

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

5830/83

9/11-83

19-83-509

Э.Гацек, Е.Глинкова, Э.Н.Исмаилова

ИССЛЕДОВАНИЕ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
И ДИНАМИКИ РОСТА КАЛЛУСОВ
Streptis capillaris, *Haemaphysalis gracilis*,
Phaseolus vulgaris ПРИ γ -ОБЛУЧЕНИИ

Направлено в журнал "Радиобиология"

1983

Имеющиеся в литературе сведения о реакции растительной ткани, культивируемой "in vitro", на воздействие ионизирующих излучений, весьма ограничены [1-9]. Отмечается, что каллусная ткань обладает высокой степенью радиорезистентности при γ -облучении. Причины высокой радиорезистентности по сравнению с наблюдаемой в тканях растений, облучаемых "in vivo", к настоящему времени не выяснены. Одной из возможных причин здесь может быть значительная гетерогенность каллусной ткани, выявленная по целому ряду морфологических и функциональных признаков, и наличие межклеточных системных взаимодействий. Гетерогенность затрудняет интерпретацию радиобиологических данных, тем не менее данная модельная система позволяет проводить радиобиологические эксперименты в строго контролируемых условиях.

Целью настоящей работы явилось исследование чувствительности и динамики роста трех видов каллусов при γ -облучении в зависимости от возраста культуры. Для решения этой задачи была разработана методика, которая позволила не только определить зависимость "доза-эффект" по изменению динамики сырого веса каллусной ткани, но и оценить вклад межклеточных взаимодействий в наблюдаемые эффекты.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использованы каллусы *Crepis capillaris*, *Phaseolus vulgaris*, индуцированные из гипокоты проростков простерилизованных семян, высаженных на питательные среды и культивируемых при температуре 27° С и рассеянном дневном освещении. Каллус *Harporhizus gracilis* получен из Института физиологии растений г. Кракова /ПНР/. Питательные среды приготавливали из макроэлементов по методике Мурасиге и Скуга [10], из микроэлементов и витаминов по методике Гамборга В5 [11]. Соотношения ауксинов и кинетина соответственно составляли для креписа 0,9 мг/л NAA и 0,1 мг/л, для гаглопаппуса 0,05 мг/л 2,4 Д и 2 мг/л, для фасоли 2 мг/л 2,4 Д и 2 мг/л. Трансплантацию каллусов проводили в разные сроки в зависимости от цели работы. Для радиобиологических экспериментов использовали эксплантаты как "молодых" /креписа 6-дневного, гаглопаппуса 4-дневного, фасоли 8-дневной/, так и "старых" каллусов /креписа 18-дневного, гаглопаппуса 20-дневного и фасоли 21-дневной/.

Митотический индекс /MI/ вычислялся по формуле $\frac{N_d}{N_s} \cdot 100$,

где N_d - количество делящихся клеток и N_s - количество всех исследованных клеток. Для получения каждой экспериментальной точки просматривалось по 800 ядер [3]. Для мацерации каллусных тканей использовался 4%-ный раствор Cr_2O_3 . Клетки окрашивались 2%-ным ацетоорцеином.

Длину клеток определяли на ланометре типа МРЗ. В каждом образце пятикратно измерялось по 200 клеток. Всего было измерено по 1000 клеток для получения каждой экспериментальной точки.

Определение свежей массы. Для учета роста каллусной ткани определяли прирост сырого веса $W_t - W_0$, где W_0 - исходный вес и W_t - вес каллуса через время t после начала культивирования. Результаты выражали относительно исходного веса: $\frac{W_t - W_0}{W_0}$. Для определения динамики роста каллусов брали по 7 исходных образцов и делили их примерно на 10 равных частей. Каждую часть взвешивали соответственно на 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 сутки. Опыт повторяли 10-кратно. После каждого взвешивания материал фиксировали в смеси Карнуа для нахождения MI и длины клеток. Облучение культуры осуществлялось в стерильных пенициллиновых флаконах без питательной среды с помощью установки "Свет" с источником Cs^{137} мощностью дозы 93 рад/с. Для определения зависимости "доза-эффект" каждый каллус делили на 9 частей - одна часть была контрольной, остальные же соответственно распределяли по дозам. Облучение проводили дозами 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400 Гр. Каждый эксперимент выполняли 6-кратно. После облучения каллусы высаживали на свежую питательную среду. Взвешивание каллусов производилось на 14-е сутки после облучения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1, 2 представлены данные по зависимости изменения сырого веса использованных в экспериментах каллусов /трех видов/ от дозы γ -облучения. Как можно видеть, эта зависимость имеет сложный характер: в области малых доз /до 100 Гр/ она сигмоидного вида /рис. 1в/, при дальнейшем же возрастании дозы облучения эти кривые выходят на плато. Следует отметить, что сложный характер кривых "доза-эффект", полученных на основе такого интегрального теста, как изменение сырого веса, свойствен реакциям большинства высокодифференцируемых тканей растительного происхождения /редукция проростков, подавление роста длины корешков и т.д. [12]. По-видимому, в каллусах сохраняется высокая степень тканевой организации, что и обуславливает реакцию ткани на облучение, подобную реакции целостного растительного

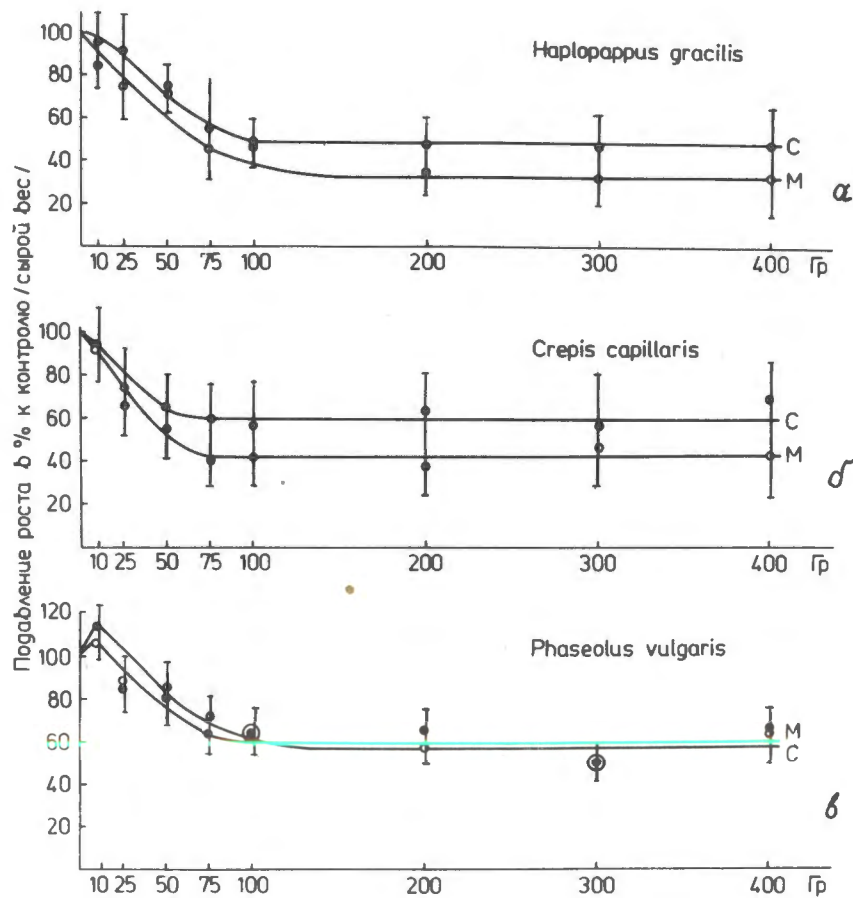


Рис.1. Изменение сырого веса каллусов разного возраста /М - "молодые", С - "старые"/, различных видов в зависимости от дозы γ -облучения. По оси абсцисс: доза облучения, Гр; по оси ординат: степень подавления роста каллусов, % от контрольного образца.

организма. Из рис.2 видно, что чувствительность каллусов к облучению в определенной степени зависит от возраста каллусной ткани. Наиболее чувствительными к облучению являются "молодые" каллусы. Обращают на себя внимание и межвидовые различия в радиочувствительности: наибольшую чувствительность в исследованном диапазоне доз γ -облучения проявляют каллусы креписа,

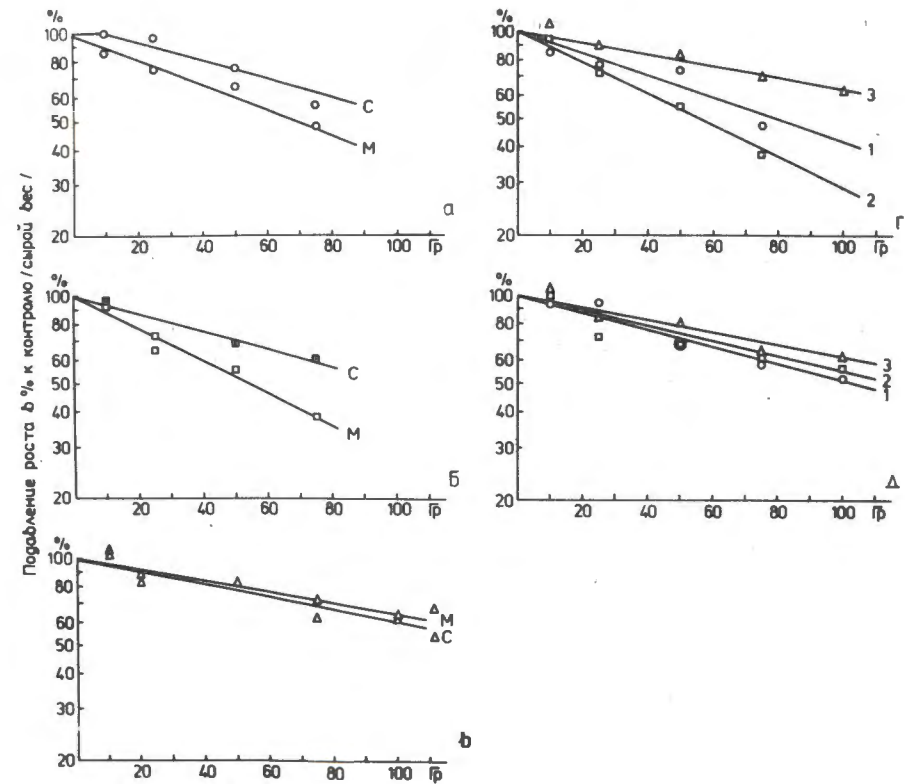


Рис.2. Изменение сырого веса каллусов разного возраста /М - "молодые", С - "старые"/и вида в зависимости от дозы γ -облучения: а/ каллусы гаплопappуса, б/ каллусы креписа, в/ каллусы фасоли, г/ суммарные кривые "доза-эффект" для "молодых" каллусов /1 - гаплопappус, 2 - крепис, 3 - фасоль/, д/ суммарные кривые "доза-эффект" для "старых" каллусов /1 - гаплопappус, 2 - крепис, 3 - фасоль/.

наименьшую - каллусы фасоли. В процессе "старения" каллусной ткани межвидовые различия в чувствительности нивелируются.

На рис.3-5 приведены результаты определения динамики изменения митотического индекса у контрольных образцов каллусов трех видов в процессе 21-дневного культивирования. Можно отметить наличие пиков в МІ, приходящихся на 3-6 сутки от начала культивирования, обусловленных, по-видимому, сокращением дли-

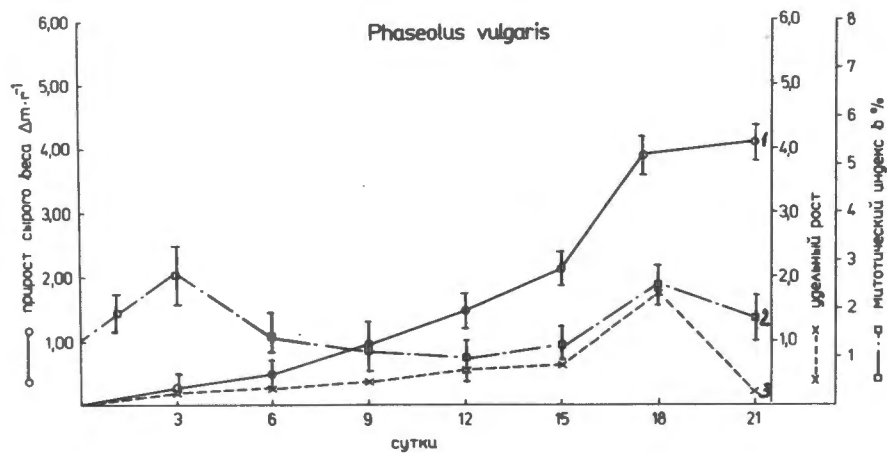


Рис.3. Изменение динамики сырого веса /кривые 1/, митотического индекса /кривые 2/, удельного роста /кривые 3/ в каллусах гаглопappa, креписа и фасоли в зависимости от длительности культивирования. По оси абсцисс: длительность культивирования, сутки; по оси ординат: прирост сырого веса, $г^{-1}$; удельный рост за двое суток, $г^{-1}$; митотический индекс, %.

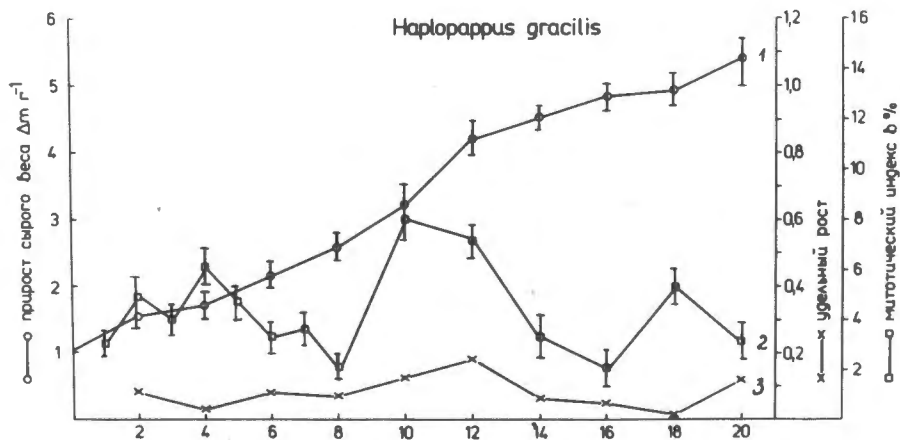


Рис.4. То же, что и на рис.3.

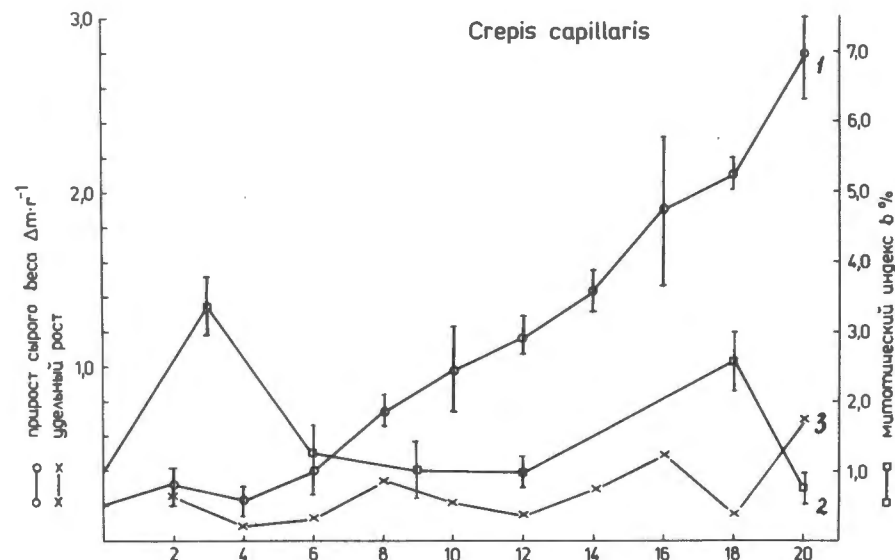


Рис.5. То же, что и на рис.3.

тельности клеточного цикла. Второй пик митотической активности приходится на стадию экспоненциальной фазы роста каллусной культуры. Аналогичную динамику изменения митотической активности в каллусах и суспензионной культуре отмечали авторы [4, 7, 13, 14, 19]. На рис.3-5 отражена также динамика роста каллусов в течение 21-дневного культивирования. Прирост свежей массы за 21 день в пересчете на 1 г инокуляма для ткани гаглопappa, фасоли и креписа соответственно составил 5,4, 4,0 и 2,8 $г^{-1}$. Характер динамики роста каллусной ткани разного происхождения, как можно видеть из рис.3-5, приблизительно одинаков. При анализе динамики изменения удельного роста каллусной ткани обращает на себя внимание тот факт, что наибольшая скорость роста биомассы приходится на экспоненциальную фазу развития каллуса. С подходом к стационарной фазе скорость роста понижается.

Как уже указывалось, растительные каллусы являются весьма неоднородными системами. В [15-18] описаны морфологические варианты, различающиеся видовыми особенностями, уровнем пloidности и возрастом клеток. Высокий полиморфизм каллусной ткани наблюдается и в наших экспериментах. На рис.6 приведены результаты наших измерений длины клеток "молодых" и "старых" каллусов. Как можно видеть, для всех трех видов каллусов характерны

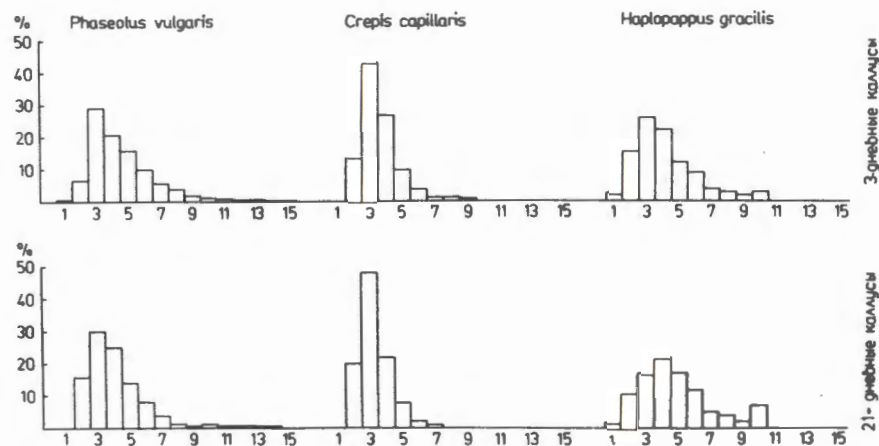


Рис.6. Распределение клеток трех видов каллусов разного возраста по длине. По оси абсцисс: классы длин клеток /класс от 0 до 40 мкм, 2 класс от 40 до 80 мкм..., 10 класс от 360 до 400 мкм/, по оси ординат: число клеток, %.

весьма значительные вариации этого показателя. Например, для фасоли длины клеток варьируются в пределах 40-600 мкм. Следует отметить, что степень полиморфизма каллусов зависит и от вида растительной ткани. Наименее гетерогенными являются каллусы креписа. В работе^{/8/} показано, что суспензионная культура табака и гаглопappa предстaвляет собой весьма гетерогенную в морфологическом отношении и по радиочувствительности популяцию клеток, состоящую из двух компартов, активно пролиферирующих и находящихся либо в фазе G_0 , либо в состоянии медленного продвижения по митотическому циклу. На основе кинетики восстановления популяций клеток при γ -облучении авторами сделан вывод о высокой радиочувствительности активнопролиферирующего пула и значительной радиорезистентности клеток, находящихся в фазе G_0 . Такие клетки, по-видимому, способны брать на себя "защитную", восстановительную роль, приводя к повышенной радиостойкости ткани. В пользу такого заключения свидетельствуют также полученные нами данные, представленные на рис.7-9. Как можно видеть, величина биомассы каллусов при γ -облучении в дозах 22-75 Гр претерпевает сложные изменения. У каллусов фасоли и креписа отмечается четкое возрастание этого показателя в период 3-6 суток после облучения. В наиболее поздние сроки отме-

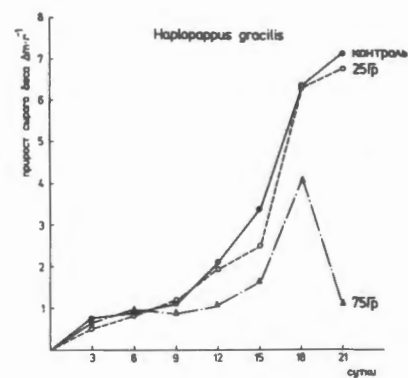


Рис.7

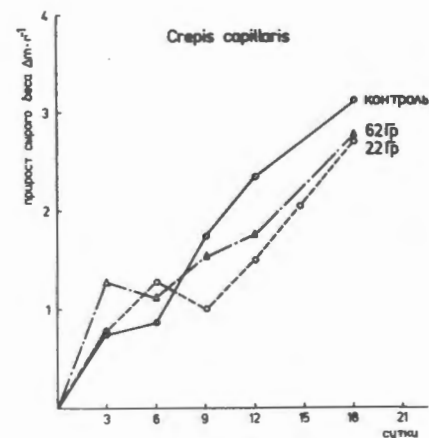


Рис.8

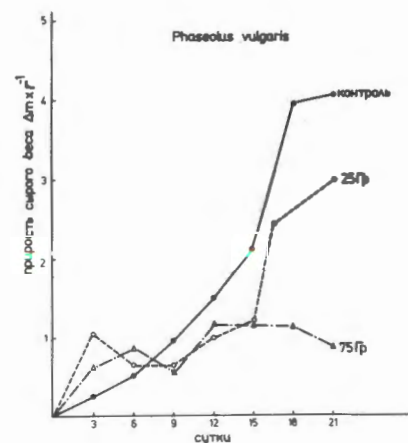


Рис.9

Рис.7-9. Изменение динамики сырого веса контрольных и облученных образцов каллусов в течение 21-дневного культивирования. По оси абсцисс: длительность культивирования, сутки, по оси ординат: прирост сырого веса, $г^{-1}$.

чается снижение величины сырого веса по сравнению с контрольными образцами. Первоначальная реакция каллусов на облучение, очевидно, связана с включением защитного пула "ждущих" клеток, активность которых приводит к увеличению биомассы в ранние сроки после облучения.

Таким образом, проведенное нами исследование радиочувствительности каллусов фасоли, гаглопappa и креписа по тесту изменения сырого веса ткани, свидетельствует о существенном изменении чувствительности к γ -облучению каллусов в зависимости от вида и возраста. Наиболее чувствительными являются "молодые" каллусы. Из трех исследованных каллусов наиболее устойчивую радиорезистентность выявили каллусы фасоли, наименьшую - кал-

лусы креписа. При "старении" каллусов межвидовые различия в радиочувствительности нивелируются.

На основе наблюдения динамики изменения сырого веса биомассы каллусов сделано предположение о том, что возрастание этого показателя на 3-6-е сутки после облучения обусловлено стимуляцией "ждушего" пула клеточной популяции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bajaj Y.P.S. Amer. J. Bot., 1968, vol. 35, p.711-712.
2. Bajaj Y.P.S. Amer. J. Bot., 1970, vol. 34, p. 1089-1096.
3. Eriksson T. Physiol. Plant., 1967, vol. 20, p. 507-518.
4. Holsten R.D., Sugii M., Steward F.C. Nature, 1965, No.208, p. 850-859.
5. Klein R.M., Vogel H.H. Plant. Physiol., 1956, vol. 31, p. 17-22.
6. Miszke W., Skucinska B., Huczkovski J. Genetika Polonika, 1979, vol. 20, No. 4, p. 507-514.
7. Torrey J.G., Reinert J., Merkel N. Amer. J. Bot., 1962, vol. 49, p. 420-425.
8. Гродзинский Д.М., Викторова Н.В. Физиология растений, 1971, т. 18, № 4, с. 823-831.
9. Moris S., Nakanishi H., Shiojiri S., Murakami M. KYCTO-FURIISU DAIGAKU GAKUJUTSU HOKOKU NOGAKU. 1980, Japan, No.32, p. 1-7.
10. Murashige T., Skoog F. Physiol. Plant., 1962, vol. 15, p. 474-497.
11. Gamborg O.L. Culture Methods in Plant Tissue. Saskatoon, Saskatchewan, Canada, 1975, p. 4-8.
12. Gaul H. Plant Injury and Lethality, in Manual on Mutation Breeding, IAEA /joint FOA/IAEA Division of AEFA, No. 119/, Vienna, 1970, p. 85-90.
13. Gould A.R., Bayliss M.W., Street H.E. J. Exp. Bot., 1974, No. 85, p. 468-478.
14. King P.J., Street H.E. Plant Tissue and Cell Culture, University of California Press, 1973, p. 269-334.
15. Blakely L.M., Steward F.C. Amer. J. Bot., 1962, vol.49, p.653.
16. Blakely L.M. Amer.J.Bot., 1964, vol. 51, p. 792-807.
17. Liao S., Boll W.G. Can. J. Bot., 1971, vol. 49, p.1131-1139.
18. Yeoman M.M., Aitchison P.A., Growth Patterhs in Tissue /callus/ Cultures. In: Plant Tissue and Cell Culture; University of California Press, 1973, p. 31-58.
19. Кулиева Р.Б., Шамина З.Б. Физиология растений, т. 19, 12, 1972, стр. 372-374.

Рукопись поступила в издательский отдел
27 июля 1983 года.

Гацек Э., Глинкова Е., Исмаилова З.Н. 19-83-509
Исследование радиочувствительности и динамики роста каллусов
Crepis capillaris, *Haplopappus gracilis*, *Phasolium vulgare*
при γ -облучении

В работе приводятся данные исследований радиочувствительности /по критерию изменения сырого веса/ трех видов каллусов: *Crepis capillaris*, *Haplopappus gracilis*, *Phasolium vulgare*, - облученных γ -лучами ^{137}Cs в дозах 10-400 Гр. Установлено, что радиочувствительность "молодых" каллусов /3-6-дневных/ зависит от вида растений. Наиболее устойчивым является каллус фасоли, наименее - каллус креписа. Для "старых" каллусов межвидовые различия в радиочувствительности практически отсутствуют. Для всех исследованных видов каллусов дозовая зависимость /в диапазоне 100-400 Гр/ по использованному критерию радиочувствительности не отмечена. Даже при дозах облучения порядка 400 Гр подавление роста "старых" каллусов относительно контрольных не превышает 40-50%. Для "молодых" каллусов эффект подавления достигает 60%. На основе исследования динамики роста, митотического индекса, морфологической гетерогенности популяции обсуждается возможный вклад неспецифической реакции клеток в общую радиорезистентность исследованных видов каллусов.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1983

Gacek E., Glinkova E., Ismailova E.N. 19-83-509
Investigation of Radiosensitivity and Growth Dynamics
for Callus Tissues *Crepis capillaris*, *Haplopappus gracilis*,
Phasolium vulgare Exposed to γ -Radiation

Radiosensitivity of three kinds of callus tissues /*Crepis capillaris*, *Haplopappus gracilis*, *Phasolium vulgare*/ manifested in the change of fresh weight after γ -irradiation has been investigated. Irradiated callus growth showed decrease with increasing doses. It is shown that the radiosensitivity of "young" callus tissues is determined by the kind of the plant. Callus of *Phaseolus* has been found to have the highest radioresistance, while that of *Crepis* has the lowest one. Radiosensitivity of "old" callus tissues is the same for all kinds. Potential mechanisms of radiosensitivity of callus tissues are discussed.

The investigation has been performed at the Laboratory of Nuclear Problems, JINR.

Препринт

Дубна 1983

Перевод О.С.Е.