

ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΕΡΕΥΝΑΙ ΕΠΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΟΝΟΥ ΔΡΑΣΕΩΣ
ΤΟΥ ΘΕΠΚΟΥ ΔΙΑΙΘΥΛΙΟΥ ΕΙΣ ΤΑ ΘΗΛΕΑ ΑΤΟΜΑ
ΤΗΣ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Ἰπὸ
Μ. ΠΕΛΕΚΑΝΟΥ

ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΕΡΕΥΝΑΙ ΕΠΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΟΝΟΥ ΔΡΑΣΕΩΣ
ΤΟΥ ΘΕΠΚΟΥ ΔΙΑΙΘΥΛΙΟΥ ΕΙΣ ΤΑ ΘΗΛΕΑ ΑΤΟΜΑ
ΤΗΣ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

ὑπὸ
Μ. ΠΕΛΕΚΑΝΟΥ

Κατὰ τὰ τελευταῖα ἔτη ἔτυχον ἰδιαιτέρας προσοχῆς ἐκ μέρους τῶν ἐρευνητῶν αἱ χημικαὶ ἐκεῖναι οὐσίαι αἱ ὁποῖαι εἶναι γνωσταὶ ὡς «παράγοντες ἀλκυλιώσεως» (alkylating agents). Ὑπὸ τὴν γενικὴν ταύτην ὀνομασίαν περιλαμβάνονται ποικίλαι καὶ συχνὰ διάφοροι μεταξὺ των χημικαὶ οὐσίαι, αἱ ὁποῖαι ὅμως ἔχουν κοινὴν τὴν ἰδιότητα νὰ προκαλοῦν ἀλκυλίωσιν εἰς βιολογικῆς σημασίας χημικὰς ἐνώσεις. Οἱ λόγοι διὰ τοὺς ὁποίους ἔλαβεν τόσην ἔκτασιν ἡ ἔρευνα τῶν παραγόντων ἀλκυλιώσεως εἶναι τὸ ὅτι ἀφ' ἑνὸς μὲν, οἱ πλεῖστοι ἐξ αὐτῶν ἐμφανίζουσι τὴν τριπλῆν ἰδιότητα νὰ εἶναι ταυτοχρόνως οὐσίαι μεταλλαξιγόνοι, καρκινογόνοι καὶ καρκινοστατικά, ἀφ' ἑτέρου δέ, τὸ γεγονός ὅτι ἡ μεταλλαξιγόνος δράσις των εἶναι παρομοία πρὸς ἐκείνην τῶν διαφόρων ἀκτινοβολιῶν. Εἰς τὸν τελευταῖον τοῦτον λόγον ὀφείλεται καὶ τὸ ὅτι ἀπεκλήθησαν «ἀκτινομιμητικά» (radiomimetic) ἐνώσεις.

Οἱ παράγοντες ἀλκυλιώσεως διακρίνονται εἰς μονενεργούς, διενεργούς κ.λ.π., ἀναλόγως τοῦ ἀριθμοῦ τῶν «κέντρων ἀλκυλιώσεως» (alkylating centres) τὰ ὁποῖα διαθέτει ἕκαστος εἰς τὸ μόριόν του. Τὸ θεϊκὸν διαιθύλιον θεωρεῖται μονενεργόν, καθ' ὅσον συνήθως μόνον τὸ ἓν του αἰθύλιον ἀντιδρᾷ ταχέως εἰς τοὺς 50-55°C, ἐνῶ διὰ τὴν χρησιμοποίησιν τοῦ δευτέρου, εἶναι ἀπαραίτητος ἡ θερμοκρασία τῶν 145°C (Ross 1962).

Σχετικῶς μὲ τὸν μηχανισμόν ἢ ἐνδεχομένως τοὺς μηχανισμούς, μέσῳ τῶν ὁποίων οἱ παράγοντες ἀλκυλιώσεως προκαλοῦν μεταλλάξεις, αἱ μέχρι σήμερον γινόμεναι ἐρευναι δὲν δύνανται νὰ παράσχουν ἐπ' αὐτοῦ πλήρεις ἐξηγήσεις. Ἐν τούτοις, προσφάτως ἐδόθη μεγάλη ἔμφασις εἰς τὸν μηχανισμόν ἀλκυλιώσεως τοῦ DNA (θυμονουκλεϊνικοῦ ὄξεος). Οἱ LAWLEY καὶ BROOKES (1961) ἐργαζόμενοι μὲ τὸ θεϊκὸν διμεθύλιον, ἔδειξαν ὅτι ἡ μεθυλίωσις λαμβάνει χώραν εἰς τὴν N-7 θέσιν τῆς γουανίνης τοῦ DNA μὲ ἀποτέλεσμα νὰ παρατηρεῖται τάσις αὐτῆς ὅπως ἐνωθῆ μετὰ τῆς θυμίνης ἀντὶ τῆς κυτοσίνης μετὰ τῆς ὁποίας κανονικῶς ἐνοῦται. Ἡ ἀνώμαλος αὕτη ἐνωσις, ἡ ὁποία διὰ τοῦ διπλασιασμοῦ τοῦ DNA συνεχίζεται περαιτέρω, ἐθεωρήθη ὡς τὸ πιθανώ-

τερον γενεσιουργόν των μεταλλάξεων αίτιον, τουλάχιστον όσον άφορᾷ εις την δράσιν του θειϊκου διαιθυλιου. Γενικῶς σήμερα πιστεύεται ότι ή άλκυλιώσις βάσεων του DNA σχετίζεται άμέσως με την πρόκλησιν τεχνητών μεταλλάξεων υπό των παραγόντων άλκυλιώσεως.

Εις προγενεστέρας έργασίας μας (PELECANOS AND ALDERSON 1964α, ALDERSON AND PELECANOS 1964), έμελετήσαμεν κυρίως την μεταλλαξιγόνον δράσιν του θειϊκου διαιθυλιου εις τὰ άρρενα τῆς *Drosophila melanogaster*. Ίσως ήθελεν φανῆ παράδοξον, αλλά τὸ μέγιστον μέρος των γνώσεων μας επί τῆς μεταλλαξιγόνου δράσεως τόσον των άκτινοβολιῶν όσον και των παραγόντων άλκυλιώσεως προέρχεται εκ πειραμάτων γενομένων επί άρρένων άτόμων *Drosophila melanogaster*. Τοῦτο συμβαίνει διότι αἱ γονάδες του άρρενος είναι συνήθως πλέον εύπρόσβλητοι από εκείνας του θήλεος και κατά συνέπειαν προσφέρονται περισσότερο διά την έρευναν των τεχνητών μεταλλάξεων. Εις μεταγενεστέραν έργασίαν μας (PELECANOS AND ALDERSON 1964β), έμελετήσαμεν την εύαισθησίαν των διαφόρων σταδίων ώογενέσεως έναντι τῆς μεταλλαξιγόνου δράσεως του θειϊκου διαιθυλιου. Έν τούτοις, ή έργασία αύτη έθεσεν ώρισμένα προβλήματα των οποίων την λύσιν επιχειρούμεν διά τῆς παρούσης έρεύνης. Συγκεκριμένως μελετῶνται:

α. Ἡ σχέσις δόσεως και άποτελέσματος εις τὰ άκμαῖα θήλεα παρουσία και άπουσία ζύμης, ως έγινετο εις τὸ παρελθόν και διά τὰ άρρενα.

β. Διερευνᾶται τὸ ποσοστὸν των προκαλουμένων κλώνων (bunches), εις τὰ διαφόρου ήλικίας ώογόνια τῆς προνούμφης και επιχειρεῖται βάσει αὐτου ή έξαγωγή συμπερασμάτων επί του εάν πράγματι ή μεγαλύτερα συχνότης μεταλλάξεων ή εύρεθεῖσα εις τὰ πρώτα ώογόνια (ήλικίας 0-24 ώρων), οφείλεται εις ηῤξημένην αὐτων εύαισθησίαν έναντι του θειϊκου διαιθυλιου ή είναι φαινομενική και οφείλεται εις μεγαλύτερον ποσοστὸν κλώνων.

γ. Μελετᾶται τέλος τὸ πρόβλημα ένδεχομένης εκλεκτικῆς δράσεως του θειϊκου διαιθυλιου επί ώρισμένης περιοχῆς ή περιοχῶν του II χρωματοσώματος. Πρὸς τοῦτο έρευνᾶται ή ταυτότης των προκληθεισῶν θανατογόνων μεταλλάξεων αἱ όποῖαι προέκυψαν εκ διαφόρων γονέων και εύρίσκεται τὸ ποσοστὸν των θανατογόνων τὰ όποῖα ταυτίζονται μεταξὺ των.

ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΙΣ ΤΟΥ ΘΕΙΙΚΟΥ ΔΙΑΙΘΥΛΙΟΥ ΕΙΣ ΔΙΑΦΟΡΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

Διά την καλλιτέραν κατανόησιν των όσων θὰ εκτεθοῦν έν συνεχείᾳ, σκόπιμον νομίζομεν όπως αναφέρωμεν όλίγα περι τῆς μεταλλαξιγόνου δράσεως του θειϊκου διαιθυλιου και εις άλλους πλην τῆς *Drosophila* οργανισμούς.

Ός μεταλλαξιγόνον εις την *Drosophila* αναφέρεται διά πρώτην φοράν μεταξὺ άλλων χημικῶν ένώσεων τὸ θειϊκὸν διαιθύλιον υπό του RABORPOT (1947). Ο KOLMARK (1956), έδειξεν ότι τὸ θειϊκὸν διαιθύλιον είναι τὸ μόνον,

έξ ενός σημαντικοῦ ἀριθμοῦ χημικῶν μεταλλαξιγόνων τὰ ὅποια ἐμελέτησεν, τὸ ὁποῖον προκαλεῖ ἐπαναμεταλλάξεις (back mutations) εἰς ὠρισμένην θέσιν (locus) τῶν χρωματοσωμάτων τῆς *Neurospora*. Τὸ (1959), ὁ LOVELESS ἀνέφερεν ὅτι ἐκ μιᾶς σειρᾶς παραγόντων ἀλκυλιώσεως τοὺς ὁποίους ἐδοκίμασεν, μόνον τὸ θεϊκὸν αἰθυλμεθύλιον καὶ τὸ θεϊκὸν διαιθύλιον ἀπεδείχθησαν μεταλλαξιγόνα διὰ τὸν βακτηριοφάγον T2. Ἐκ τοῦ γεγονότος τούτου ὁ LOVELESS συνήγαγεν ὅτι ἡ αἰθυλίωσις ἴσως ἀποτελεῖ τὸν μοναδικὸν τρόπον μὲ τὸν ὁποῖον ἐπιρρεάζεται τὸ DNA τοῦ βακτηριοφάγου T2. Οἱ STRAUSS καὶ OKUBO (1960), συνέκριναν τὴν δρᾶσιν τοῦ θεϊκοῦ διαιθυλίου μὲ ἐκείνην τοῦ ὑπεριώδους φωτὸς εἰς τὰ βακτήρια καὶ εὔρον ὁμοιότητος μεταξὺ τῶν δύο αὐτῶν μεταλλαξιγόνων. Ἀντιθέτως, οἱ HESLOT καὶ FERRARY (1958) καὶ EHRENBERG (1959), συγκρίναντες τὴν δρᾶσιν τοῦ μετὰ τῶν ἀκτίνων X εἰς τὴν κριθὴν, ἀναφέρουν ὅτι δι' ὠρισμένα τοῦλάχιστον εἶδη μεταλλάξεων τὸ θεϊκὸν διαιθύλιον ἦτο σαφῶς ἀποτελεσματικώτερον τῶν ἀκτίνων. Ὁ HEINER καὶ οἱ συνεργάται του, (HEINER ET AL. 1960), συνέκριναν τὴν βιολογικὴν δρᾶσιν τοῦ θεϊκοῦ διαιθυλίου καὶ τῶν ἀκτίνων γ εἰς τὴν κριθὴν καὶ εὔρον μεταξὺ ἄλλων ὅτι τόσον τὸ φάσμα ὅσον καὶ ἡ συχνότης τῶν προκληθεισῶν μεταλλάξεων ἦτο τελείως διάφορος διὰ τὰ δύο μεταλλαξιγόνα. Ἰδιαιτέρου ἐνδιαφέροντος εἶναι ἡ παρατήρησις τῶν προαναφερθέντων, ὅτι παρὰ τὸ μέγα ποσοστὸν γονιδιακῶν μεταλλάξεων τὰς ὁποίας προκαλεῖ, τὸ θεϊκὸν διαιθύλιον εἶναι σχεδὸν ἀνίσχυρον νὰ προκαλέσῃ μεγάλας χρωματοσωμικὰς μεταλλάξεις ὅπως αἰ ἀναστροφαι καὶ αἰ μετατοπίσεις. Ὁ HESLOT (1960) ἀναφέρει ὅτι τὸ θεϊκὸν διαιθύλιον προκαλεῖ ἐξαιρετικῶς μεγάλον ἀριθμὸν σωματικῶν χιμαϊρῶν εἰς τὴν κριθὴν. Προσφάτως ὁ DAVIES (1966), ἐμελέτησεν συγκριτικῶς τὴν δρᾶσιν ἑνὸς διενεργοῦ παράγοντος ἀλκυλιώσεως, τοῦ ἀζωθυπερίτου (Nitrogen mustard) καὶ τοῦ θεϊκοῦ διαιθυλίου εἰς τὸ χλωροφῦκος *Chlamydomonas reinhardi*. Οὗτος παρετήρησεν ὅτι καὶ τὰ δύο αὐτὰ μεταλλαξιγόνα δροῦν ἀνασχετικῶς ἐπὶ τοῦ φαινομένου τοῦ διασκελισμοῦ (crossing-over). Οὕτω, τὸ ποσοστὸν τῶν ἀναμενομένων ἀτόμων ἐκ διασκελισμοῦ (recombinants), ἦτο σημαντικῶς κατώτερον μετὰ τὴν ἐπίδρασιν τῶν δύο μεταλλαξιγόνων. Ἐν τούτοις τὰ στάδια κατὰ τὰ ὅποια ἕκαστον ἐξ αὐτῶν ἐκδηλώνει τὴν ἐνέργειάν του εἶναι διάφορα. Τέλος, οἱ GLÄSS καὶ MARQUARDT (1966), ἔδειξαν ὅτι τὸ θεϊκὸν διαιθύλιον παράγει μὲν ρήγματα εἰς τὰ χρωματοσώματα τῆς *Bellevalia romana*, ἀλλ' ὄχι καὶ μετατοπίσεις, πρᾶγμα τὸ ὁποῖον συμφωνεῖ μὲ τὰ δεδομένα τοῦ HEINER ἐπὶ τῆς κριθῆς ἀλλὰ καὶ μὲ τὰ ἰδικὰ μας εὐρήματα (PELECANOS 1966), εἰς τὴν *Drosophila melanogaster*.

Ἐκ τῶν ἀνωτέρω ἐκτεθέντων καταφαίνεται νομιζομεν ἡ σπουδαιότης τοῦ θεϊκοῦ διαιθυλίου ὡς μεταλλαξιγόνου καθ' ὅσον τοῦτο καίτοι δραστηκῶτατον προκειμένου περὶ γονιδιακῶν μεταλλάξεων, παρουσιάζει κατὰ κάποιον

τρόπον μίαν εξειδίκευσιν δράσεως (specificity) τῆς ὁποίας ἡ φύσις καθὼς καὶ ἡ ἔκτασις δέον ὅπως διερευνηθῆ περαιτέρω.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

α. *Σχέσις δόσεως καὶ γενετικοῦ ἀποτελέσματος.* Αὕτη ἐμελετήθη εἰς τὰ ἀκμαῖα θήλεα διὰ τῆς μεθόδου διατροφῆς (adult feeding method), τῆς ἐπινοηθείσης ὑπὸ τοῦ Lüers (1953) καὶ τροποποιηθείσης ὑφ' ἡμῶν (PELECANOS and ALDERSON 1964α).

Ἄκμαῖα θήλεα ἡλικίας 4 ἡμερῶν διετρέφοντο μὲ διαλύσεις περιεχοῦσας διαφόρους ἐκάστοτε συγκεντρώσεις θειικοῦ διαιθυλίου ἐπὶ 24 ὥρας καὶ ἀκολούθως διεσταυροῦντο μὲ ἄρρενα τῆς φυλῆς Muller - 5. Ἐκαστον θῆλυ διεσταυροῦτο κεχωρισμένως μετὰ δύο ἄρρένων τῆς ὡς ἄνω φυλῆς, τοῦ ἐπετρέπετο δὲ ἡ ὠοτοκία ἐπὶ ἐν εἰκοσιτετράωρον. Οὕτω, αἱ ὑπολογιζόμεναι βάσει τῆς τεχνικῆς Muller - 5 φυλοσύνδετοι ὑποτελεῖς θανατογόνοι μεταλλάξεις, ἀναφέρονται εἰς τὸ στάδιον 14 τῆς ὠογενέσεως, ἥτοι ἐκεῖνο τοῦ ὠρίμου ὠαρίου. Ὡς γνωστόν, εἰς τὰς ὠοθήκας τοῦ ἀκμαίου ἀπαντοῦν καὶ τὰ 14 στάδια τῆς ὠογενέσεως (King 1956), ἀλλὰ τὸ στάδιον τοῦ ὠρίμου ὠαρίου ἐμφανίζεται τὸ πρῶτον μετὰ τὴν συμπλήρωσιν τῆς τρίτης ἡμέρας ἀπὸ τῆς ἐκκολάψεως τοῦ ἀκμαίου.

Ἐγένοντο δύο σειραὶ πειραμάτων, ἥτοι, μία κατὰ τὴν ὁποίαν ὑπῆρχον ἐντὸς τῶν φιαλῶν διατροφῆς 2-3 σταγόνας ληφθεῖσαι ἐξ αἰωρήματος 5% νεκρᾶς ζύμης καὶ ἕτερα κατὰ τὴν ὁποίαν αἱ μυῖγες διετρέφοντο ἀποκλειστικῶς ἐκ τοῦ διαλύματος τοῦ περιέχοντος τὸ θεικὸν διαιθυλίον. Εἰς ἀμφοτέρας τὰς περιπτώσεις, τὰ ὑποβληθέντα εἰς τὴν ἐπίδρασιν τοῦ μεταλλαξιγόνου θήλεα ἦσαν τῆς φυλῆς Oregon - K διὰ τὴν ὁποίαν πρόσφατος ἔλεγχος ἔδειξεν ὅτι ἡ φυσικὴ μεταλλακτικότης τῆς, ὑπολογιζομένη εἰς φυλοσυνδέτους ὑποτελεῖς θανατογόνους μεταλλάξεις, ἀνήρχετο εἰς 0,1%-0,2%.

Παρὰ τὰς ἀπωλείας θειικοῦ διαιθυλίου λόγῳ ὑδρολύσεως, ἐχρησιμοποιεῖτο ἡ αὐτὴ διάλυσις καθ' ὅλον τὸ εἰκοσιτετράωρον διατροφῆς. Διὰ συγκέντρωσιν 0,5% θειικοῦ διαιθυλίου ἡ πτώσις τοῦ pH ἐντὸς τοῦ εἰκοσιτετράωρου ἦτο ἀπὸ pH 2,9 εἰς pH 1,8. Διὰ μικροτέρας συγκεντρώσεις ἡ πτώσις τοῦ pH ἦτο μικροτέρα.

β. *Ἐῤυρεσις τῆς ἐναισθησίας τῶν διαφοροῦ ἡλικίας ὠογονίων τῆς προνούμης.* Ἐχρησιμοποιήθη ἡ μέθοδος διατροφῆς τῶν προνουμῶν ὡς αὕτη ἐκτίθεται εἰς προηγουμένην ἐπὶ τῶν θηλέων ἐργασίαν μας (PELECANOS and ALDERSON 1964β). Ἡ χρησιμοποιοηθεῖσα συγκέντρωσις μεταλλαξιγόνου ἦτο καὶ εἰς τοὺς πέντε τύπους πειραμάτων 0,5%.

Οἱ τύποι τῶν ἐκτελεσθέντων πειραμάτων ἦσαν οἱ ἀκόλουθοι:

1. Τύπος 0-12. Προνύμφαι μόλις έκκολαφθεῖσαι (ἡλικίας 0 ὥρων) διετράφησαν ἐπὶ 12 ὥρας ἐντὸς ὕλικου περιέχοντος τὸ μεταλλαξιγόνον.

2. Τύπος 12-24. Προνύμφαι ἡλικίας 12 ὥρων διετράφησαν μέχρις ἡλικίας 24 ὥρων μὲ θεϊκὸν διαιθύλιον.

3. Τύπος 0-24. Μόλις έκκολαφθεῖσαι προνύμφαι διετράφησαν μέχρις ἡλικίας 24 ὥρων ἐντὸς ὕλικου περιέχοντος τὸ μεταλλαξιγόνον.

4. Τύπος 24-48. Προνύμφαι ἡλικίας 24 ὥρων ὑπέστησαν τὸ θεϊκὸν διαιθύλιον μέχρις ἡλικίας 48 ὥρων.

5. Τύπος 48-72. Προνύμφαι ἡλικίας 48 ὥρων διετράφησαν μὲ θεϊκὸν διαιθύλιον μέχρις ἡλικίας 72 ὥρων.

Εἰς ὅλους τοὺς τύπους τῶν προαναφερθέντων πειραμάτων αἱ προνύμφαι ὅταν δὲν ὕφισταντο τὴν ἐπίδρασιν τοῦ μεταλλαξιγόνου, ἐτοποιητοῦντο ἐντὸς δοχείων Petri ἢ φιαλῶν περιεχοσῶν τὸ σύνθηδες θρεπτικὸν ὕλικὸν διὰ καλλιέργειας *Drosophila*.

Ἡ ἐκτίμησις τῆς εὐαισθησίας τῶν διαφόρου ἡλικίας ὡγονίων ἐγένετο διὰ τοῦ ὑπολογισμοῦ τῶν ὑποτελῶν θανατογόνων μεταλλάξεων τῶν προκαλουμένων εἰς τὸ II χρωματώσωμα. Πρὸς τοῦτο, τὰ ὑποστάντα τὴν ἐπίδρασιν τοῦ μεταλλαξιγόνου θήλα διεσταυροῦντο ὡς παρθένα μετὰ 2 ἄρρένων ἕκαστον τῆς φυλῆς Cy L⁴/Pm (Curly Lobe⁴, Plum) ἐπὶ τριήμερον. Ἀκολούθως τὰ θήλα ταῦτα μετεφέροντο εἰς νέους σωλῆνας περιέχοντας νωπὴν τροφήν καὶ ἀφίεντο ἐκεῖ νὰ γεννήσουν ἐκ νέου ἐπὶ ἄλλο ἐν τριήμερον. Ἡ τεχνικὴ αὕτη εἶναι ἡ καλουμένη τεχνικὴ τῶν διαδοχικῶν δειγματοληψιῶν (Brooding technique) τὴν ὁποίαν λεπτομερῶς περιγράφομεν εἰς προγενεστέραν ἡμῶν ἐργασίαν. (PELECANOS AND ALDERSON 1964β). Δύο διαδοχικαὶ ἀνὰ τριήμερον δειγματοληψίαι ἐκρίθησαν ἱκανοποιητικαὶ διὰ τὸν σκοπὸν τῶν πειραμάτων μας.

Τὰ ἐκτεθέντα εἰς τὴν ἐπίδρασιν τοῦ θεϊκοῦ διαιθυλίου ἄτομα (θήλειαι προνύμφαι) ἀνῆκον καὶ εἰς τὴν περίπτωσιν ταύτην εἰς τὴν φυλὴν Oregon - K. Ὁ τρόπος βάσει τοῦ ὁποίου ὑπολογίζονται αἱ θανατογόνοι μεταλλάξεις διὰ χρησιμοποίησεως τῆς καλλιέργειας Cy L⁴/Pm εἶναι λίαν γνωστὸς (AUERBACH 1962), καὶ ὡς ἐκ τούτου δὲν περιγράφεται ἐνταῦθα.

γ. *Εὔρεσις τῆς ταυτότητος τῶν θανατογόνων.* Τόσον εἰς τὴν περίπτωσιν ἐκτιμήσεως τοῦ ποσοστοῦ τῶν «κλώνων» (bunches) θανατογόνων προσερχομένων ἐξ' ἐνὸς ἀρχικοῦ ὡγονίου καὶ παραγομένων ὑπὸ τοῦ αὐτοῦ ἀτόμου, ὅσον καὶ ὅταν ἐκτιμᾶται γενικῶς ἡ ταυτότης τῶν θανατογόνων τῶν προσερχομένων ἐκ διαφόρων γονέων, ἀπαραίτητος εἶναι ἡ ἐκτέλεσις τῆς καλουμένης «διασταυρώσεως ταυτότητος θανατογόνων» (test for identity of lethals). Πρὸς τοῦτο, κατ' ἀρχὴν δημιουργοῦνται καλλιέργειαι (stocks) ἐκ τῶν εὐρεθέντων θανατογόνων, κατόπιν δέ, ἐξ ἐκάστου φιαλίδιου τὸ ὁποῖον εἶναι ἡριθμημένον λαμβάνεται ἐν θήλυ παρθένον ἢ ἐν ἄρρεν τοῦ γενοτύπου Cy L⁴/+l καὶ διασταυροῦται μετὰ ἄρρενος ἢ θήλεος τοῦ αὐτοῦ γενοτύπου λαμβανομένου

ἐξ ἑτέρου φιαλιδίου. Διὰ τῆς διασταυρώσεως ταύτης ἐὰν τὰ θανατογόνα (l) τὰ προερχόμενα ἐκ τῶν δύο φιαλιδίων εἶναι τὰ αὐτά, ἔρχονται εἰς ὁμοζυγωτίαν, ὅποτε δὲν παράγονται ἄτομα κανονικοῦ γενοτύπου $+/+$. Ἐὰν πάλιν τὰ δύο θανατογόνα εἶναι διάφορα, τότε παραμένει ἓνα ἕκαστον ἐν ἑτεροζυγωτίᾳ $+l/l+$ καὶ παράγονται κανονικοῦ γενοτύπου ἀπόγονοι.

Αἱ διάφοροι διασταυρώσεις ἀκολουθοῦν τὸν ἐξῆς τύπον:

Ἰποθέσωμεν ὅτι θέλομεν νὰ ἐκτιμήσωμεν τὸ ποσοστὸν τῶν κλώνων οἱ ὁποῖοι παρήχθησαν ἀπὸ τὸ ὑπ' ἀριθ. 3 θῆλυ, τὸ ὁποῖον παρήγαγεν μεταξὺ τῶν ἀπογόνων τοῦ 4 θανατογόνους μεταλλάξεις, ἥτοι τὰς $3_1, 3_2, 3_3, 3_4$. Ἐπὶ τῇ βάσει τῶν προαναφερθέντων ἐκτελοῦμεν τὰς ἐξῆς διασταυρώσεις:

$$3_1 \times 3_2, 3_1 \times 3_3, 3_1 \times 3_4, 3_2 \times 3_3, 3_2 \times 3_4, 3_3 \times 3_4.$$

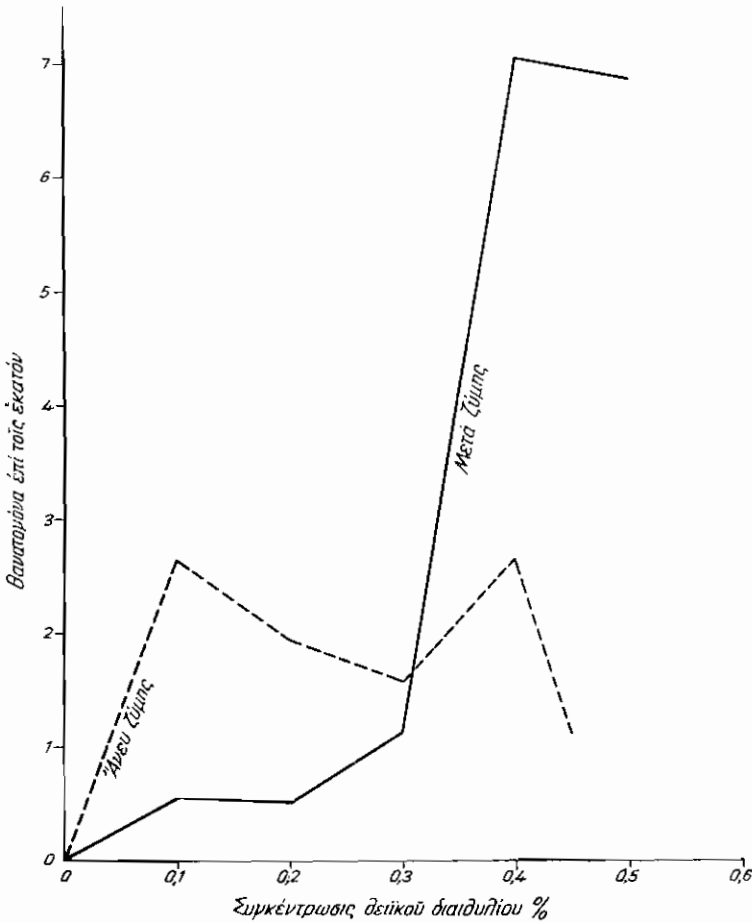
Οὕτω εὐρίσκομεν τὴν ταυτότητα τῶν 4 θανατογόνων ἥτοι ποῖα ἐξ αὐτῶν ταυτίζονται μεταξὺ των. Τὸ αὐτὸ ἐπαναλαμβάνεται διὰ κάθε γονέα ὁ ὁποῖος παρήγαγεν πλείονα τοῦ ἑνὸς θανατογόνου καὶ τελικῶς ὑπολογίζεται οὕτω τὸ ποσοστὸν ἐπὶ τοῖς ἑκατὸν τῶν κλώνων θανατογόνων οἱ ὁποῖοι ἀπαντοῦν εἰς ἓν πείραμα.

Εἰς τὴν περίπτωσιν κατὰ τὴν ὁποίαν ἐκτιμᾶται τὸ γενικὸν ποσοστὸν ταυτότητος τῶν θανατογόνων ἐπὶ τοῦ συνόλου τῶν προκληθέντων ἐκ διαφόρων γονέων, λαμβάνονται ἄτομα ἑνὸς μόνου θανατογόνου ἐξ ἑκάστου γονέως καὶ διασταυροῦνται μεταξὺ των κατὰ τὸν προεκτεθέντα τρόπον. Δι' αὐτοῦ τοῦ τρόπου ὑπολογίζεται τελικῶς τὸ ποσοστὸν ἐπὶ τοῖς ἑκατὸν τῶν ταυτιζομένων θανατογόνων μεταλλάξεων αἱ ὁποῖαι προεκλήθησαν ἐφ' ὀλοκλήρου τοῦ II χρωματοσώματος.

Α Π Ο Τ Ε Λ Ε Σ Μ Α Τ Α

α. *Σχέσις δόσεως καὶ γενετικοῦ ἀποτελέσματος εἰς τὰ ἀκμαῖα θήλεα.* Εἰς προγενεστέραν ἐργασίαν μας (PELECANOS and ALDERSON 1964a), ἐμελετήσαμεν τὴν σχέσιν δόσεως καὶ γενετικοῦ ἀποτελέσματος διὰ τῆς μεθόδου διατροφῆς τῶν προνομφῶν εἰς τὰ δύο φύλα, διὰ δὲ τῆς μεθόδου διατροφῆς τῶν ἀκμαίων μόνον εἰς τὰ ἄρρενα. Ὡς γνωστὸν, προκειμένου περὶ γονιδακῶν μεταλλάξεων ἀναμένεται τὸ γενετικὸν ἀποτέλεσμα νὰ εἶναι εὐθέως ἀνάλογον τῆς παρεχομένης δόσεως. Ἐν τούτοις, εἰς τὴν περίπτωσιν τοῦ θειϊκοῦ διαιτυλίου παρουσιάζεται κάποια ἰδιομορφία, συνισταμένη εἰς τὴν ὑπαρξιν μιᾶς «κρίσιμου» συγκεντρώσεως ἀπὸ τῆς ὁποίας καὶ ἐντεῦθεν παρατηρεῖται ἀπότομος αὔξησις εἰς τὸ ποσοστὸν τῶν προκαλουμένων μεταλλάξεων. Ἡ κρίσιμος αὕτη συγκεντρωσις εὐρέθη ὅτι εἶναι περίπου ἡ αὕτη καὶ διὰ τὰς δύο μεθόδους καὶ εἶναι 0,375% προκειμένου περὶ προνομφῶν ἀμφοτέρων τῶν φύλων καὶ 0,4% προκειμένου περὶ ἀκμαίων ἀρρένων. Ἐπιπροσθέτως, εὐρέθη ὅτι ἐὰν ἀπὸ τὸ ὑλικὸν διατροφῆς τῶν

ἀκμαίων ἀρρένων ἀφαιρεθῆ ἡ ζύμη, ἦτοι τὸ κύριον συστατικὸν διατροφῆς των, τότε ἡ σχέσις παρουσιάζεται εὐθύγραμμος, ἐξαφανιζομένης τῆς κρίσιμου συγκέντρωσης.



Σχέσις δόσεως καὶ γενετικοῦ ἀποτελέσματος

Διὰ δύο σειρῶν πειραμάτων, μετὰ ζύμης καὶ ἄνευ αὐτῆς, ἐπεχειρήσαμεν νὰ ἐρευνήσωμεν τὴν σχέσιν δόσεως καὶ ἀποτελέσματος καὶ εἰς τὰ ἀκμαῖα θήλεα διατρέφοντες ταῦτα μὲ διάλυσιν διαφόρου ἐκάστοτε περιεκτικότητος εἰς θεικὸν διαιθύλιον. Τὰ ἀποτελέσματα ἀναγράφονται εἰς τοὺς πίνακας 1 καὶ 2. Ἐξ αὐτῶν καταφαίνεται ὅτι ὅταν ἡ ζύμη εἶναι παροῦσα, ἐμφανίζεται πάλιν ἡ κρίσιμος συγκέντρωσις ἡ ὁποία καὶ εἰς τὴν περίπτωσιν ταύτην, ὡς εἰς ἐκείνην τῶν ἀκμαίων ἀρρένων, εἶναι 0,4%. Ἀντιθέτως εἰς τὴν περίπτωσιν κατὰ τὴν ὁποίαν δὲν

προστίθεται ζύμη εις την τροφήν, αντί τῆς γραμμικῆς συναρτήσεως τῆς εὐρεθείσης εις τὰ ἀκμαῖα ἄρρυνα, λαμβάνεται ἀκανόνιστος καμπύλη ὡς ἐμφαίνεται εις τὸ διάγραμμα. Ἄξιοσημείωτον εἶναι καὶ τὸ γεγονός ὅτι εις τὴν πρώτην περίπτωσιν (πίναξ 1), πλὴν τῆς ἀποτόμου αὐξήσεως τοῦ ποσοστοῦ τῶν θανατογόνων μεταλλάξεων αὐξάνει καὶ ὁ ἀριθμὸς τῶν γονέων οἱ ὅποιοι συμμετέχουν εις τὴν παραγωγὴν θανατογόνων.

Πίναξ 1. Σχέσις δόσεως καὶ ἀποτελέσματος (μετὰ ζύμης)

Συγκέντρωσις θειικοῦ διαιθυλίου	Ἐξετασθέντα Χρωματοσώματα	Ἀριθμὸς θανατογόνων	Θανατογόνα %	% ♀ παρά- γοντα θανατ.
0,10	1.136	6	0,55	8,40
0,20	598	4	0,50	8,00
0,30	805	9	1,12	14,60
0,40	655	46	7,02	57,00
0,50	818	56	6,84	58,00

Πίναξ 2. Σχέσις δόσεως καὶ ἀποτελέσματος (ἄνευ ζύμης)

Συγκέντρωσις θειικοῦ διαιθυλίου	Ἐξετασθέντα Χρωματοσώματα	Ἀριθμὸς θανατογόνων	Θανατογόνα %	% ♀ παρά- γοντα θανατ.
0,10	304	8	2,63	10,00
0,20	309	6	1,94	10,00
0,30	318	4	1,57	8,50
0,40	527	13	2,66	5,50
0,45	366	4	1,09	5,20

β. *Εὐαισθησία τῶν διαφορῶν ἡλικίας ὠογόνιων τῆς προνύμφης.* Προηγουμένη ἔρευνά μας ἐπὶ τῆς εὐαισθησίας τῶν ὠογόνιων τῆς θηλείας προνύμφης (PELECANOS and ALDERSON 1964β), ἔδειξεν ὅτι ὅλα τὰ ὠογόνια ἡλικίας ἄνω τῶν 24 ὥρῶν ἀντιδροῦν ἐξ ἴσου εις τὴν μεταλλαξιγόνον δρασίν τοῦ θειικοῦ διαιθυλίου. Ἐξ ἄλλου, εὐρέθη ὅτι τὸ ποσοστὸν τῶν λαμβανομένων ὑποτελῶν φυλοσυνδέτων θανατογόνων μεταλλάξεων ἦτο ὑψηλότερον ὅταν τὸ μεταλλαξιγόνον ἐπέδρα ἐπὶ προνυμφῶν ἡλικίας 0 - 24 ὥρῶν. Τὸ ἀποτέλεσμα ἐν τούτοις τοῦτο, ἦτο μᾶλλον ἐπισημῶδες καθ' ὅσον δὲν ἦτο δυνατόν νὰ διερευνηθῆ τὸ ποσοστὸν τῶν παραγομένων κλώνων τῶν θανατογόνων καὶ τοῦτο διότι εἶναι τεχνικῶς ἀδύνατον νὰ γίνῃ διασταύρωσις ταυτότητος εις τὴν περίπτωσιν τῶν φυλοσυνδέτων θανατογόνων. Τὸ θέμα παρουσιάζει περισσότερον ἐνδιαφέρον καθ' ὅσον εὐρέθη (ALDERSON and PELECANOS 1964), ὅτι ἄρρυνα ἡλικίας 0 - 12 ὥρῶν παρουσιάζουν πολὺ μεγαλύτερον ποσοστὸν μεταλλάξεων ἀπὸ τὰ ἡλικίας 12 - 24 ὥρῶν.

Τὸ πρόβλημα διερευνήθη διὰ πέντε σειρῶν πειραμάτων (βλέπε μέθοδοι

καί υλικά) καί ύπελογίσθησαν αί προκαλούμεναι εἰς τὸ Π χρωματόσωμα μεταλλάξεις (ύποτελεῖς θανατογόνου) οὕτως ὥστε νά εἶναι δυνατὴ ἡ περαιτέρω ἐκτίμησις τῶν πιθανῶν κλώνων εἰς ἐκάστην περίπτωσιν. Ὁ πίναξ (3) δεικνύει τὴν διάρκειαν ἀναπτύξεως, τὰ ποσοστὰ ἐπιβιώσεως ὡς καὶ τὰ ποσοστὰ ἐπὶ τοῖς ἐκα-

Πίναξ 3. Διάρκεια ἀναπτύξεως, ἐπιβιώσις καὶ ποσοστὰ ἐπὶ τοῖς ἐκατὸν τῶν προκληθεισῶν εἰς τὸ Π χρωματόσωμα θανατογόνων μεταλλάξεων εἰς δύο διαδοχικὰς δειγματοληψίας

Τύπος πειράματος	Διάρκεια ἀναπτύξεως (ἡμέραι)	Ἐπιβιώσις %	1η Δειγματοληψία			2α Δειγματοληψία		
			N	% l	% f	N	% l	% f
0-12	8,5-9,5	75,4	901	14,76	50,33	776	12,24	43,79
12-24	8,5-9,5	73,0	796	15,83	49,54	560	11,60	40,90
0-24	8,5-9,5	76,5	1003	15,35	48,63	601	11,48	47,77
24-48	8,0-9,0	81,2	759	7,31	24,73	605	8,09	25,24
48-72	8,0-9,0	80,6	602	8,97	25,00	512	7,49	24,00

N=Ἀριθμὸς ἐξετασθέντων χρωματωσώματων.
 % l=Ὑποτελεῖς θανατογόνου μεταλλάξεις ἐπὶ τοῖς ἐκατὸν
 % f=Ποσοστὸν ἐπὶ τοῖς ἐκατὸν θηλέων γονέων ἐκ τῶν ὁποίων προέκυψαν θανατογόνου μεταλλάξεις.

τὸν τῶν προκληθεισῶν θανατογόνων μεταλλάξεων εἰς δύο διαδοχικὰς τριημέρου διάρκειας δειγματοληψίας. Ἡ ἀνάλυσις τοῦ ποσοστοῦ ἐπὶ τοῖς ἐκατὸν τῶν πιθανῶν κλώνων διὰ τὴν πρώτην καὶ δευτέραν δειγματοληψίαν εἰς τοὺς πέντε τύπους πειραμάτων παρουσιάζεται εἰς τοὺς πίνακας (4) καὶ (5) ἀντιστοίχως.

Πίναξ 4. Ἀνάλυσις τοῦ ποσοστοῦ ἐπὶ τοῖς ἐκατὸν τῶν πιθανῶν κλώνων εἰς τὴν πρώτην δειγματοληψίαν πέντε τύπων πειραμάτων

Τύπος πειράματος	Σύνολον + παράγοντα θανατογόνου	Σύνολον θανατογόνων	Γονεῖς μὲ πλείονα τοῦ ἑνὸς θανατογόνου	Ἀριθμὸς θανατογόνων	Γονεῖς μὲ ἕνα θανατογόνον	Ἀριθμὸς θανατογόνων	% Ποσοστὸν γονέων μὲ πλείονα τοῦ ἑνὸς θανατογόνου	% Ποσοστὸν πιθανῶν κλώνων
0-12	76	133	48	105	28	28	63,16	52,38
12-24	55	126	53	104	22	22	60,00	50,00
0-24	72	154	43	126	28	28	60,56	52,38
24-48	23	57	6	40	17	17	26,08	47,50
48-72	24	54	8	38	16	16	33,33	52,63

Τὰ εὐρεθέντα ποσοστὰ τῶν πιθανῶν κλώνων εἰς οὐδεμίαν περίπτωσιν διαφέρουν στατιστικῶς σημαντικῶς μεταξύ των. Οὕτω, δυνάμεθα νά συμπεράνωμεν ὅτι

αί ύψηλώτεροι τιμαί θανατογόνων μεταλλάξεων αί λαμβανόμενοι από τούς τύπους πειραμάτων 0 - 12, 12 - 24, και 0 - 24 όφείλονται μάλλον εις μεγαλύτεραν εύαισθησίαν τών πρώτων ώγονίων έναντι του θειϊκού διαιθυλίου.

Πίναξ 5. 'Ανάλυσις του ποσοστού επί τοίς εκατόν τών πιθανών κλώνων εις τήν δευτέραν δειγματοληψίαν πέντε τύπων πειραμάτων

Τύπος πειράματος	Σύνολον + παράγοντα θανατογόνα	Σύνολον θανατογόνων	Γονεία με πλείονα του ενός θανατογόνα	'Αριθμός θανατογόνων	Γονεία με ένα θανατογόνον	'Αριθμός θανατογόνων	% Ποσοστόν γονέων με πλείονα του ενός θανατογόνα	% Ποσοστόν πιθανών κλώνων
0-12	52	95	37	80	15	15	71,15	48,65
12-24	41	65	21	45	20	20	51,22	51,11
0-24	43	67	22	46	21	21	51,16	50,00
24-48	26	49	6	29	20	20	23,08	51,72
48-72	24	38	5	19	19	19	20,83	47,37

γ. Ταυτότης θανατογόνων εφ' όλοκλήρου του Η χρωματοσώματος. 'Ως έξε- τέθη προηγουμένως, (μέθοδοι και ύλικά), δια τήν μελέτην του ποσοστού τών ταυτιζομένων θανατογόνων επί του συνόλου τών προκληθέντων εκ διαφόρων γονέων, λαμβάνεται ανά εν έξ εκάστου γονέως και έκτελούνται αί διασταυρώσεις δια τήν εύρεσιν τής ταυτότητος τών θανατογόνων. Είς τήν περίπτωσιν μας έχρησιμο- ποιήθησαν τά θανατογόνα τά ληφθέντα εκ τής πρώτης δειγματοληψίας μόνον και λόγω τεχνικών δυσχερειών όχι όλα έξ αύτων. 'Εν τούτοις, τά εύρεθέντα εκ τών πέντε τύπων πειραμάτων αποτελέσματα είναι λίαν ένδεικτικά, δοθέντος ότι

Πίναξ 6. Εύρεσις τής ταυτότητος θανατογόνων μεταλλάξεων, αί όποία προέκυψαν ανά μία εκ διαφόρων γονέων

Τύπος πειράματος	Σύνολον έ- ξετασθέντων θανατογόνων	Ταυτιζόμενα θανατογόνα		Διάφορα θανατογόνα	
		'Αριθμός	'Επί τοίς %	'Αριθμός	'Επί τοίς %
0-12	71	24	33,80	47	66,20
12-24	46	18	39,13	26	60,87
0-24	66	25	37,87	41	62,13
24-48	20	7	35,00	13	65,00
48-72	19	7	36,84	12	63,16

εις όλας τās περιπτώσεις τὸ ποσοστόν τών ταυτιζομένων θανατογόνων είναι ύ- ψηλόν, κυμαίνόμενον από 33,80% εις τόν τύπον 0 - 12 μέχρις 39,13% εις τόν τύπον 12 - 24. Λεπτομερῆ στοιχεῖα παρέχονται εις τόν πίνακα (6).

ΣΥΖΗΤΗΣΙΣ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τὰ εὐρήματα ἐκ τῆς μελέτης δόσεως καὶ γενετικοῦ ἀποτελέσματος εἰς τὰ ἀκμαῖα θήλεα ἐνισχύουν τὴν ἤδη διατυπωθεῖσαν ἄποψιν (PELEGANOS and ALDERSON 1964a), ὅτι ἡ παρουσιαζομένη ἰδιομορφία ὀφείλεται πιθανώτατα εἰς ἀντιδρασιν ἢ καὶ ἀντιδράσεις τοῦ θεϊκοῦ διαιθυλίου μετὰ τοῦ κυρίου συστατικοῦ τῆς παρεχομένης τροφῆς, ἤτοι τῆς ζύμης. Λόγω τῶν ἀντιδράσεων αὐτῶν, ἐν μέγχα μέρος τοῦ μεταλλαξιγόνου καταναλίσκεται καὶ μόνον ὅταν κορεσθοῦν αἱ ὡς ἄνω ἀντιδράσεις (κρίσιμος συγκέντρωσις), τὸ ἐλεύθερον θεϊκὸν διαιθύλιον ἐκδηλώνει ἐντόμως τὴν μεταλλαξιγόνον δρᾶσιν του.

Ἄτυχῶς, δὲν κατέστη δυνατόν, ὅπως εἰς τὴν περίπτωσιν τῶν ἀκμαίων ἀρρένων, νὰ ἐπαληθευθῇ ἡ εὐθὺς ἀνάλογος σχέσις δόσεως καὶ ἀποτελέσματος ἀπουσία ζύμης. Ἡ ληφθεῖσα ἀνώμαλος καμπύλη πιθανὸν νὰ ὀφείλεται εἰς τὸ ὅτι τὰ ἀκμαῖα θήλεα, λόγω τοῦ ὅτι δὲν ἀρέσκονται εἰς τὴν ἄνευ ζύμης χορηγούμενην τροφήν, διατρέφονται πλημμελῶς ἢ δὲν διατρέφονται διόλου ἐκ τοῦ χορηγούμενου εἰς αὐτὰ ἐπὶ 24ωρον διαλύματος θεϊκοῦ διαιθυλίου. Ὑπὲρ τῆς ἐρμηνείας ταύτης συνηγορεῖ ἡ παρατήρησις ὅτι τὸ ποσοστὸν τῶν γονέων οἱ ὅποιοι παράγουν θανατογόνα (πίναξ 2) βαίνει ἐλαττούμενον ὅσον αὐξάνει ἡ συγκέντρωσις εἰς τὸ διάλυμα τοῦ μεταλλαξιγόνου. Ἐπίσης, ἀνάλογοι παρατηρήσεις σχετικαὶ μετὰ τὰς ἐπιδράσεις μικρᾶς διαρκείας αἱ ὅποια ἐγένοντο ἐπὶ τῶν ἀρρένων (PELEGANOS 1965). Δυστυχῶς, ἡ ταχύτης μετὰ τῆς ὁποίας μεταπίπτουν ἐκ τοῦ ἐνὸς σταδίου εἰς ἕτερον τὰ διάφορα στάδια τῆς ὠογενέσεως εἰς τὴν ὠοθήκην τοῦ ἀκμαίου, δὲν ἐπιτρέπει τὴν παράτασιν τοῦ χρόνου ἐπιδράσεως τοῦ μεταλλαξιγόνου ἐπὶ τῶν μυιγῶν ἄνευ τοῦ κινδύνου νὰ δειγματοληπτήσωμεν ἐπὶ μικτῶν γεννητικῶν κυττάρων καὶ οὐχὶ ἐπὶ τῶν ὠρίμων ὠαρίων ὡς ἐπιβάλλεται διὰ νὰ ἔχωμεν συγκρίσιμα πρὸς τὰ προγενέστερα ἀποτελέσματα.

Σχετικῶς μετὰ τὸ πρόβλημα τῆς μεγαλυτέρας εὐαισθησίας τῶν πρώτων ὠογονίων τῆς προνύμφης (ἡλικία 0-24), τὰ δεδομένα τῆς ἐρεῦνης μας συνηγοροῦν σαφῶς ὑπὲρ μιᾶς τοιαύτης παραδοχῆς. Βεβαίως, τὰ ὑπολογισθέντα ποσοστὰ τῶν πιθανῶν κλώνων δὲν εἶναι ἀπόλυτα καθ' ὅσον:

α. Εἶναι δυνατόν νὰ ταυτίζονται δύο θανατογόνα χωρὶς ἀπαραιτήτως νὰ ἀποτελοῦν κλώνον ἐνὸς ἀρχικοῦ ὠογονίου φέροντος θανατογόνον. Ἄλλωστε, τὸ εὐρεθὲν ὑψηλὸν ποσοστὸν ταυτιζομένων θανατογόνων ἐφ' ὀλοκλήρου τοῦ Π χρωματοσώματος ὑποδηλοῖ ὅτι εἶναι δυνατὴ ἡ ἀνεξάρτητος δημιουργία περισσοτέρων τοῦ ἐνὸς ταυτιζομένων θανατογόνων εἰς τὸν αὐτὸν γονέα.

β. Εἶναι ἐπίσης πιθανὸν νὰ μὴν πρόκειται περὶ ἀληθῶν κλώνων ἀλλὰ περὶ «ψευδοκλώνων» (pseudoclusters) θανατογόνων, ἤτοι περὶ θανατογόνων τὰ ὅποια δημιουργοῦνται εἰς θέσεις τοῦ χρωματοσώματος κειμένας πολὺ πλησίον ἀλλήλων (NAFEI and AUERBACH 1964).

Ἐν πάσῃ περιπτώσει, τὰ ἀποτελέσματα τοῦ πίνακος (6) δὲν παρέχουν οὐ-

δεμίαν ένδειξιν ότι τὰ διαφόρου ήλικίας ώογόνια παρουσιάζουν διάφορα ποσοστά ταυτότητας θανατογόνων. Έξ άλλου, ούδεις λόγος συντρέχει ούτως ώστε νά δεχθώμεν ότι τὰ ποσοστά τών τυχόν ψευδοκλώνων είναι τόσο διάφορα εις τὰ διαφόρου ήλικίας έξετασθέντα ώογόνια ώστε νά δικαιολογούν τήν παρατηρηθείσαν μεγάλην διαφοράν συχνότητος προκληθεισών μεταλλάξεων. Κατά συνέπειαν τὰ δεδομένα, ώς έξ άρχής άνεφέρθη, συγκλίνουν μάλλον ύπερ τής παραδοχής τής ύπάρξεως ένός πλέον εύαισθητού σταδίου τó όποιον έντοπιζεται εις τὰ ώογόνια 0-24 ώρων.

Ή διάφορος εύαισθησία τών ώογονίων είναι δυνατόν νά όφείλεται εις πολλούς παράγοντας ώς λ. χ. εις τήν διάφορον διαπερατότητα τών πρωτοπλασματικών μεμβρανών ή τήν έκάστοτε διάφορον πυκνότητα του χρωματοσωματικού υλικου. Έξ άλλου, άν δεχθώμεν ότι ή κυρίως μεταλλαξιγόνος δράσις τών μονοενεργών παραγόντων άλκυλιώσεως όφείλεται εις τήν άλκυλίωσιν του DNA (LAWLEY and BROOKES 1961), (BROOKES and LAWLEY 1963), τότε είναι πιθανόν ή διάφορος εύαισθησία νά όφείλεται εις τó ότι τó DNA δέν πάντοτε έξ ύσου εύπρόσβλητον ύπό τών παραγόντων άλκυλιώσεως. Ούτω, άν είναι εις ώρισμένα στάδια είναι στενωτέρον συνδεδεμένον μετά τής πρωτεϊνης προσβάλλεται όλιγώτερον παρ' όσον όταν είναι χαλαρώς συνδεδεμένον μετ' αύτης, ώς λ. χ. πρό του διπλασιασμου του.

Τó εύρεθέν μέγα ποσοστόν ταυτιζομένων θανατογόνων τών προερχομένων εκ διαφόρων γονέων σαφώς δηλοι ότι ή κατανομή αυτών, τουλάχιστον όσον άφορā εις τó II χρωματόσωμα, δέν είναι τυχαία. Οί GLASS και MARQUARDT (1966) οί όποιοι έμελέτησαν τήν κατανομήν τών ρηγμάτων τά όποια προκαλεί τó θεικόν διαιθυλιον εις τήν *Bellevallia*, εύρον ότι αύτη δέν είναι τυχαία ούτε επί του αυτου χρωματοσωματος άλλ' ούτε και μεταξύ τών διαφόρων χρωματοσωμάτων. Άνάλογοι περιπτώσεις έξειδικευμένης δράσεως μεταλλαξιγόνων έχουν παρατηρηθεί και ύπό άλλων έρευνητών. Ούτω λ. χ. οί NAFEI και LUERBACH (1964), παρατήρησαν ότι ή κατανομή τών θανατογόνων τών προκαλουμένων ύπό τής μυρμηκικής άλδευδης τόσο εις τó X όσο και εις τó II χρωματόσωμα τών άρρένων τής *Drosophila* δέν είναι τυχαία. Έκ τών δεδομένων αυτών νομιζομεν ότι καταφαίνεται ή σημασία μιās περαιτέρω έρεύνης επί τής κατανομής και τής ταυτότητας τών ύπό του θεικου διαιθυλιου προκαλουμένων θανατογόνων και εις άλλα χρωματοσώματα τόσο τών άρρένων όσο και τών θηλέων. Ένδιαφέρον επίσης παρουσιάζει ή έντόπισις τών ταυτιζομένων θανατογόνων ή εύρεσις δηλαδή τής θέσεως αυτών επί του χρωματοσωματος. Τοϋτο θά καταστήση ίσως δυνατήν και τήν εύρεσιν του τρόπου με τον όποιον προκαλείται τόσο μεγάλος αριθμός ταυτιζομένων μεταξύ τών θανατογόνων μεταλλάξεων.

Τοιαῦται έρευναί προγραμματισθεΐσαι, εύρίσκονται ήδη ύπό διεξαγωγής.

Π Ε Ρ Ι Λ Η Ψ Ι Σ

Εἰς τὴν μελέτην ταύτην ἐρευνήθησαν τὰ κάτωθι προβλήματα :

α. Ἡ σχέσις δόσεως καὶ γενετικοῦ ἀποτελέσματος εἰς τὰ ἀκμαῖα θήλαα παρουσία καὶ ἀπουσία ζύμης, ἡ ὁποία καὶ ἀποτελεῖ τὸ κύριον συστατικὸν διατροφῆς τῶν μυϊγῶν εἰς τὴν μέθοδον διατροφῆς τῶν ἀκμαίων.

β. Τὸ ποσοστὸν τῶν προκαλουμένων εἰς τὰ διαφόρου ἡλικία ὠογόνια κλώνων, ἐπὶ τῇ βάσει δὲ αὐτοῦ ἐπιχειρεῖται ἡ ἐξαγωγή συμπερασμάτων ἐπὶ τοῦ ἐὰν πράγματι ἡ μεγαλύτερα συχνότης μεταλλάξεων ἡ ὁποία εὑρέθη εἰς τὰ πρῶτα ὠογόνια (0 - 24 ὥρων) ὀφείλεται εἰς τὴν ἠϋξημένην αὐτῶν εὐαισθησίαν.

γ. Μελετᾶται ἐπίσης τὸ πρόβλημα τῆς ἐνδεχομένης ἐκλεκτικῆς δράσεως τοῦ θειικοῦ διαιθυλίου ἐπὶ ὀρισμένης περιοχῆς ἢ περιοχῶν τοῦ Π χρωματοσώματος. Πρὸς τοῦτο, χρησιμοποιεῖται ἡ τεχνικὴ εὐρέσεως τῆς ταυτότητος τῶν προκληθεισῶν θανατογόνων μεταλλάξεων (identity test).

Συνοπτικῶς τὰ εὐρήματα τῆς ἐρεύνης εἶναι τὰ κάτωθι:

α. Παρουσία ζύμης ἢ σχέσις δόσεως καὶ γενετικοῦ ἀποτελέσματος εἶναι ἀνάλογος πρὸς τὴν παρατηρηθεῖσαν εἰς τὰ ἀκμαῖα ἄρρενα, ἡ δὲ κρίσιμος συγκέντρωσις εἶναι καὶ ἐνταῦθα 0,4%. Ἀντιθέτως εἰς τὴν περίπτωσιν κατὰ τὴν ὁποίαν προστίθεται ζύμη εἰς τὴν τροφήν, λαμβάνεται ἀντὶ τῆς γραμμικῆς συναρτήσεως ἀκανόνιστος καμπύλη. Ἐπιχειρεῖται ἐξήγησις τοῦ φαινομένου τούτου ἐπὶ τῇ βάσει προγενεστέρων ἐρευνῶν.

β. Εἰς πέντε σειρὰς πειραμάτων ἐπὶ τῶν ὠογονίων προνομφῶν διαφορῶν ἡλικιῶν, ἡ ἀνάλυσις τῶν λαμβανομένων ἐκάστοτε κλώνων ἔδειξεν ὅτι τὸ ποσοστὸν αὐτῶν δὲν διαφέρει σημαντικῶς μεταξὺ τῶν ὠογονίων ἡλικίας 0 - 24 ὥρων καὶ τῶν μεταγενεστέρων τοιούτων. Ὅθεν, συνάγεται ὅτι ὑπάρχει στάδιον μεγαλύτερας εὐαισθησίας τὸ ὁποῖον ἐντοπίζεται εἰς τὰ ἔχοντα ἡλικίαν ὀλίγων ὥρων ὠογόνια τῆς προνομφικῆς ὠοθήκης.

γ. Ὁ ἔλεγχος τῆς ταυτότητος τῶν θανατογόνων μεταλλάξεων εἰς τὰς διαφόρους σειρὰς πειραμάτων δεικνύει ποσοστὸν ταυτότητος κυμαινόμενον μεταξὺ 33,80% καὶ 39,13%. Ἡ μεγάλη αὕτη συχνότης ταυτιζομένων θανατογόνων συνηγορεῖ ὑπὲρ τῆς παραδοχῆς τῆς μὴ τυχαίας κατανομῆς αὐτῶν ἐπὶ τοῦ Π χρωματοσώματος.

Διεξάγονται ἐρευναι διὰ τὸν καθορισμὸν τῆς θέσεως τῶν ταυτιζομένων θανατογόνων ἐπὶ τοῦ Π χρωματοσώματος.

Ἡ παροῦσα ἐργασία μὲ ἀντικείμενον τὴν μεταλλαξιγόνον δρᾶσιν τοῦ θειικοῦ διαιθυλίου ἐπὶ τῶν θηλέων τῆς *Drosophila melanogaster* διεξήχθη ἐξ ὀλοκλήρου εἰς τὸ Ἐργαστήριον Γενικῆς Βιολογίας τοῦ Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Πρὸς τὸν καθηγητὴν καὶ διδάσκαλόν μου κ. Α. Κανέλλην, Διευθυντὴν τοῦ ὡς ἄνω Ἐργαστηρίου, ἐκφράζω τὰς θερμὰς μου εὐχαριστίας διὰ τὴν πολὺπλευρον βοήθειαν τὴν ὁποίαν μοῦ παρέσχεν κατὰ τὴν ἐκτέλεσιν τῆς ἐργασίας; καθὼς καὶ διὰ τὴν συνεχῆ του παρότρυνσιν πρὸς νέας ἐρεῦνας.

S U M M A R Y

FURTHER STUDIES ON THE MUTAGENIC ACTIVITY OF DIETHYL SULPHATE IN DROSOPHILA MELANOGASTER FEMALES

By M. Pelecanos Dept. of General Biology University of Thessaloniki - Greece

In previous investigations Pelecanos and Alderson (1964a, 1964b) have studied the dose - mutagenic response to larval and adult feeding of diethyl sulphate as well as the sensitivity of the larval and adult ovary to the mutagenic activity of this mutagen. However, the dose - mutagenic response of the adult females had not been studied; furthermore, the data dit not allow to confirm or to exclude the possibility that an early oögonium is more sensitive than later oögonial stages to the mutagenic activity of diethyl sulphate. In the present investigation we have tried to study the following:

a. The dose - mutagenic response of adult females to the feeding of diethyl sulphate both in the presence and the absence of the major food constituent, the yeast. The sex - linked recessive lethal mutation rate, as determined by the Muller - 5 technique, was used as a measure of the mutagenic effect.

b. Study the oögonial germ cell sensitivity of the larva by determining the frequencies of induced autosomal recessive lethal mutations in two successive 3 - day broods.

c. Investigate the extent of bunching in order to assess whether or not the stage 0-24 hours is more sensitive than the later ones.

d. Study the identity of lethals yielded by different female parents and find the percentage of identical ones.

The available data allow the following assumptions:

a. The dose - mutagenic effect in the presence of yeast is remarkably similar to that found in adult males (see figure and tables 1 and 2), the critical concentration of diethyl sulphate being again 0.4%. On the contrary, the curve obtained in the absence of yeast is an anomalous one. This is probably due to the fact that adult females dislike the treatment medium and when treated for 24 hours they resist to hunger and to not eat enough from it. The low percentage of parents which yielded lethals is in favour of such an explanation.

b. The extent of bunching was shown to be nearly the same all over the 5 types of experiments (tables 4 and 5), while the frequencies of lethals found in the treatments 0-12, 12-24 and 0-24 are significantly higher from those obtained from treatments on later oögonia (table 3). Thus, it appears that the first oögonia are indeed more sensitive to the mutagenic activity of diethyl sulphate.

c. A high percentage of identical lethals was found varying from 33.80%-39.13%. This finding strongly suggests that the distribution of lethals along the second chromosome is not random. Further studies for localising and mapping the lethals are in progress.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ALDERSON T. and M. PELECANOS. The Mutagenic activity of diethyl sulphate in *Drosophila melanogaster*. II. The sensitivity of the immature (larval) and adult testis. *Mutation Research*, **1**, 182-192 (1964)
2. AUERBACH C. Mutation Part I Methods. *London* (1962)
3. DAVIES D. R. The Comparative effects of a mono- and a bifunctional alkylating agent in recombination on *Chlamydomonas reinhardi*. *Zeitschrift für Vererbungsbl.*, **98**, 61-70 (1966).
4. BROOKES P., and P. D. LAWLEY. Effects of alkylating agents on T₂ and T₄ bacteriophages. *Biochem. J.*, **89**, 138 (1963).
5. EHRENBURG L. Chemische Mutagenese. Erwin - Baur - Gedächtn., I, (1959). *Abhandl. Deutsch. Akad. Wiss. Berlin*, **1**, 124-136 (1960).
6. GLÄSS E. und H. MARQUARDT. Verteilung und lokalisation induzierter Brüche auf den Chromosomen von *Bellevalia*. I. Methyl phenylnitrosamin, Diäthylsulfat, Methylmethansulfonat. *Zeitschrift Vererbungsbl.* **68**, 167-179 (1966).
7. HEINER, R. E., C. P. KONZAK, R. A. NILAN and R. R. LEGAULT. Diverse ratios of mutations to chromosome aberrations in barley treated with diethyl sulphate and gamma rays. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **46**, 1215-1221 (1960).
8. HESLOT, H et R. FERRARY. Action génétique comparée des radiations et de quelques mutagènes sur l'orge. *Ann. Inst. Nat. Agronomique*, **44**, 133-152 (1958).
9. HESLOT H. Actions d'agents chimiques mutagènes sur quelques plantes cultivées. *Abhandl. Deutsch. Akad. Wiss.*, **I** (1960).
10. KING R. C., A. C. ROBINSON. and R. F. SMITH. Oögenesis in adult *Drosophila melanogaster*. *Growth*, **20**, 121-157 (1956).
11. KOLMARK G. Mutagenic properties of certain esters of inorganic acids investigated by the *Neurospora* back - mutation test. *Comptes - rendus Lab. Carlsberg Ser. Physiol.*, **26**, 205-220 (1956).
12. LAWLEY, P. D. and P. BROOKES. Acidic dissociation 7:9 dialkyl - guanines and its possible relations to mutagenic properties of alkylating agents. *Nature*, **192**, 1081 (1961).
13. LOVELESS A. The influence of radiomimetic substances in DNA synthesis and function studied in *E. coli* phage systems III. Mutation of T2 bacteriophage as a consequence of alkylation in vitro: the uniqueness of ethylation. *Proc. Roy. Soc. London*, **150**, 497-508 (1959).
14. LÜERS H.. Untersuchung über die Mutagenität des (TEM) in *Drosophila melanogaster*. *Arch. for Geschwulstforschung*, **6**, 77 (1953).
15. NAFEI H. and C. AUERBACH. Mutagenesis by formaldehyde food in relation to

- DNA replication in *Drosophila* spermatocytes. *Zeitschrift Vererbungsl.*, **95**, 351-367 (1964).
16. PELECANOS M. and T. ALDERSON. The mutagenic activity of diethyl sulphate in *Drosophila melanogaster*. I. The dose - mutagenic response to larval and adult feeding. *Mut. Research*, **I**, 173-181 (1964a).
 17. PELECANOS M. and T. ALDERSON: The mutagenic activity of diethyl sulphate in *Drosophila melanogaster*. III. The sensitivity of the immature (larval) and adult ovary. *Mut. Research*, **I**, 302-309 (1964b).
 18. PELECANOS M. The mutagenic effect of the duration of treatment with diethyl sulphate on previously starved adult males. *Dros. Inf. Service*, **40**, 42 (1965).
 19. PELECANOS M. Induction of cross-overs, recessive lethal mutations and reciprocal translocations in *Drosophila* after treatment with diethyl sulphate. *Nature*, **210**, 1254-5 (1966).
 20. RAPOPORT I. A. About the mutagenic action of dimethyl and diethyl sulphate. (Russian), *Dok. Vsesoyuz. Akad. Sel'sko - Khoz Nauk Lenina*, **12**, 12-15 (1947).
 21. ROSS W. C. J. Biological alkylating agents. *London* (1962).
 22. STRAUSS, B. and S. OKUBO. Protein synthesis and the induction of mutations in *E. coli* by alkylating agents. *Journ. Bacteriol.*, **79**, 464-473 (1960).