

Т. ОРАВ, Т. ШНАЙДЕР

О ВЫСОКОЙ УСТОЙЧИВОСТИ РАПСА К РАЗЛИЧНЫМ МУТАГЕННЫМ АГЕНТАМ И ВОЗМОЖНЫХ ЕЕ ПРИЧИНАХ

Изучение радиочувствительности находится в центре внимания современной радио-биологии. «Понять причины, благодаря которым живая клетка, ткань или многоклеточный организм... погибает, — это значит понять основной механизм биологического действия радиации» (Кузин, 1965, стр. 11).

Проблема радиочувствительности содержит несколько аспектов, изучение которых нередко требует различного методического подхода. Радиочувствительность растений, как и всех живых организмов, определяется внешними и внутренними факторами. Внешние факторы, действующие как до облучения, так и во время облучения и после него, могут иметь весьма существенное модифицирующее влияние на эффект облучения (Орав, 1962; Огав, 1965). В настоящем сообщении действие внешних факторов не рассматривается, так как облучение семян и их обработка химическими мутагенами, а также выращивание растений проводились в одинаковых условиях.

Среди внутренних факторов, определяющих степень радиочувствительности, можно выделить факторы, определяющие первоначальную реакцию на облучение, и факторы, определяющие репарационные способности. Как те, так и другие в основном имеют генетический характер. Соотношение роли той или другой группы факторов в конечном эффекте облучения, по-видимому, может быть различным, зависит от изучаемого объекта и его физиологического состояния и трудно поддается точной оценке.

Для количественного анализа зависимости видовой радиочувствительности от других морфофизиологических признаков, на наш взгляд, наибольшее значение имеют работы, связанные с установлением корреляций между радиочувствительностью и ядерными клеточными параметрами. В первую очередь мы имеем в виду исследования лаборатории А. Сперроу, а также Т. Осборна и А. Лундена. Данные этих авторов, проверенные нами на пшенице, ячмене и рапсе (Орав и др., 1967), весьма убедительно подтверждают наличие корреляции между радиочувствительностью и так наз. средним объемом хромосом (объем интерфазного ядра, деленный на соматическое число хромосом данного вида), несмотря на то что при определении этого показателя не учитывалось наличие ядрышек и различий между самими хромосомами. По А. Сперроу и др. (Sparrow A. и др., 1963), при различиях по радиочувствительности между изученными видами более чем в сотни раз, и между средними объемами хромосом — в несколько сотен раз, различия в поглощенной энергии на одну хромосо-

му при летальной дозе весьма незначительны — только в 3—4 раза. Т. Осборн и А. Лунден (Osborne, Lunden, 1964) на основании изучения 12 видов растений предлагают следующую приближенную формулу для оценки радиочувствительности: 50%-ная доза подавления прироста сухого вещества определяется (в p) формулой:
$$\frac{(10,14 \pm 1,17) \cdot 10^6}{\text{средний объем ядра (мк}^3\text{)}} \cdot$$

Как в работах Т. Осборна и А. Лундена, так и нашими опытами установлено, что рапс (*Brassica napus* L. var. *oleifera* DC., $2n=38$) имеет исключительно маленькие размеры хромосом. Согласно А. Лундену (Lunden, 1964), средний объем хромосомы рапса меньше, чем у всех изученных им видов — $3,3 \text{ мк}^3$, в наших же опытах (Орав и др., 1967) он несколько больше — $5,3 \pm 0,3 \text{ мк}^3$.

На существование корреляции между размерами хромосом и радиочувствительностью указывают также Д. Остергрэн и др. (Östergren и др., 1958). Они установили при облучении двух видов *Hyacinthus* равными дозами рентгеновых лучей, что вид *H. dalmaticus*, имеющий мелкие хромосомы, был более устойчивым к облучению, чем *H. orientalis*, хромосомы которого значительно крупнее. В работе Р. Вакониг-Ваартая (Wakonig-Vaartaja, 1963) исследовалось действие рентгеновых лучей на три пары растительных видов с одинаковым числом хромосом, но различными средними объемами ядер и хромосом (*Allium cepa* и *A. schoenoprasum*, $2n=16$; *Rhoeo discolor* и *Tradescantia paludosa*, $2n=12$; *Vicia faba* и *V. sativa*, $2n=12$). Бóльшее число анафаз с нарушениями было обнаружено у видов с бóльшими объемами ядра и хромосом. Приведенные результаты подтверждают наличие четкой взаимосвязи между степенью радиационных повреждений и средним объемом ядра и хромосомы.

На большие различия в радиочувствительности растений было обращено внимание еще в начале этого века. Так, М. Кернике (Körnigke, 1904) отмечал, что и при рентгеновском и при радиевом облучении бобы сильнее повреждаются, чем вика, и особенно рапс. Позже было установлено, что радиочувствительность связана с систематическим положением растений: очень радиоустойчивы крестоцветные, менее радиостойки — злаки, еще менее радиостойки — бобовые (Körnigke, 1905). А. Густафссон (Gustafsson, 1944) также отмечает высокую радиоустойчивость масличных крестоцветных и, по его данным, критическая доза у рапса (сорт 'Регина') выше 30 кр. На высокую радиоустойчивость крестоцветных указывает и Н. Дубинин (1961). Им приведена составленная С. Вальной сводная таблица радиочувствительности культур, согласно которой величина критической дозы (D_{L70}) у рапса сорта 'Носовский 9' — 100 кр (определение Е. Преображенской). По данным Б. Авраменко (1967), полудетальная доза для ярового рапса сорта 'Носовский 9' — около 100 кр, а критическая — около 150 кр, что больше соответствует нашим данным, полученным на сорте 'Регина II'.

Е. Преображенская (1967) приводит список 19 родов крестоцветных, расположенных по их радиоустойчивости. Среди форм этого наиболее устойчивого семейства род *Brassica* занимает третье место после *Raphanus* и *Lepidium*.

В наших полевых опытах 1964—1967 гг. по облучению сухих семян ярового рапса 'Регина II' гамма-лучами ^{60}Co в дозах 1, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 70, 80, 90, 100 и 110 кр подавление роста наблюдалось в M_1 , начиная с дозы 30 кр. Данные фенологических наблюдений показывают, что цветение растений в вариантах облучения 1—20 кр началось почти одновременно с контролем, при дозе 30 кр — позже на 4—5 дней, а при дозах 50—

110 кр — на 6—8 дней позже, чем в контроле. Выживаемость растений в опытах 1964 г. значительно снижалась начиная с 30 кр, ЛД₇₀ была около 100 кр. В дополнительном вегетационном опыте, проведенном в 1967 г., критическая доза была еще выше (ЛД₇₀ ≥ 200 кр). В вариантах облучения 90—110 кр у растений отмечались хлорофильные нарушения — пятнистость листьев, асимметричность листьев и цветков, фациация и искривление стеблей. Все нарушения носили характер морфозов и не передавались по наследству. Следует отметить, что высокая радиоустойчивость рапса проявилась не только в небольшом числе пострadiационных повреждений, но и в незначительных генетических эффектах. В М₂ посев производили по семьям, в каждом варианте облучения было высеяно по 2000 семян. Из 24 000 растений М₂ было выделено всего 4 мутантных формы с измененной длиной вегетационного периода — две скороспелых и две позднеспелых, причем одна из последних имела интенсивную антоциановую окраску стеблей. Ни морфологических изменений, ни хлорофильных нарушений не отмечено.

Для объяснения высокой радиочувствительности рапса, связанной, по-видимому, с небольшими размерами его хромосом, необходимо коротко остановиться на самом факте существования сверхмалых хромосом. В своих обширных исследованиях А. Сперроу с сотрудниками установили наличие еще более мелких хромосом у ряда видов рода *Sedum*: *S. tricarpum*, *S. alfredi*, *S. rupifragum*. Все эти виды были в высокой степени полиплоидными ($2n=128$ или 136) и исключительно радиоустойчивыми.

Каковы возможные причины существования хромосом с такими маленькими размерами? Может быть, у данной формы объем генетической информации меньше и, в связи с этим, меньше ДНК? Такая возможность не исключена, хотя доказательств в пользу этого предположения еще нет. Трудно также представить себе, что у одного вида «информативные способности» ДНК выше, чем у другого. Нам кажется более вероятным другое объяснение — существование различий в пространственной конфигурации ДНП, в его более плотной «упаковке» уменьшающей чувствительные объемы в ядре клетки. В пользу этого говорит ряд косвенных доказательств:

1. Изменения объема ядер в онтогенезе в зависимости от физиологического состояния организма, сопровождающиеся изменением радиочувствительности. Наиболее наглядно это показали Дж. Вант-Хоф и А. Сперроу (Van't Hof, Sparrow, 1965) на клетках воздушных корешков *Tradescantia paludosa*, у которых объемы ядер покоящихся и активно растущих клеток значительно различались (соответственно 491 и 733 мк³), однако количества поглощенной энергии при дозе, подавляющей линейный рост на 37%, были близки (8600 и 7750 кэв); Р. Библи и К. Хофер (Biebl, Hofer, 1966) отмечают существование суточного и годового ритма в изменении объема клеточных ядер в эпидермисе лука и листочках мха, в зависимости от которого изменялась и радиочувствительность.

2. С. Нирула (Nirula, 1963) на примере трех видов *Sorghum* показал, что изменение объема ядер и суммарной длины хромосом не всегда коррелирует с изменением количества ДНК в ядре.

3. С. Ленерт и С. Окада (Lehnert, Okada, 1963) изучали изменение специфической активности синтеза ДНК различных фракций, выделенных из печени крысы через 24 ч после облучения рентгеновыми лучами (доза 800 р). В их опытах активность самих ядер составила 32—35% от активности необлученных ядер, активность фракции ДНК, связанной с гистоном — 25—54%, активность фракции ДНК с остаточным (нера-

створимый) белком — 26—54%, а активность чистой ДНК после облучения была примерно на уровне контроля. Критерий активности — включение ^3H -тимидина. Тот факт, что вызванное облучением снижение синтетической активности ДНК исчезает, когда ДНК освобождена от остаточного белка, говорит весьма убедительно о существенной роли целостного нуклеопротейда в формировании радиационного поражения.

Установлено также (Лебедева и др., 1966), что радиотоксины из облученных растений способны активно связываться с нуклеопротейдами ядра. При этом существенное значение имеет величина площади площади хромосомы, на которой происходит комплексообразование.

Пространственная конфигурация нуклеопротейда должна играть роль и в ответной реакции на химические воздействия, в частности на физиологическую и генетическую устойчивость к алкилирующим мутагенам. Более плотной «упаковке» и в этом случае отведена защитная роль. Такое предположение подтвердили наши опыты в Институте экспериментальной биологии и на Йыгеваской селекционной станции с 30 сортами различных видов культурных растений, семена которых были обработаны нитрозэтилмочевинной (НЭМ) и нитрозометилмочевинной (НММ) разных концентраций и некоторыми другими химическими мутагенами. Среди всех изученных видов наиболее устойчивым оказался рапс. Сорт 'Регина II' в M_1 реагировал слабым торможением роста на концентрации НММ 1:4000 и 1:8000, при воздействии НЭМ (концентрации 1:2000 и 1:4000, обработка в течение 24 ч) не наблюдалось физиологической реакции. Более сильная реакция на указанные мутагены отмечена у озимого сорта 'Немерчанский I', у которого при обработке семян раствором НММ (1:4000) рост растений подавлялся на 20—30% по сравнению с контролем. В M_2 наследственных изменений не обнаружено.

В 1966 г. семена трех сортов ярового рапса 'Регина II', 'Носовский 9' и 'Итальянский' обрабатывались раствором полиалкилирующего химического мутагена, по эффективности примерно равного НЭМ, при концентрации 1:2000. Растения M_1 не отличались от контрольных ни по скорости роста, ни по темпам развития. В M_1 у сорта 'Носовский 9' были выделены два растения озимого типа, у которых свойство озимости сохранилось и в M_2 . В M_2 было высеяно по 680 семей (примерно по 23 800 растений) каждого сорта. У сорта 'Итальянский' в M_2 отмечено пять семей, все растения которых развивались как озимые. Таким образом, мутагены, исключительно эффективные у большинства других культур, оказались весьма малоэффективными при воздействии на рапс.

Вопрос о репаративных способностях рапса представляет большой интерес и будет обсуждаться нами после окончания опытов по фракционированному облучению семян и изучению зависимости эффекта радиации от мощности дозы.

На основании вышеизложенного можно высказать предположение о существовании у рапса общей резистентности к сильнодействующим внешним факторам, обладающим мутагенным действием. Это предположение не противоречит генетической обусловленности радиочувствительности, так как действие самих генов может реализоваться через конфигурацию ДНП. Наследственные факторы, имеющие отношение к определению радиочувствительности, могут также реализоваться через химический состав цитоплазмы и связанные с физиологическими процессами клетки репарационные процессы.

Выводы

1. Из данных литературы известно, что рапс, как и многие другие масличные крестоцветные, отличается высокой радиационной устойчивостью. Результаты наших опытов подтверждают высокую устойчивость рапса к действию ионизирующих излучений. При облучении воздушных сухих семян ярового рапса 'Регина II' гамма-лучами ^{60}Co в дозах от 1 до 110 кр только начиная с дозы 30 кр наблюдалось подавление роста, задержка в развитии растений и снижение их выживаемости по сравнению с контролем. Морфологические и хлорофильные нарушения, отмеченные у растений M_1 (дозы 90—110 кр), имели характер морфозов и не наследовались. В M_2 было получено несколько мутантных форм с измененной длиной вегетационного периода — скороспелые и позднеспелые.

2. В наших опытах установлена также высокая устойчивость рапса к действию химических мутагенов. При обработке семян рапса в течение 24 ч НЭМ (концентрации 1:2000 и 1:4000) и НММ (концентрации 1:4000 и 1:8000) в M_1 отмечены задержка роста и хлорофильные нарушения; в M_2 наследственных изменений не обнаружено. После обработки семян трех сортов ярового рапса раствором полиалкилирующего супермутагена в концентрации 1:2000 выделены озимые мутанты у сорта 'Носовский 9' в M_1 и M_2 и у сорта 'Итальянский' в M_2 .

3. Высокая устойчивость рапса к ионизирующим излучениям и химическим мутагенам дает основание говорить об общей устойчивости генетического аппарата рапса к сильнодействующим мутагенным факторам. Вполне вероятно, что высокая устойчивость рапса связана с небольшими размерами его хромосом — 3,3 мк³, по данным А. Лундена (Lunden, 1964), и 5,3 мк³, по нашим определениям (Орав и др., 1967), и это, возможно, обусловлено особенностями пространственной структуры ДНП, а именно — его более плотной «упаковкой», уменьшающей чувствительный объем в ядре клетки и играющей защитную роль.

ЛИТЕРАТУРА

- Авраменко Б. И., 1967. Радиорезистентность растений и семян семейства *Cruciferae* L. Автореф. дисс. канд. биол. н. Минск.
- Дубинин Н. П., 1961. Проблемы радиационной генетики. М.
- Кузин А. М., 1965. Современные проблемы радиобиологии. В сб.: Ионизирующие излучения в биологии: 11—19. Рига.
- Лебедева Н. Е., Вайнсон А. А., Кузин А. М., 1966. Взаимодействие хинонов с клеточными ядрами. В сб.: Радиотоксины: 51—58. М.
- Орав Т. А., 1962. О влиянии внешних условий на процессы мутагенеза. Изв. АН ЭССР, Сер. биол. 11: 150—155.
- Орав Т., Шнайдер Т., Кальюсте Х., Орав И., 1967. О количественной модели радиочувствительности растений. Изв. АН ЭССР, Биология 16: 149—156.
- Преображенская Е. И., 1967. Связь радиостойчивости растений с филогенетическим возрастом. Изв. Сиб. отд. АН СССР, Сер. биол.-мед. наук (5): 79—81.
- Biebl R., Hofer K., 1966. Tages- und Jahresperiodik der Strahlenresistenz pflanzlicher Zellen. Radiation Botany 6 (3): 225—250.
- Gustafsson Å., 1944. The X-ray resistance of dormant seeds in some agricultural plants. Hereditas 30 (1—2): 165—178. На русск. яз. в сб.: Радиоактивные излучения и селекция растений: 59—74. М., 1957.
- Körnische M., 1904. Wirkung von Röntgenstrahlen auf Keimung und Wachstum. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 22: 1141—1144.
- Körnische M., 1905. Weitere Untersuchungen über die Wirkung von Röntgen- und Radiumstrahlen auf die Pflanzen. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 23: 324—333.
- Lehnert S. M., Okada S., 1963. Nuclear factors involved in the radiation-induced depression of DNA synthesis of deoxyribonucleic acid. Nature 199 (4898): 1108.
- Lunden A. O., 1964. Seed embryo features and irradiation response. Radiat. Botany 4 (4): 429—434.

- Nirula S., 1963. Studies on some nuclear factors controlling radiation sensitivity and the induced mutation rate in eu- and parasorghum species. *Radiat. Botany* 3 (4) : 351—361.
- Orav T., 1965. Välikeskkonna mõjust mutageneesi hilisele etapile. ENSV TA Toimet., Biol. Seeria 14 (4) : 462—470.
- Osborne T., Lunden A., 1964. Seed radiosensitivity: a new constant? *Science* 145 (3633) : 710—711.
- Östergren G., Morris R., Wakonig T., 1958. A study in *Hyacinthus* on chromosome size and breakability by X-rays. *Hereditas* 44 (1) : 1—17.
- Sparrow A. H., Schairer L. A., Sparrow R., 1963. Relationship between nuclear volumes, chromosome numbers and relative radiosensitivities. *Science* 141 (3576) : 163—166.
- Van't Hof J., Sparrow A. H., 1965. Radiation effects on the growth rate and cell population kinetics of actively growing and dormant roots of *Tradescantia paludosa*. *J. Cellular Biol.* 26 (1) : 187—199.
- Wakonig-Vaartaja R., 1963. Correlation of chromosome size and radiosensitivity. *Nature* 198 (4885) : 1105—1106.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
27/XI 1967

T. ORAV, T. SNAIDER

RAPSI KÕRGEST RESISTENTSUSEST MUTAGEENSETELE FAKTORITELE JA SELLE NÄHTUSE VÕIMALIKEST PÕHJUSTEST

Resüme

Diskuteeritakse kõrgemate taimede kiirgustundlikkuse erinevate aspektide ning sise-
miste faktorite osatähtsuse üle, mis võivad määrata kiirgustundlikkuse taseme. Katsetes
kiiritati suvirapsi (*Brassica napus* L. var. *oleifera* DC.) seemneid ^{60}Co gammakiirtega
(doosid 1—110 kr) ning töödeldi alküülvivate mutageenide erinevas kontsentratsioonis
lahustega. Katsetest selgus, et raps oli kõigile kasutatud mõjutustele erakordselt vastu-
pidav. Esimeses põlvkonnas üle 30 kr kiiritamisel ja nitroosmetüülkarbamiidiga töötlemis-
el esines taimedel kasvupidurdust ning morfoloogilisi hälbeid, mis aga polnud pärili-
kud. Suures hulgas uuritud materjalis leidis ainult üksikuid mutante — hilja- ja vara-
velmivaid ning talvise kasvutüübiga. Katsetulemused ning teiste autorite andmed viisid
järeltulele, et rapsi kõrge resistentsus sõltub tema kromosoomide väikestest mõõtme-
test, mille DNP ruumiline konfiguratsioon soodustab rakutuuma «tundliku pinna»
vähenemist.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Eksperimentaalbioloogia Instituut

Saabus toimetusse
27. XI 1967

T. ORAV, T. SHNAIDER

A CONTRIBUTION TO THE POSSIBLE CAUSES OF HIGH RESISTANCE TO DIFFERENT MUTAGENIC AGENTS IN RAPE

Summary

Different aspects of radioresistance and the role of internal factors which may
determine the level of radiosensitivity in high plants have been discussed. In the
experiments designed to investigate the physiological and genetical effects of different
doses (1—110 kr) of gamma-rays ^{60}Co and different concentrations of alkylating
chemical mutagens on seeds of summer rape (*Brassica napus* L. var. *oleifera* DC.), a
very high resistance of this species to all kinds of treatments was demonstrated. The
growth depression and the morphological and physiological abnormalities observed in
 M_1 had no hereditary nature and disappeared in the following generations. Only a few
mutant forms with a changed duration of the vegetation period and winter habit of
growth were obtained. Experimental results have led us to assumptions that there are
relationships between the high resistance in rape and the small mean size of its
chromosomes and that there are differences in the spatial configuration in DNP which
may be explained by the more dense "packing", diminishing the sensitive volume in
the cell nucleus.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Experimental Biology

Received
Nov. 27, 1967