

Л.М. ЛАЗАРЕНКО, В.Ф. БЕЗРУКОВ

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко

## ДИНАМИКА ХРОМОСОМНОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ БАТУНА (*ALLIUM FISTULOSUM* L.): ГАММА-ОБЛУЧЕНИЕ СЕМЯН РАЗНОГО СРОКА ХРАНЕНИЯ



*Исследованы хромосомные aberrации в клетках корневой меристемы проростков лука батун при гамма-облучении (5 и 10 Гр) семян разных возрастных групп (7, 19, 31, 43 и 55 мес хранения). Облучение в дозе 5 Гр значимо повышало частоту aberrантных анафаз (ЧАА) в 31- и 43-месячных семенах; облучение в дозе 10 Гр приводило к повышению ЧАА в семенах всех возрастных групп. У 7-месячных семян при дозе 10 Гр частота мостов снижалась, а доля двойных мостов, напротив, повышалась практически до уровня контроля старых (55 мес). Снижение доли двойных мостов почти до уровня контроля 7-месячных наблюдали в старых (55 мес) семенах при 5 Гр. Особенности проявления хромосомной нестабильности и всхожести у 31-месячных семян указывают на то, что третий год хранения является критическим для семян батун.*

© Л.М. ЛАЗАРЕНКО, В.Ф. БЕЗРУКОВ, 2006

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2006. № 4

**Введение.** Хромосомная нестабильность (ХН) как реакция генома на мутагенное влияние повышается с возрастом организма. Показано, что чем выше спонтанный уровень частоты aberrантных анафаз (ЧАА), тем более вероятно проявление мутагенного эффекта известных мутагенов, к примеру, пирогаллола и формальдегида [1, 2]. Следовательно, при старении организма можно ожидать повышения чувствительности генома к действию мутагенов. Как показано ранее, возрастная динамика хромосомной нестабильности имеет колебательный характер [2], причем чем выше скорость возрастных изменений хромосомной нестабильности, тем больше бывает амплитуда колебаний и тем дальше уклоняются от линии регрессии не только максимальные, но и минимальные значения ЧАА [2]. В связи с такой непростой картиной спонтанного мутагенеза при старении вопрос о возрастных изменениях реакции генома на мутагенные воздействия остается открытым.

Цель настоящей работы состояла в изучении возрастных особенностей реакции генома на гамма-облучение генетически однородных семян *Allium fistulosum* L. разного возраста, хранившихся в одинаковых условиях. Выбор гамма-облучения обусловлен тем, что это универсальный и общепринятый способ оценки нестабильности генома, легко дозируемый и удобный в работе.

**Материалы и методика.** Использовали семена лука батун (*Allium fistulosum* L.) сорта Майский, которые собирали ежегодно с растений, выросших на одном и том же участке из исходно одной партии семян. Семена хранили в стеклянной негерметически закрытой посуде при комнатной температуре в темном шкафу. На момент постановки эксперимента семена, собранные в разные годы, представляли пять возрастных групп — 7, 19, 31, 43 и 55 мес, что соответствует 1, 2, 3, 4 и 5 годам хранения.

Сухие семена подвергали гамма-облучению от источника  $^{60}\text{Co}$  (установка «Исследователь») в дозе 5 и 10 Гр. Семена всех возрастных групп облучали одновременно. При выборе доз ориентировались на результаты облучения семян *A. sera* L. [3]. Контрольные варианты эксперимента представлены необлученными семенами тех же пяти групп.

Семена проращивали в чашках Петри на фильтрах, смоченных дистиллированной во-

дой, при температуре  $24 \pm 1,5$  °С. Корешки длиной 4—9 мм фиксировали в смеси этанола и ледяной уксусной кислоты (3:1). Клетки корневой меристемы анализировали анафазным методом на давленных препаратах, окрашенных ацеторсеином [4].

Влияние гамма-облучения оценивали по всхожести семян через 72 ч с момента замачивания. Об изменении стабильности генома судили по частоте aberrантных анафаз (ЧАА, %), поврежденности aberrантных клеток (ПАК) относительно контроля и наличию мульти-aberrантных клеток (5 aberrаций на клетку и более). При вычислении ПАК мульти-aberrантные клетки не учитывали. Частоту мостов определяли как долю мостов от общего количества всех aberrаций, выраженную в процентах. Частоту двойных мостов вычисляли как долю от общего количества мостов.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Результаты исследования хромосомной нестабильности и всхожести семян сведены в таблицу. Всхожесть облученных семян всех возрастных групп, кроме 31-месячных, не отличалась существенно от всхожести семян контрольных

групп. Всхожесть 31-месячных семян снижалась после облучения в дозе 5 Гр и еще больше после 10 Гр (таблица, рис. 1).

Высокий уровень спонтанной мутабельности *A. fistulosum* L. позволяет получать достоверные результаты при относительно небольшом объеме анализируемого материала. При наличии достаточного количества материала анализировали более 500 анафазных клеток. Меньший объем анализируемых анафаз (в случае старых семян) не отражается на полученных результатах, поскольку с возрастом частота повреждения хромосом повышается.

При старении семян хромосомная нестабильность возрастает. Как видно из таблицы и рис. 2, ЧАА и ПАК в необлученных семенах зависят от срока хранения (возраста) семян: чем старше семена, тем выше ЧАА и ПАК. Отсутствие различий по ЧАА в 19- и 31-месячных семенах (таблица, контроль) может объясняться нелинейным характером возрастной динамики ЧАА при старении семян. При облучении семян в дозе 5 Гр достоверное повышение ЧАА наблюдается лишь в 31- и 43-месячных семенах (рис. 2, а). Облучение в дозе

Влияние гамма-облучения на всхожесть и цитогенетические показатели разновозрастных семян *Allium fistulosum* L.

Возраст семян, мес	Всхожесть, %	Изучено анафаз, n	ЧАА, %	ПАК	МАО	%	
						М	ДМ
Контроль							
7	66 ± 4,74	476	3,36 ± 0,83	1,20 ± 0,12	0	95,0 ± 4,9	15,8 ± 8,4
19	77 ± 4,21	494	8,91 ± 1,28	1,52 ± 0,10	0	48,3 ± 6,5	31,0 ± 8,6
31	86 ± 3,47	419	8,35 ± 1,35	1,38 ± 0,11	0	70,8 ± 6,6	29,4 ± 7,8
43	62 ± 4,85	341	34,60 ± 2,58	1,49 ± 0,14	9	57,4 ± 3,7	47,5 ± 5,0
55	36 ± 4,80	227	57,71 ± 3,28	1,47 ± 0,19	8	48,4 ± 3,4	46,6 ± 4,9
5 Гр							
7	66 ± 4,74	526	5,51 ± 1,00	1,17 ± 0,07	0	60,0 ± 8,3	23,8 ± 9,3
19	76 ± 4,27	524	10,31 ± 1,33	1,16 ± 0,05	1	53,0 ± 6,1	42,9 ± 8,4
31	71 ± 4,54	419	21,00 ± 1,99	1,45 ± 0,10	1	56,3 ± 4,4	31,0 ± 5,5
43	66 ± 4,74	292	42,81 ± 2,90	1,66 ± 0,12	5	48,2 ± 3,6	43,0 ± 5,1
55	38 ± 4,85	147	61,22 ± 4,02	1,54 ± 0,08	5	50,8 ± 4,5	20,3 ± 5,0
10 Гр							
7	59 ± 4,92	498	23,90 ± 1,91	1,58 ± 0,14	3	45,5 ± 3,8	52,5 ± 5,6
19	80 ± 4,00	544	43,38 ± 2,12	1,59 ± 0,07	7	52,0 ± 2,6	45,2 ± 3,5
31	52 ± 4,99	425	56,00 ± 2,41	1,56 ± 0,08	8	47,8 ± 2,6	37,4 ± 3,7
43	60 ± 4,90	372	50,81 ± 2,59	1,60 ± 0,10	7	58,7 ± 2,9	41,0 ± 3,8
55	35 ± 4,77	229	76,86 ± 2,79	1,71 ± 0,07	12	55,7 ± 3,0	47,8 ± 4,0

Примечания. ЧАА — частота aberrантных анафаз, %; ПАК — поврежденность aberrантной клетки; МАО — количество мульти-aberrантных анафаз; М — мосты, % от всех aberrаций; ДМ — двойные мосты, % от всех мостов.

10 Гр приводит к достоверному повышению ЧАА в семенах всех возрастных групп. Однако, как видно из рис. 2, а, в 7, 19, 31-месячных семенах повышение ЧАА особо выражено.

Изменений ПАК после облучения семян в большинстве возрастных групп не выявлено. Достоверное повышение ПАК отмечено только у 7-месячных семян после облучения в дозе 10 Гр, а снижение — у 19-месячных семян, облученных в дозе 5 Гр (таблица, рис. 2, б).

Мультиабберрантные анафазы при естественном старении семян *A. fistulosum* L. появляются достаточно поздно — единичные после 3 лет хранения, а то и позже: в контроле появление мультиабберрантных анафаз отмечено для 43- и 55-месячных семян (таблица). С увеличением дозы облучения появление мультиабберрантных анафаз смещается в более молодые возрастные группы. При дозе 5 Гр мультиабберрантные клетки наблюдаются в 19-месячных семенах, а при дозе облучения 10 Гр — уже в 7-месячных семенах. Появление анафаз с большим числом aberrаций наблюдала Орлова [7] при температурно ускоренном старении молодых семян батуна. В семенах *A. sepa* под влиянием гамма-радиации также отмечено повышение количества клеток с множественными aberrациями [8]. Так как ЧАА в семенах *A. sepa* при старении нарастает гораздо медленнее, чем у *A. fistulosum*, можно предположить, что в молодых семенах *A. fistulosum* при гамма-облучении появление мультиабберрантных анафаз отражает индуцированное повышение хромосомной нестабильности, а не является простым следствием повышения ПАК.

Возрастные различия в реакции семян на гамма-облучение обнаружены не только для параметров, характеризующих жизнеспособность семян и стабильность хромосом, но и для возрастных изменений спектра хромосомных aberrаций. Как видно из рис. 3, а, частота мостов в контрольных семенах с возрастом снижается. При облучении молодых (7 мес) семян частота мостов резко падает, причем чем больше доза облучения, тем значительно снижается уровень мостов. В облученных семенах всех возрастных групп частота мостов в основном колеблется в пределах 45,5—60,0%. Это отличается от естественной картины возрастной динамики частоты мостов при спон-

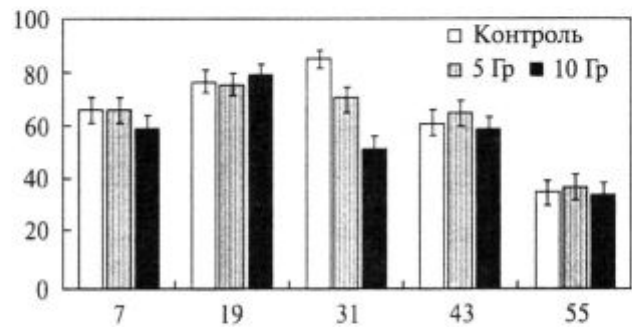


Рис. 1. Всхожесть семян *Allium fistulosum* L., % (по вертикали) в зависимости от их возраста, месяцы (по горизонтали) на момент облучения и дозы облучения

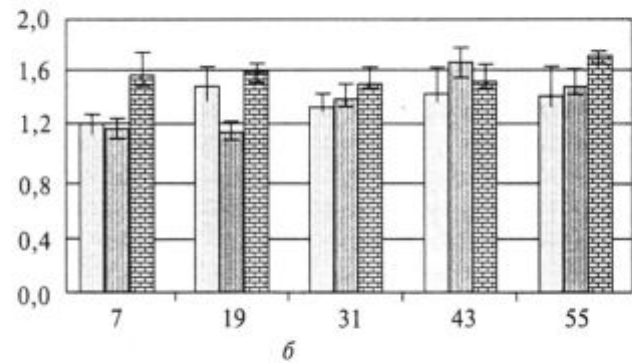
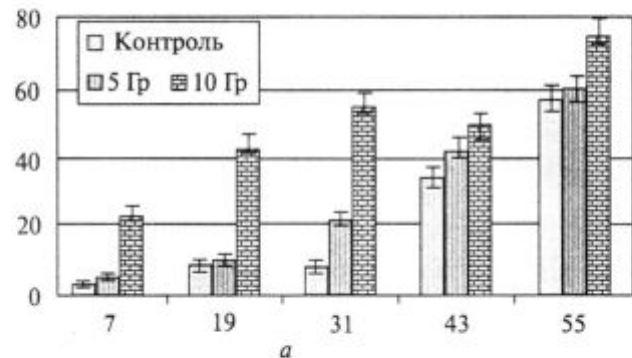


Рис. 2. Влияние возраста, месяцы (по горизонтали) и дозы облучения на параметры хромосомной нестабильности семян *Allium fistulosum* L.: а — частота aberrантных анафаз (ЧАА, %, по вертикали); б — поврежденность aberrантной клетки (ПАК — среднее количество aberrаций на aberrантную клетку, по вертикали). Возраст указан на момент облучения семян

танном старении семян батуна (рис. 3, а). Следует отметить, что при естественном старении семян батуна на фоне повышения общего количества aberrаций доля мостов снижается, а доля двойных мостов возрастает, что было показано и в других работах [2, 5].

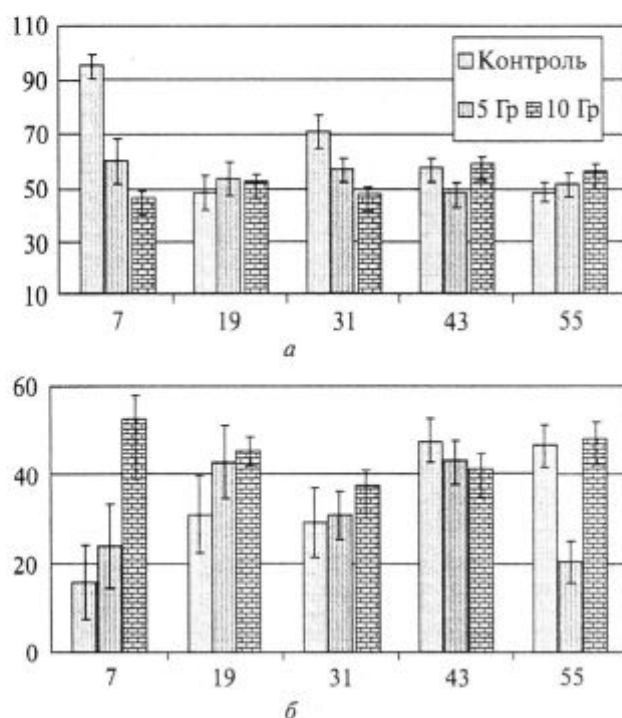


Рис. 3. Изменения спектра aberrаций у *Allium fistulosum* в зависимости от возраста семян на момент облучения (по горизонтали, мес) и дозы облучения. По вертикали: а — частота мостов, %; б — доля двойных мостов от их общего количества, %

В молодых семенах батуна (7 мес) облучение в дозе 10 Гр привело к резкому повышению доли двойных мостов по сравнению с контролем — до уровня старых семян. Подобное (правда, менее выраженное по сравнению с контролем) повышение доли двойных мостов наблюдали и для 19-месячных семян. В остальных возрастных группах семян при дозе облучения 10 Гр изменения доли двойных мостов не наблюдались (рис. 3, б). При облучении в дозе 5 Гр достоверное снижение доли двойных мостов по сравнению с контролем наблюдали в варианте со старыми (55 мес) семенами — до уровня контроля молодых семян (рис. 3, б).

Представленные данные по всхожести необлученных семян отражают обычную картину возрастной динамики всхожести семян батуна [2]. Как правило, всхожесть молодых семян (до 1 года) ниже, чем у двух- и трехлетних. В течение первых двух лет хранения всхожесть повышается; в течение 2, 3-го, иногда 4-го года хранения всхожесть семян батуна на фоне

неравномерных колебаний достигает максимальных значений, после чего (4-й и 5-й годы хранения) всхожесть падает. Данные, приведенные в таблице, хорошо демонстрируют основные этапы возрастных изменений всхожести семян батуна при хранении: нарастание до трех лет и падение всхожести после трех лет хранения (таблица, рис. 1). Можно предположить, что к третьему году хранения в семенах батуна происходят определенные метаболические изменения, связанные либо с накоплением индукторов и стимуляторов, либо с убыванием ингибиторов прорастания. По крайней мере, в этом периоде семена особо чувствительны к воздействию гамма-радиации. Именно на третьем году хранения наблюдаются максимальные (дозозависимые) различия по всхожести у облученных семян и в контроле. В остальных возрастных группах разница между облученными и контрольными семенами незначительна (рис. 1).

Повышение ЧАА и ПАК при старении семян батуна в норме (контроле) имеет нелинейный и колебательный характер [6]. То, что ЧАА в 31-месячных семенах не отличается от аналогичного показателя в 19-месячных семенах (таблица), может быть следствием этого явления. Облучение 19- и 31-месячных семян с практически одинаковым уровнем спонтанной хромосомной нестабильности (соответственно 8,91 и 8,35 %) привело к выявлению существенных различий между ними. Для этих двух возрастных групп ЧАА составила соответственно 10,31 и 21,00 % при облучении в дозе 5 Гр и 43,38 и 56,00 % при дозе 10 Гр (таблица). Это свидетельствует о том, что на самом деле нестабильность хромосом в семенах сроком хранения 31 мес уже гораздо выше, чем в 19-месячных. Возрастная динамика ПАК при естественном старении семян батуна также имеет неравномерно колебательный характер, причем, как правило, амплитуды колебаний ПАК не синхронны колебаниям ЧАА [2, 6].

Можно предположить, что при естественном старении повышение ЧАА и ПАК может быть обусловлено снижением эффективности репарации и с накоплением мутагенных метаболитов, а у молодых семян количество накопленных метаболитов еще невелико и поэтому их влияние не очень существенно. Облучение

приводит к дополнительному повреждению ДНК и, как следствие, к возрастанию ЧАА и ПАК. В то же время снижение ПАК у облученных в дозе 5 Гр 19-месячных семенах при сохранении ЧАА на уровне контроля (таблица) может свидетельствовать об активации репарации.

Определенное представление о механизмах различной реакции на облучение семян разного возраста можно получить при сравнении частоты мостов и доли двойных мостов в разных вариантах (рис. 3). Известно, что мосты образуются вследствие асимметрической транслокации при слиянии образовавшихся центрических фрагментов. Такое слияние — процесс энергозависимый, как это было показано в экспериментах с пшеницей и бобами [9]. Поскольку образование мостов возрастало на фоне снижения ЧАА, авторы рассматривали мосты как показатель интенсивности репарации. Эта точка зрения согласуется с результатами наблюдений возрастной динамики образования мостов при естественном [2] и ускоренном старении семян батуна [7]. Процессы слияния центрических фрагментов у *A. fistulosum* L. происходят достаточно интенсивно: в молодых семенах обнаруживаются мосты, и часто их доля в общем количестве aberrаций преобладает. В очень молодых семенах (1–1,5 мес после сбора урожая) иногда все aberrации представлены мостами. При старении семян на фоне общего возрастания количества aberrаций всех видов доля мостов снижается.

Аберрации хромосомного типа (двойные мосты и фрагменты) — это результат нерепарированных повреждений хромосом, состоявшихся в  $G_1$ -периоде интерфазы. При анафазном методе не всегда удается отличить двойные фрагменты от одинарных, зато мосты хромосомного типа достаточно четко отличаются от мостов хроматидного типа. Это позволяет судить о том, в каком периоде интерфазы происходит повреждение хромосом. Поскольку процессы репарации в основном происходят именно в  $G_1$ -периоде, двойные мосты можно рассматривать как косвенный показатель интенсивности репарации, предшествующей репликации хромосом. С учетом этих соображений обнаруженное нами у гамма-

лученных молодых семян снижение частоты мостов (рис. 3, а) и повышение доли двойных мостов (рис. 3, б) позволяет предположить, что одним из наиболее вероятных последствий облучения является снижение эффективности репарации.

Характеризуя полученные результаты в целом, можно отметить следующее. Облучение в дозе 5 Гр повышает частоту aberrантных анафаз в 31- и 43-месячных семенах; облучение в дозе 10 Гр приводит к повышению ЧАА в семенах всех возрастных групп. Существенное повышение ПАК отмечено при облучении 7-месячных семян в дозе 10 Гр; снижение этого показателя наблюдали при облучении 19-месячных семян в дозе 5 Гр. Гамма-облучение молодых (7 мес) семян батуна приводит к определенным изменениям спектра хромосомных aberrаций: частота мостов при облучении в дозе 10 Гр снижается до уровня, характерного для старых (55 мес) семян; доля двойных мостов при облучении в дозе 10 Гр также повышается до уровня старых (55 мес) семян; в старых (55 мес) семенах, облученных в дозе 5 Гр, доля двойных мостов снижается до уровня, характерного для молодых (7 мес) семян. Гамма-облучение семян батуна в дозе 5 и 10 Гр приводит к снижению всхожести семян, возраст которых на момент облучения составил 31 мес (2,5 года — третий год хранения семян).

Таким образом, реакция генома семян *Allium fistulosum* L. на гамма-облучение зависит от дозы и возраста семян на момент облучения. Особенности проявления хромосомной нестабильности у 7-, 19- и 31-месячных семян, а также всхожести у 31-месячных семян указывают на то, что третий год хранения является критическим для семян батуна.

**SUMMARY.** The chromosome aberrations in root meristem cells of welsh onion (*Allium fistulosum* L.) seeds after gamma-irradiation (5 and 10 Gy) of different-aged seeds (7, 19, 31, 43 and 55 months of storage) were studied. The irradiation dose of 5 Gy significantly increased the frequency of aberrant anaphases (FAA) for 31- and 43-months seeds; the dose of 10 Gy significantly increased the FAA in seeds of all age groups. The irradiation of young (7 months) seeds resulted in decreasing of the fraction of bridges to the control level of the old (55-months) seeds for the dose of 5 Gy and below the control level of the old seeds — for the dose of 10 Gy. Some peculiarities of cyto-

genetic parameters of genome instability and the germinating capacity of the seeds made it possible to suppose that the third year of storage is a critical period for the welsh onion seeds.

**РЕЗЮМЕ.** Досліджено хромосомні аберації в клітинах кореневої меристеми цибулі батун при гамма-опроміненні (5 і 10 Гр) насіння різних вікових груп (7, 19, 31, 43 та 55 місяців зберігання). Опромінення в дозі 5 Гр значуще підвищило частоту аберантних анафаз (ЧАА) у 31- та 43-місячному насінні; опромінення в дозі 10 Гр сприяло підвищенню ЧАА у насінні батуну всіх вікових груп. У 7-місячному насінні, опроміненому в дозі 10 Гр, частота мостів знижувалась, а частка подвійних мостів, навпаки, підвищувалась практично до рівня контролю старого насіння (55 міс). Зниження частки подвійних мостів майже до рівня контролю молодого (7 міс) спостерігали у старому (55 міс) насінні при опроміненні в дозі 5 Гр. Особливості прояву хромосомної нестабільності та схожості у 31-місячного насіння вказують на те, що третій рік зберігання є критичним для насіння батуну.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дубинин Н.П., Шербаков В.К., Юкова Г.С. Мутагенный эффект пирогаллола на фоне разных уровней естественного мутирования клеток // Генетика. — 1967. — № 1. — С. 47—52.
2. Лазаренко Л.М. Цитогенетична оцінка мутабельності *Allium fistulosum* L. (*Liliacea*, *Magnoliophyta*) при старінні насіння : Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — Київ, 1999. — 16 с.
3. Куцоконь Н.К., Безруков В.Ф., Лазаренко Л.М., Рашидов Н.М., Гродзинський Д.М. Кількість аберацій на аберантну клітину як параметр хромосомної нестабільності. 1. Характеристика дозових залежностей // Цитология и генетика. — 2003. — 37, № 4. — С. 20—25.
4. Гостимский С.А., Дьякова М.И., Ивановская Е.В., Монахова М.А. Практикум по цитогенетике : Метод. пособие. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1974. — 171 с.
5. Орлова Н.Н. Естественный мутационный процесс в семенах при их хранении // Усп. соврем. генетики. — 1972. — 4. — С. 206—228.
6. Лазаренко Л.М., Безруков В.Ф. Хромосомная нестабильность растений в системе генетического мониторинга // Проблемы безопасности атомных электростанций и Чернобиля : Наук.-техн. зб. Вип. 3. Част. 2. Парадигми сучасної радіобіології. — Чорнобиль, 2005. — С. 101—105.
7. Орлова Н.Н. Мутационный процесс в семенах лука-батун *Allium fistulosum* при хранении их в разных условиях : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1967. — 21 с.
8. Куцоконь Н.К., Лазаренко Л.М., Безруков В.Ф., Рашидов Н.М., Гродзинський Д.М. Кількість аберацій на аберантну клітину як параметр хромосомної нестабільності. 2. Порівняльний аналіз впливу факторів різної природи // Цитология и генетика. — 2004. — 37, № 1. — С. 55—62.
9. Дубинин Н.П., Руднева С.В., Шербаков В.К. Специфическая модификация спектра структурных мутаций хромосом, возникающих при естественном мутировании // Генетика. — 1967. — № 9. — С. 35—39.

Поступила 29.11.05