

Г. Г. БАТИКЯН, Е. Г. СИМОНЯН

## ВЛИЯНИЕ КИНЕТИНА НА КЛЕТОЧНОЕ ДЕЛЕНИЕ ЛУКА (ALLIUM SEPA)

Многочисленные данные литературы говорят о существовании факторов, побуждающих клетку к делению. Так, Мезия считает, что потенциально каждая клетка способна делиться, но существуют условия, препятствующие осуществлению этого естественного для клетки акта [1].

Другая группа ученых [3, 7, 8] делит факторы, определяющие наступление клеточного деления, на две группы: определяющие возможность осуществления деления и реализующие вступление в митоз клетки. К указанным факторам, в свою очередь, относят многочисленные другие условия, осуществляющие наступление деления и реализующие его.

В литературе по указанному вопросу существует мнение о том, что клеточное деление вызывается определенным стимулирующим веществом. (В подавляющем большинстве случаев стимуляция митотической активности выражается в сокращении длительности интерфазы).

В 1955 г. из растворов ДНК растительного и животного происхождения было выделено такое вещество и названо кинетином; это вещество (6 фурфуриламинопурин) повышает частоту митозов. Изучение этого фактора представляет определенный интерес с точки зрения выявления механизма его действия.

В литературе имеется сравнительно мало работ, посвященных изучению этого вопроса, сравнительно лучше изучено воздействие кинетина на различные другие ткани растений. Имеющиеся работы нередко носят противоречивый характер. Так, в опытах Ткаленко [2] кинетин в концентрации 1,5 и 10 мг/л стимулировал рост отрезков колеоптилей кукурузы и пшеницы. Эффект применения его усиливался при совместном воздействии с  $MnSO_4$  и ИУК и ослаблялся при добавлении мочевины.

В концентрации 2 и 10 мг/л [4] кинетин предотвращал распад хлорофилла в изолированных листьях ячменя даже после облучения их рентгеновскими лучами в дозах 10, 30 и 50 кр.

Интересными являются данные Pulet Prul-Emile [6], который установил, что кинетин ( $10^{-6} \cdot 10^{-4}$   $\mu$ ) задерживает рост первичных корней чечевицы тем сильнее, чем выше концентрация и продолжительность времени обработки. При слабых концентрациях и коротких экспозициях он слегка стимулирует рост отрезанных кончиков корней.

С нашей точки зрения, большой интерес представляет работа Grillo R. S., Polsky R. [5] относительно кариотипического изменения у *Triturus*

после воздействия кинетином. Этими авторами установлено, что у животных, подвергшихся действию кинетина, в кишечнике число делящихся клеток было в 8—15 раз больше, чем в контроле. В печени число митозов превышало его в контроле в 8 раз. В то же время ни в кишечнике, ни в печени число меченых клеток не увеличивалось под влиянием кинетина. Авторы приходят к выводу, что кинетин не вызывает появления новых митозов, т. к. число клеток, синтезирующих ДНК, не возрастает. Увеличивается лишь продолжительность митоза, что создает ошибочное представление о повышении митотической активности.

Целью настоящей работы является изучение воздействия минимальных и оптимальных доз кинетина на митотическую активность.

Мы старались, по мере возможности, взять больше вариантов с тем, чтобы установить закономерность воздействия различных доз на митотическую активность корешков лука (*All. cepa*), выращенных в чашках Петри при температуре 22—25°C. В отдельных случаях семена проращивались в соответствующих растворах кинетина разной концентрации. Нами определялась также продолжительность отдельных фаз митоза. С этой целью был использован 0,01% раствор колхицина. В качестве минимальных доз были взяты следующие концентрации кинетина: 1 мг/5000 мл, 1 мг/10000 мл, 1 мг/50000 мл, 1 мг/1000000 мл, а в качестве оптимальных доз 1 мг/100 мл, 1 мг/250 мл и 2,5 мг/100 мл. Обработку указанными растворами производили в зависимости от данной экспозиции (6, 8, 11 часов или 2, 4, 6, 8, 12 часов) или семена просто проращивались в указанных растворах. В некоторых вариантах опыта корешки, после обработки кинетином, помещались в чашки Петри, увлажненные водой, на 2 часа. Корешки обычно фиксировались длиной до 1 см. Фиксация производилась раствором Карнуа (3:1). Часть их фиксировалась в 9 час. утра для определения митотической активности в норме—нулевая экспозиция. Остальные проростки делили на 2 группы. Одну часть помещали на фильтровальную бумагу, смоченную водой (контроль), с той же продолжительностью времени обработки, что и в опыте (1, 2, 3, 4, 6 часов), другую—переносили в чашку Петри с соответствующими растворами и экспозициями. В опыте с определением продолжительности отдельных доз то же самое проделывалось с колхицином и с кинетином+колхицином. Для определения митотической активности из каждой экспозиции бралось для фиксации 10—12 корешков. Из фиксированного материала готовились давленные ацетокарминовые препараты. В каждой комбинации (за комбинацию в опыте бралась продолжительность экспозиции, за вариант—взятая доза кинетина) анализу подвергалось 10 корешков, по 1000 клеток в каждом. Итого по всем комбинациям было подсчитано свыше 700 тысяч клеток.

Полученные данные математически достоверны. Показателем митотической активности служил митотический индекс (МИ), под которым следует понимать число клеток, находящихся в фазе деления. Чтобы определить истинную митотическую активность ткани, необходимо учитывать не только количество видимых в данный момент митозов, но и скорость протекания процесса митотического деления, но здесь невозможно выявить, имеет ли место стимуляция делений (уменьшение интерфазы) или увеличивается продолжительность митоза. Продолжительность может быть вычислена из скорости, с которой МИ возрастает, когда клетки блокированы колхицином, который не препятствует вступлению клеток в митоз, но и не допускает выхода их из митоза, задерживая его на стадии метафазы. Продолжительность митоза определялась по

формуле Дюстена  $m = \frac{ixt}{It^s}$ , где  $m$ —продолжительность митоза,  $i$ —митотический индекс данной ткани,  $It^s$  —митотический индекс после времени действия колхицина.

Для определения продолжительности интерфазы мы использовали формулу  $Ti = \left( \frac{Tm \ln 2}{\ln \frac{1+2Im}{1+Im}} - Tm \right) x$  — процент неделящихся клеток,

где  $Ti$  — продолжительность интерфазы,  $Tm$  — продолжительность митоза,  $Im$  — митотический индекс данной ткани.

Для определения продолжительности профазы, метафазы, анафазы и телофазы мы делили продолжительность митоза на количество делящихся клеток, затем частное от деления умножали на число профаз, метафаз, ана- и телофаз. Процент ошибки был вычислен по формуле

$m = \frac{+\sigma}{\sqrt{\frac{\sigma}{n}}}$ , где  $\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$ ,  $n$  — число подсчитанных корешков.

Анализ полученных данных показывает, что из взятых нами минимальных доз наиболее эффективное воздействие на митотическую активность клеток корешков лука оказывает концентрация 1 мг/10000 мл при шестичасовой экспозиции (6,43±0,77%). При более длительном выдерживании клеток в растворе кинетина (8, 11 часов) митотическая активность падает соответственно до 5,18±0,70 и 5,6±0,72. При других концентрациях (1 мг/5000 мл; 1 мг/1000000 мл) она несколько ниже (5,43±±0,63, 5,18±0,70, 5,25±0,70 и др.). Для всех взятых концентраций характерна более высокая митотическая активность при малых экспозициях, при более высоких экспозициях активность клеточного деления, наоборот, понижается.

В указанные часы МА клеток в контроле составляло 4,71%, 4,55%. При анализе отдельных фаз митоза особых непривычных картин не наблюдалось (рис. 1). Под влиянием кинетина усиливается величина клеток путем растяжения, размеры их ядер и ядрышек. Иная картина наблюдается в случае, когда семена лука проращиваются в тех же растворах кинетина (рис. 1). Митотическая активность клеток при тех же концентрациях и экспозициях падала почти на 2%. Уменьшается прежде всего количество клеток, вступающих в профазу и соответственно — процент делящихся клеток в метафазе, анафазе и телофазе. Так, если в варианте с 1 мг/10000 мл через 6 час. после воздействия кинетином МА составляет 6,43±0,77, то при той же дозе она падает до 4,47±0,67%.

Данные двух рисунков свидетельствуют о том, что те же дозы кинетина в одном случае стимулируют деление, в другом — подавляют вступление новых клеток в митоз.

Во второй серии опыта, в которой испытывались оптимальные дозы (1 мг/100 мл, 1 мг/250 мл, 2,5 мг/100 мл) МА клеток намного понижалась не только по сравнению с предыдущей серией, но и с контролем (табл. 1), (рис. 2).

При концентрации 1 мг/100 мл и продолжительности экспозиции 2, 4, 6, 8 и 12 часов МИ клеток постепенно понижается от  $3,6 \pm 0,58$  до  $3,0 \pm 0,55$ . При перенесении корешков лука после их обработки кинетином в увлажненные водой чашки Петри, МИ клеток продолжает понижаться от  $3,1 \pm 0,55$  до  $2,6 \pm 0,51$ . Очень интересно, что в воде клетки корешков обработанных кинетином как бы блокируются и в профазе их оказывается значительно меньше, т. е. меньше клеток вступает в митоз.

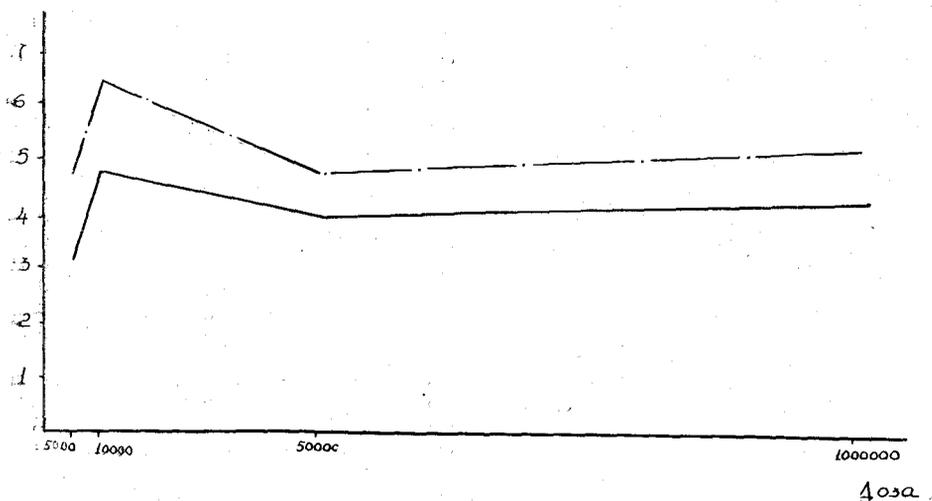


Рис. 1. — — — — корешки обрабатывались в кинетине, ————— семена проращивались в кинетине.

Та же картина наблюдается при следующей концентрации (1 мг/250 мл), с той разницей, что в этом варианте концентрация, очевидно, является более благоприятной, поэтому МИ, по сравнению с предыдущим вариантом, выше (от  $4,6 \pm 0,65$  до  $3,7 \pm 0,59$ ). Как правило, МИ клеток корешков после их перенесения в воду понижается. МИ понижается, соответственно, и при увеличении экспозиции воздействия. Например, при концентрации 2,5 мг/100 мл и при 2-часовой экспозиции он составляет  $6,2 \pm 0,78$ , а при 12-часовой экспозиции —  $2,0 \pm 0,44$  (табл. 2). Очень интересным моментом в опыте является увеличение МИ при концентрации 2,5 мг/100 мл. Во всех экспозициях данной серии опытов количество метафаз больше числа профаз. Эта картина свидетельствует о том, что доза 2,5 мг/100 мл является блокирующей, о чем свидетельствует увеличение числа метафаз.

Так, если при концентрации 2,5 мг/100 мл после двухчасовой экспозиции количество метафаз составляет 18,2%, при четырехчасовой экспозиции — 19,2%, шестичасовой — 18,2% и т. д., то при концентрации 1 мг/100 мл и тех же экспозициях количество метафаз соответственно составляло 13,0; 9,0; 12,3% и т. д. Эти данные показывают, что повышение МА клеток в варианте 2,5 мг/100 мл имеет место за счет блокирования митоза на стадии метафазы. Такая картина несколько напоминает картины, описываемые при к-митозах.

Таблица 1

Частота встречаемости фаз митоза в клетках корешков лука при воздействии различными дозами и при различных экспозициях кинетина

Вариант = принцип опыта	Продолжительность времени обработки, час.	Продолжительность времени обработки во- дой после воз- действия кинетина	Количество клеток, %	Среднее на 1000 клеток					МИ, %	
				И	П	М	А	Т		
1 мг/100 мл	2	—	10000	953,5	11,3	13,0	4,5	7,9	3,6±0,58	
	4	—	10000	975,5	3,8	9,0	4,9	7,2	3,4±0,48	
	6	—	10000	970,5	3,1	12,3	3,5	9,6	3,9±0,53	
	8	—	10000	963,5	6,3	13,5	4,5	10,7	3,0±0,53	
	12	—	10000	969,1	4,6	9,9	5,9	10,6	3,0±0,55	
	2	2 часа	10000	968,7	6,5	9,8	1,6	13,5	3,1±0,55	
	4	2 часа	10000	965,6	8,4	14,0	1,5	8,6	3,5±0,58	
	6	2 часа	10000	967,4	6,9	12,4	4,5	10,4	3,0±0,30	
	8	2 часа	10000	967,4	2,8	16,1	3,3	7,1	2,9±0,53	
	12	2 часа	10000	974,0	2,4	16,5	2,5	5,6	2,6±0,51	
	1 мг/250 мл	2	2 часа	10000	956,6	14,5	15,8	4,2	9,4	4,6±0,65
		4	2 часа	10000	954,0	7,3	25,4	7,2	6,7	4,6±0,66
6		2 часа	10000	952,3	16,2	19,0	6,9	5,9	4,7±0,67	
8		2 часа	10000	959,3	4,2	11,1	6,4	13,1	3,4±0,57	
12		2 часа	10000	963,1	18,7	11,0	6,8	11,5	3,7±0,59	
2		2 часа	10000	968,7	6,5	9,8	1,6	13,5	3,1±0,55	
4		2 часа	10000	973,0	5,0	11,6	3,0	8,0	2,7±0,51	
6		2 часа	10000	975,0	3,6	12,0	2,2	7,2	2,5±0,49	
8		2 часа	10000	973,2	3,4	15,9	2,3	2,6	2,3±0,47	
12		2 часа	10000	979,0	4	11,0	1,8	4,2	2,1±0,45	
2,5 мл/100 мл		2	—	10000	938,2	16,4	18,2	10,8	15,6	6,2±0,78
		4	—	10000	944,1	15,8	19,2	4,3	6,7	5,6±0,70
	6	—	10000	956,0	15,5	18,2	3,4	6,9	4,4±0,68	
	8	—	10000	962,6	6,3	10,0	9,2	10,9	3,7±0,60	
	12	—	10000	973,3	2,9	9,4	2,8	6,7	2,0±0,44	
	2	2 часа	10000	918,8	7,3	11,2	3,4	6,7	2,7±0,49	
	4	2 часа	10000	976,8	5,1	8,4	3,6	6,6	2,3±0,47	
	6	2 часа	10000	964,8	7,7	12,6	5,1	9,4	2,5±0,50	
	7	2 часа	10000	981,9	3,6	7,0	2,9	4,8	1,8±0,39	
	12	2 часа	10000	984,0	2,5	7,1	3,4	3,0	1,6±0,39	

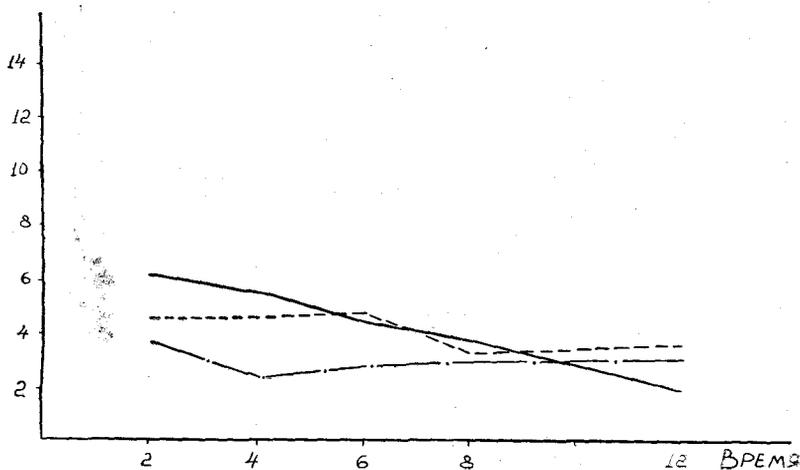


Рис. 2. ————— 2,5 мг/100 мл, - - - - - 1 мг/250 мл, ..... 1 мг/100 мл.

Обобщая данные двух серий опыта, считаем возможным заключить, что из взятых доз кинетина наиболее эффективное воздействие на МИ клеток оказывает доза 1 мг/10000 мл. С повышением дозы воздействия и продолжительности обработки понижается митотическая активность. Эта картина закономерно повторяется и по отдельным фазам.

На основании приведенных выше данных можно заключить, что в минимальных концентрациях и коротких экспозициях кинетин стимулирует клеточное деление, а при оптимальных концентрациях наблюдается блокирование его (1 мг/100 мл; 2,5 мг/100 мл; 1 мг/250 мл), выражающееся в том, что кинетин препятствует вступлению клеток в митоз (чем длиннее экспозиция, тем выше его блокирующее воздействие).

Таблица 2

Частота встречаемости фаз митоза в клетках корешков лука при действии колхицина и в воде

Вариант опыта	Продолжительность времени обработки, час.	Количество клеток	Среднее на 1000 клеток					МИ, %
			И	П	М	А	Т	
Контроль (вода)	0	10000	970,0	17	9,2	2	1,8	3,0±0,53
	1	10000	972,0	15,2	10	2,4	0,6	2,8±0,52
	2	10000	972,8	16,2	8	2,1	0,9	2,7±0,71
	3	10000	973,1	14	10,1	1,8	1	2,6±0,51
	4	10000	974,0	15	8,2	0,9	0,9	2,6±0,51
	6	10000	976,0	14,8	7,9	1,6	1,2	2,4±0,47
Вода+колхицин	1	10000	969,1	15,2	13,1	1,3	1,2	3,1±0,54
	2	10000	961,2	15,5	23,5	—	—	3,9±0,60
	3	10000	953,5	15,0	32,8	—	—	4,7±0,65
	4	10000	944,3	16,3	40,2	—	—	5,6±0,71
	6	10000	938,0	16,8	55,2	—	—	7,2±0,81
	Контроль (проращивание в кинетине)	10000	977,9	7	9	3	4	2,31±0,47
10000		977,7	5	11	2	5	2,33±0,47	
10000		977,5	9	9	2	2	2,35±0,46	
10000		977,0	8	12	1	2	2,30±0,46	
10000		978,2	7	10	3	2	2,28±0,45	
10000		978,8	5	11	3	4	2,22±0,45	
Кинетин+колхицин	1	10000	972,2	9	15	2	2	2,8±0,51
	2	10000	965,4	7	28	—	—	3,5±0,53
	3	10000	965,0	7	36	—	—	4,4±0,62
	4	10000	949,1	8	43	—	—	5,1±0,71
	6	10000	941,3	7	41	—	—	5,9±0,75

Чтобы установить причину стимуляции клеточного деления при воздействии кинетина, нами была заложена третья серия опытов, в которой с помощью колхицинового метода мы попытались определить продолжительность отдельных фаз митоза. С этой целью был поставлен опыт в 4-х вариантах (контроль, обработка корешков колхицином, проращивание семян в кинетине и последний вариант—обработка выращенных в кинетине корешков колхицином).

Из табл. 3 видно, что при применении колхицина через 2 часа после обработки уже имеет место полное блокирование клеточного деления. В том случае, когда семена проращивались в концентрации кинетина

1 мг/100 мл, МИ клеток очень низок и в разных повторностях почти одинаков ( $2,31 \pm 0,47$ ;  $2,28 \pm 0,45$  и т. д.).

При взаимном действии кинетина и колхицина блокирование клеточного деления наступает через то же время, что и при воздействии одним колхицином (рис. 3).

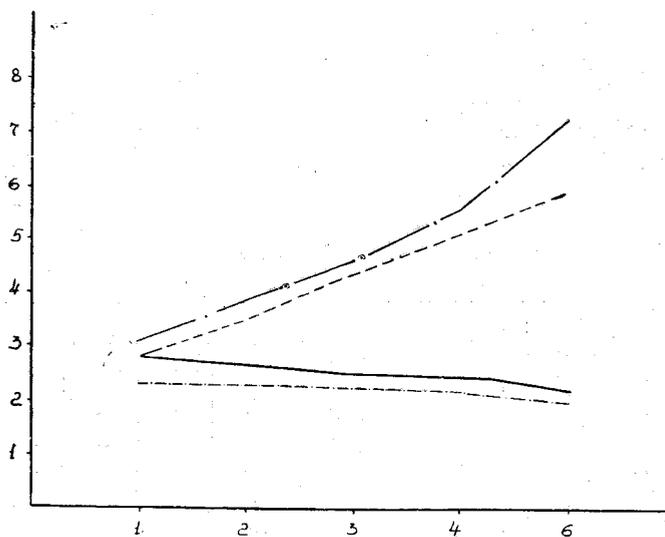


Рис. 3. —·—·—·— ( $H_2O + \text{колхицин}$ ), - - - - - (кинетин + колхицин), ————— (контроль), ······ (кинетин).

На основании данных табл. 2 мы определили продолжительность митотического цикла и отдельных его фаз под воздействием колхицина и кинетина + колхицин.

Полученные данные убеждают в том, что стимуляция клеточного деления происходит не за счет укорочения или уменьшения продолжительности интерфазы, а за счет увеличения отдельных фаз митоза.

Так, при действии колхицина продолжительность интерфазы равна  $2352 \pm 1,38$  мин, а при совместном воздействии кинетина и колхицина —  $2778 \pm 2,5$  мин. Соответственно увеличивается и весь митотический цикл, составляя в первом случае  $2467,1 \pm 3,8$ , а во втором —  $2872,5 \pm 4,1$ . Увеличивается также длительность мета-, ана- и телофаз. При обработке корешков колхицином метафаза длится  $35,67 \pm 0,6$  мин, а в варианте кинетин + колхицин те же фазы соответственно имеют продолжительность  $36,2 \pm 0,7$  мин,  $12,5 \pm 0,1$  мин и  $13,2 \pm 1,1$ . Общая же длительность митоза падает во втором варианте (табл. 3), что связано с понижением количества клеток, вступающих в деление.

Таким образом, данные последнего опыта позволяют сделать вывод о том, что стимуляция клеточного деления различными дозами кинетина имеет место не за счет уменьшения продолжительности интерфазы, а за счет увеличения продолжительности отдельных фаз митоза.

Ереванский государственный университет,  
кафедра генетики и цитологии

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Мезия Д. Митоз и физиология клеточного деления. М., 1963.
2. Ткаленко Л. В. С.-х. биология, 4, 1966.
3. Lurwitsch A. Das Problem der Zellteilung physiologisch betrachtet, Berlin, 1926.
4. Giacomelli M., Belli Donini M. Z. Giorn bot. ital. 72, 2—3, 1965.
5. Grillo R. S., Polsky R. Exptl. cell Res, 44, 2—3, 1966.
6. Pilet Payl Emile. Ber. Schwer bot Ges. 75, 1965.
7. Swann M. Cancer Res, 17, 1957.
8. Wasserman F. Handbuch den mikroskopischen Anatomie des Menschen 1, 2. Berlin, 1929.