

Иви ОРАВ, Тойво ОРАВ, Хелья РАУК

ЗАВИСИМОСТЬ МУТАГЕННОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗНЫХ НИТРОЗОАЛКИЛМОЧЕВИН И ХАРАКТЕРА СПЕКТРА МУТАЦИЙ ОТ pH СРЕДЫ ОБРАБОТКИ СЕМЯН

В последние годы при изучении проблемы повышения эффективности химического мутагенеза у растений возрос интерес к такому модифицирующему фактору, как pH среды обработки семян. Вопрос о роли кислотности среды во время обработки генетического материала имеет как теоретический, так и практический аспект. В теоретическом плане обработка при разных pH может дать ценную информацию о механизме действия химических мутагенов, в первую очередь об алкилмочевинах, у которых до сих пор еще не выяснена роль алкилирования, карбамоилирования и других происходящих на уровне нуклеиновых кислот и ДНП реакций в образовании первичного генетического повреждения (Серебряный, 1972; Зоз и др., 1974). Однако на практике установлено значительное повышение выхода мутаций при обработке N-нитрозоалкилмочевинами в кислой среде (pH 5,0 и ниже). Например, в наших предыдущих опытах было показано, что мутагенное действие N-нитрозо-N-метилмочевины (НММ) и N-нитрозо-N-метилбиурета (НМБ) при pH 5 намного сильнее, чем при pH 7 (Орав и др., 1976, 1978). Из концентраций, примененных в этом опыте, наиболее эффективными оказались для НММ 0,4 мМ (pH 5) и 1,6 мМ (pH 7). Частота хлорофильных мутаций у ячменя сорта 'Харьковский 306' в первом случае составляла 23,5%, во втором 2,58%. Еще более значительное различие было отмечено при использовании НМБ: при наиболее эффективной концентрации его (0,8 мМ) и pH 5 — 20,56% хлорофильных мутаций, а при pH 7 только 1,05%, т. е. разница почти 20-кратная.

Описанный опыт использован в качестве предварительного с целью установления сравнимых изоэффективных концентраций для дальнейшего исследования и уточнения некоторых других методических вопросов, и поэтому проведен на одном, хорошо изученном в отношении реакций к мутагенным воздействиям сорте. Опыт, о котором идет речь в настоящем сообщении, значительно сложнее по схеме, и его результаты дают возможность для более широких обобщений. Проявление специфичности на разных этапах постмутагенных процессов будет обсуждено в отдельной работе.

Материал и методика

Объектом исследования, как и в предыдущих опытах, служил яровой ячмень, а основным критерием генетической эффективности воздействия служили хлорофильные мутации, оригинальная методика определения, классификации и сравнения спектров которых разработана

нами ранее (Калам, Орав, 1974; Орав и др., 1978). В настоящей работе использовались три сорта ярового ячменя: 'Харьковский 306', 'Отра' и 'Ингрид'. Первый из них является основным объектом исследования во всех наших опытах по радиационному и химическому мутагенезу начиная с 1957 г. (Орав и др., 1972; Прийлинн и др., 1976) и благодаря этому хорошо изучен по спектру мутаций. Этот сорт дает высокую частоту мутаций в ответ на воздействие мутагенных факторов. Таким образом, сорт 'Харьковский 306' является хорошей моделью в исследованиях по мутагенезу, однако ни сам сорт, ни его мутанты не представляют собой в условиях Эстонской ССР практической ценности из-за высокой полегаемости и недостаточной урожайности. Поэтому наряду с этим сортом в опыт были включены более перспективные генотипы — сорта скандинавской селекции: 'Отра' (районированный в Эстонской ССР с 1970 г. высокоурожайный и скороспелый шестирядный сорт) и двурядный сорт 'Ингрид', хорошо использующий высокий фон удобрений.

Семена всех трех сортов ячменя подвергались обработке растворами четырех химических мутагенов по единой схеме: при рН 5 в концентрациях 0,5, 1,0 и 1,5 мМ и при рН 7 в концентрациях 1,0, 2,0 и 3,0 мМ. Применялись те же мутагены, что и в предыдущем опыте (НММ и НМБ), и, кроме них, N-нитрозо-N-этилмочевина (НЭМ) и N-нитрозо-N-диметилмочевина (НДММ). Обработку начинали с сухих семян, которые в течение 18 ч при комнатной температуре выдерживались в шестикратно по весу количестве раствора мутагена. Поскольку точность рН обеспечивали фосфатноцитратным буфером, то были использованы три контроля, в которых семена в течение 18 ч замачивались или в воде, или в буферных растворах (при рН 5 или рН 7) без мутагена. После этого все опытные и контрольные семена промывались в проточной воде в течение 4 ч.

Агротехника в опыте была общепринятой. Сразу после промывания семена высевались в поле в рядок густотой 1 зерно на 2 см, расстояние между рядками 20 см, т. е. 250 зерен на 1 м². Следующие поколения высевались необмолоченными колосьями: главный колос каждого растения предыдущего поколения — в поле, остальные — зимой в посевные ящики для установления хлорофильных мутаций. Посев необмолоченными колосьями позволяет быстрее и точнее проводить посев, учет хлорофильных мутаций и уборку (уборка снопами вместе с корнями).

Результаты опыта

Приведенная выше схема опыта была единой в том смысле, что все мутагены применялись в одинаковых молярных концентрациях. При рН 7 использовались двойные концентрации, так как заранее было известно, что биологические эффекты при рН 5 намного сильнее. Формально сравнимой (совпадающей) концентрацией для обеих рН была концентрация 1,0 мМ.

В результате мутагенной обработки семян в М₁ наблюдалось прямое токсическое действие, приводящее к гибели части, а в некоторых вариантах даже всех растений. Как показывают данные о выживаемости растений по сортам и вариантам обработки (табл. 1), степень поражения в основном зависит от двух факторов — мутагена и рН обработки. Самое сильное поражение наблюдается после обработки НММ. У всех сортов полная гибель растений отмечалась при концентрации мутагена 1,0 мМ при рН 5 и 3,0 мМ при рН 7 (несколько устой-

Таблица 1

Выживаемость растений разных сортов ячменя, выращенных из обработанных мутагенами при различных рН семян

Сорт	Мутаген	рН 5			рН 7		
		Концентрация обработки, мМ			Концентрация обработки, мМ		
		0,5	1,0	1,5	1,0	2,0	3,0
'Ингрид'	НММ	27,5	0,1	0,6	62,2	34,3	1,8
	НЭМ	55,0	33,3	5,2	66,6	65,1	63,6
	НДММ	68,5	67,0	61,3	67,0	68,3	70,3
	НМБ	61,9	35,8	6,8	67,2	66,7	68,3
	Контроль	65,5			67,2		
'Харьковский 306'	НММ	66,4	0	0	74,0	23,2	0
	НЭМ	79,2	60,9	0,9	82,9	72,1	74,5
	НДММ	72,6	80,6	68,9	69,1	72,5	78,9
	НМБ	66,4	29,5	0,7	71,6	71,8	71,6
	Контроль	80,0			77,5		
'Отра'	НММ	20,1	0	0	44,3	12,1	0,3
	НЭМ	46,0	28,5	2,0	45,4	56,9	51,4
	НДММ	55,6	50,5	51,6	50,8	61,5	61,4
	НМБ	49,9	14,7	0,2	57,4	59,7	50,7
	Контроль	52,3			50,3		

Таблица 2

Частота хлорофильных мутаций в M_2-M_4 у сортов ярового ячменя после обработки химическими мутагенами при разных рН

Сорт	Мутаген	рН 5			рН 7			Среднее по мутагенам
		Концентрация обработки, мМ			Концентрация обработки, мМ			
		0,5	1,0	1,5	1,0	2,0	3,0	
'Ингрид'	НММ	29,8	16,7	+	17,4	17,7	0,0	16,3
	НЭМ	18,8	23,4	31,3	11,0	22,6	18,2	20,9
	НДММ	0,0	1,3	0,8	0,0	0,0	1,3	0,6
	НМБ	14,5	10,0	6,7	2,2	0,0	3,4	6,1
	Среднее по воздействиям	15,8	15,7	12,9	7,6	10,1	5,7	11,0
'Харьковский 306'	НММ	20,4	+	+	13,1	26,3	+	19,9
	НЭМ	24,4	32,1	20,0	13,9	21,7	36,2	24,7
	НДММ	2,2	2,2	2,0	1,6	1,5	3,3	2,1
	НМБ	11,3	29,3	+	0,0	3,2	5,9	9,3
	Среднее по воздействиям	14,6	15,9	11,0	7,1	13,2	15,1	14,0
'Отра'	НММ	18,5	+	+	21,2	7,7	+	15,8
	НЭМ	32,1	38,3	5,3	18,9	24,0	34,9	25,6
	НДММ	4,5	1,3	8,6	1,5	0,4	4,2	3,4
	НМБ	18,4	0,0	+	2,4	6,0	7,5	6,9
	Среднее по воздействиям	18,4	13,2	6,9	11,0	9,5	15,5	12,9

+ - Растения погибли в M_1 .

чивее при критических концентрациях оказался только сорт 'Ингрид'. Таким образом, по физиологическому — поражающему — действию изоэффективными оказались концентрации, различающиеся в три раза.

Под воздействием остальных трех мутагенов при рН 7 значительной гибели растений не наблюдалось. При рН 5 под воздействием 1,0 мМ НЭМ и НМБ гибель растений оказалась весьма существенной и при концентрации 1,5 мМ — почти полной. Таким образом, контрасты между эффектами у этих мутагенов при разных рН были еще существеннее. Сорт 'Ингрид' при рН 5 оказался несколько резистентнее к воздействию по сравнению с другими сортами. НДММ в испытанных концентрациях существенной гибели растений не вызывает. Так, у сорта 'Харьковский 306' при концентрации 1,0 мМ при рН 5 и 3,0 мМ при рН 7 обнаружена даже стимуляция всхожести и выживаемости растений, как и у сорта 'Отра' при концентрациях 2,0 и 3,0 мМ при рН 7.

Рассмотрим теперь мутагенное действие использованных алкилмочевин. Как было сказано ранее, в качестве критерия оценки служили хлорофильные мутации, частота появления которых приведена в табл. 2.

С практической точки зрения в очередной раз обращает на себя внимание НЭМ, которая во всех вариантах опыта дает высокую частоту мутирования, в среднем значительно превышающая следующий по эффективности мутаген — НММ. Сравнительно низкая частота мутирования обнаружена только при рН 5 и концентрации НЭМ 1,5 мМ у сорта 'Отра', где в M_1 сохранилось всего 19 семей. При воздействии НММ в варианте с рН 7 и концентрацией мутагена 3,0 мМ у сорта 'Ингрид' сохранилось 10 семей и среди них не было обнаружено ни одного мутанта; низкий выход мутантов установлен также в варианте с обработкой НММ концентрацией 2,0 мМ у сорта 'Отра' при рН 7, где гибель растений в M_1 была около 90%. Эти факты подтверждают высказанное нами ранее предположение (Орав, 1974), что при гибели растений M_1 в первую очередь элиминируются потенциальные носители хлорофильных и других маложизнеспособных мутаций, что внешне является как бы восстановлением популяции. По существу эта идея является конкретизацией частного случая общеизвестной паранекротической гипотезы М. Е. Лобашева о мутации как нетождественной репарации.

По средней частоте вызванных хлорофильных мутаций (7—8%) НМБ значительно уступает НЭМ (около 24%) и НММ (более 17%). Однако по сравнению, например, с рентгеновыми или гамма-лучами и эта частота довольно высокая. Самой малоэффективной при использованных концентрациях среди изученных мутагенов оказалась НДММ. Однако у этого мутагена наблюдается четкая зависимость эффективности от сорта — частота хлорофильных мутаций у сорта 'Ингрид' редко превышает 1% (среднее 0,6%), у сорта 'Харьковский 306' примерно 2% и у сорта 'Отра' в некоторых случаях превышает 4% (среднее 3,4%).

В итоге анализа результатов описанного опыта можно подчеркнуть сходство реакций трех разных, происходящих от разных родителей и весьма различающихся по биологическим свойствам сортовых генотипов ярового ячменя ('Харьковский 306', 'Ингрид' и 'Отра') на одинаковые мутагенные воздействия. Сходство было отмечено в физиологической реакции (при рассмотрении выживаемости), а также в суммарной генетической реакции. Приведенные в последней колонке

табл. 2 невзвешенные средние частоты хлорофильных мутаций у 'Ингрид' составляли 11,0, у 'Харьковский 306' — 14 и у 'Отра' — 12,9%. Эти частоты достаточно близкие, но уже элементарное взвешивание средних по вариантам с учетом гибели дает еще более близкие корригированные значения — 11,3, 12,8 и 12,4% соответственно.

Выводы

1. Сравнительное изучение генетического действия четырех химических мутагенов на трех сортах ярового ячменя показало, что наиболее эффективной по частоте хлорофильных мутаций в M_2 — M_4 была НЭМ (при оптимальных режимах более 35%, среднее по вариантам ~24%), несколько уступала ей НММ (при оптимальных режимах почти 30%, среднее более 17%). Среднюю эффективность показал НМБ (в одном варианте 29%, а в среднем 7—8%), наименее мутагенной оказалась НДММ (максимально 8,6%, в среднем 2% хлорофильных мутаций).
2. Как поражение, так и генетическое действие изученных препаратов оказалось намного сильнее при рН 5, чем при рН 7.
3. Реакция сортов на химическое воздействие оказалась весьма сходной, несмотря на значительные различия в их происхождении и свойствах.
4. При значительном поражающем действии мутагена частота мутаций понижалась, что говорит о существовании избирательного элиминирующего отбора при гибели растений.

ЛИТЕРАТУРА

- Зоз Н. Н., Серебряный А. М., Бабаев М. Ш., Григорова Н. В., Прийлинн О. Я., Шнайдер Т. М., Вяльяс А. Ю., Пярди Ю. Изучение механизма мутагенного действия N-нитрозо-N-алкилмочевин. VI. Зависимость цитогенетической активности новых N-нитрозо-N-алкилмочевин от рН раствора. — В кн.: Успехи химического мутагенеза в селекции. М., 1974, 86—96.
- Калам Ю., Орав Т. Хлорофильная мутация. Таллин, 1974.
- Орав И., Зоз Н., Орав Т., Серебряный А., Рандалу К. Частота хлорофильных мутаций у ячменя после обработки химическими мутагенами при разных рН. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1976, 25, 249—251.
- Орав Т. А. Об особенностях отбора между клетками — носителями мутаций разных типов в различных условиях пострадиационного выращивания. — Инф. бюл. Научного Совета по проблемам радиобиологии, 1974, 16, 81—83.
- Орав Т., Зоз Н., Орав И., Серебряный А., Калам Ю., Рандалу К. Специфичность спектра хлорофильных мутаций у ячменя после обработки химическими мутагенами при разных рН. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1978, 27, 70—74.
- Орав Т. А., Шангин-Березовский Г. Н., Орав И. С. Радиационный мутагенез и модифицирующие его условия. Таллин, 1972.
- Прийлинн О., Шнайдер Т., Орав Т. Исследования по химическому мутагенезу у сельскохозяйственных растений. Таллин, 1976.
- Серебряный А. М. К механизму мутагенного действия N-нитрозо-N-алкилмочевин. — В кн.: Молекулярные механизмы генетических процессов. М., 1972, 135—138.

Ivi ORAV, Toivo ORAV, Helja RAUK

**NITROSOALKUÜLKARBAMIIDIDE MUTAGEENSE TOIME
JA MUTATSIOONISPEKTRI SÖLTUVUS TÖÖTLEMISKESKKONNA pH-st**

Keemiliste mutageenide N-nitroso-N-metüülkarbamiidi (NMK), N-nitroso-N-etüülkarbamiidi (NEK), N-nitroso-N-dimetüülkarbamiidi (NDMK) ja N-nitroso-N-metüülbiureedi (NMB) toime võrdlev uurimine kolmel odrasordil näitas, et füsioloogiline reaktsioon (taimede hukkumine) sõltub mutageenist, selle kontsentratsioonist ja töötlemiskeskkonna pH-st. Nii taimede hukkumine kui ka klorofüllmutatsioonide sagedus põlvkondades M_2 — M_4 oli pH 5 korral tunduvalt suurem kui pH 7 korral. Klorofüllmutatsioonide sageduse järgi osutus kõige efektiivsemaks NEK (variantide keskmine 24%), veidi nõrgema toimega oli NMK (üle 17%). NMB-ga töödeldud variantides saadi klorofüllmutatsioone 7—8%. Kõige väiksema efektiivsusega mutageeniks osutus NDMK (2% klorofüllmutatsioone). Vaatamata küllaltki suurtele erinevustele päritolus ja omadustes reageerisid sordid mutageensele mõjutusele ühtlaselt.

Ivi ORAV, Toivo ORAV, Helja RAUK

**DEPENDENCE OF THE MUTAGENIC EFFECTIVITY OF NITROSOALKYLUREA
AND THE SPECTRUM OF CHLOROPHYLL MUTATIONS
UPON THE pH OF THE TREATMENT SOLUTION**

When treating the seeds of three different barley varieties with chemical mutagens N-nitroso-N-methyl-urea (NMU), N-nitroso-N-ethyl-urea (NEU), N-nitroso-N-dimethyl-urea (NDMU) and N-nitroso-N-methyl biuret (NMB), the physiological reaction of plants (survival rate) depends upon the mutagen and its concentration as well as upon the acidity of the treatment solution. At pH 5, the lethality of plants and the frequency of chlorophyll mutations in M_2 — M_4 generations was considerably higher than at pH 7.

NEU proved to be the most effective mutagen (24% chlorophyll mutations meanly); a somewhat lower frequency of chlorophyll mutations (over 17 per cent) was obtained by the use of NMU. In the variants treated with NMB the chlorophyll mutations frequency was 7—8 per cent, whereas in the variants treated with NDMU it was 2 per cent only. The different barley varieties revealed a similar reaction to the treatment with mutagens, in spite of the considerable differences in their origin and features.