

МУТАНТНА ДІЯ ДИМЕТИЛСУЛЬФАТУ НА МЕЙОЗ M_1 СОНЯШНИКУ

Кириченко В. В., Васько В. О.

Харківський національний аграрний університет імені В. В. Докучаєва, Україна

Вивчали стан хромосом у мейозі M_1 лінії соняшника, обробленого хімічним мутагеном диметилсульфат. Порушення в мейозі в материнських клітинах пилку в основному спостерігалися у вигляді відставання хромосом при формуванні метафази або при розходженні їх в анафазі. Хромосоми, які відстали, розміщувалися уздовж веретена, викиду хромосом в цитоплазму клітини не спостерігалося. Причому більша частина хромосом, які відстали, в анафазі I підтягувалися до полюса веретена і нормально включалися в ядро. Незважаючи на наявність аномалій, в мейозі переважали зовні нормально розвинені тетради.

Ключові слова: мутаген, диметилсульфат, соняшник, хромосома, мейоз, тетрада

Вступ. Аналіз змін у ядрі клітини і особливо у найважливіших його структурних компонентах – хромосомах є одним з надійних тестів оцінки мутагенної чутливості рослин. Цей тест можна віднести до числа найточніших показників пошкоджувальної дії мутагенів, які дають можливість отримати кількісне вираження відповідної реакції на вплив хімічних мутагенів та опромінення на клітинному рівні.

Аналіз літературних даних, постановка проблеми. Незважаючи на те, що хромосоми кожного каріотипу мають постійне число, форму і внутрішню структуру, вони здатні змінюватися спонтанно або під впливом різних чинників: іонізуючого випромінювання та хімічних речовин. Одним з найбільш важливих проривів в історії генетики стало відкриття, штучного індукування мутацій в рослинах.

Вивчення результатів першого мутантного покоління є невід'ємною частиною процесу вивчення мутантних поколінь рослин в мутаційній селекції. За даними М. А. Питиримової (1987), в деяких випадках спостерігається залежність між пошкоджуючою дією мутагену в першому поколінні та частотою мутацій в M_2 поколінні. Вплив мутагенів призводить до зниження зав'язуваності насіння (стерильності) рослин в M_1 [7].

Для ефективного використання цінних ознак мутантів у селекції необхідними є дані про їх генетичну природу [1]. Мутанти з одним і тим же фенотипом можуть з'являтися за різних мутаційних умов: внаслідок великих хромосомних перебудов, в результаті точкових мутацій, причиною їх виникнення може бути анеуплоїдія [4, 5].

Широке генетичне різноманіття є основою для створення нових сортів та гібридів з доброю якістю і високою врожайністю. Протягом останніх 70 років історії мутаційних досліджень було розроблено широкий спектр методів та підходів для того, щоб збільшити ймовірність прояву бажаних мутацій.

Фізичні і хімічні мутагенні чинники використовуються, щоб викликати корисні мутації з високою частотою у соняшнику [8].

Важливим досягненням в області експериментального мутагенезу є створення сорту соняшнику Первенець К. І. Солдатовим, олія якого наближається до оливкової і містить 70-80 % олеїнової кислоти. В якості мутагену при виділенні цього сорту застосовували диметилсульфат, яким обробляли насіння.

Мета і задачі досліджень. Метою досліджень є оцінка впливу мутагену на мейоз у клітинах M_1 соняшнику.

Відповідно до наміченої мети були поставлені такі завдання: оцінити вплив супермутагену на частоту порушень у мейозі в залежності від концентрації обробки, порівняти частоту клітин з порушеннями у M_1 з контролем.

Наукова новизна досліджень полягає у відкритті сильної дії диметилсульфату на стан хромосом у мейозі M_1 гомозиготних ліній соняшнику, а також в достовірних відмінностях дії різних концентрацій мутагену в залежності від генотипу цінної олійної культури.

Матеріали і методи. В якості вихідного матеріалу використовували дві гомозиготні лінії-закріплювачі стерильності та дві лінії-відновники фертильності пилку селекції IP ім. В. Я. Юр'єва НААН, попередньо оброблених хімічним мутагеном диметилсульфат у концентрації 0,01 % та 0,05 %. Контролем було сухе необроблене насіння.

З кожної лінії до цвітіння ізолювали індивідуальними ізоляторами рослини M_1 з морфологічними мутаціями. Фіксацію дослідного матеріалу проводили на посівах M_1 соняшнику в 2014 р.

Для вивчення мейозу у M_1 соняшнику відокремлювали сегменти кошиків ($d=2-3$ см.) з пиляками, фіксували в оцтовому алкоголі (1:3) протягом 24 годин. Потім тричі промивали етиловим спиртом і залишали на зберігання в 70 % розчині етилового спирту при температурі $+4$ °C [6]. Фарбування хромосом материнських клітин пилку проводили 2 % розчином ацетоорсеїну. Мейоз вивчали на давлених у краплі 40 % оцтової кислоти тимчасових препаратах. Для встановлення висновків про вплив диметилсульфату на мейоз у клітинах M_1 рослин соняшнику використовували метафазно-анафазний метод, підраховували загальну кількість клітин у цих фазах та кількість нормальних тетрад, визначали відсоток клітин з порушеннями від загальної кількості клітин та для кожної фази окремо.

Статистичну значимість відмінностей між вибірковими частками оцінювали за допомогою F-критерію Фішера та значення NP_{05} [2, 3].

Обговорення результатів. Приблизно за 16-18 днів до цвітіння, коли кошики досягають, 2,5-3,0 см в діаметрі, в материнських клітинах пилку периферійних бутонів починається процес мейозу. Материнські клітини пилку соняшнику мають нормальний диплоїдний набір ($2n = 34$) хромосом.

Цикл мейозу складається з ряду послідовних фаз, у яких хромосоми зазнають певних змін.

Порушення в мейозі в материнських клітинах пилку виражалися в основному у відставанні хромосом при формуванні метафази або при розходженні їх в анафазі. Хромосоми, які відставали, розміщувалися уздовж веретена, викиду хромосом в цитоплазму клітини не спостерігалось. Причому більша частина хромосом, які відстали, в анафазі I підтягувалися до полюса веретена і нормально включалися в ядро. Про це свідчить незначний відсоток порушень, виявлених у телофазі I (рис. 1).

У другому поділі мейозу спостерігалися в основному ті ж відхилення в поведінці хромосом, що і в першому. У метафазі II спостерігалися вибивання із метафазної пластинки та несиметричне розходження хромосом до полюсів. Клітини з порушенням стану хромосом спостерігали на стадії анафази II. На цій стадії мейозу переважали клітини з відстаючими хромосомами, незначна кількість клітин було з мостами.

Після закінчення першого поділу мейозу в МКП між двома дочірніми ядрами клітинної перегородки не утворюється.

Після другого поділу виникають всі чотири клітини одночасно, шляхом закладення борозенок від периферії до центру і перешнуровуванням протопласта материнської клітини на окремі мікроспори.

Другий поділ мейозу у соняшнику закінчується утворенням тетрад по симультанному (одночасному) типу з тетраедричним розташуванням мікроспор у тетраді.

Незважаючи на наявність аномалій в мейозі, у мутантних ліній соняшнику переважали зовні нормально розвинені тетради. Також спостерігалися монади, діади, тріади, пен-тади але їх відсоток був незначний.

Таким чином, дослідження поведінки хромосом в мейозі у M_1 соняшнику виявило, що, незважаючи на перший погляд повну кон'югацію хромосом у профазі I, наступні стадії мейозу проходили з численними порушеннями.

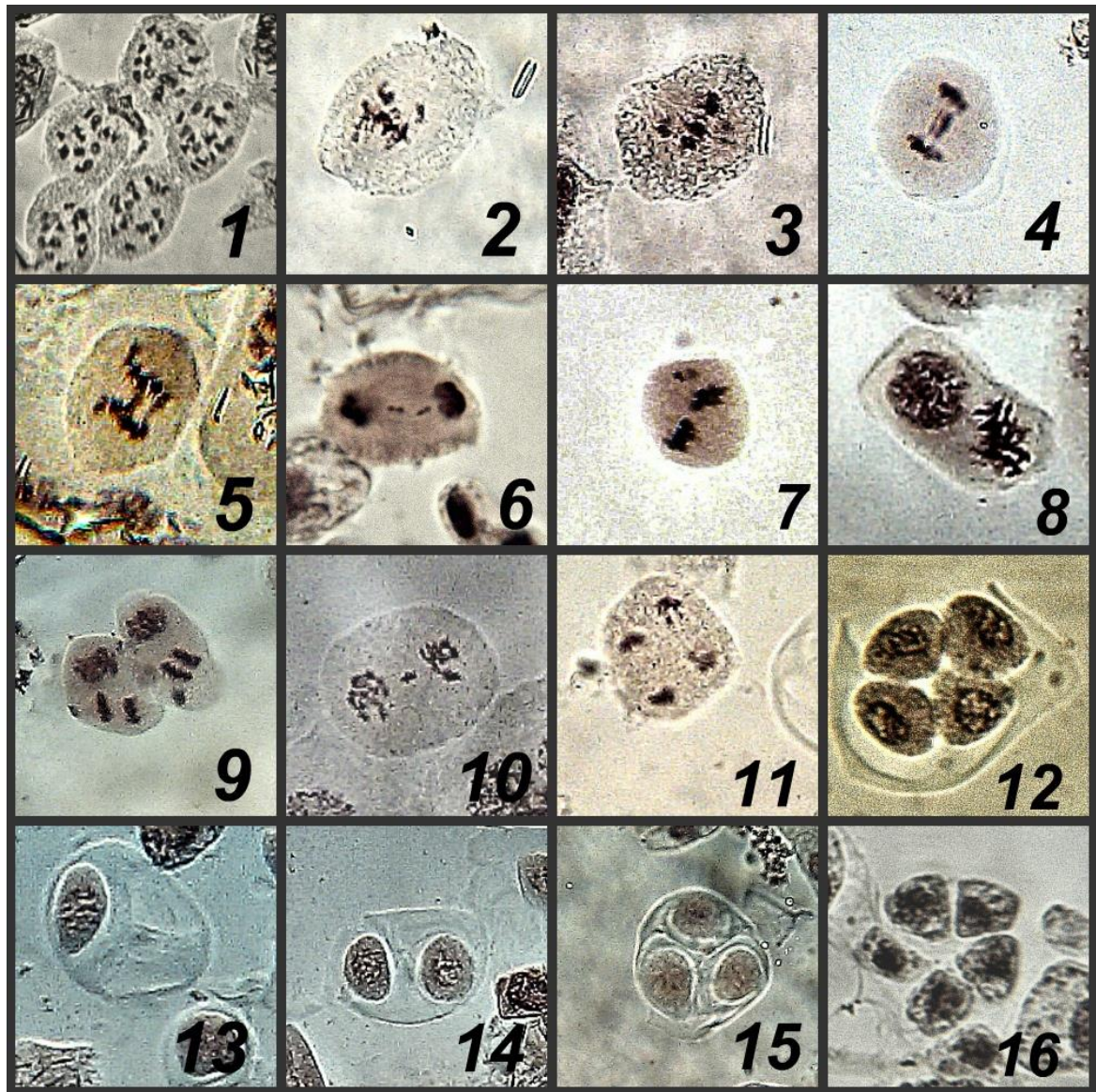


Рис. 1. Мікрофотографії мейозу у M_1 соняшнику.

1 - 17 бівалентів у діакінезі, 2,3 - хромосоми поза метафазною пластинкою, 4,5 - мости з хромосомами, що відстають, в анафазі I, 6 – хромосоми, що відстають, у анафазі I, 7 - хромосома поза метафазною пластинкою у метафазі II, 8,9 – несиметричне розходження хромосом у другому поділі мейозу, 10 - міст у метафазі II, 11 - міст та хромосоми, які відстають, у анафазі II, 12 – нормальна тетрада, 13 – монада, 14 - діада, 15 – триада, 16 – пентада.

У результаті аналізу даних у M_1 соняшнику, оброблених диметилсульфатом 0,01 % та 0,05 % концентрації, можна зробити висновок про суттєвий вплив мутагену на мейоз у порівнянні з контролем (табл. 1), оскільки відсоток клітин з порушеннями у порівнянні з контрольним варіантом був значним. Так у лінії X06-135В частота порушень у контролі становить 0,07 %, у варіанті ДМС 0,01 % відсоток клітин з порушеннями складає 6,78 %, у концентрації ДМС 0,05 % – 21,01 %, що дає нам підстави говорити про суттєвий вплив мутагену на нормальний хід мейозу. Такі ж результати про вплив диметилсульфату були і в інших трьох гомозиготних форм.

Найбільший відсоток клітин з порушенням у всіх досліджуваних варіантів спостерігався у метафазі II (у ♂ X06-135В (ДМС 0,05 %) виявлено 58,14 % клітин з порушенням), це були в основному клітини з несиметричним формуванням метафазної пластинки. У анафазі I також спостерігалася значна кількість клітин з порушеннями – мости та відставання хромосом (♀ X1002Б (ДМС 0,01%) - 26,98 % клітин з порушенням анафазі I).

Таблиця 1

Частота материнських клітин пилку з порушеннями на різних стадіях мейозу у М₁ соняшнику

Вид мутагена	Концентрація, %	Вивчено клітин на різних стадіях мейозу			Метафаза I		Анафаза I		Метафаза II		Анафаза II		Тетради	
		усього	частка з порушеннями - p	% з порушеннями p±sp	усього	% з порушеннями p±sp	усього	% з порушеннями p±sp	усього	% з порушеннями p±sp	усього	% з порушеннями p±sp	усього	% з порушеннями p±sp
♀ X1008 Б														
<i>Контроль</i>		1413	0	0,07±0,07	302	0	219	0	163	0	226	0	503	0,39±0,28
ДМС	0,01	1289	0,09	9,23±0,81*	226	3,54±1,23	186	12,9±2,46	176	14,77±7,15	110	11,82±3,08	591	8,12±1,12
	0,05	1333	0,2	19,88±1,09*	433	11,78±1,55	225	17,78±2,55	98	51,02±5,05	32	18,75±6,90	545	21,65±1,76
<i>НІР₀₅</i>		<i>0,01</i>												
♀ X1002Б														
<i>Контроль</i>		1219	0	0,16±0,11	213	0	112	0	119	0	66	0	719	0,14±0,14
ДМС	0,01	1130	0,14	13,63±1,02*	221	12,67±2,24	126	26,98±3,95	187	30,48±3,37	70	7,14±3,08	526	5,70±1,01
	0,05	1072	0,15	15,49±1,12*	282	14,89±2,12	116	16,38±3,44	96	56,25±5,06	46	34,78±7,02	532	6,58±1,07
<i>НІР₀₅</i>		<i>0,01</i>												
♂ X06-135В														
<i>Контроль</i>		1380	0	0,14±0,10	163	0	192	0	149	0,67±0,67	98	0	779	0,13±0,11
ДМС	0,01	1402	0,07	6,78±0,67*	591	4,23±0,83	212	12,26±2,25	96	26,04±4,48	26	0	477	3,98±0,90
	0,05	1452	0,21	21,01±1,07*	150	4,0±1,6	361	11,63±2,85	172	58,14±3,76	15	13,33±8,77	754	20,56±1,47
<i>НІР₀₅</i>		<i>0,01</i>												
♂ X IP 1Г														
<i>Контроль</i>		1298	0	0	315	0	232	0	57	0	25	0	669	0
ДМС	0,01	1374	0,07	6,70±0,67*	399	7,02±1,28	278	7,91±1,62	98	29,59±4,61	19	21,05±9,35	580	1,55±0,51
	0,05	1314	0,12	11,87±0,89*	412	10,68±1,52	279	12,90±2,01	135	29,63±3,93	50	24,0±6,04	438	5,48±1,09
<i>НІР₀₅</i>		<i>0,01</i>												

Примітка. * - достовірно відрізняється від контролю при P0,05

Дослідження показали, що в різних пиляках однієї квітці, а також в різних пилкових гніздах одного пиляка поділ в материнських клітинах пилку протікає несинхронно.

Навіть у межах одного гнізда пиляка синхронність поділу виражена нечітко. Особливо асинхронно проходить процес мейозу материнських клітин пилку в цілому по кошику. Наприклад, у той час як у пиляку крайових квіток кошика спостерігаються тетради мікроспор, у центральних квітках – материнські клітини пилку в профазі I, то в клітинах проміжних між цими крайніми групами квіток відбувається перший і другий поділ мейозу. Таким чином, в пиляках квіток одного кошика можна одночасно спостерігати всі фази мейозу в материнських клітинах пилку, від початку до повного завершення.

Висновки. Таким чином, у результаті дослідження поведінки хромосом у мейозі M_1 соняшнику, оброблених ДМС 0,01 % та 0,05 %, можна зробити висновок про суттєвий вплив мутагену у порівнянні з контролем, оскільки відсоток клітин з порушеннями у порівнянні з контрольним варіантом був значним, що підтверджено статистичною обробкою даних.

Незважаючи на повну, на перший погляд, кон'югацію хромосом у профазі I, наступні стадії мейозу проходили з чисельними порушеннями. Порушення в мейозі в материнських клітинах пилку, в основному, виражалися у відставанні хромосом при формуванні метафази або при розходженні їх в анафазі.

Дослідження показали, що в різних пиляках однієї квітці, а також в різних пилкових гніздах одного пиляка поділ в материнських клітинах пилку протікає несинхронно. Навіть у межах одного гнізда синхронність поділу виражена нечітко.

У пиляках квіток одного кошика можна одночасно спостерігати всі фази мейозу в материнських клітинах пилку, від початку до повного завершення.

Список використаних джерел

1. Atlagic, J. Cytogenetic study of hexaploid species *Helianthus tuberosus* and its F_1 and BC_1F_1 hybrids with cultivated sunflower, *H. annuus* [Text] / J. Atlagic, S. Terzic // – Genetika. – 2006. – Vol. 38, No. 3. – P. 203-213.
2. Доспехов, Б. А. Методика полевого опыта [Текст] / Б. А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
3. Лакин, Г. Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1980. – 294 с.
4. Козаченко, М. Р. Експериментальний мутагенез в селекції ячменю [Текст] / М. Р. Козаченко. – Х.: НААН України, Ін-т рослинництва ім. В. Я. Юр'єва, 2010. - 296 с.
5. Škorić, D. Sunflower genetics and breeding: international monography [Text] / D. Škorić et al. – Novi Sad: Serbian Academy of Sciences and Arts, Branch, 2012. – XV. – 520 str.
6. Паушева, З. П. Практикум по цитологии растений / З. П. Паушева. – М.: Агропромиздат, 1988. – 217 с.
7. Юшкина, Л. Л. Цитогенетическое изучение межвидового гибрида *Helianthus praecox* × *H. annuus*, его родительских форм и двух беккроссов [Текст] / Л. Л. Юшкина, Е. В. Нестерова, В. В. Кириченко и др. // Цитология и генетика. – 2009. – Т. 43, №1. – С. 42-47.
8. Prabakaran P. Effect of Gamma rays and EMS on meiotic Chromosomal behavior in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) [Text] / P. Prabakaran, S. Jayakumar // Indian Journal of Advances in Plant Research (IJAPR). – 2014. – Vol. 1(7). – P. 1-4.

References

1. Atlagic J, Terzic S. Cytogenetic study of hexaploid species *Helianthus tuberosus* and its F_1 and BC_1F_1 hybrids with cultivated sunflower, *H. annuus*. Genetika. 2006; 38(3): 203-213.
2. Dospikhov, BA. Methods of field experience (with the fundamentals of statistical processing of study results). Moscow: Agropromizdat; 1985. P. 35–231
3. Lakin, GF. Biometrics. Moscow: Vysshaya shkola; 1980. 294 p.

4. Kozachenko, MR. Experimental mutagenesis in barley breeding. Kharkiv, 2010. 296 p.
5. Škorić D et al. Sunflower genetics and breeding. Novi Sad: Serbian Academy of Sciences and Arts, Branch; 2012. XV. 520 p.
6. Pausheva, ZP. Workshop on plant cytology. Moscow: Agropromizdat; 1988. 217 p.
7. Yushkina LL, Nesterova EV, Kyrychenko VV, Dolgova TA, Popov VN. Cytogenetic study of an interspecific hybrid *Helianthus praecox* × *H. annuus*, its parental forms and two backcrosses // Cytol. Genetics. 2009; 43(1): 42-47.
8. Prabakaran P, Jayakumar S. Effect of Gamma rays and EMS on meiotic Chromosomal behavior in Sunflower (*Helianthus annuus* L.). IJAPR. 2014; 1(7):1-4.

МУТАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИМЕТИЛСУЛЬФАТА НА МЕЙОЗ M_1 ПОДСОЛНЕЧНИКА

Кириченко В. В., Васько В. А.

Харьковский национальный аграрный университет им. В. В. Докучаева, Украина

Анализ изменений в ядре клетки и особенно в важнейших его структурных компонентах - хромосомах является одним из надежных тестов оценки мутагенной чувствительности растений.

Цель и задачи исследований. Целью исследований является оценка влияния мутагена на мейоз в клетках M_1 подсолнечника.

Согласно намеченной цели были поставлены следующие задачи: Оценить влияние супермутагена на частоту нарушений в мейозе в зависимости от концентрации обработки, сравнить частоту клеток с нарушениями в M_1 с контролем.

Материалы и методы. В качестве исходного материала использовали две гомозиготные линии-закрепители стерильности и две линии-восстановители фертильности пыльцы селекции ИР им. В. Я. Юрьева НААН, предварительно обработанных химическим мутагеном диметилсульфатом концентрации 0,01 % и 0,05 %. Контролем служили сухие необработанные семена.

Для изучения мейоза у M_1 подсолнечника отделяли сегменты корзинок ($d = 2-3$ см) с пыльниками, фиксировали в уксусном спирте (1 : 3) в течение 24 часов. Затем трижды промывали этиловым спиртом и оставляли на хранение в 70 % растворе этилового спирта при температуре + 4 °С. Окраску хромосом материнских клеток пыльцы проводили 2 % раствором ацетоорсеина. Мейоз изучали на давленных в капле 40 % уксусной кислоты временных препаратах.

Обсуждение результатов. Нарушения в мейозе в материнских клетках пыльцы в основном, выражались в отставании хромосом при формировании метафазы или при расхождении их в анафазе. Во втором делении мейоза наблюдались в основном те же отклонения в поведении хромосом, что и в первом. Несмотря на наличие аномалий в мейозе, у мутантных линий подсолнечника преобладали внешне нормально развитые тетрады. Также наблюдались монады диады, триады, пентады но их процент был незначителен. Проанализировав данные в M_1 подсолнечника обработанных диметилсульфатом 0,01 % и 0,05 % концентрации можно сделать вывод о существенном влиянии мутагена на мейоз в сравнении с контролем, так как процент клеток с нарушениями в сравнении с контрольным вариантом был значительным. Так в линии X06-135В частота нарушений в контроле составляет 0,07 %, у варианта ДМС 0,01 % процент клеток с нарушениями составляет 6,78 %, в концентрации ДМС 0,05 % - 21,01 %, что дает нам основания говорить о существенном влиянии мутагена на нормальный ход мейоза. Такие же результаты влияния диметилсульфата были и в других трех гомозиготных форм.

Выводы. В результате исследования поведения хромосом в мейозе M_1 подсолнечника обработанных ДМС 0,01 % и 0,05 % можно сделать вывод о существенном влиянии мутагена в

сравнении с контролем, так как процент клеток с нарушениями по сравнению с контрольным вариантом был значительным, что доказано статистической обработкой данных. В пыльниках цветков одной корзинки можно одновременно наблюдать все фазы мейоза в МКП, от начала до полного завершения.

Ключевые слова: мутаген, диметилсульфат, подсолнечник, хромосома, мейоз, тетрада

MUTAGENIC ACTIVITY OF DIMETHYL SULFATE ON MEIOSIS IN M₁ SUNFLOWER

Курченко В. В., Васко В. О.

Kharkiv national agrarian university nd. a V. V. Dokuchaiev, Ukraine

Analysis of changes in the cell nucleus, and especially in its most important structural components – chromosomes, is a reliable test to assess mutagenic susceptibility of plants.

The aim and tasks of the study. The study purpose was to evaluate the effect of mutagen on meiosis in M₁ sunflower cells.

According to the intended purpose, we set the following objectives: To evaluate the effect on supermutagen on the frequency of meiosis disorders, depending on concentration; to compare the incidence of impaired cells in M₁ with the control.

Materials and methods. Two homozygous lines – sterility fixers and 2 lines – pollen fertility restorers bred at the Plant Production Institute nd. a VYa Yuriev were pretreated with chemical mutagen dimethyl sulfate at the concentrations of 0.01% and 0.05% and used as starting material. The controls was dry untreated seeds.

To study meiosis in M₁ sunflower, we separated calathidium segments (d = 2-3 cm) with anthers, fixed them in acetic alcohol (1: 3) for 24 hours. Then we washed them in ethanol three times and stored in 70% ethanol at + 4 ° C. Chromosomes of pollen mother cells were stained in 2% *aceto-orcein*. Meiosis was studied in temporary preparations squashed in a drop of 40% acetic acid.

Results and discussion. Meiosis disorders in pollen mother cells were mainly expressed in chromosome lag during metaphase or in chromosome disjunction during anaphase. In the 2nd meiotic division, the chromosome abnormalities observed were essentially the same as those in the 1st division. Despite the presence of abnormalities in meiosis, externally normally developed tetrads prevailed in mutant sunflower lines. In addition, we observed monads, dyads, triads, pentads, but their percentage was negligible. Having analyzed the data on M₁ sunflower treated with dimethyl sulfate at the concentrations of 0.01% and 0.05%, we can conclude that mutagen significantly affects meiosis in comparison with the control, since the percentage of impaired cells was high as compared to the control. For example, in line X06-135B the incidence of impairments 0.07%, 6.78%, and 21.01% in the control, with 0.01% DMS, and with 0.05% DMS, respectively, which gives us reason to state that mutagen significantly influences the meiotic processes. Similar results were obtained for the effect of dimethylsulfate on the other three homozygous forms.

Conclusions. From studying chromosome behavior in meiosis of M₁ sunflower treated with 0.01% and 0.05% DMS, we can conclude that the effect of mutagen is significant in comparison with the control, as the percentage of impaired cells was high as compared to the control, as evidenced by statistical processing of the data. All phases of meiosis in PMC, from start to completion, can be simultaneously observed in anthers of flowers of a single calathidium.

Key words: mutagen, dimethyl sulfate, sunflower, chromosome, meiosis, tetrad