

Т. В. САЛЬНИКОВА

**ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ НОВОГО
СУПЕРМУТАГЕНА (НДЭМ) НА МЯГКОЙ ПШЕНИЦЕ
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТИПА РАСТВОРИТЕЛЯ
И pH РАСТВОРА**

(Представлено академиком Н. П. Дубининым 23 V 1974)

За последние годы в химическом мутагенезе на высших растениях большое внимание уделяется изучению действия нитрозосоединений (¹⁻⁴), из которых наиболее высоким мутагенным эффектом характеризуются N-нитрозоалкилмочевины (⁵).

Ранее нами показано (³), что аналог супермутагена N-нитрозометилмочевины (ННМ) — N-нитрозодиметилмочевина — на мягкой пшенице в ряде случаев превосходит по генетической активности НММ и, кроме того, обладает по сравнению с последней более слабыми токсическими свойствами.

В связи с этим представляло интерес изучить мутагенную активность N-нитрозодиэтилмочевины (НДЭМ) — аналога другого супермутагена из группы N-нитрозоалкилмочевины (НАМ) — N-нитрозоэтилмочевины (НЭМ).

НДЭМ синтезирована и передана нам на испытание А. М. Серебряным. В предварительных исследованиях установлено (⁶), что НДЭМ в клетках корневой меристемы у мягкой пшеницы индуцирует перестройки хромосом с частотой, близкой к частоте аббераций, вызываемых НЭМ, и в M_1 вызывает у этой культуры довольно высокую частоту мутантов. Сведений относительно мутагенной активности НДЭМ по частоте вызываемых ею в M_2 видимых мутаций в литературе не известно.

Рядом авторов на различных объектах показано, что токсические, а иногда и мутагенные свойства НАМ в значительной степени определяются значениями pH раствора (^{3, 7, 8}). Причину изменения мутагенных свойств НАМ в различных условиях pH некоторые исследователи связывают с неодинаковым временем полураспада этих мутагенов в кислых и щелочных растворах (⁸). Чем быстрее мутаген достигнет генетического материала клетки, тем меньше будет зависеть его мутагенный эффект от времени полураспада. Из литературных данных известно, что хорошим транспортером различных веществ, в том числе и мутагенов, является органический растворитель диметилсульфоксид (ДМСО) (^{9, 10}). С другой стороны, установлено, что ДМСО снижает генетическую активность соединений (^{11, 12}), в силу, по-видимому, наличия у него защитных свойств (¹³⁻¹⁵).

В связи с вышеизложенным мы поставили задачу провести сравнительное изучение мутагенной активности НДЭМ при растворении ее в фосфатном буфере и таких малоизученных для биологических систем органических растворителях, как диоксане (ДО), диметилформамиде (ДМФА), серном эфире (СЭ). Одновременно исследовали зависимость мутагенного эффекта НДЭМ от pH раствора.

На воздушно-сухие семена озимой пшеницы сорта Белоцерковская 198 воздействовали растворами НДЭМ в концентрациях 0,005 и 0,01 %. В случае использования растворителей навеску мутагена растворяли сначала в чистом растворителе, количество которого определяли из расчета, чтобы в растворе концентрация ДО составляла 2,5 %, ДМФА и СЭ 5,0 %. Концен-

трации растворителей подобраны по критерию эквитоксичности. Полученный раствор выливали в 0,2 М фосфатный буфер с рН 5,7 или 7,0. Контролями в опыте служили варианты замачивания семян в дистиллированной воде, фосфатном буфере рН 5,7 и органических растворителях указанных концентраций. Экспозиция воздействия во всех вариантах составляла 18 час., число обработанных семян в каждом варианте 500 штук.

Посев M_1 и M_2 проводили согласно существующей в химическом мутагенезе методике. В M_1 определяли всхожесть семян, степень стерильности растений, частоту появления измененных форм; в M_2 — частоту семей с мутантами, причем учитывали лишь формы с четко выраженными измене-

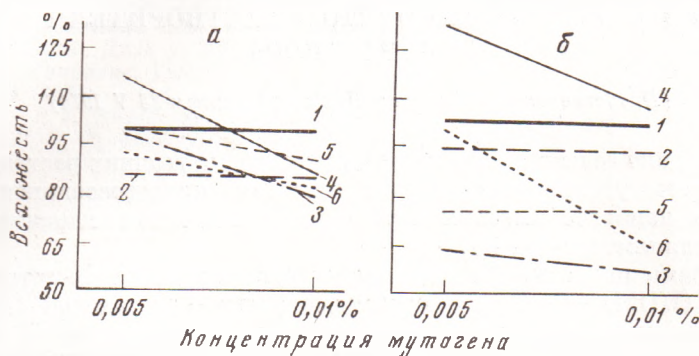


Рис. 1. Всхожесть семян мягкой пшеницы при воздействии НДЭМ, растворенной в фосфатном буфере и органических растворителях при рН 7,0 (а) и 5,7 (б). 1 — дистиллированная вода; 2 — фосфатный буфер; 3 — НДЭМ; 4 — НДЭМ+ДО; 5 — НДЭМ+ДМФА; 6 — НДЭМ+СЭ

ниями морфологических признаков колоса и соломины. К мутантам относили растения лишь после проверки их в M_3 . В M_2 по каждому варианту изучено 100—150 семей. Различия по частоте появления в M_2 семей с мутантами в различных вариантах опыта определяли по методу «фи». Всхожесть семян при замачивании их в дистиллированной воде принята нами за 100% (фактическая полевая всхожесть в данном варианте составляла 65,8%), по отношению к ней определена всхожесть семян в других вариантах опыта.

Как видно из рис. 1, всхожесть семян при замачивании в фосфатном буфере рН 5,7 и 7,0 несколько снизилась. В настоящем опыте подтвердились закономерности, выявленные нами для других НАМ⁽³⁾, а именно НДЭМ при растворении в буфере оказалась более токсичной в кислой среде (рис. 1б, 3), снизив в этих условиях всхожесть почти вдвое по сравнению с контролем (замачивание в дистиллированной воде). Растворение НДЭМ в органических растворителях привело к значительному уменьшению гибели семян, особенно при использовании буфера с рН 5,7. Лишь при растворении НДЭМ в СЭ при рН 7,0 наблюдали незначительное снижение всхожести по сравнению с обработкой НДЭМ в буферном растворе (рис. 1а, б). Значительная стимуляция всхожести отмечена при обоих значениях рН в вариантах растворения НДЭМ в ДО.

Следует отметить, что при обработке семян в растворах ДО и ДМФА всхожесть семян также была выше, чем при замачивании в дистиллированной воде, замачивание семян в растворе СЭ незначительно понизило всхожесть. Эти данные на рис. 1 не приводятся.

В M_1 учитывали степень стерильности растений по числу незавязавших зерен колосков на колос (в каждом варианте просматривали не менее 10 колосьев). Установлено, что при растворении НДЭМ в буфере без органических растворителей стерильность растений несколько выше, особенно при рН 5,7, по сравнению с обработкой НДЭМ в присутствии растворите-

лей. В вариантах с использованием в качестве растворителя ДО стерильность растений немного повышалась по сравнению с вариантами растворения НДЭМ в ДМФА и СЭ. Различия эти были статистически недостоверными.

По нашим многолетним наблюдениям, у сорта Белоцерковская 198 несмотря на тщательный отбор и пространственную изоляцию ежегодно в норме выщепляются красноколосые, безостые и в отдельные годы опушенные формы, общая частота которых достигает 6,0%. В связи с этим в M_1 и в M_2 ни в опыте, ни в контроле вышеуказанные формы не принимали в расчет; их учитывали в случае химерной их природы и если при доста-

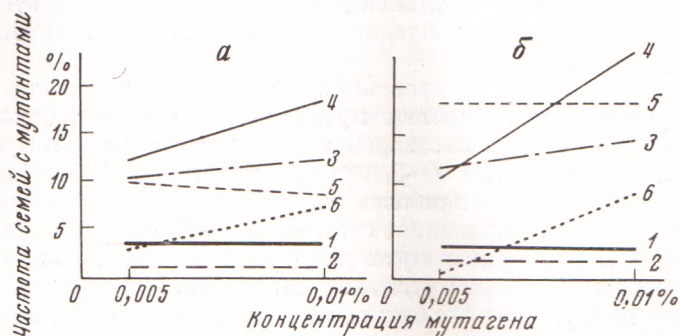


Рис. 2. Частота семей с мутантами в M_2 , индуцированная НДЭМ в нейтральной среде (а) и кислой (б) при использовании органических растворителей и без них. Обозначения те же, что на рис. 1

точном числе растений в семье M_2 отношение таких форм к растениям с фенотипом исходного сорта составляло 3 : 1 (красная окраска колосковых чешуй, безостость и опушенность у сорта Белоцерковская 198 — доминантные признаки).

В настоящем исследовании об изменении генетической активности НДЭМ в зависимости от условий обработки судили по выходу мутантов в M_1 и частоте семей с мутантами в M_2 . После проверки на наследование найдено, что количество мутантов, проявившихся в M_1 , невелико во всех вариантах опыта (не более 2,5%) и частота их появления статистически недостоверна. Однако наблюдали тенденцию повышения выхода мутантов в M_1 при обоих значениях рН в вариантах использования органических растворителей.

Число мутантных признаков в M_1 ограничивалось одним-двумя. Это были в основном плотноколосые формы и спельтоиды. При воздействии НДЭМ 0,005% при рН 7,0 с использованием СЭ в M_1 выделен мутант-сферококкод.

Частота появления семей с мутантами в M_2 (после проверки на наследование) представлена на рис. 2. Из этих данных можно сделать следующие выводы. Во-первых, генетическая активность НДЭМ возрастает в кислой среде. Подтверждением этого служит высокая значимость различий между вариантами растворения НДЭМ в ДМФА при рН 5,7, с одной стороны, и при рН 7,0 — с другой (рис. 2, б). Приближались к достоверным различия по выходу мутантов в M_2 между вариантом растворения НДЭМ (концентрация 0,01%) в ДО при рН 5,7 и аналогичным вариантом, но при рН 7,0. Во-вторых, растворение НДЭМ в ДО при обоих значениях рН приводило к значительному повышению ее генетической активности по сравнению с растворением НДЭМ в фосфатном буфере (различия, определенные по методу «фи», в данном случае были либо значимы, либо приближались к достоверным). Усиление мутагенных свойств НДЭМ при растворении ее в ДМФА при 5,7, а также небольшой спад активности мута-

гена, растворенного в ДМФА при pH 7,0, статистически недостоверны. Снижение генетической активности НДЭМ при растворении ее в СЭ в кислой и в нейтральной среде оказалось высокосущественным.

На рис. 2 не приведены данные по частоте появления семей с мутантами, вызванными растворами органических растворителей. При pH 7,0 ДО, ДМФА и СЭ в применявшихся концентрациях индуцировали в M_2 мутанты в количестве $2,3 \pm 1,35$; $8,5 \pm 2,58$ и $7,3 \pm 2,22\%$ соответственно. При pH 5,7 частота семей с мутантами при воздействии растворами этих растворителей соответственно составляла $4,3 \pm 1,7$; $3,4 \pm 1,48$ и $3,1 \pm 3,07\%$. Из приведенных данных следует, что ДО является наиболее инертным в биологическом отношении соединением в то время, как ДМФА и СЭ, особенно в нейтральной среде, обладают определенной биологической активностью.

Изучение спектров индуцированной изменчивости показало, что в большинстве случаев высокой частоте мутантов соответствует более широкий спектр мутаций. Так, при растворении НДЭМ в фосфатном буфере число типов изменений равнялось 4–5, при растворении НДЭМ в ДМФА 5–6 и при растворении в ДО (наиболее эффективном органическом растворителе) число мутантных признаков составляло 7–8. Как указывалось выше, СЭ способствовал снижению мутагенной активности НДЭМ, однако при невысокой частоте семей с мутантами спектр индуцированной НДЭМ изменчивости в присутствии СЭ был достаточно широким (6–7 типов). Наиболее часто появляющимися во всех вариантах опыта являлись плотноколосые растения, низкорослые с плотным колосом, спельтоиды, рыхлоколосые. Реже возникали скверхеды и полускверхеды. В трех вариантах выделены мутанты, характеризующиеся округлыми колосковыми чешуями и округлым зерном. От полученных нами ранее сферококкоидов их отличает высокая озерненность и отсутствие химерной природы. В варианте НДЭМ 0,01% + ДМФА (pH 5,7) получена форма, у которой число колосков в колосе вдвое превышало таковое колоса контроля. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что испытанный нами мутаген НДЭМ по способности индуцировать с довольно высокой частотой мутации у мягкой пшеницы и вызывать появление так называемых системных мутаций можно отнести к сильным химическим мутагенам — супермутагенам.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
23 V 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. Н. Зоз, С. И. Макарова и др., ДАН, т. 159, № 4, 915 (1964). ² С. И. Демченко, Автореф. канд. дисс., М., 1968. ³ Т. В. Сальникова, А. М. Серебряный, Генетика, т. 8, 5, 21 (1972). ⁴ К. И. Гечев, Автореф. канд. дисс., М., 1973. ⁵ И. А. Рапопорт, Сборн. Супермутагены, «Наука», 1966, стр. 9. ⁶ Н. Н. Зоз, А. М. Серебряный и др., Сборн. Успехи химического мутагенеза в селекции, «Наука», 1974, стр. 86. ⁷ Л. Л. Гумаков, А. Е. Бедняк и др., Сборн. Супермутагены, «Наука», 1966, стр. 34. ⁸ J. Velemisky, T. Gichner, Mutat. Res., v. 10, 43 (1970). ⁹ C. D. Leake, Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 141, 1 (1967). ¹⁰ C. A. Bhatia, Mutat. Res., v. 4, 3, 375 (1967). ¹¹ E. A. Siddiq R. P. Puri et al., Curr. Sci., v. 37, 24, 686 (1968). ¹² A. J. Muller, Arabidopsis Inform. Serv., № 6, 28 (1969). ¹³ B. A. Bridges, Radiation Res., v. 17, 801 (1962). ¹⁴ M. J. Ashwood-Smith, Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 141, 1, 45 (1967). ¹⁵ Е. Н. Гончаренко, Автореф. докт. дисс., М., 1973.