

Гамма-гексахлорциклогексан в качестве полиплоидогенного вещества

ЗДЕНЕК ЛАНДА

Отделение генетики кафедры физиологии растений, микробиологии и генетики биологического факультета Карлова университета, Прага

Поступила в редакцию 5. 1. 1959

Souhrn

Jedním z hlavních momentů šlechtitelského využití polyploidie je otázka polyploidizačních agens a metod jejich aplikace. Kromě nejužívanějšího alkaloidu kolchicinu je známa řada látek téhož účinku, z nichž některé mají dokonce ekonomické přednosti ve srovnání s kolchicinem, jsou však méně intensivně studovány. Cílem této práce bylo ověřit údaje o polyploidizační aktivitě γ -hexachlorcyklohexanu, stanovit jednoduchou metodu jeho aplikace, zjistit šíři jeho působení a vyjasnit možnosti záměny kolchicinové techniky snáze dostupnou metodou aplikace γ -HCH. Metoda, která vyplynula z orientačních pokusů na cibuli a salátu, byla v dalším aplikována na druhy a odrůdy řady rostlin (viz seznam). Pokusy byla potvrzena polyploidizační aktivita γ -HCH. Perspektivnost použité modifikace výsevu semen do vlhkého filmu γ -HCH byla stanovena pro druhy *Linum usitatissimum*, *Viola tricolor maxima* a *Lactuca sativa*. Pro širší využití agens je třeba vypracovat příslušné modifikace. Zdá se, že bude možno užívat v cytologické technice místo kolchicinového pretreatment γ -HCH. V práci se pokračuje.

Резюме

Из методов, которые вызывают полиплоидию у растений, и которые являются одним из основных моментов ее селекционного использования, имеют прежде всего значение методы химические, в частности ряд модификаций, основанных на применении колхицина. Кроме колхицина известен ряд веществ, вызывающих полиплоидию. Некоторые из них имеют даже экономические преимущества по сравнению с колхицином, однако, их менее интенсивно изучают. Целью предлагаемой работы ориен-

тировочного характера ставилась проверка данных о полиплоидогенной активности гамма-гексахлорциклогексана (γ -ГХЦГ), установление простого метода его применения, систематического диапазона его действия и выяснение возможности замена колхицинового метода легче доступным применением γ -ГХЦГ. Предварительные опыты ставились на луковичах *Allium cepa* и на семенах *Lactuca sativa* с применением растворов агента в метаноле, этаноле и в воде. Вытекающий из них метод посева семян во влажный фильм γ -ГХЦГ применен в дальнейшем в серии опытов к семенному материалу ряда видов и сортов преимущественно культурных растений. Наблюдениями за габитусом роста и цитологическими отношениями подтверждена активность агента в вызывании полиплоидии. Перспективность использования примененного метода выявлена для видов *Lactuca sativa* L., *Viola tricolor maxima*, *Linum usitatissimum* L. Для более широкого использования агента следует выработать соответствующие модификации. Указано также на возможность использования γ -ГХЦГ в цитологической технике в качестве претритмента (pretreatment). Работа продолжается в намеченных направлениях.

Введение

В последние годы уделяется у нас также должное внимание явлению полиплоидии, проблематика которого в той или другой степени затрагивает ряд ботанических, зоологических и микробиологических дисциплин, и также смежных наук. Хотя и число работ, имеющих отношение к явлению полиплоидии, достигает в настоящее время уже многих тысяч (ср. EIGSTI 1947), все же остается ряд полностью не решенных проблем, для конкретизации которых, однако, требовалось бы специального обзора.

Возможности селекционного использования явления полиплоидии зависят от трех основных моментов: от характера исходного материала для полиплоидной селекции, от эффективности применяемых методов вызывания полиплоидии и от эффективности приемов селекции на полиплоидной базе. Из ряда известных методов, которыми вызывают полиплоидию, наиболее широко используются химические методы, основанные, в частности, на применении колхицина. Имеется, однако, целый ряд веществ, обладающих не менее выраженной активностью вызывать полиплоидию у растений (EIGSTI 1947, Шмук 1951), которые своей доступностью имеют даже преимущество по сравнению с колхицином. Однако, методы их использования разрабатываются гораздо менее интенсивно.

В литературе имеются указания на полиплоидогенную активность ГХЦГ и некоторых его изомеров, в частности, γ -изомера (NYBOM и KNUTSSON 1947, цит. по HAMEL 1947, KOSTOFF 1948, Рамануджам и ПАРТХАСАРАТХИ 1956, RAO и KUNDU 1949, цит. по Р. В. А., ШТУББЕ 1958).

Целью предлагаемой работы являлась проверка этих указаний. Своей задачей мы ставили установление простого метода применения агента, выяснение систематического диапазона его действия и также выяснение возможности замена колхицинового метода легче доступным применением γ -ГХЦГ.

Предварительные опыты

Предварительные опыты ставились на луковичах *Allium cepa* и на семенах *Lactuca sativa* „Mělnický král máje“ (сорт Мелницкий король мая). В опытах использованы насыщенные при комнатной температуре растворы γ -ГХЦГ в метаноле и этаноле, разбавленные водой до концентраций: 0,01%; 0,05%; 0,1%; 0,5%; 1%; 1,5%; 2%. Далее использованы насыщенные при той же температуре растворы γ -ГХЦГ в воде в 3 модификациях — в случае *Allium cepa*: насыщенный раствор, насыщенный раствор с пленкой γ -ГХЦГ на поверхности, насыщенный раствор с пленкой и избытком агента на дне; в случае *Lactuca sativa*: насыщенный раствор, насыщенный раствор + опудривание семян агентом, насыщенный при температуре кипения раствор. Контролями служили культуры в воде и в метаноле и в этаноле, разбавленных до тех же концентраций как и в опытной серии. На положительный эффект воздействия γ -ГХЦГ судили по типичному с-туморному характеру роста, т. е. по появлению ланцетообразных утолщений корешков *Allium cepa* L. и задержке роста и утолщению ростков *Lactuca sativa* L. В случаях алкогольных растворов наиболее сильно выражен эффект в концентрации 0,1—1,5%. Однако, реакция на воздействие агентом резко выражена во 2-ой и 3-ей вариантах водных растворов как у *Allium cepa* L. так и у *Lactuca sativa* L. Из результатов предварительных опытов вытекало, что наиболее удачной является модификация с применением водного раствора, в частности, насыщенного при повышенной температуре. Целью дальнейших опытов являлось, следовательно, применение этой модификации к семенному материалу ряда видов и сортов, и выявление таким образом систематического диапазона действия γ -ГХЦГ и возможности использования ее в качестве метода получения полиплоидных растений.

Материал и методика опытов

В качестве подопытного материала использованы нами следующие виды и сорта растений: *Antirrhinum maius* L., *Dianthus barbatus* L., *Helianthus annuus* L., *Helichrysum monstrosum*, *Lactuca sativa* L. (сорта: Americký hnědý, Batavia, называемый также Blonde de Paris, Black Seeded Sipson, Bóters Treib, Maikönig Freiland, Mělnický král máje I, II (двух провениенций), Troitzkopf Brauner), *L. perennis* L., *L. saligena* L., *L. serriola* TORR., *L. virosa* L., *Lathyrus articulatus* BRIQ., *L. clymenum* L., *L. odoratus* L. (смесь гибридов), *L. sativus* L. (типы: «пиперский», «съемобный из СССР», «кормовой из СССР»), *Lycopersicum esculentum* MILL. сорта: Červené drobné, Hanácké rané, Ostravské nízké, Průhonický Universal, Vrbičanské nízké, Zlatá královna, Žluté drobné, *Linum usitatissimum* L., сорт: Novum, *Melandrium album* GARCKE, *Pisum sativum* L., сорт Heinrichův raný, *Solanum* sect. *Tuberarium* виды: *S. Antipoviczi* I, II, III, *S. boergeri* BUK., *S. chacoense*, *S. commersoni* DUN., *S. demissum* LINDL., *S. etuberosum* LINDL., *S. gibberulosum* BUK., *S. lapaticum* BUK., *S. longipedicellatum* BUK., *S. schicki* JUZ. et BUK., *S. schreiteri* BUK., *S. tlaxcalense* HAWK., *S. tuberosum* L., авtogамия сорта Nowa Huta, *S. vernei* BITT. et WITTM., *Trifolium pratense* L., сорт Přerovský, *Viola tricolor maxima* сорта Berna и Záře Alp, *Vicia calcarata*, *V. cornigera*, *V. ervilia* WILB., *V. hybrida* L., *V. lathyroides* L., *V. ludoviciana*, *V. lutea* L., *Zea mays* L. — ряд сортов и гибридов.

Препарат γ -ГХЦГ (99—100%) получен из Энтомологической лаборатории ЧСАН.

На основании предварительных опытов применена нами следующая методика: около 0,25 гр. γ -ГХЦГ заливают $\frac{1}{2}$ л. воды, доводят до кипения, кипятят в течение 3—5 мин., затем раствор охлаждают, начинающий едва мутнеть вливают на фильтровальную бумагу в чашки Петри и оставляют на ночь. Утром устраняют избыточный раствор и в образовавшийся на бумаге фильм γ -ГХЦГ высевают семена. Время воздействия до нескольких дней.

Опыты ставились в 3 повторениях. Оценка полиплоидогенного действия γ -ГХЦГ проводилась наблюдением за с-эффектом роста (задержка, утолщение ростка, укорочение корней, вздутие их кончиков) и цитологическая проверка с-эффекта быстрыми цитологическими методами: нигрозиновым и ацетокарминовым (Ниву и Разовкова 1952, Разовкова и Разовек 1955). Этот способ выявления полиплоидогенной активности испытуемых веществ общепринят (ср. Шмук 1951).

Сводка результатов и обсуждение

Результаты опытов сведены в таблицу (табл. 1).

Табл. 1. Реакция видового материала на действие γ -ГХЦГ

Виды	Цитологический с-эффект	С-эффект габитуса	Пригодность исп. метода
<i>Antirrhinum majus</i>	+	++	—
<i>Dianthus barbatus</i>	+	+	—
<i>Helichrysum monstrosum</i>	+	—	—
<i>Helianthus annuus</i>	+	—	—
<i>Lactuca sativa</i>	+	++	+
<i>Lactuca</i> spp.	+	++	+
<i>Lathyrus odoratus</i>	+	+	—
<i>Lycopersicum esculentum</i>	+	+	—
<i>Linum usitatissimum</i>	+	++	+
<i>Melandrium album</i>	+	+	—
<i>Pisum sativum</i>	+	—	—
<i>Solanum</i> sect. <i>Tuberarium</i> spp.	+	+	—
<i>Viola tricolor maxima</i>	+	++	+
<i>Vicia</i> spp.	+	+	—
<i>Zea mays</i>	+	++	—
<i>Trifolium pratense</i>	+	+	—

Примечания к таблице 1 ст. 2: знаком + обозначены случаи с-митоза

ст. 3: знаком ++ обозначены случаи типичной реакции ростков или корешков, знаком + обозначено заметное проявление типичной реакции

ст. 4: пригодность метода оценивалась по хорошо выраженному с-эффекту ростков, не сопровождаемому повреждением корешка.

Следовательно, реакция на воздействие γ -ГХЦГ, оцениваемая по типу роста ростков, у разных видов различия. Во всех случаях, где мы имели дело с разными сортами, наблюдалась различная реакция. Действие γ -ГХЦГ вызывает типичные для полиплоидогенных веществ цитологи-

ческие реакции (резкое нарушение хода митоза, подавление веретена, разная степень полиплоидии, нарушения распределения хромосом). Детальный цитологический анализ действия γ -ГХЦГ, однако, не входил в задачи данной работы и ему будет посвящена отдельная работа. Следует все же отметить, что цитологические картины, наблюдавшиеся после воздействия агентом, дают основание для его применения в цитологической технике в качестве претритмента (pretreatment).

В связи с продолжающейся работой по использованию γ -ГХЦГ в качестве полиплоидогенного вещества следует обратить внимание на ряд вопросов. Прежде всего следует изучить характер распределения полиплоидных тканей в получаемых после воздействия миксоплоидных растениях и выяснить постоянность вызванной полиплоидии. Далее следует обратить внимание на подробное выяснение цитологической реакции всех изомеров ГХЦГ, что интересно в связи с теорией полиплоидогенного действия, на вопрос цитологического и физиологического действия в практике сельского хозяйства применяемых доз агента. В литературе также подробно не выяснены конкретные причины различий в реакции отдельных видов и сортов. Актуальным является также вопрос селективной стимуляции развития полиплоидных тканей. Работа продолжается в намеченных нами направлениях.

Выражаю искреннюю благодарность проф. др-у. К. Грубому и д-ру З. Пазоурковой за оказанную в течение работы помощь ценными советами.

Литература

- РАМАНУДЖАМ, С., ПАРТХАСАРАТХИ, Н.: Автополиплоидия. — Сб. «Полиплоидия», Москва, стр. 95—129, 1956.
- ШМУК, А. А.: Исследования по биологической и агрономической химии. — Москва, 1951.
- ШТУВВЕ, Г.: Состояние и развитие исследований по генетике в Германской демократической республике. — Бот. ж. АН СССР **43** : 1363—1377, 1958.
- EIGST, O.: Colchicine bibliography. [Библиография колхицина.] — *Lloydia* **10** : 65—114, 1947.
- HAMEL, J. L.: [Реферат работы Найбома и Кнутссона, цит. ниже.] — *L'Année biologique* **11—12** : 317—318, 1947.
- HRUBÝ, K., PAZOURKOVÁ, Z.: *Základy mikroskopické techniky*. [Основы микроскопической техники.] — Praha, 1952.
- KOSTOFF, R.: Atypical growth, abnormal mitosis, polyploidy and chromosome fragmentation induced by hexachloreyclohexane. [Атипичный рост, абнормальный митоз, полиплоидия и фрагментации хромосом вызванные гексахлорциклогексаном.] — *Nature* **162** : 845, 1948.
- NYVOM, N., KNUTSSON, B.: Investigations on c-mitosis in *Allium cepa*. [Исследования по с-митозу у лука.] — *Hereditas* **33** : 320—334, 1947. цит. по HAMEL, 1947.
- PAZOURKOVÁ, Z., PAZOUREK, J.: *Nová modifikace nigrosinové metody*. [Новая модификация нигросинового метода.] — *Preslia* **27** : 442—446, 1955.
- RAO, N., KUNDU, B.: Effects of gamexane on the root tips of *Corchorus capsularis*. [Влияние гамексана на кончики корней *Corchorus capsularis*.] — *Sci. et Cult.* **14** : 424, 1949. Цит. по Plant Breeding Abstr.

Адрес: Zdeněk Landa, prom. biol., Biologický ústav Československé akademie věd, oddělení fyziologie rostlin, Praha 6 - Dejvice, Na cvičišti 2.

Hexachloreyclohexane as a Polyploidisation Agent

ZDENĚK LANDA

Summary

We have confirmed data regarding the action of γ -hexachloreyclohexane as an agent inducing polyploidy, established a simple method of its application, determined the extend of its effect and found out whether it would be possible to replace the colchicine technique by a more accesible method of γ -HCH application. The method resulting from preliminary experiments with onion and lettuce was later applied to species and varieties of a number of plants (see list). The activity of γ -HCH as an agent inducing polyploidy was confirmed by the experiments. A method of sowing seeds in a damp film of γ -HCH was projected for *Linum usitatissimum*, *Viola tricolor maxima* a *Lactuca sativa*. It seems probable that the use of γ -HCH instead colchicine pretreatment will be possible in cytological technique.