

УДК 577.175.1+632.118.3

ВОЗДЕЙСТВИЕ ОСТРОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА ИНТЕРПРЕТАЦИЮ ПОЗИЦИОННОЙ ИНФОРМАЦИИ КЛЕТКАМИ АПИКАЛЬНОЙ И ЛАТЕРАЛЬНОЙ МЕРИСТЕМЫ ГОРОХА

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

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины
03680 Киев, ул. Академика Заболотного, 148*

Представлены результаты исследования регенерационных процессов у проростков гороха при воздействии острого облучения. Проанализированы данные цито-, гистологических повреждений и восстановительных процессов в корневых апексах с точки зрения позиционной информации, в частности компетенции клеток меристемы к ИУК. Обсуждена роль минимального объема меристемы и зоны дифференциации апекса корня, необходимых для восстановления сигнальной системы и позиционной информации.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., острое облучение, меристема, придаточные корни, хромосомные aberrации, регенерация, компетенция клеток к ИУК.

Процессы морфогенеза у растений представляют собой результат сложного взаимодействия активности генома, гормональной регуляции, воздействия факторов среды, разворачивающихся в пространстве и времени. Система координат задается градиентом концентрации индукторов, контролирующим таким образом упорядоченное возникновение и расположение осевых зачатков органов [12]. Понятие «позиционной информации» пришло в морфогенез растений из эмбриологии животных [13–15] как представление о процессе (или разметке), в ходе которого определяется точное положение определенных клеток в составе ткани, расположение тканей относительно друг друга, распределение митотической активности и формирование в пространстве «образа» растительного организма в целом [6, 10]. Согласно концепции «позиционной информации», компетентные к восприятию индуктора (морфогена) клетки последовательно воссоздают пространственные конструкции, специализируясь соответственно концентрации и продолжительности действия индуктора, а также своей генетической конституции и стадии онтогенеза [12–15]. Концепция о роли позиционной информации особенно важна для изучения первичных физиологических процессов, ведущих к инициации развития органов. В роли индукторов могут выступать разные факторы: ионы Ca^{2+} , электрические сигналы, трофические и гормональные факторы. Один и тот же морфоген может играть неодинаковую роль в зависимости от его локализации, концентрации, генотипа и стадии онтогенеза растения. В типичном случае в качестве регуляторов морфогенеза выступают фитогормоны; они же преимущественно определяют и реакцию растения на воздействие стрессора.

Известно, что способность клеток меристемы адекватно воспринимать позиционную информацию нарушается при воздействии острого и хронического облучения [2, 3]. Одним из главных фитогормонов, участвующих в дифференциации органов и регуляции органогенеза растений, является гетероауксин [4, 6, 8]. Понять плеiotропный характер действия ауксинов и механизм выбора клеткой одного определенного типа ответа из множества можно посредством избирательного усиления одной из ауксининдуцируемых программ, примером чего является активация регенерации придаточных корней в системе с заторможенными ростовыми процессами в надземных органах. Изучение особенностей рецепции и гормональной сигнализации в ауксинзависимой дифференциации зачатков органов, а также модификация этой программы действием стрессовых факторов является одним из приоритетных и малоизученных направлений в современной биологии развития. Задача настоящего этапа работы состояла в анализе воздействия гамма-облучения на регенерационную способность отрезков эпикотилей и интактных проростков гороха с точки зрения позиционной информации.

Методика

Объектом исследования были проростки гороха (*Pisum sativum* L., сорт Комет) в двух сериях опытов. В первой серии в качестве модельной системы использовали отрезки эпикотиля. Для этого 4–8-суточные проростки подвергали гамма-облучению дозами 1, 3, 6 и 10 Гр. Сразу после облучения у проростков удаляли верхушки с листьями и семядоли с корнем, полученные отрезки эпикотиля погружали дистальным концом в перлит для укоренения, поддерживая температуру 22 °С и условия влажной камеры. Таким образом, первоначальный градиент ИУК не подпадал под непосредственное воздействие облучения. Спустя 7 сут, оценивали частоту образования придаточных корней и их генезис. Для этого изготавливали временные препараты из поперечных и продольных срезов черенков и окрашивали их метиленовым синим или ацетоорсеином.

Во второй серии опытов применяли высокие дозы облучения, которые заведомо нарушали позиционную информацию во взаимоотношении стебель—корень. Для этого 3-суточные проростки облучали дозами 8, 10, 13 и 16 Гр и переводили в условия водной культуры. Через 48 ч после облучения корневые апексы фиксировали, изготавливали из них давленные препараты, окрашенные ацетоорсеином. На 8- и 10-е сутки культивирования из корневых апексов изготавливали постоянные цитологические препараты, окрашенные по Фельгену согласно общепринятой цитологической методике [5]. В течение двух недель культивирования проростков определяли прирост их фитомассы и коррелятивные отношения между развитием корня и побега. В этой серии опытов исходный градиент ИУК мог подвергаться изменениям под воздействием облучения, поскольку ткани-продуценты фитогормона являются, как известно, критическими. Однако, поскольку регуляторные системы, ответственные за гомеостаз метаболизма, характеризуются более высокой радиостойчивостью, чем ответственные за пролиферацию клеток, мы полагали, что градиент ИУК, относящийся к консервативной и устойчивой метаболической компоненте, был подвержен незначительным модификациям со стороны облучения.

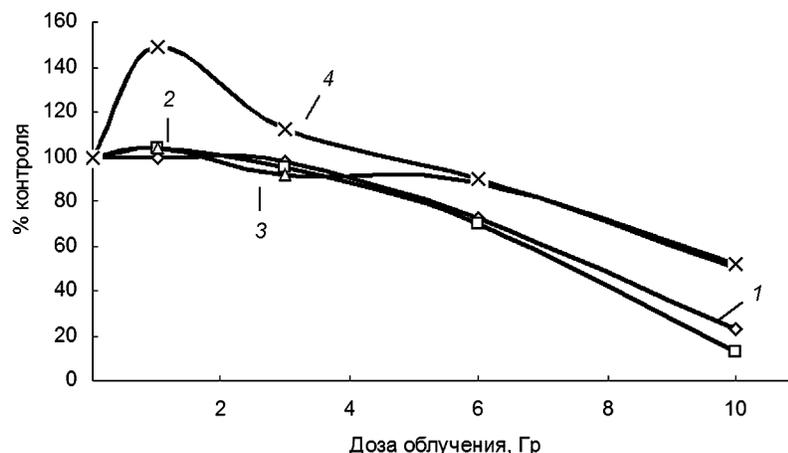


Рис. 1. Зависимость корнеобразования черенков гороха от дозы облучения:
 1 — число стеблей с корнями; 2 — число корней на 1 стебель; 3 — число корней на 1 стебель с корнями;
 4 — длина придаточных корней, мм

Результаты и обсуждение

Воздействие острого облучения на образование придаточных корней. Изучением регенерации корней на отрезках эпикотилей разновозрастных проростков установлено, что 4—5-суточные проростки были еще не вполне способны к корнеобразованию. Лучшие показатели регенерации наблюдали у 7—8-суточных проростков, что, по-видимому, связано как с формированием гормонального статуса, так и компетенции клеток меристемы к фитогормонам у растений этого возраста. В контроле регенерация корней на дистальном конце эпикотиля осуществлялась прямым путем через активацию пролиферации клеток сосудистой (флоэмной) паренхимы вблизи поверхности среза. В пролиферативной активности этих клеток, которая обуславливает регенерационные свойства корнеобразования, отмечена зависимость от дозы облучения (рис. 1). В контроле инициали корней закладывались синхронно, по два от каждого из двух сосудистых пучков (рис. 2). При облучении дозой 1 Гр наблюдалась

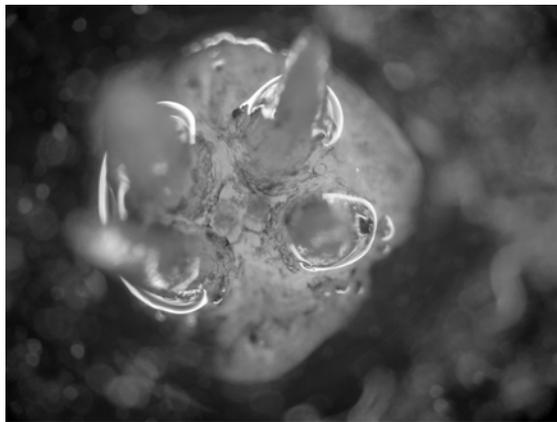


Рис. 2. Синхронный рост придаточных корней в вертикальной плоскости (контроль)

стимуляция роста придаточных корней (104 % контроля (К) по частоте образования корней и 149 % К — по длине корней) (см. рис. 1). Закладка зачатков корней осуществлялась вблизи поверхности среза менее синхронно и упорядоченно (рис. 3). Корни отрастали вертикально по вектору гравитации или незначительно отклонялись от вертикальной оси. Доза 3 Гр слабо влияла на интенсивность корнеобразования (95,6 % К), но

стимулировала рост корней (112 % К) и закладку корневых примордиев выше по оси стебля (см. рис. 1, 4, 5). В последнем случае пространственная ориентация роста корней отклонялась от вертикальной и составляла угол приблизительно 45° к вертикальной оси. Длина придаточных корней варьировала. Доза 6 Гр угнетала корнеобразование (70 % К) и рост корней (90 % К) (см. рис. 1, 6, а), а доза 10 Гр почти полностью блокировала пролиферативную активность сосудистой паренхимы (13 % К) и тормозила рост тех корней, которые все же закладывались (52 % К) (см. рис. 6, б). Закладке инициалей при высоких дозах облучения (от 6 Гр и выше) часто предшествовал процесс каллюсогенеза на поверхности дистального среза эпикотиля (см. рис. 6, а, б).

Таким образом, компетенция клеток-мишеней к ИУК и отрастание корней зависели от возраста проростков и дозы облучения. Регенерационная способность клеток сосудистой паренхимы стебля носила дозозависимый характер: дозы до 3 Гр слабо стимулировали корнеобразование и в большей степени рост придаточных корней, а также влияли на порядок их заложения и ориентацию роста. Дозы от 6 Гр и больше угнетали прежде всего заложение инициалей, а рост корней ингибировался в меньшей степени. Следовательно, под влиянием небольших доз облучения происходило изменение чувствительности к фитогормонам, в частности повышение порога чувствительности к ИУК клеток-мишеней в сосудистой паренхиме стебля и меристеме придаточных корней, вследствие чего изменялись частота, порядок и пространственная ориентация сайтов реге-



Рис. 3. Стимуляция корнеобразования при облучении дозой 1 Гр. Варьирование длины корней

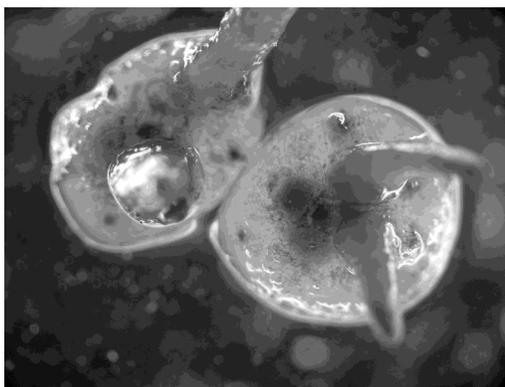


Рис. 4. Изменение порядка корнеобразования при облучении дозой 3 Гр

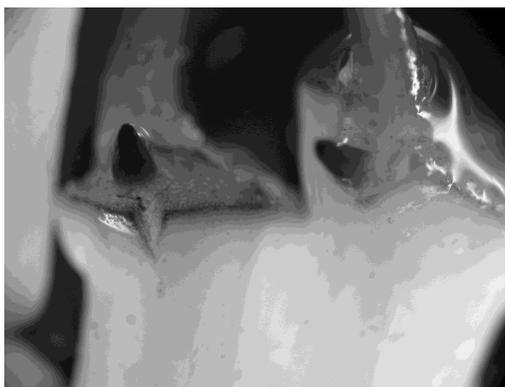


Рис. 5. Закладка придаточных корней на разной высоте и под углом относительно продольной оси стебля при облучении дозой 3 Гр

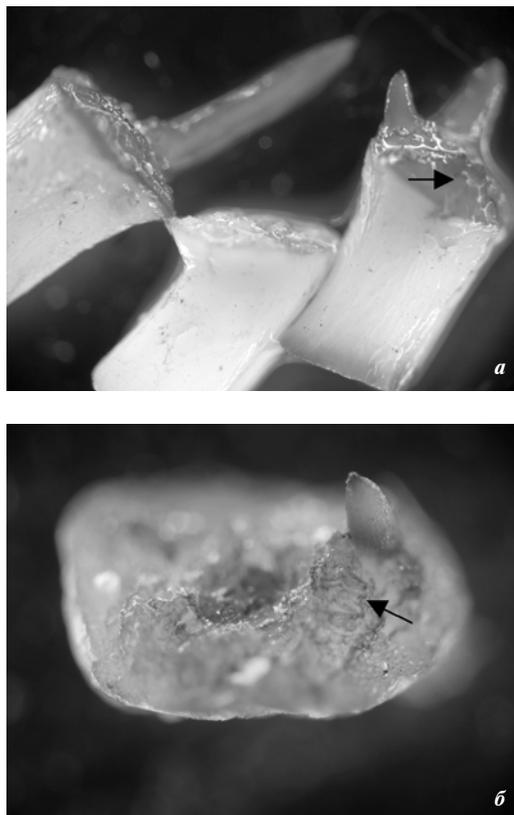


Рис. 6. Угнетение корнеобразования при облучении дозами 6 (а) и 10 Гр (б):

а — образованию корней может предшествовать каллюсогенез; б — образование придаточного корня после каллюсогенеза (указано стрелкой)

нерации, а также усиливались ростовые процессы в придаточных корнях. По-видимому, полудетальные дозы и выше блокируют регенерационные процессы на двух уровнях. Первом — при закладке инициалей придаточных корней через утрату компетенции клеток-мишеней к ИУК и втором — при развитии придаточных корней из-за угнетения пролиферации в пуле клеток, производных клеток-мишеней, чувствительных к ИУК, а также к этилену. Закладке инициалей при больших дозах облучения может предшествовать каллюсообразование как процесс реабилитации морфогенетических потенциалов образовательных тканей.

Действие острого облучения на развитие интактных проростков. Анализ восстановительных процессов с точки зрения позиционной информации. Используемые дозы от 8 до 16 Гр тормозят прежде всего экспоненциальную фазу прироста фитомассы проростков,

основу которой составляет растяжение первых междоузлий побега и закладка новых узлов. При дозе 8 Гр формирование стебля подавлялось сильнее, чем корня, а при 10 Гр и выше развитие надземной части практически полностью блокировалось. Развитие корневой системы заметно тормозилось при всех дозах, но особенно при дозах от 13 Гр и выше. Отличие в развитии надземной и корневой частей проростков определялось, по-видимому, степенью подавления прежде всего процессов растяжения, в основе которых лежит дифференциальная чувствительность к концентрационному градиенту ИУК клеток медуллярной меристемы междоузлий и зоны растяжения корня. Известно, что оптимум концентрации ИУК, индуцирующий эти процессы, в корне почти вдвое ниже, чем в стебле [9]. Доза в 8 Гр, по-видимому, является критической в отношении реализации морфогенетического потенциала проростков. Несмотря на частичное сохранение ростовой активности проростков при этой дозе, корреляция между развитием корневой системы и стебля могла нарушаться. При дозе в 10 Гр эта корреляция исчезла: при формировании побега не развивались главный корень и боковые ответвления, и, наоборот, формирование корневой системы, как правило, не соотносилось с развитием побега. Это может указывать на нарушение позиционной информации и коррелятивных взаимоотношений стебель—корень, в

частности потерю клетками стеблевой меристемы компетенции к цитокинину, включающему программу побегообразования, и к ИУК, ответственной за растяжение междоузлий. Со стороны клеток перицикла, очевидно, утрачивается компетенция к ИУК и этилену, индуцирующих программу корнеобразования [7, 9].

Цитогенетический анализ корневой меристемы проростков, проведенный спустя 48 ч после облучения, выявил возрастающую частоту хромосомных aberrаций: 60, 66, 76 и 84 % соответственно дозам 8, 10, 13 и 16 Гр. Число aberrаций на клетку возрастало с дозой от 1,1 до 2,3, а нагруженность aberrациями aberrантной клетки — с 1,9 до 2,7. Следовательно, патология 60 % пролиферирующих клеток корневой меристемы гороха при распределении 1,1 aberrации на клетку и 1,9 — на aberrантную клетку еще совместима с выживанием, органогенезом и сохранением способности к интерпретации позиционной информации клетками меристемы проростков. Патология 66 % пролиферирующих клеток при распределении 1,6 aberrации на клетку и 2,3 — на aberrантную клетку сопровождается нарушением способности к интерпретации позиционной информации меристемой стебля и, как следствие — блокированием органогенеза и растяжения междоузлий. Причиной этого может быть потеря компетенции клетками-мишенями к фитогормонам (вследствие мутагенеза) и снижение минимально необходимого числа («критической массы») компетентных клеток. Другая причина потери позиционной информации клетками меристемы может быть обусловлена нарушениями в ауксинзависимой сигнальной системе и экспрессии ауксинзависимых генов семейства *Aux/IAA* и *ARF* [11].

Дальнейшее возрастание частоты aberrаций до 76 % сопровождается полной остановкой роста не только стебля, но и корня. Тем не менее в корневых апексах проростков при облучении высокими дозами (13 и 16 Гр) происходили восстановительные процессы. Регенерационные процессы в главном корне проростков обнаруживались на 6—7-е сутки после облучения и осуществлялись на фоне деградациии множества клеток первичной коры, меристемы, эпидермиса и корневого чехлика. Проллиферация клеток перицикла обеспечивала частичное восстановление тканей первичной коры и стелы в зоне дифференциации корня (рис. 7). При этом наблюдалась очаговая или сплошная (вдоль продольной оси корня) пролиферация клеток перицикла. Реже в зоне дифференциации обнаруживалось заложение инициалей придаточных корней (рис. 8).

Репопуляционное восстановление проксимальной меристемы приводило к формированию нового апекса, возобновляющего рост главного корня (рис. 9). Число aberrаций в клетках восстановленной меристемы резко снижалось, но не достигало нормы. В некоторых случаях регенерация апикальной меристемы следовала после каллюсогенеза (на месте проксимальной меристемы). Действительно, недифференцированные клетки паренхимы каллюса могут обладать компетенцией к ауксину (или другому морфогену), что и обуславливает включение ауксинзависимой программы корнеобразования в каллюсной культуре клеток [1]. По-видимому, восстановлению компетенции к ИУК в корневых апексах должны предшествовать пролиферация выживших клеток меристемы (или паренхимы), восстановление минимально необходимого объема популяции этих клеток и путей трансдукции ауксинзависимой сигнальной системы. Итак, доза в 8 Гр при патологии 60 % пролиферирующих клеток корневой меристемы, по-видимому, является критической в отно-

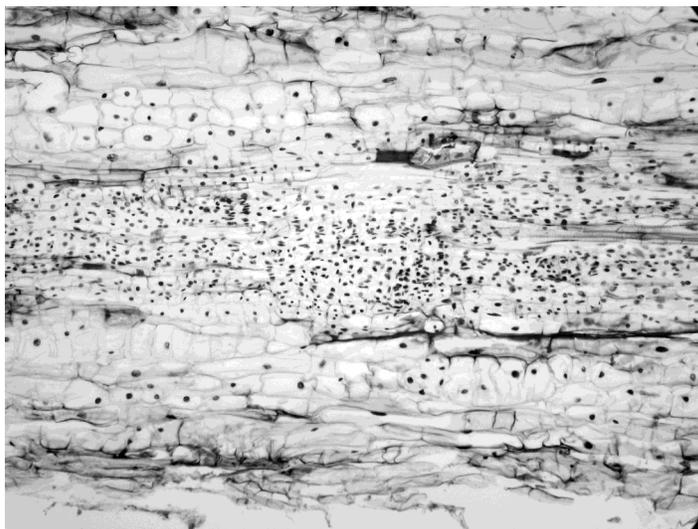


Рис. 7. Восстановительные процессы в корне при облучении дозой 16 Гр. Пролиферация клеток перицикла на границе стелы

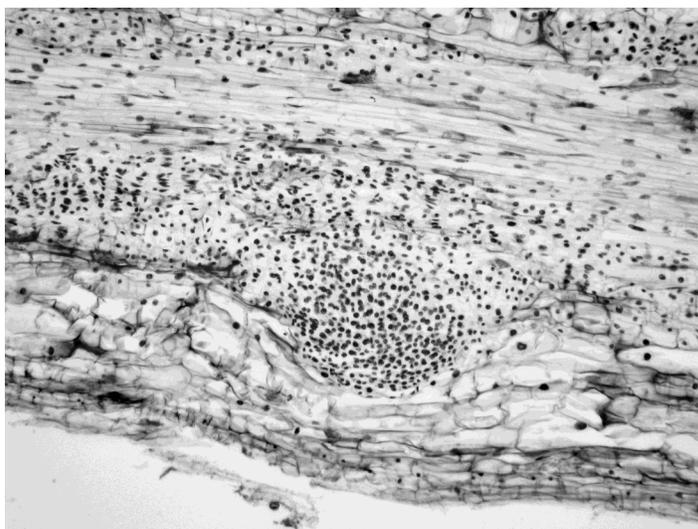


Рис. 8. Закладка инициали придаточного корня при облучении дозой 16 Гр

шении реализации морфогенеза проростков. При дозе 10 Гр (патология 66 % клеток меристемы) блокируются ростовые процессы в стебле и закладка боковых ответвлений в главном корне, что может быть обусловлено потерей клетками меристемы способности адекватно интерпретировать свою позиционную информацию. При большей нагруженности абберациями нарушения морфогенеза прогрессивно нарастают, но сопровождаются регенерационными и репопуляционными восстановительными процессами в апексе главного корня, не обеспечивающими однако выживание проростков.

Что касается косвенного характера интерпретации результатов, то, как уже отмечалось, исследуемые процессы являются маркерами на градиент ИУК. Наше предположение об отсутствии значительных изменений градиента ИУК под влиянием острого облучения основано на том,

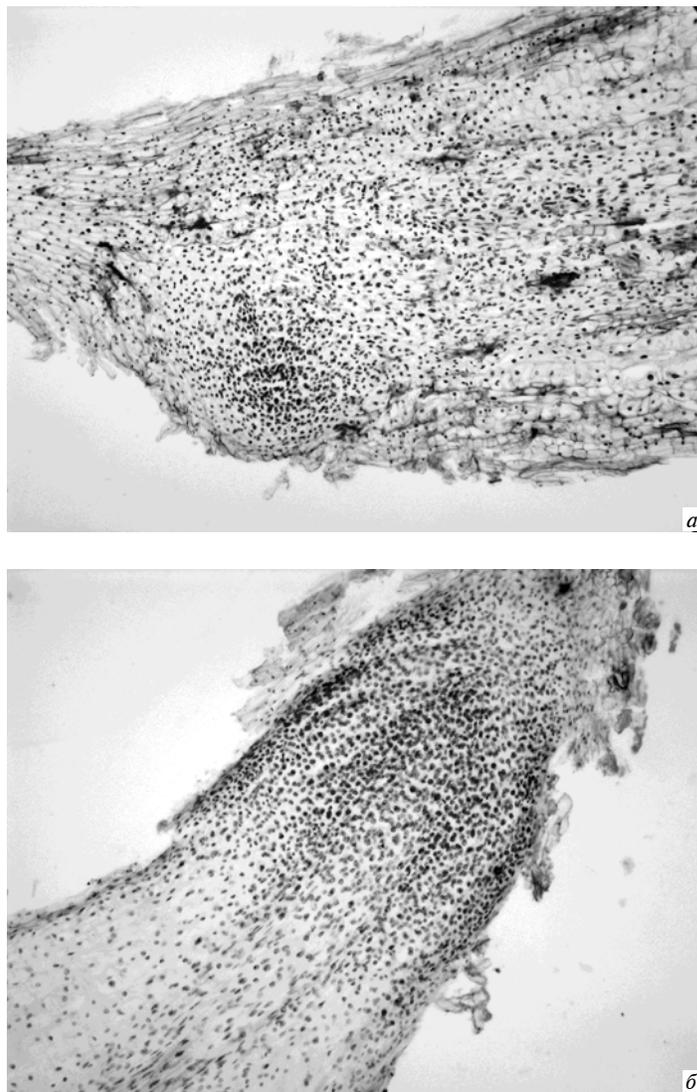


Рис. 9. Репопуляционное восстановление меристемы корня при облучении дозами 16 (а) и 13 Гр (б)

что градиент ИУК, определяющий полярность растения, так же, как энергозависимый транспорт ИУК, относится к консервативной и устойчивой метаболической компоненте, характеризующейся более высокой радиоустойчивостью, чем пролиферация клеток. Сходство количественных данных по регенерационным процессам в обеих сериях опытов подтвердило допустимость подобной трактовки.

Таким образом, регенерационный потенциал тканей сосудистой паренхимы проводящего пучка отрезков эпикотилия гороха зависит от возраста проростков и дозы облучения. Регенерационная способность появляется в меристеме проростков на 7—8-е сутки культивирования, что, по-видимому, отражает формирование гормонального статуса и компетенции клеток-мишеней к фитогормонам у растений этого возраста. Регенерационный потенциал клеток сосудистой паренхимы носит дозозависимый характер: дозы до 3 Гр стимулируют корнеобразование и рост

корней, влияют на порядок закладки инициалей и ориентацию роста корней, а от 6 Гр и выше — угнетают регенерацию. Рост корней ингибируется меньше, чем заложение инициалей. Полулетальные и выше дозы блокируют регенерационные процессы на двух уровнях: при закладке инициалей придаточных корней через утрату компетенции клеток-мишеней к ИУК и при развитии придаточных корней из-за угнетения пролиферации в пуле клеток, производных клеток-мишеней, чувствительных к ИУК и этилену. При высоких дозах острого облучения регенерация может происходить непрямым путем, через каллюсогенез.

Регенерационные процессы в главном корне проростков, облученных высокими дозами, начинались на 6—7-е сутки после облучения. Они протекали в двух плоскостях корня: латеральной, обеспечивая частичное восстановление тканей первичной коры и стелы в зоне дифференциации, и продольной, восстанавливая апикальную меристему и зону растяжения. Хотя с увеличением дозы облучения возрастает нагруженность меристемы и отдельных клеток абберрациями, а также усиливается степень повреждения тканей апекса, восстановительные процессы осуществляются в диапазоне всех примененных доз. В отношении реализации морфогенеза доза в 8 Гр, по-видимому, является критической. С увеличением дозы облучения корреляция между развитием корневой системы и стебля нарушалась. При большей нагруженности абберрациями индуцируются регенерационные и репопуляционные механизмы восстановления, обеспечивающие в некоторых случаях выживание апексов главного корня, но не гарантирующие восстановления морфогенеза. По-видимому, восстановление способности к интерпретации позиционной информации возможно лишь после восполнения некоего минимума численности популяции клеток латеральной и апикальной меристем, а также структуры тканей зоны дифференциации, обеспечивающих пути трансдукции ауксинзависимой сигнальной системы.

1. Бутенко Р.Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений // 35-е Тимирязевское чтение. — Л.: Наука, 1975. — 51 с.
2. Гродзинский Д.М. Модификация отдаленных эффектов хронического облучения // Наук. праці Миколаїв. ун-ту ім. Петра Могили. Сер. Екологія. Спецвипуск. — 2008. — 102, вип. 89. — С. 7—17.
3. Гродзинський Д.М. Парадигми сучасної радіобіології // Радіобіологічні ефекти хронічного опромінення у зоні впливу Чорнобильської катастрофи. — К.: Наук. думка, 2008. — С. 9—32.
4. Кулаева О.Н., Кузнецов В.В. Аналитические обзоры. Новейшие достижения и перспективы изучения механизма действия фитогормонов и их участия в сигнальных системах целого растения // Вестн. РФФИ. — 2004. — № 2. — С. 12—26.
5. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. — М.: Колос, 1974. — 245 с.
6. Пенин А.А., Ежова Т.А., Чуб В.В. Принципы формализации данных для построения генетико-морфологической модели развития побега цветковых растений // Онтогенез. — 2002. — 33, № 6. — С. 421—428.
7. Полевой В.В. Роль ауксина в системах регуляции у растений // 44-е Тимирязевское чтение. — Л.: Наука, 1986. — 80 с.
8. Полевой В.В. Фитогормоны. — Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. — 248 с.
9. Полевой В.В., Саламатова Т.С. Физиология роста и развития растений. — Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1991. — 239 с.
10. Чуб В.В. Роль позиционной информации в регуляции развития органов цветка и листовых серий побегов: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Москва, 2008. — 45 с.
11. Shi-Weng Li, Lingui Xue, Shijian Xu et al. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting // Bot. Rev. — 2009. — 75, N 2. — P. 230—247.
12. Tsikolia N. The role and limits of a gradient based explanation of morphogenesis: a theoretical consideration // Int. J. Dev. Biol. — 2006. — 50. — P. 333—340.

13. *Wolpert L.* One hundred years of positional information // *Trends Genet.* — 1996. — **12**. — P. 359—364.
14. *Wolpert L.* Positional information and pattern formation and development // *Dev. Genet.* — 1994. — **15(6)**. — P. 485—490.
15. *Wolpert L.* The progress zone model for specifying positional information // *Int. J. Dev. Biol.* — 2002. — **46**. — P. 869—870.

Получено 07.07.2009

ВПЛИВ ГОСТРОГО ОПРОМІНЕННЯ НА ІНТЕРПРЕТАЦІЮ ПОЗИЦІЙНОЇ
ІНФОРМАЦІЇ КЛІТИНАМИ АПІКАЛЬНОЇ ТА ЛАТЕРАЛЬНОЇ МЕРИСТЕМИ
ГОРОХУ

О.А. Кравець, О.Н. Міхеев, Л.Г. Овсянникова, Д.М. Гродзинський

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України,
Київ

Наведено результати дослідження регенераційних процесів у проростках гороху за дії гострого опромінення. Проаналізовано дані цито-, гістологічних пошкоджень і відновлювальних процесів у корневих апексах з погляду позиційної інформації, зокрема компетенції клітин меристеми до ІОК. Обговорено роль мінімального об'єму меристеми і зони диференціювання апекса кореня, необхідних для відновлення сигнальної системи і позиційної інформації.

EFFECT OF ACUTE IRRADIATION ON POSITIONAL INFORMATION
INTERPRETATION OF APICAL AND LATERAL MERISTEM CELLS IN PEA

E.A. Kravetz, A.N. Mykhyeyev, L.G. Ovsiannikova, D.M. Grodzinsky

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine
148 Acad. Zabolotnogo St., Kyiv, 03680, Ukraine

The results of investigation of regeneration processes in pea seedlings under effect of acute irradiation are represented. Data about cyto- and histological damages and restoring processes in root apexes with point of view of positional information, specifically competency of meristem cells to IAA are analysed. The role of minimal volume of meristems and differential zone necessary for restoration of signaling network and positional information is discussed.

Key words: *Pisum sativum* L., acute irradiation, meristem, adventitious roots, chromosomal aberrations, regeneration, competency of cells to IAA.