

Е.А. КРАВЕЦ, А.Н. МИХЕЕВ,
Л.Г. ОВСЯННИКОВА, Д.М. ГРОДЗИНСКИЙ
Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН
Украины, Киев
E-mail: elkra@online.ua

КРИТИЧЕСКИЙ УРОВЕНЬ РАДИАЦИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ АПИКАЛЬНОЙ МЕРИСТЕМЫ КОРНЯ И МЕХАНИЗМЫ ЕЕ ВОССТАНОВЛЕНИЯ У *PISUM SATIVUM* L.



Для определения критического уровня радиационного повреждения апикальной меристемы главного корня построены дозовые зависимости ростовых и цитогенетических параметров в диапазоне доз от 2 до 20 Гр и проанализированы причинные связи между частотой хромосомных aberrаций и гибелью ткани, органа и организма. Сопоставление частот aberrантных анафаз и поклеточного распределения aberrаций, с одной стороны, прироста массы проростков и выживаемости меристемы, с другой, позволило оценить 44–48%-ный уровень частоты aberrантных анафаз в корневой меристеме как критический. Превышение этого уровня приводит к запуску в меристеме суицидной программы через индукцию мульти-aberrантных повреждений и интерфазной гибели клеток. Предполагается, что в механизмах восстановления важную роль играет клеточная конкуренция между клонами нормальных, aberrантных с единичными перестройками и мульти-aberrантными клетками. При превышении 50%-ного уровня возможно полное или частичное восстановление апикальной меристемы корня за счет регенерации. Критическим показателем повреждения апикальной меристемы корня, при котором еще возможна его регенерация, является около 70 % хромосомных aberrаций. Однако этих локальных процессов регенерации недостаточно для восстановления морфогенеза и выживания проростков.

© Е.А. КРАВЕЦ, А.Н. МИХЕЕВ, Л.Г. ОВСЯННИКОВА,
Д.М. ГРОДЗИНСКИЙ, 2011

Введение. Радиационное повреждение апикальных меристем растения может иметь широкий диапазон последствий — от эффектов стимуляции до ингибирования и полной гибели меристемы. Проллиферативная (репродуктивная) гибель меристематических клеток как одна из составляющих этих процессов в значительной степени определяется повреждением их хромосомного аппарата, что обуславливает адекватность использования цитогенетических критериев для характеристики воздействия ионизирующей радиации на клетку [2, 3]. В основе гибели клеток обычно лежат несбалансированные перестройки — асимметричные обмены и ацентрические фрагменты [1–5]. Показано, что репродуктивная гибель aberrантных клеток происходит в течение нескольких (обычно 3–5) клеточных поколений после облучения [2, 3]. Молекулярные механизмы повреждения ДНК и хромосом достаточно полно исследованы [2, 6–8], однако немного известно о реализации первичных повреждений ДНК в хромосомные aberrации [6, 9, 10] и о механизмах восстановления на клеточном и тканевом уровнях.

Для количественной характеристики радиобиологического эффекта часто используется такой интегральный показатель, как выживаемость. Вместе с тем данные по сопоставлению результатов цитогенетического анализа и выживаемости целого организма или органа отсутствуют. Полагают, что при оценке причинной связи между частотой хромосомных aberrаций и гибелью организма возникает много дополнительных обстоятельств, усложняющих результаты такого сопоставления. В частности, это гетерогенность радиочувствительности тканей и клеток, которая обусловлена асинхронностью клеточных популяций и числом клеток, находящихся в G_1 и G_0 , выживание гамма-проростков, в основе которого лежит высокая радиоустойчивость регуляторных систем, ответственных за гомеостаз метаболизма, а также регенерационные процессы, основанные на активации центра покоя и др. [9, 10]. По этой же причине практически отсутствуют данные о пороговых значениях цитогенетического повреждения меристемы, коррелирующих с ее выживанием или гибелью, и выживанием или гибелью структур более высокого уровня организации (орган, организм). По данным Гудкова [10], критический ре-

зевр клеток апикальной меристемы корня гороха при радиационном повреждении составляет около 30 % общего числа клеток в норме, из которых около 45 % (т.е. 13 %) сохраняют способность к пролиферации. Пролиферативная активность покоящегося центра, по мнению автора, запускается при дозах от 8 Гр и выше, однако контроль уровня цитогенетического повреждения меристемы в этой работе не приводится.

Целью настоящего исследования была оценка порогового уровня радиационного повреждения апикальной меристемы, совместимого с ее выживанием и восстановительными процессами. Задачи работы состояли в анализе и сопоставлении следующих дозовых зависимостей: прирост массы проростков (вес сухой фитомассы), частота аберрантных и неаберрантных (нормальных) анафаз, поклеточное распределение aberrаций, средняя нагрузка меристематической клетки aberrациями, выживаемость меристемы и корня, а также регенерационные процессы. Предполагалось, что сопоставление указанных дозовых зависимостей позволит выявить связь в проявлении разных радиобиологических реакций и определить пороговые значения повреждения меристемы, превышение которых приводит к гибели ткани, органа или всего организма.

Материал и методы. В качестве объекта исследования использовали проростки гороха (*Pisum sativum* L., сорт Комет) в двух сериях экспериментов. Полагают, что наибольшей радиочувствительностью характеризуются двухдневные проростки гороха, ЛД₅₀ для которых составляет около 8,2 Гр [6]. В наших экспериментах трехсуточные проростки облучались в первой серии опытов на гамма-установке РОКУС при мощности облучения 1,42 сГр/с в дозах 8, 10, 13, 16 и 20 Гр, а во второй серии опытов — на рентгеновской установке РУМ-17 ($I = 10$ А; $U = 200$ кэВ) в дозах 2, 4, 6 и 8 Гр. Во избежание возможного цитостатического эффекта облучения анализ меристемы осуществляли через 48 ч после облучения. Оценивали следующие цитогенетические параметры: ЧАА (частота аберрантных ана-телофаз в процентах от 100 проанализированных), ЧНА (частота нормальных ана-телофаз), поклеточное распределение aberrаций (соотношения числа клеток

с 1, 2, 3 и множественными aberrациями в процентах к общему числу аномальных анафаз), нагрузка aberrациями aberrантной клетки (отношение суммы всех aberrаций в aberrантных клетках к числу aberrантных анафаз, Аб/АК), а также нагрузка aberrациями меристемы (отношение суммы всех aberrаций к общему числу анафаз, Аб/К). Классификацию aberrаций в анафазе проводили по следующим видам: фрагменты одинарные и парные, мосты одинарные (хроматидные) и парные (хромосомные), мосты с одинарными и парными фрагментами [2, 4]. Мультиабerrантные перестройки идентифицировались при учете более трех aberrаций на анафазу. При наличии микроядра в ана-телофазе его учитывали за одно нарушение. Указанные критерии характеризуют разные стороны и степень повреждения меристемы [11]. Объем выборки составлял 9–11 корней. На 8-е сутки определяли выживаемость меристемы (визуально по отрастанию побуревших апексов и на основании их гистологического анализа), фиксировали апексы корней и изготавливали постоянные цитологические препараты для анализа регенерационных процессов. На 8-е и 14-е сутки определяли степень развития боковых корней (число и длину) и корреляцию между развитием стебля и корня (соотношение длины стебель/корень). Давленные препараты окрашивали ацетоорсеином, постоянные — по Фельгену согласно общепринятой цитологической методике [12]. В течение двух недель культивирования определяли динамику прироста массы надземной и подземной частей проростков (сухая фитомасса). Материал статистически обработан по рекомендациям Лакина [13], а также с использованием функций программы Microsoft Excel.

Результаты исследования и их обсуждение. *Дозовые зависимости по приросту фитомассы.* В диапазоне использованных доз развитие стебля ингибировалось сильнее, чем корня (рис. 1, а–в и 2, а). При дозах свыше 6 Гр формирование стебля резко угнеталось, тормозилась прежде всего экспоненциальная фаза прироста фитомассы (рис. 1, з), основу которой у контрольных растений составляет растяжение первого междоузлия побега и закладка следующих узлов. При дозах от 8 Гр и выше

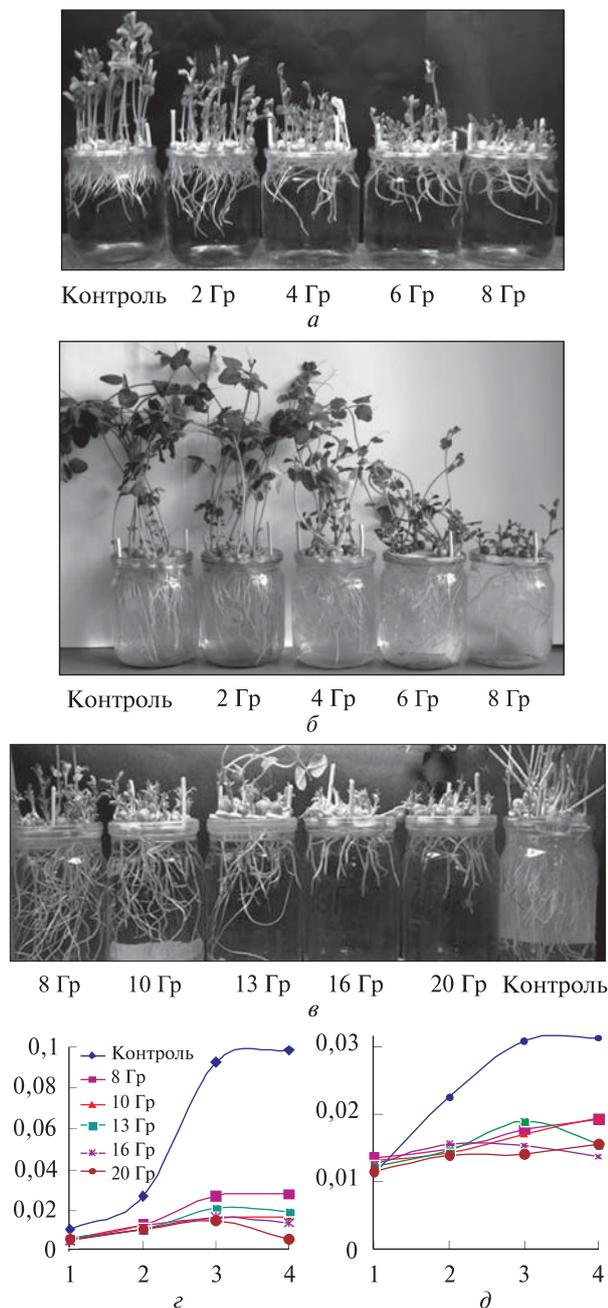


Рис. 1. Влияние разных доз острого облучения на развитие проростков: *а* – в диапазоне доз от 2 до 8 Гр 8-суточные проростки, *б* – в том же диапазоне доз 2-недельные проростки, *в* – в диапазоне от 8 до 20 Гр 2-недельные проростки, *г* – графические кривые прироста массы стебля в течение двух недель в диапазоне доз от 8 до 20 Гр, *д* – кривые прироста массы корня при тех же условиях. По вертикали – сухая масса стебля (*г*) и корня (*д*), г; по горизонтали – время выращивания в условных точках: 1 – 14.02.09; 2 – 16.02.09; 3 – 20.02.09; 4 – 23.02.09

формирование стебля практически полностью блокировалось (рис. 1, *а–г* и 2, *а*). Развитие корневой системы также тормозилось при всех использованных дозах, а от 13 Гр прирост корня останавливался (рис. 1, *а–в, д* и 2, *б*). Угнетение развития корневой системы до 8–10 Гр проявлялось в торможении, а также блокировании образования и роста боковых корней, от 10 Гр и выше – замедлении и остановке роста главного корня.

Дозовые зависимости по ЧАА и поклеточно-му распределению aberrаций. С помощью цитогенетического анализа корневой меристемы выявлена возрастающая частота хромосомных aberrаций от 27 % (при 2 Гр) до 80–94 % при 20 Гр (рис. 3, *а*). Дозовая кривая слагалась из нескольких участков, дважды формируя экспоненту в области до 4 Гр и после 8 Гр. В диапазоне доз от 4 до 8 Гр выделялся особый участок стабилизации повреждения меристемы на уровне 44–48 %, в котором линейный характер дозовой зависимости резко изменялся (рис. 3, *а*). При дозах свыше 8 Гр ЧАА вновь линейно возрастала, перегружая меристему нарушениями.

Кривые поклеточного распределения aberrаций носили волнообразный, нелинейный характер с тенденцией после 8 Гр к повышению числа мультиабберрантных повреждений и снижению частоты анафаз с единичными перестройками. В диапазоне доз от 4 до 8 Гр характер поклеточного распределения aberrаций обнаруживал обратную тенденцию – снижение частоты мультиабберрантных повреждений и повышение частоты анафаз с единичными перестройками (рис. 3, *б*). Это дает основание полагать, что в основе снижения числа aberrаций при повышении дозы облучения лежат механизмы клеточной конкуренции между клонами нормальных и абберрантных клеток, которая, очевидно, поддерживается репопуляцией за счет клеток, находящихся в момент облучения в G_1 и G_0 . По-видимому, в клеточной конкуренции важна роль не только клонов неабберрантных клеток. Клетки, несущие единичные или даже двойные перестройки, также могут сохраняться в клеточных потоках, выигрывая конкуренцию с клетками, более нагруженными перестройками. Известно, что одна или две перестройки на клетку не всегда при-

водят к ее гибели, поскольку aberrантные хроматиды могут равномерно распределяться между анафазными наборами [2, 3]. Высокий процент клеток, содержащих микроядро во втором после облучения митозе, также указывает на вероятностное выживание клеток с aberrациями. Индукция же мультиaberrантных повреждений, как правило, сопровождается исключением таких клеток из клеточных потоков и пролиферативной гибелью клетки. Соотношение между этими клонами клеток изменяется с увеличением дозы облучения: частота анафаз с единичными, затем и двойными нарушениями линейно снижается, а частота мультиaberrантных анафаз возрастает (рис. 3, б). При превышении 50%-ного уровня aberrаций основной вклад в формирование повреждения меристемы вносят мультиaberrантные и трехчленные хромосомные перестройки. Можно предполагать, что индукция мультиaberrантных повреждений в диапазоне высоких доз затрагивает прежде всего клетки, которые уже несут генетический груз [14], о чем свидетельствует наличие микроядер в мультиaberrантных митотических фигурах.

Нагруженность перестройками aberrантной клетки быстро растет с дозой, достигая 2,2 при 4 Гр, затем снижается до 1,9 при 8 Гр, после чего вновь линейно и необратимо возрастает (рис. 3, в). Критический уровень нагруженности меристематической клетки aberrациями (в пересчете на все анафазы) составляет 0,7–0,8 на анафазу (рис. 3, в). Таким образом, критический уровень нагруженности меристемы лежит за пределами двух aberrаций на aberrантную клетку и до одной aberrации в среднем на клетку.

Цитостатический эффект высоких доз облучения был менее значительным, чем ожидалось. В спектре хромосомных aberrаций в интервале доз до 8 Гр преобладают двойные мосты и двойные фрагменты (рис. 4 а, б). С увеличением дозы облучения возрастает число мультиaberrантных перестроек, повреждений митотического аппарата с разбросом хромосом (рис. 4, г, ж), а также клеток с микроядрами и перетяжками между ядрами (рис. 4, в, е, ж, з). Одновременно возрастает число интерфазных клеток с аномальной структурой ядра (рис. 4, г–з). При дозах от 13 Гр меристе-

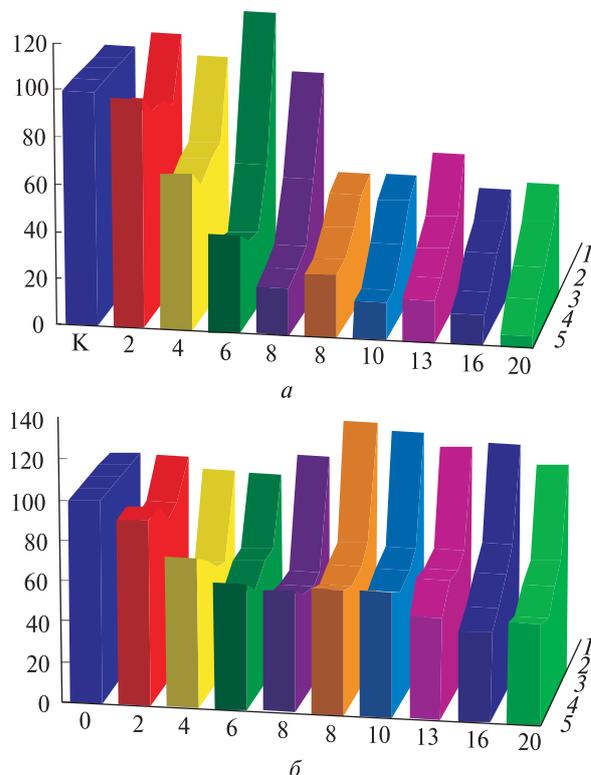


Рис. 2. Диаграммы прироста массы стебля (а) и корня (б) (данные по двум экспериментам; по горизонтали – доза гамма-облучения, Гр; по вертикали – вес, % к контролю; 1–5 – возраст проростков в условных точках)

ма практически не содержит интерфазных клеток нормального строения, что, вероятно, свидетельствует о добавлении второй после индукции мультиaberrантных перестроек составляющей суицидной программы – интерфазной гибели клеток. Таким образом, критическим значением повреждения корневой меристемы проростков гороха при учете частоты ана-телофаз митоза является 44–48 % aberrантных клеток со средним показателем нагруженности 2 перестройки на aberrантную анафазу и 0,8 – в среднем на клетку. Превышение этого порога приводит к запуску программы самоуничтожения меристемы путем индукции мультиaberrантных повреждений и интерфазной гибели клеток.

Сопоставление ЧНК и прироста фитомассы проростков. При сопоставлении ЧНК и прироста массы проростков обнаружилось, что стабилизация частоты aberrаций не оказывала

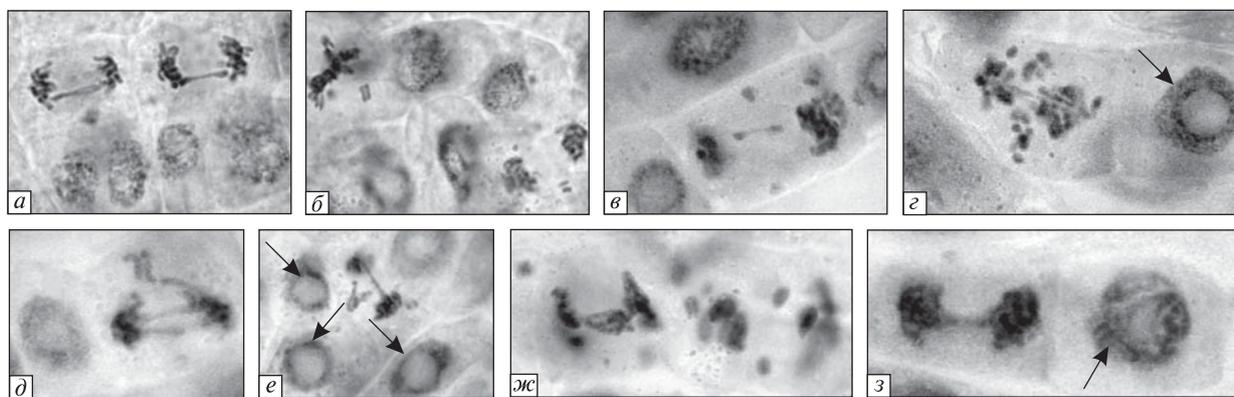
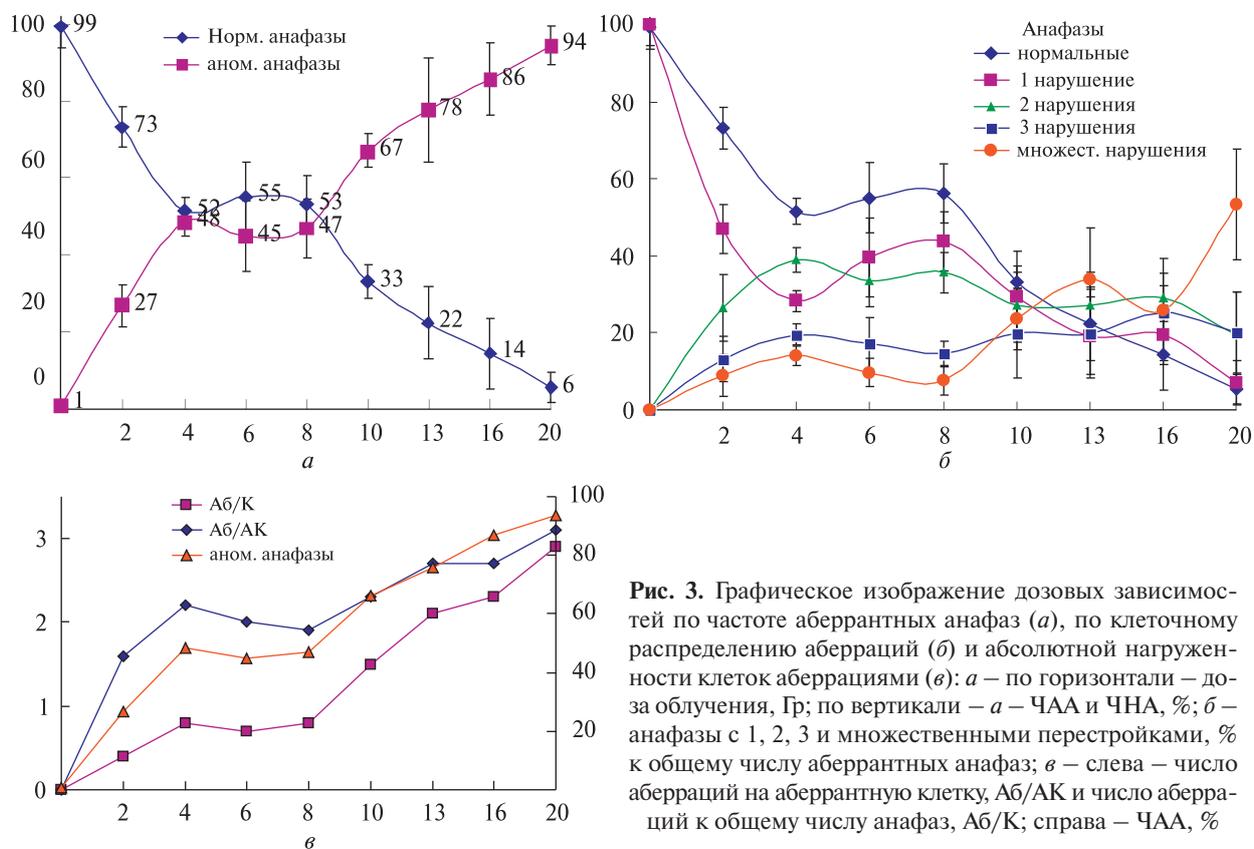


Рис. 4. Спектр хромосомных aberrаций: *a, б* – хромосомные мосты и двойные фрагменты в мета- и телофазе, свидетельствующие об асимметричных обменах; *в* – телофаза, дицентрический и двойной фрагмент, два микро-ядра свидетельствуют о делении aberrантной клетки (13 Гр); *г* – мультиaberrантная анафаза, нарушение формирования веретена деления (16 Гр); *д* – телофаза, два моста и фрагменты (13 Гр); *е* – телофаза, хромосомный мост и фрагменты (20 Гр); *ж* – К-митоз (справа), телофаза с перетяжкой (13 Гр); *з* – телофаза с перетяжкой (16 Гр); стрелками указаны интерфазные ядра с аномальной структурой (*г, е, з*)

видимого эффекта на прирост корня и стебля (рис. 5, *a, б*). При одинаковой ЧНА формирование корня и побега испытывали разную степень депрессии. Превышение 50%-ного по-

рога повреждения меристемы имело летальные последствия для развития побега. Отдельные случаи сохранения способности к морфогенезу сопровождались нарушением позиционной

информации — отсутствием корреляции между развитием стебля и корня. Однако пересечение 50%-ного порога повреждения не останавливает прироста корня. Блокирование прироста корня осуществляется при 70%-ном уровне повреждения в точке пересечения с кривой выживаемости (рис. 5, а). По-видимому, прирост массы корня за пределами 50%-ного порога повреждения осуществляется за счет регенерации. При превышении 70%-ного уровня повреждения регенерация уже не обеспечивает фиксированного прироста массы корня.

Регенерация главного корня. Регенерация корня, по нашим наблюдениям, осуществлялась в диапазоне повреждающих доз от 4–6 Гр и выше, до 20 Гр. Основу регенерации составляет механизм репопуляции (за счет пролиферации клеток центра покоя), позволяющий клеточной популяции восстанавливать не только численность, но и структуру органа. Как отмечает Гудков [10], при радиационном повреждении меристемы на характер дозовых кривых кинетики ее ростовых процессов (продолжительности фаз клеточного цикла и пролиферативной активности) накладываются два процесса противоположной направленности: с одной стороны это подавление ростовой активности, с другой — начало и степень процессов восстановления. При дозах в 4 и 6 Гр репопуляционный механизм обеспечивает быстрое восстановление апекса, при 8 Гр прирост главного корня незначительно замедляется (рис. 6, а, б). В зависимости от степени повреждения апикальной меристемы регенерация приводит к частичной или полной ее замене. Однако этих локальных процессов недостаточно для восстановления морфогенеза и выживания проростков при значительном превышении порога повреждаемости. Чем выше доза облучения, тем сложнее и медленнее происходит восстановление. При дозах 10 и 13 Гр процесс замещения сопровождается торможением и остановкой роста, при 16 и 20 Гр — полным блокированием роста. Регенерация в большинстве случаев осуществляется прямым путем через репопуляционный механизм (рис. 6, в), реже — к репопуляционному механизму добавляется активация пролиферации в переходной к растяжению зоне апекса. В редких случаях регенерация происходит непрямым

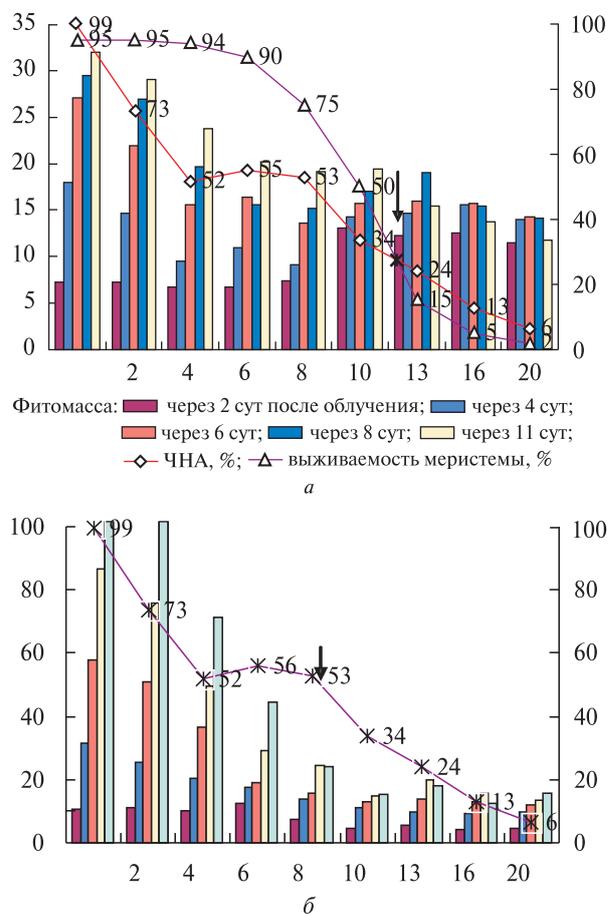


Рис. 5. Сопоставление дозовых зависимостей по приросту массы корня, ЧНА и выживаемости меристемы (а), приросту массы стебля и ЧНА (б): а — по горизонтали — доза гамма-облучения, Гр; по вертикали слева — вес, мг, справа — выживаемость, % и ЧНА, %, стрелкой указана точка пересечения кривых; б — по горизонтали — доза облучения, Гр; по вертикали слева — % к контролю, справа — ЧНА, %; стрелкой указана точка блокирования прироста фитомассы

путем — через дедифференциацию и каллусогенез (рис. 6, з). При максимальных дозах регенерация может наблюдаться в 26–40 % случаях (рис. 7). Частота неаберранных клеток коррелирует с частотой регенерации, что обуславливает восстановительные процессы в меристеме даже при максимальных дозах облучения (рис. 7). Пересечение кривых по ЧНА и выживаемости меристемы указывает существование 70%-ного порога повреждения корневой меристемы, превышение которого не совместимо с выживанием корня.

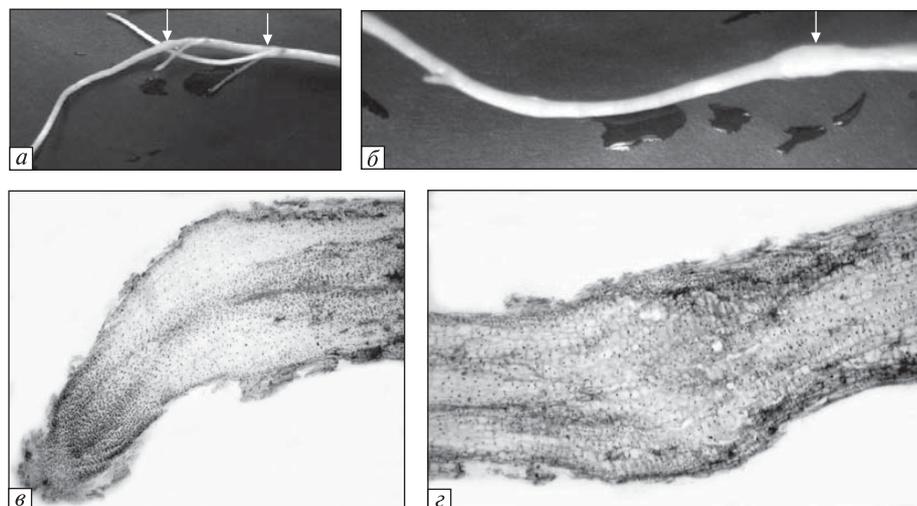


Рис. 6. Восстановление тканей и ростовой активности апекса корня при дозе 8 Гр, стрелками указаны зона побурения (а) и утолщения (б); в – прямой способ регенерации через репопуляционный механизм, 20 Гр; г – непрямой способ регенерации через каллусогенез, 13 Гр

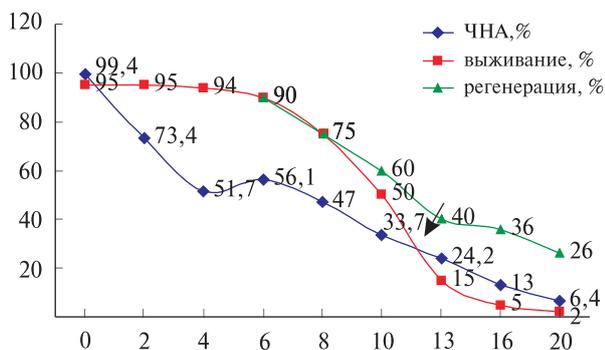


Рис. 7. Сопоставление дозовых зависимостей ЧНА, выживаемости главного корня и регенерации апикальной меристемы: по горизонтали – доза облучения, Гр; по вертикали – ЧНА, %, выживание меристемы, %, регенерация, %; стрелкой указан 70%-ный порог повреждения

В апексах проростков, облученных дозами 16 и 20 Гр, наблюдалась дегенерация и деформация тканей эпидермиса, коры, чехлика и меристемы, фрагментация элементов проводящей системы (рис. 8). Тем не менее в побуревших апексах (признак отмирания поверхностных тканей корня) осуществлялись восстановительные процессы. В 26–40 % случаев происходило репопуляционное восстановление проксимальной меристемы, формирующей новый апекс (рис. 8, а, б, г). Число aberrаций в воссозданном апексе резко снижалось, но не достигало контрольного уровня (рис. 8, б, в); часть вновь образованных клеток подвергалась апоптозу. С наибольшей частотой встре-

чалась пролиферация клеток периклики, которые путем периклиальных делений, по-видимому, частично восстанавливали структуру корня в зоне дифференциации (рис. 8, д, е). Проллиферативная активность клеток зоны периклики приводила к заложению инициалей боковых корней (рис. 8, ж), что свидетельствовало о частичном восстановлении позиционной информации в поврежденных тканях, в частности, компетенции клеток периклики к ИУК [14]. Однако дальнейшее развитие боковых корней было возможно лишь после восстановления структуры и дифференцировки тканей корня, которые обеспечивают передачу сигналов и работу соответствующих сигнальных систем.

Итак, полученные результаты дают основание полагать, что критическим уровнем радиационного повреждения апикальной меристемы корня проростков гороха является 44–48 % aberrантных анафаз, учитывая, что при этом уровне aberrаций в меристеме корня еще может выживать апикальная меристема стебля. С превышением 50%-ного уровня повреждения запускаются механизмы самоуничтожения меристемы путем индукции мульти-аберрантных повреждений и интерфазной гибели клеток.

Вместе с тем, благодаря репопуляционному и регенерационному восстановлению, критическим показателем повреждения апикальной меристемы корня, при котором еще возможно выживание корня, можно считать 70 % aberrаций,

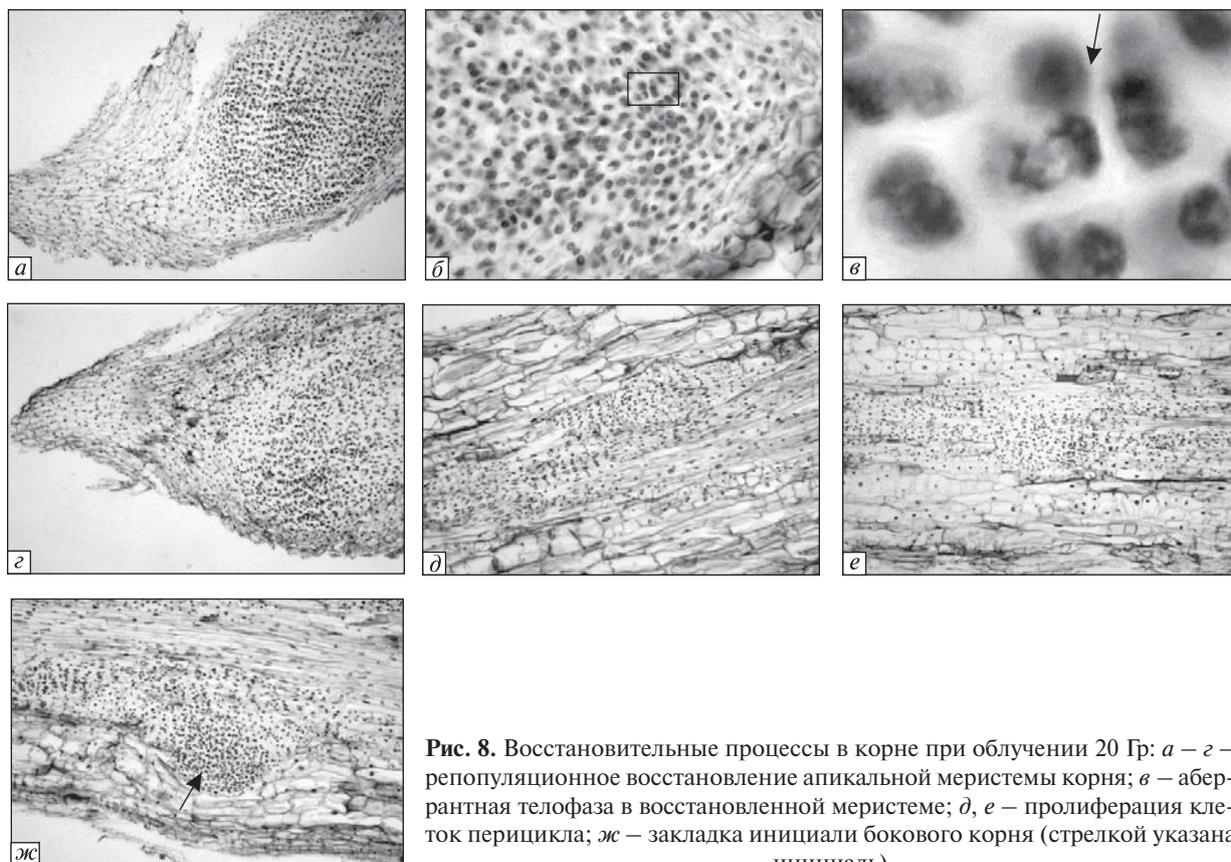


Рис. 8. Восстановительные процессы в корне при облучении 20 Гр: *a – c* – репопуляционное восстановление апикальной меристемы корня; *в* – aberrантная телофаза в восстановленной меристеме; *д, e* – пролиферация клеток перицикла; *ж* – закладка инициали бокового корня (стрелкой указана инициаль)

хотя этих локальных процессов как правило недостаточно для восстановления морфогенеза и выживания проростков. Показатель критического уровня повреждения меристемы, очевидно, зависит от генотипа, стадии онтогенеза, природы стрессового фактора и, вероятно, других причин. Так, у лука батуна (*Allium fistulosum* L.) частота aberrантных клеток, сопряженная с прорастанием стареющих семян, была в три-шесть раз выше, чем аналогичный показатель у *A. cepa* L., и доходила до 70 % у семян, еще не утративших всхожесть [11, 15]. Согласно трактовке результатов Grant et al. [16] по *Pisum sativum* L. уже 7 % aberrаций сказываются на способности семян к прорастанию. В то же время облучение сухих семян гороха в высоких дозах слабо влияет на прорастание. По данным Царапкина [17], облучение в дозе 15 крад индуцирует 42%-ную частоту aberrаций в корневой меристеме проростков, но незначительно сказывается на прорастании семян.

В механизмах радиоустойчивости проростков гороха в интервале доз, близких к ЛД₅₀, важную роль играет клеточная конкуренция, которая согласно новейшим представлениям является одним из важнейших механизмов гомеостаза в организме животных. Благодаря клеточной конкуренции определяются размеры ткани, в том числе и при регенерации, стабилизируется дифференциация/дифференциация клеток, элиминируются мутации [18–21]. Показано, что клеточная конкуренция внутри многоклеточного организма между клеточными популяциями, которые различаются по скорости роста, приводит к элиминации медленно пролиферирующих клеток [18, 20]. Клеточную конкуренцию у растений можно толковать более широко, например как фактор, который обеспечивает наследование изменений, приобретенных организмом в онтогенезе [22]. Действительно, клеточная конкуренция в гетерогенной популяции меристематичес-

ких клеток может приводить к отбору клеточных клонов, наиболее адаптированных к условиям существования организма [23]. В условиях давления стрессового фактора клеточная конкуренция интенсифицируется. Получены данные о положительной роли клеточной конкуренции при радиационном повреждении вегетативных и генеративных меристем [24–27]. Показано, что в определенном дозовом диапазоне динамика формирования хромосомных aberrаций в корневой меристеме и спорогенном комплексе растений следует обратной зависимости от дозы облучения. Клеточную конкуренцию в раннем онтогенезе растений можно рассматривать как механизм, с помощью которого ограничивается мутагенез, регулируется состояние и численность клеточных субпопуляций апикальной меристемы, восстанавливается структура поврежденных тканей и морфогенез облученных проростков.

Полученные результаты дают основание полагать, что критическим уровнем повреждения апикальной меристемы корня у проростков гороха, совместимым с их выживанием, является примерно 44–48 % aberrантных анафаз. При этом же уровне aberrаций меристематических клеток корня еще может выживать апикальная меристема стебля. Превышение порогового уровня несовместимо с выживанием как стеблевой, так и корневой меристемы. Сохранение ростовой активности за пределами пороговой дозы, как правило, сопровождается нарушением морфогенеза. В механизмах восстановления меристемы решающую роль, по видимому, играет клеточная конкуренция между клонами нормальных, aberrантных с единичными перестройками и мультиaberrантными клетками, а также репопуляция, пополняющая число преимущественно неaberrантных клеток. С превышением 50%-ного уровня повреждения запускаются механизмы самоуничтожения меристемы путем индукции мультиaberrантных повреждений и интерфазной гибели клеток. Феноменологически превышение порогового уровня радиационного повреждения проявляется в нарастании нарушений морфогенеза и остановке роста. Интерпретация результатов, как и ожидалось, усложнялась накладывающейся на эти процессы регенерацией. Процессы регенерации сопро-

водят восстановление во всем диапазоне повреждающих доз, причем, чем выше доза облучения, тем сложнее и медленнее происходит восстановление.

Клеточную основу регенерации составляет пролиферативная активность клеток центра покоя и перицикла, находящихся в момент облучения в G_0 . При гибели апикальной меристемы регенерация может приводить к полному замещению некротической ткани на новую, восстанавливая не только численность, но и структуру корневого апекса. Реже наблюдается непрямая регенерация через дедифференциацию и каллусогенез. Критическим показателем повреждения апикальной меристемы корня, при котором еще возможно его восстановление, можно считать 70 % хромосомных aberrаций. Однако локальных процессов регенерации недостаточно для восстановления морфогенеза и выживания проростков, по крайней мере, в наблюдаемый период времени (в течение трех недель).

Выводы. Критическим, или пороговым, уровнем повреждения апикальной меристемы корня проростков гороха, совместимым с их выживанием, является 44–48 % aberrантных анафаз с учетом того, что при этом уровне aberrаций в меристеме корня еще может выживать апикальная меристема стебля. Превышение 50%-ного уровня повреждения приводит к запуску суицидной программы в меристеме через индукцию мультиaberrантных повреждений и интерфазной гибели клеток. В механизмах восстановления апикальной меристемы корня важную роль играет клеточная конкуренция между клонами нормальных клеток, aberrантных с одной или двумя перестройками и мультиaberrантными клетками, а также репопуляция. Сдвиг соотношения в сторону увеличения числа нормальных и aberrантных с 1–2 перестройками анафаз свидетельствует о восстановительных процессах, преобладание мультиaberrантных анафаз указывает на необратимость радиационного повреждения. Регенерация главного корня осуществляется в диапазоне повреждающих доз, обеспечивая полное или частичное восстановление корневого апекса. Критическим показателем повреждения апикальной меристемы корня, еще совместимым с ее регене-

рацией, является примерно 70 % aberrаций. Однако этих локальных процессов регенерации недостаточно для восстановления морфогенеза и выживания проростков. Клеточную конкуренцию в раннем онтогенезе облученных растений можно рассматривать как механизм, с помощью которого ограничивается мутагенез, регулируется состояние и численность клеточных субпопуляций апикальной меристемы, восстанавливается структура поврежденных тканей.

*E.A. Kravets, A.N. Mykheyev,
L.G. Ovsyannikova, D.M. Grodzynsky*

CRITICAL LEVEL OF RADIATION DAMAGE
OF ROOT APICAL MERISTEM
AND MECHANISMS FOR ITS RECOVERY
IN *PISUM SATIVUM* L.

The dose dependencies of growth and cytogenetical values have been built to determine the critical level of root apical meristem damage induced by acute irradiation in the range from 2 to 20 Gr. We have analyzed the frequencies of aberrant anaphases and the aberration distribution per cell, on the one hand, and the growth of biomass, the survival and regeneration of the root meristem, on the other hand. The critical level of damage to the stem apical meristem and root of seedlings was defined as 44–48 % of aberrant anaphase. Exceeding of this level leads to the launch of suicidal program through induction of multiaberrant damages and interphase cell death. It appears that competition of clones of non-aberrant cells, the cells bearing 1 and 2 damages and multiaberrant cells plays the primary role in the mechanisms of recovery. The regeneration provides full or partial restoration of the main root apical meristem. However these local processes are insufficient to restore morphogenesis and survival of seedlings in excess of the critical level damage.

*O.A. Kravets, A.N. Mykheyev,
L.G. Ovsyannikova, D.M. Grodzynsky*

КРИТИЧНИЙ РІВЕНЬ РАДІАЦІЙНОГО
ПОШКОДЖЕННЯ АПІКАЛЬНОЇ МЕРИСТЕМИ
КОРЕНЯ ТА МЕХАНІЗМИ ЇЇ ВІДНОВЛЕННЯ
У *PISUM SATIVUM* L.

Для визначення критичного рівня ушкодження апікальної меристеми кореня, індукованого гострим опроміненням в діапазоні доз від 2 до 20 Гр, побудовано різні дозові залежності ростових та цитогенетичних параметрів. Співставлення частоти aberrантних анафаз і поклітинного розподілу aberrантних анафаз, з одного боку, і приросту фітомаси, виживаності меристеми і регенерації кореня, з іншого, дозволило оцінити 44–48%-вий рівень частоти aberrантних анафаз як критичний. Перевищення

цього рівня пошкодження призводить до запускання в меристемі суїцидної програми через індукцію мультиaberrантних пошкоджень та інтерфазної загибелі клітин. Припускається, що в механізмах відновлення при допороговому рівні пошкодження головну роль виконує клітинна конкуренція між клонами нормальних клітин, aberrантних клітин, які мають 1 або 2 ушкодження, і мультиaberrантними клітинами. Регенерація забезпечує повне або часткове відновлення апікальної меристеми головного кореня, однак цих локальних процесів недостатньо для відновлення морфогенезу і виживання проростків при значному перевищенні порога пошкодження.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ганаси Е.Э. Радиационное повреждение и репарация хромосом. — М.: Наука, 1976. — 103 с.
2. Ганаси Е.Э., Заичкина С.И., Розанова О.М. Роль различных повреждений ДНК в формировании радиационного повреждения хромосом // Радиобиология. — 1984. — 4, № 5. — С. 616–625.
3. Барсуков В.С., Малиновский О.В. Количественное описание процесса радиационной инактивации клеток. Основные посыпки. Образование летальных повреждений // Цитология. — 1973. — 15, № 9. — С. 1152.
4. Гостимский С.А., Дьякова М.И., Ивановская Е.В., Монахова М.А. Практикум по цитогенетике: Метод. пособие. — М.: Изд-во МГУ, 1974. — 150 с.
5. Carano A.V. Transmission probabilities of X-ray induced chromosome aberrations and their relation to colony survival in Chinese hamster cells // Radiat. Res. — 1972. — 51, № 2. — P. 512–520.
6. Инге-Вечматов С.Г. Генетика с основами селекции. — М.: Высш. шк., 1989. — 591 с.
7. Митрофанов Ю.А. Индуцированная изменчивость хромосом эукариот. — М.: Наука, 1994. — 140 с.
8. Obe G., Pfeiffer P., Savage J.R.K. et al. Chromosomal aberrations: formation, identification, and distribution // Mutat. Res. — 2002. — 504. — P. 17–36.
9. Гродзинский Д.М. Радиобиология растений. — Киев: Наук. думка, 1986. — 380 с.
10. Гудков И.Н. Клеточные механизмы пострadiационного восстановления растений. — Киев: Наук. думка, 1986. — 222 с.
11. Куцоконь Н.К., Лазаренко Л.М., Безруков В.Ф. та ін. Кількість aberrантних анафаз на клітину як параметр хромосомної нестабільності. 2. Порівняльний аналіз впливу факторів різної природи // Цитология и генетика. — 2004. — 38, № 1. — С. 55–62.
12. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. — М.: Агропромиздат, 1988. — 271 с.
13. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1980. — 293 с.
14. Kravets E.A., Mykheyev A.N., Ovsyannikova L.G., Grodzynsky D.M. Воздействие острого облучения на интерпретацию позиционной информации клетка-

- ми апикальной и латеральной меристемы гороха // Физиология и биохимия культур. растений. — 2010. — **42**, № 4. — С. 288–297.
15. Куцоконь Н.К. Радиційна індукція множинних пошкоджень у рослин : Автореф. дис.... канд. біол. наук. — Київ, 2004. — 24 с.
16. Grant W.F., Owens E.T. Chromosome aberration assays in *Pisum* for the study of invironmental mutagens // Mutat. Res. — 2001. — **488**. — P. 93–118.
17. Царанкин Л.С. Количественные закономерности действия радиации на хромосомы в покоящихся семенах гороха : Автореф. дис.... д-ра биол. наук. — Киев, 1974. — 42 с.
18. Diaz B., Moreno E. The competitive nature of cells // Exp. Cell Res. — 2005. — **306**. — P. 317–322.
19. Gallant P. Myc, cell competition and compensatory proliferation // Cancer Res. — 2005. — **65**. — P. 6485–6487.
20. Moreno E., Basler K. dMyc transforms cells into super-competitors // Cell. — 2004. — **117**. — P. 117–129.
21. Tyler D.M., Li Wei, Zhuo Ning, Pellock B., Baker N.E. Genes affecting cell competition in *Drosophila* // Genetics. — 2007. — **175**. — P. 643–657.
22. Лежачиос Э. Элементы общей теории адаптации. — Вильнюс : Моклас, 1986. — 273 с.
23. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — Київ : Логос, 2005. — 723 с.
24. Gaul H. Uber die Chmarenbildung in Gerstenpflanzen nach Rongenbestrahlung von Samen // Flora. — 1959. — **147**, № 2. — P. 207–241.
25. Кравец Е.А., Гродзинский Д.М. Роль клеточной конкуренции в механизмах восстановления при воздействии ионизирующего и УФ-Б излучения (на примере *Hordeum vulgare* L.) // Тр. Тимиряз. академии. — 2008. — № 2. — С. 30–35.
26. Кравец Е.А. Клеточные и тканевые механизмы восстановительных процессов в вегетативных и генеративных меристемах при воздействии облучения // Цитология и генетика. — 2009. — **43**, № 1. — С. 11–22.
27. Кравец Е.А. Клеточный отбор в онтогенезе растений и его значение для формирования адаптации к облучению // Наук. пр. Николаїв. ун-ту. — 2008. — Вип. **89**, № 102. — С. 98–104.

Поступила 24.10.09