

ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ АКАДЕМИИ НАУК СССР

---

На правах рукописи

СЕЙТХОЖАЕВ АБИЛБАШАР ИДЬЯСОВИЧ

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЕПРОДУКЦИИ  
КЛЕТОК В КОРЕШКАХ ДИПЛОИДНОЙ И ТЕТРА-  
ПЛОИДНОЙ ГРЕЧИХИ

03.00.17. - Цитология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Ленинград

1973

ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ АКАДЕМИИ НАУК СССР

---

На правах рукописи

СЕЙТҶОЖАЕВ АБИЛБАШАР ИЛҶАСОВИЧ

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЕПРОДУКЦИИ  
КЛЕТОК В КОРЕШКАХ ДИПЛОИДНОЙ И ТЕТРА-  
ПЛОИДНОЙ ГРЕЧИХИ

03.00.17. - Цитология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Ленинград  
1973

Работа выполнена в Институте цитологии АН СССР

Диссертация изложена на 115 страницах машинописного текста, содержит 27 рисунков, 8 таблиц. Список литературы насчитывает 185 названий.

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор

А.А.ЗАВАРЗИН

кандидат биологических наук

Г.Ф.КРУПНОВА

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

В.Б.ИВАНОВ

кандидат биологических наук

Т.А.ШЕЙКИНА

Ведущее учреждение - Институт ботаники им. В.Л.Комарова  
АН СССР

Автореферат разослан "21" января 1974 г.

Защита состоится "29" марта 1974 г.

в 15<sup>00</sup> часов на заседании Совета Института цитологии  
АН СССР в помещении конференц-зала.

Адрес Института - Ленинград, 190121, пр. Маклина, 32.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института

Ученый секретарь совета

А.Г.БУЛЫЧЕВ

В изучении проблемы репродукции клеток большой интерес представляет вопрос о зависимости этого процесса от общего количества ДНК и наборов хромосом в геноме.

Удобными объектами для выяснения этого вопроса являются корешки растений одного вида, но отличающиеся по количеству наборов хромосом и, в частности, экспериментально выведенные сорта полиплоидных культурных растений. Имеющиеся в литературе данные по одной из внешних характеристик процессов репродукции клеток диплоидных и полиплоидных растений - временным параметрам митотических циклов и периода синтеза ДНК, показывают, что у разных растений наблюдается различное отношение между количеством ДНК и длительностью редупликации (Van't Hof, 1965; Тицу, 1965; Карповская, Беляева, 1973; Skult, 1969; Troy a. Wimber, 1968). В связи с этим одной из задач в разработке рассматриваемой проблемы является дальнейшее накопление сравнительного материала. В плане решения этой задачи в работе была поставлена цель сопоставить временные параметры митотического цикла и его отдельных периодов в клетках корешков проростков диплоидной и тетраплоидной гречих.

Полученные в результате такого сопоставления данные, наряду с другими известными характеристиками диплоидной и тетраплоидной гречих вызвали необходимость исследования особенностей репродукции клеток у изучаемых линий гречихи при воздействии какого-либо повреждающего фактора. В качестве такого фактора были выбраны рентгеновские лучи.

Данные о кинетике хромосомных перестроек в клетках облученных проростков диплоидной и тетраплоидной гречихи разноречивы: в одних опытах частота хромосомных перестроек у диплоидной и тетраплоидной гречихи почти совпадает,

а в других—она различна (Довженко, 1969, 1970). Этот вопрос особенно актуален и в практическом и в теоретическом плане в связи с широким использованием в народном хозяйстве полиплоидных организмов и интенсивным изучением репарационных процессов, происходящих в генетическом аппарате клеток. В связи с этим второй задачей настоящей работы было накопление фактического материала по выяснению особенностей репарации хромосомных повреждений в клетках диплоидной и тетраплоидной гречих.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования были корешки проростков следующих форм гречихи посевной (*Fagopyrum esculentum* Moench):

1. Диплоидная гречиха-2n - сорт Большевик - в геноме имеет 16 хромосом;

2. Аутотетраплоидная форма - 4n - имеет 32 хромосомы, экспериментально получена из диплоидного сорта Большевик с помощью колхицина (Сахаров, Фролова и Мансурова, 1944).

Соответственно задачам работы были поставлены опыты с корешками диплоидной и тетраплоидной гречихи для определения митотического индекса, динамики размножения клеток в корешках и для изучения кинетики хромосомных перестроек в зависимости от пострадиационного воздействия кофеина.

Во всех опытах семена ди- и тетраплоидной гречихи проращивали во влажных чашках Петри в темноте при температуре  $27^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Проростки выращивали отдельно для приготовления суспензии клеток, давленных тотальных препаратов и продольных срезов. Материал фиксировали смесями Навашина и Карнуа.

Изучение динамики размножения клеток в корешках про-

ростков ди- и тетраплоидной гречих проводили:

а) методом импульсной метки  $H^3$ -тимидином и анализа динамики изменения процента меченых митозов во времени (Quastler a. Sherman, 1959);

б) анализа увеличения индекса меченых ядер в условиях непрерывной инкубации корешков в  $H^3$ -тимидине - метод насыщения (Дондуа, Дондуа, 1964);

в) по скорости роста корней и скорости размножения клеток в них (Иванов, 1968).

Такой разносторонний методический подход позволил избежать недостатков и ограничений каждого из перечисленных приемов анализа процессов репродукции клеток. Для определения временных параметров митотического цикла по методу кривой меченых митозов поставлено 8 серий опытов. Из них 6 серий с проростками ди- и тетраплоидной гречихи с длиной корешков 0,4-0,5 см и 2 серии опытов на корешках 4-4,5 см. Корешки проростков инкубировались в  $H^3$ -тимидине (доза 2 мккюри/мл) в течении 30 минут, Материал фиксировали через 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 13 час.

В опытах с насыщением  $H^3$ -тимидином проростки непрерывно в течение 10 часов инкубировали в водном растворе этого предшественника (0,5 мкк/мл) с заменой раствора через каждые 2 часа. Фиксацию материала проводили через 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 и 10 часов.

Во всех опытах автографы приготавливались с использованием эмульсии М и Р (Москва, НИИХИМФОТОПРОЕКТ). Эмульсии наносились либо на высушенные обезпарафиненные срезы, либо на суспензию клеток или давленные препараты. Окраску автографов ацето-орсеином проводили до нанесения эмульсии (дав-

ленные препараты). Автографы срезов окрашивали гематоксилином Майера, а суспензии клеток-гематоксилином в 50% растворе пропионовой кислоты (Henderson a. Lu, 1968). На каждый анализируемый срок процент меченых митозов вычислялся на 50-100 митозов, а индекс меченых ядер на 500 клеток для каждого корешка.

Для определения средней продолжительности цикла по скорости роста корней и скорости размножения клеток в них экспериментально определяли скорость роста корня ( $V$ ), среднюю длину заканчивающих рост клеток ( $l_1$ ), размер меристемы ( $L_m$ ) в начале и в конце опыта, и среднюю длину меристематической клетки ( $l_m$ ). Т вычисляли по формуле:

$$T = \frac{ln 2 \cdot L_m l_1}{V \cdot l_m} \quad (I)$$

Пострадиационное действие кофеина (концентрация 0,005%) исследовалось как на клетках диплоидной, так и тетраплоидной гречихи в двух аспектах. С одной стороны определяли продолжительность периодов митотического цикла (методом кривой меченых митозов) у обеих изучаемых форм гречихи при облучении рентгеновыми лучами в дозе 300 р и пострадиационном воздействии кофеина, а также без облучения, применяя только кофеин. С другой стороны изучали кинетику хромосомных перестроек в клетках диплоидной и тетраплоидной гречихи в зависимости от пострадиационного воздействия кофеина. Соответственно этим двум аспектам были поставлены 2 основных серии опытов.

В первой серии исследовали: а) действие кофеина на митотический цикл; б) действие рентгеновских лучей на цикл; в) пострадиационное действие кофеина на цикл.

В опытах использовали корешки длиной 1,5-1,8 см обеих форм гречихи. Облучение проводили на аппарате РУМ-II-мод-

ность дозы 200 р/мин, фильтр  $Al$  -3 мл, 200 kV, 20 mA. В кофейне корешки инкубировались в течение двух часов. Во второй серии опытов, где изучалось кинетика хромосомных перестроек, индуцированных рентгеновскими лучами, материал фиксировали через каждые 2, 4, 6, 8, 10, 12 часов после воздействия рентгеновских лучей (контроль) и рентгеновских лучей и кофеина (опыт).

Для исследования кинетики хромосомных перестроек применялся анафазный анализ. На каждый вариант фиксации отбиралось по 10 корешков. Подсчитывали число анафазных клеток с хромосомными повреждениями и число повреждений на клетку (мостов и фрагментов). Результаты подсчетов обрабатывались по Стъуденту. В результате статистической обработки материала рассчитана средняя величина числа поврежденных клеток, числа повреждений на клетку и стандартная ошибка.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### I. Сопоставление длительности митотического цикла в корешках проростков диплоидной и тетраплоидной гречиши в норме, при воздействии рентгеновских лучей и кофеина.

#### а) Нормальные корешки.

Основные результаты по определению временных параметров митотического цикла по кривой меченых митозов на суспензиях клеток, давленных тотальных препаратах и на срезах корешков ди- и тетраплоидной гречиши представлены в табл. I (А).

Приведенные в таблице данные показывают, что в норме общая продолжительность клеточного цикла во всех вариантах опытов одинакова у ди- и тетраплоидной гречиши и занимает около 6-7 часов для субпопуляции клеток с коротким митотическим циклом. Для меченых  $H^3$ -тимидином клеток характерны



Таблица I

Продолжительность митотического цикла и его отдельных периодов (по методу Quastler а. Sherman, 1959) в корешках диплоидной и тетраплоидной гречих в норме и при воздействиях

Варианты опытов	2п		4п		8п		16п		32п		64п				
	T	% митотических митозов на максимуме	G <sub>1</sub> +I/2 M	S	G <sub>2</sub> +I/2 M	T	% митотических митозов на максимуме	G <sub>1</sub> +I/2 M	S	G <sub>2</sub> +I/2 M	T	% митотических митозов на максимуме			
А. Нормальные корешки:	6-7	69	I	2,5	3,5	6-7	55	I	3,0	3,7	6-7	53	I	2,8	3,7
а) суспензия клеток	-	70	-	3,0	3,5	-	53	I	2,8	3,7	-	53	I	2,8	3,7
б) давленные	-	70	-	3,0	3,5	-	53	I	2,8	3,7	-	53	I	2,8	3,7
в) срезы:															
1. эпидермис + экзодерма	6-7	60	I	2,2	4,0	6-7	53	I	2,5	3,9	6-7	53	I	2,5	3,9
2. кора	6-7	49	I	2,0	4,2	6-7	51	I	2,5	3,8	6-7	51	I	2,5	3,8
3. эндодерма	6-7	65	I	2,0	4,0	6-7	52	I	2,4	4,0	6-7	52	I	2,4	4,0

таблица I

I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	II
4. Центральный цилиндр	6-7	78	I	2,0	4,0	6-7	63	I	2,6	3,8
5. Зачаток боковых ко- решков	6-7	50	I	2,3	2,8	6-7	49	I	2,4	3,0
Б. Опыты с воздействи- ем кофеина и облуче- ния (давленные корешки)										
а) кофеин (0,005%)	-	63	-	5,1	3,9	-	55	-	5,2	3,5
б) облучение (300 p)	-	57	-	3,5	3,6	-	56	-	3,2	4,0
в) облучение (300 p) + кофеин (0,005%)	-	51	-	3,7	5,1	-	51	-	4,1	4,6

относительно продолжительный период  $G_2 + 1/2 M$  и короткие периоды  $S$  и  $G_1 + 1/2 M$ .

Особенностью представленных данных для диплоидной и для тетраплоидной гречи является отсутствие 100%-го уровня меченых митозов в период максимального их количества через 5 часов после инкубации в растворе  $H^3$ -тимидина.

Этот факт свидетельствует о том, что на протяжении всего эксперимента существовала фракция немеченых митозов. При чем относительное количество таких немеченых митозов в корешках тетраплоидной гречи достоверно больше, чем у диплоидов.

Для проверки реальности существования значительного процента немеченых митозов в период максимального вступления маркированных  $H^3$ -тимидином клеток в митоз была проведена более длительная экспозиция автографов на срезах клеток меристем корешков через 5 часов после инкубации в  $H^3$ -тимидине. В этих условиях при резком увеличении интенсивности метки над ядрами и митотическими фигурами не удалось наблюдать заметного увеличения процента меченых митозов.

Анализ хода кривых, характеризующих изменение процента меченых митозов во времени после однократной инкубации корешков в  $H^3$ -тимидине для пролиферирующих клеток разных тканей (эпидермис + экзодерма, кора, эндодерма и центральный цилиндр) меристемы корешков ди- и тетраплоидной гречи на срезах показал, что все они имеют сходный характер. Это свидетельствует, очевидно, об одинаковой продолжительности и структуре митотического цикла меченых  $H^3$ -тимидином клеток в разных тканях и в одинаковых тканях у диплоидных и тетраплоидных растений. Однако, при более детальном рассмотрении кривых меченых митозов обнаружены некоторые различия в отношении количества меченых митозов на

максимуме (через 5 часов после начала опыта) как между отдельными тканями у растений одной плоидности, так и в одинаковых тканях у ди- и тетраплоидной гречихи. Так, например, у диплоидной гречихи в клетках коры в период максимального количества меченых митозов уровень их не превышает 50%, в то время как в других тканях он доходит до 60-78%.

Высота первого пика меченых митозов во всех тканях меристемы тетраплоидной гречихи за исключением коры меньше чем в соответствующих тканях меристемы диплоидной гречихи. Интересно отметить, что как и у диплоидной гречихи максимальный уровень меченых митозов обнаружен в клетках центрального цилиндра, однако этот уровень на 15% ниже, чем у диплоидной гречихи.

Несколько иначе выглядит кривые изменения процента меченых митозов во времени при однократной инкубации в растворе изотопа для пролиферирующих клеток зачатков боковых корешков у ди- и у тетраплоидной гречихи.

Максимум меченых митозов здесь наблюдается не через 5 часов от начала опыта, как наблюдалось в клетках исследованных тканей меристемы корешков, а через 4 часа после инкубации в  $H^3$ -тимидине. Однако второй максимум меченых митозов приходится, по-видимому, не на II, а на IO часов, благодаря чему общая продолжительность митотического цикла также занимает около 6-7 час. В этих зачатках у диплоидов, как и у тетраплоидов содержится одинаковое и большое количество пролиферирующих клеток, не включающих  $H^3$ -тимидин при импульсной метке (около 50% немеченых митозов на максимуме).

Таким образом, более дифференцированный анализ изменения доли меченых митозов во времени, проведенный на ав-

тографах продольных срезов корней, дал результаты соответствующие усредненным результатам, полученным на суспензии клеток и давленных препаратах. Однако на автографах срезов корешков удалось выявить ряд интересных особенностей в ходе кривых меченых митозов, специфичных как для отдельных тканей корешков растений одной плоидности, так и между одинаковыми тканями меристем диплоидной и тетраплоидной гречи.

При определении средней продолжительности митотического цикла по скорости роста корней и скорости размножения клеток в них, оказалось, что за весь период опыта средняя скорость роста корней у диплоидной гречи была 0,93 мм/час в первом опыте и 0,89 мм/час - во втором опыте, а для тетраплоидной гречи соответственно 0,89 и 0,91 мм/час. При этом размер меристемы ( $L_m$ ) и средняя длина меристематических и закончивших рост клеток ( $l_m$  и  $l_1$ ) оказались одинаковыми у обеих форм гречи. Продолжительность митотического цикла, определяемая по этим показателям (формула I), была равна 6,0 и 6,6 часа для диплоидной и 6,2-6,6 часа - для тетраплоидной гречи.

На рис. I представлены результаты опытов по динамике прироста меченых ядер и изменению митотического индекса во времени при непрерывной инкубации корешков ди- и тетраплоидной гречи в растворе  $H^3$ -тимидина (0,5 мккюри/мл). Сопоставление данных по митотическому индексу показывает, что он одинаков (около 10-12%) у обеих форм гречи и держится примерно на одном уровне в течение опыта.<sup>х)</sup> Такое постоянство количества клеток в митозе свидетельствует, по-

---

х) Значение митотического индекса в этой серии опытов оказалось несколько выше, чем в опытах с импульсной меткой.

видимому, о том, что используемая нами доза  $H^3$ -тимидина (0,5 мккюри/мл) не оказывала существенного радиационного эффекта на процессы репродукции клеток.

Анализ хода кривых изменения индекса меченых ядер во времени для растущей части корня (меристемы) диплоидной гречихи (рис. 1, сплошная линия) показывает, что в интервале от 0,5 до 2-х часов после начала опыта происходит интенсивный прирост меченых ядер порядка 12% за час. Затем в период между 2-6 час скорость прироста меченых клеток уменьшается до 6,2% в час, а с 6 и до конца опыта падает до 3% в час. Кривая, отражающая скорость прироста меченых ядер у тетраплоидной гречихи (рис. 1, пунктирная линия), имеет сходный характер, хотя ее наклон несколько отличается в период от 1 до 2 часов и от 6 до 8 часов после инкубации корешков в  $H^3$ -тимидине. У обеих форм гречихи не наблюдается 100%-ного уровня мечения клеток при длительном присутствии предшественника синтеза ДНК ( $H^3$ -тимидина).

Средняя продолжительность митотического цикла, вычисленная по кривой насыщения (Дондуа, Дондуа, 1964) была равна для отрезка времени от 0,5 до 2 часов - 4,2 у диплоидной и 4,6 часов - у тетраплоидной гречих. Для отрезка времени от двух до шести часов значения длительности митотического цикла оказались значительно большими (13,4 часа - у диплоидной и 12,3 часа - у тетраплоидной гречихи).

Если усреднить полученные экспериментальные данные и определить длительность митотического цикла по разнице значений индекса меченых ядер через 0,5 и 6 часов, то его значения будут 9,5 час. для диплоидной и 9,8 час для тетраплоидной гречихи.

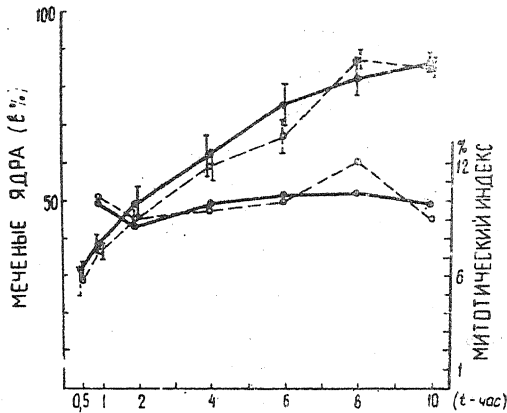


Рис. 1. Изменение процента меченых ядер во времени при непрерывной (в течение 10 час.) инкубации корешков в растворе  $H^3$ -тимидина (доза 0,5 мккюри/мл) у диплоидной и тетраплоидной гречихи. По оси абсцисс - время инкубации в  $H^3$ -тимидине (в час.), по оси ординат - слева количество меченых ядер (в %); справа - митотический индекс (в %). Сплошная линия - диплоидная, пунктирная - тетраплоидная гречиха.

Таким образом, сопоставление полученных тремя различными методами данных, характеризующих продолжительность митотического цикла пролиферирующих клеток у ди- и тетраплоидной гречихи, показало, что существенных отличий по этому показателю пролиферативной активности у рассматриваемых форм гречихи обнаружить не удалось. На основании этих данных можно сделать вывод о том, что у гречихи, как и у некоторых других растений (Vang a. Dodson, 1970; Skult, 1969; Troy a. Wimber, 1968), организменная полиплоидизация не вызывает изменения ни времени редупликации удвоенных геномов, ни увеличения длительности других процессов подготовки клеток к делению.

Наряду с этим некоторые различия во временных параметрах митотического цикла, полученные разными методами, свидетельствуют либо о сложном характере процессов репродукции клеток в меристеме корешков гречихи (гетерогенность популяции пролиферирующих клеток), либо об особенностях циркуляции экзогенного  $H^3$ -тимидина в растительных тканях.

б) Влияние облучения и кофеина на периоды  $G_2$  и  $S$  митотического цикла пролиферирующих клеток меристемы корешков проростков диплоидной и тетраплоидной гречих.

Поставлены три серии опытов по изучению действия рентгеновских лучей, кофеина и пострадиационного действия кофеина на продолжительность митотического цикла у изучаемых линий гречихи. На основании сделанных опытов были построены графики хода кривых меченых митозов, по которым были определены временные параметры премитотического периода и фазы синтеза ДНК в зависимости от действия указанных выше факторов. Эти величины представлены в табл. I (Б).

Анализ представленных данных показывает, что облучение в пролиферирующих клетках корешков у диплоидных и у тетраплоидных гречих вызывает незначительное увеличение длительности периодов  $G_2$  и  $S$ , у диплоидной гречихи снижается по сравнению с нормой значение первого максимума меченых митозов на 10-15%.

При воздействии кофеина длительность периода  $G_2$  клеток диплоидной и тетраплоидной гречих не изменяется по сравнению с нормой. Вместе с тем происходит почти двухкратное увеличение продолжительности периода  $S$  у обеих форм гречихи.

При совместном воздействии облучения и кофеина наб-



людается торможение обоих периодов цикла. Однако торможение периода  $G_2$  оказалось большим, чем при воздействии только облучения, а период  $S$  наоборот - меньшим, чем при воздействии одного кофеина. При этом в клетках тетраплоидной гречихи длительность периода  $S$  увеличивается больше, а периода  $G_2$  меньше, чем в клетках диплоидной гречихи.

Такой сложный характер суммарного действия исследуемых агентов на временные параметры исследованных периодов митотического цикла меристематических клеток корешков диплоидной и тетраплоидной гречих позволяет предположить наличие некоторых особенностей в их системах репарации ДНК. Проверке этого предположения и посвящена заключительная часть работы, в которой изучались особенности восстановления хромосомных перестроек в зависимости от пloidности изучаемых линий, индуцированных рентгеновскими лучами с помощью специфического ингибитора репарации - кофеина.

## 2. Сравнительное изучение частоты хромосомных перестроек, индуцированных рентгеновскими лучами в клетках меристемы корня диплоидной и тетраплоидной гречих.

Изучение хромосомных перестроек проведено на анафазных клетках первого митоза после облучения. При анализе повреждений учитывали клетки с мостами и фрагментами, подсчитывали их количество по отношению к неповрежденным клеткам и определяли число повреждений на 100 клеток.

Изменение во времени доли поврежденных клеток и частоты хромосомных перестроек на 100 клеток после облучения рентгеновскими лучами корешков ди- и тетраплоидной гречихи представлены на рис. 2.

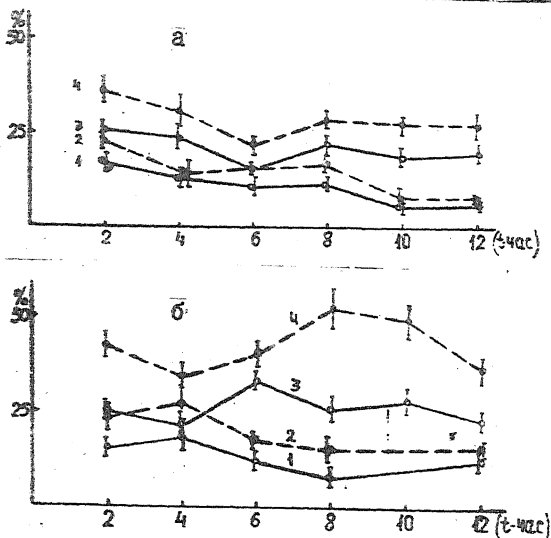


Рис. 2. - Изменение кинетики хромосомных повреждений при пострadiационной обработке кофеином корешков ди- и тетраплоидной гречихи.

а) диплоидная гречиха. 1 - % клеток с хромосомными повреждениями при облучении; 2 - число повреждений на 100 клеток при облучении; 3 - % клеток с хромосомными повреждениями при пострadiационной обработке кофеином; 4 - число повреждений на 100 клеток при пострadiационной обработке кофеином.

б) тетраплоидная гречиха. Обозначения те же, что на рис. "а".

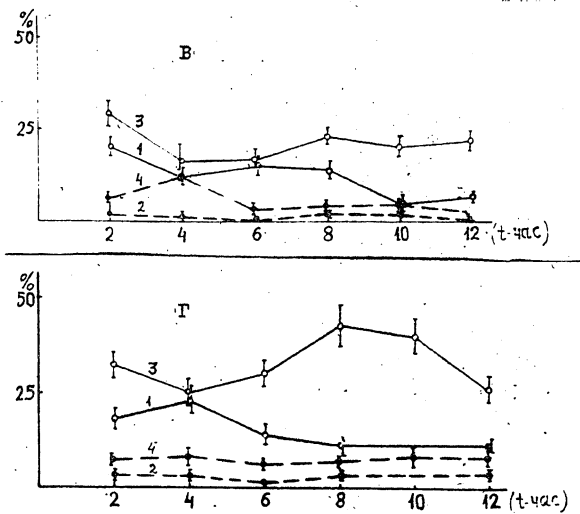


Рис. 2. ~~Изменение количества мостов и фрагментов во времени у диплоидной и тетраплоидной гречиши при пострadiaционной обработке кофеином.~~

в) диплоидная гречиша. 1 - % клеток с фрагментами при облучении; 2 - % клеток с мостами при облучении; 3 - % клеток с фрагментами при пострadiaционной обработке кофеином; 4 - % клеток с мостами при пострadiaционной обработке кофеином.

г) тетраплоидная гречиша. Обозначения те же, что на рис. "в".

По оси абсцисс на всех рисунках отложено время после облучения в часах, по оси ординат - процент поврежденных клеток и хромосом.

Как видно на рис. 2 (а-1, б-1), количество поврежденных клеток по мере удаления сроков фиксации от момента воздействия X-лучами, снижается. Почти аналогичные изменения во времени наблюдаются и в числе повреждений на клетку (рис. 2, а-2, б-2). Определение количества фрагментов и мостов отдельно для каждого срока фиксации показало, что фрагментов всегда больше, чем мостов.

При двухчасовой обработке кофеином облученных корешков ди- и тетраплоидной гречихи наблюдается увеличение общего количества клеток с перестройками (рис. 2, а-3, б-3) во всех сравниваемых сроках фиксации по сравнению с вариантами опыта, где применялось одно облучение. Наряду с нарастанием числа поврежденных клеток наблюдается значительное изменение частоты хромосомных повреждений на клетку (рис. 2, а-4, б-4), которое происходит в основном за счет увеличения числа хромосомных фрагментов (рис. 2, в и г), хотя количество мостов также повышается в клетках ди- и тетраплоидной гречихи. Необходимо отметить, что в клетках тетраплоидной гречихи хромосомные повреждения встречаются чаще, чем в клетках диплоидной гречихи (рис. 2, в-3,4; г-3,4).

Для того, чтобы сопоставить модифицирующее действие кофеина на индуцированные хромосомные повреждения в клетках диплоидной и тетраплоидной гречихи, мы рассчитали относительную величину этого действия на частоту хромосомных перестроек с учетом двухчасовой задержки в прохождении клеток по циклу.

Как было показано ранее, облучение с последующей обработкой кофеином увеличивало продолжительность периодов  $S$  и  $G_2$  в целом на 1,5-2 часа (табл. I).

В таблице 2 вычислена разница в действии кофеина в

клетках диплоидной и тетраплоидной гречихи по отношению к вариантам, где применялось только одно облучение.

Таблица 2

Разница в действии кофеина на частоту хромосомных повреждений в клетках диплоидной и тетраплоидной гречихи с учетом двухчасовой задержки в прохождении клеток по циклу

Сроки фиксации		2n		4n	
Облучение + кофеин	Облучение	% поврежденных клеток	Число повреждений на 100 клеток	% поврежденных клеток	Число повреждений на 100 клеток
4 час	2 часа	6,0	7,0	6,9	10,9
6 час	4 часа	1,5	6,7	14,5	13,1
8 час	6 час	9,7	11,9	13,8	32,7
10 час	8 час	5,9	8,5	20,0	34,0
12 час	10 час	13,7	17,9	-	-

Для этого из числа, отражающего процент клеток с хромосомными повреждениями в опытном варианте (облучение + кофеин), зафиксированных через 4 часа после воздействия, вычитали число клеток с абберациями, подсчитанное в контрольном варианте (только облучение), зафиксированном через 2 часа после облучения:

% хромосомных перестроек (облучение + кофеин, 4 часа)  
 - % хромосомных перестроек (облучение, 2 часа).

Высчитана разница как в отношении клеток с хромосомными повреждениями, так и числа повреждений на клетку. Если в первые сроки фиксации (4 часа) процент клеток с повреждениями при действии кофеина увеличивается в равной

мере у обеих форм гречихи, то по мере увеличения времени от момента воздействия появляется существенная разница между диплоидной и тетраплоидной гречихой, как в частоте хромосомных повреждений на клетку, так и в числе клеток с хромосомными повреждениями (табл. 2: фиксация через 8 и 10 часов). В клетках тетраплоидной гречихи пострадиационная обработка кофеином вызывает более существенное увеличение числа клеток с хромосомными повреждениями по сравнению с клетками диплоидной гречихи. Многочисленные опыты, в которых исследовалось действие кофеина на прокариоты и эукариоты свидетельствуют о специфичности действия кофеина на репарационные процессы, протекающие в клетках (Жестяников, 1973). В работе Ганасси, Аптикаевой и Заичкиной (1972) показано, что усиление действия кофеина возрастает с увеличением радиорезистентности растений (критерий - хромосомные перестройки), тогда как у растений с высоким выходом перестроек (радиочувствительные особи) влияние кофеина практически не проявляется. Авторы связывают вариабельность радиочувствительности растений с различиями пострадиационной репарации.

Вероятнее всего, данные, полученные в нашей работе, позволяют связать больший эффект в пострадиационном действии кофеина на частоту хромосомных перестроек в клетках тетраплоидной гречихи по сравнению с диплоидной с разным уровнем репарационных процессов в клетках изученных линий гречихи. Эти результаты хорошо коррелируют с данными, полученными Довженко (1970) на этих же линиях гречих по другому биологическому критерию, такому - как рост растений. Таким образом, сравнительное исследование кинетики хромосомных перестроек у линий гречихи, отличающихся по содержанию ДНК, в сочетании с применением

специфического ингибитора репарации кофеина, позволило выявить различия в уровне репарационных процессов у изучаемых форм гречихи и получить новые экспериментальные доказательства обратимости хромосомных повреждений, индуцированных рентгеновским облучением.

## ВЫВОДЫ

1. Анализ временных параметров митотического цикла по кривой меченых митозов на срезах, давленных препаратах и суспензии меристем корешков проростков диплоидной и тетраплоидной гречихи показал, что общая продолжительность цикла у обеих форм гречихи для быстро пролиферирующей популяции клеток одинакова и равна 6-7 час (при  $tG_2 - 3,5$ ,  $tS - 2,5$  и  $tG_1$  час). Продолжительность митотического цикла и соотношение длительности его отдельных периодов оказались одинаковыми в разных тканях меристемы у обеих форм гречихи. Незначительные особенности в структуре цикла обнаружены лишь в пролиферирующих клетках зачатков боковых корешков. Эти особенности идентичны у обеих форм гречихи. Структура цикла остается постоянной у корешков различного возраста и различных форм тетраплоидной гречихи.

2. Межтканевые особенности и отличия аналогичных тканей меристемы диплоидной и тетраплоидной гречихи в опытах с импульсной меткой  $H^3$ -тимидином проявляются лишь в соотношении меченых и немеченых пролиферирующих клеток. У тетраплоидной гречихи относительное количество немеченых  $H^3$ -тимидином клеток достоверно больше, чем у диплоидной. И у диплоидной, и у тетраплоидной гречихи в зачатках боковых корешков относительное количество немеченых пролиферирующих клеток больше, чем в других тканях меристемы.

3. Значительная гетерогенность популяции пролифери-

рующих клеток в меристеме корешков диплоидной и тетраплоидной гречих обнаружена при анализе параметров митотического цикла по кривой насыщения  $H^3$ -тимидином. При этом минимальная продолжительность митотического цикла у обеих форм гречихи - 4,2-4,6 ч., а максимальная - 12,3-13,4 часов. Пролиферативный пул меристемы корешков по данным опытов с насыщением  $H^3$ -тимидином в течение 10 часов оказался равным 36-87% у обеих форм гречихи.

4. Средняя продолжительность митотического цикла пролиферирующих клеток меристемы, вычисленная путем анализа скорости роста корней и скорости размножения клеток в них оказалась одинаковой у обеих форм гречихи и равной 6,3-6,4 часам.

5. Повышенные дозы  $H^3$ -тимидина (2 мккюри/мл) оказывают тормозящее влияние на митотическую активность и вступление клеток в период синтеза ДНК. Однако адаптация к действию этого агента у тетраплоидной гречихи выше, чем у диплоидной.

6. Кофеин увеличивает период синтеза ДНК митотического цикла у ди- и тетраплоидной гречихи.

7. Облучение корешков ди- и тетраплоидной гречихи  $x$ -лучами в дозе 300 р практически не изменяет продолжительность клеточного цикла; однако это воздействие приводит к выходу клеток с хромосомными повреждениями.

8. Обработка кофеином облученных клеток ди- и тетраплоидной гречихи вызывает удлинение как периода репликации ДНК, так и премитотического периода.

9. Кофеин повышает число хромосомных повреждений, индуцированных рентгеновским облучением в меристемных клетках корешков ди- и тетраплоидной гречих.

10. С увеличением хромосомного набора в геноме модифицирующий эффект кофеина нарастает, что по-видимому, свидетельствует о более мощной системе репарации в клетках тетраплоидной гречихи.



Материалы диссертации докладывались:

1. На расширенном заседании Научного совета по проблемам цитологии, посвященном некоторым вопросам цитологии растений. г. Ленинград, 1971 г.

2. На Научной конференции Института цитологии АН СССР, посвященной 15-летию Института. г. Ленинград, 1972 г.

3. На IV Международном биофизическом конгрессе. г. Москва, 1972 г.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

1. А.И.Сейтхожаев. "Исследование митотических циклов в первичных корешках у диплоидной и тетраплоидной гречихи." Цитология, XIII, № I, 62-68, 1971.

2. Г.Ф.Крупнова, Г.М.Логунова и А.И.Сейтхожаев. "Действие кофеина на хромосомные повреждения в облученных растительных клетках". Тезисы докл. Научной конференции Института цитологии АН СССР, посвященной 15-летию Института, Ленинград, 48-49, 1972.

3. В.Д.Жестяников, В.М.Михельсон, Г.Ф.Крупнова, Э.В.Айказян, А.И.Сейтхожаев, Е.Е.Семенова, Г.М.Логунова, Е.И.Гентер. "Репарация ДНК и обратимость лучевых повреждений хромосом". Тезисы секц. докл. IV Межд. биофизического конгресса. Москва, 206-207, 1972.

4. В.Д.Жестяников, В.М.Михельсон, Г.Ф.Крупнова, Р.И.Пинто, Э.В.Айказян, Е.Г.Семенова, Л.С.Баренфельд, А.И.Сейтхожаев, Г.М.Логунова, Ф.Л.Виханская, Л.П.Фальковская. "Действие кофеина на процессы репарации на молекулярном, субклеточном и клеточном уровнях". Радиаци-

тология-72. Оперативно-информационные материалы. Ленинград, 21, 1973.

5. А.И.Сейтхожаев. "Определение продолжительности митотических циклов клеток корешков диплоидной и тетраплоидной гречих". Цитология, XV, № 8, 991-994, 1973.