

Хелья РАУК

К ВОПРОСУ О СВЯЗИ РАДИО- И ХЕМОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ С НЕКОТОРЫМИ КЛЕТОЧНЫМИ ПАРАМЕТРАМИ

В настоящее время вполне ясно, что радиобиологический эффект при облучении растительного организма складывается под влиянием многих факторов, одновременно или поэтапно действующих в облученном организме. Некоторые из этих факторов усиливают проявление радиобиологических эффектов. К таким (увеличивающим радиочувствительность растений) относятся, например, высокий уровень предшественников радиотоксинов и высокая активность окислительных систем, а также сравнительно большой объем хромосомной мишени. Другие факторы, в частности высокая активность репарирующих ферментов и наличие эндогенных защитных веществ, а также избыточность генов, увеличивают радиоустойчивость и препятствуют развитию радиационного поражения в облученных растениях.

Таким образом, радиоустойчивость растений следует рассматривать как явление системное. В этом отражаются многие процессы, свойственные разным уровням организации растений. Лучевая реакция начинается с отклонений в молекулярных реакциях, далее проявляется в нарушении процессов самосборки структур клеток и нарушении регуляции клеточных процессов, онтогенеза, межклеточных взаимодействий и в инактивации клеток (Кузин, 1970, 1979; Гродзинский, 1979). Модифицирующие воздействия возможны на каждом из уровней развития лучевой реакции (Ogav, 1965). Радиоустойчивость растений в конечном счете определяется различным сочетанием указанных выше процессов.

Из сказанного следует, насколько сложно формирование радиационного поражения. В течение последних трех десятилетий в литературе опубликованы результаты многочисленных исследований, в которых сделаны попытки обнаружить какие-либо закономерности, позволяющие прогнозировать радиоустойчивость или конкретного вида, или больших систематических групп растений. Связь между радиоустойчивостью растений и их филогенезом анализируется в работах Е. И. Преображенской (1967, 1969, 1979 и др.). Большую радиоустойчивость показывают эволюционно-продвинутые таксоны по сравнению с таксонами, стоящими в основании филогенетического дерева. Для эволюционно-продвинутых таксонов характерно большее содержание в семенах общего азота, сырого белка и низкомолекулярных легкорастворимых форм белка. Таким образом, у высших растений определенную роль в радиоустойчивости играет эволюция белкового обмена.

В поисках возможно точной и при этом простой модели для предсказания радиоустойчивости (-чувствительности) на уровне вида многие исследователи уделяли внимание в основном некоторым клеточным параметрам, в частности размерам ядер и интерфазных хромосом как «чувствительного объема», мишени клетки. Среди многих биологических особенностей, повышающих радиочувствительность растений, таких как одноядерность клеток, большое клеточное ядро и высокое содержание ДНК в ядре, высокое ядерно-плазменное отношение, боль-

шие хромосомы и небольшое их число, низкий уровень плоидности, низкое содержание радиозащитных веществ, многие исследователи считали самыми существенными именно объемы клеточного ядра и хромосом.

Данные о связи радиочувствительности растений с размерами хромосом начали поступать в 50-х годах из лаборатории А. Спэрроу в США. Обобщив материалы более ранних исследований, А. Спэрроу и его сотрудники пришли к выводу, что особенно чувствительны к облучению виды с крупными хромосомами (Sparrow, Christensen, 1953; Sparrow, Gupckel, 1956 и др.). В качестве сравнительного критерия в этих работах принимался «средний условный объем интерфазных хромосом», т. е. объем интерфазного ядра в меристеме корней, деленный на соматическое число хромосом ($2n$) данного вида.

В опытах по хроническому гамма-облучению ряда культурных растений из разных семейств Н. Ньюбом (1957) установил такую же последовательность распределения видов по радиочувствительности. Виды с крупными хромосомами (*Lilium*, *Tradescantia* и др.) оказались значительно более чувствительными к облучению, чем виды с мелкими хромосомами (*Linum*, *Sinapis* и др.). Исследования в этом направлении интенсивно продолжались в 60-х годах (обзор см. Орав и др., 1972). Накопившийся к этому времени материал о связи радиоустойчивости растений с объемом ядер и интерфазных хромосом, а также собственные результаты изучения этой связи на 12 видах растений позволили А. Лундену и Т. Осборну (Lunden, 1964; Osborne, Lunden, 1964) предложить простую модель для предсказания радиочувствительности на уровне вида. Для вычисления дозы, подавляющей прирост сухого вещества на 50% (50%-ная доза подавления) надо знать лишь средний объем ядра:

$$\text{50\%-ная доза подавления} = \frac{(10,14 \pm 1,17) \cdot 10^6}{\text{средний объем ядра (мкм}^3\text{)}}$$

Большинство работ по изучению коррелятивных связей между клеточными параметрами и радиочувствительностью проведено на травянистых растениях. Однако существование такой корреляции установлено и на древесных растениях — как у покрытосеменных, так и у голосеменных форм (Capella, Conger, 1967; Sparrow и др., 1968).

При изучении устойчивости клеток и организмов к ионизирующим излучениям одним из наиболее интересных вопросов является зависимость радиочувствительности от степени плоидности клеток. В основном на сельскохозяйственных культурах, таких как пшеница, ячмень, рис, гречиха и др., было показано, что с увеличением степени плоидности уменьшается индуцируемая излучениями летальность (Swaminathan, Prabkaha, 1960; Matsumura, 1961, 1964, 1966 и др.). Цитогенетические исследования показали, что в клетках полиплоидных организмов в результате облучения возникает больше перестроек хромосом, чем в тканях диплоидных форм. Был сделан вывод, что защитный эффект полиплоидности заключается в том, что при наличии дополнительных хромосомных наборов повреждения отдельных хромосом дают меньший фенотипический эффект. Тем же объясняется и меньшее число мутаций в потомстве облученных полиплоидов.

Интересные данные получены на плазмодиях слизистых грибов. Изучение влияния УФ-облучения на одноядерные миксоамебы показало, что при использовании гаплоидной линии и диплоидных и тетраплоидных клонов резистентность к облучению возрастает прямо пропорционально с увеличением уровня плоидности (Mulleavy, Evans, 1980). Все же следует заключить, что определенного мнения относительно роли числа наборов хромосом, особенно в пределах одного

рода, в радиационном поражении растительных организмов пока не сложилось. Получено много противоречивых данных, которые свидетельствуют об отсутствии прямой зависимости радиоустойчивости от плоидности (Boга, 1958; Saric, 1961; Володин, 1967 и др.).

Начиная с 1967 г. опыты по изучению зависимости радиоустойчивости от параметров клеточного ядра проводятся и в Институте экспериментальной биологии АН ЭССР. На первом этапе работы пришлось решить некоторые методические вопросы: 1) подбор наиболее адекватного ядерного фиксатора — таковыми среди шести изученных оказались жидкость Ньюкомера и ацеталкоголь (Кальюсте, 1968); 2) экспериментальная разработка методики измерений на постоянных и давленных ацетоорсеиновых препаратах, в частности вывод формул для разных типов ядер при определении их объема на основе двух перпендикулярных друг к другу диаметров. Методические опыты проводились на разных сортах пшеницы. Впоследствии было проведено три серии опытов. Первые эксперименты по изучению зависимости между радиоустойчивостью и количественными параметрами клетки были проведены на яровом рапсе и ячмене с целью проверки вышеприведенной формулы Лундена. В качестве показателя чувствительного объема применялся средний объем условной интерфазной хромосомы. Результаты опыта дали вполне удовлетворительное совпадение с вычисленными на основе предложенной А. Лунденом формулы значениями, однако показали и значительное варьирование степени радиационного поражения в зависимости от условий выращивания, особенно в полевых опытах (Орав и др., 1967).

Для дальнейших экспериментов была избрана группа объектов, генетически близких, но имеющих разную степень плоидности, разные размеры ядер и хромосом и значительно различающуюся радиоустойчивость. Такими оказались виды и разновидности полиплоидного ряда пшениц. В опыте изучались радиоустойчивость и клеточные параметры — объемы ядра и клетки, условный объем хромосом и плазменно-ядерные отношения — 16 форм пшениц, относящихся к 14 разновидностям 8 видов (Кальюсте, 1972). Определение радиоустойчивости проводили в вегетационных опытах (дозы облучения (гамма-лучи) от 10 до 35 кР с интервалами 5 кР), и ЛД₅₀ выводили путем экстраполяции.

Результаты изучения диплоидных пшениц (*T. monococcum*) показали, что между ними имеются весьма значительные различия в радиочувствительности. Изученные формы *T. monococcum* — две формы var. *flavescens* разного происхождения и одна var. *laetissimum* — показали четкую зависимость радиочувствительности от объема ядра. Среди тетраплоидных пшениц радиоустойчивость изученных форм *T. dicoccum* варьирует меньше, средняя ЛД₅₀ вида практически совпадает со средней ЛД₅₀ всей тетраплоидной группы, если в эту группу не включать *T. timopheevi*. ЛД₅₀ представителя этого вида (var. *viticulosum*) была около 35 кР. И по данным других авторов, этот вид занимает среди пшениц особое место как по высокому иммунитету и другим особенностям, так и по плохой скрещиваемости с другими видами пшениц.

При близких размерах хромосом формы *T. carthlicum* обладают весьма большими различиями в радиочувствительности — 26 и 12 кР. Примерно равны и имеют одно и то же направление эти различия у разновидностей вида *T. durum* — *melanopus* и *candicans*. Только у этого вида среди тетраплоидов имеется пропорциональная зависимость радиоустойчивости (ЛД₅₀) от среднего объема интерфазной хромосомы. У гексаплоидных видов и разновидностей картина исследуемых нами явлений самая разнообразная. У форм вида *sphaerococcum* с

близкими размерами хромосом имеются значительные различия по ЛД₅₀. На равном с ними уровне радиостойчивости находится *T. spelta* (var. *coeruleum*), имеющая значительно более мелкие хромосомы.

С целью установить наличие (или отсутствие) коррелятивных связей между радиочувствительностью и размерами хромосом и ядер представляло интерес сопоставление этих показателей. Были определены коэффициенты корреляции между средними объемами интерфазных хромосом и плазмменно-ядерным отношением, с одной стороны, и показателями радиационного поражения, с другой. Существенные корреляции между средними объемами хромосом и показателями радиочувствительности имели место на диплоидном уровне (объем хромосомы и ЛД₅₀ —0,976; объем хромосомы и процент аберраций 0,936 при дозе 10 кР и 0,977 при дозе 25 кР; объем хромосомы и процент всхожести при всех дозах облучения показал отрицательную корреляцию не ниже —0,891). Наличие отрицательной корреляционной связи между средним условным объемом хромосомы и такими показателями радиочувствительности, как ЛД₅₀ и процент всхожести облученных семян говорит о том, что диплоидные формы пшеницы с более крупными хромосомами действительно чувствительнее, чем формы с меньшими размерами хромосом.

На тетраплоидном уровне не установлено зависимости радиочувствительности от среднего объема интерфазного ядра. Различия в средних объемах хромосом в этой группе весьма небольшие, что затрудняет выявление корреляционных зависимостей. Четкой связи между радиочувствительностью и объемом хромосомы не наблюдалось также в группе гексаплоидных пшениц. У *T. sphaerococcum* две разновидности — *rubiginosum* и *globosum*, по нашим измерениям, имели одинаковый объем хромосомы (~38 мкм³), однако по радиочувствительности они весьма сильно отличались друг от друга (ЛД₅₀ соответственно 18 и 30 кР). У разновидности *tumidum*, имеющей наибольший объем хромосомы (~42 мкм³), ЛД₅₀ оказалась средней (~23 кР).

Между плазмменно-ядерными отношениями и показателями радиационного поражения существенные корреляции также имели место только на диплоидном уровне (плазмменно-ядерное отношение и ЛД₅₀ —0,996; плазмменно-ядерное отношение и процент ана- и телофазных нарушений 0,937 при 25 кР). На полиплоидном уровне корреляции не наблюдались.

Таким образом, результаты наших опытов подтверждают правильность физиологического, структурно-метаболического подхода к радиационному поражению. Сравнительно простые и генетически близкие геномы разновидностей *T. monococcum*, у которых можно предполагать сходную картину клеточного метаболизма вообще и образование токсических продуктов под действием облучения в частности, и которые при этом имеют различающиеся объемы клеточных ядер, показывают зависимость радиобиологических эффектов от объема ядерной мишени. Такая зависимость исчезает с усложнением генома при увеличении плоидности и прибавлении новых исходных геномов.

В свете результатов вышеописанных опытов представляло интерес сравнение радио- и хемочувствительности диплоидной и аутотетраплоидной гречихи, семена которых были получены от В. В. Сахарова. В опыте применялись стареющие (8-летние) и свежерепродуцированные семена. Семена подвергали или гамма-облучению (дозы 4 и 8 кР), или обработке диметилсульфатом (ДМС) (концентрации 0,005 и 0,02%), или же комбинированной обработке ДМС после гамма-облучения дозой 4 кР.

Результаты опыта по критерию всхожести семян приведены в

Таблица 1

Процент всходов у ди- и тетраплоидной гречихи на восьмой день прорастания после облучения и (или) обработки диметилсульфатом

Примененное воздействие	Диплоидные семена		Тетраплоидные семена	
	Стареющие	Свежие	Стареющие	Свежие
Облучение 4 кР	20	88	41	81
Облучение 8 кР	23	89	47	85
ДМС 0,005%	10	90	12	86
ДМС 0,02%	0	89	7	79
4 кР + ДМС 0,005%	7	95	15	81
4 кР + ДМС 0,02%	3	78	11	93
Контроль	7	88	43	79

Таблица 2

Количественные характеристики клеток ди- и аутотетраплоидной гречихи

Показатель	Степень плоидности		Отношение 2 n/4 n
	2 n	4 n	
Средний объем клетки	3712±67,7	5752±106	1,00/1,55
Средний объем ядра	946±18,2	1577±22,4	1,00/1,67
Средний объем интерфазной хромосомы	59,1±1,14	49,3±0,70	1,00/0,83

табл. 1. По поведению контрольных семян видно, что всхожесть за 8 лет сильно снижается. Как было показано уже В. В. Сахаровым, у тетраплоида снижение всхожести происходит значительно медленнее. В то же время всхожесть свежеразмноженных семян у тетраплоидной гречихи несколько ниже, чем у диплоидной формы. Интересно отметить, что на диплоидные стареющие семена облучение оказывает статистически доказанное стимулирующее действие. Картина подавления всхожести по мутагенным воздействиям у стареющих семян аналогична картине у ди- и тетраплоида.

Обработка ДМС оказала подавляющее действие на прорастание стареющих семян, также как и комбинированная обработка, при этом эффекты комбинированной обработки были близки к эффектам обработки ДМС.

Цитологическими исследованиями показано, что хромосомный аппарат тетраплоидной гречихи вполне стабилизировался в результате продолжительного отбора на фертильность, и хромосомных аномалий не наблюдается. В ходе стабилизации тетраплоидного ядра происходила более плотная упаковка ядерного материала. Средний объем интерфазного тетраплоидного ядра в корневой меристеме, по нашим измерениям (табл. 2), составляет 167% объема диплоидного ядра, т. е. он значительно меньше ожидаемого двойного объема. В связи с этим средний условный объем интерфазной хромосомы тетраплоидной гречихи составляет 83% объема хромосомы диплоидной формы. Объем тетраплоидной клетки превышает объем диплоидной на 55%. Таким образом, размеры чувствительных объемов у тетраплоидной гречихи значительно меньше, чем у диплоидной.

Результаты опыта с гречихой ввиду ограниченного объема и невы-

соких доз облучения, обусловленных присутствием стареющих семян, с точки зрения сравнения радиоустойчивости диплоидной и тетраплоидной форм малоинформативны. Однако, результаты сравнения параметров ди- и тетраплоидного ядра служат косвенным доказательством того, что относительная защищенность полиплоидной хромосомы может быть основана на ее более плотной упаковке.

В итоге можно сказать, что величина ядер и средний условный объем хромосомы играют некоторую роль в генетической детерминации радиоустойчивости у растений. Однако при применении ядерных количественных показателей для приблизительной оценки радиочувствительности любой конкретной формы или вида следует учесть, что при сложных геномах полиплоидных организмов могут оказаться решающими другие детерминирующие факторы и сложные взаимоотношения между ними. В таких случаях ориентировочные оценки радиоустойчивости могут оказаться неправильными.

ЛИТЕРАТУРА

- Володин В. Г. Сравнительное изучение радиочувствительности и мутационной изменчивости полиплоидного ряда пшениц. — В кн.: Экспериментальный мутагенез. Минск, 1967, 88—100.
- Гродзинский Д. М. Системный характер радиоустойчивости растений. — Информ. бюл. Научного совета по проблемам радиобиологии АН СССР, 1979, 22, 80—81.
- Кальюсте Х. А. Сравнительное изучение размеров клеточных ядер двух сортов озимой пшеницы при использовании разных фиксаторов. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1968, 17, 15—19.
- Кальюсте Х. А. О радиочувствительности полиплоидного ряда пшениц в связи с количественными показателями меристематических клеток. — В кн.: Индуцированный мутагенез у растений. Таллин, 1972, 188—197.
- Кузин А. М. Структурно-метаболическая гипотеза в радиобиологии. М., 1970.
- Кузин А. М. Проблема радиочувствительности растений. — Информ. бюл. Научного совета по проблемам радиобиологии АН СССР, 1979, 22, 78—80.
- Ньюбом Н. Дополнительные опыты по изучению действия на растения хронического гамма-облучения. — В кн.: Радиоактивные излучения и селекция растений. М., 1957, 75—87.
- Орав Т. А., Шангин-Березовский Г. Н., Орав И. С. Радиационный мутагенез и модифицирующие его условия. Таллин, 1972.
- Орав Т. А., Шнайдер Т. М., Кальюсте Х. А., Орав И. С. О количественной модели радиочувствительности растений. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1967, 16, 150—156.
- Преображенская Е. И. Связь радиоустойчивости растений с филогенетическим возрастом. — Изв. СО АН СССР. Сер. биол.-мед. наук, 1967, 5, 79—84.
- Преображенская Е. И. Радиочувствительность рода *Triticum*. — В кн.: Радиационная биофизика и радиобиология растений. Л., 1969, 139—142.
- Преображенская Е. И. Закономерности радиоустойчивости высших растений и растений. Ташкент, 1979, 214—216.
- Voга, K. C. Comparative effects of varying doses of X-rays and fast neutrons on the growth, development and induction of cytological changes in tetraploid and hexaploid wheat. — Proc. Int. Conf. on Peaceful Uses of Atomic Energy, 1958, 27, 314—320.
- Capella, J. A., Conger, A. D. Radiosensitivity and interphase chromosome volume in the Gymnosperms. — Rad. Bot., 1967, 7, 137—149.
- Lunden, A. O. Seed embryo features and irradiation response. — Rad. Bot., 1964, 4, 429—437.
- Matsumura, S. Radiation genetics in wheat. VI. Biological effects of thermal and fast neutrons on diploid wheat. — Jap. J. Genet., 1961, 39, 86—90.
- Matsumura, S. Relation between polyploidy and effects of gamma- and neutron-radiation on wheat. — Wheat Inform. Serv., Kyoto, 1964, 17—18, 36—38.
- Matsumura, S. Radiation genetics in wheat. IX. Differences in effects of gamma-rays and 14 MeV, fission and fast neutrons from Po-Be. — Rad. Bot., 1966, 6, 275—283.
- Mulleavy, P., Evans, T. E. Construction and radiation sensitivity of an isogenic ploidal series of *Physarum polycephalum*. — Rad. Res., 1980, 2, 387—388.
- Орав, Т. Välikseskkonna mõjust mutageneesi hilisele etapile. — ENSV TA Toimet. Biol., 1965, 14, 462—470.

- Osborne, T. S., Lunden, A. O. Seed radiosensitivity: a new constant? — *Science*, 1964, **145**, 3633, 710—711.
- Saric, M. The effects of irradiation in relation to the biological traits of the seed irradiated. — In: *Effects of ionizing radiation on seeds*. 1961, Vienna, 103—116.
- Sparrow, A. H., Christensen, E. Tolerance of certain higher plants to chronic exposure to gamma-radiation from cobalt-60. — *Science*, 1953, **118**, 697—698.
- Sparrow, A. H., Gunckel, J. E. The effects on plants of chronic exposure to gamma-radiation from radiocobalt. — *Proc. 1st Int. Conf. on Peaceful Uses of Atomic Energy*, 1956, **12**, 52—59.
- Sparrow, A. H., Rogers, A. F., Schwemmer, S. S. Radiosensitivity studies with woody plants. I. Acute gamma irradiation survival data for 28 species and predictions for 190 species. — *Rad. Bot.*, 1968, **8**, 149—186.
- Swaminathan, M. S., Prabhakara, M. V. Frequency of mutations induced by radiations in hexaploid species of *Triticum*. — *Science*, 1960, **132**, 3442, 1842.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
3/VI 1981

Helja RAUK

TAIMEDE RESISTENTSUS KIIRGUSTE JA KEEMILISTE MUTAGEENIDE SUHTES NING SELLE SEOSSED MÖNEDE RAKUPARAMEETRIEGA

Artiklis on käsitletud taimede kiirgusresistentsusega seotud probleeme, eriti kiirgustundlikkuse prognoosimise võimalusi. Lähemalt on vaadeldud kiirgustundlikkuse sõltuvust rakkude ploidsusastmest ning rakutuuma suurusest ja kromosoomide keskmisest tinglikust mahust (nisu polüploidse rea näitel). Kiirguskahjustuse astme sõltuvust rakutuuma ja kromosoomi mahust täheldati ainult diploidsete nisude suhteliselt lihtsate genoomide puhul. Diploidse ja autotetraploidse tatra resistentsus gammakiirguse ja keemilise mutageeni dimetüülsulfaadi ning nende koosmõju suhtes sõltus ploidsusastmest suhteliselt vähe. Suuri erinevusi täheldati aga di- ja tetraploidsete tatrasedemete vananemises.

Helja RAUK

ON THE PLANT TOLERANCE TO RADIATION AND CHEMICAL MUTAGENS IN CONNECTION WITH SOME CELL PARAMETERS

In the paper, the problems of the radiotolerance of plants have been dealt with, and attempts have been made to find possibilities for predicting the radiosensitivity of plants. The dependence of radiosensitivity on the ploidy level as well as the nuclear and chromosome volumes of a polyploid series of wheat has been described. The degree of radiation damage depended on the nuclear volume only on the diploid level. The tolerance of diploid and autotetraploid buckwheat to gamma-radiation and dimethylsulphate did not depend on the level of ploidy. Significant differences were observed in the ageing of di- and tetraploid seeds of buckwheat.