

В. С. ПОГОСЯН, Э. А. АГАДЖАНЯН, Н. К. ХАЧАТРЯН

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ АЗОТИСТОГО ИПРИТА У COREOPSIS TINCTORIA NUTT.

При изучении цитогенетического действия бифункционального азотистого иприта (HN_2) выявлено, что у *Coreopsis tinctoria* хромосомные изменения, индуцированные HN_2 , в большом количестве реализуются в истинные мутации в меристематических клетках корешков M_1 и только часть их доходит до мейоза, остальные могут проявляться и в меристематических клетках корешков второго поколения.

Центральным звеном мутационного процесса являются предмутационные потенциальные изменения, т. е. такое состояние в хромосоме, которое характеризуется определенной вероятностью перехода в конечную генную мутацию или структурную аберрацию. В настоящее время известно, что любое первичное изменение генетических структур, возникающее под действием мутагенных факторов, является потенциальным [1], а сам процесс мутагенеза носит длительный характер [2].

Несмотря на то, что сейчас становится общепринятой точка зрения о том, что процесс образования аберраций является многоэтапным, растянутым во времени, вопрос о продолжительности действия химических мутагенов в клетке является до сих пор не совсем ясным и в некоторой степени спорным. В свете этого весьма интересно выяснение действия более активного в химических реакциях мутагена—азотистого иприта, относящегося к чрезвычайно быстро реагирующим мутагенам, взаимодействующим с компонентами клетки в момент их присутствия в среде. Специфика действия азотистого иприта в различных тканях одного и того же организма почти не исследована. Исходя из этого, мы поставили цель—изучить цитогенетическое действие бифункционального азотистого иприта в меристематических клетках корешков M_1 , M_2 и в материнских клетках пыльцевых зерен растений M_1 у *Coreopsis tinctoria* Nutt.

Материал и методика. Свежесобранные воздушно-сухие семена *C. tinctoria* (ленок) обрабатывались 0,001, 0,005 и 0,01% растворами азотистого иприта (HN_2) в течение 18 час. Семена контрольного варианта соответственно выдерживались в дистиллированной воде. После обработки и промывки часть их ставилась на проращивание в термостат при 24°C, а другая часть была высеяна в поле для получения растений M_1 . Корешки семян M_1 и M_2 , достигшие 1—2 мм длины, фиксировались раствором уксуснокислого спирта (3:1), а бутоны растений M_1 —раствором Ньюкомера. Готовились временные ацетокарминовые препараты. В ана- и телофазах меристематических клеток корешков подсчитывались хромосомные перестройки: фрагменты, мосты (одиночные и парные, с фрагментами и без них). В спорогенной ткани анализировались I и II мета- (М) и анафазы (А) материнских клеток пыльцы, в которых учиты-

вались клетки с отклонениями от нормы (содержащие мосты, фрагменты, отстающие и опережающие хромосомы). Определялась также достоверность отличия результатов опыта от контроля (td).

Результаты и обсуждение. Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что в естественных условиях уровень мутирования клеток у ленка незначителен (0,07%). В спектре спонтанных хромосомных мутаций преобладают аберрации типа транслокаций.

При действии бифункционального HN_2 была установлена высокая эффективность этого мутагена в отношении индукции структурных мутаций хромосом в меристематических клетках корешков M_1 . Эти данные соответствуют результатам экспериментов, свидетельствующих о значительных повреждениях хромосом растений под действием HN_2 [3—7]. Однако, в отличие от других объектов, у ленка максимальная частота хромосомных аберраций не превышает 3,3%, что объясняется спецификой данного объекта. Имея столь низкий процент спонтанных нарушений, клетки ленка не могут продолжать нормальный цикл развития при частоте аберраций выше 4%. Поэтому при обработке семян ленка концентрацией выше 0,01% не наблюдается простирапия семян— все клетки зародыша погибают. С повышением концентрации HN_2 увеличивается и частота хромосомных аберраций, достигающая максимума при сублетальной концентрации 0,01% (табл. 1). HN_2 инду-

Таблица 1
Частота аберраций хромосом в меристематических клетках ленка (M_1), индуцированных HN_2

Концентрация, %	Число просмотренных анателофаз	% перестроек хромосом	Соотношение мостов и фрагментов	td
Контроль	1097	0,07 ± 0,05	1:0	—
0,001	843	1,1 ± 0,34	1:8	3,1
0,005	595	1,2 ± 0,30	1:9	3,1
0,01	730	3,3 ± 0,65	1:1	4,9

цирует преимущественно ацентрические фрагменты, которые значительно превалируют над количеством мостов. Кроме того, в меристематических клетках корешков ленка в пределах одной клетки HN_2 приводит к одновременному образованию нескольких типов нарушений. В таких клетках отмечаются и отстающие хромосомы. Следовательно, помимо действия на структуру хромосом, в основе которого лежит образование поперечных сшивок между полунуклеотидными нитями ДНК [8], HN_2 действует также на синхронное расхождение хромосом, нарушая функцию центромеры.

В литературе имеются данные, показывающие, что при действии HN_2 видимые мутации могут появляться даже через десятки клеточных поколений, включая два оплодотворения [9, 10]. Этим длительным воздействием объясняется также появление хромосомных нарушений в

мейотическом делении материнских клеток пыльцы при воздействии HN_2 на семена ленка.

Цитогенетический анализ спорогенных клеток растений M_1 показал, что по сравнению с контролем взятые концентрации HN_2 приводят к повышению частоты хромосомных нарушений в мейозе, которые в большом количестве выявляются в M_1 . На этой стадии мейоза происходит выбрасывание уни- и бивалентов за пределы метафазной пластинки и слипание хромосом. Количество таких нарушений метафаз особенно возрастает при концентрациях 0,001 и 0,01% (табл. 2). В M_2

Таблица 2

Анализ нарушений хромосом в мейозе, индуцированных HN_2 , у ленка

Концентрация, %	Метафаза I		Метафаза II		Анафаза I		Анафаза II	
	количество изученных клеток	% нарушений клеток						
Контроль	1164	0,3 ± 0,1	277	0,7 ± 0,5	516	0,9 ± 0,6	391	1,02 ± 0,5
0,001	595	7,06 ± 1,1	405	1,4 ± 0,3	401	4,4 ± 1,0	316	—
0,005	417	0,4 ± 0,09	311	1,6 ± 0,5	399	1,3 ± 0,08	424	0,4 ± 0,08
0,01	588	8,3 ± 1,14	671	2,0 ± 0,1	477	2,0 ± 0,2	490	—

нарушенными могут оказаться одна или две пластинки. Однако на этой стадии понижается общий уровень нарушений, и все концентрации действуют почти одинаково. Для AI наиболее эффективной концентрацией HN_2 оказалась 0,01%, основными типами нарушений являются мосты, фрагменты и отстающие хромосомы. В анафазах встречаются также клетки с множественными нарушениями. Как общая закономерность, при воздействии HN_2 высокий процент нарушений хромосом наблюдается при первом мейотическом делении. Во втором делении мейоза частота нарушений понижается и уже в AII отмечается только при концентрации 0,005%. На этой стадии развития материнских клеток пыльцы снижение процента хромосомных нарушений отмечено и при воздействии этиленимином на семена космеи и цинии [11].

Таким образом, отдельные стадии мейоза определенным образом реагируют на действие мутагена, а снижение процента нарушений во втором делении мейоза, по-видимому, происходит вследствие того, что часть хромосомных нарушений элиминируется. По сравнению с другими алкилирующими мутагенами [12—14] HN_2 в спорогенных клетках вызывает наименьший процент нарушений, в то время как в меристематических клетках наблюдается обратная картина. Надо отметить, что у ленка при митозе и мейозе в основном отмечены однотипные изменения—мосты, фрагменты, отстающие или опережающие хромосомы. Следовательно, в различных клетках—меристематических и спорогенных— HN_2 не меняет спектр хромосомных нарушений. Однако большинство индуцированных структурных изменений реализуется в истин-

ные мутации в клетках корешков M_1 , меньшее число нарушений отмечено в мейозе. Но этим не ограничивается процесс реализации структурных изменений хромосом. Как показывают данные рисунка, абер-

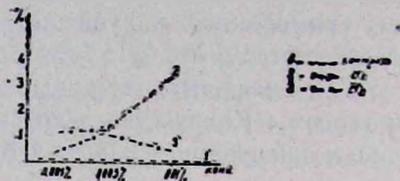


Рис. Частота хромосомных aberrаций в корешках ленка M_1 и M_2 , индуцированных бифункциональным азотистым ипритом.

рации указанных типов встречаются и в корешках M_2 . Однако частота их проявления, по сравнению с M_1 , сильно падает.

В M_2 наивысший процент хромосомных aberrаций наблюдается при концентрации 0,005% ($td=9,4$), но независимо от концентрации в M_2 образуется в 2—4 раза больше фрагментов, чем мостов. Это говорит о том, что в клетках корешков M_2 HN_2 не меняет специфику своего действия. Следовательно, можно предполагать, что в корешках M_2 происходит реализация тех изменений хромосом, которые образовались непосредственно после воздействия HN_2 . В литературе есть данные, свидетельствующие о появлении в соматических клетках aberrаций хромосом во втором митозе на матрицах, синтезированных после воздействия HN_2 [15], а в клетках растений—даже после двух циклов репликации хромосомальной ДНК [16]. Установлено также, что однократное воздействие алкилирующими веществами приводит к возникновению мутаций в ряде клеточных поколений [17]. Под действием диметилсульфата [18] изменения в структуре хромосом проявляются не сразу после воздействия. Большинство их выявляется позже, в меристематических клетках корешков второго поколения.

Ивенс и Скотт [19], рассматривая молекулярный механизм действия HN_2 на ДНК, пытались связать его с образованием перестроек хромосом у высших организмов на основе гипотезы ошибочной репликации и работы репаративных систем. Однако, как и все алкилирующие соединения, HN_2 является мутагеном с задержанным эффектом, при действии которого образуется большое количество хроматидных перестроек, реализующихся в фазе синтеза ДНК. Следовательно, мутаген непосредственно реагирует с хромосомами в фазе G_1 митотического цикла, в результате чего возникают потенциальные изменения, реализующиеся в истинные разрывы хромосом в момент их ауторепродукции [1]. Этим и объясняется появление эффективных разрывов хромосом в фазе G_1 митотического цикла у *Speris capillarigis* при действии бифункциональным и трифункциональным ипритом [3, 4]. Следовательно, HN_2 способен вызывать разрывы хромосом независимо от синтеза ДНК, и первичные повреждения вызывают появление потенциальных разрывов, реализация которых в истинные мутации связана с мета-

болизмом клетки. Однако эти потенциальные изменения могут быть двух типов—коротко- и долгоживущими. Появление хромосомных нарушений в мейозе и митозе последующего поколения (M_2) под воздействием HN_2 можно объяснить существованием долгоживущих скрытых потенциальных изменений, способных проходить ряд репликаций ДНК.

Таким образом, обобщая полученные данные, можно заключить, что изменения в хромосомах ленка, индуцированные HN_2 , в большом количестве реализуются в истинные разрывы в меристематических клетках корешков M_1 и только часть их доходит до мейоза, а остальные могут проявляться даже в меристематических клетках второго поколения.

Ереванский государственный университет,
лаборатория цитологии

Поступило 16.III 1976 г.

Վ. Ս. ՊՈՂՈՍՅԱՆ, Է. Ա. ԱՂԱՋԱՆՅԱՆ, Ն. Կ. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ

ԱՋՈՏԱՅԻՆ ԻՊՐԻՏԻ ՑԻՏՈԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ
COREOPSIS TINCTORIA NUTT-Ի ՄՈՏ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրվել է ազոտային իպրիտի ցիտոգենետիկական ազդեցությունը *Coreopsis tinctoria*-ի M_1 և M_2 սերնդի բույսերի արմատածայրերի մերիստեմատիկ հյուսվածքի բջիջների միթոտիկ բաժանման և M_1 սերնդի բույսերի փոշեհատիկների մայրական բջիջների մեյոտիկ բաժանման վրա:

Պարզվել է, որ երկֆունկցիոնալ ազոտային իպրիտի փորձարկված 0,001, 0,005 և 0,01% խտությունների դեպքում *Coreopsis tinctoria*-ի մոտ առաջացած քրոմոսոմային փոփոխությունների մեծ մասը իրացվում է M_1 սերնդի արմատածայրերի մերիստեմատիկ բջիջներում, և նրանց միայն մի մասն է հասնում մինչև մեյոզ: Առաջացած փոփոխությունների որոշ մասը կարող է իրացվել նաև M_2 սերնդի արմատածայրերի մերիստեմատիկ բջիջներում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Дубинин Н. П., Акифьев А. П. Успехи совр. биологии, 69, 2, 273, 1970.
2. Дубинин Н. П., Сипрыкина Е. Г. ДАН СССР, 158, 4, 1964.
3. Азатян Р. А. Биологический журнал Армении, 26, 7, 96, 1973.
4. Азатян Р. А. Биологический журнал Армении, 27, 4, 68, 1974.
5. Митрофанов Ю. А., Восканян А. З. Цитология и генетика, 6, 5, 1972.
6. Митрофанов Ю. А., Восканян А. З. Биологический журнал Армении, 25, 8, 41, 1972.
7. Попа Н. Е. Цитология и генетика, 3, 2, 136, 1969.
8. Loveless A., Revell S. H. Nature, 164, 938, 1949.
9. Auerbach C. and Robson S. M. Nature, 154, 81, 1944.
10. Auerbach C. and Robson S. M. Nature, 157, 302, 1946.
11. Батикян Г. Г., Еравндян С. Г. Биологический журнал Армении, 27, 10, 34, 1974.
12. Калинина Н. П., СидорOVA К. К. Цитология и генетика, 5, 1, 34, 1971.
13. Погосян В. С., Агаджанян Э. А., Хачатрян Н. К. Биологический журнал Армении, 28, 5, 47, 1975.

14. *Sato M., and Gaul H.* Radiation Botany, 7, 1963.
15. *Дубинин Н. П., Акифьев А. П., Виштынецкая Т. А.* Генетика, 7, 7, 10, 1971.
16. *Эргашев А. К., Юрченко В. В., Акифьев А. П.* Генетика, 8, 4, 1972.
17. *Alexander M. L.* Genetics, 56, 2, 273, 1967.
18. *Погосян В. С., Агаджанян Э. А., Хачатрян Н. К.* Биологический журнал Армении, 27, 10, 40, 1974.
19. *Evans H. J., Scott D.* Proc. Roy. Soc. B, 173, 1039, 491, 1969.