

ДЕЙСТВИЕ КРОТИЛИНА НА ИЗМЕНЕНИЕ ЧАСТОТЫ МУТИРОВАНИЯ ХРОМОСОМ *Vicia faba* И *Allium cepa*

Синтез новых химических веществ и их применение в сельском хозяйстве, медицине и других областях народного хозяйства, где человек прямо или косвенно (через продукты питания) соприкасается с ними, выдвинули вопрос их генетической эффективности.

Особое место среди этих веществ занимают гербициды, целью использования которых является уничтожение сорняков в посевах, но не исключена возможность иных их воздействий на основную культуру. В практике исследование свойств гербицидов ограничивается проверкой их хозяйственного эффекта. Однако имеются исследования относительно смещения генетических показателей при воздействии на клетки растений рядом гербицидов, широко применяемых в сельском хозяйстве.

В монографии «Химия и природа гербицидов» А. Крафтс [1] приводит данные ряда авторов о способности гербицидов вызывать цитогенетические нарушения. Так, исследование Ивенсом и Блекманом действия фенилкарбамата на клетки показало, что этот гербицид обладает подиплоидогенными свойствами, сходными с колхицином, и гибель растений происходит из-за нарушения нормального хода митоза. Различные аномалии в процессе деления клеток и структуре хромосом, по данным Кенвина и Фризена, вызывает раствор гербицида ИФК. Широкою известностью как мутаген со специфическим проявлением действия на хромосомы получил гербицид ГМК—гидразид малеиновой кислоты [2—5].

Настоящая работа посвящена изучению генетических свойств кротилина, одного из эффективных гербицидов, применяемых в Армении. Состояние изученности свойств этого вещества в разных аспектах мы обсуждаем в следующей статье, помещенной в настоящем сборнике [6]. Следует лишь отметить, что о его влиянии на структуру хромосом и клеточное деление в доступной нам литературе не удалось обнаружить каких-либо сведений.

Исследование мутагенных свойств кротилина проводилось на семенах двух объектов: *Vicia faba* var. *major* и *Allium cepa*.

Кротилин представляет собой маслянистое вещество и в воде дает эмульсию. Готовили весовое соотношение вещества и воды. Раствор применяли после длительного интенсивного встряхивания, когда на дне сосуда не оставалось капелек масла. В практике обычно применяются водные растворы кротилина.

Опыты были поставлены с замачиванием сухих семян и обработкой корешков растворами кротилина.

В первом случае сухие семена конских бобов замачивали в растворах кротилина—0,001; 0,005 и 0,01% в течение 6, 12 и 18 часов. По

истечении указанных сроков семена тщательно промывали под водой в течение 10 мин. и ставили во влажные опилки на проращивание при 22°C. На четвертые сутки после начала опыта отбирали корешки длиной 12—13 мм и помещали в 0,05% раствор колхицина на 2 часа. Затем их фиксировали в ацет-алкоголе (3/1) и окрашивали ацетокармином. На временных давленных препаратах проводили метафазный анализ.

В другом опыте кротилином были обработаны корешки конских бобов, достигшие 12—13 мм длины. В этом случае обработка 0,01% раствором кротилина продолжалась 1 и 3 часа, и материал фиксировался сразу после обработки, а также через 9 и 18 часов.

На корешках *A. сера* проводили анафазный анализ параллельно с определением митотической активности. Корешки лука длиной 4—5 мм обрабатывали 10^{-3} и 10^{-6} % растворами кротилина. Материал фиксировали прямо из растворов кротилина через каждые три часа в течение 24 часов. На каждую точку фиксации просматривали по 25 корешков.

Обработка сухих семян *Vicia faba*. Не все варианты опыта, поставленного на конских бобах и отмеченного в отделе методики, удалось проанализировать цитогенетически. При замачивании сухих семян в течение 18 час. в растворах кротилина корешки достигали лишь 3—4 мм длины и погибали. При 12-часовой обработке при длине корешков, соответствующих контрольному варианту, в вариантах с кротилином не наблюдалось деления клеток, а в единичных случаях хромосомы были скучены и представляли собой компактный комок. Материал для анализа был получен лишь при 6-часовом замачивании, но здесь решающую роль играла концентрация раствора. Наибольшая из них (0,01%) при обработке в течение 6 часов дала детальный эффект. И лишь два остальных раствора дали возможность иметь материал для метафазного анализа (табл. 1).

Таблица 1

Действие кротилина на хромосомы *Vicia faba* при замачивании сухих семян

Вариант	Ч и с л о			% метафаз с аберрациями хромосом	Среднее число аберраций
	метафаз	метафаз с аберрациями хромосом	аберраций хромосом		
Вода	1466	142	155	$9,6 \pm 0,7$	1,03
Кротилин 0,005 %	1014	46	47	$4,5 \pm 0,6$	1,02
Кротилин 0,001 %	572	31	35	$5,4 \pm 0,9$	1,12

Полученный цифровой материал позволяет заключить, что действие взятых растворов кротилина характеризуется антимуtagenными свойствами: снижается уровень мутирования хромосом с $9,6 \pm 0,7\%$ до $4,5 \pm 0,6\%$ при концентрации 0,005% и $5,4 \pm 0,9\%$ при концентрации 0,001%. Достоверность разницы с контролем в первом случае составляет 4,7, во втором—3,7. Разница между вариантами кротилина не достоверна. Почти не изменяется средняя поврежденность хромосом на поврежденную клетку.

Антимуtagenный эффект ряда веществ обнаружен сравнительно недавно [7—10]. Механизм действия антимутагенов мало изучен. Вероятно, в каждом конкретном случае их влияние имеет определенное направление. Известно, что одно и то же вещество в зависимости от концентрации и объекта исследования может проявить как мутагенный, так и антимуtagenный эффект (11).

Соотношение типов структурных перестроек хромосом несколько изменяется при действии концентрации 0,001% (табл. 2).

Таблица 2
Соотношение типов перестроек хромосом при действии кротилина на сухие семена *Vicia faba*

Вариант	Типы перестроек (% от суммы)				
	изолюкусные разрывы	межхромосомные хроматидные обмены	дупликация-делеции	хроматидные концевые делеции	прочие
Вода	51,6±4,0	11,6±2,5	19,4±3,2	7,7±2,1	9,7±2,3
Кротилин 0,005%	57,6±7,5	—	22,2±4,4	8,7±4,2	5,8±3,9
Кротилин 0,001%	80,1±6,7	2,8±2,7	2,8±2,7	8,5±4,7	5,8±3,9

Как видно из таблицы, в отмеченном варианте увеличен процент изолюкусных разрывов и незначительно число более сложных типов — триадналов и межхромосомных хроматидных обменов, объединенных нами в одну графу. Другой раствор кротилина почти не смещает контрольных показателей.

Для характеристики активности взятых растворов кротилина в отношении процессов соединения фрагментов был более детально проанализирован тип изолюкусных разрывов. Как известно, он включает четыре категории по признаку соединения проксимальных и дистальных фрагментов. Табл. 3 указывает на факт ингибирования кротилином процессов соединения. Причем в варианте с 0,001% уменьшен процент соединения проксимальных фрагментов и увеличен вдвое по сравнению с контролем процент соединения дистальных фрагментов. В варианте с 0,05% лишь категории с соединением как дистальных, так и проксимальных фрагментов отличаются от контроля.

Таблица 3
Действие кротилина на интенсивность соединительных процессов в поврежденных хромосомах *Vicia faba*

Вариант	Число изолюкусных разрывов	Соотношение категорий (% от суммы)			
		НПД	СПНД	СПД	СДНП
Вода	80	58,7	18,7	15,0	7,6
Кротилин 0,005%	26	73,0	15,4	3,9	7,7
Кротилин 0,001%	28	71,5	7,1	7,1	14,3

Антимутагенное действие любого вещества можно характеризовать, исходя из двух предпосылок: во-первых, происходит инактивация мутагенных свойств сопутствующего фактора (в нашем случае активного комплекса естественных мутагенов, содержащихся в кожуре семян *V. faba*), т. е. снижение силы первичной реакции поражения хромосомных структур и, во-вторых, активируются вторичные процессы восстановления структуры хромосом путем соединения образованных фрагментов. В первом случае не замечается изменения в соотношении типов структурных перестроек хромосом. Во втором случае защитное (антимутагенное) вещество активирует возникновение таких типов структурных перестроек хромосом, которые характеризуются соединением фрагментов. Они частично восстанавливаются в нормальном виде, чем и снижается частота мутирования.

Как показывает табл. 3, в нашем случае кротилин, уменьшая частоту мутирования хромосом, вместе с тем ингибировал соединительные процессы. Этот факт позволяет предположить, что кротилин уменьшает энергию поражения, что, вероятно, можно отнести за счет его свойства как маслянистого вещества, обволакивающего семена и не разрешающего аутомутагенам из кожуры полностью раствориться в воде.

Обработка корешков *V. faba*. При обработке корешков длиной 12—13 мм кротилин действовал настолько угнетающе, что материала для цитогенетического анализа не было получено. Имело место сильное подавление митотического деления клеток. В варианте с 0,005% раствором кротилина при просмотре 15 корешков под микроскопом была зарегистрирована всего 101 метафаза при обработке в течение одного часа и фиксации через 18 часов и 54 метафазы при обработке в течение 3 часов и фиксации также через 18 часов.

Обработка корешков лука. Подобный же опыт был проведен на корешках лука. Исследование мутагенных свойств в этом случае, как отмечалось выше, проводили одновременно с определением митотической активности. Фиксация материала через каждые три часа от начала обработки позволила определить в динамике действие двух концентраций кротилина на частоту мутирования хромосом при продолжительности влияния от 3 до 24 часов (табл. 4). Данные таблицы показывают, что концентрация $10^{-6}\%$ почти не изменяет частоту

Таблица 4

Действие кротилина на частоту мутирования клеток *Allium cepa* L.

Время обработки, час.	Число		% анафаз с aberrациями хромосом
	анафаз	анафаз с aberrациями хромосом	
Контроль (вода)			
3	65	6	$9,23 \pm 3,53$
6	303	17	$5,61 \pm 1,32$
9	430	35	$8,14 \pm 1,32$
12	528	34	$6,43 \pm 1,07$
15	593	27	$4,54 \pm 0,86$
18	364	17	$4,67 \pm 1,11$
21	694	22	$3,15 \pm 0,66$
24	655	37	$5,65 \pm 0,90$
Кротилин $10^{-6}\%$			
3	112	6	$5,35 \pm 2,12$
6	201	18	$8,95 \pm 2,01$
9	195	9	$4,61 \pm 1,50$
12	424	29	$6,83 \pm 1,23$
15	432	24	$5,55 \pm 1,10$
18	506	32	$6,32 \pm 1,08$
21	620	23	$3,70 \pm 0,76$
24	568	29	$5,10 \pm 0,29$
Кротилин $10^{-3}\%$			
3	139	17	$12,23 \pm 2,78$
6	182	9	$4,94 \pm 1,61$
9	38	3	$7,89 \pm 4,37$
12	117	10	$8,54 \pm 2,58$
15	282	17	$6,03 \pm 1,42$
18	262	13	$4,93 \pm 1,34$
21	619	36	$5,81 \pm 0,94$
24	528	35	$6,63 \pm 1,08$

выхода aberrаций хромосом по сравнению с контролем. В другой статье отмечается факт идентичного с контролем действия этого раствора на клеточное деление [6].

Обработка раствором кротилина 10^{-3} % в некоторые сроки приводит к увеличению частоты мутирования клеток. Вероятно, с активацией поступления большего количества клеток в митоз, включая и клетки со спонтанно поврежденными хромосомами, следует связать некоторое увеличение числа клеток с поврежденными хромосомами в первой точке. Данные табл. 4 приводят к выводу о генетической инертности кротилина в отношении хромосом А. сера. Однако в отличие от действия на семена конских бобов здесь не выявляются его антимутиационные свойства.

Анализ соотношения типов структурных перестроек хромосом выявил некоторые особенности действия кротилина. Не изменяя уровня мутирования хромосом, его растворы вызывают некоторые качественные изменения в процессе становления мутаций хромосом и времени их проявления (табл. 5).

Таблица 5

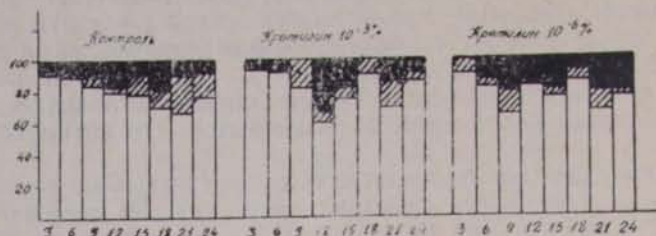
Изменение соотношения типов структурных перестроек хромосом А. сера L. под действием кротилина

Время обработ- ки, час.	Фрагменты	Хроматидные	Хромосомные	Число aberrаций
		дицентрики	дицентрики	
(% от суммы)				
	Контроль (вода)			
3	93,3	6,7	—	15
6	91,3	8,7	—	23
9	83,8	10,2	6	49
12	79,3	16,8	4,1	48
15	78,0	9,7	12,3	41
18	70,5	17,5	12	17
21	68,7	9,3	22	32
24	75,4	8,8	15,7	57
	Кротилин 10^{-6} %			
3	88,9	—	11,1	9
6	83,2	12,6	4,2	24
9	66,7	22,2	11,1	9
12	80,6	19,4	—	36
15	75,7	20,2	4,1	29
18	87,6	6,1	6,3	49
21	66,6	22,3	11,1	27
24	75,9	20,5	2,6	39
	Кротилин 10^{-3} %			
3	96,3	3,6	—	28
6	90,9	9,1	—	11
9	83,3	—	16,7	6
12	61,1	33,3	5,6	18
15	74,9	17,7	7,4	28
18	88,2	—	11,8	17
21	68,1	14,9	17,0	47
24	86,1	9,2	4,7	43

Как и следовало ожидать, появление хромосомных дицентриков в контроле задерживается. Раствор кротилина 10^{-6} % несколько изменяет картину. Здесь уже через три часа отмечается появление хромосомных

мостов. Вероятно, сказывается ускорение процессов митоза под действием кротилина.

С этой точки зрения представляют интерес колебания в процентах хроматидных дицентриков в варианте с $10^{-3}\%$ кротилина. Графический рисунок показывает, что в течение всего анализируемого периода



Действие кротилина на изменение соотношения типов структурных перестроек хромосом.

По оси абсцисс—продолжительность воздействия (час), по оси ординат—процент перестроек.

- — ацентрические фрагменты.
- — хромосомные дицентрики.
- — хроматидные дицентрики.

наблюдается два спада до нуля через каждые шесть часов. Динамика хромосомных дицентриков в этом варианте не отличается от контроля.

Таким образом, анализ полученных данных показал, что замачивание семян конских бобов в растворах кротилина приводит к достоверному снижению уровня мутирования хромосом. Модификация мутабельности при действии кротилина характеризуется уменьшением повреждения хромосом и подавлением процесса соединения фрагментов при образовании перестроек типа изохроматидных разрывов.

Хромосомы меристемы корешков *A. cere* проявляют инертное отношение к действию кротилина. Лишь несколько смещается в некоторые сроки воздействия соотношение типов структурных перестроек хромосом.

Լ. Ա. ԱՐԱՐԱՏՅԱՆ, Ս. Ա. ՎԱՐԴԱՆՅԱՆ

ԿՐՈՏԻԼԻՆԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ *Vicia faba* և *Allium cepa*
ՏԵՍԱԿՆԵՐԻ ՔՐՈՄՈՍՈՄՆԵՐԻ ԽՈՏՈՐՈՄՆԵՐԻ ՀԱՃԱՆԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ո մ

Vicia faba տեսակի չոր սերմերը մշակվել են կրոտիլինի տարբեր խտությունների լուծույթներով, որի հետևանքով բրոմասոմային խտորաններ կրող բջիջների տոկոսը հավաստիորեն ընկել է: *Allium cepa* տեսակի ծիլերի վրա ազդելիս, կրոտիլինը բրոմասոմների ստրուկտուրաների վրա որևէ ազդեցություն չի գործել:

EFFECT OF CROTILINE ON THE FREQUENCY OF THE VICIA FABA AND ALLIUM CEPA TYPE CHROMOSOME ABERRATIONS

Summary

Dry seeds of the *Vicia faba* type have been treated with crotiline solutions of different densities, as a result of which the percentage of cells carrying chromosome aberrations has markedly fallen. Crotiline has shown no effect on the chromosome structures when applied on the *Allium cepa* type sprouts.

ЛИТЕРАТУРА

1. Крафтс А. Химия и природа действия гербицидов. ИЛ, 1963.
2. Darlington C. D., McLeish J. Action of maleic hydrazide on the cell. *Nature*, 167, 407, 1951.
3. McLeish J. The action of maleic hydrazide in *Vicia*. *Heredity* (Suppl.), 6, 125, 1953.
4. Carlson J. M. Cytological response of plant meristems to maleic hydrazide. *Iowa State Col. J. Sci.*, 29, 105, 1954.
5. Weller L. E., Bell C. D., Sell H. M. Studies of maleic hydrazide interactions with thiol compounds. *Plant phys.*, 32, 146, 1957.
6. Аракатян Л. А., Вартанян А. А. Модификация кротилином динамики клеточного деления. В настоящем сборнике, стр. 51—55.
7. Novick A. Antimutagens. *Nature*, 170, 926, 1952.
8. Novick A., Szillard Z. Antimutagens. *Proc. 9-th Intern. Cong. Genetics.*, 2, 698, 1954.
9. Дубинин Н. П., Щербаков В. К., Сурков В. В. Антимутагенный и мутагенный эффект аминокислот, обладающих противолучевым действием. *ДАН СССР*, 159, 4, 913, 1964.
10. Винклер Г. Н., Запрометов М. Н., Щербаков В. К. Генетическая активность катехинов, выделенных из чайного растения. *ДАН СССР*, 177, 3, 699, 1967.
11. Аракатян Л. А. Специфичность мутационной изменчивости хромосом под действием нидолилукусной кислоты. В сб.: «Применение экспериментальных мутаций в селекции растений», Тезисы докладов, 13, Киев, 1968.