

Н. Д. ТАРАСЕНКО

**ПОВЫШЕНИЕ МУТАГЕННОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭМС
И НИТРОЗОГУАНИДИНА ПОД ВЛИЯНИЕМ ФИТОГОРМОНОВ
ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА ЧАСТИЧНО СИНХРОНИЗИРОВАННЫЕ
ПРОРОСТКИ ЯЧМЕНЯ**

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 18 V 1970)

В последние годы получен ряд убедительных фактов, говорящих о том, что многие химические мутагены взаимодействуют с основаниями ДНК в период редупликации, вызывая ошибки спаривания, что приводит к изменению порядка оснований и, в итоге, к мутациям.

Знание генетических карт, т. е. порядка расположения генов в хромосоме, а также последовательность редупликации генов во времени (¹⁻⁷) дало возможность получать мутации определенных локусов, обрабатывая химическими мутагенами синхронизированные клеточные популяции *Escherichia coli* в определенное время (⁸⁻¹⁰).

В настоящей работе была поставлена задача выяснить закономерности индуцирования мутаций в ячменя при обработке проростков с частично синхронизированными клеточными делениями клеток — меристемы верхушечной почечки — этилметансульфонатом (ЭМС), а также при одновременном воздействии ростовыми веществами и химическими мутагенами. Фитогормоны, как известно, являются генетическими индукторами, а активные участки хромосом также, видимо, более доступны для мутагенов, чем репрессированные (¹¹).

Нами был использован метод температурной синхронизации, основанный на дифференциальной чувствительности к пониженной температуре редупликации ДНК, синтеза РНК и белков, с одной стороны, и процесса митоза — с другой (¹²). При пониженных температурах в клетках проростков редупликация хромосом замедляется и в митоз клетки не переходят, останавливаясь в профазе. Для начала митоза необходима более высокая температура.

Если проростки поместить в холодильную камеру с температурой 3—4° на 240 час., а затем перенести в комнатную температуру, митотический индекс увеличивается в 25—30 раз.

Эксперименты проведены на сортах ячменя Винер и Тамми, а в качестве мутагенов использованы ЭМС (0,25%) и N — N-нитрозогуанидин* (2,5 мг/мл). Стимуляторы роста применены следующие: Na-соль нафеновых кислот (1 капля на 75 мл раствора мутагена), индолилуксусная кислота (0,25 стандартной таблетки (0,1 г) на 250 мл мутагена) и α -нафтилуксусная кислота (0,0002%).

Эксперименты проведены в теплице и в поле. Рис. 1 свидетельствует о том, что максимальной величины (25—27%) митотический индекс в верхней меристеме проростков достигает через 60—90 мин. после переноса проростков из холодильника в условия комнатной температуры. Кривая частоты появления семей с хлорофильными мутациями в M₂ показывает,

* Известно (¹⁰), что N — N-нитрозогуанидин действует как мутаген в период репликации бактериальной хромосомы.

что вводить мутаген необходимо не в период самого высокого митотического индекса, а спустя 5—6 час., когда задержанные холодом клетки пройдут стадии митоза и вступят вновь в S-период. В экспериментах был использован не метод замачивания проростков в растворе мутагена, основанный на диффузии и активном поглощении его и не позволяющий импульсно, в ограниченное время, подать мутаген в ткани, а метод вакуум-инфильтрации⁽¹³⁾. Суть его заключается в создании вакуума (50—75 мм рт. ст.) в камере, где проростки (или только их верхняя меристема) погружены в раствор химического мутагена, и последующем быстром (0,5—1,0 сек.) уравнивании давления с атмосферным, — раствор при этом эффективно и быстро инфильтрирует в ткани. Весь процесс создания вакуума с последующей инфильтрацией занимал 3 мин. Более глубокий вакуум приводил к резкому снижению выживания обработанных проростков, вплоть до полной гибели.

Частота семей с мутациями оказалась наиболее высокой в случае введения раствора ЭМС спустя 6 час. после переноса проростков в комнатную температуру, а спектр хлорофильных мутаций при этом был самый широкий. Обработка мутагеном через 1 и 3 часа после переноса проростков в комнатную температуру вызывала появление мутаций с низкой частотой; в этих вариантах были обнаружены только два типа хлорофильных мутаций — *albina* и *xantha*.

Вероятно, большинство клеток, в том числе, по-видимому, и инициальные, из которых возникают генеративные органы, спустя 5—6 час. после переноса проростков в условия комнатной температуры, находятся в S-периоде, поэтому они и оказываются наиболее чувствительны к ЭМС и дают всплески мутаций. Впрочем, вывод этот не однозначен, так как точными данными о времени редупликации хромосом в инициальных клетках мы не располагаем.

Применение названных выше фитогормонов, которые ускоряют, стимулируют процессы репликации и транскрипции и, таким образом, облегчают взаимодействие химических мутагенов с открытыми участками оснований ДНК, дало следующие результаты.

Из табл. 1 видно, что эффект от использования N — N-нитрозогуанидина возрос ниже, чем воздействия ЭМС. Увеличение частоты мутаций в 3 раза наблюдалось в варианте № 5, при замачивании сухих семян, а особенно в варианте № 6 — при замачивании семян в растворе мутагена совместно с ростовыми веществами, где частота повышалась в 11—21 раз по сравнению с контролем. Снижение выживаемости во всех вариантах при замачивании проростков объясняется более сильным повреждением первичных корешков, показанным нами ранее⁽¹⁴⁾. Спектр мутаций отличался от контроля в варианте № 3 (замачивание проростков в ЭМС), где отсутствовали мутации типа *tigrina* и семьи с мутантными сеянцами типа *albina* — *xantha*, и в варианте № 8 (замачивание в N — N-нитрозогуанидине с α -нафтилуксусной кислотой), где отсутствовали мутации типа *tigrina*, *striata*, *albinaxantha* и светло-зеленые с пятнами.

Таким образом, для увеличения частоты мутаций и изменения их спектра целесообразно использовать ростовые вещества в сочетании с химическими мутагенами, особенно такими как N — N-нитрозогуанидин, действующий в S-период.

В работе⁽¹⁵⁾ была сделана интересная попытка индуцировать хлорофильные мутации у ячменя в период редупликации хромосом. В некото-



Рис. 1. Частота мутаций при введении ЭМС спустя разное время после синхронизации. 1 — митотический индекс, 2 — частота мутаций

рых хромосомах репликация начинается от центромеры и идет к теломерному участку, а в других — наоборот. Было обнаружено, что хлорофильные мутанты типа *xantha* появляются через 60 мин. после начала S-периода, в то время как мутанты типа *tigrina* возникают только спустя 90 мин.

Таблица 1

Модифицирующее влияние стимуляторов роста на мутагенное действие ЭМС и N—N-нитрозогуанидина (ячмень, сорт Винер, опыт в полевых условиях)

№ п. п.	Варианты опыта	Выживание в M ₂ , %	Число изуч. семей в M ₂	Частота семей с мутациями в M ₂ , %	Спектр хлорофильных мутаций						
					albina	xantha	tigrina	striata	albina-xantha	chlorina	св.-зел. с пятнами
1	Контроль (после синхронизации)	94,1	480	0,83±0,15	+	+	—	—	—	—	—
2	Сухие семена в ЭМС	96,9	385	33,7±2,4	+	+	—	+	+	+	+
3	Синхронизация + замачивания в ЭМС	77,7	241	26,1±2,3	+	+	—	+	—	+	+
4	Синхронизация + замачивание в ЭМС с Na-солью нафтенных кислот	67,7	225	35,1±2,15	+	+	+	+	+	+	+
5	Замачивание сухих семян в N—N-нитрозогуанидине	54,4	285	3,2±1,1	+	+	—	—	—	—	—
6	Синхронизация + замачивание в N—N-нитрозогуанидине	67,4	301	1,0±0,36	—	+	—	—	—	—	—
7	Синхронизация + замачивание в гуанидине с ИУК	40,6	112	24,4±2,1	+	+	+	+	+	+	+
8	Синхронизация + замачивание в гуанидине с нафтилуксусной к-той	39,6	105	11,1±1,3	+	+	—	—	—	+	—

Примечание. Экспозиция в ЭМС и N—N-нитрозогуанидине 18 час.

и более. *Albina*, *viridis* и *striata* появлялись при обработке мутагеном в начале S-периода, в то время как *chlorina* возникали при обработке в конце S-фазы.

Нами отмечено появление мутаций типа *albina* и *xantha* при обработке частично синхронизированных проростков через 1 и 3 часа после переноса в комнатную температуру, что по времени соответствует началу S-периода, в то время как введение ЭМС через 6 час. вызывало появление мутации типа *tigrina* и *chlorina*. Полученные результаты в основном совпадают с данными ⁽¹⁵⁾ для несинхронизированных проростков.

Необходимо отметить, что главная трудность в правильной интерпретации полученных результатов, как отмечают многие авторы, состоит в существовании большого числа локусов, мутирование которых приводит к сходному фенотипическому эффекту. Например, около 300 генов влияют на развитие зеленой окраски у ячменя. Для получения мутации типа *albina*, по мнению А. Густафссона, необходимо изменение одного из 125—150 локусов, около 125 — для *viridis*, 10—15 для *xantha* и 15—20 для редких типов.

Естественно, что мутации типа *albina* и *viridis* должны появляться примерно в 10 раз чаще других типов. В наших опытах *albina* появлялись наиболее часто, а *viridis* практически отсутствовали, в то время как в опытах по инфильтрации мутагенов в предварительно синхронизированные проростки и в опытах с α-нафтилуксусной кислотой *xantha* появлялись в 10 раз чаще, чем *albina*.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что частота семей с хлорофильными мутациями резко увеличивается, если вводить ЭМС в проростки ячменя методом вакуум-инфильтрации не сразу после окончания синхронизации, а через несколько часов, оптимально — через 6 час. По-видимому, это объясняется тем, что инициальные клетки верхней меристемы находятся в этот момент в S-периоде, когда митотический индекс мал. Совместное использование ростовых веществ и хими-

ческих мутагенов резко увеличивает частоту мутаций, причем расширяется спектр хлорофильных мутаций.

Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Академии наук СССР
Новосибирск

Поступило
5 V 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. Meselson, E. W. Stahl, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 44, 58, 672 (1958).
² K. G. Lark, T. Repko, E. Hoffman, Biochim. et biophys. acta, 76, 1, 9 (1963).
³ K. G. Lark, Cell Synchrony Studied in Biosynthetic Regulation, N. Y.—London, 1966, p. 54. ⁴ K. G. Lark, O. Maale, J. Mol. Biol., 23, 1, 99 (1967). ⁵ T. Nagata, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 49, 551 (1963). ⁶ H. Joshikawa, N. Sueoka, ibid., 49, 4, 559 (1963). ⁷ C. E. Helmstetter, J. Bacteriol., 95, 5, 1634 (1963). ⁸ F. J. Ryan, S. D. Cetrulo, Biochim. and Biophys. Res. Commun., 12, 6, 445 (1963).
⁹ Е. Н. Воронина, А. С. Пословина, Р. И. Салганик, Генетика, 4, 7, 89 (1968).
¹⁰ E. Cerda-Olmedo, P. C. Hanawalt, N. Guerola, J. Mol. Biol., 33, 3, (1968). ¹¹ R. D. Brock, Induced Mutations in Plants, Proc. of a Symposium Pullman, 14—19 July. Intern. Atomic Energy Agency, Vienna, 1969, p. 93. ¹² Н. Д. Тарасенко, Г. С. Майкевич, и др., Цитология, 13, № 4 (1971). ¹³ Н. Д. Тарасенко, В кн. Индуцированный мутагенез у растений, Таллин, 1971. ¹⁴ Н. Д. Тарасенко, ДАН, 183, № 3, 700 (1968). ¹⁵ M. S. Swaminathan, Induced Mutation in Plant. Proc. of a Symposium Pullman, 14—19 July. Intern. Atomic Energy Agency, Vienna, 1969, p. 719.