растений проводили также на клетках листовой меристемы вегетирующих растений подсолнечника *Helianthus annuus* L. в ранний (4–5 лист) и поздний (16–17) периоды вегетации (Шестопалова, Баева, 2007; Баева, 2008). Растения выращивали на опытном участке биостанции из облученных семян гибрида и его инбредных родительских форм. Семена облучали гамма-радиацией в дозе 50 Гр, стимулирующей ростовые процессы и в дозе 200 Гр, угнетающей процессы пролиферации клеток, тормозящей рост и развитие организма. Для индукции радиоадаптивного ответа семена последовательно облучали

сначала «малой», а затем высокой дозой радиации. В качестве дополнительного адаптирующего фактора использовали облучение радиоволнами мм-диапазона, стимулирующее действие которых было установлено ранее в работах сотрудников нашей лаборатории (Шестопалова и др., 1989).

Сравнение пролиферативной активности корневой меристемы проростков и листовой меристем вегетирующих растений показало, что митотическая активность снижается с возрастом. Меристема гетерозисных растений являлась более активно пролиферирующей, чем меристема родительских линий, не только в период прорастания семян, но и в течение всего периода онтогенеза, что подтвердило данные, полученные ранее в нашей лаборатории (Баева, 1996).

Влияние адаптирующего режима облучения семян на митотическую активность клеток листовой меристемы родительских форм и гибрида в ранний период вегетации показало, что стимуляция митотической активности под влиянием «малой» дозы радиации больше выражена в меристеме линий, для которых был характерен самый низкий ее показатель в норме. У гибрида, чей естественный уровень пролиферации клеток был высоким, стимуляционный эффект адаптирующего режима был выражен в наименьшей мере. В меристеме гибрида сильнее, чем у родительских линий, происходило угнетение способности клеток к пролиферации под влиянием высокой, повреждающей, дозы радиации. В меристеме родительских линий уровень митотической активности при облучении высокой дозой радиации достоверно не отличался от контроля.

Превышение показателей митотической активности клеток меристемы листьев после предоблучения семян линий и гибрида одним и двумя физическими факторами свидетельствовало о формировании радиоадаптивного ответа, но степень выраженности феномена была разной и зависела от генотипа. Максимальное проявление радиоадаптивного ответа в ранний период вегетации наблюдали у инбредных линий, что было следствием значительной стимуляции митотической активности под воздействием адаптирующей дозы. Радиоадаптивный ответ клеток гибрида, у которого стимуляционный эффект адаптирующего режима был выражен в наименьшей мере, проявлялся лишь как тенденция.

Изменение уровня митотической активности меристемы листьев в онтогенезе растений состояло в снижении пролиферативной способности клеток листьев в поздний период вегетации по сравнению с его ранним этапом в 2 раза, что согласуется с положениями адапционно-регуляторной теории старения (Фролькіс, 1999). В поздний период вегетации стимуляционный эффект адаптирующей дозы сохранялся у всех форм и максимально был выражен у гибрида. Проявление индуцированного адаптивного ответа к радиации инбредных растений в поздний период вегетации сохранялось. У гибрида также формировался радиоадаптивный ответ, причем в большей мере после совместного предоблучения гамма-радиацией и радиоволнами. Защитный эффект комбинированного адаптирующего предоблучения у гибрида отмечали и в более поздние сроки онтогенеза, в генеративную фазу развития растений по увеличенным на 40 и 70% диаметрам соцветий. По-видимому, мм-волны, как радиопротектор (Галат, Межевикина, 1999), усиливали положительный эффект малой дозы предоблучения 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, тогда как в меристеме корней проростков такие клетки были. Это может свидетельствовать об оздоровлении клеточной популяции в онтогенезе растений, элиминации поврежденных клеток и размножении неповрежденных.

Таким образом, показано, что индуцированный радиоадаптивный ответ на ранних этапах роста растений по показателям уровня митотической активности способен сохраняться в онтогенезе и проявляться в течение всего периода вегетации. Результаты исследований позволили прийти к заключению, что обязательным условием формирования радиоадаптивного ответа является повышенная интенсивность размножения клеток. В то же время механизмы повышения митотической активности линий и гибридов различны – у первых стимуляция пролиферации вызывается воздействием на семена адаптирующих режимов гамма-радиации и радиоволн мм-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 радиационной адаптации и в стимулированном тканевом репопуляционном восстановлении растений.

Таким образом, благодаря существующей возможности проведения полевых исследований на Северско-Донецкой биологической станции им. проф. В.М.Арнольди сотрудниками лаборатории цитофизиологии и цитогенетики растений под руководством профессора Н.Г.Шестопаловой были получены путем радиационного мутагенеза новые формы тритикале и озимой ржи, изучено проявление в онтогенезе растений таких важных биологических явлений, как гетерозис, суточная ритмика пролиферации клеток, установлен факт наследования проявлений радиационной адаптации в поколениях растений.

Список литературы

- Баева Т.І. Добова кінетика проліферативної активності меристеми вихідних форм та гібридів рослин з різним ступенем прояву гетерозису. Зв'язок мітотичного потенціалу з врожайністю. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Х., 1996. – 18с.
- Баева О.Ю. Індукція і прояв радіоадаптивної відповіді клітин інбредних та гетерозисних рослин *Helianthus annuus* L. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Х., 2008. – 20с.
- Винокурова Л.В. Генетичні і цитологічні прояви реакції тритікале ті його вихідних форм на гамма-опромінювання повітряно-сухого насіння. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Х., 1996. – 18с.
- Галат В.В., Межевикина Л.М. Действие миллиметровых волн на раннее развитие зародышей мышей и морских ежей // Биофизика. – 1999. – Т.44, вып.1. – С. 157–140.
- Долгова Т.А. Індукція і прояв радіоадаптивної відповіді у поколіннях рослин з різним генотипом. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 2004. – 22с.
- Толстоплет Е.В. Цитофизиологические и цитогенетические проявления естественного старения семян в зависимости от генотипа и условий хранения генофонда сельскохозяйственных культур. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Х., 1994. – 18с.
- Фролькіс В.В. Геронтологія: прогнози і гіпотези // Вісник НАН України. – 1999. – №7. – С. 28–40.
- Шестопалова Н.Г. Репродукция клеток при гетерозисе. – Х.: Вища школа. Издательство при Харьковском университете, 1981. – 84с.
- Шестопалова Н.Г., Баева Е.Ю. Радиоадаптивный ответ клеток листовой меристемы инбредных линий и гетерозисных растений *Helianthus annuus* L. в период раннего и позднего онтогенеза // Цитология и генетика. – 2007. – Т.44, №6. – С. 44–49.
- Шестопалова Н.Г., Баева Т.И., Головина Л.Н. и др. Реакция растений на действие радиоволн мм-диапазона // VII семинар по применению мм излучений низкой интенсивности в биологии и медицине. Тез. докл. – Звенигород, 1989. – С.124.
- Шестопалова Н.Г., Баева Т.И., Белецкая Н.Е. Способ определения гетерозисного эффекта у гибридов первого поколения озимой ржи. А.с. 1540740. СССР. А01Н1/04. Оpubл. 07.02.90. Бюл. №5.
- Шестопалова Н.Г., Головина Л.Н., Корнеев В.А. и др. Способ предпосевной обработки семян для синхронизации клеточных делений зародышевой меристемы зерновых культур: А.с. 1692408 СССР. Оpubл. 23.11.91. Бюл. №43.
- Шестопалова Н.Г., Матюшенко А.А., Винокурова Л.В. Способ получения измененных форм озимой ржи. А.с. №1543577. СССР. Оpubл. 02.07.90. Бюл.№5.

Представлено: **В.М.Попов** / Presented by: **V.M.Popov**
Рецензент: **А.В.Некрасова** / Reviewer: **A.V.Nekrasova**
Подано до редакції / Received: 01.04.2014