

УДК 633.11:575.24:631.528

ЧАСТОТА И СПЕКТР ХРОМОСОМНЫХ НАРУШЕНИЙ В КЛЕТКАХ КОРНЕВОЙ МЕРИСТЕМЫ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ МУТАГЕНОВ

© 2007 г. Н. Н. Назаренко

Институт физиологии растений и генетики

Национальной академии наук Украины

(Киев, Украина)

Проведен сравнительный анализ частоты хромосомных aberrаций при действии мутагенных факторов на семена сортов озимой пшеницы Смуглянка и Панна. Частота хромосомных aberrаций в зависимости от дозы колебалась от 1,28 до 47,85 %. На основании результатов факторного и дискриминантного анализа спектра хромосомных aberrаций показана специфичность действия мутагенов.

Ключевые слова: *Triticum aestivum L.*, мутаген, хромосомные aberrации, спектр, частота

Цитологический анализ хромосомных aberrаций является одной из надежных методик оценки и идентификации факта мутагенного воздействия. Значение цитологического анализа возрастает в связи с использованием ряда качественно новых мутагенов [8, 15-17], развитием исследований в области действия сверхмалых доз мутагенов [1, 3, 14], а также механизмов мутагенеза и антимутагенеза [5, 12, 13].

Также цитологический анализ широко применим в установлении перехода из области радиационной стимуляции в область линейного индуцирования хромосомных aberrаций [5], выявлении механизмов адаптивного ответа и, как следствие, повышения репарационной активности при разных режимах обработки мутагенами [12, 13].

Целью нашего исследования было изучение и сравнение частоты и спектра хромосомных aberrаций при действии мутагенных факторов на растения пшеницы на основе данных цитологического анализа хромосом.

Опыты проводились на двух сортах озимой пшеницы (*Triticum aestivum L.*) – Смуглянка и Панна – в рамках цикла исследований по получению генетически и селекционно ценных

мутаций у этих сортов пшеницы. Выбор сорта Смуглянка обусловлен его мутагенным происхождением и высокой продуктивностью (существует мнение, что обработка мутагенами сортов, полученных с помощью экспериментального мутагенеза, увеличивает спектр и частоту мутаций, а также такие сорта характеризуются более высоким процентом хромосомных aberrаций); сорт Панна был выбран как единственный на данный момент сорт сверхсильной пшеницы. Ставится задача его улучшения по отдельным параметрам (устойчивость к полеганию, продуктивность). Цитологический анализ проводился с целью установления параметров анализа, по которым можно идентифицировать природу мутагенного действия. Кроме того, использовалась возможность проверить на практике предположение о большей генетической нестабильности современных сортов озимой пшеницы (существуют данные о высокой скрытой гетерозиготности современных сортов, чем и пытаются объяснить их повышенную продуктивность), которая должна была отобразиться в более высоком проценте aberrаций в контроле и при низких дозах мутагенов.

МЕТОДИКА

В опытах использовались сухие семена пшеницы, которые обрабатывали химическими мутагенами НЭМ (нитрозоэтилмочевинной) –

Адрес для корреспонденции: Назаренко Николай Николаевич, Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, ул. Васильковская, 31/17, Киев, 03022, Украина

ЧАСТОТА И СПЕКТР ХРОСОМНЫХ НАРУШЕНИЙ

0,005, 0,01, 0,025, 0,05 %, НММ (нитрозометилмочевиной) – 0,001, 0,005, 0,0125, 0,025% по общепринятой методике [4] и облучали гамма-лучами в дозах 50, 100, 150, 200 Гр.

Функциональной особенностью химических мутагенов НЭМ и НММ является преобладание воздействия на последовательности 5'-GNC-3', где N – любое из ДНК-оснований. В основном алкилирующему действию подвержены центры с низкой нуклеофильностью. Для НММ наиболее повреждаемый сайт N7 гуанина, для НЭМ – сахарофосфатный остов ДНК с целями на фосфатных группах [6].

Обработанный химическими мутагенами материал промывали под проточной водой в течение 10-15 мин и проращивали в чашках Петри с увлажненной фильтровальной бумагой в термостате при температуре 22°C. Для цитологического анализа структуры хромосомного аппарата первичные корешки фиксировали в фиксаторе Карнуа в течении 24 часов. Фиксированный материал сохраняли в 70-градусном спирте при температуре 2°C в холодильнике. По каждому варианту фиксировалось не менее 20 корешков.

Анализ проводили на временных давленных препаратах кончиков корешков. Препараты готовили согласно методике [10, 11], анализировали под микроскопом (выявляли митозы с aberrациями). При подсчете пользовались ана-

фазным методом. Данные были исследованы на нормальность распределения по критерию Колмогорова-Смирнова, а также по χ^2 (в этом случае – кроме контроля). Значимость разницы как между контролем и вариантами, так и между вариантами определялась по критерию Стьюдента [7]. При анализе данных использовался пакет анализа Statistic 6.0

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показано в табл. 1, все варианты достоверно отличались по частоте хромосомных aberrаций друг от друга и от контроля. Для упрощения схемы статистической обработки варианты были разбиты на группы по природе мутагена и изучалась сначала значимость отличия варианта с наименьшей дозой мутагена от контроля, а затем отличия вариантов внутри группы. Частота хромосомных aberrаций варьировала от 3,26 % до 41,2 % для Панны и от 5,14 % до 47,7 % для Смуглянки. Ряд мутагенов по частоте индуцированных aberrаций можно представить так гамма-лучи > НММ > НЭМ, что соответствует предыдущим исследованиям [2].

Что касается спектра aberrаций, то картина неоднозначная, хотя в целом можно отметить, что гамма-излучение вызывает большее количество мостов, нежели фрагментов, а

Таблица 1

Частота хромосомных aberrаций при действии мутагенных факторов на семена озимой пшеницы

| Вариант | Митозы | Аберраций | | Митозы | Аберраций | |
|----------------|--------|-----------|-------------|-----------|-----------|-------------|
| | | шт | % | | шт | % |
| | Панна | | | Смуглянка | | |
| Контроль, вода | 1013 | 13 | 1,28±0,43 | 1018 | 19 | 1,87±0,48 |
| 50 Гр | 1004 | 119 | 11,85±0,98* | 1032 | 151 | 14,63±1,17* |
| 100 Гр | 984 | 204 | 20,73±1,42* | 1031 | 283 | 27,45±1,63* |
| 150 Гр | 1002 | 302 | 30,14±1,78* | 1012 | 387 | 38,24±1,99* |
| 200 Гр | 551 | 227 | 41,20±2,01* | 846 | 404 | 47,75±2,18* |
| НЭМ 0,005 % | 1011 | 33 | 3,26±0,57* | 1006 | 56 | 5,57±0,64* |
| НЭМ 0,01 % | 1002 | 91 | 9,08±0,92* | 1023 | 121 | 11,83±0,97* |
| НЭМ 0,025 % | 1018 | 169 | 16,60±1,22* | 1017 | 192 | 18,88±1,39* |
| НЭМ 0,05 % | 1024 | 218 | 21,29±1,47* | 1028 | 281 | 27,33±1,70* |
| НММ 0,001 % | 1036 | 37 | 3,57±0,61* | 1051 | 54 | 5,14±0,61* |
| НММ 0,005 % | 1041 | 105 | 10,09±0,95* | 1007 | 125 | 12,41±1,02* |
| НММ 0,0125 % | 1019 | 197 | 19,33±1,36* | 1026 | 213 | 20,76±1,42* |
| НММ 0,025 % | 982 | 289 | 29,43±1,71* | 846 | 290 | 34,28±1,79* |

* - различие статистически достоверно при $t_{0,05}$

Таблица 2

Спектр хромосомных aberrаций. Сорт Панна

| Вариант | Фрагменты (одинарные +двойные) | | Мосты (хромосомные + хроматидные) | | Фрагменты / мосты | Другие (микроядра, отстающая хромосома) | | Две aberrации и более | |
|----------------|--------------------------------|--------|-----------------------------------|--------|-------------------|---|-------|-----------------------|------|
| | шт. | % | шт. | % | | шт. | % | шт. | % |
| Контроль, вода | 4 | 0,39 | 9 | 0,89 | 0,44* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 50 Гр | 48 | 4,78* | 71 | 7,07* | 0,68* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 100 Гр | 67 | 6,81* | 112 | 11,38* | 0,60* | 8 | 0,82* | 17 | 1,73 |
| 150 Гр | 95 | 9,48* | 167 | 16,67* | 0,57* | 17 | 1,70* | 23 | 2,30 |
| 200 Гр | 88 | 15,97* | 89 | 16,15* | 0,99 | 18 | 3,26* | 32 | 5,81 |
| НЭМ 0,005% | 17 | 1,68* | 16 | 1,58* | 1,06* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| НЭМ 0,01% | 45 | 4,49* | 41 | 4,09* | 1,10* | 1 | 0,10* | 3 | 0,30 |
| НЭМ 0,025% | 79 | 7,76* | 77 | 7,56* | 1,03 | 5 | 0,49* | 8 | 0,79 |
| НЭМ 0,05% | 95 | 9,28* | 94 | 9,18* | 1,01 | 10 | 0,98* | 19 | 1,86 |
| НММ 0,001% | 19 | 1,83* | 18 | 1,74* | 1,06* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| НММ 0,005% | 52 | 5,00* | 49 | 4,71* | 1,06* | 1 | 0,10* | 3 | 0,29 |
| НММ 0,0125% | 90 | 8,83* | 88 | 8,64* | 1,02 | 7 | 0,69* | 12 | 1,18 |
| НММ 0,025% | 129 | 13,14* | 113 | 11,51* | 1,14* | 13 | 1,32* | 34 | 3,46 |

* - различие статистически достоверно при $t_{0,05}$

ЧАСТОТА И СПЕКТР ХРОСОМНЫХ НАРУШЕНИЙ

Таблица 3

Спектр хромосомных aberrаций. Сорт Смуглянка

| Вариант | Фрагменты (одинарные +двойные) | | Мосты (хромосомные + хроматидные) | | Фрагменты / мосты | Другие (микроядра, отстающая хромосома) | | Две aberrации и более | |
|----------------|--------------------------------|--------|-----------------------------------|--------|-------------------|---|------|-----------------------|------|
| | шт | % | шт | % | | шт | % | шт. | % |
| Контроль, вода | 9 | 0,88 | 10 | 0,98 | 0,90* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 50 гр | 68 | 6,59* | 75 | 7,27* | 0,91* | 4 | 0,39 | 4 | 0,39 |
| 100 Гр | 123 | 11,93* | 128 | 12,42* | 0,96* | 12 | 1,16 | 20 | 1,94 |
| 150 Гр | 165 | 16,30* | 167 | 16,50* | 0,99 | 19 | 1,88 | 36 | 3,56 |
| 200 Гр | 166 | 19,62* | 167 | 19,74* | 0,99 | 28 | 3,31 | 43 | 5,08 |
| НЭМ 0,005% | 30 | 2,98* | 23 | 2,29* | 1,30* | 1 | 0,10 | 2 | 0,20 |
| НЭМ 0,01% | 57 | 5,57* | 51 | 4,99* | 1,12* | 5 | 0,49 | 8 | 0,78 |
| НЭМ 0,025% | 91 | 8,95* | 78 | 7,67* | 1,17* | 10 | 0,98 | 13 | 1,28 |
| НЭМ 0,05% | 129 | 12,55* | 113 | 10,99* | 1,14* | 17 | 1,65 | 22 | 2,14 |
| НММ 0,001% | 25 | 2,38* | 19 | 1,81* | 1,32* | 6 | 0,57 | 4 | 0,38 |
| НММ 0,005% | 55 | 5,46* | 54 | 5,36* | 1,02 | 8 | 0,79 | 8 | 0,79 |
| НММ 0,0125% | 89 | 8,67* | 86 | 8,38* | 1,03* | 16 | 1,56 | 22 | 2,14 |
| НММ 0,025% | 109 | 12,88* | 108 | 12,77* | 1,01 | 28 | 3,31 | 45 | 5,32 |

* - различие статистически достоверно при $t_{0,05}$

Результаты факторного анализа по данным цитологического анализа

| Переменная | Фактор | F | F критическое |
|---------------------|------------------|-------|---------------|
| частоты aberrаций | генотип | 6,56 | 4,32 |
| | доза мутагена | 4,89 | 4,75 |
| | природа мутагена | 2,12 | 4,14 |
| 2 и более aberrации | генотип | 13,32 | 4,18 |
| | доза мутагена | 5,12 | 4,25 |
| | природа мутагена | 2,01 | 3,94 |
| мост хромосомный | генотип | 13,90 | 4,75 |
| | доза мутагена | 0,93 | 4,16 |
| | природа мутагена | 3,25 | 4,75 |
| мост хроматидный | генотип | 2,48 | 5,14 |
| | доза мутагена | 11,09 | 4,17 |
| | природа мутагена | 3,12 | 5,04 |
| фрагменты одиночные | генотип | 4,34 | 4,05 |
| | доза мутагена | 4,70 | 3,98 |
| | природа мутагена | 1,08 | 4,04 |
| отстающая хромосома | генотип | 5,57 | 5,16 |
| | доза мутагена | 6,48 | 4,33 |
| | природа мутагена | 0,60 | 5,09 |
| микроядро | генотип | 6,56 | 4,65 |
| | доза мутагена | 5,57 | 5,04 |
| | природа мутагена | 4,09 | 4,48 |
| фрагменты парные | генотип | 2,25 | 5,17 |
| | доза мутагена | 5,22 | 4,75 |
| | природа мутагена | 2,51 | 5,16 |

химические мутагены – фрагментов. Такая aberrация как двойные фрагменты считается индикатором мутагенного действия [14] (что не соответствует полученным результатам по модельным переменным) и в целом частота повышается при увеличении дозы. Также с увеличением дозы специфика действия физических и химических мутагенов становится менее различимой (табл. 2, 3). Увеличение частот таких aberrаций как фрагменты, мосты, микроядра и отстающие хромосомы связаны в большей мере с линейным возрастанием дозы. Удельный вес частот комплексных aberrаций увеличивается с увеличением дозы.

В целом механизм действия НЭМ, отличный от других алкилирующих агентов, находит своё отражение в соотношении фрагментов и мостов при сопоставимых с НММ концентрациями, однако отличия не всегда статистически достоверны (табл. 2, 3).

Специфика генотипа проявляется в разной частоте хромосомных aberrаций при рав-

ных дозах мутагенов. Смуглянка демонстрирует более высокую чувствительность, но одновременно и более высокую избирательность и специфичность. Видимо, генотип-мутагенное взаимодействие играет существенную роль при образовании хромосомных aberrаций.

Следует отметить, что пожалуй наиболее депрессивное воздействие при проращивании оказали доза 200 Гр на Панну и доза 0,025 % НММ на Смуглянку. Причём 200 Гр оказали столь депрессивное воздействие на семена Панны, что для фиксации пришлось отбирать боковые первичные корешки. Видимо, более высокая выживаемость Панны при этой дозе по сравнению со Смуглянкой в полевых условиях объясняется модифицирующими факторами среды (скорее всего температурным режимом почвы и её влажностью) [14], либо гораздо более интенсивным развитием вторичной корневой системы. А более низкая частота хромосомных нарушений – повышенной элиминацией клеток с повреждениями генетических структур клеточного ядра [3, 16].

Результаты дискриминантного анализа по данным цитологического анализа сортов Панна и Смуглянка

| Переменные в модели | Гамма-излучение | НЭМ | НММ |
|---------------------|-----------------|------|------|
| Панна | | | |
| частоты аберраций | 0,07 | 0,28 | 0,40 |
| 2 и более аберрации | 0,05 | 0,07 | 0,04 |
| мост хромосомный | 0,06 | 0,07 | — |
| мост хроматидный | 0,06 | — | — |
| фрагменты одиночные | 0,02 | — | 0,06 |
| отстающая хромосома | — | 0,07 | — |
| микроядро | 0,05 | 0,07 | — |
| Смуглянка | | | |
| частоты аберраций | 0,08 | 0,79 | 0,14 |
| 2 и более аберрации | — | — | — |
| мост хромосомный | 0,06 | — | 0,07 |
| мост хроматидный | 0,06 | — | — |
| фрагменты одиночные | 0,06 | — | 0,08 |
| отстающая хромосома | — | 0,08 | — |
| микроядро | 0,05 | 0,08 | — |
| фрагменты парные | — | — | 0,07 |

При повышении дозы мутагена также возрастало количество клеток с двумя и более аберрациями. Зависимость в целом линейная, хотя и не полностью.

Можно сделать вывод, что частота и частично спектр хромосомных аберраций зависят от генотипа объекта, дозы и природы мутагена. Вопрос о приоритетности этих факторов в модификации мутагенного действия на уровне хромосомного аппарата клетки был проанализирован с помощью факторного анализа (табл. 4). Установлено что, как и в случае со структурным анализом [9], приоритет за генотипом объекта, вклад дозы и природы мутагена менее существенен.

Для выявления модельных параметров цитологического анализа использовался дискриминантный анализ (проанализированы показатели цитологического анализа по остаточной λ Уилкса) (табл. 5). Установлено, что действие гамма-излучения вызывает появление мостов, НММ – фрагментов, НЭМ – скорее мостов, однако четкой специфики не выявлено. Наличие парных фрагментов фактически ни в одном случае не входило в число модельных. Частота хромосомных аберраций была в модели всегда с наиболее высокой степенью достоверности. У Смуглянки в вариантах с гамма-излучением и НММ модельным было и число мостов, и число фрагментов, однако в варианте

с гамма-излучением количество мостов было гораздо лучшим классификатором, нежели количество фрагментов, в случае с НММ – соответственно наоборот.

Линейная зависимость между дозой мутагена и количеством аберраций крайне сильна и характеризуется коэффициентом ранговой корреляции 0,89 – 0,92 в зависимости от сорта и природы мутагена.

Цитологический анализ гораздо достовернее, чем структурный анализ отображает дозу мутагена (на примере модельных переменных), особенно в случае низких и оптимальных доз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гераськин А. С., Дикарев В.Г., Дикарева Н.С. Влияние раздельного радиоактивного и химического загрязнения на выход цитогенетических нарушений в интеркалярной меристеме ярового ячменя // Радиационная биология. Радиоэкология – 2002. – Т. 42, № 4. – С. 364 – 368.
2. Дем'яненко В.В., Логвиненко В.Ф., Семерунь Т.Б. Вивчення цитогенетичної активності мутагенних чинників на прикладі озимої пшениці // Физиология и биохимия культ. растений – 2005. – Т. 37, № 4. – С. 313 – 318.

НАЗАРЕНКО

3. *Егоров Е.В.* Аналогия биологического действия сверхмалых химических и физических доз // Радиационная биология. Радиоэкология – 2003. – Т. 43, № 3. – С. 261 – 264.
4. *Зоз Н. Н.* Методика использования химических мутагенов в селекции сельскохозяйственных культур // Мутационная селекция. – М.: Наука, 1968. – С. 23-27
5. *Корогодина В.Л., Пантелева А., Ганичева И.* Влияние мощности дозы гамма-облучения на митоз и адаптивный ответ клеток первичных корней проростков гороха // Радиационная биология. Радиоэкология – 1998. – Т. 38, № 5. – С. 643 – 649.
6. *Кужир Т.Д.* Антимутагены и химический мутагенез в системах высших эукариот. – Минск, 1999. – 267 с.
7. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
8. *Моргун В. В., Логвиненко В. Ф.* Мутационная селекция пшеницы. – Киев: Наукова думка, 1995. – 628 с.
9. *Назаренко М.М.* Вживаність та структура врожайності як показники мутагенної депресії у першому поколінні мутантів сортів озимої м'якої пшениці // Физиология и биохимия культурных растений. – 2007. – Т. 39, № 5. – С. 438-446.
10. *Паушева З. П.* Практикум по цитологии растений. – М.: Агропромиздат, 1988. – 271 с.
11. *Проніна О. В.* Методичні вказівки до спецпрактикуму "Експериментальний мутагенез" для студентів біологічного факультету / Київський національний ун-т ім. Тараса Шевченка. — К. : Український фітосоціологічний центр, 2002. — 24 с.
12. *Серебряный А.М., Зоз Н.Н.* Радиационный адаптивный ответ у пшеницы. Феноменология и вероятный механизм // Радиационная биология. Радиоэкология – 2001. – Т. 41, № 5. – С. 589 – 598.
13. *Серебряный А.М., Зоз Н.Н., Морозова И.С.* К механизму антимутагенеза у растений // Генетика – 2005. – Т. 41, № 5. – С. 676 – 679.
14. *Шамаль Н.В.* Цитогенетические нарушения у проростков ячменя под действием гамма-облучения семян и засухи // Весці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2006. – № 1. – С. 72 – 75.
15. *Amano E.* Use of Induced Mutants in Rice Breeding in Japan // Plant Mutation Reports – 2006. – V. 1, № 1. – P. 21 – 24.
16. *Lifang Wu-Zengliang Yu* Radiobiological effects of a low-energy ion beam on wheat // Radiat Environ Biophys – 2001. – V. 40. – P. 53 – 57.
17. *Yamaguchi H., Morishita T., Degi K.* Effect of Carbon-ion Beams Irradiation on Mutation Induction in Rice // Plant Mutation Reports – 2006. – V. 1, № 1. – P. 25 – 27.

Поступила в редакцію
07.03.2007 г.

FREQUENCY AND SPECTRUM OF CHROMOSOMAL DERANGEMENTS IN THE ROOT MERISTEM CELLS OF WHEAT PLANTLETS AT THE MUTAGENS ACTION

N. N. Nazarenko

*Institute of Plant Physiology and Genetics
National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)*

The comparative analysis of frequency of chromosomal aberrations at action by mutation factors on the seeds of winter wheat sorts Smuglyanka and Panna has been conducted. Frequency of chromosomal aberrations depending on a dose has been varied from 1,28 to 47,85 %. On the basis of the results of factor and discriminant analysis of chromosomes aberation spectrum the specificity of mutagens action is shown.

Key words: *Triticum aestivum L., mutagen, chromosomal aberrations, spectrum, frequency*

ЧАСТОТА И СПЕКТР ХРОМОСОМНЫХ НАРУШЕНИЙ

**ЧАСТОТА ТА СПЕКТР ХРОМОСОМНИХ ПОРУШЕНЬ
В КЛІТИНАХ КОРЕНЕВОЇ МЕРИСТЕМИ ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ
ЗА ДІЇ МУТАГЕНІВ**

М. М. Назаренко

*Інститут фізіології рослин і генетики
Національної академії наук України
(Київ, Україна)*

Проведено порівняльний аналіз частоти хромосомних аберацій при дії мутагенними чинниками на насіння сортів озимої пшениці Смуглянка і Панна. Частота хромосомних аберацій залежно від дози коливалася від 1,28 до 47,85 %. На підставі результатів факторного та дискримінантного аналізу спектра хромосомних аберацій показана специфічність дії мутагенів.

Ключові слова: *Triticum aestivum L.*, мутаген, хромосомні аберації, спектр, частота