

Доклады Академии Наук СССР

1939. Том XXIII, № 5

ГЕНЕТИКА

Н. К. КОЛЬЦОВ, член-корреспондент Академии Наук СССР

К МЕТОДИКЕ ИСКУССТВЕННОГО ВЫЗЫВАНИЯ ПОЛИПЛОИДИИ КОЛХИЦИННОМ

После опубликованных в конце 1937 г. работ американских генетиков А. Ф. Блэксли и Б. Н. Нобеля повсюду развернулась интенсивная работа по искусственному получению полиплоидных растений путем воздействия колхицина. Колхицин—препарат дорогой, не везде его можно получить, и эту методику в 1938 г. использовали гораздо меньше, чем можно было рассчитывать по вызванному ей интересу, предложенная же взамен ее проф. А. А. Шмуком методика воздействия аценафтенонем не на всех видах растений дает удовлетворительные результаты.

Колхицин является очень сильным клеточным ядом. По Людфорду уже при концентрации колхицина 0.0001% культуры тканей позвоночных погибают. Между тем Блэксли предлагает для вызывания полиплоидии у растений употреблять 0.2—0.4% раствор. Правда ли, что между клетками позвоночных и цветковых растений существует столь большое различие по отношению к этому яду? Я решил проверить этот вопрос и в качестве объекта выбрал прорастающие семена вики, хромосомный комплекс которой так хорошо изучен И. Н. Свешниковой: здесь гаплоидное число хромосом 6, и большинство из них обнаруживает в метафазе ясную индивидуальность.

При воздействии растворов колхицина на семена вики нетрудно вызвать полиплоидию в корешках. При этом в большинстве случаев полиплоидия здесь возникает не в отдельных клетках или секторах, а захватывает все или почти все клетки прорастающего корешка. Вероятно действие колхицина—физико-химическое: проникая в протоплазму, он изменяет ее вязкость и препятствует возникновению веретена. Хромосомы периодически расщепляются на стадии поздней профазы внутри ядерной оболочки, после чего ядро успокаивается. Метафазы и анафазы, освобожденные от ядерной оболочки, на препаратах, зафиксированных без промывки от колхицина, имеют явно пикнотический вид, как это наблюдается и в животных тканях, но после отмывки колхицина можно наблюдать и нормальные метафазы и анафазы. В зависимости от длительности действия ядовитого раствора полиплоидия может достигать очень значительных размеров: нередко в сильно разрастающихся клетках с огромными ядрами можно наблюдать не только 8- и 16-кратное число хромосом, но также и 32- и даже 64-кратное. На моих препаратах есть клетки, в которых число хромосом значительно больше 1 000 (вероятно 256-плоиды). Но даже в последнем случае такая мультиполиплоидная клетка не является одиночной в препарате, а окружена такими же гигантскими клетками, только со спокой-

ными ядрами без ясных хромосом. Вообще, если в корешке имеются главным образом тетраплоидные клетки, то в том же препарате можно обычно найти и диплоиды и отдельные октоплоиды, а если большинство клеток 16-плоидные, то наряду с ними встречаются 8-плоидные и 32-плоидные.

На разрезах всех корешков, побывавших даже короткое время в относительно крепких растворах колхицина, наблюдаются ясные признаки отравления. Чехлик отмерших клеток на поверхности кончика корня и на вызываемом под действием колхицина вздутии корня иногда очень широк, может достигать 10 и более клеточных слоев, отстающих нередко без распада на отдельные клетки. Но и под чехликом несколько слоев поверхностных клеток меристемы также обнаруживают признаки отмирания, большинство их с разрушающимися ядрами; клеточные стенки обычно ненормально утолщены. В клетках меристемы часто также наблюдаются разрушающиеся и пикнотические ядра.

Я поставил своей задачей определить такие пограничные концентрации, при которых следы отравления колхицином были бы сведены к минимуму, но способность вызывать полиплоидию еще сохранилась бы. В мае 1938 г. были поставлены три серии опытов—А, В, С. Для первых двух серий были взяты растворы колхицина: 0.2—0.1—0.05—0.025—0.01—0.005%. Когда оказалось, что и в самом слабом из этих растворов появляются корешки стипичными для полиплоидов вздутиями (бульбами), была поставлена третья серия С, для которой взяты растворы 0.005—0.0025—0.0012—0.0006%. В сериях А и С в раствор колхицина помещались уже заранее пророщенные в воде зерна, в серии В—зерна не пророщенные. В каждом из растворов серии А и В зерна оставались от 1 до 12 суток, в серии С—от 3 до 9 суток. В общем получилось во всех трех сериях около 100 опытов, обработанных различными способами колхицином. В каждом из этих опытов было заложено по 15 зерен. По окончании каждого опыта проросшие зерна отмывались водой от колхицина в течение нескольких часов, после чего часть их высаживалась в горшки в землю, а 2—4 зерна фиксировались в жидкости Навашина, и из корешков готовились серии разрезов, которые окрашивались гематоксилином Гейденгайна или по Фейльгену. В общем таким образом было обработано и исследовано более 200 корешков.

При изучении разрезов обнаружилась прежде всего определенная разница между параллельными сериями А и В. Если в раствор колхицина закладывались уже проросшие в воде зерна, то среди них полиплоидов оказывалось больше, чем при закладке сухих семян в растворы той же крепости и на тот же срок (табл. 1). Во всей серии А из 83 исследован-

Таблица 1

	Диплоиды	Тетрапл.	Октопл.	Мультипл.	Всего	% полипл.	% мультипл.
Серия А	17	38	8	30	83	79.0	24.1
Серия В	50	21	9	12	92	45.6	13.0
Серия С	1	2	5	18	26	96.2	69.2

ных семян обнаружено по корешкам 66 полиплоидов (79%), а в серии В из 92 семян—42 полиплоида (45.6%). При воздействии на проросшие семена уже через 24 часа получается максимальный % полиплоидов, а при воздействии на семена не проросшие максимальный % полиплоидов получается только через 3 суток. В течение первых двух суток успевают возникнуть только первые степени полиплоидии (4 и 8), но через трое суток появляются уже мультиполиплоиды (16 и выше, табл. 2); процент последних при даль-

Таблица 2
Зависимость полиплоидии от времени воздействия по сериям А и С

	Диплоиды	Тетрапл.	Октопл.	Мультипл.	Всего	% полипл.	% мультипл.
1 сутки	2	10	1	0	13	84.6	0
2 суток	4	6	0	0	10	60.0	0
3 суток	2	11	5	8	26	92.3	30.8
4 суток	0	5	5	9	19	100	47.4
6 суток	1	4	0	5	10	90	50.0
9 суток	5	2	2	10	19	73.7	52.6
12 суток	4	2	0	6	12	66.6	50

нейшем воздействии постепенно повышается, доходя в некоторых случаях до 100.

Влияние концентрации колхицина показано в табл. 3, в которой объединены все опыты серии А и С, т. е. с воздействием на проросшие семена

Таблица 3
Зависимость полиплоидии от концентрации растворов при всех сроках воздействия
(Последние 4 ряда цифр относятся к серии С, в которой корешки фиксировались лишь после трехсуточного воздействия колхицина)

% колхицина	Диплоиды	Тетрапл.	Октопл.	Мультипл.	Всего	% полипл.	% мультипл.
0.2	5	5	1	0	11	54.6	0
0.1	2	7	1	4	14	88.7	28.5
0.05	6	5	0	2	13	53.8	15.4
0.025	0	11	1	8	20	100	40.0
0.01	4	4	2	0	10	60.0	0
0.005	0	6	3	6	15	100	40.0
0.005	0	0	1	6	7	100	85.7
0.0025	0	0	3	4	7	100	57.1
0.0012	0	0	0	6	6	100	100
0.0006	1	2	1	2	6	83.3	33.3

в течение разных сроков. Из этой таблицы видно, что сила воздействия колхицина мало изменяется при понижении концентрации в пределах от 0.2 до 0.0012 и даже до 0.0006%. В слабых растворах число корешков с нормальным хромосомным комплексом даже уменьшается, спускаясь иногда до 0, а процент мультиполиплоидов, наоборот, увеличивается. Впрочем я не придаю большого значения абсолютным числам измененных в разных опытах корешков, так как, с одной стороны, эти числа статистически недостаточны, а с другой, — выбор корешков для фиксации не был вполне случайным. Во многих случаях для фиксации отбирались преимущественно корешки уже с макроскопическими изменениями, а на посев оставлялись не измененные; это относится особенно к опытам серии С, которые должны были показать, что и в наиболее разведенных растворах колхицина возникают полиплоиды.

Описанные опыты доказывают, что для вызывания полиплоидии у вики нет необходимости применять крепкие растворы 0.2 или даже 0.4%, как это рекомендуют американцы для датуры и других растений, а можно употреблять растворы в 100 или даже в 200 и 400 раз более слабые. Чем раствор колхицина слабее, тем меньше его ядовитое действие на общее

состояние прорастающего зерна. Это выясняется не только из микроскопических разрезов корней, о чем говорилось выше, но и при посадке в землю семян, проросших в разных растворах колхицина.

Эта посадка в грунт прошла у меня в несколько неблагоприятных условиях, однако одинаковых для разных серий. Но ни одно из зерен, побывавших сутки или более в 0.2 или 0.1% растворах колхицина, не развилось в жизнеспособное растение. Из зерен, обработанных 0.05% раствором, проросли лишь немногие, преимущественно с диплоидными корешками. Начиная с 0.25% раствора колхицина прорастание высаженных семян приближается к нормальному, в особенности при кратковременном воздействии колхицина. Боковые корешки укоренившихся в грунт растений после воздействия растворами колхицина 0.025—0.0006% нередко содержат исключительно тетраплоидные клетки, но встречаются среди них и корешки с нормальными диплоидными клетками; клетки мультиплоидного типа здесь не попадались. Листья выросших в грунт растений по большей части имели устьица нормальной величины, но встречались и листья с очень большими устьицами, повидимому тетраплоидными и октоплоидными. Подробный анализ полученных растений и семян не входит в задачу настоящего сообщения.

Таким образом прорастающие семена вики оказываются почти столь же чувствительными к ядовитому действию высоких концентраций колхицина, как и ткани млекопитающих животных, а с другой стороны, слабые растворы колхицина (0.001% и ниже) вызывают полиплоидию в корешке вики столь же определенно, как и более крепкие растворы. При опускании молодых веточек вики в 0.001% колхицина в почках также были найдены многочисленные полиплоидные митозы.

Само собою разумеется, я не считаю возможным распространить эти выводы на другие объекты: для каждого растения должны быть определены минимальные концентрации колхицина, наименее токсичные и в то же время определенно вызывающие достаточно высокий процент тетраплоидии.

Институт экспериментальной биологии.
Академия Наук СССР.
Москва.

Поступило
31 III 1939.