



TARTU RIIKLIK ÜLICOOL

Geneetika ja darvinismi
kateeder

I. Laumets

2,4-D TOIMEST Haplopappus gracilis'e

KALLUSKOELE

Diplomitöö

Juhendaja: dots. H. Kallak

22.06.69
Laumets
Paul
23.07.69.
H. Kallak

Tartu 1969

S I S U K O R D

	Lk
I SISSEJUHATUS.....	3
II KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
III MATERJAL JA METOODIKA.....	29
IV EKSPERIMENTAALNE OSA.....	34
V KOKKUVÖTE.....	46
VI (VENEKEELNE RESÜMEE). РЕЗЮМЕ.....	48
VII KASUTATUD KIRJANDUS.....	50

I. S I S S E J U H A T U S

Isoleeritud taimekudede ja -rakkude kultiveerimine kunstlikul süttmel on viimasel ajal leidnud rakendust mitmete probleemide lahendamiseks füsioloogias (biosünteesiprotsesside teed ja nende sõltuvus mitmesugustest teguritest), morfoloogias (morfogeneesi ja diferentseerumisnähtuste olemus), samuti tsütogeneetikas (kromosoomide garnituuri püsivuse ja muutumise tingimused). Saab ju koekultuure suhteliselt kergesti mõjutada süttme kaudu selle koostisse lisatavate kemikaalidega.

Loomsete koekultuuridega võrreldes on taimsete koekultuuride uurimine veel üsna vähe välja kujunenud suund ning seetõttu esineb palju lahendamata probleeme.

Laialdaselt kasutatakse koekultuurina taimede haavakude e. kallust. Kalluse hulka laiemas mõttes loetakse kõik vigastuse tagajärjel tekkinud diferentseerumata koed nii lõikepinnal kui ka vigastatud organi sees. Organilt või koetükilt isoleeritud kalluskude võib edukalt kasvatada vastava koosti-

sega tehissõõtmel.

Isoleeritud kultuurina kasvatatav kallus on hea materjal tsütoloogiliseks uurimistööks: teda on võrreldes tervete taimedega suhteliselt kerge kasvatada ja uurida. Niisugune kalluskultuur koosneb põhiliselt parenhüümsetest rakkudest.

Teatud tingimustel toimub aga kalluskoos diferentseerumine: parenhüümsete rakkude seas eristuvad jagunemisvõimelistest rakkudest haavameristeemi kolded, moodustuvad haavapuidu elemendid, algab organogenees - adventiivpungade ja -juurte areng. Täieliku organogeneesi tagajärjel kujunevad terved taimed, mis on võimelised vilju kandma.

Isoleeritud kudedes ja rakkudes puudub organismi kui terviku reguleeriv mõju ja sellepärast avalduvad selgemini üksikute rakkude omadused ja võimed.

Isoleeritud kalluskoe välise homogeensuse kõrval ei saa märkimata jätta päriliku materjali küllaltki suurt heterogeensust. Märgatavalt varieerub koekultuuri tingimustes nii kromosoomide arv kui ehitus, esineb kõrvalekaldeid normaalsest mittoosist. Nimetatud asjaolu tuleb eriti arvestada juhul, kui tahetakse välja selgitada kallusrakkudes aset[↑]leidvate muutuste sõltuvust ühest või teisest mõjutegurist.

Käesoleva töö ülesandeks on iseloomustada herbitsiidina tuntud ja praktikas küllaltki laialdaselt rakendatava 2,4-D toimet Haplopappus gracilis'e diferentseerumata kalluskoe rakkudele.

Töö eksperimentaalne osa on teostatud TRÜ geneetika ja darvinismi kateedris aastail 1966-1969. Kasulike näpunäide-
te ja vajalike nõuannete eest võlgnen tänu töö juhendajale,
dots. H.Kallakule ja vanemlaborant L. Järveküljele.

II KIRJANDUSE ÜLEVAADE

Taimedelt eraldatud koetükikeste, nn. eksplantaatide kultiveerimisel moodustub neil enamasti k a l l u s - diferentseerumata, suure potentsiaalse arenemisvõimega haavakude. Kallust võib lähtekoelt eraldada ja iseseisvalt edasi kasvatada. Passeerimisega on võimalik kallust kultuuris säilitada aastaid. Sõltuvalt sisemistest iserasustest ja kultiveerimistingimustest kasvab kallus ühtlase diferentseerumata koemassina või moodustab võsupungi ja juurealgmeid, millest omakorda võivad areneda terved taimorganismid.

Kirjanduse andmeil koosneb diferentseerumata kallus põhiliselt jagunemisvõimelistest parenhüümrakkudest (Eriksson, 1967; Kallak, 1967; Venketeswaran, 1963; Бытєнко, 1964). Kallusrakkude kuju, suurus ja sisemine ehitus (sisaldised, tsütoplasma ja tuuma mahuline vahekord, tuumade kuju ja arv jne.) võivad seejuures märgatavalt varieeruda. Kalluses leiame ümmargusi, ovaalseid ja korrapäratu kujuga rakke. Kõik nad asuvad koos samas kalluskoe

tükis, sõltudes väga vähe lähtekoe iseärasustest. Kalluskoe rakkude kuju mitmekesisus tuleneb nende suhteliselt vabast paiknemisest: puudub koele iseloomulik rakkude tihe seos.

Märgatavalt varieerub kallusrakkudes ka tuumade suurus ja ehitus ning neis sisalduv kromosoomide arv.

Mõningates rakkudes esinevad ebatavaliselt suured ja korrapäratu, sagar^alise kujuga tuumad. Neid nn. polümorfseid tuumi leiame eelkõige suurtes rakkudes. On avaldatud arvamust, et polümorfsetest tuumadest võib edaspidi tekkida mitu uut tuuma s.t. tuum võib jaguneda ilma korrapärase mitoosita (Kallak, 1967).

Taimseid koekultuure käsitlevas kirjanduses valitseb üldiselt seisukoht, et kallusrakud jagunevad põhiliselt mitoosi teel. Kuivõrd käesoleva töö^{ühks} ülesandeks oli selgitada Haplopappus gracilis'e kalluskoe rakkude mitootilise jagunemise ööpäevast dünaamikat, osutus vajalikuks mõnevõrra lähemalt tutvuda mitooside ööpäevase dünaamika kohta avaldatud seisukohatadega.

J. Alovi (Alob, 1964) andmeil on mitooside ööpäevane ja sesoonne dünaamika sagedaseks nähtuseks nii taime- kui loomariigis. Nii nagu teised füsioloogilised protsessid, muutub rütmiliselt ka mitooside aktiivsus ööpäevase ja aastase tsükli jooksul. Rakkude jagunemise intensiivsus teeb läbi seaduspäraseid muutused ka ontogeneesi jooksul.

Erilist huvi pakuvad mitooside ööpäevase rütmi mehhanismid. Väliskeskkonna rütmilised muutused (valgus, temperatuur, toitumisrežiim jt.), rakkude funktsionaalse aktiivsuse rütm ja ainevahetusreaktsioonide muutused võivad olla ühenduslülideks protsesside ahelas, mis kindlustavad mitootilise aktiivsuse perioodilisuse. Esimesed andmed valgustusrežiimi mõjust rakkude jagunemisele saadi taimsetel objektidel, millel kestva pimeduse tingimustes ööpäevased rütmid muutusid või kadusid täielikult. Näiteks D.F. van Leyden (Alob, 1964) kasvatas kahte sibula taime ühes nõus püsival temperatuuril, kuid erineva valgustusrežiimi tingimustes: üht pidevas pimeduses, teist normaalse ööpäevase valguse-pimeduse vahelduses. Mitootilise aktiivsuse maksimum oli mõlemal taimel kell 23⁰⁰; minimum kell 11⁰⁰, kuid

pimedas hoitud taimel kõikus mitootiline aktiivsus palju väiksemal määral kui normaalse öö ja päeva vaheldumise tingimustes kasvatatud taimel. Pideva ööpäevase valgustamise korral muutusid mitooside ööpäevased rütmid vastupidisteks: maksimum märgiti hommikul, minimum - öösel.

Analoogilisi katseid on tehtud ka loomadel. S.Mamon-
tov (*Мамонтов*, 1968) uuris näiteks rakkude jagunemise ööpäevast rütmi hiire keele ja silma sarvkesta epiteelis. Ilmnes, et ööpäevane dünaamika nii terves sarvkestas kui tema üksikutes kihtides on väljendatav ühetipulise kõvera-
ga. Sarvkesta epiteeli kõrgema mitootilise aktiivsuse pe-
riood langeb kella 7⁰⁰ ja 13⁰⁰ vahele. Keele epiteeli mi-
toosiindeks tõuseb ja saavutab maksimaalse väärtuse kell
7⁰⁰ ning langeb jälle kella 10⁰⁰-ks.

Kirjanduses võib leida üksikuid andmeid ka mitooside ööpäevasest dünaamikast taimsetes koekultuurides.

Tubaka rakkude suspensioonis on mitootilise aktiivsuse ööpäevast rütmi määranud T. Hayashi (1968). Loomuliku valguse tingimustes täheldas ta kaht mitootilise aktiivsuse tippu - hommikul ja öösel; pideva pimeduse tingimustes

tipud vaheldusid sagedamini.

H.Kallak (1968) on kirjeldanud tardsöötmel kultiveeritava tubaka kalluskoe mitooside aktiivsuse dünaamikat, sõltuvalt subkultuuri eest ja ööpäevasest perioodist. Kuuen-
dal päeval pärast järjekordset passaaži esineb tubaka kal-
lusrakkude mitooside ööpäevases aktiivsuses kaks tippu:
kell 4⁰⁰ ja kell 16⁰⁰. Kolmekümne päeva vanuses subkultuu-
ris väljendub mitooside ööpäevane dünaamika aga ainult
ühetipulise kõveraga, maksimumiga kella 24⁰⁰ paiku. Nelja-
kümnendaks päevaks pärast passaaži langeb märgatavalt mi-
tooside üldine intensiivsus ning kaob praktiliselt ööpäe-
vane rütm.

Märgatavalt muutub rakkude jagunemise intensiivsus
koekultuurides, sõltuvalt subkultuuri eest. T.Kovaljova
jt. (*Kobaseba u gp.*, 1968) on jälginud mitootilist jagu-
nemist Rauwolfia serpentiana ja Haplopappus gracilis'e
rakkude suspensioonides. Uurimustest ilmneb, et alates ka-
heksandast ööpäevast algab Rauwolfia serpentiana koekul-
tuuris mitootilise aktiivsuse tõus. Kümnendal päeval pärast
passaaži langeb mitootiline aktiivsus mõningal määral ja

kahe nädala pärast algab uus tõus, mis vältab viis kuni kuus päeva.

Haplopappus gracilis'e rakkude suspensioonis täheldati rakkude jagunemisi esimese kahe nädala jooksul pärast passaazi, kõrgema sagedusega seitsmendal ööpäeval (1,2-2,7%).

R. Butenko jt. (Бутенко и др., 1967) andmetel püsib rakkude jagunemine Haplopappus'e ja tubaka rakkude suspensioonis võrdlemisi madalal tasemel kuni kolmanda päevani, seejärel tõuseb üheksa korda Haplopappus'el ja kolm kuni viis korda tubakal ja saavutab neljateistkümnendal ööpäeval maksimaalse väärtuse, mis vältab peaaegu kahekümne esimese ööpäevani pärast passaazi.

Osa tuumi jaguneb kalluses ilmselt ka otseselt - a m i t o o s i teel. Kallusrakkudes võib leida tüüpilisi amitoosi figuure vähemal või suuremal määral sissesoonunud tuumadega (Kallak, 1968; Partanen, 1963; Venketaswaran et al., 1964; Бродский , 1966;).

Mõned autorid käsitavad tuuma otsest jagunemist kui raku füsioloogilist reaktsiooni tuuma pinna ja mahu suhte parandamiseks (Бродский , 1966). Selline vajadus tekib eeskätt suurtes polüploidsetes rakkudes, kus tuuma ja

tsütoplasma kontaktid on häiritud. Et polüploidseerumine viib aga tasakaalust välja tuuma pinna ja raku mahu suhte ning halvab sellega tsüto- ja karüoplasma vahelist ainevahetust, toimubki suurtes polüploidsetes rakkudes sageli amitoos. Amitoos normaliseerib polüploidsete rakkude ainevahetust. Tuuma amitootilisele jagunemisele enamasti raku jagunemist ei järgne ja nii võivadki tekkida mitmetuumalised rakud.

Paljud autorid viitavad k r o m o s o o m a b e r r a t s i o o n i d e kõrgendatud sagedusele koekultuuri tingimustes (Eriksson, 1965; Kallak, 1967, 1968; Partanen, 1963; Sawamura, 1964; Venketeswaran et.al., 1963; Строев, 1966; Шебренко, 1965).

Jagunevates kallusrakkudes võib sageli kohata kromosoomitfragmente, samuti "sildu", mis räägivad mitmesugustest aberratsioonidest. Kromosoomides toimuvad murdumised, mis võivad põhjustada üksikute kromosoomiosade eraldumist ja viia murdunud osade taasühinemisele uues kombinatsioonis. Kui on murdunud mitu kromosoomi, võivad vahetusse minna erinevate kromosoomide osad ja sealjuures võib mõni kro-

mosoom omandada kaks tsentromeeri, teine aga jääda täiesti ilma tsentromeerita. Anafaasis hakatakse kahe tsentromeeriga kromosoome samaaegselt mõlemale rakupoolusele tõmbama ja tekib "sild" - kahe rakupooluse vahel väljaveninud kromosoom. C. Partaneni (1963) arvates on kromosoomaberratsioonid üheks aneuploidsete rakkude tekkimise eelduseks.

Iseloomulikuks nähtuseks kallusrakkudele peetakse ka muutusi kromosoomide arvus (Blakely, Steward, 1964; D'Amato, 1965; Kallak, 1967, 1968; Каллак, Ярбекромъ, 1968; Muir, 1965; Mühling et al., 1960; Partanen, 1963; Shamina, 1965; Torrey, 1965; Venketeswaran et al., 1963; Бродский, 1966; Бугенко, 1964; Кобалева и др., 1968).

Koekultuure iseloomustab kromosoomide arvu pideva suurenemise tendents. On ilmne, et polüploidisus seostub mingisugusel viisil kultiveerimistingimustega, eelkõige - söötme koostisega.

A. Reinert ja J. Torrey (1961) täheldasid Haplopappus gracilis'e kalluse kasvatamisel kookospiima sisaldavas söötmes näiteks rohkem polüploidseid rakke kui sünteetilise söötme korral. Polüploidisus tõusis kuni 16 n-ni, kuigi tetraploidised ra-

kud olid kõige sagedasemad. Mitra et.al., (1964) katsed portugali koekultuuriga räägivad samuti kultuuri erinevast käitumisest, sõltuvalt kultiveerimistingimustest. Vedelas söötmes kultiveerimisel ilmnevad erinevate kloonide vahel erinevused polüploidse astmes, samuti esineb mitmetuumalisi rakke, anafaasis "sildu" ja kromosoomifragmente. Tardsöötme kultiveerimisel säilib rakkudes kromosoomide arv diploidse ja ei esine ka aberratsioonid. Võib arvata, et vedelsöötme puhul avaldab mõju rakupindade vahetum kokkupuutumine toitekeskkonnaga.

T. Kovaljova jt. (Kobaneba ugpr., 1968) on täheldanud Haplopappus gracilis'e rakkude kultiveerimisel suspensioonidena mõnede kloonide täielikku polüploidseerumist paari aasta jooksul, 2,4-D lisamisel söötmele aga juba kaheksa kuu pärast.

Kultiveerimistingimuste toimet kultuuride polüploidseerumisele seletatakse eri autorite poolt erineval viisil. Ühed autorid (Shamina, 1965) oletavad, et söötme vastavate komponentide mõjul toimub diploidsete rakkude otsene polüploidseerumine. Z. Shamina (1965) kirjeldab Haplopappus gracilis'e diploidse kalluskultuuri järkjärgulist polüploidseerumist sõltu-

valt söötme mõnedest komponentidest. Põhisöötmena kasutab ta White'i söödet, kuhu on lisatud 0,1mg/l kinetiini ja 0,5mg/l 2,4-D. Pärast kaheksakuist kultiveerimist olid kõik rakud polüploidised. Autori arvates põhjustasid polüploidisuse teket kinetiin ja 2,4-D.

Teiste autorite (Torrey, 1965) arvates avaldab sööde kultuurile esmajärjekorras selekteerivat toimet, mingil viisil soodustades lähtekoes algselt olemasolevate polüploidsete rakkude jagunemist. See seisukoht eeldab, et polüploidseid rakke esineb juba lähtekudedes ning et koe- kultuuri tingimustes suureneb ainult nende hulk. Seoses sellega jõuame C. Partanen (1965) poolt tehtud järelduseni: in vitro avaldub vaid see, mis on olemas in vivo.

D'Amato (1965) järgi on diploidne seisund üldse omane põhiliselt diferentseerumata algkudedele: juure apikaalsele meristeemile, kasvukuhiku initsiaalrakkudele, prokambiumile, peritsüklile jne., polüploidisus aga vanadele, diferentseerunud kudedele. Üksikasjalisemalt on D'Amato poolt jälgitud sibula juure karüoloogilist pilti. Epidermise rakud osutuvad di- ja tetraploidseteks, juure kesksilindri ja endoder-

mise rakud peamiselt tetraploidseteks, üksikud - oktoploidseteks, peritsükli ja prokambiumi rakud olid aga eranditult diploidised. Siit võib järeldada, et kromosoomide diploidne seisund püsib vaid kudedes, kus toimuvad mitoosid ja kus on vaja täpselt edasi anda geneetilist informatsiooni.

Peale kultivaerimistingimuste mitmekülgse toime sõltub isoleeritud rakkude muutlikkus ka nende s i s e m i s t e s t i s e ä r a s u s t e s t, eelkõige vastava liigi genotüübist. Ühtede liikide kudedel on kalduvus polüploideerumiseks suurem kui teistel. S.Kupila (D'Amato, 1965) tõstab esile selliseid liike nagu Helianthus annuus ja Helianthus tuberosus, mis säilitavad neile omase diploidse garnituuri ka koekultuuri tingimustes. Seevastu tomati, herne, hübriidtubaka jt. taimede diploidised lähtekoed muutuvad kestvate passaažide järel üha polüploidsemateks.

Kromosoomide komplekti kordistumise peamiste m e h h a n i s m i d e n a tuuakse esile endomitoos ja tuumade liitumine (D'Amato, 1965; Partanen, 1965; Атабекоба, 1965).

Endomitoosi ehk kromosoomide tuumasisesse kordistumise korral ei moodustu mitoosile iseloomulikku käävi, mistõttu

on takistatud kromosoomide lahknemine raku poolustele.

Kui ka järgnevate tuumajagunemiste käigus käävi ei

moodustu, kahekordistub kromosoomide arv iga endomi-

toosi järel. Endopolüploidsete tuumade tekkimisel

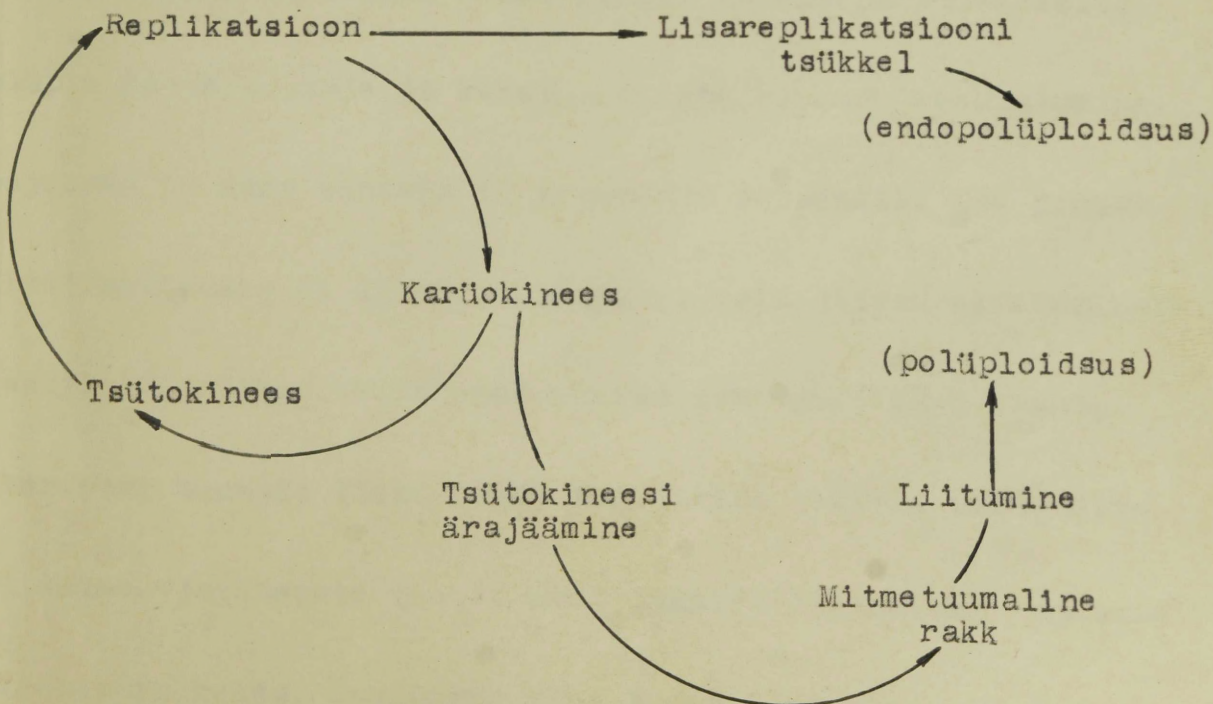
endoreplikatsiooni teel täheldatakse "diplokromosoomi-

de" (4- kromatiidiga kromosoomid), "kvadrikromosoomi-

de" (8-kromatiidiga kromosoomid) jne. teket.

Tuumade liitumine leiab aset suurtes kahe- ja enamatumalistes rakkudes.

C. Partanen (1965) iseloomustab koekultuurides aset leidva polüploideerumise teid alljärgneva skeemiga (joon.1.).



A. Fernandes (Арабекоба , 1965)grupeerib kromosoomide komplekti kordistumise võimalused järgmiselt:

- 1) Kaks järjestikust kromosoomide pikijagunemist profaasis ühe järgneva lahknemisega anafaasis.
- 2) Polüploidse tuuma moodustumine kromatiidide mittetäieliku lahknemise tõttu poolustele.
- 3) Tsütokineesi ärajäämine pärast tuuma jagunemist viib kahetuumaliste rakkude moodustumisele, milledes tuumade liitumisel moodustub tetraploidne tuum.
- 4) Mittetäieliku vaheseina moodustumine tütarakkude vahel järgneva tuumade liitumisega.
- 5) Vaheseina kadumine kahe raku vahel ja tuumade liitumine.

On näha, et kõigis viies grupis toimub paralleelselt polüploidsete tuumade ja kahetuumaliste rakkude moodustumine. Seejuures on suur tähtsus tüartuumade seisundil. Kui kromatiidid anafaasis ei liigu poolustele, vaid jäävad ekvatoriaalplaadil lähestikku, siis moodustuvad kahetuumalised rakud. Interfaasi tuumade liitumisest sagedamini tekivad polüploid-
sed tuumad jagunevate (metafaasi) tuumade liitumisel kahetuumalistes rakkudes. Seejuures kahe tuuma liitumise aluseks on

kaks tingimust - tuumade lähedus ja mitoosi faaside ühtsus - sünkroonsus.

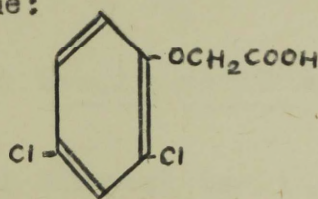
Ulatuslikust morfoloogilisest ja geneetilisest varieeruvusest hoolimata on koekultuure kasutatud uurimisobjektina mitmesuguste bioloogilistelt aktiivsete ainete toime kindlakstegemisel. Koekultuuride mõjutamisel on erinevad autorid saanud väga mitmekesiseid tulemusi, sõltuvalt mõjuaine liigist, selle kontsentratsioonist ja mõjutatavast koest.

S. Venketeswaran jt. (1964) uurisid nukleinhapete, nende eelkäijate ja derivaatide mõju mitooside aktiivsusele Vicia faba koekultuuris, mida kasvatati Torrey vedelas põhisöötmes. DNH või RNH lisamine söötmesse ei avaldanud märkimisväärset efekti rakkude jagunemisele, kuna aga DNH või RNH - Na - sool juba madalas kontsentratsioonis avaldas üsna olulist stimuleerivat mõju.

Märgatavalt suurenes Vicia faba koekultuuris polüploidsete rakkude arv. Eriti suur oli viimane tsütidiini ja uridiiniga mõjutatud kultuuris. Lisaks ilmnesid arvukad

varieerumised tuumade käitumises ja morfoloogias nagu meta-
faasi kromosoomide tugev kontraktsioon, fragmentatsioon,
"sillad" anafaasis jne.

Põllumajanduses kasutatakse umbrohtude tõrjeks mitme-
suguseid herbitsiidide. Nimetus "herbitsiid" tu-
leneb ladinakeelsetest sõnadest "herba" - rohi ja "tsido"-
-tapma. Keemilise koostise järgi jagatakse herbitsiidid
anorgaanilisteks (väävelhape, Na-klooraat jt.) ja orgaanilis-
teks (pentakloorfenool, simasiin). Paljud autorid on uurinud
herbitsiidide, sealhulgas ka 2,4-D mõju mitmesugustele taime-
liikidele. 2,4 - D kujutab endast kõrge aktiivsusega kasvu-
regulaatorit. Keemiliselt on 2,4-dikloorfenoksüäädikhappe
struktuurvalem järgmine:



A. Leopoldi (Leonberg, 1968) andmetel kloori viimine
mõlemasse ortoasendisse vähendab tunduvalt 2,4-D aktiivsust.
Spetsiifilise aktiivsuse ilmutamiseks on tingimata vajalik
vaba orto-asendi aromaatrõngas. 2,4-D aktiivsust vähendab ka
karboksüülrühma puudumine külgheljas. Ruumilise konfiguratsiooni poolest on aktiivne ainult paremale pöörav vorm.

B. Faludi jt. (1965) poolt on näiteks kindlaks tehtud, et kartuli koekultuuri kasvu stimuleerimisel etendab olulist osa klooriga asendamine neljandas asendis.

V. Strojev (Строев, 1966) on uurinud näiteks simasiini ja maleiinhappe hüdrasiidi geneetilist toimet odra idujuurtele ja võrrelnud nende toime aktiivsust spontaanse muteerumise sagedusega kontrollis. Maleiinhappe hüdrasiid (0,0075 ja 0,005 M) surub täielikult alla rakkude jagunemise, suurendab aga kromosoomaberratsioonide arvu kromosoomide fragmenteerumise ja "sildade" näol. Simasiin ei takistanud oluliselt rakkude jagunemist, tõstis aga märgatavalt kromosoomaberratsioonide arvu, võrreldes kontrolliga.

V. Ševtšenko (Шевченко, 1965) on täheldanud maleiinhappe hüdrasiidi mõjul Crepis capillaris'e võrsete rakkudes kromatiidset tüüpi aberratsioonide sagenemist ja murdumiste tekkimist ainult kindlates kromosoomi osades.

S. Sawamura (1964) on uurinud erinevate herbitsiidide (2,4-dikloorfenoksüäädikhappe, 2,4,5 - trikloorfenoksüäädikhappe, 2,5 -dikloorfenoksüäädikhappe jt.) mõju Tradescantia tolmuka karvakeste ja Vicia faba abilehe rakkude ainevahetu-

sele ning mitoosidele. Need herbitsiidid kutsuvad esile mitmesuguseid häireid mitooside käigus: "sildu" anafaasis, kromosoomide kokkukleepumist, kromosoomide aeglustunud liikumist anafaasis, kahe- ja mitmetuumalisi rakke, mikrotuumi, ebatäielikke rakukesti jne.

G. Mühling jt. (1960) on mõjutanud aedherne (Pisum sativum) idujuuri arvukate fenooli-tüüpi ühenditega (2,4-dikloorfenool, 2,4-dikloorfenoksüetanool, 2,4-dikloorfenoksüädikhape jt.) ja analüüsinud mitooside kulgu. Mõjutamise tulemustest ilmneb, et need ühendid põhjustavad kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt kolhitsiinile sarnase reaktsiooni ja inhibeerivad rakkude jagunemist. Katsetest selgub, et fenooli-tüüpi ühendid on potentsiaalselt polüploiddeerivad agendid.

Mitmesuguste katsetega on näidatud, et 2,4-D, tungides kaheidulehelistesse taimedesse, häirib teravalt nende elutegevust. Esmalt surutakse alla fotosüntees, seejärel langeb järsult orgaaniliste ainete moodustumise kiirus, toimub suhkrute lagunemine, surutakse alla valgu süntees ja tõuseb hingamisfermentide aktiivsus, (Boeboguh, 1964).

2,4-D mõju avaldub ka välistes tunnustes: taime kasv seiskub, lehepungad hukkuvad, lehed deformeeruvad ja keerduvad.

B.Faludi jt. (1963) andmetel on teada, et 2,4-D muudab suhkrute ainevahetust. Hingamine kaldub otsese oksüdatsiooni suunas, mitmed ketoonhapped mobiliseeritakse aminohapete desamiinimisel. On kindlaks tehtud, et 2,4-D kui kasvuregulaator vähendab suhkru inkorporeerumist pektiini ja tselluloosi molekulidesse, mis kaudselt soodustab diferentseerumata kasvu jätkumist. B.Faludi jt. (1963) poolt võrreldi mitmesuguste suhkrute mõju kartuli kasvaja tüüpi kalluskoele, mida indutseeriti 2,4-D-ga. Tehti kindlaks, et mõju osas koekultuuride kasvule võib suhkrud jagada kolme gruppi: a) suhkrud, mis stimuleerivad kasvu (sahharoos, trehaloos, D-glükoos); b) suhkrud, mis avaldavad väga nõrka toimet (D-riboos, D-fruktoos, maltoos); c) toksilise toimega suhkrud, ehk suhkrud, mis takistavad kasvu soodustavate suhkrute kasutamist (L-arabinoos, D-galaktoos, L-sorboos, laktoos).

2,4-D avaldab pärssivat toimet ka valgu biosünteesile (Ottrep, 1968). Lämmastiku ainevahetuse iseloomulikumaks

muutuseks on märgatavad nihked valgulise ja mittevalgulise lämmastiku suhtes, mittevalgulise lämmastiku fraktsiooni suurenemise ja valgulise lämmastiku fraktsiooni vähenemise suunas. 10^{-7} M ja 10^{-6} M 2,4-D kasutamise tulemusena suhe valguline lämmastik - mittevalguline lämmastik tatra võrsete hüpokotüülis langes üle kahe korra, võrreldes vastava suhtega väiksemate kontsentratsioonide juures.

Väheseid andmeid leidub kirjanduses ka 2,4-D m õ -
j u s t t a i m s e t e l e k o e k u l t u u r i d e -
l e. Näiteks J. Spurr jt. (1962) on uurinud 2,4-D mõju
tomati kalluskoe kasvule ja ensümaatilisele aktiivsusele.
Kallus pärines kas normaalsest varrekoest või varrekas-
vajatest. Kultuure kasvatati Ca-pantotenaati, 2,4-D ja
kookospiima sisaldaval söötmel. Katsetest selgus, et nor-
maalkudede kalluse kasv on intensiivsem 2,4-D sisaldaval
söötmel kui ilma 2,4-D-ta söötmel. Ensümaatiline aktiiv-
sus oli kõrgem ilma 2,4-D-ta söötmes.

Kasvajatelt isoleeritud koe kasv oli, vastupidi,
väiksem 2,4-D sisaldavas söötmes ilma 2,4-D-ta söötmega
võrreldes. Ensümaatiline aktiivsus oli sel korral kõrgem

2,4-D sisaldavas söötmes. Katsetest ilmneb, et 2,4-D mõjutab erinevalt eri tüüpi kalluskude kasvu ja ensümaatilist aktiivsust.

J. Režabek (1967) on kindlaks teinud 2,4-D kui kasvufaktori osa Solanum laciniatum'i juurekalluse formeermisel White'i söötmel. Ilmnes, et lisatud 2,4-D (1mg/l) kutsub esile juuretipu basaalse osa paisumise. Ainult kombinatsioonis vitamiinidega (müoinositol, koliin, riboflaviin, askorbiinhape, Ca-pantotenaat, biotiin) toimub tüüpiline kalluse proliferatsioon.

B. Faludi jt. (1959) on uurinud 2,4-D mõju fosfori ainevahetusele kartuli koekultuuris. Vastavate katsete põhjal järeldas ta, et 2,4-D takistab fosfori omastamist ja toksilise kontsentratsiooni $10^{-3}M$ mõjul kaotavad rakud märgatava osa oma fosfori sisaldusest. Eriti langeb fosfori sisaldus fosfolipoidsetes fraktsioonides.

B. Faludi jt. (1965) on jälginud ka fenoksüäädikhappe ja tema dikloorderivaatide toimet kartuli koekultuuri kasvule. Kasutades kontsentratsioone $10^{-7}M$, $10^{-4}M$ ja $10^{-3}M$ täheldas ta, et $10^{-4}M$ fenoksüäädikhape stimu-

leerib kasvu. Kõige intensiivsem oli kalluse kasv kultuuris, mida töödeldi 2,4-D-ga, kuna 2,5-D ilmutas vaid minimaalset efekti. 2,3-D, 2,6-D ja 3,5-D kontsentratsioonil 10^{-4} M ei stimuleerinud kasvu ja kontsentratsioonil 10^{-3} M surusid täielikult alla rakkude jagunemise. 10^{-3} M fenoksüäädikhape avaldas vaid vähemärgatavat pidurdust.

Kuivõrd käesoleva töö põhiliseks ülesandeks oli uurida 2,4-D mõju Haplopappus gracilis'e kalluskoele, osutus vajalikuks tutvuda töödega, milles iseloomustatakse Haplopappus gracilis'e kalluskude ja selle kultiveerimistingimusi. Eriksson (1967^{a,b}) Lähemalt on selle probleemiga tardsõotme tingimustes tegelenud Z. Shamina. ? v

Z. Shamina (1965) katsete eesmärgiks oli selgitada mutatsiooniprotsessi printsiipe Haplopappus gracilis'e erinevates kloonides. Katsetes kasutas ta varre kasvukuhikutelt või segmentidelt eraldatud kallust ja kultiveeris White'i põhisõotmel kinetiini ja auksiini lisandiga. Ühes katsevariandis lisas Shamina põhisõotmele 0,1mg/l kinetiini ja 1mg/l α -naftüüläädikhapet, teises - 0,1mg/l kinetiini ja 0,5mg/l 2,4-D.

Kinetiini ja *L*-naftüüläädikhappega söötmel osutusid

Haplopappus gracilis'e ühe kuu vanuse kultuuri rakud peamiselt diploidseteks, järgnevate passaažidega aga suurenes pidevalt rakkude hulk, mis sisaldavad 6,8,10 ja enam kromosoomi. Märgatavalt suurenes eriti triploidsete rakkude arv. Autori arvates võib triploidide moodustumist tingida somaatiline reduktsioon, kromosoomide ebavõrdne jaotumine mitoosis või söötme selekteeriv toime. Ka kinetiini ja 2,4-D sisaldaval söötmel suurenes tugevasti polüploidsete rakkude arv, kusjuures pärast kaheksakuist kultiveerimist olid praktiliselt kõik rakud polüploidised. Z.Shamina (1965) arvates ei soodusta kinetiin või 2,4-D olemasolevate polüploidsete rakkude selektiivset jagunemist nagu väidab J.Torrey (1965), vaid nad indutseerivad otseselt polüploidisust, sest esimesed eksplantaadid olid peamiselt diploidised.

Kultuurides ilmnesid lisaks polüploidsetele rakkudele ka kromosoomaberratsioonid, kuid nende arv ei olnud suur. 85% kromosoomaberratsioonidest olid seotud fragmentide moodustumisega.

Oma uurimistulemuste alusel iseloomustab Z.Shami-
na Haplopappus gracilis'e koekultuuri järgmiselt:

1. Haplopappus gracilis'e koekultuuri kasvatamisel sünteetilistel söötmetel tõuseb polüploidsete rakkude arv.
2. 2,4-D lisamine söötmesse kontsentratsioonis 0,5mg/l viib polüploidsete kloonide moodustumisele.
3. Polüploideerumise aste ei sõltu klooni päritolust.
4. Uuritud kloone iseloomustab aneuploidsete rakkude puudumine.
5. Kromosoomaberratsioonide arv väheneb passaažide jook-
sul.
6. Kromosoomaberratsioonid on seotud peamiselt fragmen-
tide moodustumisega.

III Materjal ja metoodika

Töö koekultuuridega nõuab nii ruumi, sõõtmete, nõude, instrumentide kui ka kudede ranget steriilsust. Sellega vältime koekultuuride saastumise bakterite ja seentega ning vabastame konkurentsist mikroorganismidega.

Vajalikud klaasnõud ja teised vahendid (paberi, vati) steriliseerisin autoklaavis 20 min. 0,7-1at rõhu juures. Enne autoklaaviga tööle asumist kuulasin ära instrueerivad loengud ja sooritasin vastava arvestuse. Töötamisel pidasin silmas kehtestatud eeskirju (Правда...1962), jälgisin, et autoklaav oleks töökorras ning maandatud, manomeetrite näidud õhtuksid, aurukambris küllaldaselt vett ning et autoklaav ei jääks järelevalveta.

Boksi ettevalmistamisel kalluskoe passeerimiseks kiiritasin seda kahel korral 2 tundi ultraviolettkiirtega (bakteritsiidne lamp БУВ-30). Steriliseerimisel hoidusin kiirguse alla sattumast (Хоуанов и др., 1958).

Instrumente steriliseerisin termostaadis 2 tundi, vahetult enne kasutamist kastsin neid veel kord 96° etanooli ja kuumutasin piirituslambi leegis. Piirituslambi kasutamisel jälgisin tuleohutust (Lasteasutuste ... 1965). Tagavarapiirituse hoid-

sin eemal lahtisest leegist.

Passeerimisel on tähtis, et koekultuurid puutuksid võimalikult vähem kokku välisõhuga. Viimane eeldab võimalikult kiireid ja täpseid liigutusi töö käigus.

Boksis töötamisel kasutasin spetsiaalset kitlit, samuti marlist suumaski.

Katsematerjaliks oli kalluskude liigilt Haplopappus gracilis. Katsematerjali valikul lähtusin kahest põhimõttest:

- 1) nimetatud liigi väikesest kromosoomide arvust ($2n=4$),
- 2) Haplopappus'e kalluse suhteliselt heast kasvust koekultuuri tingimustes.

Kude pärineb R.G. Butenko koekultuuride laboratooriumist NSVL TA Taimefüsioloogia Instituudist Moskvast, kus see algselt eraldati 10-15 cm pikkuste seemikute varresegmentidelt ja alates 1964.a. passeeriti korrapäraste vaheaegadega (4 nädala järel) vastavale tardsõõtmele. Esimesed 10 passaazi (subkultuuri) tehti White'i sõõtmele, millele oli lisatud 1 mg/l α -naftuuläädikhapet ja 0,1 mg/l kinetiini. Edasi kasutati sõõtmena Mura-shige lahust, millele lisati α - naftuuläädikhapet (2 mg/l), heteroauksiini (0,5 mg/l) ja kinetiini (0,01 mg/l).

Alates 1964.a. maikuust kultiveeritakse Haplopappus'e

kalluskude TRÜ geneetika ja darvinismi kateedris.

Haplopappuse kalluse kultiveerimiseks kasutasin Murashige-Skoogi söödet, mille koostisse kuuluvad peale Murashige makro- ja mikroelementide järgmised ained:

sahharoos	-	30 g/l
kaseiinhüdrolüsaat	-	1 g/l
2,4-D	-	1 mg/l
adeniin	-	1 mg/l
agar	-	6 g/l
vitamiin-B ₁	-	0,4 mg/l
Ca-nitraat	-	288 mg/l
Fe-tsitraat	-	3,5 mg/l

Sööde on valmistatud ainetest, millede kogused on antud R.G. Butenko (Буренко, 1964) poolt. Nimetatud ained lahustasin destilleeritud vees. Seejärel jaotasin valmistatud söötme viieks osaks. Üks jäi kontrollvariandiks ja neljale ülejäänule lisasin vastava koguse 2,4-dikloorfenoksüädikhapet (2,4-D):

- I variant - 5 mg/l 2,4-D
- II variant - 10 mg/l 2,4-D
- III variant - 20 mg/l 2,4-D
- IV variant - 50 mg/l 2,4-D

Seejärel valasin söötmed 100ml Erlenmeyer'i kolbidesse, igasse ca 40-50 ml ja autoklaavisin kaks korda 20 min. jooksul +115-120°C juures 0,75-1at rõhu all.

Autoklaavitud ning jahutatud (tardunud) söötmeile asetasin pintsettide abil võimalikult ühesuurused kalluskoe tükid eelnevalt kloneeritud kultuurist. Kolvid eksplantaatidega paigutasin termostaati $+27^{\circ}\text{C}$ juurde kasvama. Kultuuride asetamisel termostaati kontrollisin selle töökorras olekut ja maandust vastavalt kehtestatud eeskirjadele (Elektriseadmete...1966).

2,4-D mõju tsütogeneetiliseks iseloomustamiseks fikseerisin üheksandal päeval pärast passeerimist kell 14 igast katsevariandist koetükke seguga, mis koosnes kolmest osast 96% etanoolist ja ühest osast jää-äädikhapest.

Fikseeritud materjalist valmistasin ajutised surupreparaadid atseeto-ortseiini(modifitseeritud La Cour'i)meetodil. Selleks võtsin väikese tüki kallust ja asetasin selle alusklaasile. Seejärel viisin sinna tilga atseeto-ortseiini värvilahust ja jätsin umbes 10 min. värvuma. Edasi asetasin peale katteklaasi ja surusin tiku otsaga katteklaasile vajutades kallusetüki ühtlaselt laiali, s.o. üherakukihiliseks.

Surupreparaate vaatasin mikroskoopide MBU-6(ok.10x, ob. 20x, ja 40x) ja MBU-3 (ok.10x, Ob.20x ja 40x) all.

Katsed viisin läbi neljas korduses. Igas korduses määrasin mitooside sageduse, amitootiliselt jagunevate, nekrootiliste ja polümorfsete tuumade ning mitme tuumaga rakkude

suhtelise hulga (indeksi) analüüsitavas materjalis, s.o. nii katsevariantides kui ka kontrollis. Igast variandist valmistasin iga kord kümme preparaati, milles määrasin ülal-märgitud indeksid $\approx$ 500 raku kohta. Kokku oli vaatluse all 100 000 kallusrakku.

Kallusrakkude jagunemise ööpäevase dünaamika määrami-
seks fikseerisin koetükid eespool nimetatud etanooli-jää-
äädikhappe seguga kuuel korral: kell 04⁰⁰, kell 8⁰⁰, kell 12⁰⁰, kell 16⁰⁰,
kell 20⁰⁰, kell 24⁰⁰. Valmistasin ajutised surupreparaadid eespool
kirjeldatud meetodil ja määrasin nende järgi mitoosiindeksi
s.o. mitootiliselt jagunevate rakkude suhte interfaasis ole-
vatesse rakkudesse.

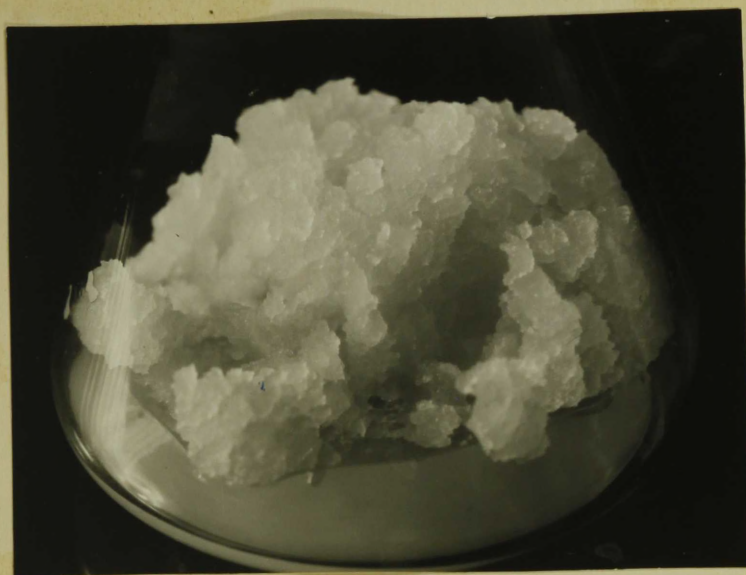
Mikrofotod tegin fotoaparaadiga "Зоркий -4", mis oli
külge monteeritud mikroskoobile МБУ-6.

IV EKSPERIMENTAALNE OSA

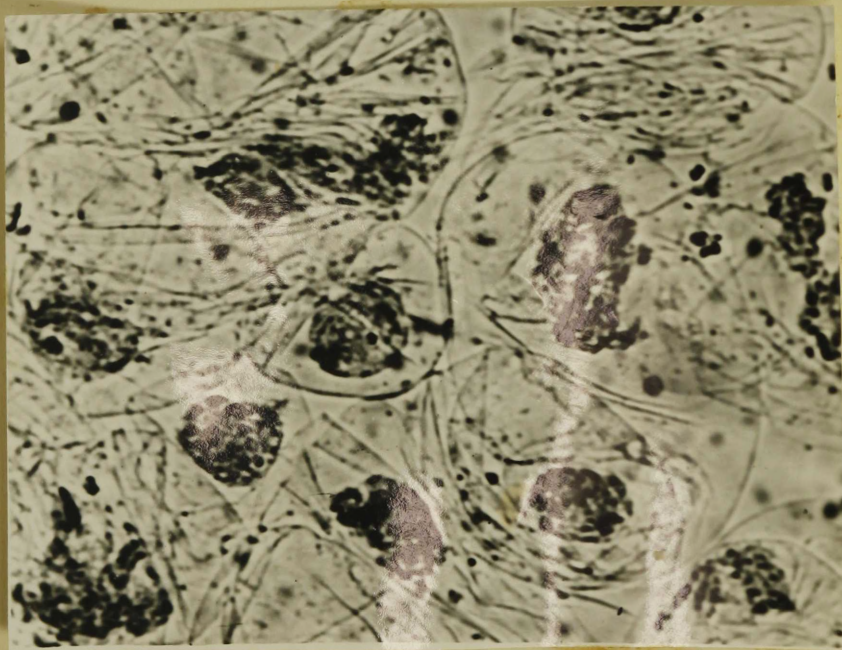
Murashige-Skoog'i söötmel kasvatatud Haplopappus gracilis'e kalluskloon on pehme, kasvajatüüpi haavakude(joon.2.).

Mikroskoopilised uurimused näitasid, et Haplopappus gracilis'e kallus koosneb põhiliselt parenhüümrakkudest (joon.3.). Seejuures varieeruvad kallusrakud niikujult, suuruselt kui sisemiselt ehituselt (tsütoplasma ja tuuma mahuliselt vahekorralt, tuumade arvult jne.). Võib näha kujult ovaalseid, ümmargusi, piklik-torujaid ja korrapäratu kujuga rakke. Kallusrakkudes varieerub märgatavalt ka tuumade suurus ja ehitus. Analoogilisest kirjanduse andmetele leidub ka uuritavas Haplopappus gracilis'e kloonis üksikuid suuremõõtmelisi, korrapäratu, sagaralise kujuga tuumi. Neid nn. polümorfseid tuumi leiame kontrollvariandis siiski suhteliselt vähe. Üksikutes tuumades soondub membraan sisse ning ilmnevad amitoosilaadsed kujundid(joon.4.). Sõni on raske otsustada, kas kõikidel niisugustel juhtudel toimub tõepoolest tuuma amitootiline jagunemine või on tegu mingisuguse pseudomitoosi vormiga. Kaks lähestikku paiknevat või osaliselt kattuvat-tuuma meenutavad ka mõnel juhul amitoosi(joon.5.).

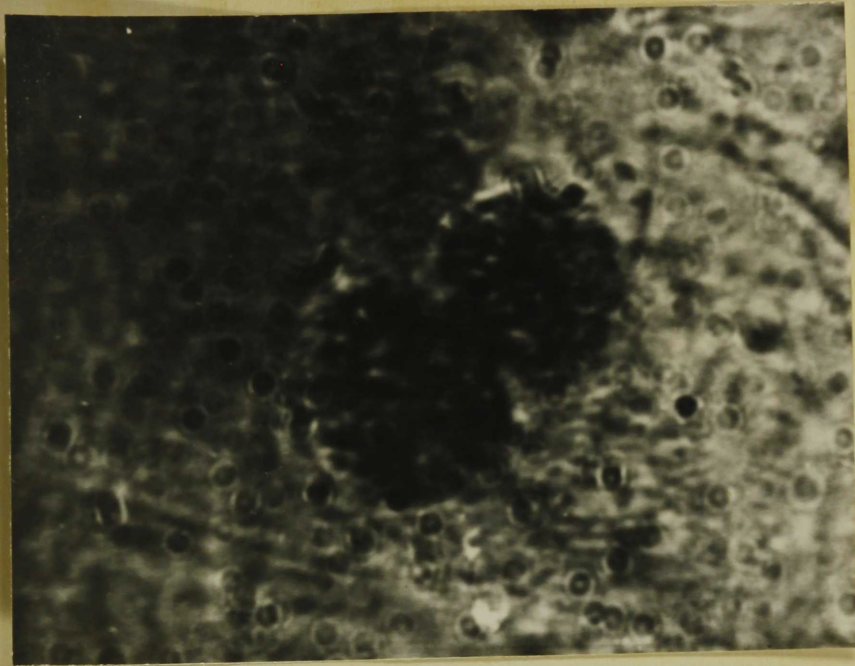
Kõrvuti ühetuumaliste rakkudega esineb Haplopappus gracilis'e kalluses ka kahe ja enamatumalisi rakke(joon.6.,7.). Mitmetuumalised rakud võivad olla tekkinud nii mitooside kui amitooside teel. Nende päritolu selgitamine nõuab vastavaid



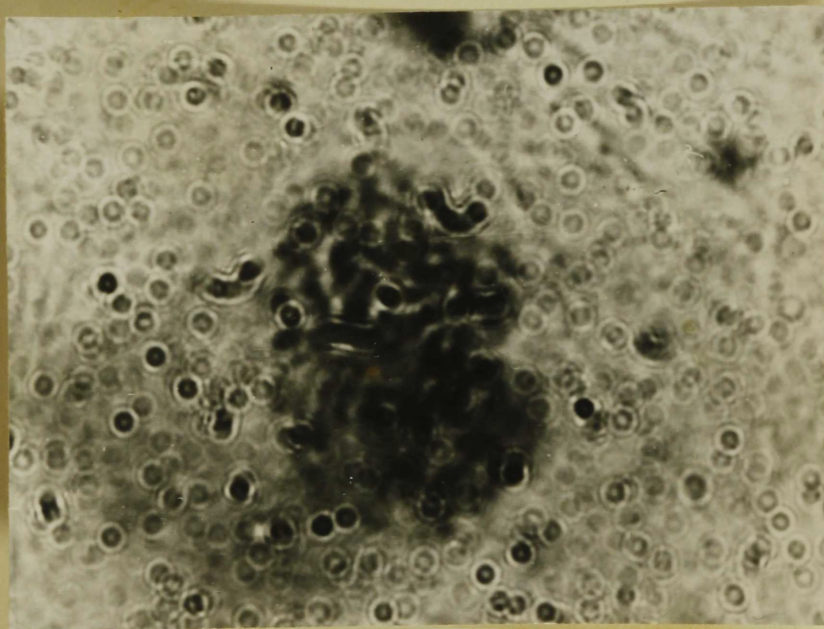
Joon.2. Isoleeritud Haplopappus gracilis'e
kalluskude tardsöötmel.



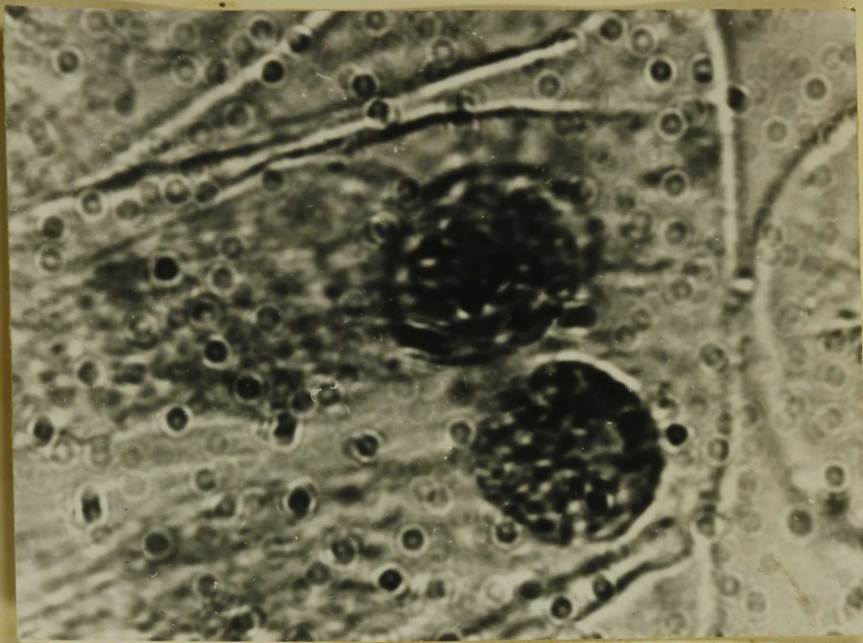
Joon.3. Rakud Haplopappus gracilis'e
kalluskoes. (Ok.20x, ob.20x)



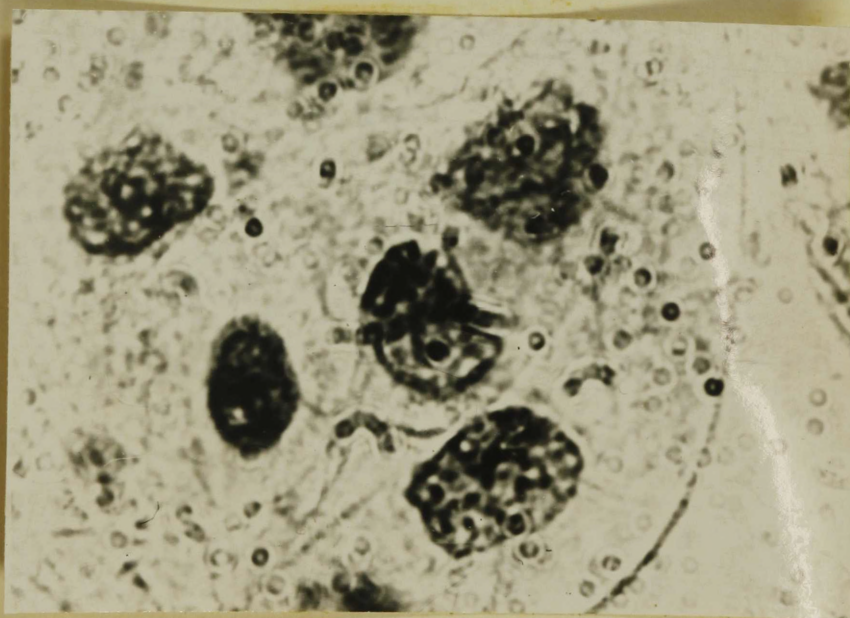
Joon.4.. Amitootiline tuum Haplopappus gracilis'e
kallusrakus. (Ok.20X, ob.60X..)



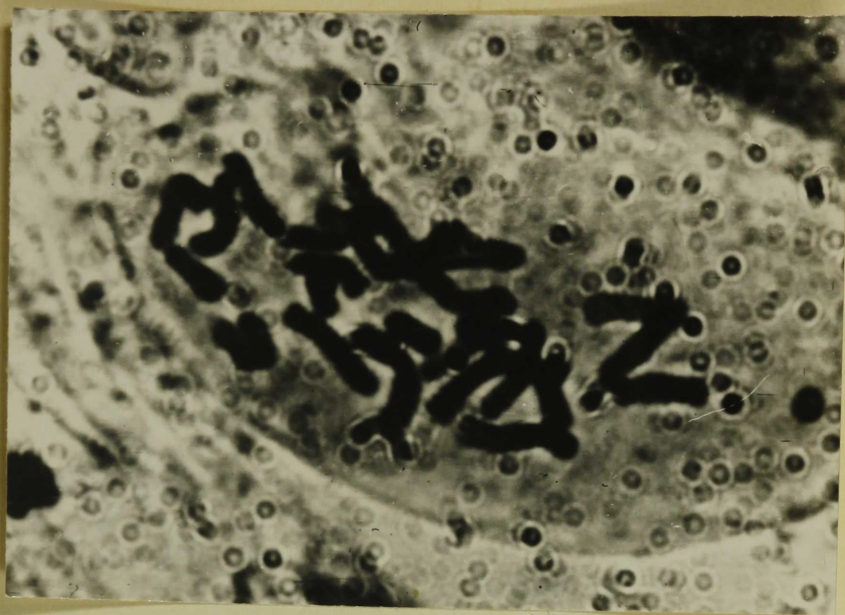
Joon.5.. Amitoosi sarnane kaksiktuum Haplopappus
gracilis'e kallusrakus. (Ok.20X, ob.60X..)



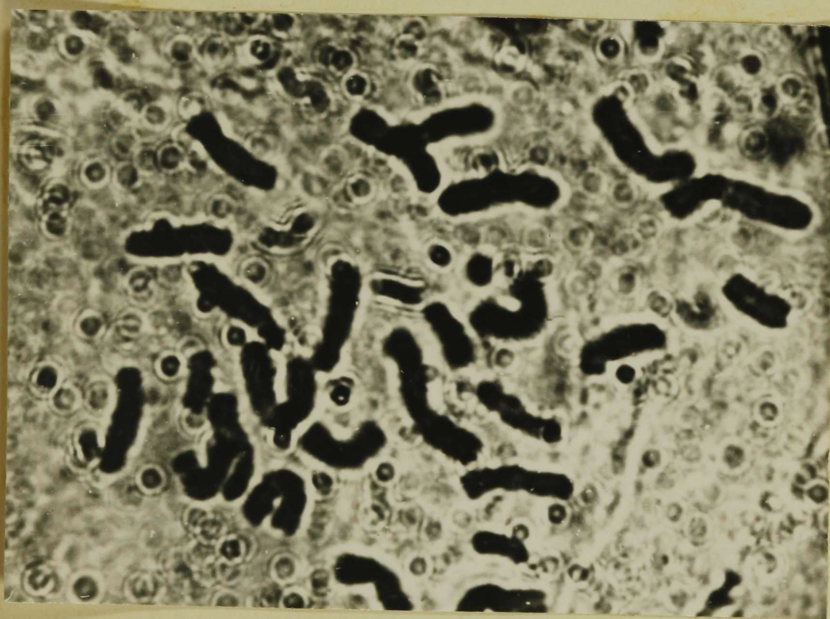
Joon.6.. Kahetuumaline rakk Haplopappus
gracilis'e kalluskoes..(Ok.20x,ob.60x.)



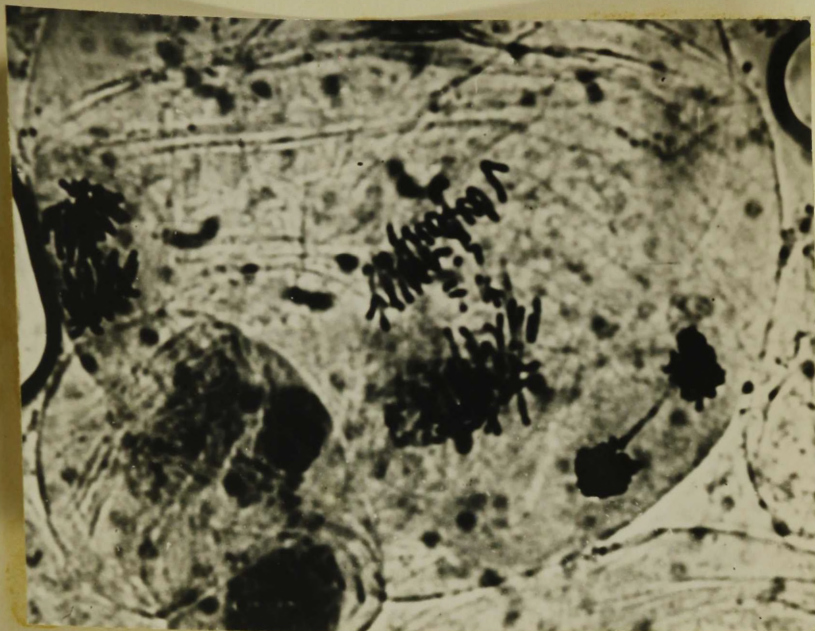
Joon.7..Hulgatumaline rakk Haplopappus
gracilis'e kalluskoes.(Ok.20x,ob.60x.)



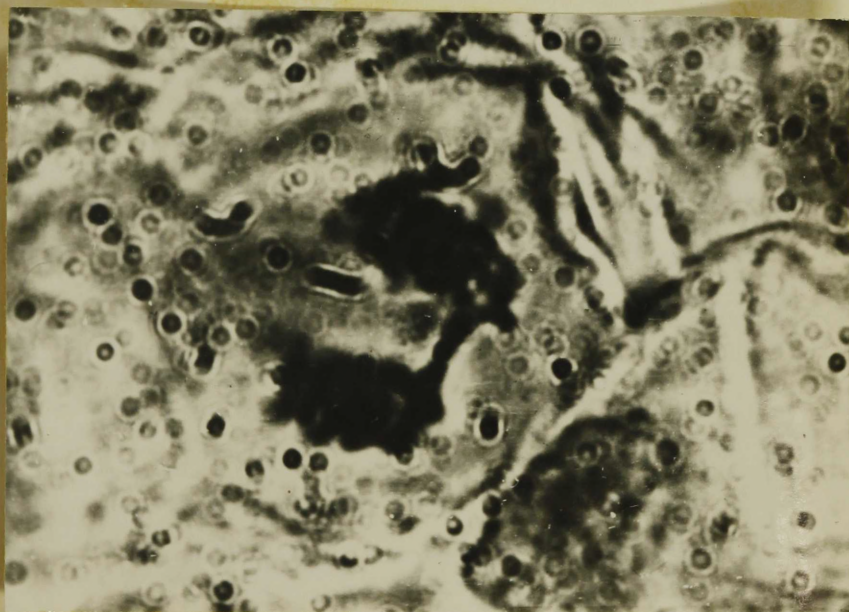
Joon.8. Polüploidne (6n) rakk Haplopappus
gracilis'e kalluskoes. (Ok. 20x, ob. 60x.)



Joon.9. Polüploidne (8n) rakk Haplopappus
gracilis'e kalluskoes. (Ok. 20x, ob. 60x.)



Joon.IO. Aberratiivsed ana- ja telofaasid
Haplopappus gracilis'e kalluskoes.
 (Ok.20x, ob.40x.)



Joon.II. Kromosoomaberratsioon Haplopappus
gracilis'e kallusrakus. (Ok.20x, ob.60x.)

eriuurimusi, mis ei mahu olemasoleva töö raamidesse.

Mikroskoopilised uurimused näitavad, et lähtekallus, s.t.

kontrollvariant on juba kõrgelt polüploidne. Valdav enamik rakke on hekso- kuni oktoploidsed (joon. 8., 9.). Kolmesaja kahekümnest loetud metafaasist olid ainult kaks tetraploidsed ja üks triploidne, ülejäänud kõik enam kui tetraploidsed.

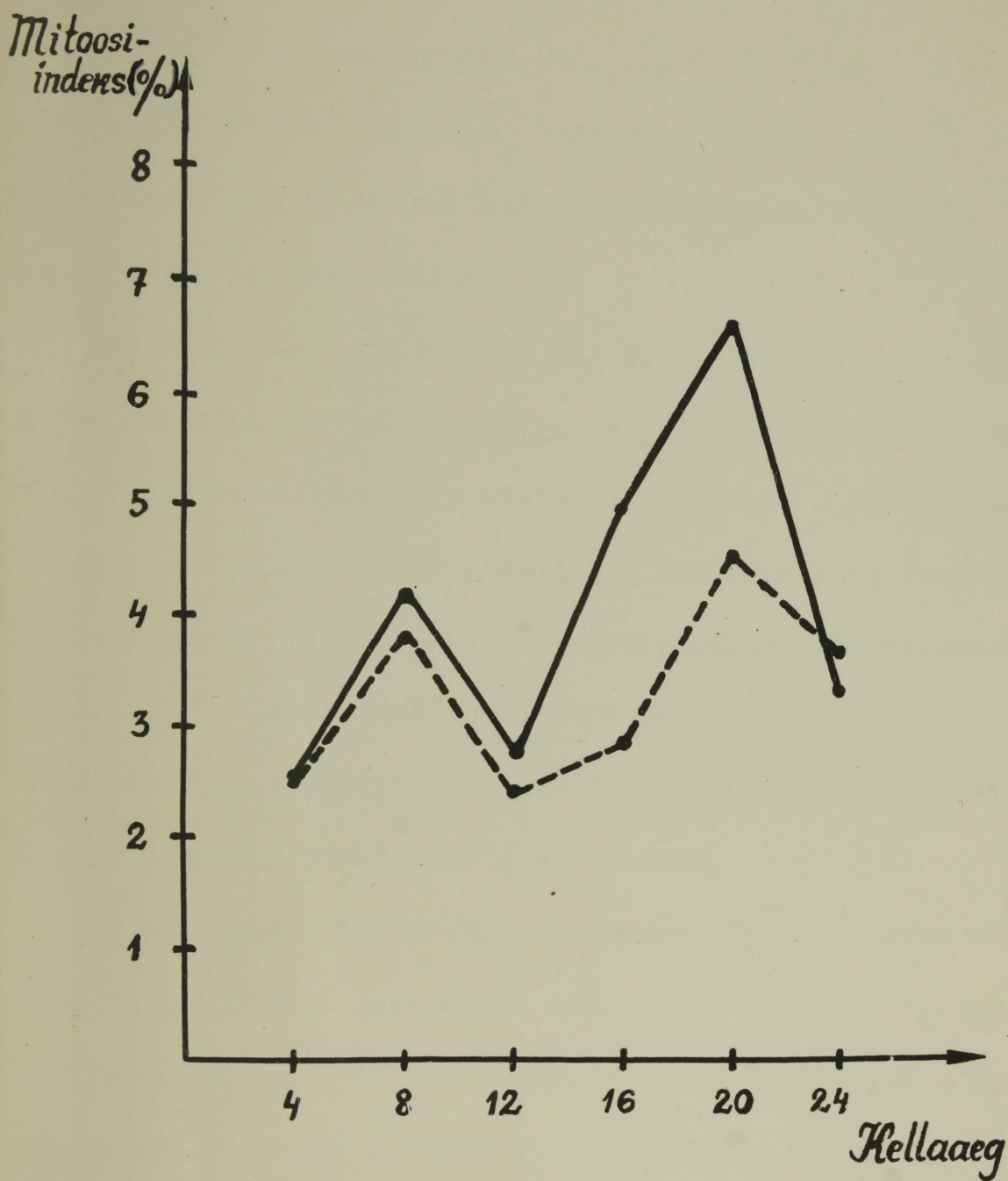
Vaadeldud ana- ja telofaasid kontrollvariandis osutusid enamasti aberratiivseteks (joon. 10.). Kaheksaja kuuestikümnest loetud ana- ja telofaasist osutusid neli normaalseteks, ülejäänud olid kas kromosoom- või kromatiid- aberratsioonidega. Tunduva ülekaalu paistsid omandavat kromosoomaberratsioonid (joon. 11.). Analoomiliselt kirjanduse andmetele esinesid aberratsioonid "sildade" ja fragmentide näol. II

Minu poolt uuritud Haplopappus gracilis'e kalluse rakud jagunevad põhiliselt mitoosi teel, nagu seda väidavad teisedki autorid mitmesuguste kalluskultuuride kohta. Käesoleva töö üheks ülesandeks kujunes mitooside ööpäevase dünaamika määramine. Selleks määrasin kahel korral (pärast kolmekümne kuuendat ja kolmekümne üheksandat passaaži), iga nelja tunni järel - kell 4⁰⁰, kell 8⁰⁰, kell 12⁰⁰, kell 16⁰⁰, kell 20⁰⁰, kell 24⁰⁰ - mitooside sageduse s.o. mitootiliselt jagunevate rakkude hulga mittejagunevate rakkude suhtes.

Määramiste tulemused on esitatud tabelis I, ja joonisel 12.

Tabel 1. Mitooside ööpäevane dünaamika Haplopappus gracilis'e kalluskoos

Kella-	I kordus				II kordus		
	Loetud rakkude arv	mitoo- side arv	mitooside %		loetud rakkude arv	mitoo- side arv	mitooside %
aeg							
8	5000	205	4,10 ± 0,57		5000	182	3,64 ± 0,54
12	5000	139	2,78 ± 0,47		5000	121	2,42 ± 0,44
16	5000	249	4,98 ± 0,63		5000	143	2,86 ± 0,48
20	5000	334	6,68 ± 0,73		5000	228	4,56 ± 0,60
24	5000	165	3,30 ± 0,52		5000	184	3,68 ± 0,54
04	5000	128	2,56 ± 0,45		5000	125	2,50 ± 0,44



Joon. 12. Mitooside ööpäevane dünaamika
Haplophragma gracilis'e kalluskoes.
 — 1. kordus
 --- 2. kordus

Nagu nähtub jooniselt 12, esineb Haplopappus gracilis'e rakkude mitootilise jagunemise aktiivsusel kaks tippu: esimene kell 8⁰⁰ (mitoosiindeksid vastavalt 3,84% ja 4,2%) ja teine kell 20⁰⁰ (mitoosiindeksid vastavalt 4,56% ja 6,68%). Kõige vähem mitoose esines antud kloonis keskpäeval, suhteliselt vähem ka varahommikul.

Töö põhiliseks ülesandeks oli 2,4-D toime tsütogeneetilise efekti selgitamine Haplopappus gracilis'e kalluskoe abil. Uurisin, millist mõju avaldavad erinevad 2,4-D kontsetratsioonid Haplopappus gracilis'e kallusrakkude tuumade jagunemisele ja morfoloogiale. Katsevariante oli neli, vastavalt 2,4-D kontsetratsioonile söötmes: 5mg/l, 10mg/l, 20mg/l ja 50mg/l. Kontrolliks jäi kalluskude Murashige-Skoo-gi põhisöötmel, mis sisaldas 2,4-D 1 mg/l.

Katsed viisin läbi neljas korduses. Igas korduses määrasin mitootiliselt jagunevate rakkude, amitootiliste, polümorfsete ja nekrootiliste tuumade ning mitme tuumaga rakkude suhtelise hulga (indeksi) analüüsitavas materjalis. Nelja korduse igas variandis, kaasaarvatud kontrollvariandis, analüüsisin kümme preparaati (à 500 rakku igas preparaadis). Üldse kokku oli vaatluse all 100 000 kallusrakku.

Uurimuste tulemused on matemaatiliselt töödelduna esitatud tabelites 2-5 ja joonistel 13-17. Kuna indeksid on küllalt madalad, siis nad alluvad Poissoni jaotusele ja kesk-

Tabel 2. 2,4-D mõjust Haplopappus gracilis'e kalluskoele

I kordus - 25 000 rakku					
2,4-D konts.	mitooside %	amitooside %	mitme tuu- maga rak- kude %	polümorfsete tuumaga rak- kude %	nekrootil. tuumadega rakkude %
1 mg/l	5,76 ± 0,68	0,70 ± 0,24	2,76 ± 0,45	1,02 ± 0,28	0,44 ± 0,19
5 mg/l	4,72 ± 0,62	0,78 ± 0,25	2,02 ± 0,40	4,82 ± 0,62	3,02 ± 0,49
10 mg/l	2,12 ± 0,42	1,26 ± 0,32	4,04 ± 0,56	2,34 ± 0,43	4,78 ± 0,62
20mg/l	1,78 ± 0,38	1,42 ± 0,34	1,88 ± 0,37	4,60 ± 0,61	6,26 ± 0,71
50 mg/l	1,20 ± 0,29	0,80 ± 0,25	2,84 ± 0,48	1,06 ± 0,29	7,72 ± 0,19

Tabel 3. 2,4-D mõjust Haplopappus gracilis'e kalluskoele

II kordus - 25 000 rakku						
2,4-D knts.	mitooside %	amitooside %	mitme tuu- maga rak- kude %	polümorfsete tuumadega rakkude %	nekrootil. tuumadega rakkude %	
1 mg/l	5,08 ± 0,64	0,82 ± 0,26	3,33 ± 0,52	0,96 ± 0,28	0,50 ± 0,20	
5 mg/l	4,92 ± 0,63	0,88 ± 0,27	4,20 ± 0,58	1,46 ± 0,34	3,32 ± 0,52	
10 mg/l §	2,00 ± 0,40	1,30 ± 0,32	4,68 ± 0,61	2,02 ± 0,40	5,00 ± 0,63	
20 mg/l	1,80 ± 0,38	1,40 ± 0,34	2,28 ± 0,45	4,76 ± 0,62	6,20 ± 0,70	
50 mg/l I	1,28 ± 0,32	0,74 ± 0,24	1,98 ± 0,39	1,50 ± 0,35	6,96 ± 0,75	

Tabel 4. 2,4-D mõjust Haplopappus gracilis'e kalluskoele

III kordus - 25 000 rakku					
2,4-D konts.	mitooside %	amitooside %	mitme tuu- maga rak- kude %	polümorfsete tuumadega rakkude %	nekrootil. tuumadega rakkude%
1mg/l	6,06 ± 0,69	0,74 ± 0,24	1,54 ± 0,35	3,58 ± 0,54	0,52 ± 0,20
5 mg/l	5,20 ± 0,66	1,12 ± 0,30	2,04 ± 0,41	4,90 ± 0,63	4,06 ± 0,57
10 mg/l	2,18 ± 0,44	1,54 ± 0,39	2,30 ± 0,43	4,93 ± 0,63	4,88 ± 0,65
20 mg/l	1,86 ± 0,39	1,64 ± 0,36	2,36 ± 0,44	4,88 ± 0,63	6,62 ± 0,73
50 mg/l	1,40 ± 0,34	1,16 ± 0,31	1,68 ± 0,37	2,92 ± 0,48	7,32 ± 0,15

Tabel 5. 2,4-D mõju Haploppus gracilis'e kalluskoele

2,4-D konts.	IV KORDUS - 25 000 rakku					
	mitooside %	amitooside %	mitme tuu- maga rak- kude %	polümorfsete tuumadega rakkude %	nekrootil. tuumadega rakkude %	
1 mg/l	4,80 ± 0,62	0,40 ± 0,17	4,30 ± 0,58	0,90 ± 0,27	0,50 ± 0,19	
5 mg/l	3,90 ± 0,56	0,50 ± 0,19	4,60 ± 0,61	1,90 ± 0,39	2,90 ± 0,48	
10 mg/l	2,00 ± 0,40	0,60 ± 0,22	4,20 ± 0,58	2,40 ± 0,44	5,00 ± 0,64	
20 mg/l	1,90 ± 0,39	0,70 ± 0,23	4,40 ± 0,59	2,30 ± 0,45	6,10 ± 0,70	
50 mg/l	0,90 ± 0,27	0,40 ± 0,18	2,40 ± 0,43	1,80 ± 0,38	6,60 ± 0,79	

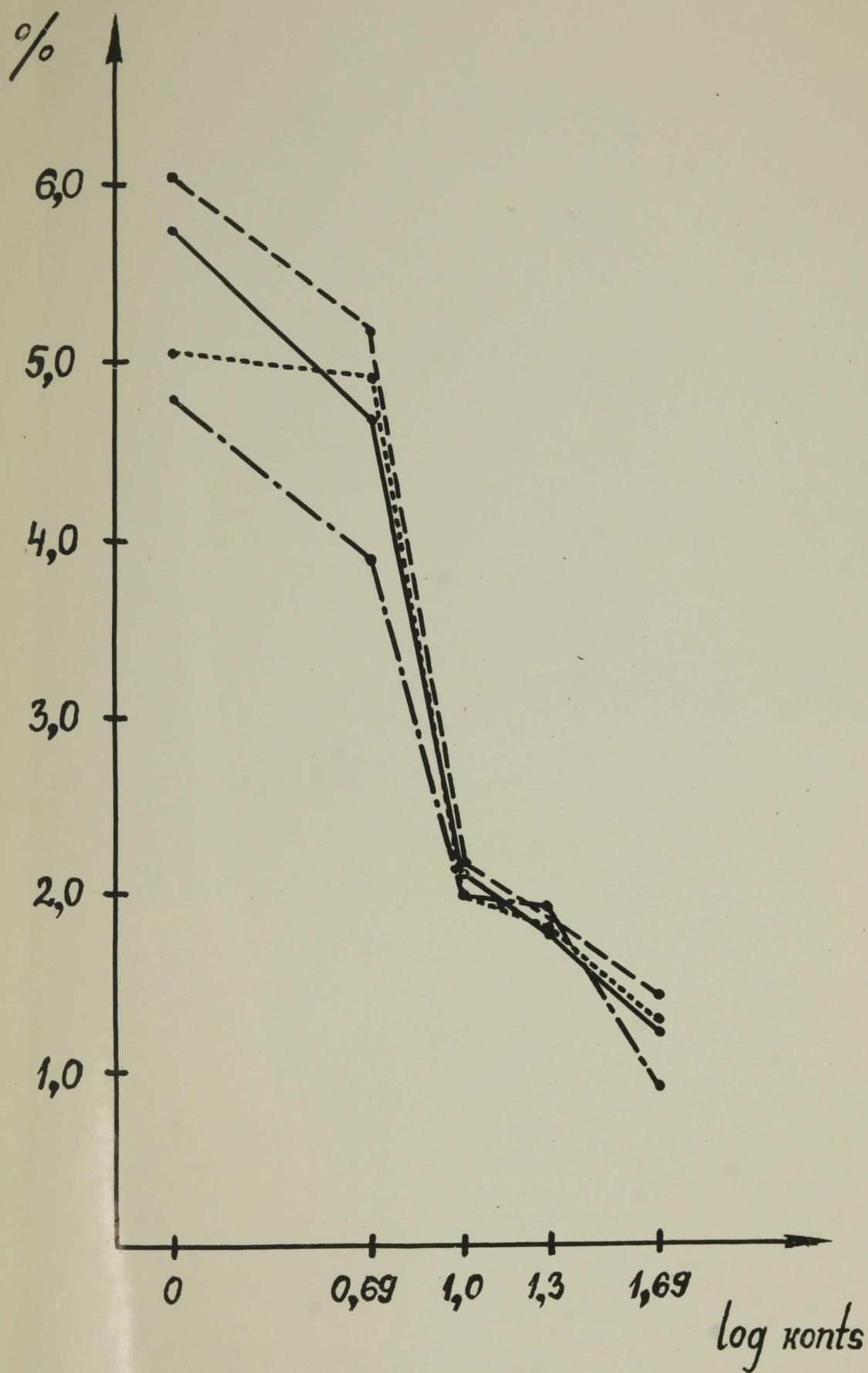
mine ruuthälve on võrdne ruutjuurega rakkude või tuumade vastavast arvust (Υρδax, 1963).

Mitooside sageduse sõltuvus 2,4-D kontsetratsioonist söötmes on toodud joonisel 1.3. Selgub, et kontrollsöötmele (1 mg/l 2,4-D) kasvaval kallusel on mitoosiindeks suhteliselt kõrge. Eri kordustes on see vastavalt 5,76 % ; 5,08 %, 6,06 % ja 4,8 %. 2,4-D suurema koguse lisandamine söötmele vähendab mitootilist aktiivsust. Kui söötmes on 5 mg/l 2,4-D, siis mitoosiindeksid korduste kaupa on vastavalt 4,72 %, 4,92 %, 5,2 % ja 3,9 %. Eriti tugevasti pidurdub mitootiline aktiivsus 2,4-D mõjul 5 mg/l-- 10 mg/l kontsetratsioonide puhul. Mitoosiindeksid on eri kordustes vastavalt 2,12%, 2,0%, 2,18% ja 2,0%. Edaspidi langeb mitootiline aktiivsus veelgi ja on 20 mg/l 2,4-D sisalduse puhul söötmes vastavalt 1,78 %, 1,8 %, 1,86 % ja 1,9 % ning 50 mg/l 2,4-D puhul 1,2 %, 1,28 %, 1,4 % ja 0,9 %.

2,4-D kõrgete kontsetratsioonide pärssivast toimest kallusrakkudele räägib selgesti ka nekrootiliste tuumadega rakkude indeksi pidev ja järsk tõus 2,4-D kontsetratsiooni suurenemisel (joon. 1.4, 1.4a, 1.4b). Eri korduste kontrollvariantides on nekrootiliste tuumadega rakkude indeksid vastavalt 0,4 %, 0,5 %, 0,52 % ja 0,5 %. 50 mg/l 2,4-D mõjul ulatub nekrootiliste tuumade sisaldus aga juba 7,72 %-ni, 6,96 %-ni, 7,32 %-ni ja 6,6 %-ni.

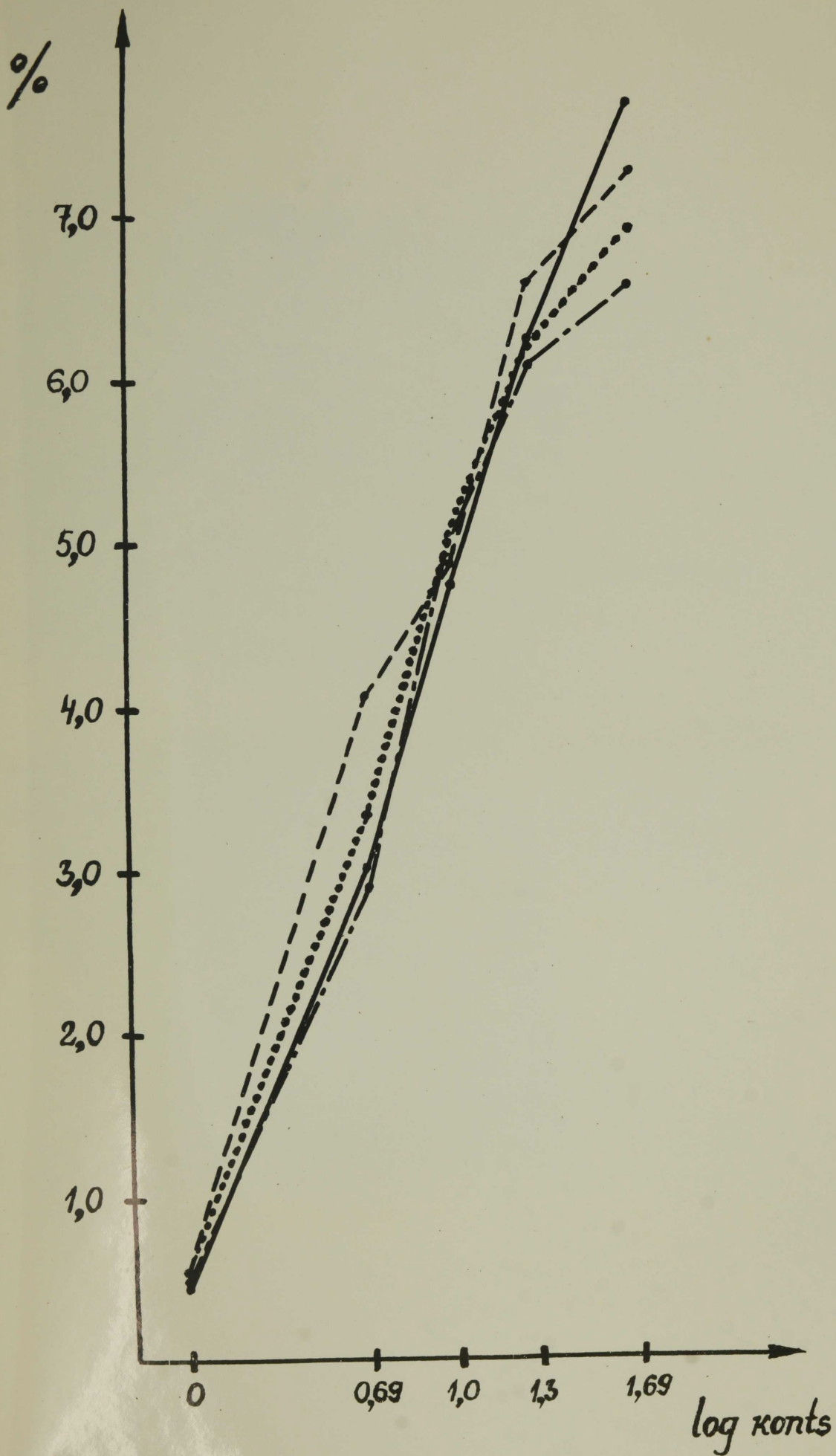
Joom.I3.. Mitooside hulga (%) sõltuvus 2,4-D
kontsentratsioonist söötmes..

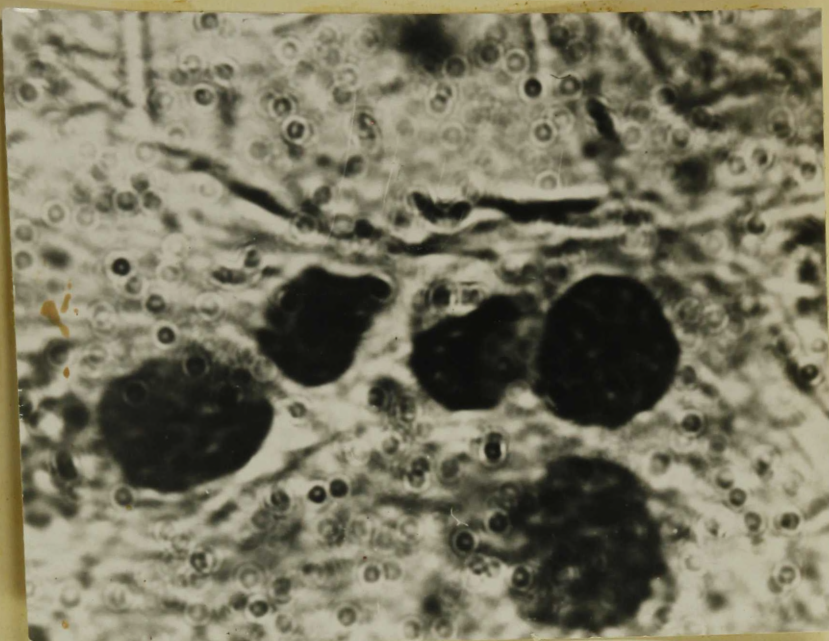
— I.. kordus
..... 2.. kordus
--- 3.. kordus
--- 4.. kordus



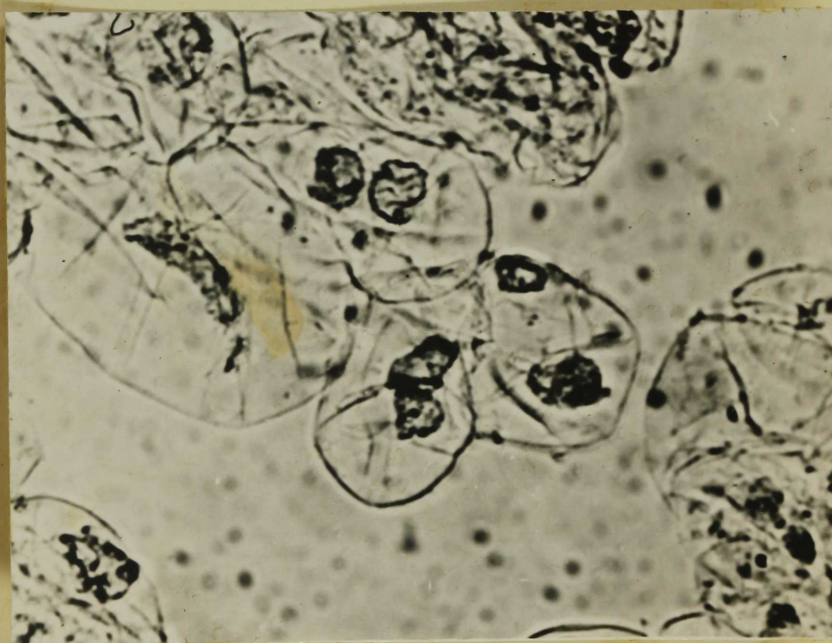
Joon. 14. Nekrootiliste tuumadega rakkude
hulga(%) sõltuvus 2,4-D kontsent-
ratsioonist söötmes.

—— I.. kordus
..... 2.. kordus
---- 3.. kordus
--- 4.. kordus





Joon.14a. Nekrootilised tuumad Haplopappus
gracilis'e kallusrakus.
 (Ok.20x, ob.40x.)



Joon.14b. Nekrootiliste tuumadega rakud Haplopappus
gracilise kalluskoes. (Ok20x, ob.20x.)

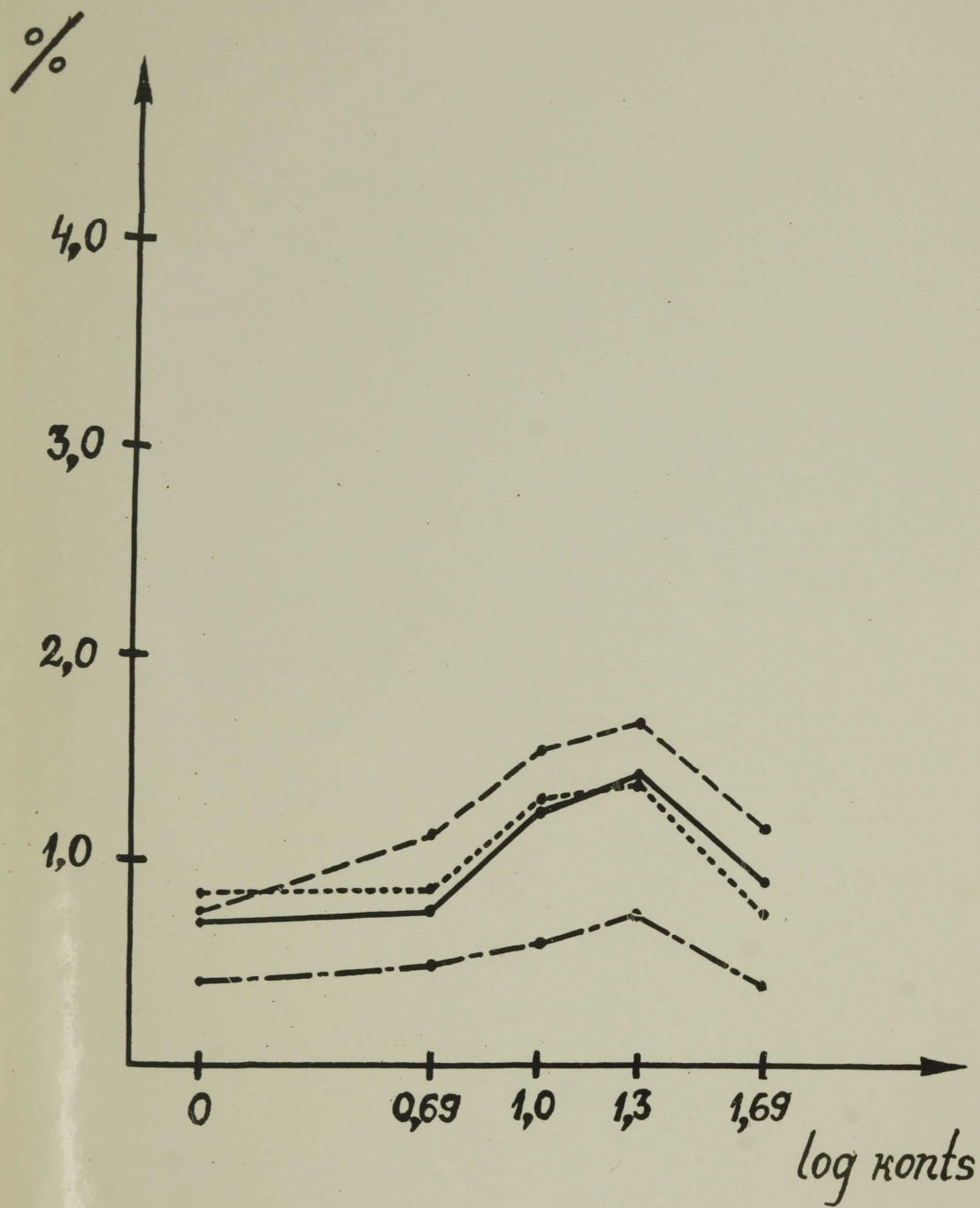
2,4-D mõju amitootiliselt jagunevate tuumade hulgale on esitatud joonisel 15. Amitootiliselt jagunevate tuumade hulgale ei avalda 2,4-D kontsetratsiooni tõus söötmes nii teravalt väljendunud mõju nagu mitootiliselt jagunevatele tuumadele, kuid võib täheldada siiski teatavat korrelatsiooni amitootiliste tuumade hulga ja 2,4-D kontsetratsiooni vahel söötmes. Korduste kontrollvariantides on amitootiliselt jagunevate tuumade protsent 0,7; 0,82; 0,74 ja 0,4. 5 mg/l 2,4-D mõjul muutub amitootiliste tuumade protsent suhteliselt vähe (0,78; 0,88; 1,12 ja 0,5). 10 mg/l 2,4-D lisandamine tõstab juba märgatavalt amitootiliste tuumade hulka (1,26; 1,3; 1,54 ja 0,6). Kõige rohkem amitootiliselt jagunevaid tuumi on kontsetratsiooni 20 mg/l 2,4-D korral (1,42%, 1,4%, 1,64% ja 0,7%). Kontsetratsioon 50 mg/l 2,4-D vähendab ka amitootiliselt jagunevate tuumade arvu: vastavad indeksid on jälle kontrollvarianti tasemel või alla selle (0,8%, 0,74%, 1,16% ja 0,4%).

Mitme tuumaga rakkude ja polümorfsete tuumadega rakkude hulga sõltuvus 2,4-D kontsetratsioonist söötmes on toodud joonistel 16 ja 17.

Joon. 16 analüüsil selgub, et eri korduste andmed on suuresti erinevad. Esimeses korduses on mitme tuumaga rakkude hulga sõltuvus 2,4-D kontsetratsioonist söötmes väga kõikuv. Kontrollvariandis on mitme tuumaga rakkude

Joon. 15.. Amitootiliselt jagunevate
tuumade hulga (%) söltuvus
2,4-D. kontsentratsioonist söötmes.

————	I.. kordus
-----	2.. kordus
-----	3.. kordus
-----	4.. kordus



Joon.16.. Mitme tuumaga rakkude hulga(%)

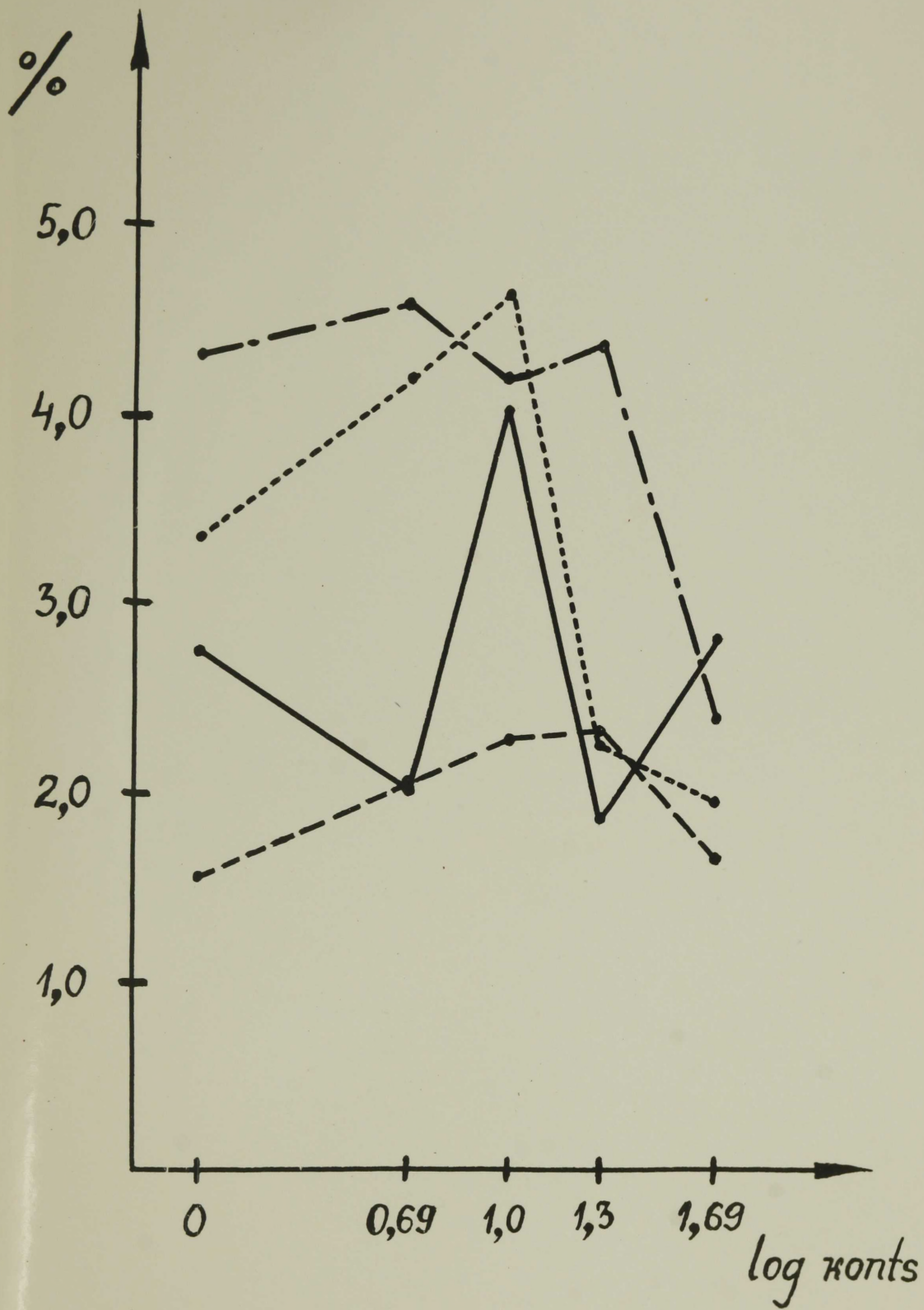
sõltuvus 2,4-D kontsentratsioonist
söötmes..

———— I.. kordus

..... 2.. kordus

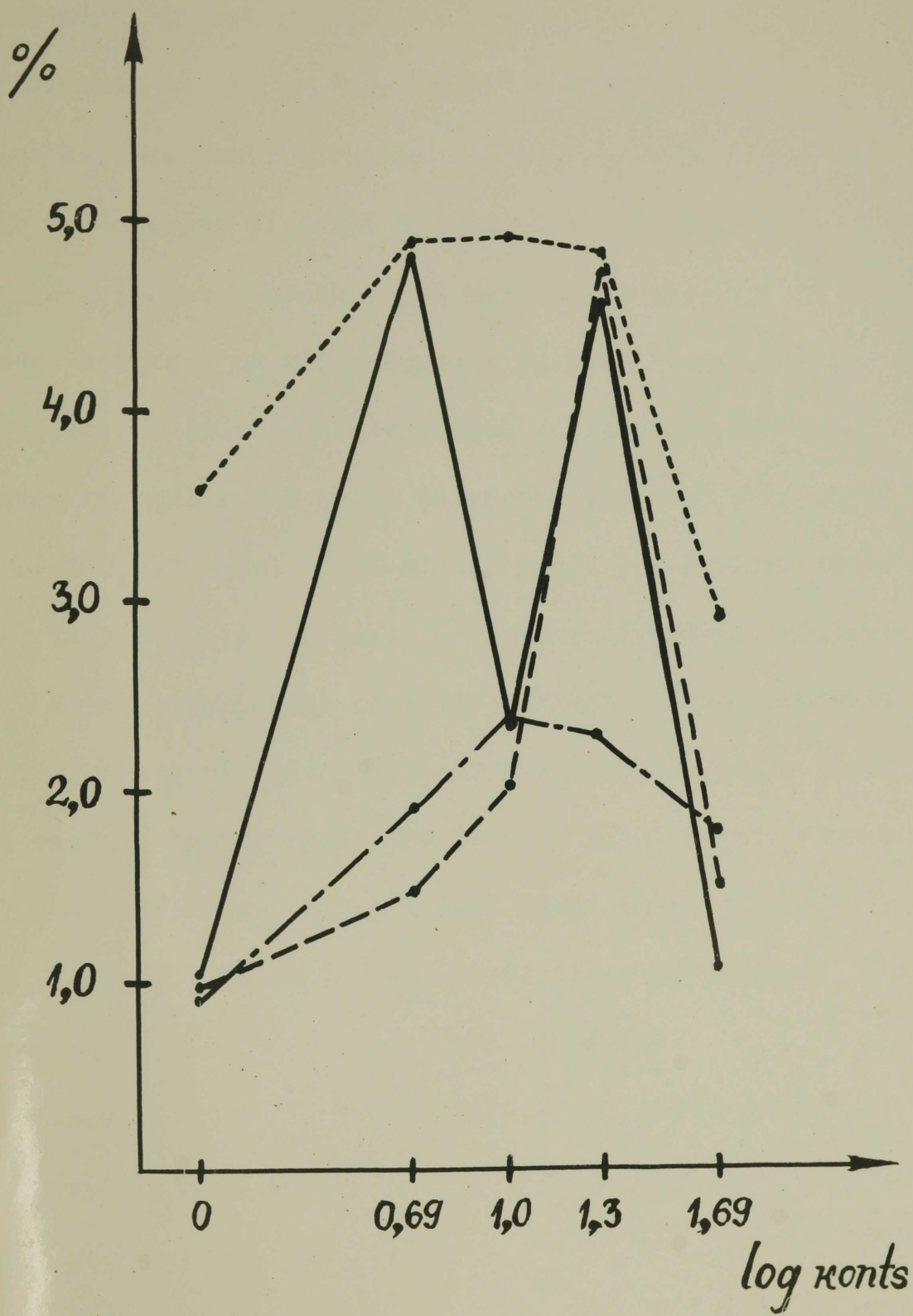
----- 3.. kordus

——— 4.. kordus



Joon. 17.. Polümorfsete tuumadega rakkude
hulga(%) sõltuvus 2,4-D kontsent-
ratsioonist söötmes..

—— I. kordus
----- 2.. kordus
----- 3. kordus
----- 4.. kordus



protsent 2,76, 5 mg/l 2,4-D mõjul langeb see 2,02-ni, 10 mg/l 2,4-D mõjul tõuseb järsult 4,04-ni, langedes jälle 1,88-ni, kui söötmes on 20 mg/l ja tõustes 50 mg/l 2,4-D mõjul 2,84-ni. Teise korduse kontrollvariandis on mitme tuumaga rakkude protsent 3,34, tõuseb pidevalt ja ulatub 10 mg/l 2,4-D mõjul 4,68-ni seejärel langeb järsult ja 50 mg/l 2,4-D mõjul on 1,98. Kolmandas korduses on mitme tuumaga rakkude hulga sõltuvus 2,4-D kontsetratsioonist söötmes märksa väiksem kui teistes kordustes. 1 mg/l 2,4-D puhul on vastav indeks 1,54%, tõuseb 10 mg/l 2,4-D mõjul 2,3%-ni ja 20 mg/l 2,4-D mõjul 2,36%-ni ning langeb jälle 50 mg/l 2,4-D puhul 1,68%-ni. Neljanda korduse kontrollvariandis on mitme tuumaga rakkude protsent teiste kordustega võrreldes küllalt kõrge, tõuseb 5 mg/l 2,4-D mõjul veelgi, langeb mõnevõrra 10 mg/l 2,4-D mõjul, tõuseb seejärel 20 mg/l 2,4-D mõjul 4,4-ni ning langeb järsult 50 mg/l 2,4-D mõjul. Kõrge kontsetratsiooni mõjul ilmnesid üksikud eriti suure tuumade arvuga rakud (joon. 7.).

Joonise 17 analüüsil ilmneb, et ka polümorfsete tuumadega rakkude hulk varieerub tunduvalt korduste kaupa. Esimeses korduses teeb vastav indeks 2,4-D mõjul läbi teravad kõikumised. Kontrollvariandis on polümorfsete tuumadega rakke 1,02%, 5 mg/l 2,4-D kontsetratsiooniga söötmel juba 4,82%. 10 mg/l 2,4-D mõjul langeb nende hulk 2,34%-ni, tõuseb seejä-

rel 20 mg/l 2,4-D mõjul jälle 4,6%-ni ja langeb lõpuks 50 mg/l 2,4-D puhul peaaegu esialgsele tasemele (1,06%). Teise korduse kontrollvariandis on polümorfsete tuumadega rakke 3,58%, vastav indeks püsib 5mg/l - 20 mg/l 2,4-D kontsetratsiooni puhul peaaegu ühtlasel tasemel (4,9%, 4,93% ja 4,88%) ning langeb 50 mg/l 2,4-D mõjul järsult 2,92%-ni. Kolmanda korduse kontrollvariandis on polümorfse tuumaga rakke 0,96%. 2,4-D kontsetratsiooni suurenedes söötmes tõuseb vastav indeks pidevalt ja ulatub 10 mg/l 2,4-D mõjul 2,02%-ni. 20 mg/l 2,4-D kontsetratsiooni puhul tõuseb polümorfsete tuumadega rakkude indeks järsult 4,76%-ni ja langeb 50mg/l 2,4-D mõjul 1,5%-ni. Neljanda korduse kontrollvariandis on polümorfsete tuumadega rakkude indeks 0,9%, tõuseb pidevalt kuni 2,4%-ni 10 mg/l 2,4-D kontsetratsiooni puhul söötmes, 20 mg/l 2,4-D mõjul saavutab maksimaalse väärtuse (4,4%) ja 50 mg/l 2,4-D mõjul langeb jälle 1,8%-ni.

Küna mitme tuumaga rakkude hulga ja polümorfsete tuumadega rakkude hulga sõltuvused 2,4-D kontsetratsiooni tõusust söötmes osutusid eri kordustes nii erinevateks ja sageli isegi vasturääkivateks, siis ei olnud võimalik täheldada mingisuguseid seaduspäraseid korrelatsioone mõjuaine hulga ja vastavate indeksite vahel.

K O K K U V Ö T E

2,4-D lisandiga (1 mg/l) Murashige-Skoog'i söötmel kasvatatud Haplopappus gracilis'e kolme aasta vanust kallusklooni iseloomustab rakkude üldine polüploidisus (enamasti 6n-8n). Viimast võis eeldada ka Z.Shamina (1965) andmete järgi, kellel Haplopappus gracilis polüploideerus 0,5 mg/l 2,4-D mõjul juba kaheksa kuu jooksul.

Erinevalt Z.Shamina (1965) andmetest sisaldasid minu poolt uuritud klooni rakud hulgaliselt kromosoomaberratsioone. Vaadeldud ana- ja telofaasidest osutusid 98 % aberratiivseteks. Kui Z.Shamina järgi väheneb passaažide vältel aberratsioonide, ^{hulk} siis käesoleva klooni kohta seda ei saa öelda.

Antud klooni on kasvatatud kolm aastat pidevas pimeduses, kuid vaatamata sellele on säilinud mitooside ööpäevane rütm. Mitootilise jagunemise intensiivsusel on ööpäevas kaks maksimumi: hommikul kell 8⁰⁰ ja öhtul kell 20⁰⁰.

Kirjanduse andmetel on seni uuritud 2,4-D madalate kontsetratsioonide toimet koekultuuridele, käesolevas töös võeti aga vaatluse alla kõrgete kontsetratsioonide (5 mg/l-50 mg/l) toime. Ilmnes, et 2,4-D kontsetratsiooni tõustes söötmes langeb üldiselt mitootiline aktiivsus. Eriti terav langus toimub 5 mg/l ja 10 mg/l vahel. 2,4-D pärssivast toimest räägib ka nekrootiliste tuumade arvu pidev tõus 2,4-D

kontsetratsiooni suurenemisel. Vaatamata mitooside indeksi üldisele langusele ja nekrootiliste tuumade hulga suurenemisele ilmutab antud Haplopappus gracilis'e kloon suhteliselt tugevat resistentsust 2,4-D suhtes. Võib oletada, et resistentsus seostub koe polüploidisuse kõrge astmega.

Teatavat korrelatsiooni, kuigi mitoosidega võrreldes märksa nõrgemat, võib täheldada ka 2,4-D kontsetratsioonide ja amitootiliselt jagunevate tuumadega rakkude arvu vahel: 2,4-D kontsetratsiooni tõusul suureneb esialgu amitootiliste tuumade hulk, 2,4-D kontsetratsiooni edasisel suurenemisel hakkab aga uuesti vähenema. Ühtlasi ilmneb teatav vastandlikkus mitootilise aktiivsuse kõveraga 5 mg/l ja 10 mg/l 2,4-D vahel. Võib arvata, et mitootilist jagunemist pärssivad tingimused mingil viisil soodustavad rakkude otsest jagunemist.

Polümorfsete tuumadega ja mitmetuumaliste rakkude hulga ning 2,4-D kontsetratsioonide vahel ei olnud võimalik kindlaks teha mingisugust seaduspärast seost.

Allkiri: Haumit

VI РЕЗЮМЕ

Выращиваемая в течение трех лет на питательной среде по Мурасиге- и Скугу с добавлением 2,4-Д (1мг/л) каллусная ткань *Haplo-rappus gracilis* характеризуется общей полиплоидизацией клеток (6n-8n). Данный клон выделяется и высоким содержанием хромосомных перестроек - 98% из изученных ана- и телофаз оказывались абберративными.

Несмотря на трехлетнее культивирование каллусной ткани в условиях постоянной темноты, сохранялся суточный ритм митозов. Максимумы митотической активности отметились в 80 и 20 ч.

Основной задачей работы было изучение воздействия высоких концентраций 5мг/л - 50мг/л на каллусную ткань *Haplo-rappus gracilis*. Оказывалось, что с повышением концентраций 2,4-Д в среде уменьшается митотическая активность, особенно резко при концентрациях 5-10мг/л. О тормозящем влиянии 2,4-Д на каллусные клетки свидетельствует и увеличение числа некротических ядер с повышением концентраций 2,4-Д. При всем этом нельзя не указывать на весьма сильную резистентность ткани в отношении воздействия 2,4-Д митозы проявляются даже при добавлении к среде 50-мг/л 2,4-Д. Можно подумать, что такая резистентность связывается с высокой степенью полиплоидности клеток каллуса.

Определенная корреляция проявляется и между концентрацией 2,4-Д и количеством амитотических ядер в каллусе: с повышением концентрации 2,4-Д сперва увеличивается, а потом снова падает число амитотических ядер. Обнаруживается и некая противоположность с митотической активностью при

концентрации 5 - 10 мг/л 2,4-Д. Условия, ин²гибирующие митозы, повидимому, каким-то образом содействуют амитотическому делению ядер.

Между прочим количеством полиморфных ядер и концентрации 2,4-Д, а также между количеством многоядерных клеток и концентрацией 2,4-Д не удалось установить какой-то определенной корреляции.

VII KASUTATUD KIRJANDUS

- D'Amato, F. 1965. Endopolyploidy as a factor in plant tissue development. -Proc. Intern. Conf. Plant Tissue Culture: 449-462. Berkeley.
- Blakely, L.M., Steward, F.C. 1964. Growth and organized development of cultured cells. Amer. Jour. Bot. 51: 780-791.
- Elektriseadmete ehituse eeskirjad. 1966. 1. jagu. Üldeeskirjad. Tln., "Valgus".
- Eriksson, T. 1965. Some effects of ultraviolet irradiation on the cytology and growth of cultures of Haplopappus gracilis. -Proc. Intern. Conf. Plant Tissue Culture: 493-497. Berkeley.
- Eriksson, T. 1967a. Duration of the mitotic cycle in cell cultures of Haplopappus gracilis. -Physiol. Plant., 20: 348-354.
- Eriksson, T. 1967b. Physiological and cytological studies on cell cultures of Haplopappus gracilis. -Acta Univ. Upsaliensis. Abstr. Uppsala Dissert. Sci., 93.
- Faludi, B. 1962. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on phospholipids. -Ann. Univ. Sci. Budapestinensis 5: 63-67.
- Faludi, B., Daniel, A.F., Gyurjan, I., Anda, S. 1963. Sugar antagonisms in plant tumour cells induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. -Acta Biol. Hung., 11, 3: 183-190.
- Faludi, B., Gyurjan, I., Faludi-Daniel, A., Pacsery, M. 1965. Molecular structure and tumorous growth inducing effect of chlorosubstituted phenoxyacetic acids in potato tissue culture. -Acta Biol. Hung., 15, 3: 321-329.

- Hayashi, T. 1968. The diurnal rhythm in the mitotic frequency in the tobacco suspension culture. "Scient. Papers Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo", 18, 1:33-39.
- Kallak, H. 1967. Taimerakkude muutlikkusest koekultuuris.- "Eesti Loodus", 12:727-732.
- Kallak, H. 1968. Cell division and chromosome numbers in the tissue culture of Nicotiana tabacum.- Biol. Plant., 10, 3:199-204.
- Lasteasutuste, koolide, internaatkoolide ja tervishoiuasutuste tuleohutuse tüüpeeskirjad. Kinnit. ENSV ÜKKM 15.apr.1963. Kooskõlast. ENSV Hariduse Minist. 15.apr.1963. ja ENSV Tervishoiu Minist. 5.apr. 1963.-Tuleohutuse eeskirjade kogumik, Tln. 1965.
- Mitra, J., Steward, F.C. 1961. Growth induction in cultures Kaplopappus gracilis.- Amer. Jour. Bot. 48:358-368.
- Muir, W. 1965. Influence of variation in chromosome number of differentiation in plant tissue cultures.- Proc. Intern. Conf. Plant Tissue Culture:485-490.
- Mühling, G.N., Van't Hof, J., Wilson, G.B., Grigsky, B.H. 1960. Cytological effects of herbicidal substituted phenols.- Weeds, 8, 2:173-181.
- Partanen, C.R. 1963. Plant tissue culture in relation to developmental cytology.- Internat. Rev. Cytol. 15: 215-243.
- Partanen, C.R. 1965. Cytological behavior of plant tissues in vitro as a reflection of potentialities in vivo.- Proc. Intern. Conf. Plant Tissue Culture:463-471.
- Reinert, A., Torrey, J. 1961. In cell, organism and milieu.- Amer. Jour. Bot. 46:156-160.
- Rennert, A., Knypl, J.S. 1967. Growth and nitrogen distribution in callus and grown-gall tobacco tissue cultures, treated with kinetin(2-chloroethyl) trimethyl-ammonium chloride.- Biol. Plant., 6:416-423.

- Řeřábek, J. 1967. Role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and myo-inositol in the formation of the callus on excised roots of Solanum laciniatum. - Biol. Plant., 9, 4: 285-291.
- Sawamura, S. 1964. Cytological studies on the effect of herbicides on plant cells in vivo. - Cytologia, 29, 1: 86-102.
- Shamina, Z.B. 1965. Cytogenetic study of tissue culture of Haplopappus gracilis. - Proc. Symp. Mut. Proc. Prague, August 9-11: 377-380.
- Spurr, H.W., Holcomb, C.E., Hildebrandt, A.C., Riker, A.J. 1962. Influence of 2,4-D on growth and enzymatic activity of normal and crown-gall tissue cultures. - Plant. Physiol., 37: 23-24.
- Torrey, J. 1965. Cytological evidence of cell selection by plant tissue culture media. - Proc. Intern. Plant Tissue Culture: 473-484.
- Venketeswaran, S. 1963. Tissue culture studies on Vicia faba. - Caryologia, 16, 1: 91-100.
- Venketeswaran, S., Spiess, E.B. 1964. Tissue culture studies on Vicia faba. - Cytologia, 29: 298-310.
- Алов И.А., 1964 . Очерки физиологии митотического деления клеток. Изд. Медицина, М. Стр. 86-235.
- Атабекова А.И., 1965? О механизме возникновения полиплоидных ядер у растений. В сб. "Полиплоидия и селекция" М.-Л. Стр. 123-129.
- Бродский В.Я., 1966. Трофика клетки. Изд. "Наука", М. Стр. 131-213.

Бутенко Р.Г., 1964. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М. Стр. 29-77.

Бутенко Р.Г., Сидоренко П.Г., Степура Г.С., Павлова М.К., 1967.

Исследования биологии клеток высших растений в культуре. - "Цитология и генетика", I, 4: 5-11.

Воеводин А. В., 1964. Гербициды. Изд. "Колос", Л. Стр. 7-135.

Каллак Х., Ярвекюльг, ^{1968.} Л.О морфологической и цитологической разнокачественности каллуса

гороха. - "Цитология и генетика", 5: 408-414.

Ковалева Т.А., Шамина З.В., Бутенко Р.Г., 1968. ^{цитологическое изучение культуры ткани раувольфии (Rauwolfia lanata) - "Генетика", 5: 5-13.}

Леопольд А., 1968. Рост и развитие растений. Изд. "Мир", М.

Мамонтов С.Г., 1968. Суточный ритм митозов в многослойных плоских эпителиях. В сб. "Некотор. актуальн. вопр. биол. и мед.", М. Стр. 152-154.

Оттер М.х., 1968. Взаимосвязь между образованием антоциановых пигментов и азотным обменом в проростках гречихи. Автореферат дисс. канд. биол. наук. Таллин. Стр. 3-19.

Правила техники безопасности при работе на автоклавах.

1962. Утверждены президиумом ЦК профсоюза Охраны труда в лечебно-профилактических учреждениях. Профиздат.

Строев В.С., 1966. Цитогенетическая активность гербицидов-симазина и гидразида малеиновой кислоты. - "Генетика", 12. Стр. 130-133.

Урбах В. Ю., 1962. Математическая статистика для био-

логов и медиков. М. Стр. 157-160.

Хоцянов Л.Н, Лейтес Р.Т, Марцинковский В.И, 1958. Гигиена труда. М. Медгиз.

Шевченко В.В, 1965. Распределение разрывов в хромосомах Crepis capillaris под действием гидразида малеиновой кислоты. - "Генетика", 6:86-94.