

Г. Г. БАТИКЯН, В. С. ПОГОСЯН

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ЭТИЛЕНИМИНА И ГЕТЕРОАУКСИНА НА МИТОТИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС КЛЕТОК КОРЕШКОВ ТОМАТА

Способность химических соединений индуцировать наследственные изменения у растений имеет первостепенное значение.

На растительных объектах из многих химических мутагенных факторов наиболее эффективными оказались некоторые алкилирующие соединения. Среди них этиленимин и этилметансульфонат получили наиболее широкое применение. Эти соединения менее токсичны и генетически более эффективны.

Вскоре после открытия мутагенного действия этиленимина на дрозофиле [18], П. К. Шкварников [27] и А. Ловеллес [35] обнаружили сильный аберрационный эффект этиленимина на растительных объектах. И. Бейзил и др. [31] заметили, что этиленимин и его производные подавляют деление растительных и животных клеток. Однако в более низких концентрациях этиленимин подобно радиации оказывает стимулирующее действие на рост растений в первом поколении и на метаболические процессы у микроорганизмов [1, 3, 14, 21, 30].

В настоящее время известно также, что на возникновение хромосомных перестроек сильное влияние оказывает и ряд других факторов: парциальное давление и повышенное содержание кислорода [16, 25, 28, 39], температура прорастания [24], обработка алкалоидами [34, 38], антибиотиками [5, 6, 26], содержание в клетке ауксинов [22, 33]. Таким образом, биохимические и физиологические особенности клеток растений оказывают большое влияние на возникновение хромосомных перестроек.

Нами преследовалась цель сравнить действие имеющего широкое применение мутагена — этиленимина и представителя группы ауксинов, стимулятора роста — гетероауксина, повышающего радиоустойчивость растений, на процесс митотического деления и хромосомные перестройки в меристематических клетках корешков томата при обработке и после хранения семян.

Методика исследования. Воздушно-сухие семена томата сорта Маяк обрабатывались водными растворами этиленимина и гетероауксина в течение 24 час. в соответствующих концентрациях: этиленимин — 0,001 %, 0,01 и 0,05, гетероауксин — 0,01 % и 0,02. Затем семена отмывались проточной водопроводной водой в течение 2—3 час. Часть обработанных семян проращивалась в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге при температуре 25°C, другая — высушивалась до воздушно-сухого состояния и хранилась при комнатной температуре сроком на год.

После истечения срока хранившиеся семена проращивались тем же способом. В обоих случаях корешки проростков длиной около 0,5—0,8 см фиксировались в растворе Навашина. Изменение митотической активности и возникновение хромосомных перестроек изучались на постоянных препаратах, окрашенных железным гематоксилином по Гейденгайну.

Результаты исследований. Кривые, характеризующие суточный митотический индекс клеток корешков томата, как у контроля, так и у подопытных вариантов оказались трехвершинными. В I серии опытов (корешки, полученные непосредственно после обработки семян) на протяжении 12 час. у контроля митотический индекс достигал максимума в 9, 12 и 19 час. В подопытных же вариантах максимальная точка митотического индекса в зависимости от концентрации смещалась в ту или иную сторону. При воздействии 0,01% раствором гетероауксина митотический индекс достигал максимума в 8, 10 и 19 час., а при воздействии той же концентрацией этиленимина пик митотического индекса отмечался начиная с 10 час. утра ($8,84 \pm 0,58$). Однако кривые, характеризующие изменения митотического индекса, в вариантах с гетероауксином менее выделены, чем при воздействии этиленимином (рис. 1).

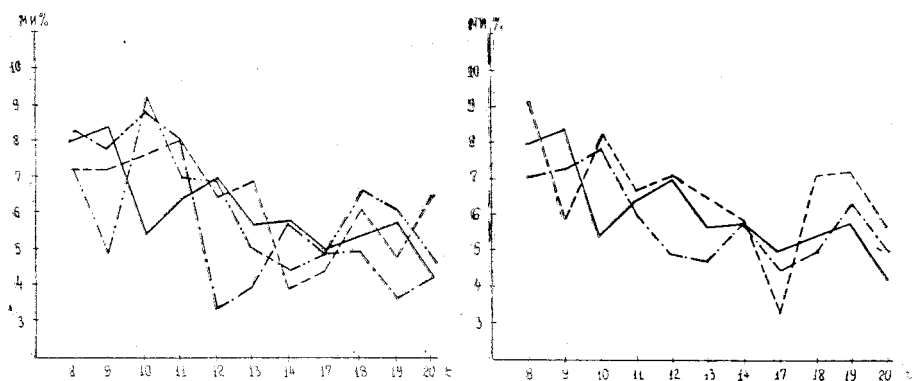


Рис. 1. Воздействие этиленимина и гетероауксина на изменения митотического индекса клеток корешков томата на протяжении 12 часов.

Этиленимин		Гетероауксин	
—	контроль	—	контроль
- - -	0,001%	- - -	0,01%
— · —	0,01%	— · —	0,02%
— · · —	0,05%		

Отмечено, что в вариантах с этиленимином митотический индекс меристематических клеток корешков томата достигает максимума начиная с 10 час. утра, между тем как у контроля, так и при малых концентрациях гетероауксина первый пик митотического индекса наблюдается в более ранние часы.

Митотический индекс в основном достигает максимальной точки за счет большого количества мета- и телофаз и только первый пик как у контроля, так и при воздействии 0,01% раствором гетероауксина и 0,05% концентрацией этиленимина выявляется главным образом за счет про- и телофаз.

Изменения митотического индекса протекают в течение трех суток. За исключением 0,02% раствора гетероауксина максимальная активность митотического индекса наблюдалась в первые сутки. Митотическая активность в подопытных вариантах держалась на уровне контроля и лишь 0,01% концентрация этиленимина и 0,02% гетероауксина давали незначительное снижение митотической активности клеток корешков томата (рис. 2).

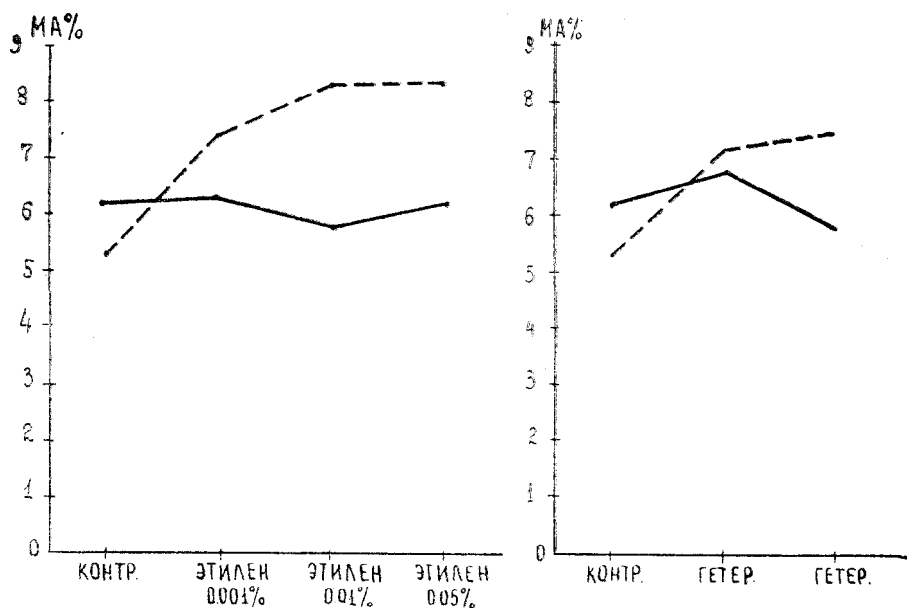


Рис. 2. Количество делящихся клеток в корешках томата при обработке семян этиленимином и гетероауксином (0,01 и 0,02%) и после хранения их в течение года.
— при обработке, --- после хранения.

Во II серии опытов изучена митотическая активность меристематических клеток у 600 корешков томата, семена которых после обработки хранились в течение года. Оказалось, что хранение обработанных семян положительно влияет на митотическую активность клеток корешков, однако наблюдается также резкое падение количества митозов в меристематических клетках контрольных корешков.

После хранения семян в подопытных вариантах процент делящихся клеток наиболее высок по сравнению даже с контрольным вариантом I серии опытов. Количество клеточных делений достигало максимума при 0,01 и 0,05% концентрациях этиленимина (рис. 2). В вариантах с этиленимином отмечалось повышение также и митотического индекса, где пики более выразительные, чем в I серии. В I серии при концентрации 0,01% этиленимина максимальная точка митотического индекса в среднем выражалась следующим образом: в 10 час.— $8,8 \pm 0,5$, 14 час.— $5,7 \pm 0,4$ и в 18 час.— $4,9 \pm 0,7$. Однако во II серии при той же концентрации соответственно в 10 час.— $8,0 \pm 0,6$, в 14 час.— $8,9 \pm 0,1$ и в 18 час.— $8,5 \pm 0,4$. В вариантах с гетероауксином подобное явление наблюдалось только при пике вечернего часа (рис. 3).

Изменения митотического индекса, протекающие в течение трех суток, за исключением 0,01% раствора этиленимина во II серии опытов, дают максимальную активность на третьи сутки.

Различное воздействие испытуемых химических веществ на процесс митотического деления клеток корешков томата выявляется при анализе анафазных нарушений. Отмечено, что при воздействии этиленимина в анафазе наблюдается фрагментация, отставание хромосом и небольшое количество мостов, процент которых даже при наименьшей концентрации возвышал контроль.

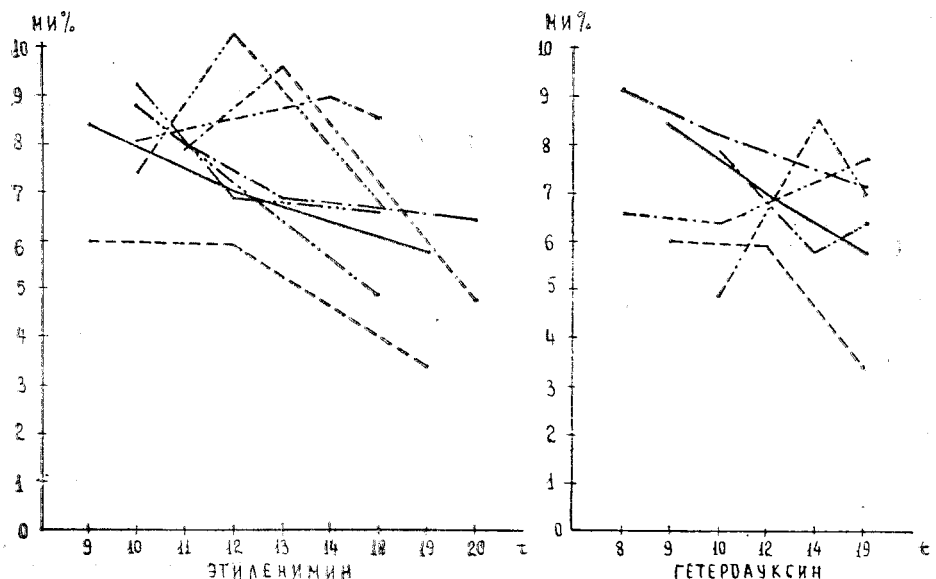


Рис. 3. Процентное соотношение пика митотического индекса клеток корешков томата при обработке семян этиленимином и гетероауксином и после хранения их в течение года.

————— контроль —————
 0,001%
 - - - - - 0,01% - - - - -
 0,05%
 при обработке после хранения

————— контроль —————
 0,01%
 - - - - - 0,02% - - - - -
 0,02%
 при обработке после хранения

При малой (0,01%) концентрации гетероауксина процент хромосомных перестроек сохранялся на уровне контроля, а повышение концентрации — вдвое (0,02%) в значительной степени снижало процент клеток с перестройками ($5,0\% \pm 1,00$ при $10,3\% \pm 0,33$ в контроле).

Наибольшей цитологической эффективностью в опыте обладала 0,05% концентрация этиленимина (табл. 1). Годовой срок хранения обработанных семян резко изменил цитологическую картину клеток корешков томата. Как при высокой, так и при малых концентрациях этиленимина происходит частичное снятие действия мутагена. Однако взятые концентрации гетероауксина оказали обратное воздействие (табл. 1).

Обсуждение полученных данных. Испытуемые концентрации как мутагена, так и стимулятора роста в основном не изменяют митотическую

Таблица 1

Число анафазных клеток с хромосомными перестройками при обработке семян этиленимином и гетероауксином и после хранения их в течение года

Вещество	Концентрация в %	Количество исследуемых анафаз	% хромосомных перестроек	
			при обработке семян	после хранения семян в течение года
Контроль	—	300	$10,3 \pm 0,33$	$10,2 \pm 1,53$
Этиленимин	0,001	300	$15,6 \pm 1,33$	$8,3 \pm 1,00$
" 	0,01	500	$15,6 \pm 1,33$	$7,6 \pm 1,00$
" 	0,05	300	$19,0 \pm 1,00$	$10,6 \pm 0,94$
Гетероауксин	0,01	300	$9,3 \pm 1,00$	$10,0 \pm 1,33$
" 	0,02	300	$5,0 \pm 1,00$	$7,8 \pm 0,33$

активность клеток корешков томата, а лишь действуют на темп деления клеток и тем самым смещают максимальную точку митотического индекса в ту или иную сторону, не влияя на количество образовавшихся пиков в течение 12 час.

В нашем исследовании на томатах не наблюдалось столь отчетливых различий в действии 0,05 % концентрации этиленимина на митотическую активность клеток, как это отмечалось у *Vicia faba* [2]. Однако указанное различие не уменьшает значения основного факта, а, видимо, обусловлено видовыми различиями и сроками прорастания семян.

В опытах по вызыванию мутации у высших растений действие алкилирующих веществ, несмотря на высокую мутагенную эффективность этих агентов, вызывает появление небольшого числа хромосомных перестроек, которые особенно малы при слабых концентрациях [29] и в наших исследованиях выявляются в довольно широких пределах концентраций (0,001—0,01 %).

Однако с повышением концентрации раствора этиленимина (0,05 %) частота хромосомных перестроек повышается. Особенностью действия этиленимина на хромосомные перестройки является относительно большее возникновение хромосомных фрагментов по сравнению с другими типами хромосомных перестроек, которое отмечалось другими авторами [3, 4, 12] и наблюдалось нами. Это выявляется, в частности, в резко отличаемых соотношениях хромосомных мостов и хромосомных фрагментов.

Несущественное влияние действия столь распространенного стимулятора как гетероауксин на митотическую активность клеток томата обусловлено специфичностью меристематических тканей, которые обладают высокой митотической активностью. М. Суонн [37] находит, что в любой ткани с высокой митотической активностью всегда имеется большой процент клеток, уже завершивших подготовку к митозу. Такие клетки нуждаются лишь в притоке энергии для деления. Для этого не нужен длительный латентный период, в случае чего соответствующая реакция велика. Такая же картина и при действии гормона [11].

Снижение количества хромосомных перестроек, непосредственно после обработки гетероауксином, как веществом, повышающим радиостойчивость, происходит подобно предположению, уже высказанному В. В. Хвостовой и Л. В. Невзгодиной [23] насчет радиочувствительности гороха, — то есть гетероауксин при непосредственной обработке семян, видимо, приостанавливает переход потенциальных повреждений хромосом в истинные.

Большой интерес имело открытие М. С. Навашина [17, 36], подтвержденное рядом авторов, о связи естественной мутабельности с процессами старения. Н. П. Дубинин и др. [7, 10] находят, что естественное мутирование вызывается в основном мутагенными продуктами обмена веществ.

Куртис и др. [32] впервые показали, что повреждение сухих семян ячменя увеличивается с ростом продолжительности хранения их после облучения. Усиливание частоты хромосомных перестроек хранившихся семян, обработанных редкоионизирующей радиацией, объясняется косвенным воздействием радиации на генетический материал [19]. Имеются также данные, которые показывают, что при обработке семян пшеницы N-нитрозоэтилмочевинной частота перестроек хромосом в корешках из семян, высушенных после обработки и пророщенных через 1,5—2 месяца после воздействия, в 2—4 раза выше, чем при прорастивании сразу после воздействия [13]. Однако известно, что при продолжительном хранении облученных семян увеличение последствия может ослабевать или предотвращаться: в присутствии воды, при отсутствии кислорода, в присутствии акцепторов радикалов (например, окиси азота) и H-доноров, хранением при низкой температуре [15].

Что касается последствий химических мутагенов, то следует отметить, что при этиленимине, который как и другие алкилирующие агенты является мутагеном с задержанным действием, увеличение количества перестроек было обнаружено только через 8 час. после обработки. Начиная с 32 час. и вплоть до 70 час. наблюдается постепенное падение процента клеток с перестройками [20]. Предполагается, что в данном случае имеет место длительное сохранение в клетках или самого этиленимина, что более вероятно, или мутагенных продуктов, образуемых им при взаимодействии с клеточными компонентами [20]. Имеются данные, свидетельствующие также об эффекте защиты при совместном действии естественного мутагена с другими. В качестве естественного мутагена служила вытяжка из семян конских бобов [9]. В наших исследованиях частичное снятие действия мутагена при хранении обработанных этиленимином семян, очевидно, происходит при последовательном влиянии сначала этиленимина (сохранившегося после высушки и хранения семян, о чем свидетельствует частота хромосомных перестроек при 0,05% концентрации), а затем естественного мутагена, который образуется в процессе хранения и действует на эти предварительно измененные этиленимином хромосомы. Частичное снятие действия этиленимина в основном осуществляется путем воссоединения при обработке образовавшихся хромо-

сомных фрагментов. Таким образом, при совместном действии двух химических мутагенов имеет место эффект защиты, в то время как при воздействии стимулятора роста—гетероауксина и мутагена—происходит частичное погашение действия гетероауксина и повышение хромосомных перестроек. При хранении семян, гетероауксин в малых концентрациях из противомутагенного вещества, а при больших концентрациях из антимутагена превращается в вещество, повышающее мутагенный эффект. Подобное явление наблюдалось и при накоплении такого жизненно необходимого соединения, как аргинин, противолучевого вещества аминокислоты цистеина и т. д. [8].

В ы в о д ы

1. Специфичность действия исследуемых химических веществ заключается в том, что одно из них — этиленимин, изменяя максимальные точки митотического индекса, существенно не влияя на митотическую активность клеток, индуцирует перестройки хромосом, другое же—гетероауксин, имея подобное влияние на митотический индекс и активность клеток корешков томата, не вызывает структурных нарушений хромосом.
2. Используя раствор с концентрацией 0,02%, гетероауксин из радиоустойчивого фактора становится эффективным антимутагеном, снижая частоту появления естественных мутаций по сравнению с контролем.
3. Годовой срок хранения обработанных семян частично снимает эффект действия этиленимина путем воссоединения при обработке образовавшихся хромосомных фрагментов.
4. При хранении семян, обработанных гетероауксином, происходит погашение действия стимулятора роста и повышение хромосомных перестроек.

Научно-исследовательская лаборатория цитологии
Ереванского государственного университета

Поступило 20.III 1967 г.

Հ. Դ. ԲԱՏԻՅԱՆ, Վ. Ս. ՊՈՂՈՍՅԱՆ

ՊՈՄԻԴՈՐԻ ԱՐՄԱՏԱԾԱՅՐԵՐԻ ՄԵՐԻՍԹԵՄԱՏԻԿ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ՄԻՏՈՏԻԿ
ՊՐՈՑԵՍԻ ՎՐԱ ԷԹԻԼԵՆԻՄԻՆԻ ԵՎ ՀԵՏԵՐՈԱՌԻՔՍԻՆԻ ԱԶԴԵՅՈՒԹՅԱՆ
ՀԱՄԵՄԱՏԱԿԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ներկայումս տարածված քիմիական մուտագեններից բուսական օբյեկտների վրա հատկապես կիրառելի են էթիլենիմինը և էթիլմեթանսուլֆոնատը, որոնք առավել քիչ տոքսիկ և գենետիկորեն ավելի արդյունավետ միացություններ են:

Մեր նպատակն է եղել ուսումնասիրել լայնորեն տարածված քիմիական մուտագեններից էթիլենիմինի և ածման խթանիչ, բույսերի ռադիոդիմացկունությունը բարձրացնող, աուքսինների խմբին պատկանող հետերոաուքսինի

ազդեցությունը պոմիդորի արմատածայրի բջիջների միտոտիկ բաժանման և բրոմոսոմային խախտումների առաջացման վրա:

Այդ նպատակով պոմիդորի Մաշակ սորտի օգաչոր սերմերը մշակվել են (24 ժամ) էթիլենիմինի (0,001, 0,01, 0,05%) և հետերոաուքսինի (0,01, 0,02%) տարբեր տոկոսանոց ջրային լուծույթներում: Սերմերի մի մասը անմիջապես ծեցվել է Պետրիի թասերում 25°C-ում, մյուս մասը շորացվել ու պահպանվել է սենյակային պայմաններում, մեկ տարի ժամկետով: Փորձարկման այդ երկու պայմաններում ստացված 0,5—0,8 սմ երկարություն ունեցող արմատածայրերից պատրաստված մշտական պրեպարատների վրա ուսումնասիրվել է բջիջների միտոտիկ ակտիվությունը և բրոմոսոմային խախտումների հաճախականությունը:

Պարզվում է, որ փորձարկվող բոլոր տարբերակներում միտոտիկ ինդեքսը պատկերող կորագծերը եռագագաթ են: Ստուպիչի համեմատությամբ, փորձարկվող մյուս տարբերակներում նկատվում են միտոտիկ ինդեքսի մաքսիմալ կետի տատանումներ՝ կախված տարբեր կոնցենտրացիաներից: Մշակումից անմիջապես հետո ծեցրած սերմերից ստացված արմատածայրերի բջիջներում միտոտիկ ակտիվության տատանումները աննշան են, մինչդեռ սերմերի պահպանումից հետո նկատվում է ակտիվության բարձրացում:

Փորձարկվող նյութերի ազդեցության հիմնական տարբերությունները դրսևորվում են բրոմոսոմային խախտումների ուսումնասիրման ժամանակ: Էթիլենիմինը, որպես ակտիվ մոտազեն, առաջ է բերում բրոմոսոմային խախտումների տոկոսի բարձրացում, հատկապես, 0,05% կոնցենտրացիայի դեպքում, մինչդեռ հետերոաուքսինը, ընդհակառակը, իջեցնում է բնական խախտումների տոկոսը: 0,02% կոնցենտրացիայի դեպքում հետերոաուքսինը, լինելով ռադիոդիմացկունությունը բարձրացնող նյութ, դառնում է արդյունավետ անտիմոտազեն, իջեցնելով բնական մոտազիաների տոկոսը:

Մշակված սերմերի մեկ տարվա պահպանումը մասամբ թուլացնում է էթիլենիմինի մոտազեն ազդեցությունը, որը, հավանաբար, տեղի է ունենում գլխավորապես մշակման ժամանակ առաջացած բրոմոսոմային ֆրագմենտների վերամիացման հետևանքով: Սերմերի պահպանումը վերացնում է հետերոաուքսինի բրոմոսոմային խախտումների արգելակման հատկությունը, նպաստելով բնական խախտումների տոկոսի բարձրացմանը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Аннкиева И. Д., Шевченко В. А., Ваулина Э. Н. Тезисы докл. симпозиума «Экспериментальный мутагенез животных, растений и микроорганизмов». М., 141—142, 1965.
2. Бартошевич Ю. Э. Сб. Супермутагены. Изд. Наука. М., 211—268, 1966.
3. Валева С. А. Радиобиология. 4, вып. 3, 451—456, 1964.
4. Герин В. Е. Изв. Сиб. отд. АН СССР (серия биолого-мед. наук), вып. 3, 12, 117—121, 1964.
5. Дубинин Н. П., Черезжанова Л. В. ДАН СССР, 140, 3, 703—704, 1961.
6. Дубинин Н. П., Гроздова Т. Я. ДАН СССР, 143, 6, 1397—1399, 1963.
7. Дубинин Н. П., Щербаков В. К. ДАН СССР, 159, 3, 652—655, 1964.
8. Дубинин Н. П., Щербаков В. К., Сурков В. В. ДАН СССР, 159, 4, 913—914, 1964.
9. Дубинин Н. П., Щербаков В. К. ДАН СССР, 160, 1, 218—219, 1965.

10. Дубинин Н. П., Щербаков В. К., Шавельзон Р. А. Тезисы докл. симпозиума «Экспериментальный мутагенез у животных, растений и микроорганизмов», т. 2, М., 13—15, 1965.
11. Епифанова О. И. Цитология, 4, 2, 128—136, 1962.
12. Зоз Н. Н. ДАН СССР, 136, 3, 712—714, 1961.
13. Зоз Н. Н., Григорова Н. В., Кожанова Н. Н. Тезисы докл. симпозиума «Экспериментальный мутагенез у животных, растений и микроорганизмов», т. 2, М., 49—50, 1965.
14. Ибрагимов Ш. И., Ковальчук Р. И. Экспериментальный мутагенез у сельскохозяйственных растений и его использование в селекции, М., 179—185, 1966.
15. Конгер А. Д. Сб.: Восстановление клеток от повреждений, М., Атомиздат, 46—55, 1963.
16. Кулик М. И. ДАН СССР, 162, 4, 928—931, 1965.
17. Навашин М. С., Герасимова Е. Н. Биол. журн., 4, 593, 1935.
18. Рапопорт И. А. ДАН СССР, 60, 3, 469, 1948.
19. Сидоров Б. Н., Хвостова В. В. Итоги науки, Биол. науки, 3, М., 176, 1960.
20. Сидоров Б. Н., Соколов Н. Н., Андреев В. С. Тезисы докл. симпозиума «Экспериментальный мутагенез животных растений и микроорганизмов», т. 2, М., 17—18, 1965.
21. Тарасенко Н. Д. Радиобиология, 3, вып. 3, 424—430, 1963.
22. Хвостова В. В., Невзгодина Л. В. Цитология, 4, 403—407, 1959.
23. Хвостова В. В., Невзгодина Л. В. В сб.: Радиационная генетика, изд. АН СССР, 358—366, 1962.
24. Хвостова В. В., Эльшуни К. А. Радиобиология, 5, вып. 1, 136—139, 1965.
25. Шапиро Н. И., Бочарова Е. М., Белицина Н. В. ДАН СССР, 126, 1, 191—194, 1959.
26. Шапиро Н. И. и Белицина Н. В. ДАН СССР, 130, 4, 904—907, 1960.
27. Шкварников П. К. ДАН СССР, 59, 7, 1337—1340, 1948.
28. Шкварников П. К. Цитология, 5, 535, 1963.
29. Шкварников П. К., Кулик М. И., Сафонова В. Т. ДАН СССР, 164, 5, 1161—1164, 1965.
30. Эйгес Н. С. Экспериментальный мутагенез у сельскохозяйственных растений и его использование в селекции, М., 66—78, 1966.
31. Biesele I. I., Phillips F. S., Thiersch J. B., Burchenal I. H., Buckley S. M., Stok C. C. Nature, 166, 1112—1113, 1950.
32. Curtis H. I. et al Radiation Res., 8, 526, 1958.
33. Ehrenberg L. Svensk. Kem. Tidskr., 67, 5, 207—224, 1955.
34. Engel L. Einfluss verschiedener Alkaloide auf die Wurzelspitzenmitose von Vicia faba. Diss. Freilurg. 1954.
35. Loveless A. Nature, 167, 338, 1951.
36. Nabashin M. Nature, 136, 436, 1933.
37. Swann M. M. Cancer res., 18, 10, 1118—1160, 1958.
38. Tiele-Winckler E. B. Zschr. indikt. Abst. u. Vererb., 87, 3, 338—355, 1956.
39. Wolff S., Luippold H. E. Genetics, 43, 4, 493, 1958.