

УДК 633.11:631.95:575.21

DOI <https://doi.org/10.32782/2226-0099.2024.138.17>

ЦИТОГЕНЕТИЧНА МІНЛИВІСТЬ ЗА ДІЇ ЕПІМУТАГЕНУ У ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ

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

Епімутагени є важливим інструментом у генетичному поліпшенні рослин завдяки їх здатності значно підвищувати частоту корисних спадкових змін. Вони не відносяться до генотоксичних сполук, тобто таких, що викликають значну кількість негативних генетичних змін у клітинах. Насіння сортів пшениці м'якої озимої Фаррел, NE 12443, Ронін, Сейлор обробляли водним розчином TX-305 у концентраціях 0,01 %, 0,05 %, 0,1 % та 0,5 %, контролем була вода. 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, поступове зростання концентрації чиннику вплинуло достовірно. Для загальної частоти фрагментів суттєвої різниці за фактором генотип не виявлено, за фактором концентрація різниці недостовірна. Для випадку з мостами суттєвої різниці за фактором генотип не виявлено, за фактором концентрація різниці достовірна. Для інших типів хромосомних перебудов (відстаючі хромосоми та мікроядра) фактор сорту теж виявився незначним, статистично недостовірною була реакція на підвищення концентрації. Вплив сорту на індукцію комплексних аберацій значимий, збільшення концентрації веде до значного зростання частоти комплексних змін. Результати аналізу у факторному просторі прогнозовані для чинників такої природи (серед модельних ознак присутні як показники сили дії лише частота, кількість мостів та комплексні зміни для зміни концентрації, комплексні зміни для вихідної форми). Диференціююча здатність достатня для модельних параметрів. Цього цілком достатньо для виявлення мени толерантних форм (Фаррел, частково Ронін). За дискримінантним аналізом, немає сенсу у використанні водночас варіантів TX-305 0,01 та 0,05 %. Аналіз дії TX-305 показав, що для даного фактору більш вагомими є такі параметри як зростання загальної чисельності клітин з перебудовами, кількості мостів та комплексних змін. Значимо вищу чутливість до дії TX-305 показав сорт Фаррел, частково Ронін, через суттєво вищу індукцію цитогенетичної мінливості. Різниця між іншими сортами не була достовірною. Застосовані концентрації слід віднести до діапазону помірних за цитогенетичною активністю, недоцільне вживання концентрації TX-305 0,01.

Ключові слова: пшениця озима, Тритон-305X, хромосомні перебудови, частота, спектр.

Okselenko O.M., Nazarenko M.M. Cytogenetic variability under the action of epimutagen in winter wheat

Epimutagens are an important tool in the genetic improvement of plants due to their ability to significantly increase the frequency of beneficial hereditary changes. They do not belong to genotoxic compounds, that is, those that cause a significant number of negative genetic changes in cells. Seeds of bread winter wheat varieties Farrell, NE 12443, Ronin, Saylor were treated with an aqueous solution of TX-305 in concentrations of 0,01 %, 0,05 %, 0,1 % and 0,5 %, 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 general rate of chromosomal changes was slightly mediated by the influence of the initial form factor; the gradual increase in the concentration of the factor had a significant effect. For the total frequency of fragments, no significant difference was found by the genotype factor, the difference

was unreliable by the concentration factor. In the case of bridges, no significant difference was found for the genotype factor, but for the concentration factor, the difference was significant. For other types of chromosomal rearrangements (lagging chromosomes and micronuclei), the variety factor also turned out to be insignificant, the reaction to increasing concentration was statistically unreliable. The influence of the variety on the induction of complex aberrations is significant, an increase in concentration leads to a significant increase in the frequency of complex changes. The results of the analysis in the factor space are predicted for factors of this nature (among the model features, only frequency, the number of bridges and complex changes for changes in concentration, complex changes for the original form are present as indicators of the force of action). Differentiating ability is sufficient for model parameters. This is quite enough to detect less tolerant forms (Farrell, partially Ronin). According to discriminant analysis, it makes no sense to use 0.01 and 0.05 % versions of TX-305 at the same time. The analysis of the effect of TX-305 showed that for this factor, such parameters as the increase in the total number of cells with rearrangements, the number of bridges and complex changes are more important. The variety Farrell, partially Ronin, showed a significantly higher sensitivity to the action of TX-305, due to a significantly higher induction of cytogenetic variability. The difference between other varieties was not reliable. The applied concentrations should be classified as moderate in terms of cytogenetic activity; it is not advisable to use a concentration of 0.01 TX-305.

Key words: winter wheat, Triton-305X, chromosomal rearrangements, rate, spectrum.

Постановка проблеми. Епімутагени є важливим інструментом у генетичному поліпшенні рослин завдяки їх здатності значно підвищувати частоту корисних спадкових змін. Вони не відносяться до гентоксичних сполук, тобто таких, що викликають значну кількість негативних генетичних змін у клітинах [1, 3].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Зазвичай, ці речовини можуть індукувати епімутації в різних білкових основах хромосом рослин з високою ефективністю, але при цьому їх використання має свої недоліки [10]. Епімутагени можуть індукувати значні зміни у фенотипі рослин, що робить їх корисними для швидкого генетичного поліпшення [6, 7]. Вони можуть діяти на конкретні епігенетичні мітки, що дозволяє отримувати більш передбачувані результати. Епімутагени не викликають гентоксичних ефектів, що зменшує ризик негативних наслідків для рослин та їх геному [4, 5].

Індукування епімутацій може бути складним процесом, що вимагає точного дозування та умов обробки. Навіть при спрямованій дії, не завжди можливо передбачити всі наслідки епімутацій. [8, 9]. Епігенетичні зміни можуть бути нестійкими і з часом зникати, що вимагає додаткових зусиль для збереження бажаних ознак [2, 9].

Постановка завдання. Застосували хімічний епімутаген Тритон-305X, тут та далі по тексту – TX-305, котрий належить до типу хімічних речовин, які здатні призводити до суттєвих змін гістонів у хромосомному комплексі та, таким чином, до зміни в експресії генів. Насіння сортів пшениці м'якої озимої Фаррелл, NE 12443, Ронін, Сейлор обробляли водним розчином TX-305 у концентраціях 0,01 %, 0,05 %, 0,1 % та 0,5 %, 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 дат 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 ($F = 2,07$; $F_{0,05} = 3,49$; $P = 0,08$), а от поступове зростання концентрації чиннику вплинуло достовірно ($F = 62,12$; $F_{0,05} = 3,25$; $P < 0,05$).

Таблиця 1
Частота хромосомних аберацій при дії TX-305 ($x \pm SD$, $n = 25$)

Сорт	Варіант	Мітозів, шт.	Хромосомних аберацій	
			шт.	%
Фаррел	вода	1009	10	$0,99 \pm 0,09^a$
	TX-305, 0,01 %	1008	28	$2,78 \pm 0,27^b$
	TX-305, 0,05 %	1004	47	$4,68 \pm 0,35^c$
	TX-305, 0,1 %	1001	60	$5,99 \pm 0,47^d$
	TX-305, 0,5 %	1007	77	$7,65 \pm 0,51^e$
NE 12443	вода	1002	8	$0,80 \pm 0,10^a$
	TX-305, 0,01 %	1004	23	$2,29 \pm 0,25^b$
	TX-305, 0,05 %	1001	31	$3,10 \pm 0,32^b$
	TX-305, 0,1 %	1007	48	$4,77 \pm 0,45^c$
	TX-305, 0,5 %	1004	63	$6,27 \pm 0,55^d$
Ронін	вода	1009	8	$0,79 \pm 0,10^a$
	TX-305, 0,01 %	1001	32	$3,20 \pm 0,25^b$
	TX-305, 0,05 %	1005	40	$3,98 \pm 0,37^b$
	TX-305, 0,1 %	1001	52	$5,19 \pm 0,43^c$
	TX-305, 0,5 %	1005	72	$7,16 \pm 0,47^d$
Сейлор	вода	1006	8	$0,80 \pm 0,10^a$
	TX-305, 0,01 %	1004	20	$1,99 \pm 0,26^b$
	TX-305, 0,05 %	1001	31	$3,10 \pm 0,38^c$
	TX-305, 0,1 %	1013	48	$4,74 \pm 0,45^d$
	TX-305, 0,5 %	1008	65	$6,54 \pm 0,51^e$

Примітка: різниця статистично достовірна за факторним аналізом ANOVA за концентраціями при $P 0,05$

Окремі вихідні форми при попарному аналізі вагомо відрізнялися. Це стосується сортів Фаррел ($F = 3,47$ $F_{0,05} = 2,48$; $P = 0,02$), та, менше, Ронін ($F = 2,67$ $F_{0,05} = 2,48$; $P = 0,04$), які виявилися в цілому менш толерантним ніж інші (суттєво вища частота аберацій). Кількість перебудов варіювала від 2,29 % (NE 12443) до 3,20 % (Ронін) при дії TX-305, 0,01 %, за дії TX-305, 0,05 % від 3,10 % (NE 12443, Сейлор) до 4,68 % (Фаррел), за дії TX-305, 0,1 % від 4,77 % (NE 12443) до 5,99 % (Фаррел), при концентрації TX-305, 0,5 % від 6,27 % (NE 12443) до 7,65 % (Фаррел).

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 ТХ-305 (x, n = 25)

Варіант	Фрагменти		Мости		фрагменти/ мости	інші		комплексні	
	шт	%	шт	%		шт	%	шт	%
Фаррел									
вода	4 ^a	40,00	4 ^a	40,00	1,00	1 ^a	10,00	0 ^a	0,00
ТХ-305, 0,01 %	15 ^b	66,67	9 ^b	28,13	1,67	4 ^a	12,50	2 ^b	6,25
ТХ-305, 0,05 %	19 ^c	46,88	16 ^b	30,36	1,12	11 ^b	19,64	7 ^c	12,50
ТХ-305, 0,1 %	23 ^d	33,93	22 ^c	32,35	1,05	15 ^c	22,06	11 ^d	16,18
ТХ-305, 0,5 %	30 ^e	33,82	30 ^e	33,71	1,00	17 ^c	19,10	13 ^d	14,61
NE 12443									
вода	4 ^a	44,44	5 ^a	55,56	0,80	0 ^a	0,00	0 ^a	0,00
ТХ-305, 0,01 %	11 ^b	44,00	8 ^b	32,00	1,38	4 ^b	16,00	2 ^a	8,00
ТХ-305, 0,05 %	12 ^b	35,29	9 ^b	26,47	1,33	10 ^c	29,41	5 ^{ab}	14,71
ТХ-305, 0,1 %	21 ^c	36,21	15 ^c	25,86	1,40	12 ^c	20,69	8 ^b	13,79
ТХ-305, 0,5 %	27 ^d	37,50	18 ^c	25,00	1,50	18 ^d	25,00	14 ^c	19,44
Ронін									
вода	5 ^a	62,50	4 ^a	50,00	1,25	0 ^a	0,00	0 ^a	0,00
ТХ-305, 0,01 %	16 ^b	50,00	10 ^b	31,25	1,60	6 ^b	18,75	1 ^a	3,13
ТХ-305, 0,05 %	19 ^c	47,50	14 ^c	35,00	1,36	7 ^b	17,50	2 ^a	5,00
ТХ-305, 0,1 %	21 ^c	40,38	19 ^d	36,54	1,11	12 ^c	23,08	7 ^b	13,46
ТХ-305, 0,5 %	31 ^d	43,06	26 ^c	36,11	1,19	15 ^c	20,83	10 ^b	13,89
Сейлор									
вода	4 ^a	50,00	4 ^a	50,00	1,00	1 ^a	12,50	0 ^a	0,00
ТХ-305, 0,01 %	9 ^b	45,00	7 ^a	35,00	1,29	4 ^a	20,00	1 ^a	5,00
ТХ-305, 0,05 %	11 ^b	35,48	10 ^{ab}	32,26	1,10	10 ^b	32,26	5 ^b	16,13
ТХ-305, 0,1 %	22 ^c	45,83	14 ^c	29,17	1,57	12 ^b	25,00	7 ^b	14,58
ТХ-305, 0,5 %	27 ^d	41,54	19 ^d	29,23	1,42	19 ^c	29,23	13 ^c	20,00

Примітка: різниця статистично достовірна за факторним аналізом ANOVA за концентраціями при P0,05

Для загальної частоти фрагментів суттєвої різниці за фактором генотип не виявлено ($F = 2,01$; $F_{0,05} = 3,49$; $P = 0,08$), за фактором концентрація різниця не достовірна ($F = 2,99$; $F_{0,05} = 3,25$; $P = 0,06$). Кількість варіювала від 9 (Сейлор) до 16 (Ронін) при дії ТХ-305, 0,01 %, за дії ТХ-305, 0,05 % від 11 (Сейлор) до 19 (Ронін, Фаррел), за дії ТХ-305, 0,1 % від 21 (NE 12443, Ронін) до 23 (Фаррел), при концентрації ТХ-305, 0,5 % від 27 (NE 12443, Сейлор) до 31 (Ронін).

Для випадку з мостами суттєвої різниці за фактором генотип знов не виявлено ($F = 2,01$; $F_{0,05} = 3,49$; $P = 0,08$), за фактором концентрація різниці достовірна ($F = 3,91$; $F_{0,05} = 3,25$; $P = 0,04$). Загалом, кількість мостів варіювала від 8 (NE 12443) до 10 (Ронін) при дії TX-305, 0,01 %, за дії TX-305, 0,05 % від 9 (NE 12443) до 16 (Фаррел), за дії TX-305, 0,1 % від 15 (NE 12443) до 22 (Фаррел), при концентрації TX-305, 0,5 % від 18 (NE 12443) до 30 (Фаррел).

Щодо інших типів хромосомних перебудов (відстаючі хромосоми та мікроядра), то для них фактор сорту теж виявився незначним ($F = 2,00$; $F_{0,05} = 3,49$; $P = 0,08$), статистично недостовірною була реакція на підвищення концентрації ($F = 2,17$; $F_{0,05} = 3,25$; $P = 0,02$). Кількість інших аберацій варіювала від 4 (три сорти) до 6 (Ронін) при дії TX-305, 0,01 %, за дії TX-305, 0,05 % від 7 (Ронін) до 11 (Фаррел), за дії TX-305, 0,1 % від 12 (три сорти) до 15 (Фаррел), при концентрації TX-305, 0,5 % від 10 (Ронін) до 14 (NE 12443).

Вплив сорту на індукцію комплексних аберацій значимий ($F = 4,16$; $F_{0,05} = 3,49$; $P = 0,03$), збільшення концентрації веде до значного зростання частоти комплексних змін ($F = 26,18$; $F_{0,05} = 3,25$; $P < 0,05$). Кількість комплексних аберацій варіювала на рівні 1-2 при дії TX-305, 0,01 %, за дії TX-305, 0,05 % від 2 (Ронін) до 7 (Фаррел), за дії TX-305, 0,1 % від 7 (Ронін та Сейлор) до 11 (Фаррел), при концентрації TX-305, 0,5 % від 10 (Ронін) до 14 (NE 12443).

Факторний аналіз показав (таблиця 3), що значущими збільшення концентрації TX-305 були для вивчених параметрів частоти, кількості мостів, наявності комплексних змін, 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	0,918727*	0,213620
Фрагментів	0,336929	0,324612
Мостів	0,614799*	0,326230
Інші аберації	0,357113	0,311225
Комплексні	0,734113*	0,567413*
Варіативність пояснена	2,346101	1,051017
Не пояснена	1,322225	1,160108

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

Як видно, у випадку з генотипом дискримінантний аналіз показав значущість для генотипу двох параметрів моделі – кількість мостів та комплексні аберації, для зміни концентрації загальної частоти, кількості мостів та комплексних змін.

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

Таблиця 4

Результати класифікаційного аналізу

Параметр	Генотип			Концентрація		
	Лямбда Уїлкса	F _{критичне} (3,53)	Р	Лямбда Уїлкса	F _{критичне} (2,52)	Р
Загальна частота	0,93	1,15	0,33	0,55	10,53	0,01
Фрагментів	0,95	0,84	0,47	0,86	1,95	0,11
Мостів	0,82	3,72	0,01	0,76	3,89	0,01
Інші аберації	0,90	2,31	0,09	0,97	0,99	0,14
Комплексні	0,81	3,99	0,01	0,78	3,51	0,01

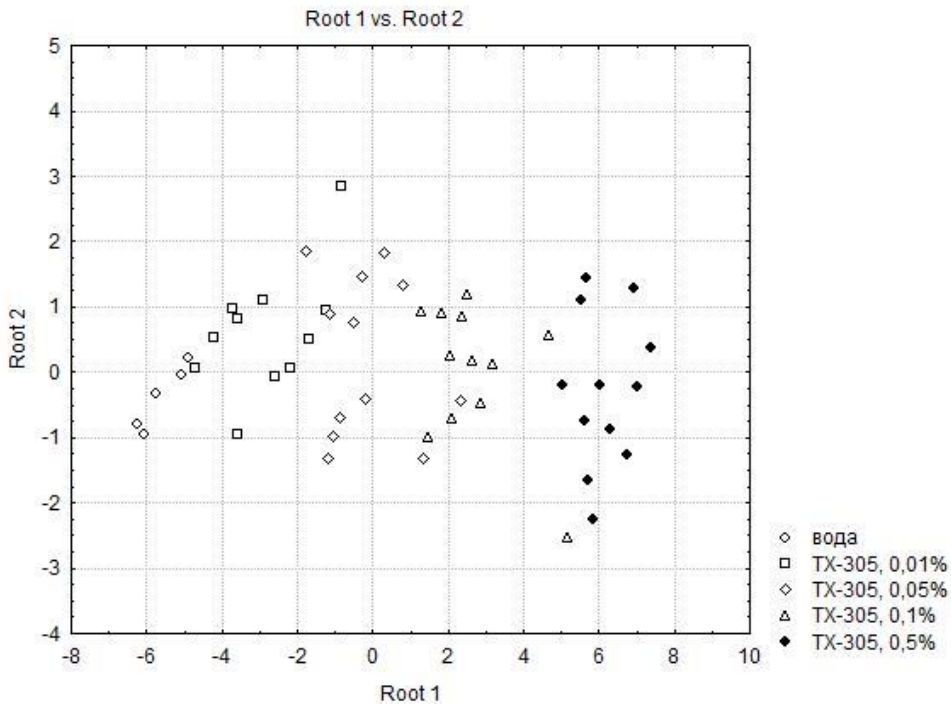


Рис. 1. Результати класифікації у факторному просторі

Диференціююча здатність достатня для модельних параметрів. Цього цілком достатньо для виявлення менш толерантних форм (Фаррел, частково Ронін). За дискримінантним аналізом, немає сенсу у використанні водночас варіантів TX-305 0,01 та 0,05 %.

Висновки і пропозиції. Аналіз дії TX-305 показав, що для даного фактору при вивченні на рівні клітини більш вагомими є такі параметри як зростання загальної чисельності клітин з перебудовами, кількості мостів та комплексних змін. Це надійні індикатори, котрі залежать від підвищення епімутагенної активності та об'єкту дії. При зростанні концентрації не завжди відбувається постійне підвищення зі значимими переходами між окремими варіантами, особливо для

кількості фрагментів та інших перебудов. Значимо вищу чутливість до дії TX-305 показав сорт Фаррел, частково Ронін, через суттєво вищу індукцію цитогенетичної мінливості. Різниця між іншими сортами не була достовірною. Застосовані концентрації слід віднести до діапазону помірних за цитогенетичною активністю, недоцільне вживання концентрації TX-305 0,01.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Akilan M., Vanniarajan C., Subramanian E., Anandhi K., Anand G. Sensitivity and insensitivity of various traits to mutagen treatment in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*. 2020. 8 (4). P. 381–389.
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. Winter wheat cytogenetic variability under the action of a chemical supermutagen. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2022. 13(4). P. 373–378.
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. Jasmin S., Nilavu E., Jayakumar A., Petchiammal I., Pramitha L., Devasena N., Francis, N., Madhavan A., Selvaraj R. A comprehensive review on mutation breeding milestones in cereals: Conventional to advanced molecular approaches to achieve sustainable goals in trait improvement. *Plant Science Today*. 2024. 11(1). P. 643–653.