

Л. Г. Вельчева, В.А. Васін

ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ ЕФЕКТ КОМБІНОВАНОЇ ОБРОБКИ МУТАГЕНАМИ НАСІННЯ ЛІНІЙНОЇ КУКУРУДЗИ

Мелітопольський державний педагогічний університет імені Богдана Хмельницького

Вивчена ефективність комбінованої обробки насіння кукурудзи при різній послідовності накладення мутагенів. Виявлено відмінності в дії прямої (хімічний мутаген + гамма-промені) і зворотної (гамма-промені + хімічний мутаген) послідовностей комбінованої обробки.

Ключові слова: аберації хромосом, мітотична активність, меристема первинного корінця.

Л. Г. Вельчева, В.А. Васін

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ КОМБИНИРОВАННОЙ ОБРАБОТКИ МУТАГЕНАМИ СЕМЯН ЛИНЕЙНОЙ КУКУРУДЗЫ

*Мелитопольский государственный педагогический университет
имени Богдана Хмельницкого*

Изучалась эффективность комбинированной обработки семян кукурузы при различной последовательности наложения мутагенов. Выявлены различия в действии прямой (химический мутаген + гамма-лучи) и обратной (гамма-лучи + химический мутаген) последовательностей комбинированной обработки.

Ключевые слова: аберрации хромосом, митотическая активность, меристема первичного корешка.

L. G. Velcheva, V. A. Vasin

CYTOGENETIC EFFECT OF COMBINED TREATMENT OF LINEAR CORN SEEDS BY MUTAGENES

Bogdan Chmelnskiy Melitopol State Pedagogical University

Study of efficiency of combined processing of corns was done in various succession with putting mutagen. Changes were revealed in actions of direct (chemical mutagen + gamma rays) and indirect (gamma rays + mutagen) successions of combined processing.

Key words: chromosome aberrations, mitotic activity, the primary meristem of the spine.

Перспективність комбінованого використання мутагенів вперше була показана на мікроорганізмах. Відтоді метод займає достойне місце серед інших генетичних методів, які використовують в формообразуючому процесі (Дубинин, Тарасов, 1969; Моргун, 2001; Мутаційна..., 2001; Химический..., 1993).

У літературі є дані, які показують розбіжності виходу мутацій при різних послідовностях накладення мутагенних факторів. Незважаючи на широке поширення, у досліджах з комбінованого використання мутагенів отримані і суперечливі результати (Гирко, Волощук, 1999; Ларченко, Моргун, 2000; Тефері, 2000; Чеченева, Ларченко, 1997). В одних дослідженнях за частотою мутацій виявлені адитивні і нададитивні ефекти, а також виділені мутанти, які не зустрічаються при роздільному застосуванні мутагенів, а в інших - ефект менш сумарного або навіть нижче, ніж у випадку роздільного застосування кожного з мутагенів. Незважаючи на таку проблематичність, використання комбінованої обробки, на думку багатьох дослідників, є досить перспективним.

G. Rukmansky (Rukmansky, 1975) вважає, що практичне значення мають не тільки випадки отримання більшої кількості та більш широкого спектра мутацій, але й випадки, коли ефект нижче сумарного, але вище ефекту одного з мутагенів, тому що при цьому індукується більше мутацій в одному і тому ж біологічному об'єкті.

Виходячи з вищесказаного, ми поставили мету: вивчити мутагенну ефективність гамма-променів (100 Гр), етиленімін (0,03%) і нітрозометілмочевини (0,01%), що використовуються самостійно і в комбінації.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Як вихідний матеріал використовували повітряно-сухе насіння трьох гомозиготних ліній кукурудзи: МК 167, 346 і 502. Насіння піддавали роздільної та комбінованої обробки мутагенами. Мутагенними чинниками служили етиленімін (ЕІ) 0,03%, нітрозометілсечовина (НМС) 0,01% і гамма-промені 100 Гр. При комбінованій обробці застосовували різну послідовність накладення мутагенних факторів. Послідовність, при якій насіння на початку замочували в розчинах хімічних

мутагенів, а потім піддавали гамма-опроміненню, умовно названа прямою. Послідовність, при якій насіння на початку опромінювали, а потім замочували в розчинах хімічних мутагенів - зворотною. Насіння обробляли за загальноприйнятою методикою (Моргун, 2001), час експозиції - 18 годин. У лабораторних умовах вивчали частоту і спектр аберацій хромосом, мітотичну активність клітин меристеми (МА) первинного корінця. Визначення мітотичної активності проводили на тимчасових препаратах. У кожному корінці переглядали більше 1000 клітин, враховуючи кількість клітин, що знаходяться в мітозі. Показником активності розподілу меристематичних клітин первинних корінців служив "мітотичний індекс" (МІ), тобто відношення числа клітин, що знаходяться в мітозі до числа досліджених клітин, виражене в промілях (Паушева, 1980). Аналіз аберацій хромосом проводився в першому мітозі після пророщування анафазним методом на тимчасових препаратах, забарвлених ацетокарміном (Паушева, 1980). При аналізі враховували хромосомні і хроматидні мости, одиночні і парні фрагменти, міст з одним фрагментом, міст з двома фрагментами. До "інших" аберацій хромосом відносили в основному хромосоми, що відстали, не ідентифіковані та інші аберації. В кожному варіанті досліджували по 10 корінців, в яких в середньому переглядали 350 - 500 анафаз і ранніх телофаз. Цифрові дані лабораторних дослідів оброблені статистично за Рокицьким (Рокицкий, 1974).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вивчення мітотичної активності меристематичних клітин лінійної кукурудзи показало, що у варіантах комбінованої обробки залежно від послідовності накладення мутагенів відзначаються дві тенденції.

По-перше, у варіантах з прямою послідовністю накладення мутагенів спостерігається різке достовірне зменшення кількості меристематичних клітин первинних корінців, як в порівнянні з роздільною обробкою, так і порівняно з контролем. МА за величиною МІ в цих варіантах для лінії МК 167 склала відповідно 46,9 і 30,8 проміль (контроль - 66,5).

По-друге, комбінована обробка насіння кукурудзи тими ж агентами, взятими в зворотній послідовності, призвела до достовірного збільшення кількості клітин, що діляться в первинних корінцях. МА за величиною МІ для лінії МК 167 в варіанті обробки гамма-промені + ЕІ дорівнює 82,7; а при обробці гамма-променями і НМС - 90,0 проміль (табл. 1).

Таблиця 1

Мітотична активність меристематичних клітин первинних корінців проростків кукурудзи лінії МК 167

Мутагенний фактор	Кількість		Мітотичний індекс, промілі
	переглянутих клітин	клітин в мітозі	
Контроль	5010	333	66,46 ± 2,58
ЕІ 0,03 %	5112	412	80,59 ± 1,94*
НМС 0,01 %	5003	391	78,15 ± 2,08*
Гамма-промені, 100 Гр	5014	405	80,77 ± 1,95*
ЕІ 0,03 % + гамма-промені, 100 Гр	5073	238	46,91 ± 3,23*
НМС 0,01 % + гамма-промені, 100 Гр	5123	158	30,84 ± 3,67*
Гамма-промені 100 Гр + ЕІ 0,03 %	5101	422	82,72 ± 1,84*
Гамма-промені 100 Гр + НМС 0,01 %	5121	461	90,02 ± 1,39*

* P ≥ 0,01

На лініях 346 і 502 відмінності в дії прямої і зворотної послідовностей комбінованої обробки так само мають місце.

Мутагенна обробка насіння призводить до пошкоджень мітотичного апарату в клітинах зародка. При прямій послідовності комбінованої обробки такі ушкодження, індуковані хімічними мутагенами, цілком ймовірно, не встигають репаруватися до впливу другого агенту (гамма-променів), так як вони є довготерміновими (Дубинин, Тарасов, 1969). В результаті чого велика кількість клітин зародка не приступає до поділу, чим і пояснюється низька МА. При зворотній послідовності комбінованої обробки пошкодження мітотичного апарату від впливу гамма-променів швидко репаруються, так як вони є короткотерміновими (Дубинин, Тарасов, 1969).

Подальша обробка хімічними мутагенами не викликає зниження швидкості ділення клітин меристеми і відзначається висока МА.

Вивчення аберацій хромосом показало, що рівень природного мутування становить 2,4% (табл. 2) для лінії МК 167.

Таблиця 2

Частота і спектр аберацій хромосом в насінні кукурудзи лінії МК 167

Мутагенний фактор	Аберації					"Інші", %
	Всього, % + m	Мости		Фрагменти		
		хромосомні, %	хроматидні, %	одиначні, %	подвійні, %	
Контроль	2,38 ± 0,28	0,26	0,83	0,31	0,42	0,56
ЕІ 0,03 %	38,25 ± 1,14*	11,68	10,02	3,88	1,95	10,72
НМС 0,01 %	32,15 ± 1,30*	12,06	8,70	4,67	2,96	3,76
Гамма-промені 100 Гр	40,37 ± 1,27*	21,03	5,07	10,77	1,21	2,29
ЕІ 0,03 % + гамма-промені 100 Гр	48,02 ± 1,15*	18,85	14,99	8,25	2,05	3,88
НМС 0,01 % + гамма-промені 100 Гр	76,23 ± 0,80*	24,29	17,43	15,97	6,71	11,83
Гамма-промені 100 Гр + ЕІ 0,03 %	24,15 ± 1,30*	9,72	8,72	2,44	1,02	2,24
Гамма-промені 100 Гр + НМС 0,01 %	18,71 ± 0,69	7,17	4,47	3,22	0,92	2,93

* P ≥ 0,001

Пряма послідовність комбінованої обробки викликала високий відсоток аберацій хромосом. Мутагенний ефект у цих варіантах обробки виявився вищим, ніж при роздільному застосуванні ЕІ, НМС і гамма-променів, а у варіанті НМС + гамма-промені він навіть вище (76,2%), ніж адитивний. У спектрах аберацій хромосом в обох варіантах обробки переважають хромосомні мости. На двох інших лініях мутагенний ефект у варіантах з прямою послідовністю комбінованої обробки перевищує такий при окремому застосуванні мутагенів. Однак, на лінії 502 - ефект дещо нижче адитивного. Така висока частота аберацій хромосом різко знизилася схожість насіння і виживання рослин M₁ в цих варіантах обробки.

У варіантах зі зворотною послідовністю комбінованої обробки мутагенний ефект не тільки значно нижче адитивного, але і нижче ефекту від роздільної обробки мутагенами. У спектрах аберацій хромосом кількість перебудов хромосомного типу значно зменшується в порівнянні з роздільною обробкою мутагенами, так само істотно знижується частота одиничних фрагментів, у порівнянні з гамма-опроміненням в дозі 100 Гр. Таким чином, ЕІ і НМС при дії на попередньо опромінене сухе насіння виступають як захисні речовини. Виявлений в досліді адитивний ефект при прямій послідовності комбінованої обробки, очевидно, можна пояснити тим, що первинна обробка, як би сенсibiliзує об'єкт до вторинного впливу. При цьому відбувається перехід клітин від стадії G₀ клітинного циклу до пізньої G₁ - і ранньої S - фаз, які характеризуються високою радіочутливістю (Гродзинский, 1989; Гудков, 1985; Клименко, Ларченко, 2006). При опроміненні насіння в цих стадіях клітинного циклу відбувається ряд біохімічних змін, що призводять до зменшення швидкості поділу клітин і збільшення кількості аберацій хромосом. Вважають, що ушкоджуються ферменти репарації, які відіграють вирішальну роль в мутаційному процесі, тобто не відновлюються предмутаційні первинні ушкодження у молекулах ДНК (Гродзинский, 1989). Імовірно, відзначений адитивний мутагенний ефект можна пояснити взаємодією первинних молекулярних пошкоджень на S-стадії клітинного циклу, індукованих кожним з мутагенів окремо. Більш низький ефект при зворотній послідовності комбінованої обробки пов'язують також з біохімічними змінами під дією мутагенних факторів. Н.П. Дубінін та В.А. Тарасов (Дубінін, Тарасов, 1969) вважають, що крім безпосередньої взаємодії з хромосомами, мутагени в змозі

змінити ефективність внутрішньоклітинних процесів, що визначають імовірність реалізації потенційних ушкоджень хромосом.

ВИСНОВКИ

1. Виявлено відмінності в дії прямої / хімічний мутаген + гамма-опромінення / і зворотної / гамма-опромінення + хімічний мутаген / послідовностей комбінованої обробки.
2. Пряма послідовність комбінованої обробки різко знижує мітотичну активність клітин меристеми і збільшує частоту аберацій хромосом, в результаті зворотної послідовності відбувається збільшення мітотичної активності і зниження частоти перебудов хромосом.
3. Зворотна послідовність комбінованої обробки мутагенами, що використовувалися, більш перспективна, тому що дозволяє індукувати мінливість без значного збільшення летальності.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Гродзинский Д.М.** Радиобиология растений / Д.М. Гродзинский. – К.: Наук. думка, 1989 – 380 с.
- Гирко В.С.,** Волощук С.И. Генетическая активность химических и физических мутагенных факторов в культуре незрелых зародышей пшеницы // Цитология и генетика. – 1999. - Т.33, №4. – С. 33-42.
- Гудков И.Н.** Клеточные механизмы пострадиационного восстановления растений / И.Н. Гудков. – К.: Наук. думка, 1985. – 224 с.
- Дубинин Н.П.** Некоторые проблемы радиационного мутагенеза // Успехи современной генетики: статьи / Н.П. Дубинин, В.А. Тарасов. – М.: 1969 – С. 7-12.
- Клименко Я.В.,** Ларченко К.А. Частота хромосомных аберацій озимої пшениці, індукованих мутагенами при дії на насіння та проростки // Физиология и биохимия культ. растений. – 2006. - Т.38, №3. – С.222-227.
- Ларченко Е.А.,** Моргун В.В. Сравнительный анализ наследственной изменчивости растений при мутагенной обработке генеративных клеток и семян кукурузы // Цитология и генетика. – 2000. - Т.34, №4. – С. 16-20.
- Моргун В.В.** Спонтанна та індукована мутаційна мінливість і її використання в селекції рослин // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. – К.: Логос, 2001. – Т. 2. – С. 144 – 174.
- Мутаційна** селекція кукурудзи // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть; К.А. Ларченко, В.В. Моргун та ін. – Київ: Логос, 2001. – Т. 2. – С. 187 – 196.
- Паушева З.П.** Практикум по цитологии растений / З.П. Паушева. – М.: Наука, 1980. – 304 с.
- Рокицкий П.И.** Биостатистика / П.И. Рокицкий. –М.: Наука, 1974. – 232 с.
- Тефері Йосеф** Вондиму. Створення вихідного матеріалу для селекції ярого ячменю з роздільним і комплексним застосуванням гамма – променів і хімічних мутагенів: Автореф. дис. ...канд. с.-г. наук. / Ін-т рослинництва ім. Юр'єва УААН. – Харків, 2000. – 19 с.
- Химический** мутагенез и задачи сельскохозяйственного производства / [отв. редактор И.А. Рапопорт]. – М.: Наука, 1993. – 238 с.
- Чеченева Т.Н.,** Ларченко Е.А. Влияние химических мутагенов и гамма-облучения на культуру in vitro инбредных линий кукурузы // Цитология и генетика. – 1997. – Т.31 №3. – С. 65-71.
- Rukmanky G.** A comparative study of gamma-ray, fast neutron and ethyleneimine mutagenic effects on Phaseolus vulgaris (kidney bean) chromosomes. / G. Rukmanky // Dokl. S-kh. Akad. In Georgia Dimitrova. –1975. – Т.8, № 4. – С.43-46.

REFERENCES

- Grodzinsky D.M.** Plants radiobiology. – K.: Naukova Dumka, 1989. – 380 p. [in Russian]
- Girko V.S.,** Voloshchuk S.I. Genetic activity of chemical and physical mutagenic factors in crop of immature corn corcule // Cytology and Genetics. – 1999. - Vol. 33. - 4. – P. 33-42. [in Russian]
- Gudkov I.N.** Cell mechanisms of radiation rehabilitation of plants. – K.: Naukova Dumka, 1985. – 224 p. [in Russian]
- Dubin N.P.** Some aspects of radiation mutagenesis // Advance of modern genetics: articles. – M., 1969. – P. 7-12. [in Russian]
- Klimenko Ya.V.,** Larchenko K.A. Frequency of chromosome aberration of fall wheat, induced by mutagens at seeds and underground seedlings // Physiology and biochemistry of crop plants. – 2006. - Vol. 38. - 3. – P. 222-227. [in Ukrainian]
- Larchenko Ye.A.,** Morgun V.V. Comparative analysis of plants' genetic variation at mutagenic processing of corn generative cells and seeds // Cytology and Genetics. – 2000. – Vol. 34. - 4. – P. 16-20. [in Russian]

- Morgun V.V.** Autonomic and induced mutagenic variation and its application in plants selection // Genetics and selection in Ukraine at the turn of the millenniums. – K.: Logos, 2001. – Vol. 2. – P. 144–174. [in Ukrainian]
- Mutagenic** corn selection // Genetics and selection in Ukraine at the turn of the millenniums; **Larchenko Ye.A., Morgun V.V.** et al. – K.: Logos, 2001. – Vol. 2. – P. 187–196. [in Ukrainian]
- Pausheva Z.P.** Laboratory course in plant cytology. – M.: Nauka, 1980. – 304 p. [in Russian]
- Rokitskyi P.I.** Biostatistics. – M.: Nauka, 1974. – 232 p. [in Russian]
- Teferi J.V.** Development of output materials for the selection of spring barley with separate and complex use of gamma rays and chemical mutagens: Synopsis of thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Agricultural Science. - Yur'ev Horticulture Institute. – Kharkiv, 2000. – 19 p. [in Ukrainian]
- Chemical** mutagenesis and challenges for agricultural industry / [I.A. Rapoport, Ed.]. – M.: Nauka, 1993. – 238 p. [in Russian]
- Checheneva T.N., Larchenko Ye.A.** Influence of chemical mutagens and gamma-rays on culture of inbred corn lines in vitro // Cytology and Genetics. – 1997. – Vol. 31. - 3. – P. 65-71. [in Russian]
- Rukmansky G.** A comparative study of gamma-ray, fast neutron and ethyleneimine mutagenic effects on *Phaseolus vulgaris* (kidney bean) chromosomes / Dokl. S-kh. Akad. In Georgiia Dimitrova. –1975. – Vol. 8. - 4. – C.43-46.