

*Тойво ОРАВ, Нимфа ЗОЗ, Иви ОРАВ,  
Александр СЕРЕБРЯНЫЙ, Юхан КАЛАМ, Кадри РАНДАЛУ*

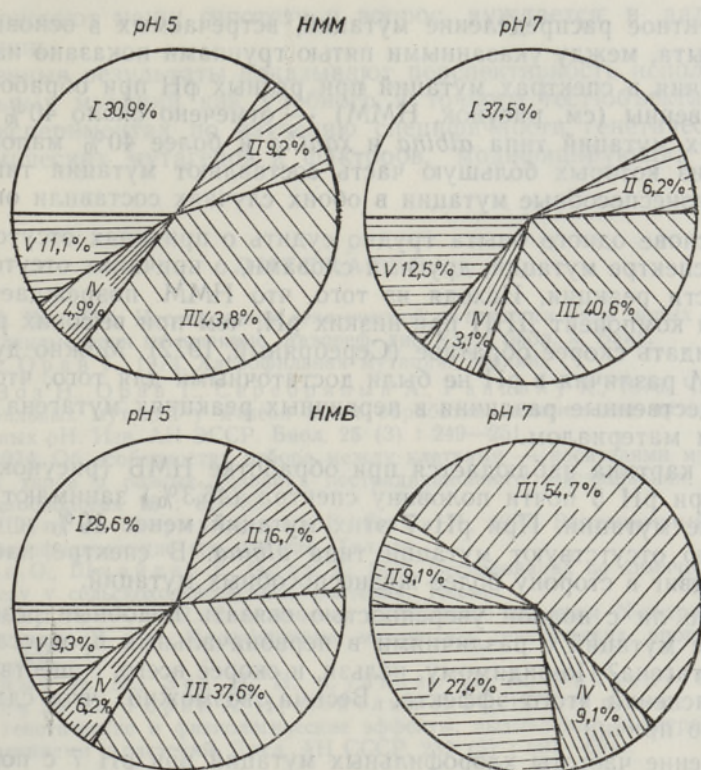
## СПЕЦИФИЧНОСТЬ СПЕКТРА ХЛОРОФИЛЬНЫХ МУТАЦИЙ У ЯЧМЕНЯ ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ ХИМИЧЕСКИМИ МУТАГЕНАМИ ПРИ РАЗНЫХ рН

В предыдущем сообщении (Орав и др., 1976) приведены результаты подсчета хлорофильных мутаций в  $M_2$ — $M_3$  ярового ячменя сорта 'Харьковский 306' после обработки N-нитрозо-N-метилмочевинной (НММ) и N-нитрозо-N-метилбиуретом (НМБ) при разных их концентрациях и рН (5 и 7). Различные рН раствора мутагена применялись с целью вызвать сдвиг в начальных процессах реакций мутагена с ядерным веществом, так как из модельных экспериментов известно (Серебряный и др., 1977), что карбамоилирование ДНП мало изменяется при снижении рН от 7 до 5, а метилирование ДНК в составе ДНП с уменьшением рН резко падает. В связи с этим повышается относительная роль повреждения белка в нарушениях, вызванных мутагеном.

Известно, что мутагенное действие как НММ, так и НМБ при рН 5 намного сильнее, чем при рН 7 (подробно см. Орав и др., 1976). Наиболее эффективными концентрациями НММ оказались 0,4 мМ при рН 5 и 1,6 мМ при рН 7. В первом случае частота хлорофильных мутаций составляла 23,5%, во втором — 2,58%, т. е. максимальная частота хлорофильных мутаций при рН 5 была в 9 раз больше, чем при рН 7. Еще больший контраст наблюдался при обработке НМБ. Например, при наиболее эффективной концентрации его (0,8 мМ) и при рН 5 отмечалось 20,56% хлорофильных мутаций, а при рН 7 — 1,05%, т. е. разница была почти в 20 раз.

Однако, наряду с эффективностью мутагенного действия, как в теоретическом, так и в практическом аспектах большой интерес представляет его специфичность.

Для изучения специфичности генетических эффектов в качестве тест-объекта применялись хлорофильные мутации, в качестве критерия — так наз. коэффициент витальности, предложенный Ю. Каламом (Калам, Орав, 1974). Коэффициент витальности ( $C_{vit}$ ) представляет собой среднее показателей ряда признаков мутантного растения в процентах или в абсолютном значении относительно показателей контрольных растений (исходного типа). Коэффициент витальности, примененный в настоящем исследовании, вычислен на основе десяти разных критериев: выживаемости, фертильности, содержания хлорофилла, интенсивности дыхания, организованности пластид и др. (Калам, Орав, 1974; Прийлинн и др., 1976).



Спектр хлорофильных мутаций после воздействия химических мутагенами при различных pH.

Группы мутаций: I —  $C_{vit}$  0—0,19, II —  $C_{vit}$  0,20—0,39, III —  $C_{vit}$  0,40—0,59, IV —  $C_{vit}$  0,60—0,79, V —  $C_{vit}$  0,80—1,00.

В данной работе все встречаемые типы хлорофильных мутаций на основе их  $C_{vit}$  разделены на пять групп:

I — летальные мутации с ранней гибелью,  $C_{vit}$  ниже 0,20, мутации *albina*, *xanthoalbina*;

II — летальные с более поздней гибелью,  $C_{vit}$  0,20—0,39, мутации *xantha*, *tigrina*, *viridoalbina*, *viridoxantha*, *lutescens*;

III — мутации с низкой выживаемостью,  $C_{vit}$  0,40—0,59, типы *viridis*, *maculata*, *alboviridis* и др.;

IV — мутации с пониженной выживаемостью,  $C_{vit}$  0,60—0,79, типы *flavoviridis*, *xanthoviridis*, *viridomaculata* и др.;

V — мутации с выживаемостью, близкой к выживаемости исходного типа,  $C_{vit}$  0,80—1,00, типы *olivacea*, *punctata*, *viridescens* и др.

Поскольку спектры сравнивались не математически, а графически, к V группе добавлены и мутации с  $C_{vit}$  выше 1,00 (типы *glauca* и *viridissima*), которые в опыте встречались не часто.

Следует отметить, что частота мутаций IV и V групп в опытах по индуцированному мутагенезу невысока, особенно редко они встречаются при радиационном мутагенезе. В данном опыте наблюдалось 10—15 разных типов мутаций в зависимости от обработки (результаты обобщены и различия между концентрациями обработки не учитываются).

Процентное распределение мутаций, встречаемых в основных вариантах опыта, между указанными пятью группами показано на рисунке.

Различия в спектрах мутаций при разных рН при обработке НММ незначительны (см. рисунок, НММ) — отмечено около 40% нежизнеспособных мутаций типа *albina* и *xantha* и более 40% маложизнеспособных, из которых большую часть составляют мутации типа *viridis*. Более жизнеспособные мутации в обоих случаях составили около 16%.

На основе одного опыта трудно судить о причинах отсутствия различий в спектре мутаций, другими словами, о причинах отсутствия специфичности реакции. Исходя из того, что НММ повреждает больше белковый компонент ДНП при низких рН, чем при высоких рН, следовало ожидать скорее обратное (Серебряный, 1972). Можно думать, что для НММ различия в рН не были достаточными для того, чтобы вызывать существенные различия в первичных реакциях мутагена с наследственным материалом.

Иная картина наблюдается при обработке НМБ (рисунок). В этом случае при рН 5 почти половину спектра (46,3%) занимают нежизнеспособные мутации. При рН 7 этих мутаций менее 10% и среди них полностью отсутствуют мутации типа *albina*. В спектре наблюдается резкий сдвиг в сторону более жизнеспособных мутаций.

Можно ли с полной уверенностью связать подобный резкий сдвиг в спектре мутаций с различиями в первоначальных процессах воздействия мутагена? По-видимому, нельзя, и скорее всего, существует целый ряд объяснений этого эффекта. Весьма возможно, что сдвиг имеет несколько причин.

Снижение частоты хлорофильных мутаций при рН 7 с повышением концентрации НМБ (максимальная частота при концентрации 0,8 мМ равна 1,05%, при 1,6 мМ — 0,52%, при 3,2 мМ — 0,35%) наводит на мысль о различиях, происходящих на уровне вторичных процессов, аналогично тому, что происходит при радиационном мутагенезе. При выращивании облученных растений в жестких условиях, усиливающих гибель поврежденных растений, в спектре увеличивается частота более жизнеспособных мутаций (Орав, 1974). В этом случае быстрее элиминируются носители маложизнеспособных мутаций. К этому же эффекту может привести усиление мутагенного воздействия. Указанную гипотезу следует проверить экспериментально.

Еще больший интерес в теоретическом плане представляет экспериментальная проверка другого возможного объяснения. НМБ как мутаген вызывает сравнительно мало хромосомных aberrаций, а в основном точечные мутации. Если частота хромосомных aberrаций при рН 5 значительно повышается, то весьма возможно, что повышение частоты нежизнеспособных мутаций (*albina*, *xantha*) связано с повреждением хромосом. В таком случае это будет служить косвенным доказательством микроaberrационного характера указанных мутаций. Предположение о том, что определенная часть хлорофильных мутаций имеет микроaberrационный характер и не представляет собой генных мутаций в узком смысле, было высказано уже ранее (Орав и др., 1972).

Анализ цитогенетической активности НМБ при разных рН пока дан только в исследовании М. Бабаева (1974). Частота хромосомных aberrаций при рН 5 действительно в 3—4 раза выше, чем при рН 7 (например, при концентрации 1,0 мМ — 12,9 и 4,1%), однако аналогичное соотношение наблюдается и при воздействии другими алкилмочевинами. НММ в концентрации 1,0 мМ при рН 5 вызывает 15,6 и при рН 7 — 7,3% aberrаций. Таким образом, результаты наблюдений М. Бабаева

не подтверждают нашу гипотезу и вопрос нуждается в дальнейшем исследовании.

Полученные результаты показывают перспективность использования хлорофильных мутаций как удобного и точного тест-объекта в дальнейших экспериментах по изучению специфичности генетического эффекта химических мутагенов и факторов, модифицирующих их действие.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Бабаев М. Ш., 1974. Исследование генетической активности ряда новых N-нитрозо-N-алкилмочевин на пшенице. Автореф. дис. канд. биол. н. Баку.
- Калам Ю., Орав Т., 1974. Хлорофильная мутация. Таллин.
- Орав И., Зоз Н., Орав Т., Серебряный А., Рандалу К., 1976. Частота хлорофильных мутаций у ячменя после обработки химическими мутагенами при разных рН. Изв. АН ЭССР. Биол. 25 (3) : 249—251.
- Орав Т., 1974. Об особенностях отбора между клетками — носителями мутаций разных типов в разных условиях пострadiационного выращивания. Инф. бюл. Радиобиология 16 : 81—83.
- Орав Т., Шангин-Березовский Г., Орав И., 1972. Радиационный мутагенез и модифицирующие его условия. Таллин.
- Прийлинн О., Шнайдер Т., Орав Т., 1976. Исследования по химическому мутагенезу у сельскохозяйственных растений. Таллин.
- Серебряный А. М., 1972. К механизму мутагенного действия N-нитрозо-N-алкилмочевины. В кн.: Молекулярные механизмы генетических процессов. М. : 135—138.
- Серебряный А. М., Зоз Н. Н., Суйкова Л. А., Рандалу К. Х., Бабаев М. Ш., Горин А. И., Цейтлин П. И., 1977. О природе влияния рН на генетические и физиологические эффекты, вызываемые N-нитрозо-N-алкилмочевинами у растений. Докл. АН СССР, 232 (3) : 691—694.

Институт экспериментальной биологии  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
11/IV 1977

Институт химической физики  
Академии наук СССР

Toivo ORAV, Nimpha ZOZ, Ivi ORAV,  
Aleksandr SEREBRIANOI, Juhan KALAM,  
Kadri RANDALU

#### ODRA KLOROFÜLLMUTATSIOONIDE SPEKTRI SPETSIIFILISUSE SÖLTUVUS KEEMILISTE MUTAGEENIDEGA TÖÖTLEMISE KESKKONNA pH-ST

##### Resümee

Odraseemnete töötlemisel keemiliste mutageenide N-nitroso-N-metüülkarbamiidiga ja N-nitroso-N-metüülbiureediga avaldab klorofüllmutatsioonide sagedusele suurt mõju keskkonna happelisus: pH 5 korral on mutatsioone ligikaudu suurusjärgu võrra rohkem kui pH 7 korral (Orav ja др., 1976). Mutatsioonispektri spetsiifilisuse uurimiseks kasutati vitaalsuskoeffitsienti  $C_{vit}$  (Калам, Орав, 1974). Kõik mutatsioonid jagati viide rühma: I —  $C_{vit}$  0...0,19 (letaalsed, varajane hukkumine), II — 0,20...0,39 (letaalsed, hilisem hukkumine), III — 0,40...0,59 (vähene säilivus), IV — 0,60...0,79 (normaalsest tunduvalt madalam elujõulisus) ja V — 0,80 ja kõrgem (normaalsele lähedane elujõulisus). Rühmade suhtelise esinemissageduse graafilise võrdlus näitas, et töötlemisel nitroso-metüülkarbamiidiga on mõlema pH korral mutatsioonisagedused väga lähedased (joon. 1, a) — ligikaudu 40% esineb letaalseid mutatsioone (*albina*, *xantha*) ja mõned harvemini esinevad tüübid) ning 15—16% suhteliselt elujõulisel mutatsioonide IV ja V rühmast. Nitrosometüülbiureediga töötlemisel olid tulemused teistsugused: pH 7 korral oli letaalseid mutatsioone alla 10% ja nende seas puudusid täiesti tüübi *albina* esindajad, kuna

pH 5 juures töödeldud variantides kuulus peaaegu pool spektrist (46.3%) letaalsele tüüpidele.

Kindlat seletust vaadeldud erinevusele veel ei ole. Edasised katsed peavad andma vastuse küsimusele, milline osa selles on mutageenide primaarsete reaktsioonide nihetel ja milline osa taastumisprotsesside erinevustel.

*Eesti NSV Teaduste Akadeemia  
Eksperimentaalbioloogia Instituut*

Toimetusse saabunud  
11. IV 1977

*NSV Liidu Teaduste Akadeemia  
Keemilise Füüsika Instituut*

*Toivo ORAV, Nympha ZOZ, Ivi ORAV,  
Aleksandr SEREBRYANY, Juhan KALAM,  
Kadri RANDALU*

### THE SPECIFICITY OF THE SPECTRUM OF BARLEY CHLOROPHYLL MUTATIONS AFTER TREATMENT AT DIFFERENT pH WITH CHEMICAL MUTAGENS

#### Summary

When treating barley seeds with N-nitroso-N-methyl-urea (NMU) and N-nitroso-N-methyl biuret (NMB) at different pH, the acidity of the treatment solution has a considerable effect on the output of chlorophyll mutations — at pH 5 the frequency of mutations was about ten times higher than at pH 7 (Orav и др., 1976). The coefficients of vitality ( $C_{vit}$ ) were used for studying the specificity of the spectrum of chlorophyll mutations (Калам, Орав, 1974). The mutations have been divided on the basis of the vitality into five groups: I —  $C_{vit}$  0...0.19 (with an early lethality); II — 0.20...0.39 (with a later lethality); III — 0.40...0.59 (with a low survival rate); IV — 0.60...0.79 (somewhat higher survival rate) and 0.80 and higher (vitality close or similar to the initial type).

A graphic comparison of the relative frequencies of these groups showed that when treated with NMU the mutation spectra are similar at pH 5 and pH 7 (Figure) — about 40 per cent of the mutations represent non-viable types (*albina*, *xantha* and some other rare mutations) while 15—16 per cent of them are mutants of a relatively high vitality (groups IV and V).

A rather different picture was observed under the treatment with NMB (Figure). In that case at pH 7 only 10 per cent of the total proved to be non-viable mutations with the *albina* type lacking among these. At pH 5, on the contrary, the non-viable mutations accounted for almost a half of the whole spectrum (46.3%).

These differences cannot be unequivocally explained at present. Further experiments are needed to settle the question whether it is a shift in the primary reactions of the mutagen that takes place here or the differences in the repairing processes play an essential role.

*Academy of Sciences of the Estonian SSR,  
Institute of Experimental Biology*

Received  
April 11, 1977

*Academy of Sciences of the USSR,  
Institute of Chemical Physics*