

УДК 633.152/575.224.46.044

© 2020

НОВИЙ МОРФОТИП ОВОЧЕВОЇ КУКУРУДЗИ, ОТРИМАНИЙ МЕТОДОМ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МУТАГЕНЕЗУ

О.Ю. Куліш¹, М.Ф. Парій²²кандидат біологічних наук

ТОВ «Всеукраїнський науковий інститут селекції»

вул. Васильківська, 30, м. Київ, 03022, Україна

e-mail: ¹olyakulish@ukr.net, ²pariimyroslov@gmail.com

Надійшла 29.07.2020

Мета. Отримати генетичні мутації з використанням сильних хімічних мутагенів, які мають широкий спектр дії — натрію азид (NaN_3) і 5-бромурацил (5BrUra), для залучення у селекційний процес; поліпшити наявні й створити нові високоврожайні гібриди овочевої кукурудзи з поліпшеними якістьми. **Методи.** Аналіз літературних джерел, використання сильних хімічних мутагенів, інструментальні та статистичні. **Результати.** Встановлено, що 5BrUra можна використовувати як хімічний мутаген на рослинах кукурудзи, а точкові мутації, які формуються за впливу цього мутагену, є цінним генетичним матеріалом у селекційній практиці. Отримано новий перспективний генотип овочевої кукурудзи. За результатами порівняльної оцінки фенотипів отриманої мутантної форми і досліджених колекційних зразків встановлено їхні істотні відмінності. Гілкування отриманої форми відбувається від основи стрижня до верхівки, у той час як для відомих мутантних форм — частково від основи до середини стрижня або стрижень не гілкується, а формуються кілька бічних гілочок. **Висновки.** Встановлено можливість використання 5-бромурацилу як хімічного мутагену на рослинах. Точкові мутації, які проявляються за впливу цього мутагену, є цінним генетичним матеріалом у селекційній практиці. За результатами порівняльної оцінки отриманої мутантної форми з колекційними зразками встановлено, що за фенотипом досліджені форми мають істотні відмінності. Отримано нову форму овочевої кукурудзи за ознакою гілкування качана, що є перспективним для подальших досліджень і впровадження у виробництво як нове покоління бебі-корн кукурудзи.

Ключові слова: хімічний мутаген, натрію азид (NaN_3), 5-бромурацил (5BrUra), мутації ra_1 , ra_2 , ra_3 .

DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk202010-06>

В Україні овочева кукурудза користується попитом і дає високі врожаї, її качани мають прекрасні смакові і поживні властивості. Овочева кукурудза вперше з'явилася на світовому ринку наприкінці XVIII — на початку XIX ст. у США. З цього часу впродовж 100 років у світі нараховувалось усього

12 сортів цієї культури. Овочева кукурудза є цінним харчовим продуктом, що має унікальний склад легкозасвоюваних вуглеводів (фруктози, цукрози, глюкози, мальтози, рафінози), містить 12–15% крохмалю, близько 3% протеїну, зокрема незамінні амінокислоти лізин і триптофан, 1% жирів,

вітаміни С, В₁, В₂, РР, а також мінеральні солі, що містять Са, К, Mg, Fe, Na, Р, Cl, S. До Реєстру сортів, дозволених для поширення в Україні, 2015 р. внесено 67 сортів овочевої кукурудзи [1].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Поліморфізм овочевої кукурудзи недостатньо генетично різноманітний, тому для його розширення у селекційних програмах застосовують штучний мутагенез. Мутації — джерело генетичного різноманіття кукурудзи, які, у свою чергу, є вихідним матеріалом у селекційній практиці цієї культури [2]. Для отримання штучних мутацій кукурудзи в 30-ті роки минулого століття Л. Стадлер уперше застосував радіаційне опромінення, а наприкінці 40-х Й. Рапопорт і Ш. Ауербах відкрили існування потужних хімічних мутагенів [2, 3]. Серед сучасних підходів із застосуванням штучного мутагенезу можна виділити такі: Tilling, CRISPR/cas та інсерційний мутагенез. Tilling — спосіб молекулярної біології, що дає змогу ідентифікувати спрямовані мутації у певному гені. Tilling вперше було використано у 2000 р. на модельному об'єкті *Arabidopsis thaliana*. Відтоді його використовують як метод зворотної генетики і для інших організмів (кукурудзи, пшениці, рису, сої, томатів і салатів). Цей спосіб поєднує стандартний ефективний метод мутагенезу з хімічним мутагеном етилметансульфонатом (EMS) із чутливим ДНК скринінг-методом, який ідентифікує у гена-мішені одну базову мутацію (так звані точкові мутації) [4–6].

Відомо багато різноманітних хімічних мутагенів, яких використовують для мутагенезу сільськогосподарських культур. Хімічний мутаген натрію азид (NaN₃) спричиняє виникнення стійких мутацій у послідовності ДНК геному рослин [7].

Для отримання мутантів у бактерій часто використовують 5-бромурацил (модифікований тимін, 5BrUra) — класичний мутаген, вплив якого відомий понад півстоліття [3, 5, 6, 8–10], проте в опрацьованій нами науковій літературі немає відомостей про використання 5-бромурацилу на рослинах. Численними дослідженнями експериментально доведено, що 5BrUra інтенсивно спричиняє точкові мутації, зокрема, транзиції включення і реплікації у бактеріофагів,

бактерій і деяких вищих організмів [3, 5, 6, 8–11]. У більшості випадків це транзиції гуанін-цитозин (Gua·Cyt) → аденін-тимін (Ade·Thy), проте зафіксовано й непоодинокі відхилення від цієї закономірності. Зазвичай 5BrUra включається у ДНК випадково у невеликих кількостях, однак іноді він може практично повністю заміщати Thy. Проте фізико-хімічні механізми мутагенної дії 5BrUra залишаються недостатньо вивченими [11–16]. Зокрема, немає універсальної гіпотези, яка б дала змогу з єдиних фізико-хімічних позицій кількісно пояснити як походження помилок включення, так і помилок реплікації.

Мета досліджень — отримати генетичні мутації з використанням сильних хімічних мутагенів, які мають широкий спектр впливу — натрію азид (NaN₃) і 5-бромурацил (5BrUra), для залучення у селекційний процес; поліпшити наявні і створити нові високоврожайні гібриди овочевої кукурудзи з поліпшеними якостями.

Матеріали і методи досліджень. У наших дослідженнях використано лінію кукурудзи ПЯ-3 (батьківський компонент гібридів Всеукраїнського наукового інституту селекції), зразки 727 G, 708 A, 308 E, 725 A, 725 B (з колекції Maize Genetics Cooperation Stock Center) [1].

Як мутагенний чинник використовували 5-бромурацил (5BrUra) у концентраціях 0,0191; 0,0955; 0,191; 0,573 і 1,91 г/л відповідно; і натрію азид (NaN₃) — 1,95; 2,6 і 3,25 г/л [17].

Насіння кукурудзи пророщували за температури 24°C на зволоженому фільтрувальному папері до з'явлення перших корінців довжиною до 0,4 см. Потім відбирали 8 зразків по 100 насінин і замочували у розчинах хімічних мутагенів 5BrUra і NaN₃ у вказаних вище концентраціях. Час експозиції — 2 год. Як контроль використовували лінію ПЯ-3, насіння якої не обробляли мутагенами [17].

Рослини, отримані у поколіннях M₀, M₁, M₂, самозапилювали. У поколінні M₁ висівали 272 см². У мутантної форми визначали кількість гілок на волоті і качанах, довжину гілок на качанах, продуктивність качана й окремих гілок. Статистичну обробку експериментальних даних проведено з використанням Microsoft Excel (P>0,05).

Результати досліджень та їх обговорення. У поколінні M_0 спостерігали зниження схожості насіння. Зі збільшенням концентрації мутагенного чинника схожість насіння знижувалася. За наступних спостережень за розвитком рослин у всіх варіантах було виявлено фенотипові зміни — мутації рослин кукурудзи (зігнуте стебло, карликовість, відсутність генеративних органів) (табл. 1).

Частота виникнення фенотипових змін з використанням 5BrUra у середньому становила 59,5%, NaN_3 — 13,4%.

Отримані дані свідчать, що фенотиповий ефект мутагену 5BrUra вищий порівняно з ефектом, що спостерігається за впливу

NaN_3 . Найвищий рівень пригнічення встановлено за застосування 5BrUra у концентрації 1,91 г/л. Для рослин було характерне відставання у розвитку з подальшим відмиранням. Серед оброблених NaN_3 рослин такого ефекту не спостерігали. Отже, можна припустити, що використані концентрації цього хімічного чинника не є летальними, тому порівнювати фенотиповий ефект недоцільно.

У M_1 поколінні визначали частоту мутацій. При проведенні фенотипових спостережень мутації було виявлено у 42- із 272-х сімей. Із 84-х сімей, оброблених 5BrUra, лише 5 мали мутації, а з 198-ми сімей,

1. Фенотиповий ефект у M_0 поколінні

Мутаген	Концентрація, г/л	Кількість обробленого насіння, шт.	Кількість			Фенотиповий ефект, %
			схожих рослин	рослин без фенотипових змін	рослин зі змінами у фенотипі	
NaN_3	1,95	100	76	69	7	9,2
	2,6	100	73	63	10	13,7
	3,25	100	69	57	12	17,4
5BrUra	0,0191	100	58	22	36	62,1
	0,0955	100	52	35	17	32,7
	0,191	100	34	13	21	61,8
	0,573	100	25	5	20	80,0
	1,91	100	23	9	14	60,9

2. Частота мутацій у M_1 поколінні

Мутаген	Концентрація, г/л	Кількість сімей			Частота мутацій, %
		усього	без мутацій	мутантних	
NaN_3	1,95	81	69	12	14,8
	2,6	62	49	13	20,9
	3,25	55	44	11	20,0
Усього		198	162	36	18,2
5BrUra	0,0191	22	18	4	18,2
	0,0955	35	34	1	2,9
	0,191	13	13	0	0
	0,573	5	5	0	0
	1,91	9	9	0	0
Усього		84	79	5	6

для обробки яких було використано NaN_3 , 36 мали мутантні форми (табл. 2).

Частота мутацій у M_1 поколінні для сімей, оброблених BrUra, становила 6%, за використання NaN_3 — 18,2% (див. табл. 2).

У представників 272-х досліджених сімей виявлено такі мутації: забарвлення рослин — альбіноси, антоціанове забарвлення стебла і листків; форма стебла — зігнуте стебло в 2–3 міжвузлях, вкорочені міжвузля; форма листових пластин — лінійні листки шириною до 2 см, зрослі і закручені листки; структура суцвіть — розгалужена волоть, гілкування качана; відсутність чоловічих генеративних органів — озернена волоть.

Серед отриманих мутантних форм кукурудзи для практичного застосування і впровадження у виробництво, вважаємо, найперспективнішою є мутація гілкування качана і волоті (рис. 1). За фенотипом отримана нами мутантна форма кукурудзи подібна до фенотипового прояву рецесивного гена *ramosa* (*ra*). Відомо 3 гена гілкування качана: ra_1 , ra_2 , ra_3 . Гомозигота за геном ra_1 має гілкуватий качан, який зазвичай погано зав'язує насіння. Волоть вирізняється великою кількістю гілочок, які відходять від центральної осі майже під прямим кутом.

У гомозигот за геном ra_2 гілкується лише верхівка качана, а його основа залишається цілою. Часто качани закінчуються гілочками з пиляками. Волоть відрізняється від нормальної волоті і від гомозигот ra_1 . Качани гомозигот ra_3 формують невеликі додаткові добре озернені качанчики, які ростуть від основи головного стрижня [2].

У поколінні M_0 нами не виявлено прояву рецесивного гена з фенотипом зміни форми качана. Появу форм кукурудзи з розгалуженою волоттю і гіллястим качаном спостерігали у M_1 поколінні, розщеплення в якому відповідало 3:1. При проведенні самозапилення таких мутантних форм потомство повністю відповідало батьківським формам, це дало змогу стверджувати, що такі фенотипові зміни закріплюються генетично. Так, у поколінні M_2 всі рослини мали гіллясті качани і волоть. Отже, таку мутантну форму можна включати до селекційного процесу і використовувати як потенційного донора зазначеної фенотипової ознаки.

Отриману мутантну лінію було охарактеризовано за комплексом господарсько цінних ознак — проведено порівняльну оцінку із зразками колекції Maize Genetics Cooperation Stock Center (MGSC), а також із кременистою кукурудзою. Характеристика

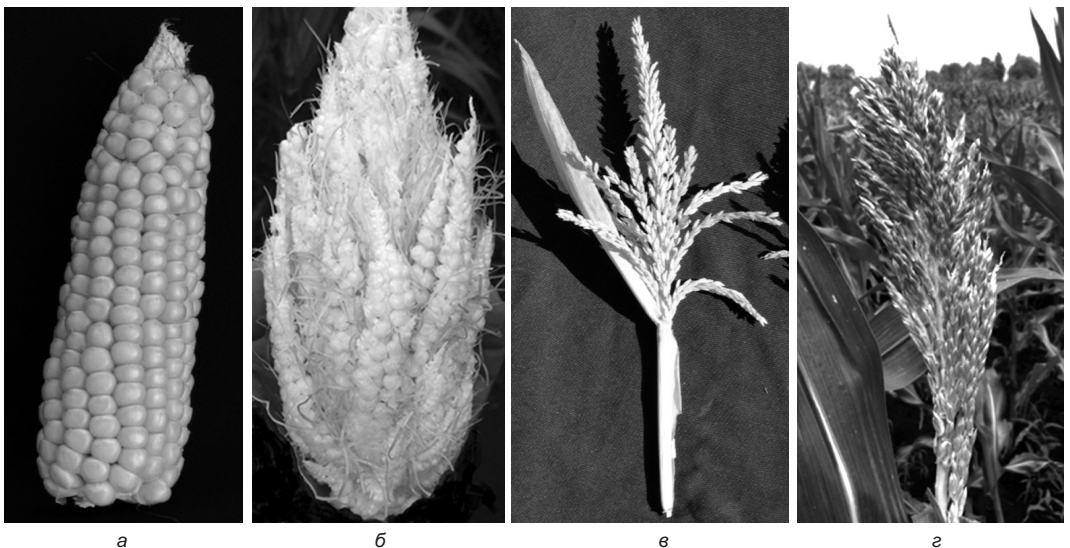


Рис. 1. Фенотиповий прояв мутантної лінії: а — качан кременистої кукурудзи; б — гіллястий качан мутантної форми; в — волоть кременистої кукурудзи; г — гілляста волоть

мутантної лінії: довжина стрижня варіювала в межах від 11 до 12,5 см. Качани мали у середньому 50–53 гілок, з яких 30–36 були продуктивними і формували повноцінне насіння. Кожна окрема гілка може мати гілочки 2-го порядку. Гілки на стрижні відрізнялися за розміром, тому їх розділено на 4 типи (табл. 3, див. рис. 2, а).

Мутантна лінія за кількістю бебі-корн качанів на рослині перевищувала кременисту кукурудзу. На рослині кукурудзи кременистого типу формується 3–4 качана, тоді як мутантна лінія може формувати 2 гіллястих качана із загальною кількістю близько 100–110 гілок (див. рис. 2, а).

Лінії кукурудзи з колекції MGCSC 727 G, 708 A, 308 E, 725 A, 725 B оцінювали за тими самими морфологічними показниками.

Лінії 727 G і 708 A є носіями мутації ra_1 і мають розгалужені качан і волоть. Довжина стрижня у середньому досягала 14 см. Качан розділявся на дві частини, нижня з яких гілкувалась і була завдовжки 8–9 см, а верхня — близько 6 см і формувала 12-рядний качан з 11-ма зернами у кожному ряду. Насіння — кременисте, довжиною до 1 см (діаметром близько 0,7 см). Нижня частина качана формувала до 73-х гілок, з яких у середньому 34 — продуктивні (табл. 3, рис. 2, б).

Лінія 308 E є носієм мутації ra_2 . Форма качана істотно відрізнялася від ra_1 . Лінія-носій мутації ra_2 формувала велику кількість гілок, які утворювалися по всій величині стрижня у хаотичному порядку. На верхівках качанів формувався чоловічий орган — волоть. Довжина качана — 26 см,

3. Типи гілок та їхня продуктивність

Тип гілки	Кількість гілок, шт.	Довжина гілок, см	Кількість рядків зерен	Кількість зерен у рядку, шт.	Продуктивність однієї гілки, насінин на 1 гілку
<i>Мутантна форма ra</i>					
Дуже великі	2	5,5 і >	4, 5	17	65
Великі	4	5,0–5,5	4	12	48
Середні	12	4,0–5,0	4	10	36
Малі	16	2,0–4,0	4	6	24
Дуже малі	17	<2,0	2, 4	1–4	4
<i>Лінія-носій мутації за геном ra_1</i>					
Великі	11	5,0–5,5	4	10	40
Середні	7	3,5–4,0	2–4	7	35
Малі	16	2,0–3,0	2	6	12
Дуже малі	39	<2,0	1–2	0	0
<i>Лінія-носій мутації за геном ra_2</i>					
Великі	5	5,0–5,5	4	13	52
Середні	5	3,5–4,0	2	6	12
Малі	6	2,0–3,0	1–2	3	4
Дуже малі	11	<2,0	1–2	1	1
<i>Лінія-носій мутації за геном ra_3</i>					
Великі	2	5,0–5,5	4–6	12	60
Середні	3	3,5–4,0	2–4	9	18
Малі	2	2,0–3,0	1–2	5	5
Дуже малі	6	<2,0	1–2	0	0

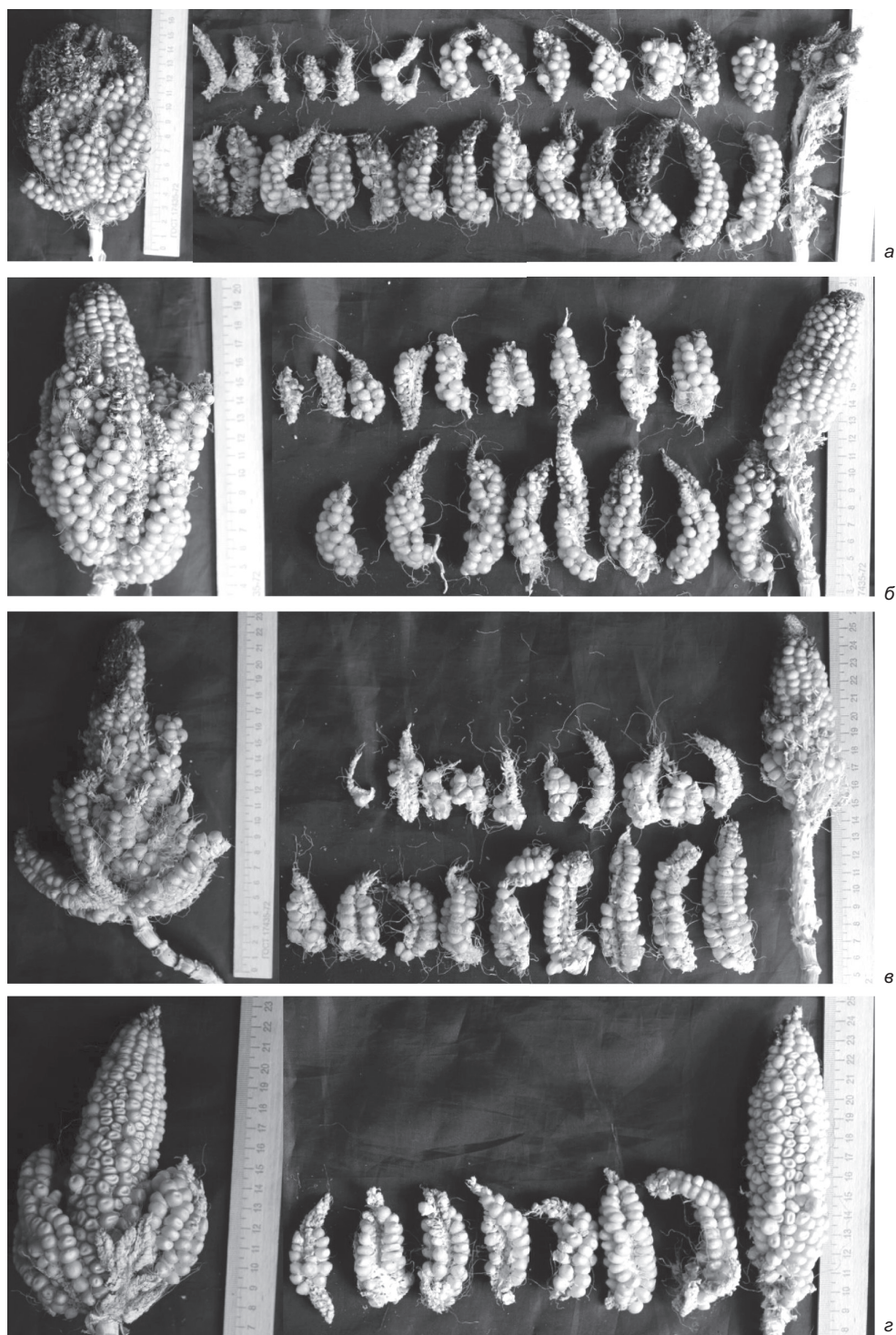


Рис. 2. Качани кукурудзи з мутаціями: а – ra ; б – ra_1 ; в – ra_2 ; г – ra_3

4. Кількість гілок на волоті

Тип гілки	ПЯ-3 контроль	ra — ПЯ-3, оброблений 5BrUra	Лінія-носії мутації за геном		
			ra ₁	ra ₂	ra ₃
1-го порядку	11	40	47	52	49
2-го порядку	3	15	8	16	14

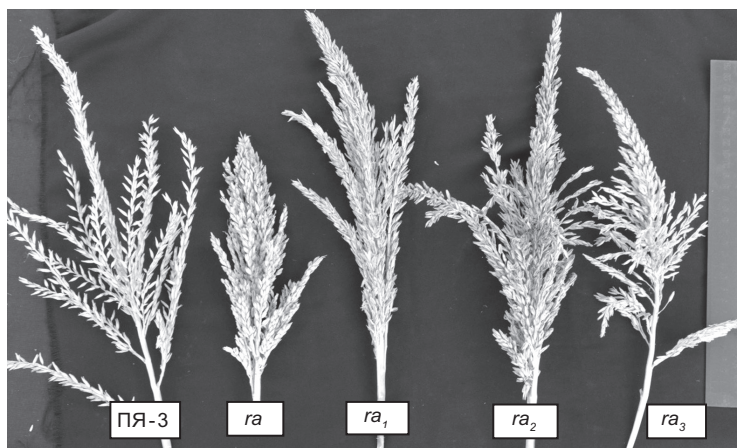


Рис. 3. Форма волотей досліджених ліній кукурудзи

на ньому — 40 і більше гілок величиною 2–6,5 см (табл. 3, рис. 2, в).

Лінія 725 А є носієм мутації ra₃, за формою качана і типом гілкування характеризується утворенням невеликої кількості гілок (8–12), які формуються від основи стрижня і є добре озерненими. Качан мав 12–14 рядів зерен. Довжина качана досягала 23 см, насіння — зубовидно-кременисте (див. табл. 3, рис. 2, г).

Чоловічий орган — волоть, у всіх досліджених форм характеризувався своїми особливостями. Кількість гілок 1- і 2-го порядків на волоті істотно відрізнялась у всіх досліджених форм (табл. 4, рис. 3).

Для створення і впровадження у виробництво нових гібридів овочевої кукурудзи були потрібні донори генетичних ознак. Для пошуку і впровадження у селекційний процес донорів ми створили колекцію

овочевої кукурудзи і застосовували хімічний мутагенез. Для розв'язання проблеми нами завдяки хімічному мутагенезу виявлено низку мутантних форм, серед яких найперспективнішою для промислового використання була мутантна форма з гіллястим качаном.

При порівнянні ліній носіїв мутацій ra₁, ra₂, ra₃ з колекції MGCSC з мутантною формою встановлено, що всі досліджені зразки відрізнялися за формою качана. Мутантна форма найбільше подібна до лінії-носія мутації ra₁. У цих двох ліній відрізняється тип гілкування качана. На відміну від мутантної форми, у якої качан гілкується за усією довжиною стрижня, лінія-носії мутації ra₁ характеризується частковим гілкуванням качана — качан гілкується до середини стрижня.

Висновки

Нами отримано новий генотип овочевої кукурудзи, який є перспективним для подальшої селекційної роботи. 5-бромурацил

можна використовувати як хімічний мутаген на рослинах, а точкові мутації, які виявляються за впливу цього мутагену, є

цінним генетичним матеріалом у селекційній практиці.

За результатами порівняльної оцінки отриманої мутантної форми з колекційними зразками встановлено, що за фенотипом досліджені форми мають

істотні відмінності. Отримано новий підвид кукурудзи за ознакою гілкування качана, що є перспективним для подальших досліджень і впровадження у виробництво як нове покоління бебі-корн кукурудзи.

Kulish O.¹, Parii M.²

Limited Liability Company «All-Ukrainian Scientific Institute of Plant Selection (AUSIPS)»; 30 Vasylykivska Str., Kyiv, 03022, Ukraine; e-mail: 'ol-yakulish@ukr.net, 'pariimyroslov@gmail.com

New morphotype of vegetable corn obtained by the method of experimental mutagenesis

Goal. To obtain genetic mutations using strong chemical mutagens, which have a broad spectrum of action (sodium azide (NaN_3) and 5-bromuracil (5BrUra)), with the aim to involve in the selection process; to improve existing and create new high-yielding hybrids of vegetable corn with improved qualities. **Methods.** Analysis of literature sources, use of strong chemical mutagens, instrumental and statistical. **Results.** It was established that 5BrUra can be used as a chemical mutagen on corn plants, and point mutations, which are formed under the influence of that mutagen, are a valuable genetic material in selection practice. A new promising genotype of vegetable corn was obtained. According to the results of comparative evaluation of the phenotypes of the obtained mutant form and

the studied collection samples, their significant differences were established. The branching of the obtained form of plants occurs from the base of the rod to the apex, while for known mutant forms — partially from the base to the middle of the rod, or the rod does not branch at all, and several lateral branches are formed. **Conclusions.** The possibility of using 5-bromuracil as a chemical mutagen on plants has been established. Point mutations, which are manifested under the influence of this mutagen, are valuable genetic material in selection practice. According to the results of comparative evaluation of the obtained mutant forms with collectible samples, it was found that the phenotype of the studied forms have significant differences. A new form of vegetable corn was obtained on the basis of cob branching, which is promising for further research and introduction into production as a new generation of baby corn.

Key words: chemical mutagen, sodium azide (NaN_3), 5-bromuracil (5BrUra), mutations ra_1 , ra_2 , ra_3 .

DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk202010-06>

Бібліографія

1. Maize Genetics and Genomics Database. URL: <http://archive.maizegdb.org>
2. Мику В.Е. Генетические исследования кукурузы. Кишинев, 1981. 232 с.
3. Oladosu Yu., Rafii M.Y., Norhani A. et al. Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2016. V. 30, Is. 1. P. 1–16. doi: 10.1080/13102818.2015.1087333
4. Henikoff S., Till B.J., Comai L. TILLING. Traditional Mutagenesis Meets Functional Genomics. *Plant Physiology*. 2004. V. 135. Is. 2. P. 630–636. doi: 10.1104/pp.104.041061
5. Mba C. Induced mutations unleash the potentials of plant genetic resources for food and agriculture. *Agronomy*. 2013. V. 3. P. 200–231. doi: 10.3390/agronomy3010200
6. Lu X., Liu J., Ren W. et al. Gene-indexed mutations in maize. *Mol. Plant*. 2018. V. 11. P. 496–504. doi: 10.1016/j.molp.2017.11.013
7. Olsen O., Wang X., von Wettstein D. Sodium azide mutagenesis: preferential generation of A.T-→G.C transitions in the barley Ant18 gene. *PNAS*. 1993. V. 90, Is. 17. P. 8043–8047. doi: 10.1073/pnas.90.17.8043
8. Ауэрбах Ш. Проблемы мутагенеза. Москва: Мир, 1978. 463 с.
9. Малюта С.С. Мутагенез. Екологічна енциклопедія: у 3-х т.; за ред. А.В. Толстоухова. Т. 2. Київ: ТОВ «Центр екологічної освіти та інформації», 2007. 321 с.
10. Тарасов В.А. Молекулярные механизмы репарации и мутагенеза. Москва: Наука, 1982. 228 с.
11. Hu X., Li H., Ding J., Han S. Mutagenic mechanism of the A-T to G-C transition induced by 5-bromouracil: anabinitio study. *Biochemisrty*. 2004. V. 43, Is. 21. P. 6361–6369.
12. Броварець О.О., Говорун Д.М. Новий фізико-хімічний механізм мутагенної дії 5-бромурацилу. *Ukrainica Bioorganica Acta*. 2009. № 2. С. 19–23.

13. Danilov V.I., var Mourik T., Kurita N. et al. On the mechanism of the mutagenic action of 5-bromouracil: a DFT study of uracil and 5-bromouracil in a water cluster. *The J. of Physical Chemistry A*. 2009. V. 113, Is. 11. P. 2233–2235. doi: 10.1021/jp811007j
14. Hanus M., Kabelac M., Nachtigallova D., Hobza P. Mutagenic properties of 5-halogenuracils: correlated quantum chemical ability study. *Biochemistry*. 2005. V. 44, Is. 5. P. 1701–1707. doi: 10.1021/bi048112g
15. Kurita N., Danilov V.I., Anisimov V.M. et al. Mechanisms of mutagenic action of 5BrU: quantum mechanical study. *J. Mol. Struct. Dyn*. 2007. V. 24. 665 p. (Bookofabstracts, Albany 2007: The Conversation 15, 19–23 June 2007).
16. Orozco M., Hernandez B., Luque F.J. Tautomerism of 1 methyl derivatives of uracil, thymine, 5-bromouracil. Is tautomerism the basis for the mutagenicity of 5-bromouridine? *The J. of Physical Chemistry B*. 1998. V. 102, Is. 26. P. 5228–5233. doi: 10.1021/jp981005+
17. Куліш О.Ю., Погреблюк М.В., Ковальчук З.В. та ін. Застосування методу експериментального мутагенезу для овочевої кукурудзи. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2016. Т. 18. С. 102–105. http://nbuv.gov.ua/UJRN/feeo_2016_18_23