

С. Н. МОВСЕСЯН, М. Г. ГАЛУКЯН, Р. А. ОГАНЕСЯН

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ О МУТАГЕННОМ ВЛИЯНИИ НЕКОТОРЫХ НОВЫХ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Впервые проведено изучение действия новых химических соединений-производных этиленimina (препарат 496) и азотистого иприта (препарат 190) на высшие растения.

Результаты анализа показали различные нарушения в редукционном делении—оставание отдельных хромосом, неукomплектованность хромосомного набора в полюсах, образование микроядер. Испытуемые новые химические препараты вызывают нарушения такого же типа и в том же количестве, что и этиленimin.

Проблема роли генотипа в экспериментальном мутагенезе у растений привлекла к себе внимание многих исследователей. В этом плане особенно важно выявить реакцию пыльцевых зерен в период их организации у таких растений, которые имеют разный геномный состав. В связи с этим в экспериментальном мутагенезе особый интерес представляет не только изучение митоза, но и исследование характера и частоты различных нарушений в мейотическом делении под действием разных мутагенов. Сложный механизм мейоза чувствителен к различным экзогенным факторам, и при их изменении этот процесс протекает с большими нарушениями [10, 12]. Нарушение мейотического деления приводит к образованию гамет с неправильно укomплектованным набором хромосом, вследствие чего увеличивается количество полужерильных пыльцевых зерен, что резко влияет на плодovitость. Действие химических факторов на мейоз еще мало изучено, но имеет важное значение, так как при его воздействии выход практически полезных изменений в сравнении с выходом их под воздействием физических факторов больше. В качестве химического фактора использованы различные соединения [1, 4, 8, 11, 13, 14—17], вызывающие специфические нарушения в мейозе. Данные по этому вопросу [1, 4] немногочисленны и противоречивы, что говорит о необходимости поисков в этом направлении.

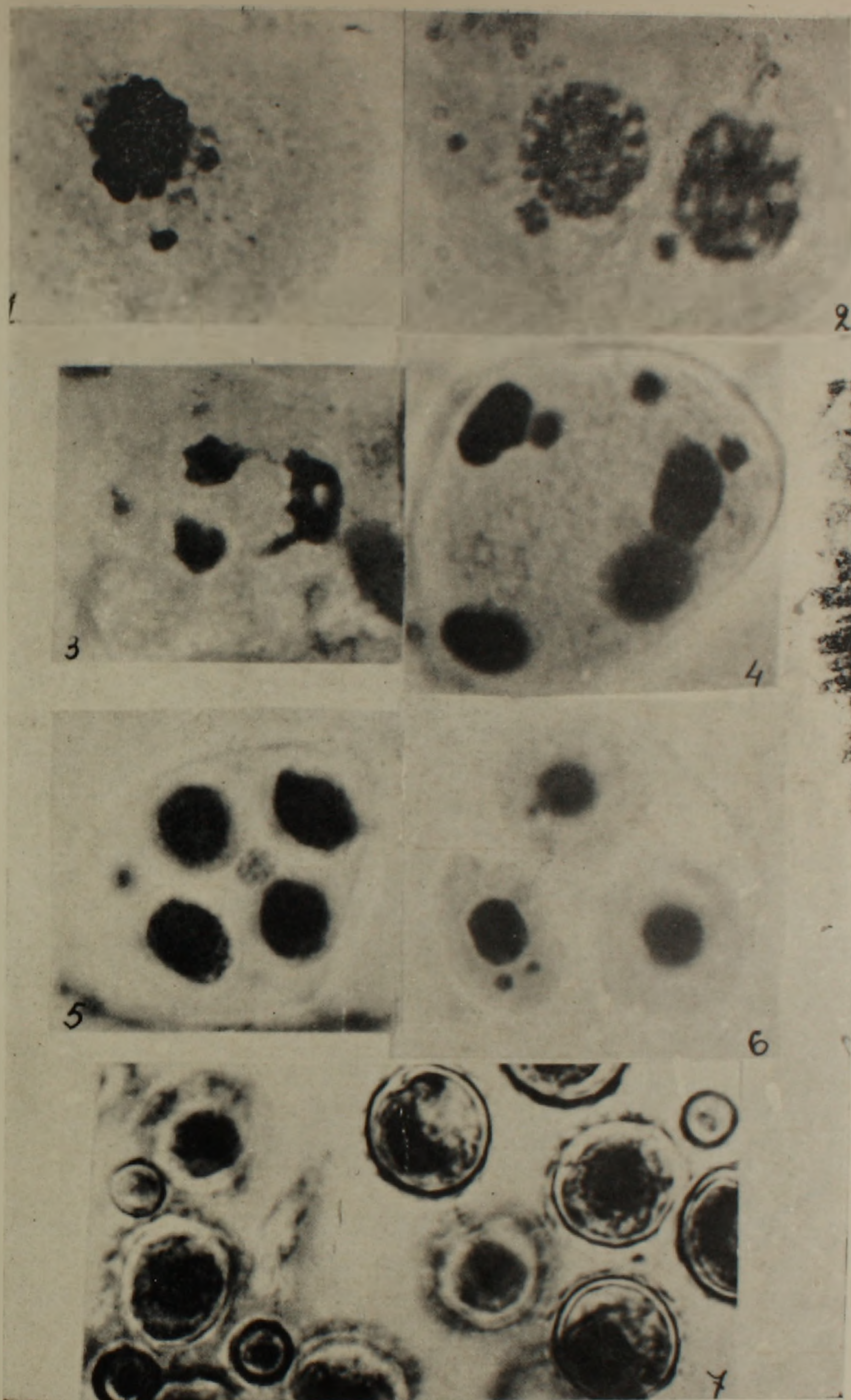
В настоящее время расширяется круг исследований в направлении выявления мутагенных свойств новых химических веществ. В Институте тонкой органической химии АН АрмССР синтезированы производные некоторых мутагенов, таких, как ЭИ, азотистый иприт и другие. Мутагенные особенности этих соединений были изучены только на бактериофагах *E. coli* [5]. На высших растениях изучение действия этих веществ впервые начато нами.

Изучено действие новых химических соединений на становление пыльцевых зерен у рудбекий с целью выявления мутагенных свойств

производного ЭИ и азотистого нирита. В нашем опыте как критерий нарушений редукционного деления у пыльцевых зерен принималось присутствие микроядер в диадах и тетрадах.

Материал и методика. Проводилось испытание этиленимина, его производного — препарат 496, а также производного азотистого нирита — препарат 190. Материалом для настоящего исследования служили два вида рудбекии *Rudbekia speciosa*, *R. triloba*. Опыты были проведены в тепличных и полевых условиях. Воздушно-сухие семена замачивались в буферных растворах, ввиду плохой растворимости препаратов в воде, с рН—8; 8,2. Были приготовлены растворы 0,1, 0,05, 0,02, 0,01 % концентрации. В качестве контроля служила проточная вода. Были проведены две серии опытов. Для первой серии на двух видах рудбекии заранее были отобраны соцветия одинаковой величины, которые обрабатывались водными растворами ЭИ и его производными. На протяжении трех дней в течение 2—3 час. бутоны обрабатывались ватными тампонами. Во втором опыте воздушно-сухие семена замачивались в растворах и оставлялись в них в течение 24 час., затем в течение часа промывались в проточной воде и высевались в теплице для получения рассады, которая в мае высаживалась в грунт. Соцветия, достигшие 5 см в диаметре, фиксировались для анализа. В качестве фиксатора применялась смесь Карнуа. Окрашивание проводилось ацетокармином и основным фуксином по методу Баттальи. Приготавливались временные давленные препараты для изучения микроспор и постоянные для изучения макроспор.

Результаты и обсуждение. Результаты исследований при изучении большого числа микроспор под воздействием различных концентраций ЭИ и его производного выявили различные нарушения. Они в основном проявлялись в отстаивании отдельных хромосом, в неукомплектованности хромосомного набора в полюсах, в образовании микроядер в диадах и тетрадах. В I и II редукционном делении отдельные хромосомы в мета-анафазе не были сконцентрированы на экваторе или в полюсе (рис. 1), а оставались вне сферы фигуры деления. В телофазе они также продолжали оставаться в цитоплазме клетки (рис. 2). Такие отстаившие хромосомы формируются в микроядра, число которых в одной микроспоре варьирует от одной до трех и более (рис. 4, 5). Микроядра продолжают существовать длительное время, и их наличие отмечено на более поздних стадиях, когда формируются одноядерные молодые пыльцевые зерна (рис. 6). В данном случае пыльцевые зерна окружены единой материнской оболочкой и в них четко вырисовываются микроядра, а на более поздних стадиях—при гаметогенезе—судьба микроядер остается невыясненной. По-видимому, у определенного количества микроспор микроядра на поздних стадиях лизируются. Помимо наличия микроядер, нередки случаи неравномерного распределения или же слипания хромосом (рис. 3, 5), что приводит к образованию ядер различной величины. В отдельных случаях ядра диад, тетрад резко отличаются по величине. Клетки тетрады, имеющие крупные и небольшого размера ядра, образуют разнокачественные пыльцевые зерна. Последние резко отличаются друг от друга величиной (рис. 7). Структурной и функциональной особенностью нарушений I и II мейотического деления является снижение фертильности пыльцы. В итоге все нарушения, наблюдаемые в различных фазах мейотического деления,



Появление микроядер в различных фазах мейоза.

Рис. 1. Микроядра в метафазе. Рис. 2. Диада с микроядрами. Рис. 3. Слияние и неравномерное распределение хромосом. Рис. 4. Тетрада с тремя микроядрами. Рис. 5. Микроспора с микроядрами. Рис. 6. Микроспора с микроядрами. Рис. 7. Пыльцевые зерна одного гнезда пыльника различной величины.

приводят к образованию неоднородных, неравноценных пыльцевых зерен, в которых отдельные клетки по внешней форме, структуре ядра и содержанию цитоплазмы различны. Они не имеют нормально сформированного ядра, а цитоплазма проявляет признаки дегенерации. Данные анализа микроспор всех обработанных соцветий показали, что часть хромосомных нарушений, обнаруженных на более ранних стадиях мейоза, не доходит до диад и тетрад, т. е. часть нарушений до организации тетрад восстанавливается. Но несмотря на это у определенного числа диад и тетрад наблюдается присутствие микроядер. Поэтому мы сочли необходимым в дальнейшем изучить частоту появления микроядер в диадах и тетрадах, так как выбросы отдельных хромосом в цитоплазму приводят к неправильно укомплектованным микроспорам. Данные анализа (табл. 1) показали, что под действием ЭИ

Таблица 1

Частота появления микроядер под действием ЭИ и его производного (препарата 496) у *R. triloba* и *R. speciosa*

Вариант	Диада			Тетрада		
	количество просмотренных клеток	количество клеток с микроядрами	% клеток с микроядрами	количество просмотренных клеток	количество клеток с микроядрами	% клеток с микроядрами
<i>R. triloba</i>						
Контроль	539	15	$2,78 \pm 0,70$	636	18	$2,87 \pm 0,50$
ЭИ—0,1%	367	16	$4,36 \pm 1,31$	359	24	$6,68 \pm 1,83$
ЭИ—0,05%	367	39	$10,62 \pm 1,52$	382	12	$3,14 \pm 0,88$
ЭИ—0,02%	303	16	$5,28 \pm 1,80$	343	9	$2,62 \pm 0,86$
ЭИ—0,01%	342	29	$8,47 \pm 1,50$	429	26	$6,05 \pm 0,94$
496—3,0 %	311	29	$9,32 \pm 1,80$	312	34	$10,89 \pm 1,76$
496—0,3 %	460	34	$1,39 \pm 1,65$	323	9	$2,78 \pm 0,91$
<i>R. speciosa</i>						
Контроль	313	6	$1,91 \pm 0,76$	455	13	$2,85 \pm 0,77$
ЭИ—0,1%	304	15	$4,93 \pm 1,71$	323	15	$4,63 \pm 1,60$
ЭИ—0,05%	322	40	$12,42 \pm 1,88$	329	24	$7,29 \pm 1,43$
ЭИ—0,02%	329	52	$15,80 \pm 2,0$	334	23	$6,88 \pm 1,38$
ЭИ—0,01%	380	42	$11,06 \pm 1,60$	194	12	$6,18 \pm 1,73$
496—0,3 %	315	26	$8,25 \pm 1,53$	290	26	$8,96 \pm 1,67$

частота микроядер повышается по сравнению с контролем. Однако как в диадах, так и в тетрадах не наблюдается прямой зависимости между концентрацией мутагена и частотой появления микроядер. Так, у *R. triloba*—при высокой концентрации (3%) частота микроядер в диадах сравнительно низка и составляет 9,32%, а при низкой—(0,05%)—10,63%. При обработке производным ЭИ (препарат 496), хотя взятые концентрации во много раз превышают ЭИ, число микроспор с микроядрами меньше, чем при обработке бутонов ЭИ. При сопоставлении действия ЭИ и его производного на развитие пыльцевых зерен выявляются идентичные нарушения, причем высокая концентрация препарата 496 у *R. triloba* вызывает большее число нарушений, чем низкая.

Эта закономерность отмечена как в диадах, так и в тетрадах. У *R. sprengiana* при воздействии теми же концентрациями ЭИ нет такой реакции. Высокое число микроядер насчитывается в диадах при 0,2% концентрации ЭИ, в тетрадах число их значительно снижается. Интересно, что у двух видов рудбекии в среднем число микроядер выше в диадах, чем в тетрадах. По-видимому, часть нарушений, отмеченных в диадах во втором мейотическом делении, частично восстанавливается. Опыты были поставлены в условиях теплицы, и это обстоятельство оказало определенное влияние на увеличение числа нарушений по сравнению с полевым опытом. Необходимо учесть, что в отличие от первого опыта, во втором обрабатывались семена. Анализ пыльников в M_1 показал возрастание числа микроядер, как и в предыдущем опыте. В отдельных гнездах большинство клеток содержит микроядра. Под действием ЭИ, препарата 496 и производного азотистого иприта частота встречаемости микроядер в диадах и тетрадах сильно возрастает по сравнению с контролем.

Таблица 2

Появление микроядер в диадах и тетрадах при воздействии аналогом азотистого иприта (препарат 190) на рудбекию

Концентрация	Количество диад			Количество тетрад		
	нормальная	с микроядром	% микроядер	нормальная	с микроядром	% микроядер
0,1M—3,34%	109	102	93,4%	501	419	83,6%
0,01M—0,34%	232	226	97,4%	118	118	100%
Контроль	106	4	3,7%	165	78	47,2%

Анализ пыльников пыльцевых зерен цветков различных зон нижнего, среднего и верхнего рядов соцветий рудбекии красивой (табл. 3) показывает различие в величине. Разница в величине пыльцевых зерен

Таблица 3

Размеры и количество пыльцевых зерен при обработке производным азотистого иприта (препарат 190)

Ряд соцветия	Количество и % проанализированных пыльцевых зерен			Общее число
	диаметр мелких—33,9 μ	диаметр средних—50 μ	диаметр крупных—73,2 μ	
Нижний	563—55,9%	417—41,4%	26—2,5%	1006
Средний	339—29%	560—51,2%	202—18,4%	1091
Верхний	600—58%	400—39,5%	28—2,6%	1015
Всего	1502—44,3%	1377—44%	742—7,8%	3122

проявляется не только как явление, обычное для данного вида [9]. У растений контрольного варианта она проявляется в меньшей степени, а у обработанных семян сравнительно увеличена. Наряду с увеличением

числа мелких и очень крупных пыльцевых зерен в каждой исследуемой зоне это явление проявляется по-разному. Поскольку пыльцевые зерна, причисленные нами к «средней группе», являются нормальными, то «мелкие» и «крупные» являются отклоняющимися типами. В среднем половина из всего количества анализированных пыльцевых зерен является отклоняющейся от нормы. Относительно крупные пыльцевые зерна встречаются во всех гнездах пыльника. Как известно, слияние ядер или слипание хромосомных групп может привести к образованию полиплоидных, а также анеуплоидных ядер.

Не исключено, что крупные пыльцевые зерна являются диплоидами или анеуплоидами и образуются в результате неправильного прохождения редукционного деления, что и подтверждается работами Батталия [9].

Нами было изучено также действие производных ЭИ и азотистого ниприта на ранние стадии макроспоры при закладке материнской клетки. Применяемый метод обработки бутонов мутагенами не оказывал какого-либо действия на развитие макроспоры и женского гаметофита. Нарушений в мейозе и дефинитивном распределении ядер зародышевого мешка не наблюдалось. Однако некоторые авторы [2], применяя иной метод обработки, показали, что под влиянием колхицина ядра археспорной клетки не переходят к профазе мейоза, в результате стимулируется развитие диплоидных зародышевых мешков. Далее непосредственная обработка (ЭИ, НММ, ДЭС, ДМС) зародышей на ранних стадиях онтогенеза чернушки дамасской приводит к полному прекращению деления клеток. Думается, что при обработке соцветий на ранних стадиях методом «тампона» ткани, окружающие семяпочку, защищают последнюю от действия мутагена.

На основании полученных данных мы пришли к выводу, что испытуемые новые химические препараты вызывают нарушения такого же типа и в таком же количестве, что и ЭИ, который считается одним из сильнейших мутагенов. Определенной корреляции между концентрациями изученных химических соединений и их эффектом воздействия не наблюдается. Сравнительное изучение двух растительных видов *R. triloba*, *R. speciosa* показало, что при действии одними и теми же мутагенами они реагируют по-разному. Под действием новых химических соединений резко повышаются нарушения в мейозе и частота встречаемости отклоняющихся от нормы пыльцевых зерен, что может свидетельствовать об их мутагенном действии.

Ереванский государственный университет,
проблемная лаборатория цитологии

Поступило 13.VII 1972 г.

Ս. Ն. ԽՈՎՍԵՍՅԱՆ, Մ. Գ. ԳԱԼՈՒԿՅԱՆ, **Ռ. Ա. ՀՈՎՀԱՆՆԵՐՍՅԱՆ**

ՆԱԽՆԱԿԱՆ ՏՎՅԱԼՆԵՐ ՆՈՐ ՔԻՄԻԱԿԱՆ ՄԻԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՄՈՒՏԱԳԵՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՎԵՐԱԲԵՐՅԱԼ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Մենք ուսումնասիրել ենք էթիլենիմիդի և ազոտական իպրիտի նոր ածանցյալների մուտագեն ազդեցությունը միկրոսպորների ձևավորման վրա, որոնք առաջին անգամ փորձարկվել են *E. coli* բակտերիոֆագի վրա՝ նույն օրգանական քիմիայի ինստիտուտում: Փորձերը դրվել են ռուդբեկիայի երկու տեսակների վրա՝ *R. speciosa* և *R. triloba*: Փորձարկվող միացությունների համապատասխան խտության ($0,1$, $0,05$, $0,02$, $0,01$) լուծույթներով մշակվել են ինչպես օդարչոր սերմերը, այնպես էլ ծաղկաբողբոջները տամպոնների միջոցով: Կատարվել է միկրոկորիզների հաշվարկ դիադներում և տետրադներում: Ստացված թվական տվյալների անալիզը ցույց տվեց, որ փորձարկվող նյութերի ազդեցությամբ միկրոկորիզների առաջացման հաճախականությունը ինչպես դիադներում, այնպես էլ տետրադներում, ստուգիչի համեմատությամբ խիստ բարձրանում է: Ստացված տվյալների հիման վրա եկել ենք այն եզրակացության, որ նոր քիմիական միացությունները առաջացնում են նույն տիպի և հաճախականության խախտումներ, ինչ որ հանրահայտ մուտագեն էթիլենիմիդը: Նշել ենք, որ որոշակի կոռելյացիա փորձարկվող մուտագենի և նրա ազդեցության էֆեկտի միջև չի դիտվել: Ռուդբեկիայի երկու տեսակների համեմատական ուսումնասիրությունը ցույց տվեց, որ նույն մուտագենների ազդեցության նկատմամբ նրանք դրսևորում են տարբեր ռեակցիա, որը պայմանավորված է նրանց գենոտիպով:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Воробьева Г. А., Егамбердиев А. Е. Узбекский биол. журн., 5, 1969.
2. Дзевальтовский А. К. Мат-лы Всесоюзн. симпоз. по эмбриологии растений, 59—62, 1968, Киев.
3. Дзевальтовский А. К. Цитология и генетика, 5, 1, 1971.
4. Лишненко И. Д. Цитология и генетика, 2, 3, 1968.
5. Пароникян Г. М., Акопян А. Г., Оганесян М. Г. Генетика, 7, 4, 1971.
6. Фурсов В. И., Вечерко Л. И. Вестник с-х наук, 3, 1968.
7. Фан-фай. Теория химического мутагенеза. Наука, 1971.
8. Хорилов О., Некрасова Г. Вестник с-х наук, 9, 1970.
9. Battaglia E. Cariologia, 7, 1955.
10. Hoda Hakeem and Sohel Amer. Die Naturwissenschaften, 53, 7, 183, 1966.
11. Matsuura Hajime, Takehisa Shiu. J. Fac. Sci. Hakkaido Univ., ser. 5, 8, 2—3, 86—100, 1962.
12. Mc. Quade H. A. Radiation Res, 20, 3, 451—456, 1963.
13. Оно Риндзиро. Сэнсекутай, Кромосома, 61, 1965.
14. Очо Р., Танифудзи С. Идэнгаку дзасси, Japan. J. Genetics, 5—6, 35, 1960.
15. Therman Eeva, Rupila Sirikka. Arch. Soc. Zool., Bot. Fennicae Vanamo, 2, 18, 1963.
16. Wu K. D., Grant W. F. Eytou, 23, 1, 63—67, 1966.
17. Wu K. D., Grant W. F. Cytologia, 32, 1, 31—41, 1967.