

Г. Г. БАТИКЯН, Е. Г. СИМОНЯН, Д. С. БАЛАСАНЯН

ВЛИЯНИЕ МАКСИМАЛЬНЫХ ДОЗ КИНЕТИНА НА МИТОЗ КЛЕТОК ALLIUM SERA L.

Согласно литературным данным, имеются вещества, стимулирующие клеточное деление, так называемые кинины. С химической точки зрения они неоднородны. Среди них особой активностью выделяются некоторые производные аденина.

Первые работы по изучению влияния кинетина на клеточное деление показали, что это вещество вызывает значительное увеличение числа делящихся клеток. Имеющиеся по этому вопросу работы нередко носят противоречивый характер. Гуттман [5], изучая активность кинетина (10^{-6} × $3 \cdot 10^{-6}$) на корневую меристему *Allium sera* L., показала, что при концентрациях ниже 10^{-6} рост корней продолжается, но они гибнут; выше — рост останавливается, то есть имеет место торможение роста. Далее она указывает, что определение МИ (митотического индекса) выявило увеличение числа митозов. Автор предполагает, что кинетин сокращает период интерфазы и удлиняет продолжительность митоза. Дейсон [3] выступает против подобного заключения, считая невероятным, чтобы подавление роста корней сопровождалось одновременным увеличением МА (митотической активности) клеток. Согласно работе Рун и Гуттман [12], кинетин вызывает также увеличение частоты митоза синхронно делящихся клеток. Результаты работ ряда авторов [9, 14] показывают, что кинетин оказывает стимулирующее действие в концентрациях 10^{-5} — 10^{-8} , в больших разведениях он оказывается неэффективным, а в разведении 10^{-3} — 10^{-4} угнетает размножение. Заметное увеличение частоты митоза под влиянием кинетина (на уровне 1%) было обнаружено Огава [10] при исследовании его действия на активность митоза клеток саркомы Иотида, пересаженных на крысий штамм Вистера. Работа Вуд и Браун [16] наводит на мысль о том, что кинетин служит только средством, возбуждающим выработку нормальными клетками веществ, стимулирующих деление клеток.

В ряде работ обсуждаются вопросы комбинированного влияния кинетина и ИУК. Показано, что в сочетании с ИУК он подавляет синтез ДНК, и клетки входят в митоз с меньшей скоростью [15]. Авторы указывают на разную реакцию диплоидных и тетраплоидных ядер на действие этих веществ [7]. Другие авторы отмечают, что кинетин больше влияет на обмен РНК, чем на обмен ДНК, он усиливает синтетические процессы в ядрышке, увеличивает содержание РНК в ткани [1, 6, 8,

11]. По данным Ткаленко [2], размер ядрышка увеличивается уже через час после введения кинетина.

С нашей точки зрения, большой интерес представляют работы Крилло, Польского [4] и Систер Петра Кевина, Виткуса, Бержера [13]. Исходя из полученных данных, авторы первой работы приходят к выводу, что кинетин не вызывает появления новых митозов, так как число клеток, синтезирующих ДНК, не возрастает. Увеличивается лишь продолжительность митоза, что создает ошибочное представление о повышении МА. Авторами второй работы установлено, что число митозов, особенно метафаз, после воздействия кинетина заметно увеличивается. Хромосомы в метафазе напоминают с-хромосомы, обработанные колхицином. Подобно колхицину, кинетин не стимулирует МА, а лишь увеличивает число метафаз путем задержки их перехода в анафазу. Некоторые клетки имеют полиплоидные ядра. Авторы считают полиплоидизацию следствием действия кинетина.

Целью настоящей работы явилось изучение воздействия максимальных доз кинетина на МА меристематических клеток корешков лука (*Allium* сера).

Опыт проводился в 2-х сериях: семена проращивались в чашках Петри на фильтровальной бумаге, увлажненной соответствующими растворами кинетина разной концентрации; корешки, выращенные на воде, обрабатывались соответствующими растворами кинетина в зависимости от данной экспозиции (1, 2, 4, 6 час.). В качестве максимальных доз были взяты следующие концентрации: 5 мг/100 мл; 7,5 мг/100 мл; 10 мг/100 мл; 15 мг/100 мл; 20 мг/100 мл; 25 мг/100 мл; 50 мг/100 мл.

Материал контрольной группы проращивался на фильтровальной бумаге, смоченной водопроводной водой при температуре 22—25°.

Для фиксации брались корешки длиной до 1 см. Фиксация производилась раствором Карнуа (3 : 1). Для определения МА из каждой экспозиции было взято по 10—12 корешков. Из фиксированного материала готовились временные ацетокарминовые препараты. Определение МА производилось из расчета на 1000 клеток в каждом корешке, а в каждой комбинации анализу подвергалось 10 корешков (за комбинацию в опыте бралась продолжительность экспозиции, за вариант—взятая доза кинетина). Полученные данные статистически достоверны.

В первой серии опыта корешки, выращенные на воде, обрабатывались соответствующими растворами кинетина. При анализе данных по вариантам прежде всего замечается, что во все сроки фиксации материала МА ниже, чем в контроле (табл. 1).

Наиболее высокая МА отмечается в варианте 5 мг/100 мл при 2-часовой экспозиции, где процент делящихся клеток составляет $3,60 \pm 0,58$, в то время как в контроле— $4,44 \pm 0,64$. Аналогичный пример можно привести и по другим вариантам. Так, в варианте 15 мг/100 мл и продолжительности экспозиции 6 час. МА равен $2,51 \pm 0,49\%$. В указанном часу МА клеток в контроле составляет $4,06 \pm 0,67\%$. Особенно большая разница в процентах делящихся клеток от контрольного показателя отмечается в варианте 50 мг/100 мл при 4-часовой обработке, где МА почти в 2 раза ниже контрольного— $1,8 \pm 0,41\%$, контроль— $3,9 \pm 0,68\%$.

Таблица 1

Частота встречаемости фаз митоза в клетках корешков лука, обработанных максимальными дозами кинетина

Вариант опыта	Продолжительность времени обработки, час	Количество клеток	Средняя на 1000 клеток					МИ, %
			И	П	М	А	Т	
5 мг/100 мл	1	10000	964,6	8,0	19,9	4,4	3,3	3,54±0,58
	2	10000	964,0	5,5	23,1	6,1	1,7	3,60±0,58
	4	10000	967,8	8,5	17,9	2,7	3,1	3,22±0,55
	6	10000	966,7	9,5	16,6	2,0	3,0	3,33±0,56
7,5 мг/100 мл	1	10000	966,5	10,5	15,4	3,0	3,8	3,35±0,56
	2	10000	965,5	10,8	18,5	2,3	3,3	3,45±0,58
	4	10000	973,3	8,2	14,2	2,2	2,3	2,67±0,50
	6	10000	970,5	8,3	13,3	3,8	1,3	2,95±0,52
10 мг/100 мл	1	10000	970,7	5,5	15,2	5,7	2,9	2,93±0,52
	2	10000	968,3	4,9	20,6	5,4	0,8	3,17±0,55
	4	10000	974,5	5,0	13,3	4,8	2,4	2,55±0,49
	6	10000	970,0	4,7	18,3	5,8	1,0	3,0±0,53
15 мг/100 мл	1	10000	973,2	5,4	17,0	3,6	0,8	2,68±0,50
	2	10000	970,0	6,0	16,4	5,8	1,8	3,0±0,54
	4	10000	973,8	3,6	16,0	3,0	1,6	2,42±0,48
	6	10000	974,9	5,0	15,1	4,1	1,0	2,51±0,49
20 мг/100 мл	1	10000	975,1	5,6	11,6	6,1	1,6	2,49±0,48
	2	10000	971,8	6,1	14,7	7,4	1,0	2,82±0,52
	4	10000	975,3	5,9	11,3	5,7	1,8	2,47±0,48
	6	10000	972,2	5,1	13,7	7,5	1,5	2,78±0,51
25 мг/100 мл	1	10000	976,4	5,3	12,7	3,7	1,9	2,36±0,47
	2	10000	974,3	5,7	11,7	5,5	2,8	2,57±0,49
	4	10000	977,0	4,8	12,1	4,3	1,8	2,30±0,046
	6	10000	972,0	6,1	10,5	8,5	0,5	2,67±0,50
50 мг/100 мл	1	10000	978,2	3,7	9,2	7,0	1,9	2,18±0,43
	2	10000	976,7	3,9	10,6	7,5	2,3	2,33±0,46
	4	10000	981,2	3,0	7,0	7,3	1,4	1,88±0,41
	6	10000	976,0	5,6	8,8	7,8	1,0	2,40±0,48
Контроль (вода)	1	10000	959,0	12,1	8,2	8,8	12,9	4,10±0,62
	2	10000	957,6	14,8	9,9	7,1	13,5	4,44±0,64
	4	10000	960,9	10,9	7,5	7,6	13,1	3,91±0,81
	6	10000	965,1	14,7	6,4	6,4	13,2	4,06±0,61

Интересно отметить, что по всем вариантам опыта МА клеток по данной экспозиции закономерно понижается в зависимости от концентрации раствора кинетина. Так, если в варианте 5 мг/100 через 1 час после обработки кинетином МА составляет $3,54 \pm 0,59\%$, то при той же экспозиции в варианте 15 мг/100 мл этот показатель падает до $2,68 \pm 0,50\%$, а в варианте 50 мг/100 мл—до $2,18 \pm 0,43\%$. Аналогичный спад МА в зависимости от концентрации раствора кинетина наблюдается и по другим комбинациям опыта, причем с повышением концентрации раствора МА понижается.

Вместе с тем во всех вариантах общим является некоторое повышение числа делящихся клеток через 2 час. с начала опыта, который

спад через 4 час., а через 6 час. МА вновь увеличивается, не достигая, однако, уровня таковой при 2-часовой экспозиции (рис. 1). На наш взгляд, подобная закономерность отражает импульсивный характер самого митотического процесса и ритмику в его течении.

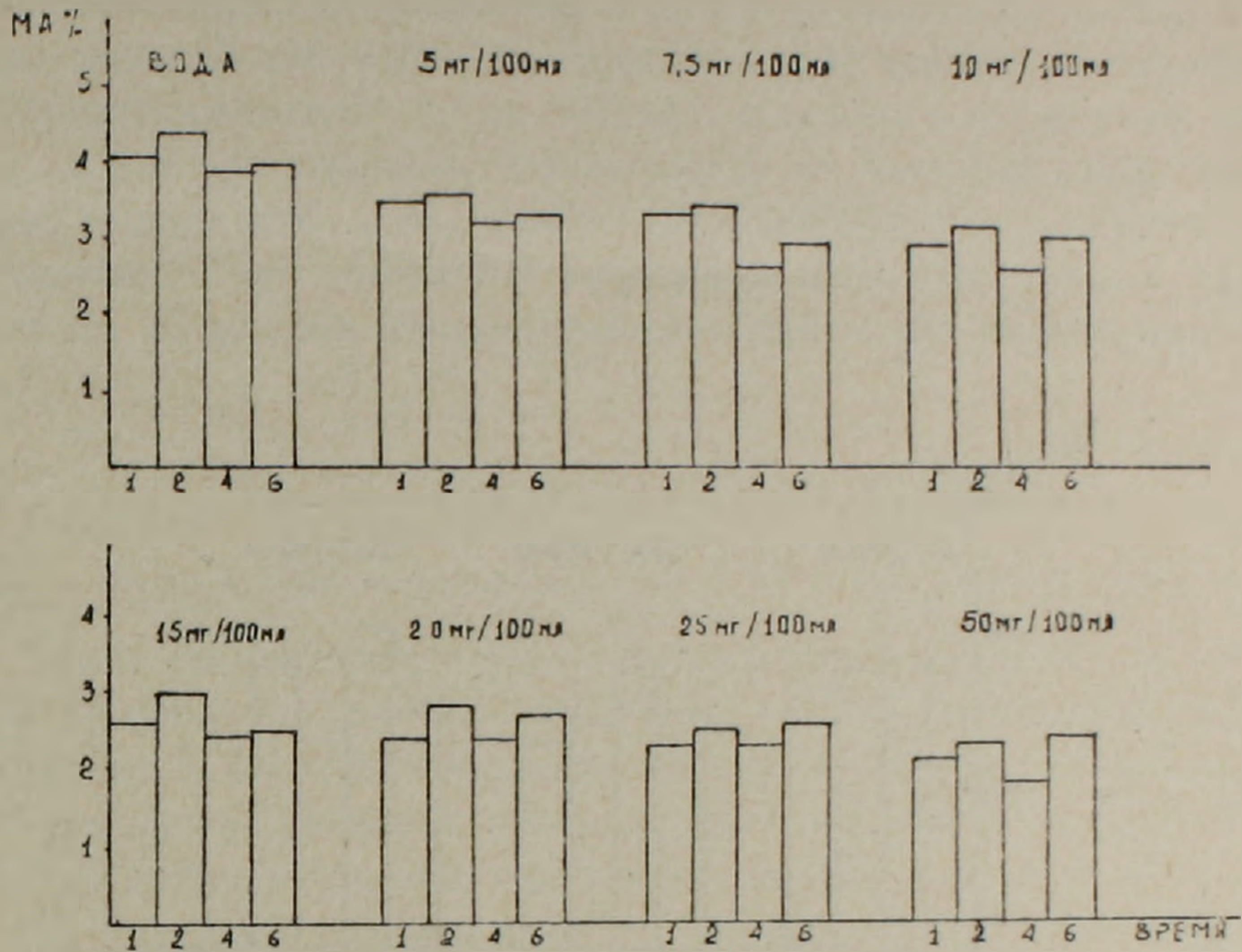


Рис. 1. МА клеток корешков лука, вызванная различными максимальными дозами кинетина.

Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что максимальные дозы кинетина оказывают ингибирующее действие на МА клеток при их обработке соответствующими растворами, и это действие тем сильнее, чем концентрированнее раствор кинетина (рис. 2).

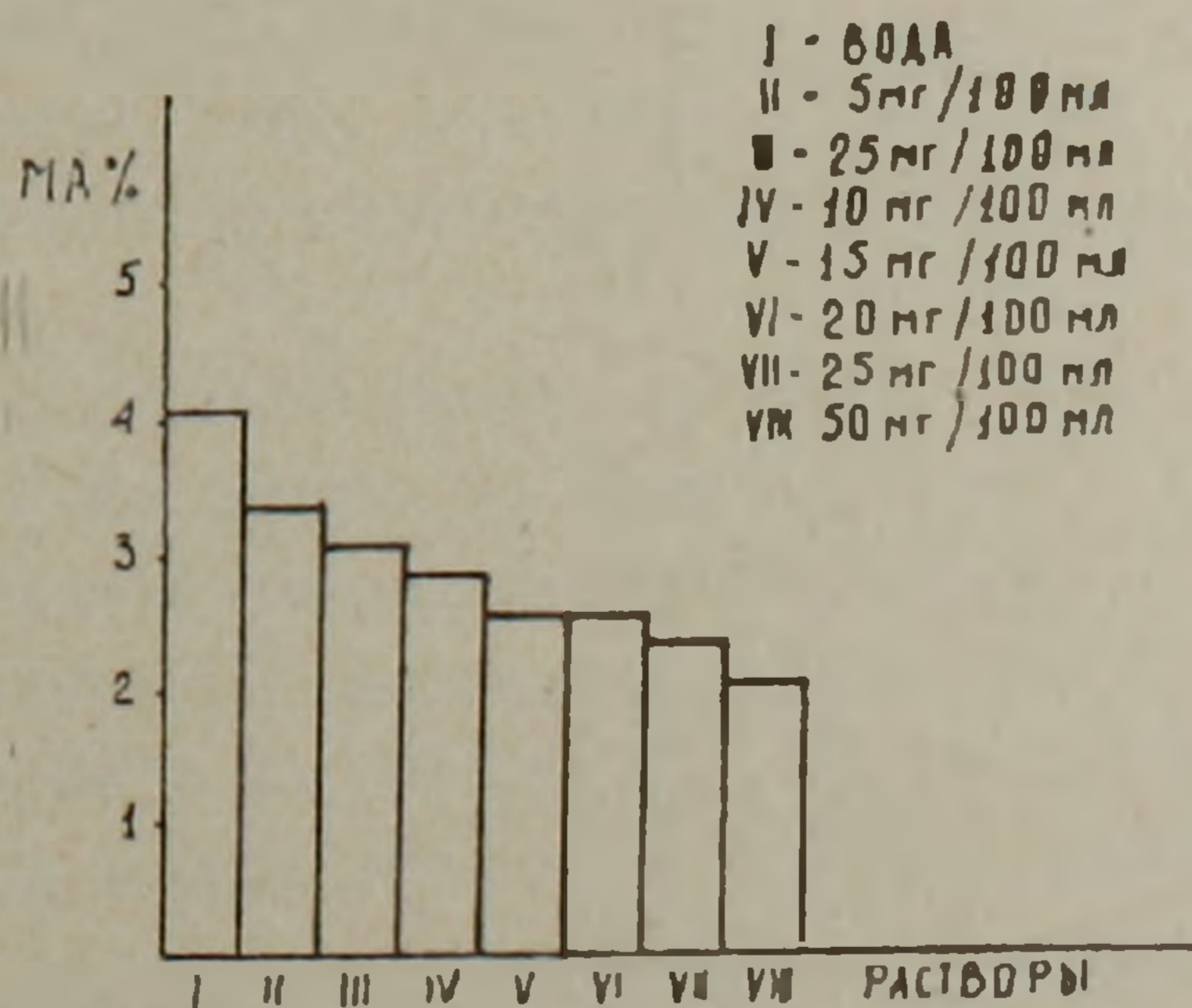


Рис. 2. МА клеток по всем экспозициям данного варианта.

Лучшим методом определения действия химических агентов на митоз служит отдельный учет всех фаз митоза. При анализе отдельных фаз выявляется довольно интересная картина. Во всех вариантах

опыта картина активности в профазе отличается от контрольной, что указывает на ингибирование вступления новых клеток в профазу (табл. 1). Анализ данных по метафазе показывает, что во всех вариантах и комбинациях опыта число метафаз больше числа профаз. Так, при концентрации 10 мг/100 мл после 2-часовой экспозиции число метафазных клеток составляет 18,5, а профазных — 10,8. Наибольшее число метафаз отмечается в варианте 5 мг/100 мл и продолжительности обработки 2 часа — 23,1 (рис. 3). В указанном варианте при той же экспозиции отмечается и наибольшая МА — $3,60 \pm 0,58\%$. Эти данные свидетельствуют о том, что довольно высокая МА клеток при обработке максимальными дозами обусловлена блокированием митоза на стадии мета-

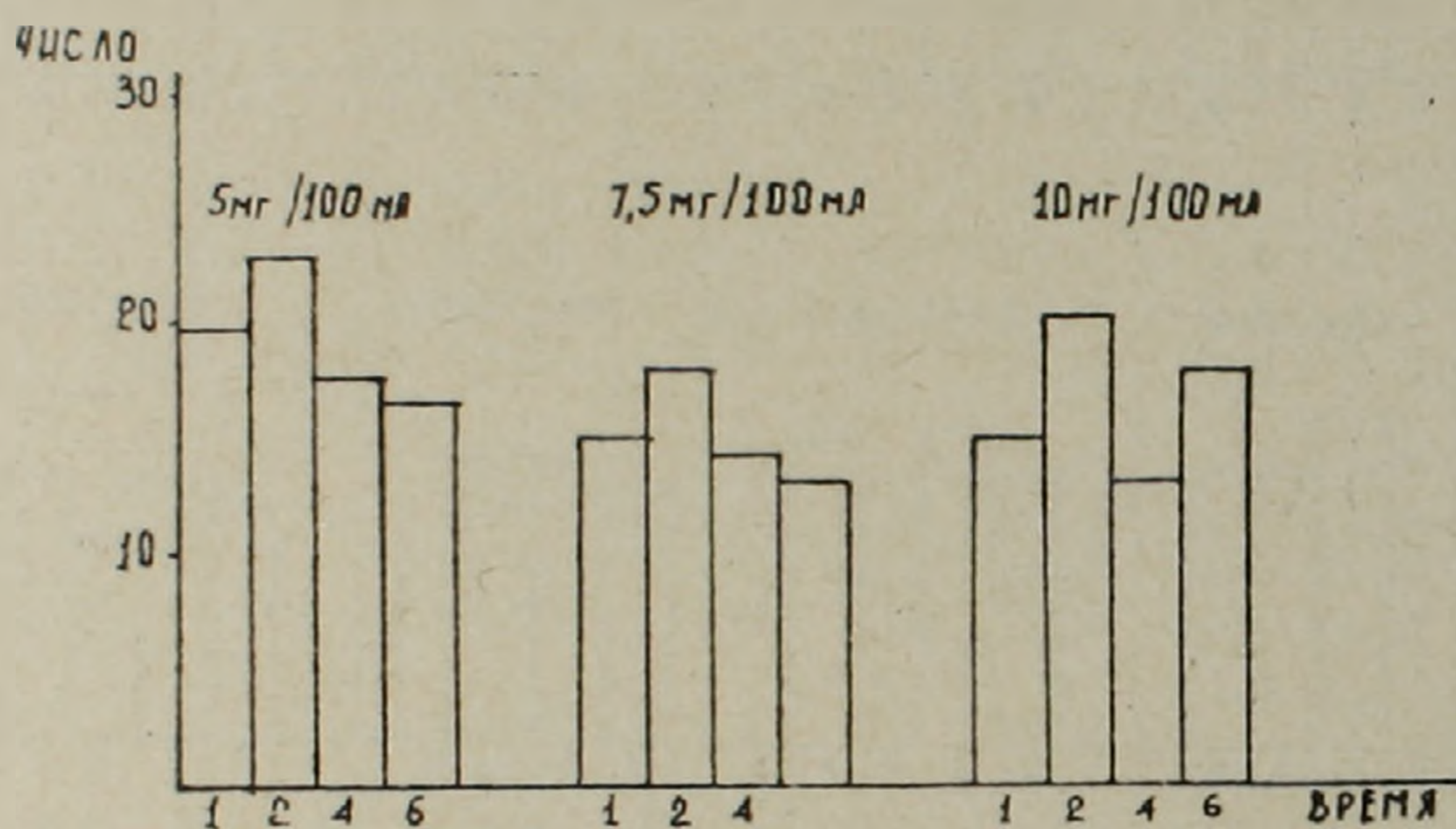


Рис. 3. Встречаемость метафазных клеток, вызванная соответствующими концентрациями кинетина.

фазы. Кинетин, очевидно, блокирует метафазное движение хромосом, т. е. задерживает начало анафазы, и в результате клетки накапливаются в метафазе. Хромосомы в метафазе несколько напоминают с-хромосомы, обработанные колхицином. На основании наших наблюдений мы предполагаем, что в данном случае кинетин оказывает действие, подобное колхицину, т. е. вызывает появление так называемых с-митозов, для которых характерно беспорядочное расположение удвоенных хромосом.

Число метафаз находится на относительно высоком уровне в вариантах 5 мг/100 мл, 7,5 мг/100 мл, 10 мг/100 мл, 15 мг/100 мл, где в сумме по всем экспозициям данного варианта встречается соответственно 77,5; 61,4; 67,4; 67,5 метафазных клеток. При более концентрированных растворах — 20 мг/100 мл, 25 мг/100 мл и 50 мг/100 мл — частота встречаемости метафаз падает, и в последнем варианте отмечается всего 35,6 метафазных клеток. Интересно отметить, что спад кривой встречаемости метафазных клеток при более концентрированных растворах сопровождается подъемом кривой, отражающей активность анафаз по всем экспозициям данного варианта (рис. 4).

Блокируя митоз на стадии метафазы, кинетин вызывает полиплоидизацию. При всех испытанных концентрациях встречаются тетра-

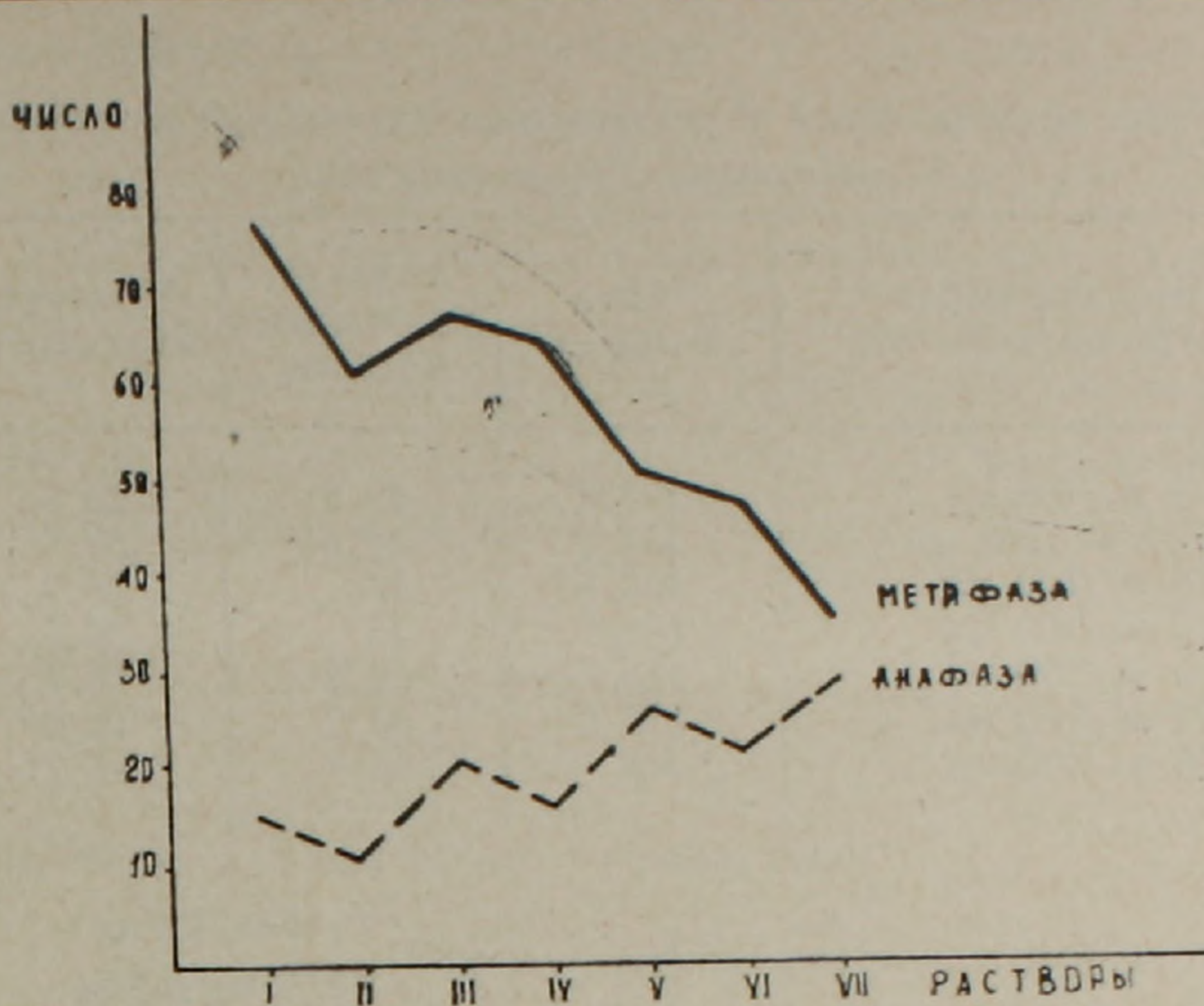


Рис. 4. Число метафаз и анафаз по всем экспозициям данного варианта.

плоиды. Нами определялся процент тетраплоидных клеток от общего числа метафазных клеток. Наивысший показатель отмечается в варианте 5 мг/100 мл и продолжительности экспозиции 6 час.— 36,1%. Следует отметить, что наибольший процент тетраплоидности во всех вариантах отмечается при 6-часовой экспозиции (рис. 5).

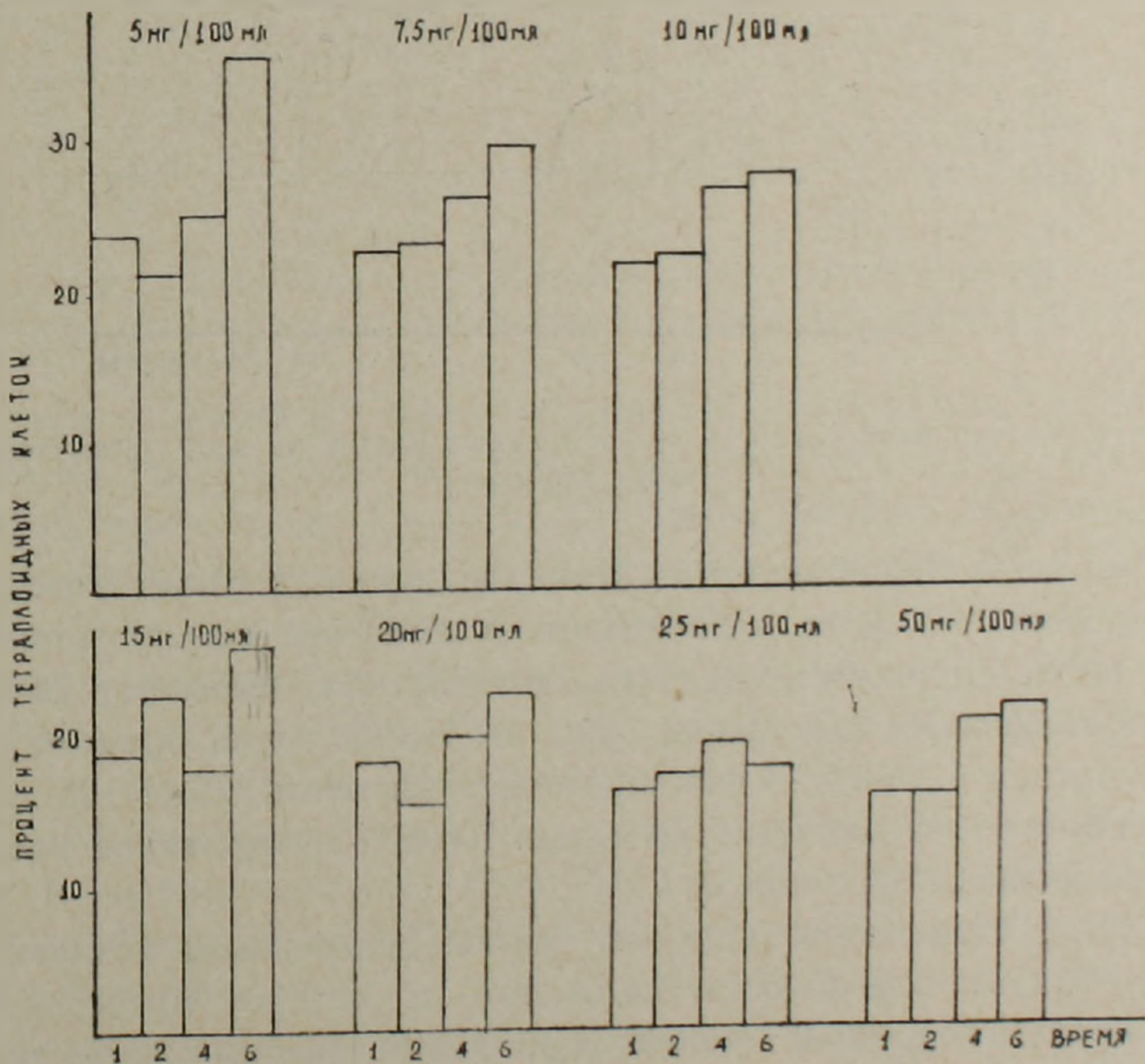


Рис. 5. Частота встречаемости тетраплоидных клеток, вызванная различными концентрациями кинетина.

Процент тетраплоидности понижается в зависимости от концентрации испытуемого раствора (рис. 6).

Таблица 2

Частота встречаемости тетраплоидных клеток при воздействии максимальными дозами кинетина

Концентрация раствора кинетина	Число метафаз	Число тетраплоидных метафаз	% тетраплоидности
5 мг/105 мл	193,7	49,7	25,6
7,5 мг/100 мл	153,5	39,5	25,7
10 мг/100 мл	168,5	42	24,9
15 мг/100 мл	161,2	35	21,7
20 мг/100 мл	128,2	24,5	19,1
25 мг/100 мл	117,5	21,2	18,0
50 мг/100 мл	89	16,7	13,7

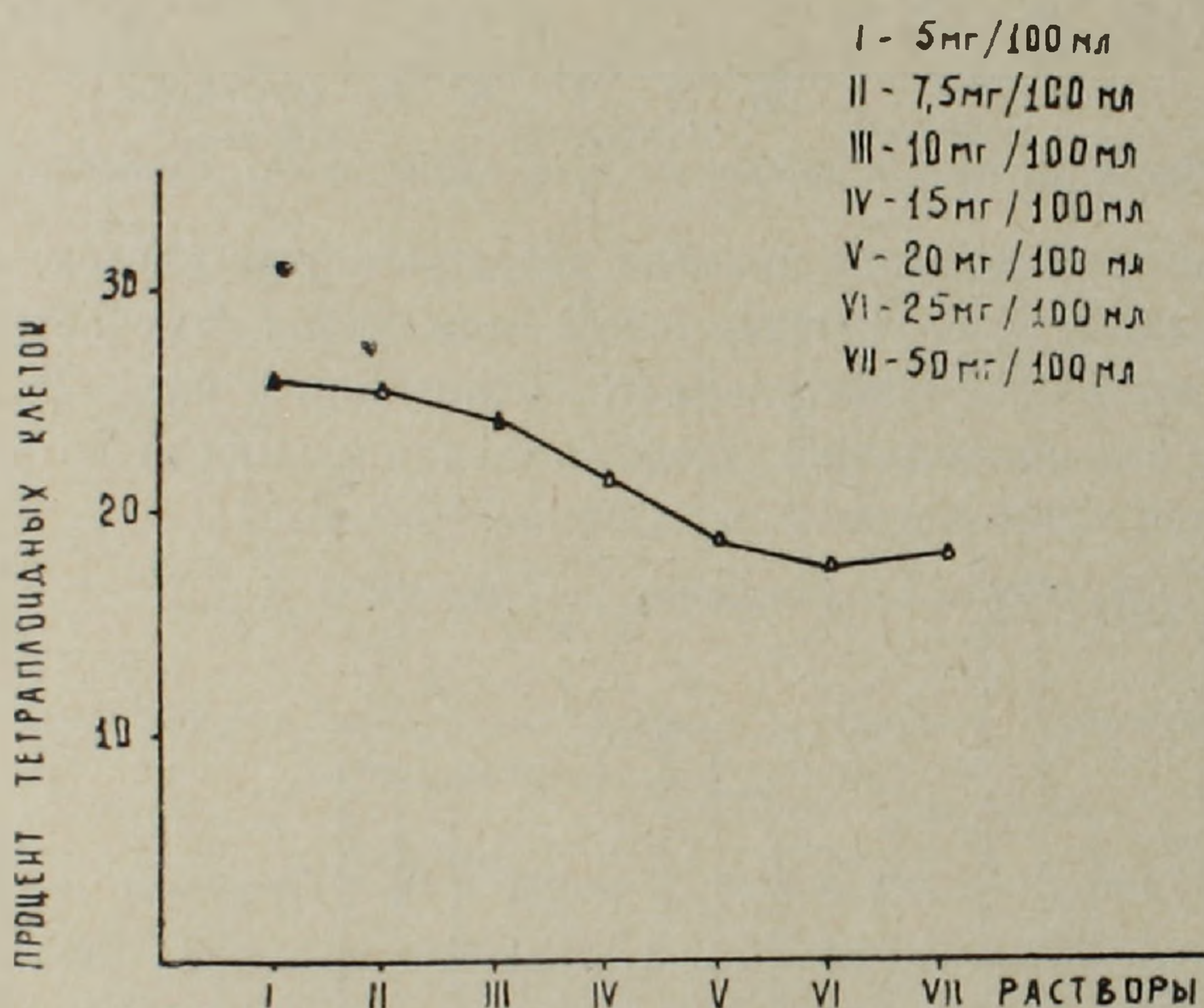


Рис. 6. Частота встречаемости тетраплоидных клеток по всем экспозициям данного варианта.

Кроме учета полиплоидных клеток, мы провели также учет анафазных нарушений — мостов, фрагментов. Увеличение концентрации раствора, а также продолжительности воздействия вызывает увеличение процента анафазных нарушений (рис. 7). Наибольший процент анафазных нарушений — 13,4% — наблюдается в варианте 50 мг/100 мл. Данные показывают, что кинетин вызывает слабое мутирование клеток меристемы корешков *Allium* сера L.

Обобщая вышеизложенное, мы считаем возможным заключить, что кинетин обладает как блокирующим, так и слабым мутагенным действием, причем подобным свойством обладают максимальные дозы.

Во второй серии опыта мы попытались проращивать семена *Allium* сера в вышеуказанных растворах кинетина. Оказалось, что из 100 поставленных на проращивание семян в вариантах 5 мг/100 мл и 7,5 мг/100 мл через 24 час. наклюнулось соответственно 20 и 15 корешков.

Через 48 час. проросло в I варианте 15 корешков, наклюнулось 10, а во II — проросло 12, наклюнулось 5 корешков. Проросшие корешки имели необходимую для фиксации длину. При концентрациях 10 мг/100 мл и 15 мг/100 мл через 24 час. наклюнулось 13 и 9 корешков. Через 48 час. проросло в I случае 12 корешков, но необходимую для фиксации длину имели 6 корешков, а во II варианте проросло 10 корешков, но ни один из них не имел достаточную для фиксации длину; длина корешков была равна 2—2,5 мм.

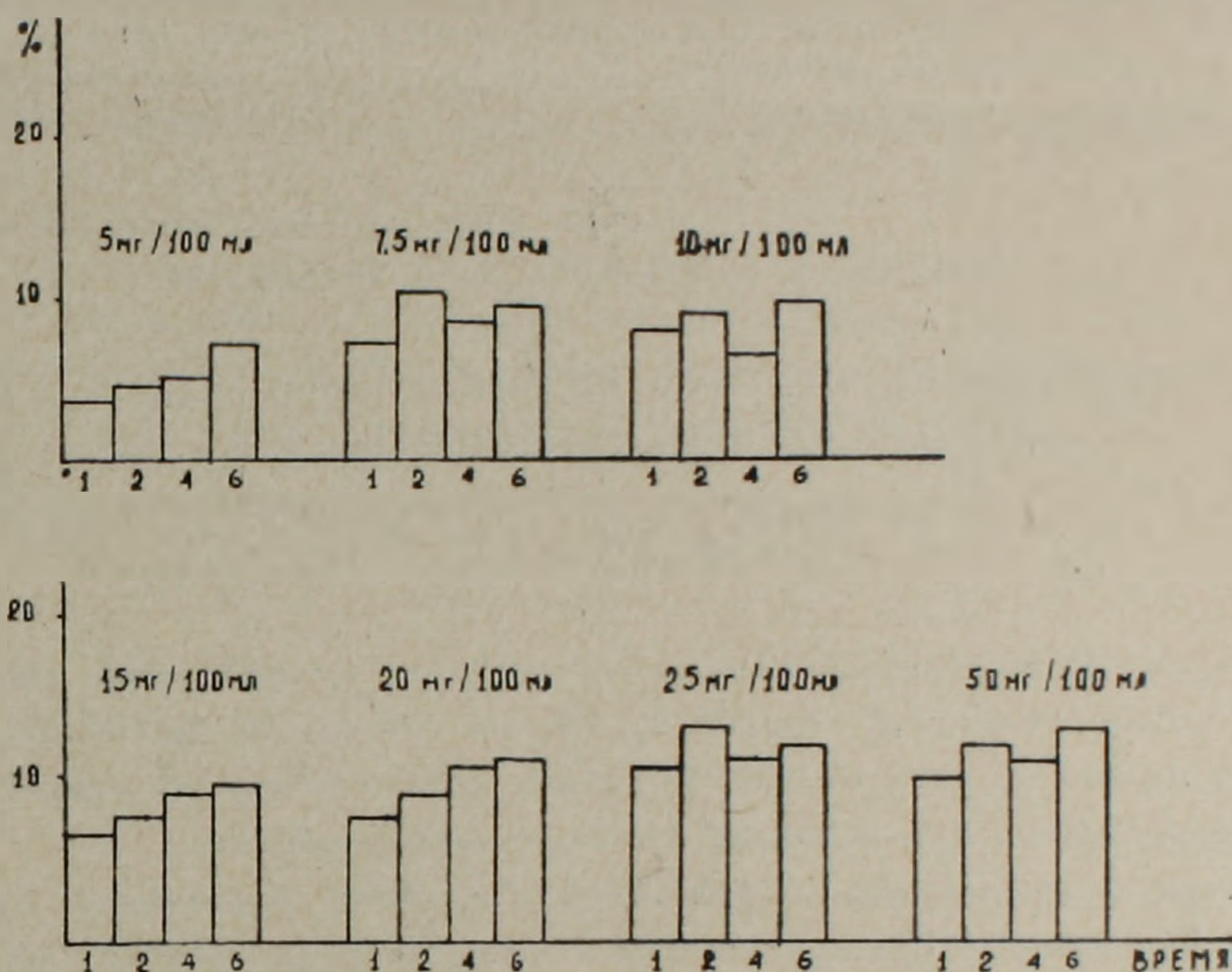


Рис. 7. Хромосомные ана- и телофазные нарушения в кариотипе клеток корешков лука, вызванные различными максимальными дозами кинетина.

Сильное подавление роста корешков наблюдалось в варианте 20 мг/100 мл, где через 24 час. после замачивания семян наклюнулось 8 корешков, через 48 час. проросло 4 корешка длиной 1—1,5 мм. Попытка проращивать семена лука в растворах кинетина 25 мг/100 мл и 50 мг/100 мл не дала результата. По-видимому, эти дозы в данном случае являются летальными. Параллельно мы поставили 100 семян на проращивание на воде. Здесь через 24 час. наклюнулось 22 корешка, а через 48 час. проросло 28 корешков, наклюнулось еще 13.

Учет МА показал, что процент делящихся клеток через 48 час. с момента замачивания семян составляет $1,46 \pm 0,12\%$ в варианте 5 мг/100 мл. При концентрации 7,5 мг/100 мл наблюдалось по 7—8 делящихся клеток в каждом корешке. А в варианте 10 мг/100 мл из 6 просмотренных корешков ни в одном не было делящейся клетки. Клетки имели нездоровый вид, ядра были разрыхленные.

Обобщая данные последней серии опыта, можно заключить, что кинетин оказывает ингибирующее действие на начальный рост корешков. Концентрация 10 мг/100 мл — предельная концентрация, при которой

протекает более или менее нормальное прорастание семян и рост проростков. Более сильные концентрации тормозят прорастание и подавляют рост. Кинетин, по-видимому, препятствует переходу клеток к делению, так как семена при концентрациях 15 мг/100 мл, 20 мг/100 мл все же прорастают, хотя и менее интенсивно, чем в контроле, но корешки, достигая длины 1,5—2 мм, погибают. Доза 25 мг/100 мл и 50 мг/100 мл оказывает летальный эффект при проращивании семян лука в испытуемых растворах.

Ереванский государственный университет,
кафедра генетики и цитологии

Поступило 16.V 1972 г.

Հ. Գ. ԲԱՏԻԿՅԱՆ, Ե. Գ. ՍԻՄՈՆՅԱՆ, Դ. Ս. ԲԱԼԱՍԱՆՅԱՆ

ԿԻՆԵՏԻՆԻ ՄԱՔՍԻՄԱԼ ԴՈՋԱՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ *ALLIUM CERA L.*
ԲՋԻՋՆԵՐԻ ՄԻՏՈՏԻԿ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ու մ

Հետազոտության արդյունքները ցույց տվեցին, որ կինետինի մաքսիմալ դոզաները (5 մգ/100 մլ, 7,5 մգ/100 մլ, 10 մգ/100 մլ, 15 մգ/100 մլ, 20 մգ/100 մլ, 25 մգ/100 մլ և 50 մգ/100 մլ) սոխի արմատածայրերի բջիջների միտոտիկ ակտիվության վրա ունենում են ճնշող ազդեցություն:

Արմատածայրի բջիջներում կինետինի մաքսիմալ դոզաներով մշակելու ժամանակ նկատվում է միտոզի կասեցում մետաֆազայի փուլում: Կինետինի նշված դոզաները, հավանաբար, կասեցնում են բրոմոսոմների շարժումը մետաֆազայում, ուշացնում հաջորդ փուլը, որի հետևանքով տեղի է ունենում բջիջների կուտակում:

Կինետինի հետազոտվող դոզաները դրսևորում են այնպիսի ազդեցություն, որը հատուկ է կոլխիցինին, այսինքն՝ առաջացնում են, այսպես կոչված, C-միտոզներ, որոնց բնորոշ է կրկնապատկված բրոմոսոմների անկանոն դասավորվածություն:

Մետաֆազայի փուլում կասեցնելով բջջային բաժանումները կինետինի նշված դոզաները առաջացնում են բջիջների պոլիպլոիդացում:

Վերցված լուծույթի տարբեր խտությունների ժամանակ միշտ էլ հանդիպում ենք տետրապլոիդ բջիջների, որոնց տոկոսը, կախված լուծույթի խտության աստիճաններից, իջնում է:

Տետրապլոիդ բջիջների ամենաբարձր տոկոսը (36,1%) դիտվել է (5 մգ/100 մլ) տարբերակում 6 ժամ տևողությամբ: Կինետինի տարբեր խտություն ունեցող լուծույթները առաջացրել են նաև անաֆազային խախտումներ: Դրանց տոկոսը մեծանում է խտության և ներգործման տևողության մեծացման հետ մեկտեղ:

Այսպիսով, կինետինի փորձարկված խտության լուծույթներն ունեն ինչպես կասեցնող, այնպես էլ թույլ մոտադեն ազդեցություն:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Кулаева О. Н., Воробьева И. П. Сб. Биология нуклеинового обмена у растений. 1964.
2. Ткаленко Л. В. Сельскохозяйственная биология, 1, 4, 1966.
3. Deysson Guy. Bull. Soc. bot. France, 106, 7—8, 1959.
4. Grillo R., Polsky R. Exptl. Cell Res., 44, 2—3, 1966.
5. Guttman R. Chromosoma, 8, 1956.
6. Guttman R. Biophys. Biochem. Cytol., 3, 1957.
7. Jang Da-ping, Dodson Edward. Com. J. Bot., 48. 1, 1970.
8. Kohlenbach Hans Willy. L. Pflanzenhysid, 63, 4, 1970.
9. Olczewska M., Maciejewska—Potapczykowa W., Sempinska E. Acta Soc. bot. Polon., 26, 3, 1957.
10. Ogawa J. Exptl. Cell Res., 15, 2, 1958.
11. Osborne D. Plant physiol., 37, 5, 1962.
12. Ron A. and Guttman K. Exptl. Cell Res., 25, 1, 1961.
13. Sister Petra Kevin, Witkus E., Berger C. Nature, 202, 4930, 1964.
14. Supniewsky J., Marczynsky T. Bull. Acad. Polon. Sci., 2, 5, 12, 1957.
15. J. Van'T Hof. Exptl. Cell Res., 51, 1, 1968.
16. Wood H. and Braun A. Ann. N. Y. Acad. Sci., 144, 1, 1967.