

Mieczysław Rozmus, Maria Drewniak,
Andrzej Kornaś, Marian Kобрzyński, Józef Krawczyk

Promienioczułość linii wsobnych *Secale cereale* L. odmiana Rogalińskie w świetle badań cytologicznych

Streszczenie

Badania obejmowały 19 linii wsobnych *Secale cereale* L. odmiana Rogalińskie napromieniowanych szybkimi neutronami w dawce 500cGy (rad) oraz materiał kontrolny. Doprowadziły one do stwierdzenia, że badany materiał jest zróżnicowany w odniesieniu do promienioczułości. Przejawem tego jest różny odsetek skielkowanych ziarniaków tych linii oraz różna aktywność mitotyczna komórek merystematycznych wierzchołków wzrostu korzeni zarodkowych. Wyższe aniżeli w kontroli wartości współczynnika M/A+T dowodzą też hamowania rozpoczętych podziałów mitotycznych w niektórych komórkach w stadium metafazy.

Wstęp

Z licznych publikacji dotyczących indukowania mutacji mutagenami fizycznymi wynika, że neutrony zarówno szybkie jak i termiczne (określane jako promieniowanie gęstojonizujące) są skuteczniejszymi czynnikami indukującymi mutacje w komórkach embrionalnych ziarniaków w stanie spoczynku, w odróżnieniu od rzadko jonizującego promieniowania X (Gustafsson i MacKey 1948; MacKey 1951; Ehrenberg i Nybom 1954; Caldecott, Beard i Gardner 1954). Zdaniem tych autorów przeżywalność siewek wyrosłych z ziarniaków napromieniowanych neutronami była znacznie wyższa, aniżeli w przypadku traktowania promieniami X. Ponadto większa była również częstotliwość mutacji chromosomowych i genowych. Jednakże u roślin niższych, a w szczególności u grzybów (Kozhina 1973), zarówno promienie X, jak i szybkie neutrony indukują mutacje z tą samą częstotliwością. Wiadomo, że częstotliwość mutacji indukowanych promieniowaniem w dawkach niskich jest

niewielka. W dawkach wyższych jest większa, lecz w przypadkach takich, przy dużej promienioczułości komórek, uszkodzenia popromienne ziarniaków są tak duże, że prowadzą w wysokim procencie do zmian subletalnych lub letalnych (Lea 1946; Scholz 1957; Sohei 1962; Tsuchiya 1962; Dubinin 1961).

W toku niniejszej pracy podjęto badania nad określeniem promienioczułości komórek embrionalnych ziarniaków 19 linii wsobnych *Secale cereale* L. odmiana Rogalińskie pod działaniem szybkich neutronów w dawce 500cGy. Jako wskaźniki promienioczułości przyjęto procent skielkowanych ziarniaków oraz aktywność mitotyczną komórek merystematycznych wierzchołków wzrostu korzeni zarodkowych. Określenie stopnia promienioczułości jest sprawą istotną w hodowli mutacyjnej roślin, pozwala bowiem typować do napromieniowania materiał o pożądanej promienioczułości.

Material i metody

Materiał w postaci 3800 ziarniaków z 19 różnych, prowadzonych w chowie wsobnym, linii *Secale cereale* L. odmiana Rogalińskie otrzymano z Zakładu Doświadczalnego Akademii Rolniczej w Prusach koło Krakowa. Linie te zostały wyprowadzone przez prof. dr. hab. Tadeusza Ruebenbauera i udostępnione dla przeprowadzenia niniejszych badań.

Sto ziarniaków każdej linii napromieniowano szybkimi neutronami o energii 0,5–1 MeV dawką 500cGy (rad). Zabieg ten przeprowadzony został w Zakładzie Dozymetrii Instytutu Fizyki Jądrowej w Krakowie.

Ponieważ wiadomo, że u tego gatunku istnieje endogenna aktywność mitotyczna komórek merystematycznych, zgodna z porami roku na naszej szerokości geograficznej, kielkowanie ziarniaków prowadzono we wrześniu, w tym bowiem czasie aktywność mitotyczna komórek embrionalnych jest największa. Ponadto żyto, podobnie jak wiele innych gatunków roślin, cechuje endogenna rytmika dobowo mitoz, zgodna z dobowymi zmianami światła i ciemności, stąd też materiał do badań pobierano i utrwalano w godzinach południowych (12^{00} – 13^{00}); w tym bowiem czasie wartości indeksu mitotycznego u tego gatunku są najwyższe.

Napromieniowane ziarniaki każdej linii oraz materiał kontrolny wysiano na szalkach Petriego, na bibule filtracyjnej nasyconej wodą wodociągową i hodowano w termostacie w ciemności w temperaturze 20°C. Po trzech dniach obliczono ilość skielkowanych ziarniaków. Następnie całą hodowlę przeniesiono do światła i po 10 dniach ponownie obliczono liczbę skielkowanych ziarniaków. Stożki wzrostu korzeni do badań cytologicznych pobierano do fiolek z wodą, umieszczano je w lodówce na 24 godziny w temperaturze 0°C celem skrócenia chromosomów. Materiał utrwalano w uproszczonym utrwalaczu Carnoy'a (alkohol etylowy 96% i kwas octowy lodowaty w stosunku 3:1), a następnie przechowywano w alkoholu etylowym 70%. Dla wyróżnicowania jąder komórkowych i chromosomów stosowano cytochemiczną reakcję Feulgena. Z zabarwionych stożków wzrostu korzeni sporządzano preparaty rozgniotowe, odwadniano je alkoholem butylowym, przeprowadzano przez ksylen i zamykano w balsamie kanadyjskim. Analizy cytologiczne wykonano posługując się mikroskopem Amplival Zeissa.

Z uwagi na fakt, że pomiędzy poszczególnymi grupami materiału kontrolnego nie stwierdzono istotnej różnicy w odniesieniu do badanych parametrów, cały materiał kontrolny w tabeli zbiorczej potraktowano jako jedną grupę. W pracy tej prócz wyników badań własnych częściowo wykorzystano wyniki z prac magisterskich Krystyny Świerzy oraz Stefanii Wilusz.

Wyniki badań

Kiełkowanie ziarniaków

Po trzech dniach od chwili wysiania ziarniaków próby kontrolnej oraz poddanych działaniu szybkich neutronów, obliczono dla każdej z nich ilość skiełkowanych ziarniaków. W próbie kontrolnej skiełkowało 91,0% ziarniaków, podczas gdy w liniach napromieniowanych skiełkowała zdecydowanie mniejsza ich ilość. Wahala się ona w granicach od 36,0% do 68,0% (średnio 43,5%). Jak widać z tabeli 1, tylko w jednej linii stwierdzono stosunkowo wysoki odsetek skiełkowanych ziarniaków, wynoszący 68,0%. W trzech napromieniowanych liniach skiełkowało po około 50,0% ziarniaków, a w każdej z piętnastu pozostałych linii ilość skiełkowanych ziarniaków spadła poniżej 50,0%. Liczba skiełkowanych ziarniaków po dziesięciu dniach była stosunkowo wysoka, zarówno w materiale kontrolnym jak i napromieniowanym. Wynosiła ona dla kontroli 98,0%, zaś dla linii napromieniowanych wahala się od 75,0% do 92,0% (tabela 1). Z powyższego wynika, że badane linie żyta wykazują różny stopień wrażliwości w stosunku do stosowanej dawki napromieniowania. Zastosowana dawka napromieniowania 500cGy, spowodowała obniżenie ilości skiełkowanych ziarniaków, szczególnie widoczne to było po trzech dniach od założenia hodowli.

Cykl mitotyczny

W materiale kontrolnym, hodowanym w warunkach laboratoryjnych, aktywność mitotyczna merystemów wierzchołkowych korzeni była stosunkowo niska, wartość indeksu mitotycznego w tym materiale wynosiła 7,7 (tabela 2, fig. 1). W materiale traktowanym szybkimi neutronami aktywność mitotyczna w przeważającej większości (w 18 liniach) była niższa aniżeli w materiale kontrolnym. Najniższą wartość indeksu mitotycznego stwierdzono w linii 15x-73 (2,4%), zaś najwyższą (6,7%) w linii 15x-4. Jedynie w linii napromieniowanej x-16 wartość indeksu mitotycznego nieznacznie była wyższa od kontroli (7,9%). Wartość średnia indeksu mitotycznego dla tego materiału wynosiła 3,9%, a więc odchylenie w stosunku do kontroli wynosiło 3,7% (tabela 2, fig. 1).

Lp.	Symbol linii	Liczba ziarniaków	Procent ziarniaków skielkowanych po 3 dniach	Procent ziarniaków skielkowanych po 10 dniach
1	48/1356/152	100	39	81
2	36/1344/125	100	41	73
3	15x – 54	100	38	76
4	15x – 4	100	43	90
5	15x – 73	100	52	87
6	15x – 11	100	50	89
7	15x – 1	100	48	78
8	15x – 7	100	39	75
9	15x – 9	100	36	80
10	15x – 19	100	38	83
11	15x – 73	100	42	86
12	47/1355/15	100	39	87
13	63/1376/194	100	39	85
14	x – 1 – 4	100	36	92
15	x – 1 – 20	100	39	89
16	x – 16	100	68	92
17	x – 75	100	51	84
18	55/1368/135	100	42	85
19	37/1346/135	100	47	90
Razem		1900	43,5	84,2
Kontrola		1900	91	98

*Tabela 1. Frekwencja skielkowanych ziarniaków w napromieniowanych liniach wsobnych *Secale cereale* L. odmiana Rogalińskie*

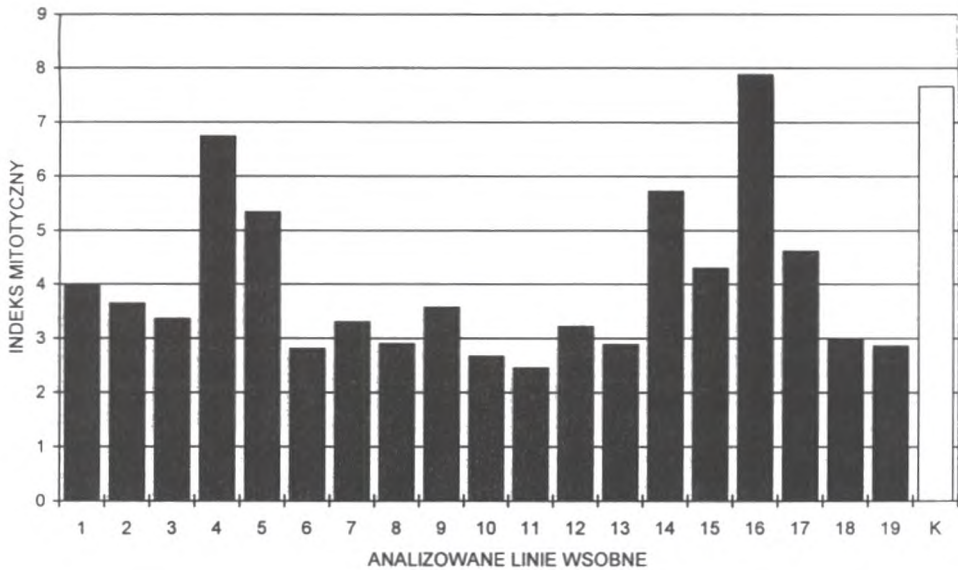


Fig. 1. Aktywność mitotyczna w stożkach wzrostu korzeni w napromieniowanych liniach wsobnych i kontroli *Secale cereale* L. odmiana Rogalińskie

Analiza przebiegu mitozy w materiale kontrolnym wykazała, że spośród dzielących się komórek najwyższy procent stanowiły komórki w stadium profazy (39,8%), zaś najniższy – komórki w stadium anafazy (11,5%). Procent komórek w metafazie (25,5%) był prawie równy procentowi komórek w telofazie (24,5%) (tabela 2). Stosunek liczby profaz do liczby metafaz, anafaz i telofaz miał się więc jak 3,5: 2,1: 1,0: 2,2. Natomiast stosunek metafaz do sumy anafaz i telofaz (M/A+T) określany jako współczynnik D'Amato wynosił w materiale kontrolnym 0,7 (tabela 2). W materiale traktowanym, podobnie jak w materiale kontrolnym, najwyższy procent wśród dzielących się komórek stanowiły komórki w profazie (66,0%), najniższy – komórki w anafazie (4,6%) i telofazie (7,8%). Komórki w stadium metafazy stanowiły 21,5% ogółu dzielących się komórek. Stosunek liczby profaz do liczby metafaz, anafaz i telofaz odbiegał tu wyraźnie od stosunku w materiale kontrolnym i miał się jak 3,0 : 1,0 : 0,2 : 0,3. Podobnie wartość średnia współczynnika D'Amato (M/A+T) wyraźnie odbiegała od takiego współczynnika w materiale kontrolnym i wynosiła 1,7 (tabela 2). Jedynie w linii 37/1346/135 wartość współczynnika D'Amato była zbliżona do wartości w materiale kontrolnym. Podkreślić należy, że pomiędzy napromieniowanymi liniami żyta, podobnie jak w przypadku wartości indeksu mitotycznego, wystąpiło także zróżnicowanie w odniesieniu do wartości współczynnika M/A+T i wahało się ono od 1,1 do 3,0 (tabela 2).

Widać stąd, że stosowana w toku niniejszych badań dawka szybkich neutronów wykazuje działanie mitostatyczne, co wyraża się spadkiem aktywności mitotycznej komórek mezytematycznych, a ponadto prowadzi do zahamowania podziałów w stadium metafazy.

Symbol linii	Ogólna liczba komórek	Liczba mitoz	Fazy mitozy				Indeks mitoty- czny	Współ- czynniki D'Amato
			profaza	metafaza	anafaza	telofaza		
1 48/1356/152	7500	297	239 80,5%	39 13,1%	7 2,3%	12 4,0%	4,0%	2,0
2 36/1344/125	7500	273	197 72,2%	56 20,5%	7 2,6	13 4,8%	3,6%	2,8
3 15x - 54	7500	252	192 76,2%	36 14,3%	10 4,0%	14 5,5%	3,7%	1,5
4 15x - 4	7500	506	343 67,8%	94 18,6%	29 5,7%	40 7,9%	6,7%	1,4
5 15x - 73	7500	401	292 72,8%	66 16,4%	18 4,5%	25 6,3%	5,3%	1,5
6 15x - 11	7500	211	172 81,5	24 11,4	5 2,4%	10 4,7%	2,8%	1,6
7 15x - 1	8000	264	163 61,7%	57 21,6%	20 7,6	24 9,1%	3,3%	1,3
8 15x - 7	8000	232	114 49,1%	70 30,2%	19 8,2%	29 12,5%	2,9%	1,4
9 15x - 9	8000	286	189 59,1%	88 30,8%	9 3,1%	20 7,0%	3,6%	3,0
10 15x - 19	8000	214	137 64,0%	56 26,2%	9 4,2%	12 5,6%	2,7%	2,9
11 15x - 73	8000	196	132 67,3%	40 20,4%	13 6,6%	11 5,6%	2,4%	1,7
12 47/1355/15	7500	242	170 70,2%	52 21,5%	4 1,6%	16 6,6%	3,2%	2,6
13 63/1376/194	7500	217	157 72,3%	44 20,3%	4 1,8%	12 5,5%	2,9%	2,7
14 x - 1 - 4	7500	430	250 58,1%	120 27,9%	20 4,6%	40 9,3%	5,7%	2,0
15 x - 1 - 20	7500	323	213 65,9%	81 25,1	11 3,4%	18 5,6%	4,3%	2,8
16 x - 16	7500	591	341 57,7%	132 22,3%	53 9,0%	69 11,0%	7,9%	1,1
17 x - 75	7500	347	220 63,4%	82 23,6%	13 3,7%	32 9,2%	4,6%	1,8
18 55/1368/135	7500	222	120 54,0%	72 32,4%	9 4,0%	21 9,4%	3,0%	2,4
19 37/1346/135	7500	215	156 72,5%	23 10,7%	5 2,3%	31 14,4%	2,9%	0,6
Razem lub średnia	145000	5719	3777 66,0	1232 21,5%	265 4,6%	445 7,8%	3,9%	1,7
Kontrola	145000	11131	4427 39,8%	2730 24,5%	1241 11,5%	2733 24,5%	7,7%	0,7

Tabela 2. Przebieg mitozy w stożkach wzrostu korzeni w napromieniowanych liniach wsobnych i kontroli *Secale cereale* L. odmiana Rogalińskie

Dyskusja

Przeprowadzone wyniki badań doprowadziły do stwierdzenia daleko posuniętego zróżnicowania badanych linii w odniesieniu do stopnia ich promienioczułości. Fakt, że nasiona różnych gatunków roślin wykazują różną promienioczułość znany jest już dość dawno (Lea 1946; Dubinin 1961; MacKey 1954 i wielu in.), natomiast istnienie zmienności w zakresie promienioczułości w odniesieniu do różnych linii tego samego gatunku nie było dotąd szczegółowo badane.

Czynnikiem decydującym w reakcji komórek na promieniowanie jest jego dawka oraz stan fizjologiczny komórki (Fritz-Niggli 1965). Ekspozycja dużymi dawkami prowadzi do zmian letalnych komórek. Stosowanie dawek niższych prowadzi do zmian letalnych tylko w niektórych komórkach, w pozostałych natomiast następuje częściowe lub całkowite hamowanie podziałów mitotycznych (Carlson 1954; Lea 1946; Rustad 1964; Ruebenbauer i Rozmus 1965; Sinclair 1968). Dodać należy, że dawki napromienienia prowadzące do zahamowania podziałów mitotycznych lub opóźniające podział są różne dla różnych organizmów. Dawka 500cGy stosowana w toku niniejszych badań prowadziła do obniżenia odsetka skielkowanych ziarniaków tak, że wahał się ona u różnych linii w granicach od 36% do 68% oraz do obniżenia aktywności mitotycznej, czego dowodzą niskie wartości indeksów mitotycznych oraz działała hamująco na cykl mitotyczny komórek, prowadząc do wydłużenia czasu jego trwania. Znacznie wyższe aniżeli w kontroli wartości współczynnika $M/A+T$ dowodzą, że proces hamowania ma miejsce głównie w stadium metafazy. W stosunku do omawianych wskaźników promienioczułości badane linie cechowało duże zróżnicowanie. Biorąc pod uwagę takie fakty, jak ten sam stan fizjologiczny ziarniaków wszystkich linii, identyczny czas ekspozycji i dawkę napromienienia, ten sam termin siewu oraz utrwalania materiałów, wydaje się, że tak znaczne zróżnicowanie odnośnie promienioczułości ma podłoże genetyczne.

Zdaniem wielu autorów (Sinclair 1968, Rostad 1970 i inni) promienioczułość komórek jest największa w okresie poprzedzającym ich podział, a w szczególności w fazach G_1 i S okresu intermitotycznego. Stosunkowo duża promienioczułość w większości badanych prób była być może związana z tym, że komórki eksponowanych ziarniaków były w okresie poprzedzającym podział mitotyczny. Jednakże w toku niniejszej pracy nie prowadzono badań pozwalających ustalić w jakich fazach okresu intermitotycznego znajdowały się poszczególne komórki.

W literaturze naukowej przedstawiono interesujące poglądy tłumaczące procesy hamowania podziałów komórkowych pod wpływem promieniowania, zwłaszcza promieni X oraz promieniowania UV. Zdaniem Van't Hofa i Kovacs (1970), którzy pracowali na materiale roślinnym, powodem opóźniania podziałów mitotycznych w merystemach wierzchołkowych korzeni *Pisum sativum* były zaburzenia syntezy białek, wywołane napromienieniem komórek w fazie G_1 . Za koncepcją utrzymującą, iż promieniowanie to jest inhibitorem syntezy białek podziałowych przemawiają też dane uzyskane przez innych autorów (Bacchetti i Sinclair 1970; Rustad 1970). Być może, że stwierdzony w toku niniejszej pracy proces hamowania podziałów mitotycznych był również wynikiem zaburzeń procesów syntezy białek podziałowych.

Literatura

- Bacchetti S., Sinclair W.K. (1970), *The relation of protein synthesis to radiation-induced division delay in Chinese hamster cells*, Radiat. Res. 44: 788–806
- Caldecott R.S., Beard B.H., Gardner C. (1954), *Cytogenetic effects of X-ray and thermal neutron irradiation on seeds of barley*, Genetics 39: 240–259
- Carlson J.G. (1954), *Immediate effects on division, morphology and viability of the cell*. Radiation biology, New York: 763–824
- Dubinin N. (1961), *Problemy radiacjonnej gienetiki*. Gosatomizdat, Moskwa
- Ehrenberg L. and Nybom N. (1954), *Ion density and biological effectiveness of radiation*. Acta Agr. Scand. 4: 396–418
- Fritz-Niggli H. (1965), *Radiobiologia*, PWN, Warszawa
- Gustafsson A., MacKey J. (1948), *The genetical effects of mustard gas substances and neutrons*, Hereditas 34: 421–446
- Kozhina T.N. (1973), *On the specificity of the mutagenic action of fast neutrons*, Genetica IX/1: 168–170
- Lea D.E. (1946), *Actions of radiations on living cells*, Cambridge Univ. Press, New York
- MacKey J. (1951), *Neutron and X-ray experiments in barley*, Hereditas 37: 421–446
- MacKey J. (1954), *Neutron and X-ray experiments in wheat and a revision of the speltoid problem*. Hereditas 40: 65–180
- Mitchison J.M. (1971), *The biology of the cell cycle*, Cambridge Univ. Press
- Ruebenbauer T., Rozmus M. (1965), *Badania nad zmianami kariologicznymi u Hordeum sativum*. *Jess. odmiana Valticky wywołanymi działaniem promieni gamma*, HRA i N 9: 339–352
- Rustad R.C. (1970), *Variations in the sensitivity to X-ray-induced mitotic delay during the cell division cycle sea urchin egg*, Radiat. Res. 42: 498–512
- Scholz F. (1957), *Mutationsversuche an Kulturpflanzen*, Zeitschrift für Pflanzenzucht. 2: 181–220; 3: 225–274
- Sinclair W.K. (1968), *Cyclic X-ray response in mammalian cells in vitro*, Radiat. Res. 33: 620–643
- Sohei K. (1952), *A note on biophysical aspect of radiation biology*, Gamma Field Symposia 1: 1–77
- Tsuchiya T. (1962), *Radiation breeding in two-rowed barley*, Seiken Ziholl 4: 21–34
- Van't Hof J., Kovacs C.J. (1970), *Mitotic delay in two biochemically different G₁ cell populations in cultured roots of pea (Pisum sativum)*, Radiat. Res. 44: 700–712