

Л. А. Араратян

ДЕЙСТВИЕ ГЕТЕРОАУКСИНА НА ХРОМОСОМЫ *Vicia faba* L. ПРИ РАЗНЫХ УРОВНЯХ СПОНТАННОГО МУТИРОВАНИЯ

Комбинированный эффект двух агентов, действующих на генетические структуры клетки, является одной из интересных и малоисследованных проблем. Как первый этап такого исследования нами был взят комплекс гетероауксин (ИУК) + естественная мутагенная группа веществ, содержащихся в кожуре семян *Vicia faba* L.

Известно, что при старении семян увеличивается уровень мутирования клеток /1/. У *Vicia faba* L. этот процесс идет за счет усиления мутагенных свойств веществ, накапливающихся в кожуре семян и действующих при прорастании последних на увеличение выхода аберраций хромосом /2/.

Таким образом, эту группу химических веществ можно признать за естественный мутагенный комплекс, изучение действия которого в сочетании с другими веществами может послужить выяснению генетических свойств последних.

На семенах *Allium fistulosum* L. /3/ и *Vicia faba* /4,5/ ранее мы исследовали мутагенные свойства гетероауксина и пришли к выводу о том, что он активизирует генетический эффект естественных метаболитов из кожуры семян, но сам не обладает способностью вызывать структурные перестройки хромосом.

Настоящая работа проведена с целью выяснения вопроса о том, каково будет действие этого вещества с увеличением фона спонтанного мутирования в связи с хранением семян в течение сравнительно долгого времени.

Для опытов использовали две партии семян *Vicia faba* var. *major* L. сорта Русские черные репродукции разных лет, хранившиеся в одинаковых лабораторных условиях. Опыт с первой партией семян был поставлен после 1,5 и 2,5 года хранения. Семена второй партии изучили через два и четыре года хранения.

Во всех случаях условия опытов были идентичными. Замачивали семена *V. faba* в 0,01% водном растворе калиевой соли β -индолуксусной кислоты (ИУК) на 18 час. Во всех случаях было взято одинаковое весовое соотношение семян и раствора. Затем семена промывали в проточной воде в течение 10-15 мин., переводили во влаж-

ные марлевые мешочки и ставили на проращивание в термостат при 20°C. Контрольный вариант замачивали в воде. Во всех опытах в контрольном варианте проращивание семян опережало вариант с ИУК почти на сутки. Выбирали первую фракцию проросших семян с корешками, достигшими длины 12–13 мм, и переводили на 2 часа в чашки Петри с 0,05% раствором колхицина, затем корешки фиксировали в смеси спирт + уксусная кислота (3/1). Проводили метафазный анализ в первом митозе на временных давленных препаратах, окрашенных ацетокармином.

Динамика изменения спонтанного уровня мутирования хромосом при старении семян. Данные, приведенные в табл. 1, показывают зависимость закономерного увеличения частоты клеток с абберациями хромосом в обеих партиях семян от срока хранения. Разница между показателями мутирования клеток достоверна. Более того, в первой группе число клеток с абберациями хромосом после 2,5 года хранения составляет $27,4 \pm 1,8\%$, что более чем вдвое превышает показатель, полученный у семян после 1,5 лет хранения. Почти такая же картина наблюдается и во второй партии семян: через два года хранения уровень мутирования составил $9,68 \pm 0,7$, а через 4 года — $15,1 \pm 1,4\%$.

Спектр структурных перестроек хромосом в контрольных вариантах не представляет особого интереса. Известно, что при естественном мутагенезе и действии химических веществ у хромосом *V.faba* преобладающими в спектре являются перестройки хроматидного типа. Основными из них были изолюкусные разрывы, межхромосомные обмены, дупликации-делеции, концевые делеции. Наблюдали также прочие типы аббераций, в которые включены и единичные хромосомные перестройки.

При сравнении данных контрольных вариантов в изменении соотношения типов аббераций в зависимости от срока хранения особых различий не отмечено.

Почти не меняется также средняя поврежденность клеток, т. е. среднее число аббераций на одну клетку, что говорит о том, что старение семян приводит к увеличению числа клеток с поврежденными хромосомами, а не большему повреждению хромосом.

Сравнение же данных по двум партиям семян (разных репродукций) *V.faba* указывает на разницу в спектрах типов перестроек. В первом случае изолюкусные разрывы и межхромосомные обмены представлены почти в равном количестве, а во втором изолюкусные разрывы являются преобладающим типом, а процент межхромосомных обменов значительно уменьшен. Это еще раз подчеркивает тот факт, что цитогенетические показатели являются довольно чутким критерием, поскольку могут изменяться в зависимости от многих факторов, в данном случае, вероятно, от условий выращивания.

Данные табл. 1 четко показывают, что обработка семян гетероауксином во всех случаях повышает уровень мутирования клеток, и это повышение значительное. Если принять для всех вариантов контроль за 100%, то ИУК вызывает превышение его уровня на 47,7–100%. Таким образом, можно подчеркнуть тот факт, что независимо от уровня спонтанного мутирования в случаях с семенами с кожурой действие ИУК направлено на увеличение степени мутирования хромосом. Хромосомы семян без кожуры, как это было показано нами

Таблица 1

Действие ИУК на частоту и спектр перестроек хромосом *V. faba* L. при разных уровнях естественного мутирования

Вариант	Число			Процент		Соотношение типов перестроек (% от суммы)				
	мета- фаз	метафаз с абберация- ми	аббер- аций	аббераций на клетку	клеток с аббер- ациями	изолюкусные разрывы	межхром- сомные об- мены	дуплика- ции-деле- ции	концевые делеции	прочие
I. 1,5 г.										
Вода	723	74	74	1,0	10,23 $\pm$ 1,1	32,2 $\pm$ 5,4	35,0 $\pm$ 6,2	21,6 $\pm$ 4,7	8,1 $\pm$ 3,1	2,7 $\pm$ 1,8
ИУК	573	123	140	1,14	21,47 $\pm$ 1,7	60,7 $\pm$ 4,1	20,8 $\pm$ 3,4	10,0 $\pm$ 2,5	6,4 $\pm$ 2,0	2,1 $\pm$ 1,2
2,5 г.										
Вода	579	159	189	1,2	27,4 $\pm$ 1,8	39,7 $\pm$ 3,5	30,6 $\pm$ 3,3	17,4 $\pm$ 2,7	6,9 $\pm$ 1,5	1,6 $\pm$ 0,9
ИУК	585	237	281	1,2	40,5 $\pm$ 2,0	39,1 $\pm$ 2,9	32,6 $\pm$ 2,8	10,0 $\pm$ 1,7	5,8 $\pm$ 1,3	9,6 $\pm$ 1,7
II. 2 г.										
Вода	1466	142	155	1,03	9,68 $\pm$ 0,7	51,6 $\pm$ 4,0	11,6 $\pm$ 2,6	19,4 $\pm$ 3,2	7,7 $\pm$ 2,1	9,7 $\pm$ 2,4
ИУК	669	108	141	1,30	16,1 $\pm$ 1,4	48,9 $\pm$ 4,2	18,4 $\pm$ 3,2	17,7 $\pm$ 3,2	4,3 $\pm$ 1,7	10,7 $\pm$ 2,6
4 г.										
Вода	640	86	97	1,02	15,1 $\pm$ 1,4	40,4 $\pm$ 5,4	29,1 $\pm$ 4,7	13,3 $\pm$ 3,8	12,3 $\pm$ 3,6	4,9 $\pm$ 2,3
ИУК	657	189	214	1,63	28,7 $\pm$ 1,7	48,5 $\pm$ 3,4	24,1 $\pm$ 2,9	10,7 $\pm$ 2,1	10,7 $\pm$ 2,1	6,0 $\pm$ 1,6

ранее /4, 5/, не реагируют на действие ИУК. Разница контроль - опыт для всех случаев достоверна (в 1 варианте $t_d = 5,6$ и $4,9$; во II - $4,3$ и $6,4$ соответственно по расположению данных в табл. 1).

Из табл. 1 ясно также, что в вариантах с семенами II партии ИУК оказывает влияние на среднюю поврежденность кариотипа, повышая показатель числа повреждений хромосом на 1 клетку. После двухлетнего хранения в контроле имеем $1,03$ поврежденных хромосом на 1 клетку, при ИУК - $1,30$; после четырехлетнего хранения спонтанный уровень не меняется, а ИУК способствует повышению этого показателя до $1,63$.

Анализ спектра перестроек хромосом дает основание полагать, что ИУК не вносит особых коррективов. Лишь в 1 варианте имеются отличия между контрольными и опытными данными.

Однако более подробный анализ типа изолюкусных разрывов, представленный в табл. 2, подтвердил неоднократно наблюдаемое нами явление усиления процессов соединения фрагментов при воздействии ИУК. Во всех случаях при ИУК значительно увеличен процент категории Upd (соединение проксимальных и дистальных фрагментов). Если в контроле он составляет $41,7 \pm 10,5$, то при ИУК - уже $61,2 \pm 5,2\%$ (1 вариант). Подобная картина характерна и для остальных вариантов.

Некоторыми авторами отмечается, что при старении семян наблюдается появление неспецифических для данного вида типов перестроек. Это отмечено для *Crepis capillaris*, где преобладающим является хромосомный тип перестроек, а старение приводит к появлению единичных хроматидных перестроек /6/.

У *V.faba* имеется задержанный тип мутирования, т. е. химические мутагены вызывают образование перестроек хроматидного типа /7/. В нашем случае наблюдалась следующая картина: при замачивании семян после 2,5 года хранения в воде отмечено $2,6\%$ хромосомных перестроек, тогда как у 1,5-летних семян они отсутствуют. При замачивании в ИУК также увеличивается процент хромосомных aberrаций от $0,6$ до $2,4\%$. У семян второй партии в первой паре вариантов имелось: в контроле - $1,4$, а при ИУК - $0,0\%$ aberrаций хромосомного типа; а у семян после четырехлетнего хранения в контроле - $1,1$, а при ИУК - $1,6\%$.

Полученные данные выявили динамику изменения как степени мутирования хромосом, так и спектра перестроек при старении семян *V.faba* в естественном состоянии и при действии ИУК. Ранее нами была высказана /3/, а затем подтверждена /4, 5/ мысль о том, что ИУК не обладает самостоятельными мутагенными свойствами при действии на хромосомный аппарат некоторых видов растений, а каталитически воздействует на аутомутагены и физиологические свойства клеток-мишеней. Настоящей серией опытов выявлена зависимость деятельности ИУК от уровня мутирования хромосом: чем выше уровень спонтанного мутирования, тем сильнее изменяется он под действием ИУК. В соотношении перестроек хромосом ИУК не вносит заметных изменений: в вариантах с ИУК повторяются те изменения, которые характерны для спектра при старении семян.

Если обсуждать полученные данные с позиций взаимодействия двух

Таблица 2

Действие ИУК на соотношение категорий изолюкусных разрывов при разных уровнях естественного мутирования хромосом *V.faba*.L

Вариант	Число изо- люкусных разрывов	Соотношение категорий (% от суммы)			
		NU _{pd}	UpNU _d	UdNU _p	Up _d
1. 1,5г.					
Вода	24	29,1 [±] 9,2	25,0 [±] 8,8	4,2 [±] 4,0	41,7 [±] 10,5
ИУК	85	17,7 [±] 4,1	11,7 [±] 3,4	9,4 [±] 3,1	61,2 [±] 5,2
2,5 г.					
Вода	75	36,0 [±] 5,5	18,7 [±] 4,5	5,3 [±] 2,5	40,0 [±] 5,5
И УК	110	16,3 [±] 3,7	9,1 [±] 2,7	7,3 [±] 2,4	67,3 [±] 4,4
II 2 г.					
Вода	80	58,8 [±] 5,5	18,7 [±] 4,3	7,5 [±] 2,9	15,0 [±] 3,6
ИУК	69	30,4 [±] 5,5	17,4 [±] 4,5	- -	58,2 [±] 5,9
4 г.					
Вода	31	51,6 [±] 8,9	25,8 [±] 7,8	9,7 [±] 5,0	12,9 [±] 6,0
ИУК	104	32,7 [±] 4,6	23,0 [±] 4,1	8,7 [±] 2,8	35,6 [±] 4,7

химических агентов — комплекса химических веществ — метаболитов из кожуры семян *V.faba* и гетероауксина, то становится ясным, что последний выступает как сенсibilизатор мутагенного эффекта этих веществ. В литературе приводится множество фактов относительно совместного действия двух химических веществ, а также эффекта мутагена на разных фонах спонтанного мутирования. Различные вещества в этом аспекте оказывают совершенно отличный друг от друга эффект. Так например, HN_2 оказывает действие, обратное полученному нами: при низком уровне естественного мутирования он дает большее нарастание числа клеток с абберациями, чем при высоком /8/. Защитный эффект оказывает стрептомицин при совместном воздействии с естественными мутагенами /7/. На основании последнего В. К. Щербаков делает вывод о том, что два химических вещества — мутагена могут превратиться в защитные при комбинированном действии на хромосомы /9/.

Однако имеются и данные, совпадающие с полученными нами. Например, обработка семян *V.faba* пирогаллолом на фоне низкого уровня спонтанного мутирования не оказывает какого-либо действия, а на высоком фоне заметно увеличивает частоту аббераций хромосом /9/. Автор объясняет этот факт взаимодействием пирогаллола с аутомутагенами.

При сопоставлении этих данных с нашими мы склоняемся к тому, что механизм этого явления связан с непосредственным действием гетероауксина на физиологические процессы, происходящие в клетках

при прорастании, и в некотором смысле также на генетический аппарат. В исследованиях последних лет влиянию физиологически активных веществ непосредственно на регуляцию функции генов уделяется особое внимание [10,13]. Хотя в этом плане нет еще достоверных материалов, все же воздействие ИУК на процессы синтеза ДНК, транскрипцию и трансляцию дает достаточное основание учитывать также эту гипотезу.

Таким образом, можно сделать следующие выводы.

1. Выявлено действие гетероауксина на мутирование хромосом *V. faba* при старении семян. В опытах с 2 группами семян разных репродукций через 1,5 и 2,5 года хранения (I группа) и 2 и 4 лет хранения (II группа) с естественным уровнем мутирования хромосом $10,23 \pm 1,1$; $27,4 \pm 1,8$; $9,68 \pm 0,7$ и $15,11 \pm 1,4\%$ соответственно показана динамика изменения повреждаемости хромосом и приведен анализ спектра типов структурных перестроек. Обработка гетероауксином во всех случаях значительно повышает уровень мутирования.

2. При старении семян несколько изменяется спектр типов структурных перестроек хромосом. Обработка гетероауксином почти не влияет на эти показатели.

3. При разных уровнях мутирования ИУК сохраняет свое свойство активировать процессы соединения. Отмечено значительное повышение процента изменений хромосом типа соединения проксимальных и дистальных фрагментов во всех вариантах с гетероауксином по сравнению с соответствующим контролем.

L. A. Araratian

THE EFFECT HETEROAUXIN ON THE VICIA FABAE L. CHROMOSOMES UNDER DIFFERENCE DEGREE OF SPONTANEOUS MUTATION

S u m m a r y

The frequency of induced chromosomal rearrangements in seeds of *Vicia faba* treated with indolyl-acetic acid (heteroauxin) was more higher than that in the control.

The treatment with IAA modified the ratio of the types of aberrations and in all cases (seeds of difference age: first group of 1,5 and 2,5 years age and second group of 2 and 4 years age) activated the processes of the fragments junction.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Навашин М. С. Новые данные по вопросу о самопроизвольных мутациях. Биол. журнал, 2, 111, 1933.
2. D'Amate F., Hoffman-Ostenhof O. Metabolism and spontaneous mutations in plants. Adv. in Genetics, 8, 1, 1956.
3. Араратян Л. А. О специфичности мутагенного действия гетероауксина на хромосомы. Цитология и генетика, 4, 30-35, 1970.

4. Араратян Л. А. Об активации гетероауксином генетического действия аутомутагенов. Генетика, 9, № 11, 175, 1973.
5. Араратян Л. А. Цитогенетические эффекты гетероауксина при спонтанном и индуцированном мутагенезе растений. Сб.: Экспериментальный мутагенез растений, вып. III, 5-75, Ереван, 1974.
6. Протопопова Е. М., Шевченко В. В., Григорьева Г. А. Влияние возраста семян на характер цитогенетического действия мутагенов с задержанным эффектом. Генетика, 6, № 1, 27, 1970.
7. Дубинин Н. П., Щербаков В. К. Природа естественного мутационного процесса у *Vicia faba* L. и *Allium fistulosum* L.¹ ДАН СССР, 159, № 3, 852, 1964.
8. Попа Н. Е. Цитогенетическое исследование мутагенного действия азотистого иприта /HN₂/ при разных уровнях естественного мутирования. Сб.: Обмен веществ и продуктивность растений. Кишинев, 94, 1974.
9. Щербаков В. К. Естественный мутационный процесс, Сб.: Итоги науки. Общая генетика, М., 1969.
10. Араратян Л. А., Азатян Р. А. Радиозащитный эффект β -индолилуксусной кислоты и ее стимулирующее действие на синтез ДНК в клетках семян *Crepis capillaris*. Цитология и генетика, 8, № 4, 299, 1974.
11. Привалов Г. Ф. Влияние комбинированной обработки семян мутагенами и регуляторами роста на выживаемость и рост сеянцев *Acer negundo* L. Генетика, 8, № 2, 36, 1972.
12. Grahek B.S., Ward O.G., Matsuda K. The metabolic responses of chromatin-associated proteins to plant hormones. Genetics, v.74(suppl.), N 2, p.2, 99, 1973.
13. Van Overbeek F. Plant Hormones and Regulators. Science, 152, N 3723, 721, 1966.