

ТАМАРА ШНАЙДЕР, ОСКАР ПРИЙЛИНН

ЗАВИСИМОСТЬ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЭТИЛЕНИМИНА ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ И ВЛАЖНОСТИ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ

Метаболическое состояние семян во время их обработки физическими и химическими мутагенами может обуславливать модифицирование мутагенного эффекта, обычно наблюдаемого при воздействии на семена, находящиеся в состоянии покоя.

Уже в одной из первых работ по изучению влияния проникающей радиации на наследственную изменчивость организмов было установлено, что предварительно замоченные семена более чувствительны к действию облучения, чем сухие (Stadler, 1928). В более поздних исследованиях повышение чувствительности набухающих семян к мутагенам авторы объясняют следующими причинами: вымыванием эндогенных защитных веществ (Камга и др., 1960), повышением концентрации кислорода в семени (Latterell, 1961), вступлением клеток зародыша в фазу синтеза ДНК (Natarajan, Shivasankar, 1965) и другими.

Выяснение зависимости мутагенного эффекта от метаболического состояния семени во время воздействия мутагенами имеет большое значение как для теории индуцированного мутагенеза, так и для его практического применения в селекции растений. Анализ зависимости мутабельности от состояния семян поможет установлению характера связи мутационного процесса с клеточным метаболизмом, а определение такого физиологического состояния семян, при котором наблюдается наибольший выход жизнеспособных мутаций с сохранением высокой фертильности и выживаемости растений, позволит выработать более эффективные методы получения ценного и разнообразного исходного материала для селекции.

Целью исследований, начатых в 1970 году в секторе генетики Института экспериментальной биологии АН ЭССР, было изучение зависимости цитогенетического и мутагенного действия этиленимина от физиологического состояния семян пшеницы во время обработки мутагеном. В настоящей статье представлены результаты цитогенетического анализа митозов в корневой меристеме проростков после обработки сухих и набухающих семян пшеницы монофункциональным алкилирующим соединением — этиленимином (ЭИ) — при двух температурных режимах.

Материал и методика

В опыте использовались воздушно-сухие семена (влажность 14%) норвежского сорта яровой пшеницы 'Норрена' эстонской репродукции. Семена обрабатывались однократно в течение 4 ч 0,01%-ным раствором ЭИ при pH 6, причем время обработки

каждой отдельной партии семян приходилось на различные сроки от 0 до 32 ч от начала замачивания семян в воде с интервалами в четыре часа. Для обработки каждой новой партии семян готовился свежий раствор ЭИ. Замачивание в воде и обработка ЭИ всех опытных и контрольных (без обработки ЭИ) партий семян проводились при $+3$ и $+18^{\circ}\text{C}$. После обработки ЭИ семена промывались проточной водой в течение 6 ч, затем определенное время они находились в воде, так что семена всех вариантов опыта и контрольные (без обработки ЭИ) были в воде и мутагене или только в воде соответственно одинаковый срок.

После обработки ЭИ часть семян сразу же высевалась в поле, определялась всхожесть, выживаемость и фертильность растений, измерялась их высота и проводились фенологические наблюдения за их развитием. После созревания и уборки растений проведен анализ количественных признаков.

Другая часть обработанных ЭИ и контрольных семян проращивалась в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге при температуре $22 \pm 1^{\circ}$. Через сутки или несколько более (в зависимости от варианта обработки) корни проростков длиной 0,5—1,0 см фиксировались в смеси абсолютного этилового спирта с ледяной уксусной кислотой (3:1) и готовились временные давленные препараты с окраской ацетоорсеином. Фиксация проводилась в два срока с интервалом в 24 ч. Под микроскопом МББ-1А просматривались делящиеся клетки меристемы кончика корня и определялось число клеток, находящихся в мета-, ана- и телофазах митотического деления, а также количество клеток с хромосомными перестройками (мостами и фрагментами) в ана- и телофазах, приходящихся на 100 клеток в этих фазах клеточного деления. В среднем по каждому варианту опыта в каждом сроке фиксации просмотрено по 20 корней.

Схема опыта может быть представлена следующим образом:

Температура во время обработки семян			
$+3^{\circ}$		$+18^{\circ}$	
Вариант		Вариант	
1	0 ч H_2O , 4 ч ЭИ	11	0 ч H_2O , 4 ч ЭИ
2	4 ч H_2O , 4 ч ЭИ	12	4 ч H_2O , 4 ч ЭИ
3	8 ч H_2O , 4 ч ЭИ	13	8 ч H_2O , 4 ч ЭИ
4	12 ч H_2O , 4 ч ЭИ	14	12 ч H_2O , 4 ч ЭИ
5	16 ч H_2O , 4 ч ЭИ	15	16 ч H_2O , 4 ч ЭИ
6	20 ч H_2O , 4 ч ЭИ	16	20 ч H_2O , 4 ч ЭИ
7	24 ч H_2O , 4 ч ЭИ	17	24 ч H_2O , 4 ч ЭИ
8	28 ч H_2O , 4 ч ЭИ	18	28 ч H_2O , 4 ч ЭИ
9	32 ч H_2O , 4 ч ЭИ	19	32 ч H_2O , 4 ч ЭИ
10	32 ч H_2O , контроль	20	32 ч H_2O , контроль

Результаты и обсуждение

Данные цитогенетического анализа (таблица) показывают, что число делящихся клеток в корневой меристеме пшеницы сорта 'Норрена' было выше в контрольных вариантах, чем в опытных после обработки семян ЭИ. Исключение составляли лишь отдельные варианты опыта при втором сроке фиксации, в которых число клеток, находящихся в мета-, ана- и телофазах митотического деления, достигало уровня контроля или даже незначительно превышало его. В опытных вариантах наименьшее число делящихся клеток при обеих температурах отмечалось после обработки ЭИ сухих семян пшеницы (варианты 1 и 11).

Более сильное подавление митозов в корневой меристеме проростков пшеницы, а также самые низкие показатели у ряда признаков рас-

тений в полевых опытах (всхо-
жесть, выживаемость, прирост в
высоту и др.), отмеченные после
обработки мутагеном сухих семян,
можно объяснить сильным токси-
ческим действием ЭИ, небольшие
молекулы которого сравнительно
быстро проникают в ткани зароды-
ша в самом начале набухания
семян. Это, очевидно, связано не
только с тем, что в сухие семена
поступает сразу сравнительно
большее количество ЭИ, чем в
предварительно замоченные, но
также и с тем, что ЭИ оказывает
существенное воздействие на те
вещества, которые содержатся в
семени в самом начале набухания и
имеют важное значение для разви-
тия растения именно в этот период.

После обработки ЭИ сухих
семян при температуре $+3^{\circ}$ число
клеток, находящихся в фазах деле-
ния митоза, было в среднем в 2,3
раза меньше, чем в вариантах с

обработкой ЭИ при температуре $+18^{\circ}$. Это, по всей вероятности, объяс-
няется более медленным поглощением раствора ЭИ при пониженной
температуре зародышем зерна, который при набухании поглощает влагу
в первую очередь и в значительно большем объеме, чем эндосперм
(Леманн, Айхеле, 1936) и, вследствие этого, более поздним началом
метаболических процессов.

При сравнении числа делящихся клеток в меристеме корней по
срокам фиксации можно увидеть, что при втором сроке фиксации в
мета-, ана- и телофазах находилось в 1,5—2,0 раза больше клеток, чем
при первом сроке.

При рассмотрении влияния температуры на число делящихся клеток в
меристеме корней, выясняется, что среднее число клеток, находящихся
в фазах деления митоза, во всех опытных и контрольных вариантах
несколько выше при температуре $+18^{\circ}$, чем в вариантах при темпера-
туре $+3^{\circ}$. Однако эти различия не всегда достоверны.

Общий ход кривых, отражающих частоту аберраций хромосом, при
обеих температурах сходен (рис. 1 А и Б). Данные первого срока фик-
сации (рис. 1 А) свидетельствуют о том, что в вариантах, где семена
обработывались ЭИ после 4- и 8-часового замачивания в воде, процент
хромосомных нарушений ниже, чем при обработке сухих семян. Воздей-
ствие ЭИ на семена, набухающие в течение 12 и 16 ч, вызвало крутой
подъем частоты перестроек хромосом, причем в этих вариантах наблю-
далось значительное превышение числа хромосомных фрагментов над
числом мостов, в то время как в остальных вариантах преобладающим
типом перестроек были хромосомные мосты (на рис. 2 приведены типы
перестроек, наблюдающиеся в опыте). При дальнейшем набухании
семян до обработки ЭИ на протяжении 24 ч и более частота перестроек
снижалась.

Анализ данных второго срока фиксации показывает (рис. 1 Б)
троекратное по сравнению с первым сроком повышение числа аберра-

Число делящихся клеток в корневой
меристеме пшеницы в зависимости
от температуры и времени обработки
семян этиленимином

Вариант	Число делящихся клеток	
	Первый срок фиксации	Второй срок фиксации
1	27,9±2,3	40,5±6,7
2	107,9±5,0	205,3±14,2
3	101,0±7,4	203,8±16,4
4	121,6±13,2	229,5±12,1
5	94,0±7,7	184,7±13,8
6	112,9±8,4	233,4±11,8
7	140,9±7,8	192,4±20,5
8	130,1±10,4	212,8±51,7
9	145,0±14,1	183,4±16,1
10	162,1±19,1	206,3±10,5
11	61,3±9,6	96,1±10,9
12	91,5±5,0	192,4±16,4
13	154,8±12,1	203,9±14,5
14	140,9±8,0	151,7±12,9
15	151,5±8,8	209,8±23,1
16	151,8±9,7	193,5±18,8
17	105,5±7,8	193,1±10,2
18	136,8±8,7	255,6±21,3
19	162,8±10,5	188,7±15,3
20	191,0±9,1	241,7±18,8

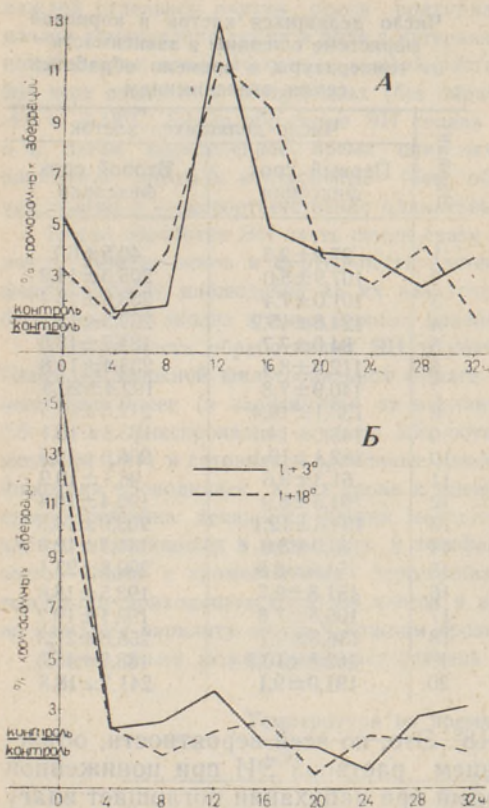


Рис. 1. Частота хромосомных перестроек в ана- и телофазах меристемы корней пшеницы в зависимости от срока обработки семян этиленимином и от температуры. А — первый срок фиксации; Б — второй срок фиксации.

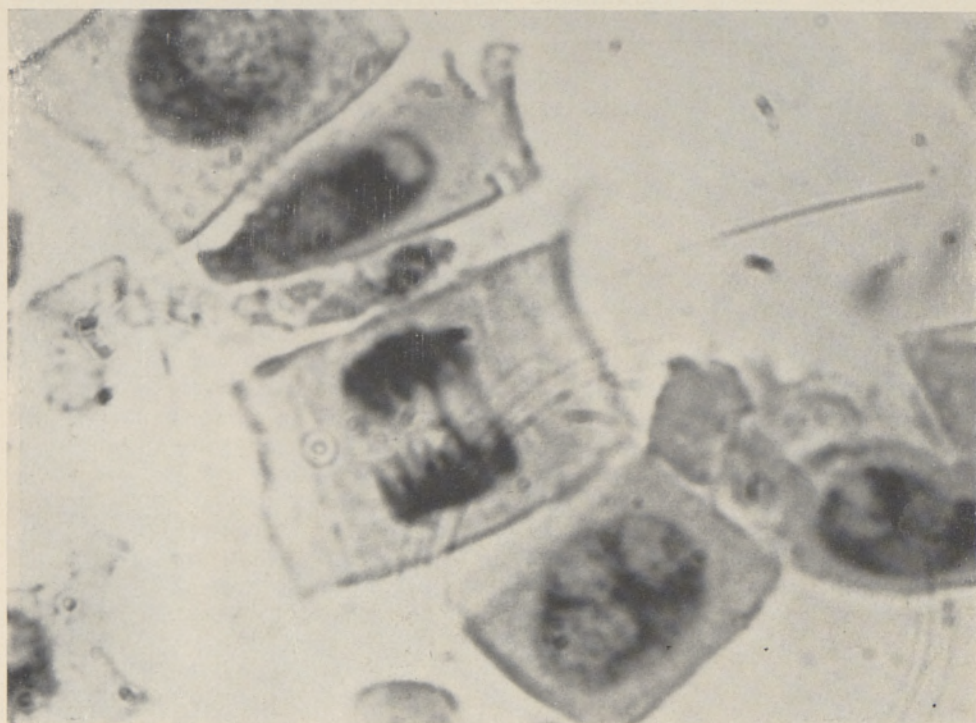
обработанных мутагеном через 15 ч после замачивания. А. Натараджан и Д. Шивасанкар (Natarajan, Shivasankar, 1965), действуя ЭМС на семена ячменя, замоченные в течение различного времени в воде, показали, что максимальная чувствительность прорастающих семян к мутагену приходится на 16—20 ч от начала замачивания, что авторы связывают с началом синтеза ДНК в клетках зародыша. При анализе количества перестроек хромосом у ячменя Дж. Моучен-Дамен с сотрудниками (Moutschen-Dahmen и др., 1968) установили, что максимум аббераций наблюдался в варианте, обработанном мутагеном через 16 ч после начала замачивания семян. По мнению авторов, это связано с вступлением клеток в фазу синтеза ДНК. В этой же работе указано на значительно более высокую чувствительность сухих семян ячменя к мутагенам (ЭО и ЭИ) по сравнению с предварительно замоченными.

В. Савин, М. Свамнатан и Б. Шарма (Savin и др., 1968) установили, что при обработке химическими мутагенами (ЭМС и НММ) прорастающих семян ячменя чувствительность их к мутагенам изменялась, причем максимальная чувствительность наблюдалась при обработке семян после 16 ч замачивания (тест — хлорофильные мутации в M_1 и M_2 , фертильность, рост и скорость развития растений в M_1).

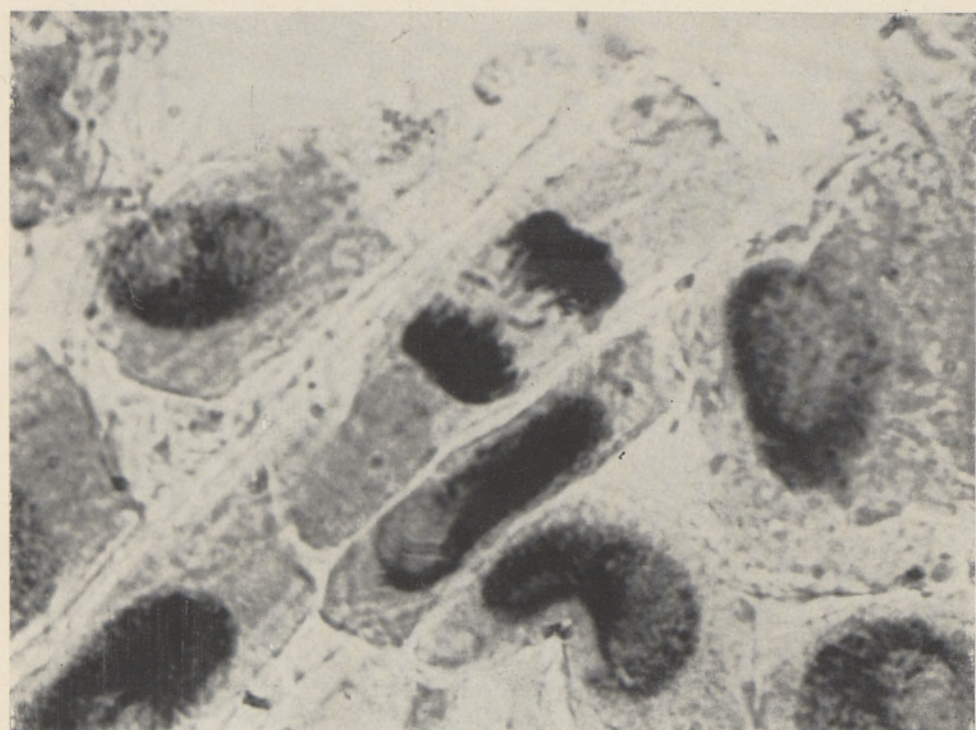
ций хромосом после обработки ЭИ сухих семян (при обеих температурах). Это подтверждает высказанное выше предположение о сильном повреждающем эффекте ЭИ при обработке сухих семян и свидетельствует о его продолжительном последствии.

Результаты проведенного опыта свидетельствуют о влиянии предварительного замачивания семян, которое проявляется в различной их чувствительности к воздействию ЭИ. Существенным является также продолжительность намачивания семян перед обработкой ЭИ, что связано с различной скоростью и интенсивностью протекания в них биохимических процессов при прорастании.

В ряде работ, опубликованных за последние годы, приводятся результаты исследований по изучению изменения чувствительности набухающих семян различных культур к различным химическим и физическим мутагенам. Г. Рэббелен (Röbbelen, 1965) в опытах с воздействием химическими мутагенами (ЭМС, ДЭС и ЭИ) на прорастающие семена *Arabidopsis thaliana* в разные сроки после их замачивания показал, что наибольшее число мутаций возникает в потомстве семян,

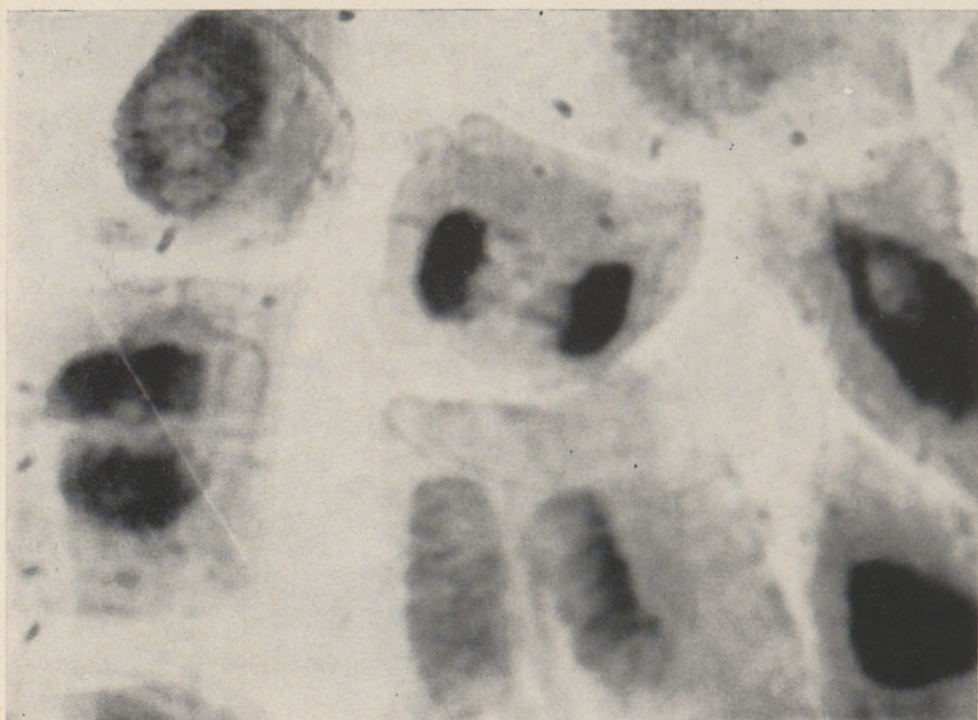


a

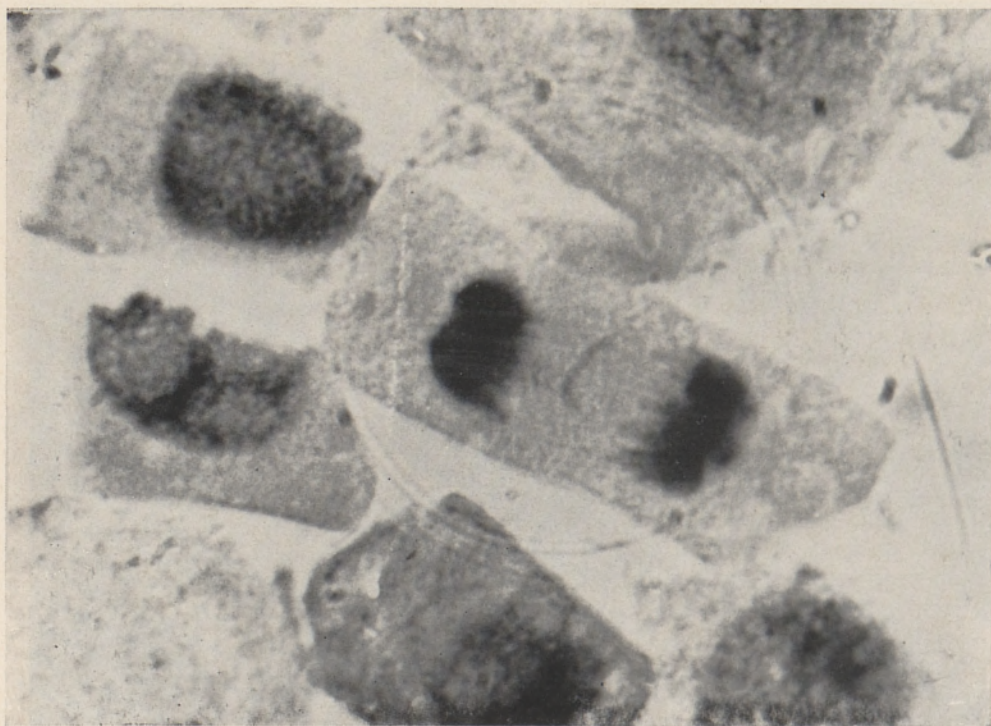


б

Рис. 2. Типы хромосомных перестроек в корневой меристеме пшеницы после обработки семян этиленимином: *a* — хромосомный мост, *б, в* — хромосомные фрагменты, *г* — отстающая хромосома (увел. 3000 \times).



8



2

Как показало авторрадиографическое определение сроков прохождения фаз клеточного цикла у ячменя, проведенное этими авторами, первое включение H^3 -тимидина в молекулы ДНК отмечалось через 16 ч от начала замачивания семян, что подтверждает предположение о связи повышения чувствительности прорастающих семян к мутагенам с наступлением фазы синтеза ДНК.

К. Микаэльсен (Mikaelsen, 1969) при действии на прорастающие семена ячменя ЭМС и ДЭС показал, что в зависимости от продолжительности замачивания семян перед обработкой чувствительность семян к мутагенам изменялась. Наименьшая частота хромосомных aberrаций и наивысшая частота хлорофильных мутаций наблюдались после 17 ч замачивания семян, что автор объясняет началом фазы S митотического цикла.

Л. Дубинина (1970 а, б) в своих исследованиях показала, что при обработке ЭИ семян *Crepis capillaris* максимальная мутабельность свойственна воздушно-сухим семенам. При обработке семян после 4-часового замачивания происходило некоторое снижение частоты мутаций, а после 5 ч замачивания количество мутаций резко уменьшалось. Через 15 ч набухания семян отмечен второй максимум мутабельности с последующим спадом.

Результаты вышеприведенных работ и наших исследований показывают явную зависимость эффективности обработки химическими мутагенами от метаболического состояния семян и указывают на возможность модифицирования таким путем мутабельности растений.

Можно предположить, что повышенная чувствительность прорастающих семян пшеницы к действию ЭИ, наблюдавшаяся в наших опытах через 12 и 16 ч после замачивания семян, обусловлена вступлением клеток зародыша в фазу синтеза ДНК. Однако полученные данные следует рассматривать как предварительные и более полное представление о характере действия ЭИ на сухие и набухающие семена пшеницы можно будет составить после анализа мутабельности растений в поколениях M_1 и M_2 , а также после проведения необходимых авторрадиографических исследований фаз клеточного цикла. Для более четкого выявления модифицирующего влияния температурного фактора необходимо проведение дополнительных опытов с более широким диапазоном температур во время обработки мутагеном.

Выводы

1. В зависимости от метаболического состояния семян пшеницы во время обработки ЭИ митотическая активность в меристеме корней проростков была различной: наибольшее цитотоксическое действие ЭИ оказал на воздушно-сухие, предварительно не замоченные семена.

2. Наибольшая частота хромосомных перестроек наблюдалась после обработки ЭИ воздушно-сухих семян и набухающих семян после 12 и 16 ч замачивания.

3. Среднее число клеток, находящихся в фазах митотического деления, при температуре $+3^\circ$ было несколько ниже, чем при температуре $+18^\circ$, что объясняется замедлением метаболических процессов при пониженной температуре. Однако общий ход кривых, отражающих частоту хромосомных aberrаций, был сходным при обеих температурах.

4. После воздействия ЭИ на семена, набухающие в течение 12 и 16 ч, среди хромосомных перестроек отмечалось значительное превышение числа хромосомных фрагментов над числом хромосомных мостов, в то время как в остальных вариантах опыта преобладающим типом перестроек были хромосомные мосты.

ЛИТЕРАТУРА

- Дубинина Л. Г., 1970а. Модифицирование мутагенного эффекта этиленimina и гамма-лучей при обработке семян в разных метаболических условиях при частичном анаэробнозе. Генетика 6 (7) : 61—72.
- Дубинина Л. Г., 1970б. Модифицирование мутагенного эффекта этиленimina и гамма-лучей в разных метаболических условиях при нормальном прорастании семян *Crepis capillaris*. Генетика 6 (8) : 35—53.
- Леманн Е., Айхеле Ф., 1936. Физиология прорастания семян. М.—Л.
- Камра Ом Р., Камра Сарожа К., Нилан Р. А., Конзак С. Ф., 1960. Radiation response of soaked barley seeds. Hereditas 46 : 152—170; 261—273.
- Latterell R. L., 1961. The influence of oxygen on radiosensitivity of maize chromosomes during seed germination. Radiation Res. 14 : 480—481.
- Mikaelsen K., 1969. Influence of mitotic stage on the effectiveness of mutagen treatments. Induced Mutations in Plants. Vienna : 245—249.
- Moutschen-Dahmen J., Moutschen-Dahmen M., Ehrenberg L., 1968. Note on the chromosome breaking activity of ethyleneoxide and ethyleneimine. Hereditas 60 : 267—269.
- Natarajan A., Shivasankar G., 1965. Studies on modification of mutation response of barley seeds to ethyl methanesulfonate. Z. indukt. Abstammungs- und Vererbungslehre 96 : 13—21.
- Röbbelen G., 1965. The effects of two endogenous factors on artificial mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*. Induction of Mutations and the Mutation Process. Prague : 42—45.
- Savin V., Swaminathan M., Sharma B., 1968. Enhancement of chemically-induced mutation frequency in barley through alteration in the duration of presoaking of seeds. Mutation Res. 6 : 101—107.
- Stadler L., 1928. Genetic effects of X-rays in maize. Proc. Nat. Acad. Sci. 14 : 69—75.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
4/VI 1971

TAMARA SNAIDER, OSKAR PRIILINN

ETÜLEENIMIINI TSÜTOGENEETILISE TOIME SÖLTUVUS NISUSEEMNETE
TÖÖTLEMISE TEMPERATUURIST JA NIISKUSEST

Resüme

Suvinisu 'Norröna' seemneid töödeldi 4 tunni jooksul etüleenimiini 0,01%-lise lahusega, kusjuures seemneid eelnevalt vees 0—32 tundi leotati, iga varianti 4 tundi eelmisest kauem. Leotamine ja mutageeniga töötlemine toimus kahel erineval temperatuuril: 3° ja 18°C. Pärast töötlemist pesti seemneid kraanivees 6 tundi ja idandati seejärel Petri tassides. Juureotsakestest valmistati ajutised preparaadid, mis fikseeriti atseetalkoholis 1:3 ja värviti atseetoortseiniiga. Määrati mitootiline aktiivsus juuremeristeemis ja kromosoommuutuste (sildade ja fragmentide) arv 100 ana- ja telofaasi kohta. Suurima tundlikkusega etüleenimiini suhtes olid õhukuivad ning 12 ja 16 tundi vees leotatud seemned. Mitootiline aktiivsus oli 3° juures mõnevõrra madalam kui 18° juures, kuid kromosoom-aberratsioonide sageduskõverate üldine kuju oli mõlemal juhul lähedane.

Arutletakse idanevate seemnete tundlikkuse muutumise võimalikke põhjusi.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Eksperimentaalbioloogia Instituut

Toimetusse saanud
4. VI 1971

TAMARA SHNAIDER, OSKAR PRIILINN

THE DEPENDENCE OF CYTOGENETICAL EFFECTS OF ETHYLENE IMINE ON
TEMPERATURE AND MOISTURE OF WHEAT SEEDS DURING TREATMENT

Summary

Dry seeds of the spring wheat variety 'Norrena' were soaked in water for various lengths of time (from 0 to 32 hours at 4-hour intervals) and treated with water solutions of 0.01 per cent ethylene imine for 4 hours. Treatments were given to these

seeds under two temperatures: $+3^{\circ}$ and $+18^{\circ}\text{C}$. After treatment the seeds were washed in running water for 6 hours and transferred to Petri dishes for germination. The root tips of the seedlings were fixed in absolute alcohol and acetic acid (3:1). The slides were prepared according to the acetic orcein squash technique. The effects of the treatment were studied by assessing mitotic activity and frequencies of chromosome aberrations (bridges and fragments) per 100 ana- and telophases of root meristematic cells. The data of experiments showed that dry seeds and seeds after 12 and 16 hours of pre-soaking were the most sensitive to mutagenic treatment. Mitotic activity of meristematic cells of root tip was a little higher at $+18^{\circ}$ than at $+3^{\circ}\text{C}$, but the yield of chromosomal aberrations was the same at both temperatures. The possible reasons of the wheat seed sensitivity alterations to ethylene imine are discussed.

*Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Experimental Biology*

Received
June 4, 1971