

УДК 633.11:631.95:575.21

DOI <https://doi.org/10.32782/2226-0099.2024.137.21>

## ЕКОГЕНЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ У ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ НА КЛІТИННОМУ РІВНІ

**Окселенко О.М.** – к.с.-г.н.,

докторант кафедри селекції і насінництва,

Дніпровський державний аграрно-економічний університет

**Назаренко М.М.** – д.с.-г.н.,

професор кафедри селекції і насінництва,

Дніпровський державний аграрно-економічний університет

Використання високогенотоксичних сполук може негативно впливати на життєздатність рослин, деякі цитогенетичні зміни можуть бути летальними або шкідливими для рослин, що знижує їх виживання та продуктивність. Насіння сортів пшениці м'якої озимої Фаррел, NE 12443, Ронін, Сейлор обробляли водним розчином ДАБ (1,4-бисдіазаоацетилбутан) у концентраціях 0,1%, 0,2%, 0,3%, Експозиція дії 24 години. Методом світлової мікроскопії проводили аналіз хромосомних аберацій на препаратах мітозів верхівок первинних коренів сортів озимої пшениці. Загальна частота хромосомних змін незначно була опосередкована впливом фактору вихідної форми, а от поступове зростання концентрації чиннику вплинуло достовірно. Сорт Фаррел виявився в цілому менш толерантним ніж інші. За спектром аналізували параметри кількості фрагментів, мостів, мікроядер та відстаючих хромосом, урахували клітини з множинними абераціями. Для загальної частоти фрагментів, мостів, мікроядер та відстаючих хромосом суттєвої різниці за фактором генотип не виявлено, за фактором концентрація різниці достовірна для всіх. Вплив сорту на індукцію комплексних аберацій значимий. Попарне порівняння показало, що різниця між першою та другою концентраціями незначима для частини сортів. У випадку з генотипом дискримінантний аналіз показав значущість для генотипу лише одного параметра моделі – комплексні аберації, для зміни концентрації загальної частоти, кількості фрагментів та комплексних змін. Диференціююча здатність достатня для модельних параметрів. За дискримінантним аналізом, немає сенсу у використанні водночас варіантів ДАБ 0,1 та 0,2%. При зростанні концентрації відбувається поступове постійне підвищення зі значимими переходами між окремими варіантами за всіма модельними показниками загальної частоти та спектру хромосомних перебудов, крім концентрацій 0,1 та 0,2%, де різниця достовірна не завжди. Значимо вищу генетичну спорідненість до дії ДАБ показав сорт Фаррел через нижчу толерантність до несприятливих наслідків, особливо для модельних показників. Різниця між іншими сортами не була достовірною, хоча при окремих попарних порівняннях можуть бути деякі флуктуації. Застосовані концентрації слід віднести до діапазону умовно-помірних за цитогенетичною активністю.

**Ключові слова:** пшениця озима, 1,4-бисдіазаоацетилбутан, хромосомні перебудови, частота, спектр.

### **Okselenko O.M., Nazarenko M.M. Ecogenetic activity in winter wheat on the cells level**

The use of highly genotoxic compounds can negatively affect plant viability, some cytogenetic changes can be lethal or harmful to plants, reducing their survival and productivity. Seeds of bread winter wheat varieties Farrell, NE 12443, Ronin, Saylor were treated with an aqueous solution of DAB (1,4-bisdiazoacetylbutane) in concentrations of 0.1%, 0.2%, 0.3%, exposure for 24 hours. Analysis of chromosomal aberrations was performed using light microscopy on preparations of mitoses of primary root tips of winter wheat varieties. The overall frequency of chromosomal changes was slightly mediated by the influence of the initial shape factor, and the gradual increase in the concentration of the factor was significantly influenced by the variety. Variety Farrel turned out to be generally

*less tolerant than the others were. For the spectrum, the parameters of fragments, bridges, micronuclei and lagging chromosomes were analyzed, taking into account cells with multiple aberrations). For the total frequency of fragments, micronuclei and lagged differences by the genotype factor is not significant for all components. In the case of the genotype, the discriminant analysis showed significance for one parameter of the model – complex aberrations, for the change in the concentration of total fragments and complex changes of 0.1 and 0.2%. There is a gradual and constant increase in the concentration of the drug with significant transitions between individual variants according to all model indicators of the general frequency and spectrum of chromosomal rearrangements, except for the increase in the concentration of 0.1 and 0.2%, where the difference is not always reliable. Variety Farrel showed a significantly higher genetic affinity to DAB action due to lower tolerance to unpleasant consequences, especially for model parameters. The difference between the other varieties was not reliable, although there may be some fluctuations in individual pairwise comparisons. The applied concentrations should be attributed to the part of conditionally moderate for cytogenetic activity.*

**Key words:** winter wheat, 1,4-bisdiazoacetylbutane, chromosomal rearrangements, rate, spectrum.

**Постановка проблеми.** Хімічні супермутагени алкільної групи відносяться до високогенотоксичних, тобто таких, що викликають значну кількість генетичних змін у клітинах. Зазвичай, вони можуть індукувати мутації в різних генах рослин з високою ефективністю, але при цьому їх використання має свої недоліки [1, 3].

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** Ці речовини здатні значно підвищити частоту мутацій порівняно з фізичними чинниками, іноді частота збільшується до 1,5–2 рази [10]. Хімічні супермутагени можуть проявляти високу сайт-специфічність, тобто вони здатні індукувати мутації в конкретних генах або ділянках геному [6, 7].

Використання високогенотоксичних сполук може негативно впливати на життєздатність рослин. Деякі цитогенетичні зміни можуть бути летальними або шкідливими для рослин, що знижує їх виживання та продуктивність [4, 5].

Підвищена частота мутацій збільшує ризик виникнення небажаних генетичних змін, які можуть негативно вплинути на ріст і розвиток рослин. Це вимагає додаткового добору чинників [8, 9]. Підвищена частота мутацій має свій зворотний бік – збільшується ризик виникнення небажаних мутацій, які можуть негативно вплинути на ріст і розвиток рослин [2, 9].

**Постановка завдання.** Застосували хімічний супермутаген 1,4-бисдіазаоацетилбутан, тут та далі по тексту – ДАБ, котрий належить до типу хімічних речовин, які здатні призводити до суттєвого рівня виникнення мутацій при відносно низькій шкодочинності. Насіння сортів пшениці м'якої озимої Фаррел, NE 12443, Ронін, Сейлор обробляли водним розчином ДАБ у концентраціях 0,1%, 0,2%, 0,3%, контролем була вода. Для кожної обробки брали 1000 зерен пшениці озимої. Експозиція дії мутагену була 24 години.

Методом світлової мікроскопії проводили аналіз хромосомних аберацій на препаратах мітозів верхівок первинних коренів сортів озимої пшениці на пізній стадії метафази та ранній анафазі. Після обробки частини верхівок коренів культивували в чашках Петрі на фільтрувальному папері з дистильованою водою в термостаті за температури + 20–22°C. Після цього частину зразків довжиною 0,8–1,0 см зрізали та фіксували протягом 24 годин у розчині Кларка, який складається з 3 частин 96% етилового спирту та 1 частини очної кислоти. Для кожного варіанту готували близько 25–30 коренів. Цитологічні дослідження забезпечували тимчасовими препаратами, забарвленими ацетокарміном. Зразки оцінювали за допомогою світлового мікроскопа Micromed XS-3330 (множення

в 600 разів) з камерою 5М. У кожному варіанті міститься приблизно 1000 рослинних клітин на відповідних стадіях. Статистичний аналіз даних проводився програмою Statistica 10.0. Відмінності між відборами визначали за допомогою однофакторного аналізу (ANOVA) і вважали надійними при  $P < 0,05$ . Відмінності між зразками оцінювали за допомогою тесту Тьюкі HSD.

**Виклад основного матеріалу дослідження.** Проаналізовані у таблиці 1 загальна частота хромосомних змін незначно була опосередкована впливом фактору вихідної форми ( $F = 2,12$ ;  $F_{0,05} = 2,48$ ;  $P = 0,06$ ), а от поступове зростання концентрації чинника вплинуло достовірно ( $F = 212,19$ ;  $F_{0,05} = 3,07$ ;  $P < 0,05$ ). Окремі вихідні форми при попарному аналізі вагомо відрізнялися. Це стосується сорту Фаррел ( $F = 2,61$ ;  $F_{0,05} = 2,48$ ;  $P = 0,05$ ), який виявився в цілому менш толерантним ніж інші (суттєво вища частота аберацій, крім другої концентрації, де на рівні інших). Кількість перебудов варіювала від 3,50% (сорт Сейлор) до 4,28% (сорт Фаррел) при дії ДАБ 0,1%, за дії ДАБ 0,2% від 5,48% (сорт Сейлор) до 6,39% (сорт Фаррел), за дії ДАБ 0,3% від 8,12% (сорт Сейлор) до 9,17% (сорт Фаррел). Таким чином, в цитогенетична мінливість, спричинена даним фактором була більш високою, ніж для епімутагенів.

Таблиця 1

**Частота хромосомних аберацій при дії ДАБ ( $x \pm SD$ ,  $n = 25$ )**

Сорт	Варіант	Мітозів, шт.	Хромосомних аберацій	
			шт.	%
Фаррел	вода	1009	10	$0,99 \pm 0,09^a$
	ДАБ, 0,1%	1005	43	$4,28 \pm 0,17^b$
	ДАБ 0,2%	1001	64	$6,39 \pm 0,19^c$
	ДАБ 0,3%	1003	92	$9,17 \pm 0,29^d$
NE 12443	вода	1002	8	$0,80 \pm 0,10^a$
	ДАБ, 0,1%	1004	40	$3,98 \pm 0,15^b$
	ДАБ 0,2%	1002	63	$6,29 \pm 0,19^c$
	ДАБ 0,3%	1007	87	$8,64 \pm 0,25^d$
Ронін	вода	1009	8	$0,79 \pm 0,10^a$
	ДАБ, 0,1%	1004	39	$3,88 \pm 0,14^b$
	ДАБ 0,2%	1005	59	$5,87 \pm 0,18^c$
	ДАБ 0,3%	1001	82	$8,19 \pm 0,27^d$
Сейлор	вода	1006	8	$0,80 \pm 0,10^a$
	ДАБ, 0,1%	1000	35	$3,50 \pm 0,16^b$
	ДАБ 0,2%	1003	55	$5,48 \pm 0,18^c$
	ДАБ 0,3%	1010	82	$8,12 \pm 0,25^d$

Примітка: різниця статистично достовірна за факторним аналізом ANOVA за концентраціями при  $P_{0,05}$

За спектром цитогенетичної мінливості чинника (таблиця 2) аналізували наступні параметри фрагменти (одинарні та подвійні, які в цілому більш характерні для дії такого типу факторів), мости (одинарні – хроматидні – та подвійні – хромосомні), а також інші, більш рідкісних аберацій таких як мікроядра, відстаючі хромосоми. Окремо урахували клітини з множинними хромосомними абераціями (комплексними), які є досить потужним інтегративним показником впливу мутагену.

Таблиця 2

## Спектр хромосомних аберацій при дії ДАБ (x, n = 25)

Варіант	Фрагменти		Мости		фрагменти/ мости	інші		комплексні	
	шт	%	шт	%		шт	%	шт	%
Фаррел									
вода	4 <sup>a</sup>	40,00	4 <sup>a</sup>	40,00	1,00	1 <sup>a</sup>	10,00	0 <sup>a</sup>	0,00
ДАБ, 0,1%	22 <sup>b</sup>	39,22	16 <sup>b</sup>	28,57	1,38	5 <sup>a</sup>	8,93	5 <sup>b</sup>	8,93
ДАБ 0,2%	35 <sup>c</sup>	45,45	20 <sup>b</sup>	25,97	1,75	9 <sup>b</sup>	11,69	10 <sup>c</sup>	12,99
ДАБ 0,3%	47 <sup>d</sup>	41,23	27 <sup>c</sup>	23,68	1,74	18 <sup>c</sup>	15,79	18 <sup>d</sup>	15,79
NE 12443									
вода	4 <sup>a</sup>	44,44	5 <sup>a</sup>	55,56	0,80	0 <sup>a</sup>	0,00	0 <sup>a</sup>	0,00
ДАБ, 0,1%	22 <sup>b</sup>	44,00	13 <sup>b</sup>	26,00	1,69	5 <sup>b</sup>	10,00	5 <sup>b</sup>	10,00
ДАБ 0,2%	32 <sup>c</sup>	46,38	18 <sup>c</sup>	26,09	1,78	13 <sup>c</sup>	18,84	13 <sup>c</sup>	18,84
ДАБ 0,3%	39 <sup>d</sup>	40,63	28 <sup>d</sup>	29,17	1,39	20 <sup>d</sup>	20,83	19 <sup>d</sup>	19,79
Ронін									
вода	5 <sup>a</sup>	62,50	4 <sup>a</sup>	50,00	1,25	0 <sup>a</sup>	0,00	0 <sup>a</sup>	0,00
ДАБ, 0,1%	21 <sup>b</sup>	31,34	14 <sup>b</sup>	20,90	1,50	4 <sup>a</sup>	5,97	5 <sup>b</sup>	7,46
ДАБ 0,2%	31 <sup>c</sup>	40,79	20 <sup>c</sup>	26,32	1,55	8 <sup>ab</sup>	10,53	8 <sup>b</sup>	10,53
ДАБ 0,3%	41 <sup>d</sup>	37,61	28 <sup>d</sup>	25,69	1,46	13 <sup>c</sup>	11,93	18 <sup>c</sup>	16,51
Сейлор									
вода	4 <sup>a</sup>	50,00	4 <sup>a</sup>	50,00	1,00	1 <sup>a</sup>	12,50	0 <sup>a</sup>	0,00
ДАБ, 0,1%	18 <sup>b</sup>	36,73	13 <sup>b</sup>	26,53	1,38	4 <sup>a</sup>	8,16	4 <sup>b</sup>	8,16
ДАБ 0,2%	28 <sup>c</sup>	40,58	19 <sup>c</sup>	27,54	1,47	8 <sup>b</sup>	11,59	8 <sup>b</sup>	11,59
ДАБ 0,3%	38 <sup>d</sup>	36,19	28 <sup>d</sup>	26,67	1,36	16 <sup>c</sup>	15,24	17 <sup>c</sup>	16,19

Примітка: різниця статистично достовірна за факторним аналізом ANOVA за концентраціями при  $P_{0,05}$

Для загальної частоти фрагментів суттєвої різниці за фактором генотип не виявлено ( $F = 2,17$ ;  $F_{0,05} = 2,48$ ;  $P = 0,07$ ), за фактором концентрація різниця достовірна ( $F = 112,99$ ;  $F_{0,05} = 3,07$ ;  $P < 0,05$ ). Попарне порівняння показало, що при переході між окремими концентраціями різниця була достовірна завжди. Кількість варіювала від 18 (сорт Сейлор) до 22 (сорти Фаррел та NE 12443) при дії ДАБ, 0,1%, за дії ДАБ 0,2% від 28 (сорт Сейлор) до 35 (сорт Фаррел), за дії ДАБ 0,3% від 36 (сорт Сейлор) до 47 (сорт Фаррел).

Для випадку з мостами суттєвої різниці за фактором генотип знов не виявлено ( $F = 2,01$ ;  $F_{0,05} = 2,48$ ;  $P = 0,08$ ), за фактором концентрація різниця достовірна ( $F = 29,01$ ;  $F_{0,05} = 3,07$ ;  $P < 0,05$ ). Попарне порівняння показало, що різниця між першою та другою концентраціями незначима для сорту Фаррел. Загалом, кількість мостів варіювала від 13 (сорти NE 12443 та Сейлор) до 16 (сорт Фаррел) при дії ДАБ, 0,1%, за дії ДАБ 0,2% від 18 (сорт NE 12443) до 20 (сорти Фаррел та Ронін), за дії ДАБ 0,3% від 27 (сорт Фаррел) до 28 (сорти Ронін та Сейлор).

Щодо інших типів хромосомних перебудов (відстаючі хромосоми та мікроядра), то для них фактор сорту теж виявився незначним ( $F = 2,10$ ;  $F_{0,05} = 2,48$ ;  $P = 0,07$ ), але статистично достовірною була реакція на підвищення концентрації ( $F = 57,17$ ;  $F_{0,05} = 3,07$ ;  $P < 0,05$ ). При попарному порівнянні варіантів знаходимо, що відсутня різниця між контролем та ДАБ 0,1% у сортів Фаррел, Ронін та Сейлор, між ДАБ 0,1 та ДАБ 0,2% у сорту Ронін, між ДАБ 0,2 та ДАБ 0,3% завжди є відмінність у дії, різниця є при будь-якій концентрації у NE

12443. Кількість інших аберацій варіювала від 4 (сорти Ронін та Сейлор) до 5 (сорти NE 12443 та Фаррел) при дії ДАБ, 0,1%, за дії ДАБ 0,2% від 8 (сорти Ронін та Сейлор) до 13 (сорт NE 12443), за дії ДАБ 0,3% від 17 (сорт Сейлор) до 19 (NE 12443).

Вплив сорту на індукцію комплексних аберацій значимий ( $F = 2,66$ ;  $F_{0,05} = 2,48$ ;  $P = 0,05$ ), збільшення концентрації веде до значного зростання частоти комплексних змін ( $F = 134,98$ ;  $F_{0,05} = 3,07$ ;  $P < 0,05$ ). Кількість при дії ДАБ 0,1% була 4–5 в усіх сортах, за дії ДАБ 0,2% від 8 (сорти Ронін та Сейлор) до 13 (сорт Фаррел), за дії ДАБ 0,3% від 17 (сорт Сейлор) до 19 (сорт NE 12443). Для всіх варіантів є статистично достовірні відмінності, крім переходу між концентраціями ДАБ 0,1% та 0,2% у сортів Ронін та Сейлор.

Факторний аналіз показав (таблиця 3), що значущими збільшення концентрації ДАБ були для всіх вивчених параметрів, генотип ж не вплинув зовсім, крім наявності множинних змін. Для визначення характеру впливу цитогенетичної активності залежно від факторів генотипу об'єкта впливу та концентрації мутагену було проведено дискримінантний аналіз (таблиця 4, Рис. 1).

Таблиця 3

## Результати факторного аналізу

Параметр	Концентрація	Генотип
Загальна частота	0,978727*	0,223620
Фрагментів	0,946929*	0,318612
Мостів	0,444799	0,354230
Інші аберації	0,657913*	0,355225
Комплексні	0,789113*	0,544413*
Варіативність пояснена	3,186171	1,251517
Не пояснена	1,021125	1,230198

Примітка: \* – статистично достовірно при  $P < 0,05$

Як видно, у випадку з генотипом дискримінантний аналіз показав значущість для генотипу лише одного параметра моделі – комплексні аберації, для зміни концентрації загальної частоти, кількості фрагментів та комплексних змін.

Таблиця 4

## Результати класифікаційного аналізу

Параметр	Генотип			Концентрація		
	Лямбда Уїлкса	$F_{\text{критичне}} (4,14)$	P	Лямбда Уїлкса	$F_{\text{критичне}} (2,66)$	P
Загальна частота	0,009	2,11	0,10	0,034	7,19	0,01
Фрагментів	0,010	2,12	0,10	0,031	5,04	0,01
Мостів	0,007	1,87	0,12	0,018	2,08	0,08
Інші аберації	0,011	2,39	0,09	0,017	1,99	0,08
Комплексні	0,024	4,16	0,05	0,035	7,44	0,01

Таким чином, результати аналізу у факторному просторі прогнозовані для чинників такої природи (серед модельних ознак присутні як показники сили дії лише частота, кількість фрагментів та комплексні зміни для зміни концентрації, комплексні зміни для вихідної форми).

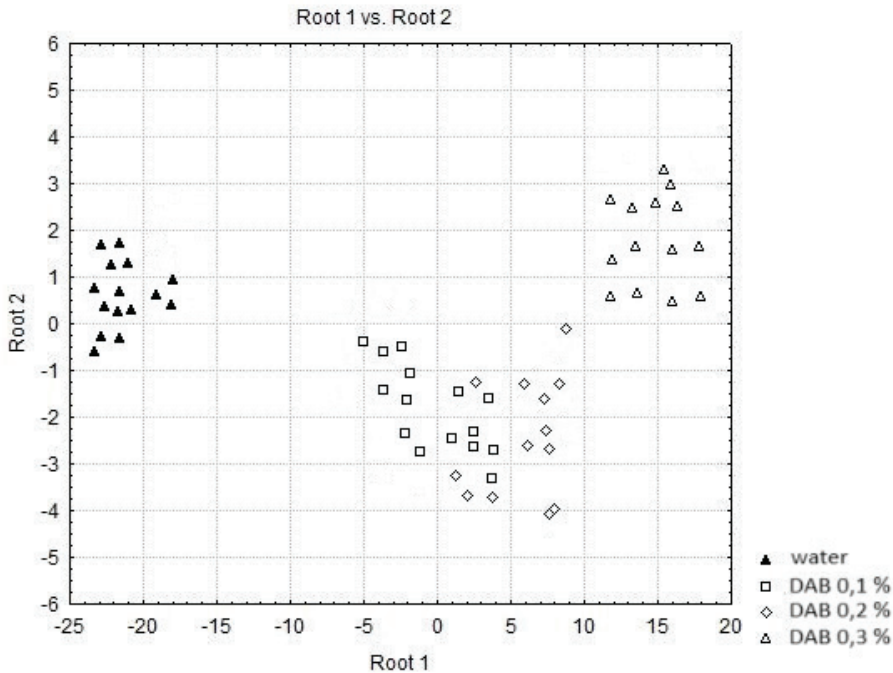


Рис. 1. Результати класифікації у факторному просторі

Диференціююча здатність достатня для модельних параметрів. Цього цілком достатньо для виявлення менш толерантних форм (частково Фаррел). За дискримінантним аналізом, немає сенсу у використанні водночас варіантів ДАБ 0,1 та 0,2%.

**Висновки і пропозиції.** Аналіз дії ДАБ як мутагену показав, що для даного фактору при вивченні на рівні клітини більш вагомим є такий параметр як зростання чисельності клітин з двома та більшою кількістю перебудов. Це надійний індикатор зміни концентрації. При зростанні концентрації відбувається поступове постійне підвищення зі значимими переходами між окремими варіантами за всіма модельними показниками загальної частоти та спектру хромосомних перебудов, крім концентрацій 0,1 та 0,2%, де різниця достовірна не завжди. Значимо вищу генетичну спорідненість до дії ДАБ показав сорт Фаррел через нижчу толерантність до несприятливих наслідків, особливо для модельних показників. Різниця між іншими сортами не була достовірною, хоча при окремих попарних порівняннях можуть бути деякі флуктуації. Застосовані концентрації слід віднести до діапазону умовно-помірних за цитогенетичною активністю.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Abaza G., Awaad A., Attia M., Abdellateif S., Gomaa A., Abaza S., Mansour E. Inducing potential mutants in bread wheat using different doses of certain physical and chemical mutagens. *Plant Breeding and Biotechnology*. 2020. 8(3). P. 252–264.
2. Bhat T. A., Wani A. A. Studies on Ethyl MethaneSulphonate induced Desynapsis in *Vicia faba* L. *European Journal of Academic Essays*. 2015. 2(1). P. 23–28
3. Datta R. M., Neogy A. K. Some Observations on the Induction of Colchiploidy in *Solanum Melongena* Linn. (Brinjal). *Nelumbo*. 2024. 11(1-2). P. 76–83.

4. Dwivedi H., Kumar G. Colchicine induced manifestation of abnormal male meiosis and 2n pollen in *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague (Apiaceae). *Caryologia*. 2021. 74(3). P. 99–106.
  5. Horshchar V., Nazarenko M. Cytogenetic activity of a mutagenic factor with high damaging capacity in winter wheat. *Scientific Horizons*. 2023. 26(9). 131–142.
  6. Hussain M., Gul M., Kamal R., Iqbal M., Zulfiqar S., Abbas A., Röder M., Muqaddasi Q., Rahman M. Prospects of developing novel genetic resources by chemical and physical mutagenesis to enlarge the genetic window in bread wheat varieties. *Agriculture*. 2021. 11. Article number 621.
  7. Khursheed S., Laskar R., Raina A., Amin R., Khan R. Comparative analysis of cytological abnormalities induced in *Vicia faba* L. geno-types using physical and chemical mutagenesis. *Chromosomal Science*. 2015. 18. P. 47–51.
  8. Nazarenko M. The influence of radio-mimetic chemical mutagen on the chromosomal complex of winter wheat cells. *Regulatory mechanisms in biosystems*. 2017. 8(2). P. 283–286.
  9. Oney-Birol S., Balkan A. Detection of cytogenetic and genotoxic effects of gamma radiation on M1 generation of three varieties of *Triticum aestivum* L. *Pakistan Journal of Botany*. 2019. 51(3), P. 887–894.
  10. Yang G., Luo W., Zhang J., Yan X., Du Y., Zhou L., Li W., Wang H., Chen Z., Guo T. Genome-wide comparisons of mutations induced by carbon-ion beam and gamma-rays irradiation in rice via resequencing multiple mutants. *Frontiers in Plant Science*. 2019. 10. Article number 1514.
-