

И. А. РАПОПОРТ

МУТАЦИИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ПРОИЗВОДНЫХ ДИАЗОМЕТАНА В ГАЗОВОЙ ФАЗЕ

(Представлено академиком Д. К. Беляевым 30 IX 1974)

В группе алифатических диазосоединений есть уже несколько мощных мутагенов, оказавших влияние не только на теорию (¹), но и занявших видное место среди практических методов повышения частоты полезных наследственных изменений, используемых в селекции растений, животных и микроорганизмов. Для многих из них, однако, еще не осуществлена разработка экспериментальных методик мутагенного воздействия с точным обоснованием преимуществ и недостатков каждой из них. Более широкий выбор способов экспериментальной обработки увеличит, в частности, возможности генетического анализа и применения важной группы диазоалкансодержащих мутагенов.

У некоторых диазоалкансодержащих веществ выявилось поразительное своеобразие мутагенного эффекта, выделяющее их среди остальных химических мутагенов, так как им присущ мутагенный механизм, не связанный с хромосомными перестройками и выдающаяся избирательность мутагенного действия. В реакции генного материала на соприкосновение с такими мутагенами есть много своеобразного.

Как 1,4-бис-диазоацетилбутан (²) — один из наиболее широко изученных и оправдавших ожидание мутагенов рассматриваемой группы, хорошо зарекомендовал себя в опытах по мутационной селекции на сельскохозяйственных растениях и животных, но не действует на геномы ⁹/₁₀ актиномицетов. Самое существенное препятствие на пути еще более успешного применения диазометановых мутагенов в селекции — ограниченные возможности их использования в газовой фазе. Собственно диазометан, впервые генетически изученное нами (¹) газообразное вещество, слишком токсичен и мало пригоден для его использования при мутагенной обработке в газовой фазе. Это возможно лишь в условиях химической лаборатории и частом повторении синтезов. Помимо того, интенсивность действия диазометана — газа уступает интенсивности действия растворенного в воде 1,4-бис-диазоацетилбутана, но последний обладает слишком высокой точкой кипения, что делает невозможным использование его для обработки в газовой фазе. Между тем, газовая обработка обещает заметные преимущества вследствие возможности достигнуть значительно более высоких и эффективных дозировок. В разных аспектах необходимо изучать эффект этого своеобразного мутагена на уровне резко возросшего мутагенного влияния. В селекционном эксперименте обработка сухих семян в газовой фазе, позволяет применить значительно более сильное воздействие. Можно ожидать, что в таком случае появление хромосомных перестроек будет полностью исключено.

Среди разных диазосоединений для измерения активности в газовой фазе был выбран диазоуксусный эфир. В опытах 1948 г. у диазоуксусного эфира обнаружена активность в диапазоне средних доз рентгеновского излучения, но последующие отдельные эксперименты обещают заметно большую частоту наследственных изменений. В опытах 1948 г. диазоуксусный эфир вносили в питательную среду в отличие от диазометана, изучавшие-

гося также в газовой среде. В описанных опытах для этого в полуторалитровом эксикаторе помещали навеску испытываемого мутагена; в том же эксикаторе в пробирках находились известное время дрозифилы — личинки и взрослые насекомые. При этом пробирки закрывали не пробками, а закрывали двухслойной марлей.

Т а б л и ц а 1

Частота сцепленных с полом мутаций у взрослых насекомых и личинок дрозифилы под влиянием диазоуксусного эфира в газовой фазе

Доза диазоуксусного эфира на 1,5 л, мг	Продолжительность воздействия, дни	Стадия метаморфоза	Общее число хромосом	Число мутаций *
14	1—1,5	Взрослые насекомые	216	$\frac{5}{2,3}$
50	1	То же	345	$\frac{15}{4,3}$
50	1,5	»	252	$\frac{7}{2,7}$
25	3	Личинки	308	$\frac{23}{7,5}$

* Числа над чертой — абс. число, под чертой — в %.

Сроки жизни насекомых в контакте с диазоуксусным эфиром и 1,4-бис-диазоацетилбутаном резко различны. В эксикаторе с диазоуксусным эфиром насекомые погибали через 1—4 суток, тогда как в таком же замкнутом объеме в присутствии 1,4-бис-диазоацетилбутана они жили более месяца, не обнаруживая, как правило, мутагенного эффекта.

Результаты опытов с диазоуксусным эфиром в газовой фазе показаны в табл. 1.

В небольших опытах мы проводили суточную обработку в эксикаторе с диазоуксусным эфиром (50 мг), а следующие сутки насекомые находились вне эксикатора, затем следовали снова 24 часа обработки и такой же перерыв, что повторялось 4 раза. Выход мутаций в потомстве обработанных взрослых самцов поднялся до 8%.

Подвергнутая влиянию газообразного диазоуксусного эфира дрозифила отличается большим числом активно функционирующих ферментов, занятых регуляцией обмена веществ у взрослых насекомых, и многочисленными морфогенными, а также метаболическими ферментами в личинке. Это снижает мутагенный выход ввиду ингибирующего и токсического действия диазоуксусного эфира. К этому надо добавить чувствительность нервной системы насекомых, к этой обработке, о чем можно судить по их замедленному движению. Все же чувствительность личинок оказалась меньше, видимо потому, что они находились в питательной среде, углубляясь в которую им удавалось ослабить токсическое действие мутагена.

Целесообразно применить диазоуксусный эфир в мутагенной селекции растений, так как есть необходимость в мутагене, действующим в газовой фазе и не вызывающим хромосомных перестроек.

Обязательным условием такого воздействия должно быть использование сухих семян, а порой даже дополнительное подсушивание их до предела, не угрожающего прорастанию. В сухих семенах продолжается процесс дыхания и поэтому исключено токсическое влияние мутагена на ряд других жизненно важных ферментов, атакуемых тем же мутагеном в намоченных семенах.

Другим преимуществом обработки diazometансодержащим мутагеном является возможность действовать им на сухие споры цветковых растений в целях генетических и селекционных исследований. До сих пор подобные опыты с данным видом мутагенов еще не проводились и тем самым был потерян перспективный подход, особенно важный для решения задачи создания нового гетерозисного материала, поскольку diazometансодержащие мутагены проявили себя лучше других в условиях водных растворов. Избирательность мутагенного действия diaзоуксусного эфира определяется его заметным родством с генной субстанцией, значительно большим, чем с другими материалами в клетке. Очередной задачей является максимальное ослабление действия этого мутагена на ферменты. Diaзоуксусный эфир неодинаково влияет на различные функционирующие ферменты в организме, но чем функционирующих ферментов меньше, тем больше шансов добиться высоких частот индуцированных мутаций. Сухие семена и споры больше всех других объектов обработки обещают успех.

Diazometансодержащие соединения выделяются также заметным стимулирующим действием и можно ожидать, что в условиях газообразной обработки будут достигнуты новые пределы стимуляционного эффекта. Стимуляция отчасти зависит от возникновения при воздействии мутагена гетерозиготности той же природы, что при гетерозисе, но без необходимости скрещивания. Стимуляция возникает и под влиянием своеобразного активирующего влияния химического мутагена на ферменты.

К настоящему времени эффект стимуляции в виде гетерозиса сильно проявляется на многих древесных растениях в течение 3—5 лет. Есть необходимость найти новые методы обработки, способные еще более усилить и продлить стимуляцию в вегетативном (а частично в половом) потомстве.

Гетерозисный эффект, вызываемый мутагенами, в общем комплексе стимуляции существенно увеличивается от применения химического вещества, которое совсем не вызывает фрагментации и хромосомных перестроек. Это обеспечивает нормальное прохождение митозов в стимулированном таким образом материале. При гетерозисной стимуляции вслед за обработкой мутагенами, индуцирующими возникновение фрагментов и хромосомных aberrаций, снижается заметно количественный выход гетерозиса. Хромосомные аномалии мешают ходу митоза и снижают частоту митозов. В этом другая из важных генетических причин, мешающих распространить своеобразный модуль гетерозисной стимуляции, вызываемой химическими мутагенами на более высокий порядок дозировок. На микроорганизмах под влиянием химических мутагенов сейчас наблюдаются случаи стимуляции с повышением синтетической активности на 700—900% даже без участия гетерозиса.

Поступило
25 IX 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. А. Рапопорт, ДАН, т. 60, 469 (1948). ² И. А. Рапопорт, ДАН, т. 130, 1134 (1960).