

Р. А. АЗАТЯН

ПРИРОДА ИЗОЛОКУСНЫХ РАЗРЫВОВ И ОДИНОЧНЫХ  
КОНЦЕВЫХ ДЕЛЕЦИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ АЛКИЛИРУЮЩИХ  
СОЕДИНЕНИЙ НА СУХИЕ СЕМЕНА  
*CREPIS CAPILLARIS L.*

В исследованиях последних лет накоплен большой материал, показывающий важную роль потенциальных изменений в мутационном процессе. Оказалось, что возникновение мутации не ограничено небольшим отрезком времени, а, напротив, развивается во времени; при этом процесс становления ее может затрагивать несколько поколений клеток, и следовательно, актов ауторепродукции хромосом. Эти данные о существовании цепной реакции, цепных процессов в мутагенезе положены в основу новой теории мутаций—продленного мутагенеза [2].

Для обоснования теории продленного мутагенеза служат новые данные о прямом взаимодействии алкилирующих агентов с хромосомой еще до ее репродукции—в предсинтетической фазе клеточного цикла—полученные на *Crepis capillaris* [3—4]. Авторами доказано, что при действии различными алкилирующими соединениями на хромосомы в предсинтетической фазе ( $G_1$ ) клеточного цикла возникают разрывы хромосом в фазе ( $G_1$ ), что приводит к появлению в митозе перестроек хромосомного типа, а также потенциальные изменения, реализующиеся при переходе хромосом к фазе S или в конце периода  $G_1$ , что приводят к появлению в митозе перестроек хроматидного типа. В реализации потенциальных изменений в истинные мутации важное значение имеют фактор времени и действие естественных восстановительных систем. Образование перестроек хроматидного типа может быть объяснено результатом реакции мутагена с предшественниками ДНК и хромосомных белков. Однако наличие перестроек хромосомного типа свидетельствует о взаимодействии алкилирующих соединений с хромосомой еще до ее репродукции, и, следовательно, указывает на важную роль потенциальных изменений в мутагенезе.

В предыдущей работе [1] было показано, что при действии так называемого супермутагена и противоопухолевого агента нитрозометилмочевины (НММ) на сухие семена *Crepis capillaris* доля перестроек хромосомного типа—дицентриков, симметричных обменов составляет около 1,5%, а в опыте с азотистым ипритом (HN2) хромосомные перестройки составляли 0,4% суммы возникающих структурных мутаций хромосом.

В настоящей работе на основе анализа природы изолюкусных разрывов при действии НММ и бифункционального азотистого иприта (HN2) устанавливаются некоторые новые закономерности возникновения структурных мутаций хромосом: показано, что изолюкусные разрывы, если не все, то значительная их часть, является результатом поражения хромосом в фазе  $G_1$  клеточного цикла в виде потенциальных разрывов, реализация которых происходит в фазе S митотического цикла.

**Материал и методика.** Сухие семена *Strepis capillaris* обрабатывали в течение 2-х часов растворами НММ  $1,5 \cdot 10^{-2}$  М и HN2  $3 \cdot 10^{-4}$  М.

После обработки в течение 30 мин семена промывали водопроводной водой, помещали в чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную 0,01% колхицином, и проращивали в термостате при 25°C. Фиксацию проводили в уксуснокислом спирте (1:3).

Проростки длиной 1,5—2,0 мм из каждого вещества были перенесены в другие чашки Петри, и фиксацию проводили до исчезновения диплоидных клеток.

Анализ хромосомных aberrаций проводили в первом митозе в метафазе в постоянных ацетокарминовых препаратах.

**Результаты и обсуждение.** При действии алкилирующих агентов соотношение типов изолюкусных разрывов и одиночных хроматидных делеций представлено в табл. 1. Данные по изолюкусным разрывам и одиночным хроматидным делециям по всем срокам фиксации в пределах до исчезновения диплоидных клеток представлены суммарно.

Одиночные хроматидные делеции принято рассматривать как результат разрыва одной из хроматид двунитчатой хромосомы; при действии НММ ( $1,5 \cdot 10^{-2}$  М) они составляют 28%, а при азотистом иприте (HN2  $3 \cdot 10^{-4}$  М)—13,8%.

Изолюкусные разрывы при НММ составляют 38,7%, а в опыте с азотистым ипритом—52,8%, из общего количества перестроек.

Слияние дистальных и проксимальных фрагментов, вызываемое действием алкилирующих соединений на сухие семена *S. capillaris* L., происходит по-разному (табл. 1). Слияний проксимальных и дистальных концов ( $U_{pd}$ ) при действии азотистого иприта (HN2) было больше (49,7%), чем в опытах с НММ (31,4%). По данным Ривелла [14—15], Ивенса [11, 13], Нири, Сидорова, Соколова [7], этот класс изолюкусных разрывов составляет примерно 60—80% общего количества их. Однако такое разногласие объясняется тем, что авторы проводили опыты на асинхронной популяции клеток, где постепенное возрастание способности к соединению сестринских хроматид связано с переходом от интерфазы ( $G_1$ ) к  $G_2$  и профазе, в то время как уже в фазе S наблюдается максимальное количество слияний проксимальных и дистальных концов. Большое количество слияний сестринских хроматид типа полных изолюкусных разрывов, по Ривеллу [15], авторы объясняют тем, что в начале фазы S сестринские хроматиды расположены более близко после репродукции хромосом.

Исследования показали, что % слияния проксимальных фрагмен-

тов при действии обоих веществ почти одинаков ( $U_pNU_d$  НММ—33,5%,  $HN2$ —31,4%), в то время как слияний дистальных фрагментов меньше ( $NU_pU_d$ —НММ—23,4%,  $HN2$ —12,8%).

Причиной этого, возможно, является наличие у проксимальных фрагментов центромер с окружающими их гетерохроматиновыми участками, более чувствительных к алкилирующим агентам [9—10].

Таблица 1

Соотношение изолюкусных разрывов хромосом и одиночных делеций при действии нитрозометилмочевины (НММ) и азотистого иприта ( $HN2$ ) на сухие семена *Crepis capillaris* L.

Мутагены	Концентрация, М	Время от начала обработки до исчезновения диплоидных клеток, час	Всего просмотренных метафаз	Всего перестроек хромосом	% изолюкусных разрывов от общей суммы перестроек	Количество изолюкусных разрывов	Из них следующих типов, % от суммы				Одиночные хроматидные делеции, % от общей суммы перестроек
							$U_{pd}$	$U_pNU_d$	$NU_pU_d$	$NU_{pd}$	
НММ	$1,5 \cdot 10^{-2}$	46—46	1134	619	38,7	239	31,4	33,5	23,4	11,7	28,0
$HN2$	$3 \cdot 10^{-4}$	38—36	2483	835	52,8	441	49,7	31,4	12,8	6,1	13,8
Контроль		34—6	3508	4	0,11	1		1,0			3,0

Категория перестроек изолюкусных разрывов ( $NU_{pd}$ ) в наших экспериментах составляет 11,7% при действии НММ, а при действии  $HN2$ —6,1%.

Закономерности появления изолюкусных разрывов в разных хромосомах при действии двух использованных алкилирующих агентов неодинаковы (табл. 2). Имеются различия в появлении одиночных хроматидных делеций и разных категорий изолюкусных разрывов у этих хромосом. В опыте с азотистым ипритом ( $HN2$ ) количество изолюкусных разрывов больше в хромосоме А, чем в хромосомах Д и С. Рассмотрим соотношения в количестве слияний проксимальных и дистальных фрагментов на примере опыта с азотистым ипритом ( $3 \cdot 10^{-4}$  М, табл. 2). Количество слияний проксимальных фрагментов у хромосомы А составляет 36,7%, хромосомы С—36,4%, а у хромосомы Д—22,4%.

Однако слияние проксимальных и дистальных фрагментов ( $U_{pd}$ ) больше у хромосомы С, чем у Д и А. Этот тип изохроматидных перестроек у хромосомы С преобладает и в опыте с НММ (табл. 2). Преобладание у хромосомы С слияния проксимальных и дистальных фрагментов ( $U_{pd}$ ) в обоих опытах свидетельствует об интенсивно происходящих соединениях разорванных концов. У хромосом А и Д процессы соединения мест разрывов протекают быстрее, а разрывы в основном локализованы в проксимальной части хромосомы, т. е. ближе к центромере. Таким образом, наблюдаются качественные различия в осуществлении процессов соединения мест разрывов у хромосомы С, А и Д.

В наших опытах при действии алкилирующих соединений из общего количества изолюкусных разрывов по отдельным хромосомам менее поражается С-хромосома. Аналогичные данные были получены и в ранних работах по экспериментальному мутагенезу Левитским [6] при рентгеноблучении семян *Sterpis capillaris* и многими другими авторами [7, 12, 16] при действии алкилирующими агентами. Распределение разрывов по отдельным хромосомам и отсутствие зависимости от длины хромосом характерно для химических мутагенов [5, 7, 9—12].

Таблица 2

Соотношение разных типов изолюкусных разрывов и одиночных делеций в различных хромосомах *Sterpis capillaris* L. при действии нитрозометилмочевины (НММ) и азотистого иприта (HN2)

Мутагены	Концентрация, М	Хромосома	Изолюкусные разрывы		Типы изолюкусных разрывов, в % от их суммы				Одиночные хроматидные делеции	
			количество	%	$U_{pd}$	$U_p NU_d$	$NU_p U_d$	$NU_{pd}$	количество	%
НММ	$1,5 \cdot 10^{-2}$	А	101	42,3	28,8	32,6	26,8	11,8	72	41,7
		С	45	18,7	44,4	31,1	20,0	4,5	30	17,3
		Д	93	39,0	28,0	35,4	21,5	15,1	71	41,0
HN2	$3 \cdot 10^{-4}$	А	221	50,2	43,4	36,7	14,0	5,9	38	33,0
		С	55	12,5	52,7	36,4	7,3	3,6	15	13,0
		Д	165	37,2	57,0	22,4	13,3	7,3	62	54,0

Причина меньшей поражаемости хромосомы С при воздействии физических и химических мутагенных факторов, возможно, в какой-то мере связана с ее небольшими размерами, по сравнению с хромосомами А и Д. Однако этим нельзя объяснить всей специфики осуществления слияний у хромосомы С. Во-первых, по одиночным хроматидным делециям она оказывается примерно в 3 раза менее пораженной, чем хромосома А и Д, а по изолюкусным разрывам—в 3—4 раза, тогда как различия по длине у нее не столь велики. Во-вторых, хромосомы А и Д, имеющие разные размеры, по одиночным хроматидным делециям и изолюкусным разрывам оказались пораженными по-разному: при действии азотистого иприта (HN2) Д-хромосома больше поражается, чем А-хромосома, а при действии НММ обе хромосомы поражаются в равной мере. Наличие у хромосомы С высокой способности к соединениям дистальных и проксимальных фрагментов показывает, что ее меньшая поражаемость мутагенами обусловлена не большей устойчивостью ее к действию мутагенных факторов, а восстановлением мутационных повреждений.

Следует также иметь ввиду, что если имеет место общее усиление процессов слияния мест разрывов отдельно у дистальных и проксимальных фрагментов, то то же должно осуществляться и при разрыве от-

дельных хроматид, что должно приводить к воссоединению обеих отдельных хроматид, т. е. восстановлению первичной структуры хромосомы.

Из указанного следует и другой важный вывод: если слияния мест разрывов в какой-то мере протекают по-разному у проксимальных и дистальных фрагментов, что находит отражение в соотношении категорий мутаций  $U_pNU_d$  и  $NU_pU_d$  (табл. 2), то аналогичное должно иметь значение и для воссоединений в пределах отдельных хроматид. Можно предполагать, что часть одиночных хроматидных делеций является производным от изохроматидных разрывов и образуется при восстановлении структуры одной из двух пораженных хроматид. Возможность этого явления ранее признавалась рядом исследователей [5, 8].

Надо принять во внимание представления о резонансном мутагенезе [2], при котором поражение одной хроматиды вызывает изменение (резонансное поражение) другой.

Эти вопросы заслуживают внимания и дальнейшего изучения не только в плане понимания закономерностей возникновения мутаций хромосом, но и для выяснения путей эволюции наследственного аппарата клеток, в котором заложены и возможности к мутированию (следовательно, и дальнейшей эволюции) и к воспроизведению естественных систем защиты и восстановления от предмутационных и мутационных изменений.

Институт общей генетики  
АН СССР, Москва

Поступило 25.VII 1968 г.

Ռ. Ա. ԱԶԱՏՅԱՆ

ԻԶՈՒՈՎՈՒՄԱՅԻՆ ԽՉՈՒՄՆԵՐԻ ԵՎ ԱՌԱՆՁԻՆ ԾԱՅՐԱՅԻՆ ԿՏՐՎԱԾՔՆԵՐԻ  
ԲՆՈՒՅԹԸ CREPIS CAPILLARIS L. ՉՈՐ ՍԵՐՄԵՐԻ ՎՐԱ  
ԱՎԿԱՒԻԱԿԱՆ ՄԻԱՅՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԳՆՅՅՈՒԹՅԱՆ ԴԵՊՔՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Յիտագենետիկական անալիզից պարզվեց, որ *Crepis capillaris* L. բույսի շոր սերմերը ալկալիական նյութերով՝ նիտրոզոմեթիլմիդանյութ (ՆՄՄ) և ազոտային իպրիտ ( $HN_2$ ), մշակելու դեպքում իզոբրոմատիդային և առանձին բրոմատիդների խզումների մի մասն առաջանում են բրոմոսոմի  $G_1$  փուլում պատենցիալ խզումների ձևով, որոնց իրացումը տեղի է ունենում միատոթիկ ցիկլի S փուլում:

Փորձի տվյալները ցույց են տալիս, որ իզոբրոմատիդային տիպերը և առանձին բրոմատիդային խզումներն ի հայտ են գալիս տարբեր տոկոսային հարաբերությամբ (աղ. 1): Նույնը նկատվում է նաև տարբեր բրոմոսոմների մոտ (աղ. 2):

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Азатян Р. А. Биологический журнал Армении, XXII, 3, 1969.
2. Дубинин Н. П. Генетика, 7, 3, 1966.
3. Дубинина Л. Г., Дубинин Н. П. Генетика, т. VI, 2, 5—23, 1968.
4. Дубинина А. Г., Дубинин Н. П. ДАН СССР, т. 175, I, 213, 1967.
5. Дубинин Н. П. Проблемы радиационной генетики. Госатомиздат, М., 219—223, 1961.
6. Левитский Г. А., Сизова М. А. ДАН СССР, 4, 1—2, 84, 1934.
7. Сидоров Б. Н., Соколов Н. Н. В сб.: Влияние ионизирующих излучений на наследственность, М., Изд-во «Наука», 220—230, 1966.
8. Сидоров Б. Н., Дубинин Н. П., Соколов Н. Н. Радиобиология, т. I, вып. 2, 161—172, 1961.
9. Шевченко В. В. Радиобиология, 4, 870—876, 1964.
10. Шевченко В. В. Генетика, 6, 86—93, 1965.
11. Evans H. J. Genetics, 46, 257, 1961.
12. Evans H. J. In: Symposium on the effects of Ionizing Radiations on seeds and Their significance for Crop Improvement, Intern. Atomic Energy Agency (Vienna), 259, 1960.
13. Neary G. J. and Evans H. J. Nature, 182, 890, 1958.
14. Revell S. H., Heredity. Suppl, 6, 107—115, 1953.
15. Revell S. H. Ann. N. Y. Acad. Scien., 68, 3, 802, 1958.
16. Rieger R. and Michaelis A. Chromosoma, 10, 163, 1959.