

УДК 581.1

РЕАКЦИЯ ХЛОРОФИЛЬНЫХ МУТАНТОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА НА ДЕЙСТВИЕ ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

© 2006 г. Е. В. Машкина, А. В. Усатов, В. А. Даниленко, Н. С. Колоколова, Е. П. Гуськов

Научно-исследовательский институт биологии
Ростовского государственного университета, Ростов-на-Дону

Поступила в редакцию 11.05.2005 г.

Исследовали степень устойчивости ядерных, пластидных и митохондриальных мутантов подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) к действию экстремальных факторов – повышенной температуре и окислительному стрессу, который моделировали гипербарической оксигенацией. В модельных экспериментах анализировали активность супероксиддисмутазы и каталазы; при цитогенетическом анализе – уровень пролиферативной активности клеток корневой апикальной меристемы; в полевых опытах – всхожесть и рост проростков на стадии формирования 3–4-й пары листьев. Показано, что наиболее устойчивыми формами подсолнечника к воздействию повышенной температуры и повышенного давления кислорода являются пластомный мутант *en:chlorina-5* и частичный ревертант *pr6-en:chlorina-7*, характеризующийся измененной структурой митохондриальной ДНК.

Helianthus annuus – внеядерные мутанты – окислительный стресс – температурный стресс – устойчивость

ВВЕДЕНИЕ

В меняющихся условиях среды на воздействие экстремальных факторов растение отвечает каскадом реакций, поддерживающих жизнеспособность организма. Первичная стрессорная реакция направлена на оперативное снижение негативных последствий воздействия, в то время как долговременная адаптация формируется на фоне сохраняющегося действия экстремальных факторов и направлена на поддержание жизнедеятельности организма как целостной системы [1, 2].

Очевидно, что степень устойчивости любого живого организма зависит от адаптивного потенциала, который, в свою очередь, определяется его генотипом. В клетках растений взаимодействуют три генетические подсистемы – геном ядра, геном пластид и геном митохондрий. Хотя геномы пластид и митохондрий имеют незначительную информационную емкость по сравнению с ядерным геномом, однако функционально они непосредственно связаны с важнейшими процессами жизнеобеспечения автотрофов – внутрикле-

точным дыханием и фотосинтезом, а эти функции, в свою очередь, более чем какие-либо другие, определяют адаптивные реакции растений при стрессе.

В литературе описаны пластидные мутанты хламидомонады, устойчивые к антибиотикам, а также температурно-чувствительные и солеустойчивые мутанты высших растений [3–6]. Так, митохондриальный мутант *Nicotiana sylvestris* характеризуется низким содержанием активных форм кислорода в тканях листьев, измененным характером экспрессии некоторых антиоксидантных ферментов и повышенной резистентностью к стрессовым воздействиям [7, 8]. Однако, несмотря на очевидную значимость внеядерных генетических детерминант в формировании устойчивости и функционирования растительных организмов, их роль в этих процессах до сих пор остается малоизученной. Коллекция внеядерных хлорофильных мутантов подсолнечника, имеющаяся в нашем распоряжении, является удобным материалом для проведения такого рода экспериментов [9]. В связи с этим целью данной работы явилось исследование роли внеядерных геномов подсолнечника в устойчивости растений к температурному (ТС) и окислительному стрессам.

МЕТОДИКА

Для определения роли ядра и цитоплазматических генов в устойчивости растений к внешним

Сокращения: ГБО – гипербарическая оксигенация, МИ – митотический индекс, СОД – супероксиддисмутаза, ТС – температурный стресс.

Адрес для корреспонденции: Машкина Елена Владимировна. 344090 Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194 / 1. Научно-исследовательский институт биологии Ростовского государственного университета. Электронная почта: genlab@bio.rsu.ru; lenmash@mail.ru

стрессовым воздействиям из коллекционного материала хлорофильных мутантов подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) НИИ биологии РГУ были отобраны следующие линии: исходная инбредная линия 3629 и полученные на ее основе мутантные линии: ядерный мутант *n:chlorina-1* и пластомные мутанты *en:chlorina-3*, *en:chlorina-5*, *en:chlorina-6*, *en:chlorina-7*. На генетической основе пластомного мутанта *en:chlorina-7* были получены частичный ревертант *pr6-en:chlorina-7* с измененной структурой как хлоропластной, так и митохондриальной ДНК [10] и полный ревертант *r-en:chlorina-7*. Реверсия у полного ревертанта вызвала восстановление содержания хлорофиллов и морфологических признаков до контрольного уровня растений – исходной линии 3629. У частичного ревертанта при сохранении желто-зеленой мутантной окраски листьев растений *en:chlorina-7* восстановились некоторые показатели габитуса [11]. В качестве контроля в работе использовали районированный в Ростовской обл. сорт Донской-99, любезно предоставленный нам автором сорта проф. Ф.И. Горбаченко (Донская опытная станция масличных культур им. Л. Жданова ВНИИ масличных культур).

На семена подсолнечника изучаемых линий воздействовали повышенной температурой (45°C) в течение первых 6 ч прорастания сразу после замачивания; окислительный стресс моделировали гипербарической оксигенацией (ГБО) (0.7 МПа чистого кислорода в течение первых 4 ч прорастания сразу после замачивания). Модельные эксперименты проводили на корневой апикальной меристеме проростков. Для биохимических анализов готовили гомогенаты в 1/15 М К-На-фосфатном буфере, pH 7.8. Соотношение среды гомогенизации и массы растительного материала составляло 10 : 1 (объем : масса). Активность антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы определяли в супернатанте после центрифугирования гомогената (500 g, 10 мин). При определении активности СОД использовали нитросиний тетразолий [12]. Активность каталазы определяли по методу Королюка с соавт. [13]. Активность ферментов рассчитывали на белок, концентрацию которого определяли по методу Lowry с соавт. [14]. В таблицах и на графиках представлены средние арифметические из 7–8 повторностей и их стандартные ошибки. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента.

Для определения митотического индекса (МИ) корешки проростков фиксировали в смеси этилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3 : 1) через каждые 2 ч с момента начала проращивания и готовили временные давленные препараты [15]. В корневой апикальной меристеме проростков анализировали величину МИ, просматривая не менее

5–8 корешков на вариант и 1000 клеток на один проросток.

Обработанные и контрольные семена высевали в поле в оптимальные сроки по типу селекционного питомника на 10-метровых делянках с площадью питания 40–60 см. В качестве критериев устойчивости в полевых опытах определяли всхожесть проростков и высоту растений на стадии развития 3–4-й пары листьев. В каждом варианте опыта использовали не менее 50 растений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Неспецифическим ответом организма на действие внешних экстремальных факторов является развитие стресс-реакции. Пусковым механизмом стресса может выступать нарушение динамического равновесия в системе прооксиданты-антиоксиданты, приводящее к активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [16–18]. Являясь составной частью единой окислительной системы клетка, пластида и митохондрии во многом определяют активность и изоферментный состав многих окислительных ферментов, кодируемых ядром. Белецким [19] было показано, что пластомная мутация, индуцированная нитрозометилмочевинной, может оказывать существенное влияние на изоферментный состав и активность пероксидаз. В то же время уровень активности ферментов ? антиоксидантов может служить косвенным показателем степени резистентности растительного организма к стрессовым воздействиям [20]. В связи с этим мы провели модельный эксперимент для оценки активности СОД и каталазы в тканях проростков подсолнечника в контроле и после воздействия ТС или ГБО. Как видно из данных табл. 1, в контроле уровень активности СОД в тканях проростков исходной линии 3629 и частичного ревертанта *pr6-en:chlorina-7* с измененными митохондриями был наибольшим относительно других изученных линий. У пластомных мутантов подсолнечника уровень активности СОД был достоверно ниже по сравнению с линией 3629. В то же время активность каталазы у пластомных мутантов *chlorina* находилась на одном уровне с этим показателем у исходной зеленой линии. Ядерный мутант *n:chlorina-1* характеризовался повышенной активностью каталазы (табл. 1).

После ТС активность СОД в клетках пластомных мутантов *en:chlorina-3*, *en:chlorina-5*, *en:chlorina-6*, так же как и у сортовых растений, практически не изменялась. При этом активность каталазы в клетках этих линий либо тоже не изменялась, либо повышалась по сравнению с контролем (табл. 1). У ядерного мутанта *n:chlorina-1* происходило снижение активности как СОД, так и каталазы (на 41 и 52% соответственно). У полного ревертанта *r-en:chlorina-7* после дейст-

Таблица 1. Активность антиоксидантных ферментов – СОД и каталазы в корневой меристеме проростков подсолнечника (ед./мг белка)

| Линия | Контроль | | ГБО, 0.7 МПа (0–4 ч) | | ТС, 45°C (0–6 ч) | |
|--------------------------|--------------|-------------|----------------------|--------------|------------------|----------------|
| | каталаза | СОД | каталаза | СОД | каталаза | СОД |
| 3629 | 4.8 ± 0.6 | 30.1 ± 6.9 | 7.9 ± 0.4*** | 11.3 ± 2.5* | 4.9 ± 0.9 | 20.1 ± 2.8 |
| <i>n:chlorina-1</i> | 8.1 ± 0.2+++ | 15.3 ± 3.1 | 9.9 ± 0.5***,+ | 23.1 ± 4.6+ | 3.9 ± 0.6*** | 9.1 ± 1.3+++ |
| <i>en:chlorina-3</i> | 3.3 ± 0.1+ | 12.6 ± 1.8+ | 3.6 ± 0.4+++ | 12.0 ± 2.1 | 3.3 ± 0.2 | 11.0 ± 1.4++ |
| <i>en:chlorina-5</i> | 4.0 ± 0.8 | 13.5 ± 2.5+ | 7.9 ± 0.1*** | 16.6 ± 2.6 | 5.6 ± 0.2* | 10.8 ± 2.9+ |
| <i>en:chlorina-6</i> | 5.1 ± 0.3 | 15.5 ± 6.3 | 6.0 ± 0.1*+++ | 10.2 ± 2.5 | 9.3 ± 0.1***,+ | 12.6 ± 2.8 |
| <i>en:chlorina-7</i> | 4.7 ± 0.3 | 12.6 ± 1.9+ | 6.6 ± 0.5***,+ | 9.9 ± 1.9 | 6.1 ± 1.3 | 9.4 ± 2.0++ |
| <i>pr6-en:chlorina-7</i> | 6.9 ± 0.4 | 35.6 ± 4.8 | 2.7 ± 0.5***,+ | 8.2 ± 3.6*** | 6.4 ± 0.2 | 8.2 ± 1.4***,+ |
| <i>r-en:chlorina-7</i> | 3.2 ± 0.5+ | 14.8 ± 2.1+ | 5.9 ± 0.5***,+ | 7.4 ± 1.4** | 10.7 ± 0.2***,+ | 6.9 ± 0.4***,+ |
| Сорт Донской | 6.6 ± 1.0 | 17.3 ± 2.1 | 8.3 ± 0.4 | 33.7 ± 7.9*+ | 6.5 ± 0.3 | 14.2 ± 4.4 |

Примечание. В скобках – период воздействия стрессовым фактором от начала прорастания. Знаком (*) отмечены достоверные отличия от контроля, знаком (+) – достоверные отличия от линии 3629; * и + – при $P < 0.05$; ** и ++ – при $P < 0.01$; *** и +++ – при $P < 0.001$.

вия ТС активность СОД снижалась на 53%, а активность каталазы повышалась на 234%. Таким образом, анализ активности СОД и каталазы в корневой меристеме проростков подсолнечника выявил различия между изучаемыми линиями, которые позволили предположить, что наиболее устойчивыми к действию ТС являются пластомные мутанты, у которых сохраняется скоординированное функционирование важнейших антиоксидантных ферментов, а наименее устойчивым – ядерный мутант.

После действия повышенного давления кислорода активность СОД была снижена у растений трех линий: 3629, *pr6-en:chlorina-7*, *r-en:chlorina-7* на 63, 77 и 50%, соответственно, а у пластомных хлорофильных мутантов оставалась на уровне контрольных значений (табл. 1). Активность каталазы у растений всех линий, за исключением частичного ревертанта *pr6-en:chlorina-7*, после действия ГБО достоверно увеличивалась.

Известно, что одной из неспецифических реакций на стрессовое воздействие является изменение пролиферативной активности клеток. Стрессовые факторы, как правило, вызывают реакцию защитного торможения метаболизма, в том числе подавление деления и линейного роста клеток [21, 22]. Анализ пролиферативной активности клеток корневой апикальной меристемы у проростков подсолнечника в контроле показал, что у исходной линии 3629 первые митотические деления наблюдались к 48 ч роста (рис. 1). Максимальный уровень МИ был зафиксирован через 68 ч после начала прорастания семян. У ядерного мутанта *n:chlorina-1* начало делений приходилось на 26 ч, а наибольшая пролиферативная активность была отмечена в то же время, что и у линии 3629 (рис. 2). При этом значение МИ было ниже,

чем у исходной линии. Пластомный мутант *en:chlorina-5* в контроле характеризовался более ранним началом пролиферации – первые деления отмечены через 26 ч роста (рис. 3). Через 34 ч роста МИ был равен 3.3%; в дальнейшем МИ изменялся волнообразно (рис. 3). У проростков сорта Донской-99 первые митозы были отмечены уже через 24 ч роста (рис. 4). В дальнейшем происходило увеличение пролиферативной активности клеток. Наибольший показатель МИ отмечали у проростков частичного ревертанта *pr6-en:chlorina-7* (рис. 5).

Анализ МИ в корневой апикальной меристеме проростков подсолнечника после воздействия ТС показал, что повышенная температура в течение первых 6 ч прорастания семян ингибирует деление клеток линии 3629 и полученных на ее основе

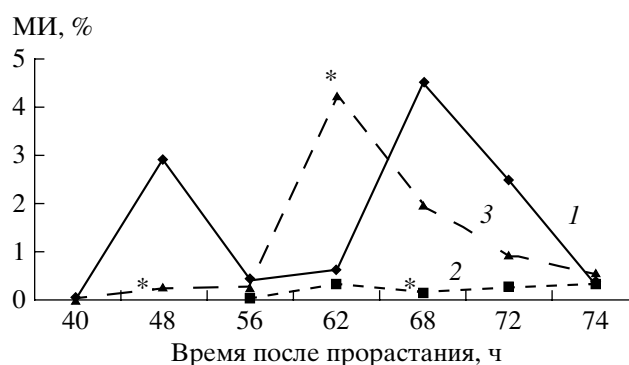


Рис. 1. Динамика изменения МИ в корневой апикальной меристеме проростков подсолнечника линии 3629 в контроле и после действия ТС или ГБО. * – достоверные отличия от контроля при $P < 0.001$. 1 – контроль, 2 – ТС, 3 – ГБО.

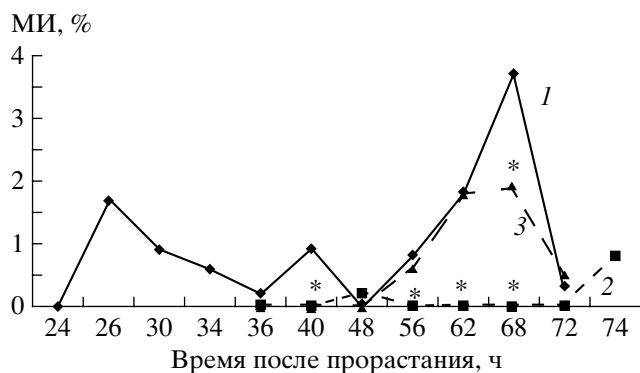


Рис. 2. Динамика изменения МИ в корневой апикальной меристеме проростков подсолнечника линии *n:chlorina-1* в контроле и после действия ТС или ГБО. Обозначения, как на рис. 1.

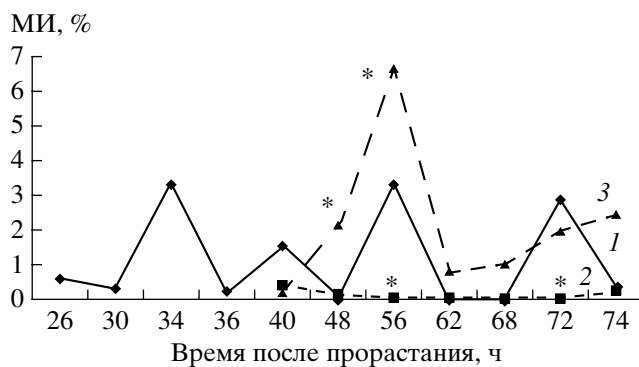


Рис. 3. Динамика изменения МИ в корневой апикальной меристеме проростков подсолнечника линии *en:chlorina-5* в контроле и после действия ТС или ГБО.

Обозначения, как на рис. 1.

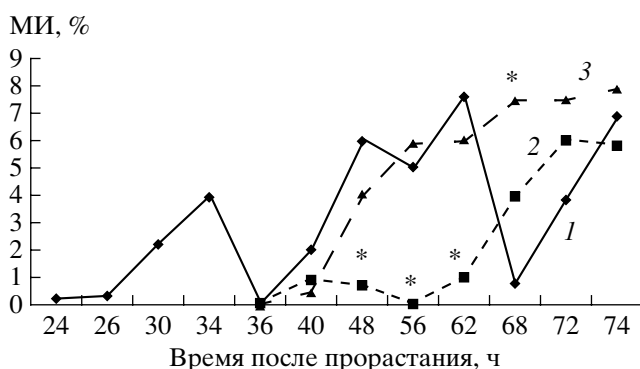


Рис. 4. Динамика изменения МИ в корневой апикальной меристеме проростков подсолнечника сорта Донской-99 в контроле и после действия ТС или ГБО. Обозначения, как на рис. 1.

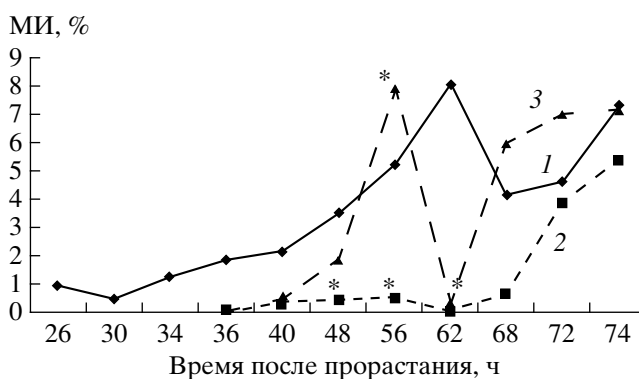


Рис. 5. Динамика изменения МИ в корневой апикальной меристеме проростков подсолнечника линии *rgb:chlorina-7* в контроле и после действия ТС или ГБО.

Обозначения, как на рис. 1.

хлорофильных мутантов (рис. 1–5). Среди всех изученных мутантов наибольшую устойчивость к ТС проявил частичный ревертант, у которого максимальное значение МИ после температурного воздействия составляло 5.4% (через 74 ч от начала проращивания семян) (рис. 5). Этот показатель превышал контрольное значение МИ для линии 3629, однако был на 33% ниже по сравнению с таковым в собственном контроле. ТС в течение первых 6 ч роста блокировал вступление клеток сорта Донской-99 в первый митоз (рис. 4). Однако в дальнейшем митотическая активность корневой меристемы восстанавливалась и не отличалась от контрольных значений.

ГБО аналогично ТС на ранних этапах прорастания подавляла митотическую активность клеток (рис. 1–5). Из литературы известно, что повышенное давление кислорода действует на клетки как ингибитор пролиферации, вызывая блок клеточного цикла на стадии G1-S. В дальнейшем про-

исходит синхронизация деления клеток, на что указывает увеличение МИ в поздние сроки фиксации [23]. Так, у пластомного мутанта *en:chlorina-5* в отдаленные сроки после действия ГБО (56 ч роста) МИ превышал контрольный уровень в 2 раза (рис. 3). Высокую пролиферативную активность после действия ГБО проявил и частичный ревертант *prb-en:chlorina-7* (рис. 5).

Стресс-факторы вызывают неспецифическую реакцию защитного торможения метаболизма, которая включает в себя подавление процессов деления и роста клеток. Известно, что одним из пусковых сигналов для пролиферации клеток является синтез циклина [24]. Тепловой шок, ингибируя синтез большинства клеточных белков, в том числе и циклина, приводит к снижению пролиферативной активности клеток сразу после действия внешнего фактора. В регуляции деления клеток существенную роль играют свободнорадикальные реакции, продукты которых оказыва-

Таблица 2. Всхожесть семян подсолнечника, после воздействия на них на ранних этапах прорастания повышенной температурой или повышенным давлением кислорода (%)

| Линия | Контроль | ГБО, 0.7 МПа (0–4 ч) | ТС, 45°C (0–6 ч) |
|--------------------------|----------|----------------------|------------------|
| 3629 | 85.3 | 69.3* | 13.3*** |
| <i>n:chlorina-1</i> | 73.3 | 57.3 | 1.3*** |
| <i>en:chlorina-3</i> | 78.7 | 84.0 | 28.0*** |
| <i>en:chlorina-5</i> | 78.7 | 69.3 | 22.7*** |
| <i>en:chlorina-6</i> | 56.0 | 34.0 | 8.0** |
| <i>en:chlorina-7</i> | 74.7 | 56.0 | 9.3*** |
| <i>pr6-en:chlorina-7</i> | 62.7 | 61.3 | 32.0* |
| <i>r-en:chlorina-7</i> | 80.0 | 56.0* | 22.7*** |
| Сорт Донской-99 | 89.3 | 78.7 | 81.3 |

Примечание. Обозначения, как в табл. 1.

ют ингибирующее влияние на интенсивность деления [25, 26]. С другой стороны, было показано, что накопление перекиси водорода и создание определенного окислительно-восстановительного потенциала необходимы для начала пролиферации и дифференцировки *Neurospora crassa* [27].

В дальнейшем все проростки подсолнечника (обработанные и контрольные) высаживали в поле. Из данных, приведенных в табл. 2, видно, что после действия повышенной температуры в первые часы прорастания у всех исследованных линий, за исключением сорта Донской-99, снижалась всхожесть семян. Однако степень этого снижения оказалась различной. Наибольшая доля проросших семян была у частичного ревертанта *pr6-en:chlorina-7* (всхожесть после ТС составила 51% по сравнению с контролем) и пластомных мутантов – *en:chlorina-3*, *en:chlorina-5* (35 и 29% соответственно). Ядерный мутант *n:chlorina-1* оказался наиболее чувствительным к темпера-

турному воздействию – единичные взошедшие растения погибали на самых ранних этапах вегетации. Среди взошедших растений были отмечены формы, у которых отсутствовала апикальная меристема, – у них стебель и первая пара листьев не развивались вовсе.

В то же время ГБО не влияла на всхожесть семян хлорофильных мутантов. Достоверное по сравнению с контролем снижение количества взошедших растений отмечали только для линии 3629 и полного ревертанта *r-en:chlorina-7* (табл. 2).

Анализ морфометрических характеристик контрольных растений и растений, обработанных на ранних стадиях прорастания семян, показал, что после воздействия повышенной температурой замедлялся рост растений вплоть до стадии развития 3–4-й пары листьев. Высота растений линии 3629 составила 25% от контроля, а высота пластомных мутантов – 61–78%. Если в контроле растения линии 3629 были достоверно выше хлорофильных мутантов, то после ТС высота пластомных мутантов на стадии 3–4-й пары листьев превышала таковую у растений исходной линии 3629 (табл. 3).

Под действием ГБО достоверно снижалась интенсивность роста проростков только у исходной линии 3629, ядерного мутанта *n:chlorina-1* и сортовых растений. Высота хлорофильных пластомных мутантов после такой обработки на стадии формирования 3–4-й пары листьев не отличалась от контроля, а у пластомного мутанта *en:chlorina-5* даже достоверно превышала контрольные значения.

Таким образом, данные полевых наблюдений согласуются с результатами цитогенетического анализа. Полное и длительное ингибирование пролиферативной активности клеток зародышей после ТС приводило к снижению количества взошедших растений и отставанию их в росте вплоть до стадии формирования 3–4-й пары листьев.

Таблица 3. Высота растений подсолнечника на стадии развития 3–4-й пары листьев (см)

| Линия | Контроль | ГБО, 0.7 МПа (0–4 ч) | ТС, 45°C (0–6 ч) |
|--------------------------|-------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 3629 | 12.2 ± 0.3 | 10.1 ± 0.3*** | 3.0 ± 0.5*** |
| <i>n:chlorina-1</i> | 8.9 ± 0.3 ⁺ | 7.6 ± 0.3 ^{+, **} | – |
| <i>en:chlorina-3</i> | 7.5 ± 0.2 ⁺ | 7.0 ± 0.2 ⁺ | 4.6 ± 0.5*** |
| <i>en:chlorina-5</i> | 7.2 ± 0.2 ⁺ | 7.9 ± 0.2 ^{+, ***} | 5.6 ± 0.5 ^{+, ***} |
| <i>en:chlorina-6</i> | 8.5 ± 0.3 ⁺ | 7.7 ± 0.5 ⁺ | – |
| <i>en:chlorina-7</i> | 8.1 ± 0.3 ⁺ | 7.5 ± 0.4 ⁺ | 5.2 ± 0.2 ^{+, ***} |
| <i>pr6-en:chlorina-7</i> | 9.7 ± 0.4 ⁺ | 8.7 ± 0.3 ⁺ | 6.4 ± 0.6 ^{+, ***} |
| <i>r-en:chlorina-7</i> | 10.8 ± 0.4 ⁺ | 10.7 ± 0.4 | 5.6 ± 0.6 ^{+, ***} |
| Сорт Донской-99 | 16.5 ± 0.4 ⁺ | 14.4 ± 0.4 ^{+, ***} | 12.7 ± 0.4 ^{+, ***} |

Примечание. Обозначения, как в табл. 1.

При действии ГБО степень активации клеточных делений коррелировала с последующим ростом растений на стадии формирования 3–4-й пары листьев. Со временем у частичного ревертанта и сортовых растений МИ восстанавливался до контрольных значений и это хорошо согласовывалось с данными об одинаковой высоте контрольных и обработанных растений. Снижение МИ у ядерного мутанта приводило к отставанию в росте растений. Двукратное повышение МИ у пластомного мутанта *en:chlorina-5* согласуется с увеличением высоты растений относительно контроля.

Обобщая полученные данные, можно заключить, что реакция разных генетических линий растений подсолнечника на действие повышенного давления кислорода и повышенной температуры не одинакова. Повышенная чувствительность к внешним воздействиям исходной инцухт-линии 3629, вероятно, вызвана высокой степенью гомозиготности ядерных аллелей, что, как известно, снижает адаптивный потенциал организма. В то же время, высокая степень гетерозиготности генетического материала растений сорта Донской-99 обеспечивает их повышенную устойчивость как к ТС, так и к ГБО.

Как митохондрии, так и пластиды играют ключевую роль в формировании устойчивости к стрессам [28]. Измененная структура как митохондриальной ДНК, так и хлоропластной ДНК может быть основой для повышения резистентности растительного организма к внешним воздействиям. С другой стороны, изменение резистентности к действию стрессовых факторов может быть связано с изменением состава ЖК липидов. Ранее было показано, что вегетативные ткани пластомных мутантов подсолнечника характеризуются измененным составом ЖК свободных полярных липидов [29]. Выявлено также, что определенное соотношение насыщенных и ненасыщенных ЖК в липидах мембран является обязательным условием для термостабильности фотосинтеза и возможной акклиматизации растений при изменении факторов внешней среды, в том числе и температуры [30].

Другой возможной причиной изменения степени резистентности цитоплазматических мутантов к действию внешних факторов может быть участие пластидного белок-синтезирующего аппарата в регуляции клеточных делений и морфогенеза растений. В литературе имеются данные о том, что синтез белка в цитоплазматических органеллах необходим для нормального клеточного деления и развития основных органов и частей растений. Так, на табаке показано, что ингибирование синтеза белка в пластидах нарушает формирование листовой пластинки и цветков [31]. Инсерции в ген *RpoT*, кодирующий гомолог фаговой РНК-

полимеразы, функционирующей как в хлоропластах, так и в митохондриях, приводят к разнообразным аномалиям фенотипа растений, в том числе нарушается рост корня, снижается длина гипокотыля, изменяется форма листа [32]. Пластиды и их геном могут играть определенную роль и в эмбриональном развитии зародыша растений [33].

На основании результатов, полученных в модельных и полевых экспериментах, можно заключить, что среди хлорофильных мутантов подсолнечника наиболее устойчивыми формами к действию ТС и ГБО являются пластомный мутант *en:chlorina-5* и частичный ревертант *pr6-en:chlorina-7*. Особенно наглядно эффект внеядерных мутаций на устойчивость растений продемонстрирован при действии повышенной концентрации O_2 . Особый интерес вызывает частичный ревертант *pr6-en:chlorina-7*. Несмотря на снижение активности антиоксидантных ферментов после действия ТС или ГБО, всхожесть семян данной линии была наибольшей среди мутантных форм, а рост растений после действия ГБО не отличался от контроля. Из данных литературы известно, что устойчивость к стрессовому фактору не всегда коррелирует с повышением активности ферментативных антиоксидантов [34]. Возможно, что в данном случае активно функционируют другие звенья защитной системы, в том числе и низкомолекулярные антиоксиданты.

Для оценки адаптивного потенциала частичного ревертанта *pr6-en:chlorina-7* мы повторно воздействовали на семена растений М1 ГБО в режиме 0.7 МПа в течение 10 ч. Ранее анализ всхожести семян показал, что первичное воздействие ГБО в данном режиме не снижало их всхожести. В других опытах мы воздействовали ГБО на семена М2 у частичного ревертанта и получили максимальное количество взошедших семян, которое достоверно превышало этот показатель у необработанных семян (неопубликованные данные). Вторичная обработка семян М2 ГБО в режиме 0.7 МПа, 10 ч у линии 3629 достоверно снижала всхожесть семян не только по сравнению с контролем, но и по сравнению с первичным воздействием ГБО. В то же время повторное воздействие ГБО повышало всхожесть семян частичного ревертанта *pr-en:chlorine-7*. Можно предположить, что первичное воздействие ГБО (4 ч) в первые часы прорастания семян явилось стимулом для “отбора” наиболее резистентных к увеличению концентрации кислорода во внешней среде клеток и/или клеточных органелл, и прежде всего митохондрий, что обеспечило впоследствии интенсивный рост растений М1, высокую всхожесть семян М2, а также резистентность к повторным воздействиям ГБО в более “сильном” режиме. Таким образом, измененная структура как митохондриальной, так и хлоропластной ДНК может быть основой для повышения резис-

тентности растительного организма к внешним стрессовым воздействиям.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Селье Г. Концепция стресса. Новое о гормонах и механизмах их действия. Киев: Наук. думка, 1977. 22 с.
2. Leshem Y.Y., Kuiper P.J., Erdei L., Lurie S., Perl-Treves R. Do Selye's Mammalian "GAS" Concept and "Co-Stress" Response Exist in Plants? // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1998. V. 851. P. 199–208.
3. Тутов А.Ф. Температурно-чувствительные хлорофильные мутации у высших растений // Успехи соврем. биологии. 1979. № 1. С. 125–132.
4. Шевякова Н.И. Солеустойчивость пластомных хлорофильных мутантов подсолнечника // Физиология растений. 1982. Т. 29. С. 317–324.
5. Atak C., Alikamanoglu S., Acik L., Canbolat Y. Induced of Plastid Mutations in Soybean Plant (*Glycine max* L., Merrill) with Gamma Radiation and Determination with RAPD // Mutat. Res. 2004. V. 556. P. 35–44.
6. Rosellini D., LaFayette P.R., Barone P., Veronesi F., Parrott W.A. Kanamycin-Resistant Alfalfa Has a Point Mutation in the 16S Plastid rRNA // Plant Cell Rep. 2004. V. 22. P. 774–779.
7. Dutilleul C., Garmier M., Noctor G., Mathieu C., Chetrit P., Foyer C., de Paepe R. Leaf Mitochondria Modulate Whole Cell Redox Homeostasis, Set Antioxidant Capacity, and Determine Stress Resistance Through Altered Signaling and Diurnal Regulation // Plant Cell. 2003. V. 15. P. 1212–1226.
8. Noctor G., Dutilleul C., De Paepe R., Foyer C. Use of Mitochondrial Electron Transport Mutants to Evaluate the Effects of Redox State on Photosynthesis, Stress Tolerance and the Integration of Carbon / Nitrogen Metabolism // J. Exp. Bot. 2004. V. 55. P. 49–57.
9. Машкина Е.В., Маркин Н.В., Усатов А.В., Гуськов Е.П. Реакция мутантных линий подсолнечника на тепловой шок // Физиология растений. 2001. Т. 48. С. 788–792.
10. Triboush S., Danilenko N., Ulitcheva I., Davydenko O. Location of Induced Mutations and Reversions in the Chloroplast Genome of *Helianthus annuus* L. // Plant Growth Regul. 1999. V. 27. P. 75–81.
11. Усатов А.В., Разорителева Е.К., Машкина Е.В., Улитчева И.И. Спонтанные и индуцированные нитрозометилмочевинной реверсии пластомных хлорофильных мутантов подсолнечника *Helianthus annuus* L. // Генетика. 2004. Т. 40. С. 248–255.
12. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лаб. дело. 1985. № 11. С. 678–681.
13. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токкарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16–19.
14. Lowry O.N., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein Measurement with the Folin Reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
15. Гостимский С.А., Дьякова М.И., Ивановская Е.В., Монахова М.А. Практикум по цитогенетике. М.: изд-во МГУ, 1974. 172 с.
16. Mittler R. Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance // Trends Plant Sci. 2002. V. 7. P. 405–410.
17. Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review // Ann. Bot. 2003. V. 91. Spec. Iss. P. 179–194.
18. Khanna-Chopra R., Sabarinath S. Heat-Stable Chloroplastic Cu / Zn Superoxide Dismutase in *Chenopodium murale* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. V. 320. P. 1187–1192.
19. Белецкий Ю.Д., Карнаухова Т.Б. Изозимы пероксидаз у неядерных хлорофильных мутантов подсолнечника // Генетика. 1975. Т. 11. С. 19–23.
20. Mittova V., Tal M., Volonita M., Guy M. Salt Stress Induces Up-Regulation of an Efficient Chloroplast Antioxidant System in the Salt-Tolerant Wild Tomato Species *Lycopersicon pennellii* But Not in the Cultivated Species // Physiol. Plant. 2002. V. 115. P. 393–400.
21. Alves A.A., Setter T.L. Response of Cassava Leaf Area Expansion to Water Deficit: Cell Proliferation, Cell Expansion and Delayed Development // Ann. Bot. 2004. V. 94. P. 605–613.
22. Gimener-Abian M., Rozalen A., Carballo J., Botella L., Pincheira J., Loper-Saez J., de la Torre C. HSP90 and Checkpoint-Dependent Lengthening of the G2 Phase Observed in Plant Cells under Hypoxia and Cold // Protoplasma. 2004. V. 223. P. 191–196.
23. Гуськов Е.П., Дворкина Р.М., Гончаренко И.И. Действие гипербароксигенации на деление клеток корней проростков растений // Цитология. 1982. Т. 24. С. 257–263.
24. Cho J., Park S., Shin E., Kim C., Han W., Sohn S., Song P., Wang M. Cyclin D1 and p22ack1 Play Opposite Roles in Plant Growth and Development // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. V. 324. P. 52–57.
25. Бурлакова Е.Б. О возможной роли свободнорадикального механизма в регуляции размножения клеток // Биофизика. 1967. Т. 12. С. 82–88.
26. Brar S., Kennedy T., Whorton A., Murphy T., Chitano P., Hoidal J. Requirement for Reactive Oxygen Species in Serum-Induced and Platelet-Derived Growth Factor-Induced Growth of Airway Smooth Muscle // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 20 017–20 026.
27. Hansberg W., de Groot H., Sies H. Reactive Oxygen Species Associated with Cell Differentiation in *Neurospora crassa* // Free Radic. Biol. Med. 1993. V. 14. P. 287–293.
28. Millar H., Considine M., Day D., Whelan J. Unraveling the Role of Mitochondria during Oxidative Stress in Plants // IUBMB Life. 2001. V. 51. P. 201–205.
29. Лысенко В.С. Биохимические особенности формирования хлоридно-натриевой солеустойчивости у подсолнечника: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ростов-на-Дону: РГУ, 1993. 24 с.

30. *Falcone D., Ogas J., Somerville C.* Regulation of Membrane Fatty Acid Composition by Temperature in Mutants of *Arabidopsis* with Alterations in Membrane Lipid Composition // *BMC Plant Biol.* 2004. V. 4. P. 17.
31. *Ahlert D., Ruf S., Bock R.* Plastid Protein Synthesis Is Required for Plant Development in Tobacco // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 15 730–15 735.
32. *Baba K., Schmidt J., Espinosa-Ruiz A., Villarejo A., Shina T., Gardestrom P., Sane A., Bhalerao R.* Organellar Gene Transcription and Early Seedling Development Are Affected in the RpoT;2 Mutant of *Arabidopsis* // *Plant J.* 2004. V. 38. P. 38–48.
33. *Ma Z., Dooner H.* A Mutation in the Nuclear-Encoded Plastid Ribosomal Protein S9 Leads to Early Embryo Lethality in Maize // *Plant J.* 2004. V. 37. P. 92–103.
34. *Woo H., Kim J., Hong Gil Nam, Pyung Ok Lim.* The Delayed Leaf Senescence Mutants of *Arabidopsis*, ore1, ore3 and ore9 Are Tolerant to Oxidative Stress // *Plant Cell Physiol.* 2004. V. 45. P. 923–932.