

КРАВЕЦ Е.А.

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАНУ,
Украина, 03680, Киев, ГСП-22, ул. акад.Заболотного, 148, e-mail: elkraev@online.ua*

КЛЕТОЧНАЯ КОНКУРЕНЦИЯ В ВЕГЕТАТИВНЫХ И ГЕНЕРАТИВНЫХ МЕРИСТЕМАХ И ЕЕ РОЛЬ В МЕХАНИЗМАХ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПРИ ДЕЙСТВИИ ОБЛУЧЕНИЯ

Феномен «клеточной конкуренции», когда клетки разных метаболических путей конкурируют друг с другом, был открыт на дрозофилле (*Drosophila melanogaster*) три десятилетия тому назад, а также был описан в контексте соматических мутаций и апоптозной элиминации (Moreno & Basler, 2004; Díaz & Moreno, 2005; Li & Baker, 2007). Клеточную конкуренцию, наряду с морфогенетическим апоптозом, стали рассматривать как тип клеточной гибели, который имеет решающее значение для обеспечения нормального развития и поддержания здорового состояния различных органов (Díaz & Moreno, 2005; Peter Gallant, 2005). Реализация клеточной конкуренции осуществляется через, так называемый автономный апоптоз, который индуцируется снижением рецепции экстрацеллюлярного фактора *Dpp* (Yamada & O'Connor, 2004). В настоящее время считают, что клеточная конкуренция является одним из механизмов гомеостаза, благодаря которому определяются численность клеток и размеры растущей ткани, в том числе и при повреждениях, стабилизируется дифференциация клеток, элиминируются мутации (Li and Baker, 2007; Tyler et al., 2007). У растений механизмы автономного апоптоза не исследованы. Что касается клеточной конкуренции (или отбора), то, по мнению некоторых исследователей, она играет важную роль в процессах тканевой дифференцировки и адаптации растительного организма (Кунах 2005). В основе клеточной конкуренции могут лежать такие факторы как гетерогенность и избыточность клеточной популяции, а также дефицит ресурсов (Лекавичюс, 1986). Клеточная конкуренция может иметь место в восстановительных процессах в случае воздействия мутагенного фактора. В качестве одного из интереснейших примеров клеточной конкуренции у растений, мы полагаем, можно рассматривать активацию «меристемы ожидания» после индуцирующего воздействия, когда клетки вегетативного апекса замещаются активно пролиферирующими клеточными клонами генеративной меристемы. Примерами клеточной конкуренции у растений может быть элиминация мутантных клеток, образующихся вследствие спонтанного или индуцированного мутагенеза. Цель нашего исследования состояла в выяснении механизмов восстановления генома ячменя в ходе онтогенеза после воздействия ионизирующего и УФ-Б- излучения и роли в этом процессе клеточной конкуренции.

Материал и методы

Объект исследования – ячмень (*Hordeum distichum* L., 2n=14), сорт Скарлет. С целью определения эффективных доз гамма-облучения сухие семена ячменя облучали в дозах 10, 20, 30 и 40 Гр., проращивали и проростки тестировали по ростовым и цитогенетическим параметрам. В дальнейшей работе использовали лишь две дозы острого облучения – 20 и 40 Гр. С той же целью 2-ухсуточные проростки облучали УФ-Б радиацией в дозах 0,5; 2,2 и 4,3 кдж/м². После облучения одну часть растений доращивали и фиксировали в течение нескольких суток, другую - высаживали в грунт для оценки воздействия облучения на последующий онтогенез. В дальнейшем был проведен цитогенетический анализ корневой меристемы по экспериментам в 3-кратной повторности. Для оценки состояния репродуктивной системы изучали формирование спорогенной ткани, микроспорогенез и микрогаметогенез. Использовали давленные препараты, окрашенные ацетоорсеином (корневая меристема) и ацетокармином (содержимое пыльников), изготовленные согласно общепринятой

цитологической методике (Паушева,1974). **Результаты исследования и их обсуждение**

Эффекты последствия УФ-Б- и острого облучения на корневую меристему проростков. Эффективными в отношении генотоксического действия оказались все использованные дозы острого и УФ-Б- облучения: в корневой меристеме проростков формировались хромосомные aberrации. Повышение дозы облучения приводило к возрастанию числа хромосомных aberrаций, микроядер и полиплоидных клеток, однако в диапазоне высоких доз число хромосомных aberrаций, как правило, снижалось. Уровень спонтанного мутагенеза коррелировал с числом полиплоидных клеток, сохранивших способность к пролиферации. В первом митозе число хромосомных aberrаций было пропорционально дозе облучения, во втором митозе дозовая зависимость изменялась (Рис. 1, 2).

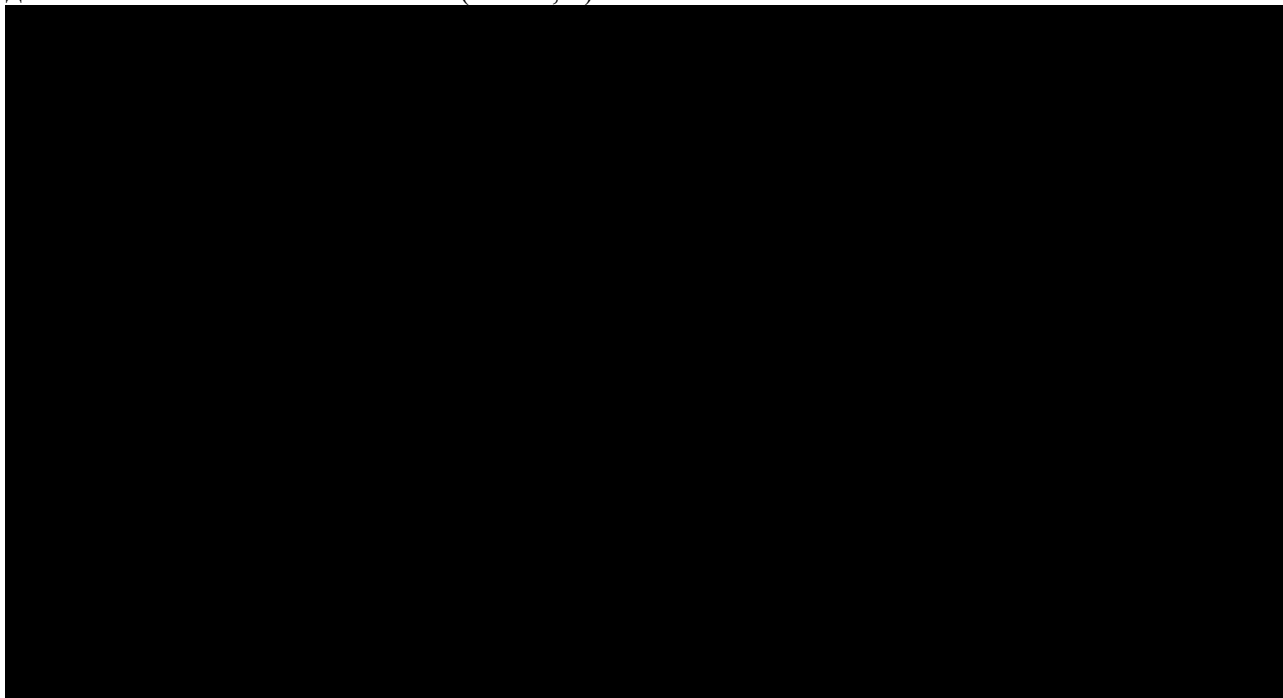
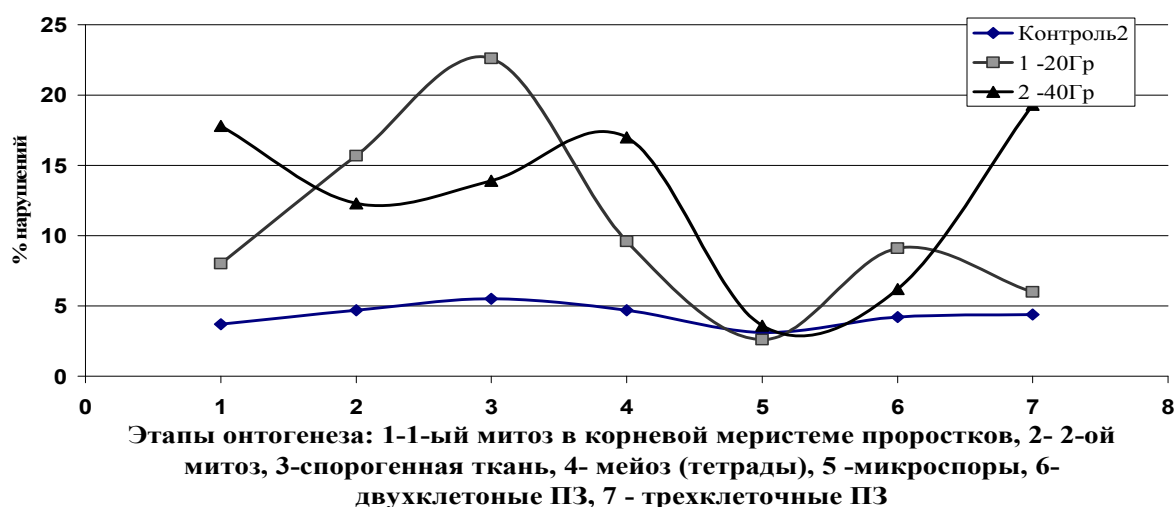


Рис.2. Динамика цитогенетических нарушений в онтогенезе растений ячменя при воздействии острого облучения



При максимальной экспозиции ультрафиолета и дозе острого облучения в 40 Гр число aberrаций снижалось параллельно с возрастанием количества дегенерирующих клеток. Элиминация клеток проходит по типу апоптоза, морфологически

проявляющегося через фрагментацию ядра или пикноз хроматина. Итак, с увеличением дозы острого и УФ-Б- облучения число aberrаций в первом митозе повышалось, а во втором снижалось, т.е. динамика образования хромосомных aberrаций при разных дозах облучения обнаруживала обратную зависимость от дозы. Это может достигаться за счет клеточного отбора, что подтверждается активизацией апоптоза.

Влияние ультрафиолетового и острого облучения на репродуктивную систему. Основным типом аномалий, характеризующих генезис микроспороцитов, является деструктивный цитомиксис. При остром облучении и в опыте с максимальной экспозицией УФ деструктивный цитомиксис охватывает от 14 до 23% микроспороцитов. В ходе микроспорогенеза обнаруживались цитогенетические аномалий, связанные с формированием хромосомных aberrаций и последствиями деструктивного цитомиксиса. Со стороны мужского гаметофита реакция на облучение проявлялась в возрастании полиморфизма, спектра и числа цитопатологий пыльцевых зерен. Характер индуцированных нарушений является, по-видимому, неспецифическим; он свойственен, в частности тетраплоидным генотипам ржи при спонтанном и индуцированном мутагенезе (Кравец, 2007). В количественном отношении между показателями стерильности пыльцы и дозой ультрафиолета прослеживается обратная зависимость. В вариантах с острым облучением зависимость оказывается прямой (Рис.1, 2). В диапазоне малых доз ультрафиолета индуцированные повреждения сохраняются в течение всего онтогенеза и не устраняются ни репарацией, ни клеточным отбором. В результате количество нарушений на протяжении онтогенеза возрастает. Следует обратить внимание на положительную зависимость между степенью деструктивного цитомиксиса и числом нарушений в ходе последующего формирования пыльцевого зерна (Рис.1, 2). Очевидно, что степень деструктивного цитомиксиса определяет качество и фертильность пыльцевых зерен. В диапазоне больших доз гамма-облучения обнаруживается «эффект насыщения» - эффективность клеточного отбора снижается и число нарушений остается значительным (Рис.2).

Основным механизмом клеточной конкуренции является цитомиксис, в ходе которого осуществляется своеобразная информационная «сверка» и подготовка микроспороцитов к мейозу, а также освобождение клеток от избыточного хроматина. Действительно, благодаря цитоплазматическим контактам, клеточная популяция микроспороцитов синхронизируется, а те из клеток, которые не охватываются сетью контактов, как правило, задерживаются в поздней профазе-метафазе первого деления мейоза и элиминируются. Клеточная конкуренция зависит от генотипа растения и влияния стрессовых факторов. У гомозиготных самоопылителей, таких как ячмень и пшеница, цитомиксис выражен сильнее, чем у перекрестников, например, ржи (Гродзинский и др., 1996; Кравец и др., 2006; Кравец, 2007). В связи с этим, интересна точка зрения Шнайдер Т.М. (1988), полагавшей, что цитомиксис увеличивает генетическое разнообразие. Стрессовые факторы – облучение, гибридизация, как правило, усиливают деструктивный характер цитомиксиса.

Следовательно, селекция клеточной популяции микроспороцитов осуществляются через автономный апоптоз. В отличие от морфогенетического апоптоза, микроспороцитов. Хотя между этими двумя типами клеточной гибели, возможно, и нет четких разграничений.

Выводы

1. Острое и УФ-Б облучение проростков индуцировало увеличение числа хромосомных aberrаций в вегетативной меристеме и цитопатологий в ходе микроспорогенеза и развития пыльцевого зерна. Динамика образования хромосомных aberrаций в корневой меристеме при разных дозах облучения обнаруживала обратную зависимость от дозы.
2. Со стороны мужской генеративной сферы реакция на облучение заключалась в усилении цитомиксиса, увеличении числа цитогенетических аномалий в ходе

микроспорогенеза, возрастании полиморфизма, спектра и числа цитопатологии пыльцевых зерен.

3. В диапазоне малых доз ультрафиолета индуцированные повреждения сохранялись в течение всего онтогенеза растений. С увеличением дозы облучения наблюдалась активизация цитолитических процессов (апоптоза) и снижение числа aberrаций, что может достигаться за счет клеточного отбора. Степень деструктивного цитомиксиса положительно коррелировала с качеством и фертильностью пыльцы.

4. Предполагается, что основным механизмом клеточной конкуренции в корневой меристеме и спорогенной ткани является автономный апоптоз, который индуцируется внутри самой клеточной популяции в ответ на воздействие мутагенного и, возможно, других внутренних и внешних факторов. Клеточная конкуренция в этих условиях способствует восстановлению и сохранению гомеостаза.

Литература

1. Гродзинский Д.М., Кравец Е.А., Хведынич О.А., Коломиец О.Д., Банникова В.П. Формирование репродуктивной системы растений, подвергшихся воздействию хронического облучения // Цитология и генетика.- 1996.- т.30, №3. С.36-45.
2. Лекавичюс Э. Элементы общей теории адаптации. Вильнюс:Мокслас.- 1986. – 273 с.
3. Кравец Е.А. Роль гаплонтного отбора в механизмах стабилизации ди- и тетраплоидных генотипов ржи под воздействием гамма-облучения.- В сб. Фактори експериментальної еволюції організмів. - Т. 1. - Київ: ЛОГОС.- 2007.
4. Кравец Е.А., Коломиец О.Д., Фалинская Т.П., Гродзинский Д.М. Цитомиксис и программируемая клеточная гибель в микроспорогенезе у мягкой пшеницы. В сб. Фактори експериментальної еволюції організмів. - Т. 1. - Київ: ЛОГОС.- 2006.
5. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. –Київ:Логос.- 2005.-723с.
6. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. -М.:Колос.-1974.-245 с.
7. Шнайдер Т.М. Особенности мейоза у отдаленных гибридов пшеницы, полученных с участием мутанта *ph* // Цитология и генетика.-1988.-т.22, N3. С.18-22.
8. Díaz, B., Moreno. E. The competitive nature of cells.// Exp. cell res.- 2005. – v.306.- P.317-322.
9. Gallant Peter. Myc, Cell Competition and Compensatory Proliferation// Cancer Research.- 2005.- v.65.- P. 6485-6487.
10. Li Wei and Baker Nicholas E. Engulfment Is Required for Cell Competition//Cell.- 2007.-v. 129.- P. 1215-1225 .
11. Moreno, E., Basler, K. dMyc transforms cells into super-competitors.//Cell.- 2004.-v. 117.- P.117-129.
12. Tyler David M. , Li Wei, Zhuo Ning , Pellock Brett and Baker Nicholas E. Genes Affecting Cell Competition in Drosophila// Genetics. 2007.V. 175.-P. 643-657.
13. Yamada Takashi Adachi and O'Connor Michael B. Mechanisms for Removal of Developmentally Abnormal Cells: Cell Competition and Morphogenetic Apoptosis// J. Biochem. -2004.- v. 136, No. 1.-P. 13-17.

Резюме

Возрастание дозы ионизирующего и УФ-Б облучения приводит в вегетативных и генеративных меристемах ячменя к активизации апоптоза и снижению числа aberrаций, что может достигаться за счет клеточной конкуренции.

Збільшення дози гамма- і УФ-Б опромінення викликає у кореневій меристемі та репродуктивних органах ячменя активізацію апоптозу та зменшення кількості ушкоджень, що може досягатися за рахунок клітинної конкуренції.

Increasing the ionizing and UV-B irradiation effected on vegetative and generative meristems causes of apoptosis activation and decreasing of aberration number. This may be resulted by the cell competition.

ЛЮСИКОВ О. М., ГОРДЕЙ И. А.

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,

Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: O.Lyusikov@igc.bas-net.by

ХРОМОСОМНАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ ГЕНОМА РЖАНО-ПШЕНИЧНЫХ АМФИДИПЛОИДОВ СЕКАЛОТРИТИКУМ (\times SECALOTRITICUM)

Наибольшее биоразнообразие достигается при интрогрессии нового генетического материала в больших объемах – отдаленной гибридизации, аллополиплоидии, хромосомной и геномной реконструкции видов. Отдаленная гибридизация служит пусковым механизмом активации молекулярно-цитогенетических коадаптивных процессов, у аллополиплоидов и хромосомно-замещенных форм создается дополнительный резерв генетической изменчивости видов за счет увеличения полиморфизма собственных хромосом и множественных межгеномных рекомбинаций и хромосомных перестроек. Поэтому особое значение имеют эволюционные, цитогенетические и молекулярные исследования закономерностей реконструкции гибридных геномов с целью разработки эффективных способов ускорения их коадаптивных генетических модификаций.

Материал и методы

Материалом для исследований служили сорта тетраплоидной озимой ржи, гексаплоидных озимых тритикале, озимой мягкой пшеницы и созданные на их основе формы гексаплоидных ржано-пшеничных амфидиплоидов - секалотритикум и ржано-пшеничные хромосомно-замещенные линии.

Результаты изучения признаков морфотипа и морфобиологических параметров продуктивности (кустистость и высота растения, длина, число колосков, количество и масса зерен главного колоса, урожайность) статистически оценивали соответственно анализом вариации по качественным и количественным признакам; достоверность средних определяли по критерию Стьюдента (t), влияние отдельных факторов на анализируемые признаки - по критерию Фишера (F) [1].

Цитологический анализ мейоза проводили на окрашенных ацетокармином давленных препаратах пыльников. Кариотипический анализ проводили с применением С-метода дифференциальной окраски хромосом [2]. Препараты анализировали на микроскопе Leica DM RXA2 с оптикой Leica PlanAPO.

Результаты и обсуждение

Формы секалотритикум создавали путем гибридизации тетраплоидной ржи (RRRR, $2n=28$) с гексаплоидными тритикале (AABBRR, $2n=42$) и последующим 1-2-кратным беккроссированием полученных ржано-тритикальных пентаплоидных гибридов F_1 (RRABR, $5x=35$) на исходные тритикале [3, 4]. Использование тритикале как вида-посредника в качестве источника геномов пшеницы позволило преодолеть барьер односторонней прогамной несовместимости, препятствующей ржано-пшеничной гибридизации. Ржано-тритикальные скрещивания с участием тетраплоидной ржи характеризовались более высокой прогамной (~1,5%, до 12%) и постамной (~80%) совместимостью, чем с участием диплоидной (~0,7%, до 3,5% нежизнеспособных семян).

Мейоз ржано-пшеничных амфидиплоидов $F_1 - F_1BC_{1-2}$ в условиях ржаной цитоплазмы характеризовался различными уровнями гомеологической конъюгации