

В. А. Амирбемян, В. А. Авакян

ДЕЙСТВИЕ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ И ЭТИЛЕНИМИНА НА ЧАСТОТУ МУТИРОВАНИЯ ХРОМОСОМ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Оценка специфичности различных мутагенных агентов проводится и на хромосомном уровне. При воздействии физических и химических мутагенов наблюдается значительное различие в спектрах мутаций, и каждому мутагену свойствен свой характерный эффект.

Имеется ряд работ, где отмечается, что группа химических мутагенов обладает задержанным эффектом, в частности, под воздействием этиленимина возникают генные мутации, в то время как радиация вызывает в большинстве случаев хромосомные перестройки /1 - 4/. Цель настоящей работы - сравнительное изучение цитогенетического действия рентгенооблучения и этиленимина, а также их комбинированного воздействия на сорта мягкой пшеницы.

Объектом опыта служили четыре сорта мягкой пшеницы (*T. aestivum*): Арташати 42 (*var. turcicum*), Эритролеукон 12 (*var. erythro-leuson*), Спитакаат (*var. graecum*) и Галгалос (*var. delfi*). Семена облучались рентгеновскими лучами на установке РУМ-11 при напряжении на трубке 185 кВ, силе тока 15 мА, мощности дозы 415 р/мин. Доза облучения 10 кр. Облученные и контрольные семена сорта Арташати 42 обрабатывали также водным раствором этиленимина в концентрациях 0,02 и 0,05% с продолжительностью обработки 18 час. Семена проращивались в чашках Петри, в термостате при 25°C. Корешки, в вариантах рентгенооблучения, низкой концентрации ЭИ и комбинированного воздействия (10 кр + ЭИ 0,02%) начали фиксировать через 48 час. после намачивания семян. Последующие фиксации в этих вариантах проводили через 52; 56; 60 и 64 час. в смеси абсолютного спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1). При обработке же семян этиленимином в концентрации 0,05% и комбинированном воздействии наступление первых митозов было задержано на 24 час. Первую фиксацию здесь проводили через 72 час. и далее с перерывами в 6 час. - через 78, 84 и 90 часов.

Корешки окрашивались ацетокармином. Цитогенетический анализ структурных изменений хромосом проводился анафазным методом. На каждую точку фиксации просмотрено 500 анафаз.

В процессе цитогенетического анализа по каждому сорту фиксации

учитывался общий процент клеток с aberrациями хромосом, а также отмечались основные типы нарушения: хроматидные и хромосомные дисцентрики и фрагменты.

По количеству клеток с aberrациями хромосом в первом сроке фиксации изучаемые сорта достоверно отличаются между собой (табл. 1 и 2). У Эритролеукон 12 и Галгалос наблюдается увеличение (повышение) числа пораженных клеток от первого до пятого срока фиксации. У сорта Спитакаат незначительное повышение процента клеток с aberrациями хромосом отмечено до четвертого срока фиксации, после чего кривая время — эффект идет на понижение. Уменьшение числа клеток с aberrациями хромосом к последнему сроку фиксации наблюдается только у сорта Спитакаат. Интересно отметить, что сорт, имеющий в первый срок фиксации наибольшее число анафаз с aberrациями, к последнему сроку имеет наименьшее их число и наоборот.

Выход aberrаций хромосом при рентгенооблучении у сорта Арташати 42 в первый срок фиксации довольно высокий. Затем ко второму и третьему срокам снижается, и достоверное повышение приходится к четвертому и пятому срокам фиксации. Такая же картина наблюдается у сорта Спитакаат с той лишь разницей, что к пятому сроку выход aberrаций снижается. У сорта Галгалос выход aberrаций повышается к третьему сроку, к четвертому снижается, а к последнему сроку достигает максимума.

Таким образом, данные варианта с рентгенооблучением показывают, что максимальная мутабельность клеток падает на вторую половину митоза. Это явление можно объяснить вторичными процессами, происходящими в клетках после облучения. Согласно Свенсону /11/ при действии излучения с низкой ЛПЭ в хромосомах возникает большое количество потенциальных повреждений, которые могут вести к истинным разрывам или же восстанавливаться. По-видимому, в нашем опыте в поздние часы фиксации эти потенциальные повреждения превратились в истинные разрывы. В варианте этиленимина у сорта Арташати 42 наблюдается резкий спад aberrаций ко второму сроку, а затем попеременное увеличение и уменьшение. Максимум число aberrаций достигает в четвертый срок фиксации.

Полученные нами результаты в варианте этиленимина совпадают с данными ряда авторов /5 — 8/, которые считают, что при воздействии алкилирующими агентами максимум выхода aberrаций хромосом приходится не на первые часы фиксации. Однако эти работы велись не с сухими семенами, а с проросшими. Существуют и другие данные, подтверждающие, что максимум выхода aberrаций приходится на первые часы фиксации /9, 10/.

Известно, что применение комбинированного воздействия двух мутагенов различной природы приводит к изменению характера мутационной реакции, присущей каждому в отдельности. Дополнительная обработка мутагенами может завершиться аддитивными или сверхаддитивными эффектами, т. е. суммарным или превышающим действием двух мутагенов, или же их цитогенетический эффект будет меньше суммы отдельных эффектов. Литературные данные цитогенетического изучения комбинированного воздействия противоречивы. В од-

них случаях совместное воздействие приводит к усилению частоты aberrаций, по сравнению с отдельными воздействиями /12-15/, в других это воздействие оказывается слабее эффекта одного из примененных мутагенов /16 - 19/.

При комбинированном воздействии мутагенами достоверное увеличение aberrаций хромосом наблюдалось в первый, второй и четвертый сроки.

Сравнение частот aberrаций, наблюдаемых в нашем опыте при комбинированном воздействии, с частотами, полученными при суммировании эффектов обоих мутагенов, показывает, что эффект совместного действия аддитивен в первые часы фиксации, затем к 56 часу наблюдается резкий спад, однако аддитивный характер кривой сохраняется. Далее в последних двух фиксациях эффект комбинированного воздействия слабее эффекта рентгенооблучения и намного выше по сравнению с эффектом этиленимина в эти же часы фиксации.

Относительно специфичности возникновения отдельных типов aberrаций хромосом наблюдается довольно существенная разница по числу клеток, имеющих хромосомные и хроматидные дицентрики /табл. 3, 4/.

При рентгенооблучении всех изученных сортов пшеницы наблюдались в основном хроматидные дицентрики и преимущественно одиночные фрагменты, в то время как хромосомные дицентрики дали низкий процент выхода. Такой спектр aberrаций хромосом характерен для химических мутагенов /20, 21/. У сорта Арташати 42 частота хроматидных дицентриков повышена в первые два срока фиксации и к третьему и пятому срокам достигает максимума. Частота хромосомных дицентриков несколько повышена на первый и пятый сроки фиксации, а в остальные часы снижается. У всех четырех сортов наблюдались преимущественно одиночные фрагменты, как свободные, так и с дицентриками. Максимум одиночных фрагментов у сорта Арташати 42 отмечен на четвертом сроке, а на остальные часы частота довольно низкая. У сорта Эритролеукон 12 частота хроматидных дицентриков по срокам постепенно увеличивается. Максимум одиночных фрагментов приходится на первый срок фиксации. В последующие сроки наблюдается попеременное увеличение и уменьшение их частот. У сорта Спитакаат по срокам наблюдалось волнообразное увеличение и уменьшение частот хроматидных дицентриков. Очень низкий процент выхода хромосомных дицентриков падал на первый и третий сроки фиксации, а в остальные сроки наблюдались равные частоты. Выход одиночных фрагментов повышен во втором, третьем и четвертом сроках фиксации, а в другие часы - намного ниже. Парные фрагменты во все сроки составляют низкий процент. Волнообразная частота по срокам хроматидных дицентриков наблюдалась и у сорта Галгалос. Максимум здесь падает на последний срок фиксации; во второй, третий и пятый сроки фиксации их частоты почти равны. В четвертом сроке частота фрагментов очень низкая. Парные фрагменты встречались в первые три срока в довольно низких процентах. Массовая фрагментация у всех четырех сортов наблюдалась редко.

Сравнение спектров, полученных рентгенооблучением и воздействием этиленимином у сорта Арташати 42, показывает, что резкого раз-

Таблица 1

Зависимость числа клеток с абберациями хромосом от времени фиксации у сортов мягкой пшеницы при рентгеноблучении

Сорт	Время фиксации	Контроль			10 кр			tdiff	Среднее число аббераций на одну клетку
		Число просмотренных анафаз	Клетки с абберациями	% клеток с абберациями	Среднее число аббераций на одну клетку	Число просмотренных анафаз	Клетки с абберациями		
Эригале-узон 12	48	500	3	$0,6 \pm 0,35$	-	500	92	$18,4 \pm 1,73$	1,15
	52	500	-	-	-	500	149	$29,8 \pm 2,05$	1,46
	56	500	4	$1,8 \pm 0,59$	15,0	500	198	$39,6 \pm 2,19$	1,67
	60	500	6	$1,2 \pm 0,49$	1,0	500	288	$57,6 \pm 2,21$	1,79
	64	500	4	$0,8 \pm 0,40$	1,0	500	398	$79,6 \pm 1,80$	1,46
	В среднем	2500	17	$0,88 \pm 0,16$	-	2500	1125	$45,0 \pm 1,0$	-
Спитакат	48	500	1	$0,2 \pm 0,2$	1,0	500	303	$60,6 \pm 2,18$	1,51
	52	500	-	-	-	500	247	$49,4 \pm 2,23$	1,22
	56	500	8	$1,6 \pm 0,56$	1,62	500	285	$57,0 \pm 2,21$	1,31
	60	500	12	$2,4 \pm 0,68$	1,58	500	378	$75,6 \pm 1,92$	1,62
	64	500	3	$0,6 \pm 0,34$	1,0	500	189	$37,8 \pm 2,17$	2,77
	В среднем	2500	24	$0,96 \pm 0,19$	-	2500	1402	$56,1 \pm 0,99$	-
Галгалоc	48	500	1	$0,2 \pm 0,2$	1,0	500	192	$38,4 \pm 2,17$	1,69
	52	500	36	$7,2 \pm 1,48$	1,30	500	179	$35,8 \pm 2,14$	1,52
	56	500	48	$9,6 \pm 1,32$	-	500	287	$57,5 \pm 2,21$	1,44
	60	500	1	$0,2 \pm 0,2$	1,0	500	168	$33,6 \pm 2,11$	1,78
	64	500	-	-	-	500	304	$60,5 \pm 2,18$	1,59
	В среднем	2500	86	$3,4 \pm 0,36$	-	2500	1130	$45,2 \pm 1,0$	-

Таблица 2

Зависимость числа клеток с абберациями от времени фиксации у сорта Арташати 42 при рентгеноблучении и воздействии этиленимином

Время фиксации	Контроль				Опыт				
	Число просмотренных анафаз	Клетки с абберациями	% клеток с абберациями	Среднее число аббераций на одну клетку	Число просмотренных анафаз	Клетки с абберациями	% клеток с абберациями	t_{diff}	Среднее число аббераций на одну клетку
Рентгеноблучение, 10 кр									
48	500	3	$0,6 \pm 0,34$	1,86	500	251	$50,2 \pm 2,24$	21,82	1,44
52	500	7	$1,4 \pm 0,52$	1,0	500	183	$36,6 \pm 2,15$	15,87	1,35
56	500	-	-	-	500	115	$23,0 \pm 1,88$	-	1,34
60	500	4	$0,8 \pm 0,39$	1,0	500	403	$80,6 \pm 1,77$	44,01	1,46
64	500	5	$1,0 \pm 0,44$	1,0	500	362	$72,4 \pm 1,99$	34,86	1,73
В среднем	2500	19	$0,76 \pm 0,17$	1,33	2500	1314	$52,65 \pm 2,23$	23,12	-
Этиленимин 0,02%									
48	500	89	$16,6 \pm 0,52$	1,32					13,2
52	500	13	$2,6 \pm 0,22$	1,30					1,35
56	500	30	$6,0 \pm 1,06$	1,26					-
60	500	167	$33,4 \pm 2,10$	1,29					15,18
64	500	143	$28,6 \pm 2,02$	1,45					13,33
В среднем	2500	618	$24,72 \pm 0,86$	1,28					27,22
10 кр этиленимин 0,02%									
48	500	358	$71,6 \pm 2,02$	1,36					34,88
52	500	398	$79,6 \pm 1,80$	1,51					41,88
56	500	165	$33,0 \pm 2,10$	1,46					-
60	500	310	$62,0 \pm 2,17$	1,34					27,72
64	500	349	$69,8 \pm 2,053$	1,22					32,74
В среднем	2500	1580	$63,2 \pm 0,96$	1,37					63,71

Таблица 3

Типы aberrаций хромосом, появляющихся у сортов мягкой пшеницы при обработке рентгенооблучением /10 кр/

Сорта	Время фиксации /часы/	Общее число aberrаций	Типы aberrаций										массовые фрагменты
			1	1-	1=	1 с массовыми фрагментами	X	X-	X=	1 с массовыми фрагментами	-	=	
Эритроплю-кон 12	48	108	36,11	3,70	-	-	8,33	-	0,91	-	47,22	6,48	1,85
	52	219	36,75	6,39	-	-	5,02	0,91	-	6,0	2,13	-	-
	56	332	90,36	0,30	0,30	-	5,42	-	-	-	3,01	1,20	-
	60	530	82,45	-	-	-	6,04	-	-	-	0,94	0,56	-
	64	584	91,80	3,08	0,34	-	6,16	-	-	-	1,03	1,03	-
Спатаваат	48	444	72,75	5,40	0,23	-	2,3	-	-	-	1,90	0,89	-
	52	302	82,45	3,31	0,33	0,66	8,0	0,99	0,33	-	6,0	0,99	0,99
	56	436	77,08	2,75	-	-	2,30	-	-	-	20,84	-	-
	60	621	70,0	4,34	1,77	0,80	9,02	1,81	0,48	-	17,23	3,06	0,97
	64	522	90,0	1,53	0,57	-	8,05	-	-	-	1,53	0,38	-
Галгалос	48	306	67,0	7,0	1,31	1,31	3,0	0,86	0,66	-	28,0	1,0	1,31
	52	244	85,24	1,84	0,82	-	5,74	-	-	-	8,20	0,32	-
	56	416	82,70	1,20	2,40	-	5,04	0,24	0,24	-	8,17	4,08	-
	60	288	96,84	-	-	-	-	-	-	-	3,36	-	-
	64	487	90,76	1,44	-	-	-	-	-	-	7,40	-	-

личия между обоими спектрами нет и в основном они похожи. В варианте рентгенооблучения частота хроматидных дицентриков остается повышенной во все сроки фиксации, а в варианте этиленимина наблюдается их постепенное повышение по срокам с максимумом к третьему сроку. Хромосомные дицентрики здесь также встречаются в меньшем количестве. Однако в варианте этиленимина, по сравнению с рентгенооблучением, наблюдается повышение одиночных фрагментов во все сроки. Максимум их составляет довольно высокий процент, чего нет в варианте рентгенооблучения. Парные фрагменты здесь встречаются во все сроки с довольно высокой частотой.

Иная картина наблюдается в варианте комбинированного воздействия, где наблюдается понижение процента как хроматидных, так и хромосомных дицентриков. В варианте совместного воздействия в отличие от варианта с отдельными воздействиями мутагенов наблюдалась очень высокая частота одиночных фрагментов во все сроки, особенно в первый срок. Повышение имеет место в отношении парных и массовых фрагментов. Это наводит на мысль, что дополнительная обработка этиленимином в концентрации 0,02%, по-видимому, усиливает поражающее действие радиации с большим выходом фрагментов.

Таблица 4

Типы aberrаций хромосом, появляющихся у сорта Арташати 42, при обработке рентгеноблучением, этиленимином и их комбинированном воздействии

Варианты	Время фиксации, часы	Общее число aberrаций	Типы перестроек										мас-совые фрагменты
			1	1-	1=	1 с массовыми фрагментами	X	X-	X=	X с массовыми фрагментами	-	=	
10 кр	48	368	80,88	4,08	1,64	0,55	10,33	0,82	0,55	-	6,25	0,82	1,64
	52	248	86,89	7,86	1,21	0,40	5,24	1,21	0,40	0,80	8,00	-	-
	56	154	91,56	2,80	-	-	-	-	-	-	5,84	-	-
	60	593	72,51	6,58	2,19	0,67	3,71	0,33	0,17	0,33	18,54	5,06	0,17
	64	629	89,18	9,84	1,27	-	7,31	0,81	-	-	3,49	-	-
Этиленимин 0,02%	48	118	36,4	18,6	0,84	-	-	-	-	-	55,9	6,8	0,84
	52	17	70,0	-	-	-	23,33	-	-	-	6,0	-	-
	56	38	92,1	-	-	-	2,63	-	-	-	5,26	-	-
	60	217	81,11	2,76	-	-	3,68	-	-	-	12,0	3,22	-
	64	208	88,0	0,48	0,48	-	1,92	-	0,48	-	8,17	1,44	0,48
10 кр + ЭИ 0,02%	48	489	24,74	6,13	1,43	1,23	4,92	1,02	0,20	-	57,25	3,30	4,70
	52	602	36,20	10,8	2,66	2,33	5,81	2,48	0,66	-	45,51	8,80	3,65
	56	227	72,70	5,73	0,44	-	0,88	-	-	-	23,35	2,64	0,44
	60	416	76,44	2,84	1,88	-	4,33	-	-	-	13,46	4,80	0,66
	64	426	71,83	19,25	1,41	0,47	9,86	0,47	-	-	14,10	3,76	0,47

При этиленимине в концентрации 0,05% и комбинированном воздействии (10 кр + ЭИ 0,05%) наблюдалось сильное торможение митозов, почему и не было возможности учитывать материал в цитологических анализах по aberrациям. При незначительном делении клеток, которое происходило на 24 часа позже, наблюдались aberrации в виде массовой фрагментации. Это отмечено и в других работах. Так например, в опытах Т. Орава и др. [22] с воздушно-сухими семенами ячменя при совместном действии гамма-лучей и этиленимина с разными концентрациями наблюдалось сильное поражение митозов, особенно при концентрации выше 0,04%.

Таким образом, наши цитологические данные показали, что выбранные нами сорта мягкой пшеницы при воздействии различных мутагенов отчетливо проявляют свою специфическую реакцию, непохожую на другие объекты.

Степень устойчивости живых организмов определяется сложным процессом, обуславливающим уровень первичной повреждаемости клеток, и интенсивностью процессов пострadiационного восстановления.

Анализ динамики цитологических повреждений показал наличие существенных различий между вариантами опыта по интенсивности

восстановления нарушений хромосом. Снижение числа аберраций (наклон кривых время — эффект) в нашем опыте отмечено только в варианте совместного действия рентгеновских лучей и этиленимина (12,8%).

Относительно специфичности восстановления отдельных типов аберраций хромосом наблюдается довольно существенная разница по степени снижения числа хроматидных, хромосомных дицентриков и фрагментов. Соответственно общему числу аберраций хромосом происходит увеличение хроматидных дицентриков и уменьшение числа фрагментов. Уменьшение числа хромосомных дицентриков наблюдается только в варианте рентгенооблучения, за исключением сорта Спитакаат.

Значительный интерес представляет также анализ кривых время — эффект для числа фрагментов, так как степень их уменьшения наиболее четко отражает реактивную способность объекта /24/. Снижение числа фрагментов отмечено у всех сортов, как при действии рентгеновских лучей и этиленимина, так и при их совместном действии. Наибольшее снижение числа фрагментов наблюдается у сорта Эритролеукон 12 (96,3%), наименьшее — у сорта Спитакаат (26,2%).

Таким образом, цитогенетические исследования показали различие сортов по интенсивности процессов пострадиационного восстановления отдельных типов нарушений хромосом.

V. A. Amirbekian, V. A. Avakian

THE EFFECTS OF X-RAY IRRADIATION AND ETHYLENIMINE ON THE FREQUENCY OF WHEAT MUTATION

S u m m a r y

It is shown that different wheat varieties have specific reactions to the X-ray irradiation, according to the spectrum and frequency. The combined application of the two mutagens causes an increase of the frequency of chromosome disorders, but the effect is lower compared with that of the two separate mutagens.

It was also discovered a significant difference in the intensity of chromosome rearrangement among different varieties and mutagens.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ehrenberg L., Gustafsson A., Lundquist V. Viable mutants induced in barley by ionizing radiations and chemical mutagens. *Hereditas*, 47, 243, 1961.
2. Ehrenberg L. Induced mutation in plant. I. Mechanism and principles. *genet. Agraria*, 12, 364, 1960.
3. Рапопорт И. И., Зоз Н. Н. Химические мутации без нарушения целостности хромосом. *Цитология* 4, 330, 1962.

4. Дубинина Л. Г., Дубинин Н. П. Новое в действии алкилирующих соединений на мутации хромосом. Генетика, № 2, 3, 1968.
5. Kihlman B. Aberrations induced by radiomimetic compounds and their relations to radiation induced aberrations. In book "radiation-induced chromosome aberrations". New-York, London, p.100, 1963.
6. Сидоров Б. Н., Соколов Н. Н., Андреев В. С. Мутагенный эффект этиленимина в ряде клеточных поколений. Генетика, № 1, 112, 1965.
7. Гостимский С. А., Хвостова В. В. Изменение частоты перестроек хромосом, возникающих под действием этиленимина в первом митозе корешков гороха. ДАН СССР, 162, № 1, 1965.
8. Дубинин Н. П., Шербаков В. К., Кеслер Г. Н. Фазы клеточного цикла и мутагенный эффект алкилирующих соединений. Генетика, № 2, 73, 1965.
9. Ахунд-заде А. И. Цитогенетический анализ мутагенного действия радиации и химических факторов /на примере *pisum Sativum* L.). Автореф. канд. дис., Баку, Ин-т Общей генетики АН СССР, 1967.
10. Сальникова Т. В., Амелькина Н. Ф. Мутагенная активность этиленимина на мягкой пшенице в зависимости от экспозиции воздействия. Сообщение II. Нарушение хромосом и митотическая активность клеток. В сб.: Применение химических мутагенов в сельском хозяйстве и медицине. М., "Наука", 1973.
11. Свенсон К. Влияние напряжения кислорода на образование разрывов под действием ионизирующих излучений. В сб.: Вопросы радиобиологии. М., ИЛ., 1956.
12. Merz T., Swanson C.P., Cohn N.S. Intraduction of chromatid aberration produced by x-rays and radiomimetic compounds. Science, 133, 703, 1963.
13. Riger K., Michaelis A. On the time period during wich chemically induced chromatid breaks ave aviable for interaction. Exptl.cell.Res. 31, 202, 1963.
14. Сидоров В. П. Цитогенетическое исследование эффекта совместного действия этиленимина и гамма-лучей на клетки семян *сг. capillaris* в двух последовательных митотических циклах. Генетика, т. X, № 2, 1974.
15. Аветисов В. А., Валева С. А. Индуцирование хлорофильных мутаций у ячменя при совместной обработке семян гамма-квантами и растворами этиленимина в различных концентрациях. Генетика, 7, № 2, 3, 1971.
16. Scott D. The additive effects of x-rays and maleic hidrazide in inducing chromosomal aberrations at the different stage of the mitotic cycle in *vicia faba*. Mutat. Res. 15, N I, 65, 1968.
17. Валева С. А. Цитогенетический анализ совместного действия химических мутагенов и облучения на семена ячменя. Радиобиология, 4, вып. 3., 451, 1964.
18. Азатян Р. А. Цитогенетический анализ aberrаций хромосом, индуцированных алкилирующими мутагенами и гамма-лучами в сухих семенах. Канд. дисс. М., Ин-т общей генетики АН СССР, 1969.

19. Суйкова Л. А. Действие новых химических мутагенов и гамма-лучей на твердую, мягкую пшеницу и ячмень. Автореф. канд. дисс., Таллин, 1966.
20. Дубинин Н. П. О некоторых узловых вопросах современной теории мутации. Генетика, № 7, 3, 1966.
21. Kimball R. Postradiation processes in the induction of recessive lethals by ionizing radiation. J. Cellular and Comp. Physiol., 58, Suppl. I: 163, I, 1961.
22. Орав Т., Шангин-Березовский Г. и Орав И. Радиационный мутагенез и модифицирующие его условия. Таллин, Изд-во "Валгус", 1972.
23. Лучник Н. В. О некоторых дискуссионных вопросах в проблеме пострadiационного восстановления хромосом. Радиобиология, 8, вып. 3, 1968.