

УДК 633.11:574.224.4

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВЫХ СТЕРЕОИЗОМЕРОВ НИТРОЗОАЛКИЛМОЧЕВИНЫ В СЕЛЕКЦИИ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

©2013 В.В. Моргун, А.М. Катеринчук, Т.В. Чугункова

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, г. Киев

Поступила 13.05.2013

Изучено влияние стереоизомеров нитрозоалкилмочевина на хромосомный аппарат, всхожесть семян, выживаемость, рост и развитие растений озимой мягкой пшеницы. Исследованы частота и спектр мутаций в поколениях М₁-М₃, определены оптимальные концентрации хиральных мутагенов для использования в мутационной селекции пшеницы.

Ключевые слова: пшеница, хиральные мутагены, оптимальные концентрации, хромосомные aberrации, частота и спектр мутаций.

Озимая мягкая пшеница – одна из главных продовольственных культур, которая по посевным площадям занимает первое место в Украине. Для повышения продуктивности, создания сортов, адаптированных к климатическим стрессам, необходимо совершенствование генофонда этой культуры. Одним из методов, позволяющих расширять наследственную изменчивость, создавать селекционно ценные формы является экспериментальный мутагенез. Следует отметить, что в настоящее время в мире зарегистрировано более 3200 мутантных сортов растений, из которых около 300 – мутантные сорта озимой мягкой пшеницы [1]. В Украине ведущую роль в области индуцированного мутагенеза занимает Институт физиологии растений и генетики НАН Украины [2]. Современное состояние мутационной селекции растений свидетельствует о том, что её дальнейшее развитие должно быть связано с эффективным применением известных супермутагенов, а также открытием и использованием новых высокоактивных химических веществ. На сегодняшний день известно большое количество химических мутагенов, но в практике применяются немногие. Наиболее распространенными химическими супермутагенами, которые используются для создания новых мутантных форм растений, является N-нитрозоэтилмочевина, N-нитрозо-метилмочевина, N-нитрозодиметилмочевина, этиленмин и др. Для получения более широкого спектра и увеличения частоты полезных мутаций проводится постоянный поиск новых эффективных химических мутагенов. С развитием химических технологий появилась возможность создания веществ с оригинальными мутагенными свойствами. В частности, такими веществами могут быть хиральные соединения, особенностью которых является то, что, имея одинаковые молекулярные формулы, они отличаются расположением атомов в пространстве.

Хиральные стереоизомеры способны вращать плоскость поляризованного света вправо или влево. Разница между оптическими изомерами проявляется в их активности и специфическом действии на организмы [3, 4]. В медицине обязательно учитывается изомерия лекарственных препаратов. Стереоизомеры применяются при производстве различных соединений, в том числе гербицидов, инсектицидов, фунгицидов, которые широко используются в сельском хозяйстве для защиты растений [5, 6]. Хиральные стереоизомеры могут быть привлекательными для применения в мутационной селекции растений. Известно, что оптически активные α -метилбензиловые *p*-полимочевина изменяют физиологические свойства риса и проса [7]. Однако как мутагенные факторы, подобные соединения на растениях практически не исследовались. Целью нашей работы было изучение мутагенной активности стереоизомеров нитрозоалкилмочевина, а также выявление возможности их использования в мутационной селекции пшеницы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом исследования были сорта озимой мягкой пшеницы: Кирена (украинской селекции) и Federer (чешской селекции), адаптированные к различным климатическим условиям выращивания. В качестве мутагенов использовали стереоизомеры R(-) и S(+) 1-N-нитрозо-1-N-метил-3-N-вторбутилмочевина¹ (НМвБМ), синтезированные в лаборатории стереохимии Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН. Семена (по 1000 зерен в каждом варианте опыта) обрабатывали мутагенами в концентрациях 0,005; 0,01; 0,03 и 0,05% по общепринятой методике. Контролем служили семена соответствующего сорта, обработанные водой. Для сравнения действия различных мутагенов использовали нитрозоэтилмочевину (НЭМ) в оптимальных концентрациях 0,0125% и 0,025% и гамма-лучи (ГЛ) в дозе 100 Гр. Экспозиция при обработке семян химическими мутагенами составляла 18ч. Цитологические исследования проводили на временных давленных препаратах при увеличении 1000^x, использовали микроскоп JENEVAL 30-G 0020a. Подсчитывали количество aberrантных

Моргун Владимир Васильевич, академик НАН Украины, директор ИФРГ НАН Украины, e-mail: plant@ifrg.kiev.ua; Катеринчук Александр Михайлович, младший научный сотрудник, e-mail: katerynchuks@mail.ru; Чугункова Татьяна Владимировна, д.б.н., проф., e-mail: t.chugunko@gmail.com

анафаз и патологий митоза. Растения выращивали на полях опытного хозяйства ИФРГ НАН Украины (пгт Глеваха Васильковского района Киевской области). В первом мутантном поколении (M_1) определяли полевую всхожесть семян пшеницы, выживаемость растений после весеннего возобновления вегетации, анализировали особенности роста и развития растений на протяжении вегетационного периода. Мутации выявляли путем отбора измененных растений на всех фазах развития в M_2 и анализа наследования измененных признаков в поколении M_3 . Статистическую обработку результатов исследований проводили по методике [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ хромосомных нарушений в клетках меристемы корешков озимой пшеницы показал, что при обработке семян хиральными мутагенами наблюдается увеличение частоты aberrаций по сравнению с контролем. В клетках сорта Federer нарушения составляли от 5,1% до 19,2%, сорта Кирена – 11,0-30,8%. При действии на семена пшеницы S(+)
НМвБМ число хромосомных aberrаций было выше, чем при действии R(-)
НМвБМ. Это свидетельствует о большей активности S(+)
формы стереоизомеров. Среди хромосомных aberrаций, вызванных хиральными мутагенами, наибольший процент составляли фрагменты, а также хромосомные и хроматидные мосты. Хиральные нитрозоал-

килмочевины вызывали в клетках корешков не только типичные хромосомные aberrации, но и различные патологии митозов, чем существенно отличались от известных мутагенов (нитрозоэтилмочевина, гамма-лучи). Была обнаружена массовая фрагментация хромосом, нарушение спирализации и деспирализации хромосом, раннее разделение хроматид, нерасхождение хромосом, слипание хромосом.

Изучение влияния мутагенов на рост и развитие растений озимой пшеницы в поколении M_1 является важным этапом исследования. Оценка всхожести семян, выживаемости растений, анализ их морфометрических параметров дает представление об уровне повреждения растений мутагенами. Выявлено, что с увеличением концентрации мутагенов снижались уровень полевой всхожести семян и выживаемость растений после весеннего возобновления вегетации. Наиболее низкими эти показатели были при действии хиральных стереоизомеров в концентрации 0,05% (рис. 1). Анализ полевой всхожести семян и выживаемости растений позволил определить концентрации стереоизомеров в 0,01% и 0,03% как оптимальные для роста и развития растений. Концентрация 0,05% R(-) и S(+)
энантиомеров отнесена к полулетальной, так как уровень всхожести семян и выживаемости растений при ее использовании находились на уровне 50% и ниже по сравнению с контролем.

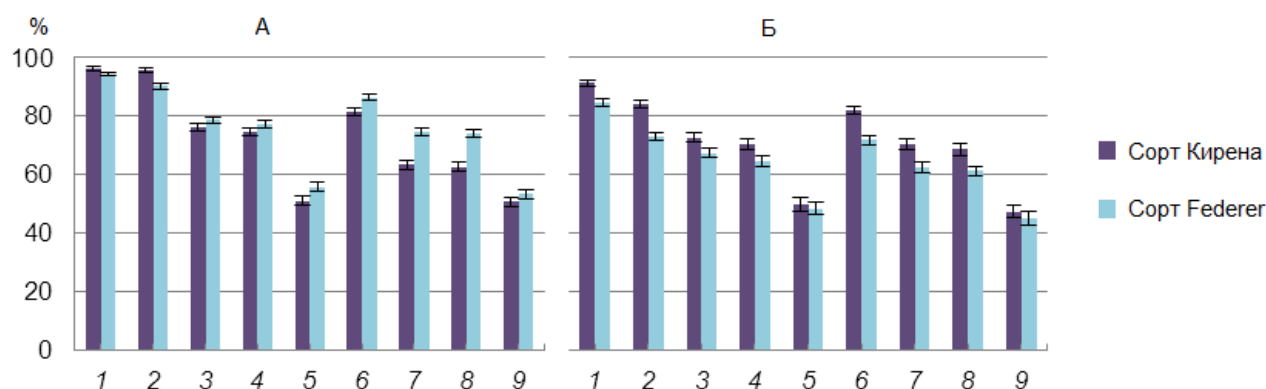


Рис. 1. А – полевая всхожесть семян, обработанных хиральными мутагенами: 1 – контроль; 2-5 – R(-) 0,005 %, 0,01 %, 0,03 %, 0,05 %; 6-9 – S(+)
0,005 %, 0,01 %, 0,03 %, 0,05 %. Б – выживаемость растений: 1 – контроль; 2-5 – R(-) 0,005 %, 0,01 %, 0,03 %, 0,05 %; 6-9 – S(+)
0,005 %, 0,01 %, 0,03 %, 0,05 %

Под действием хиральных мутагенов изменялась высота растений пшеницы в поколении M_1 . В большей степени угнетение высоты растений зафиксировано в варианте обработки стереоизомером S(+)
НМвБМ в концентрации 0,05%. Структурный анализ элементов продуктивности растений пшеницы позволил установить, что количество колосков, масса зерна с главного колоса и масса 1000 зерен являются более чувствительными к воздействию мутагенных факторов, чем другие. Хиральные стереоизомеры оказывали меньшее повреждающее влияние на всхожесть, выживание, рост и развитие растений пшеницы по сравнению с гамма-лучами и

НЭМ, не вызывая существенной депрессии по этим показателям.

Основным показателем, позволяющим определять генетическую активность мутагенных факторов, является частота мутаций. В третьем поколении (M_3) выделено значительное количество мутантных растений пшеницы, которые отличались по морфологическим признакам и физиологическим показателям от исходных сортов. Анализ мутантных форм свидетельствовал об увеличении частоты мутаций с повышением концентрации мутагенов (табл.).

Таблица. Частота видимых мутаций у сортов мягкой озимой пшеницы

№ п/п	Мутаген, концентрация, %	Изучено семей	Семей с мутациями, %	
			Сорт Federer	Сорт Кирена
1	Контроль (вода)	500	0,4±0,28	0,8±0,4
2	ГЛ 100 Гр	500	4,2±0,9*	5,2±0,99*
3	НЭМ 0,0125	500	5,4±1,01*	8,0±1,21*
4	НЭМ 0,025	500	5,6±1,03*	7,8±1,2*
5	R(-) НМвБМ 0,005	500	3,2±0,79*	5,0±0,97*
6	R(-) НМвБМ 0,01	500	3,6±0,83*	5,4±1,01*
7	R(-) НМвБМ 0,03	500	4,8±0,96*	10,2±1,35*‡
8	R(-) НМвБМ 0,05	500	5,4±1,01*	9,2±1,29*‡
9	S(+) НМвБМ 0,005	500	5,0±0,97*	5,0±0,97*
10	S(+) НМвБМ 0,01	500	5,6±1,03*	9,0±1,28*‡
11	S(+) НМвБМ 0,03	500	6,0±1,06*	9,2±1,29*‡
12	S(+) НМвБМ 0,05	500	9,0±1,28*‡^	12,6±1,48*‡^

Прим. * - достоверно с № 1 при $P_{0,05}$; ‡ - достоверно с № 2 при $P_{0,05}$; ^ - достоверно с № 3, 4 при $P_{0,05}$

При действии R(-) НМвБМ максимальная частота мутаций составила 10,2%, что существенно превышало частоту мутаций, индуцированных гамма-лучами в дозе 100 Гр. Стереизомер R(-) НМвБС в концентрациях 0,03% и 0,05% вызывал мутации на уровне действия НЭМ в оптимальных концентрациях. Это дает основание считать, что концентрации R(-) 0,03% и 0,05% являются оптимальными для индуцирования мутаций у озимой мягкой пшеницы. Обработка семян стереоизомером S(+) НМвБС в максимальной концентрации приводила, по сравнению с ГЛ и НЭМ, к появлению большего количества мутантных семей у обоих исследуемых сортов пшеницы. Концентрации стереоизомера S(+) 0,01% и 0,03% можно назвать оптимальными,

поскольку вызываемая ими частота мутаций была на уровне наиболее широко используемого в практике супермутагена нитрозоэтилмочевины и гамма-лучей. Следует отметить, что обработанные сорта обнаружили сходную реакцию на действие стереоизомеров нитрозоалкилмочевины. Однако, в целом, частота видимых мутаций у сорта Кирена была выше, чем у сорта Federer.

Анализ мутантных растений озимой пшеницы в M_3 позволил выделить 28 типов мутаций, которые можно отнести к 4 группам (мутации стебля и листа, мутации колоса, мутации по физиологическим показателям роста и развития, системные мутации). Наиболее значительную часть составляли мутации структуры колоса (рис. 2).



Рис. 2. Мутации колоса, индуцированные хиральными мутагенами на сорте Federer: 1 – контроль, 2 – крупный остистый, 3 – крупный, 4 – булавовидный, 5 – остистый, 6 – спельтоидный

Можно отметить сортовую специфичность в индуцировании типов мутаций. Для сорта Federer было отмечено существенное отличие между гамма-лучами, НЭМ и хиральными стереоизомерами в индукции таких мутаций, как остистый колос и

раннеспелость. На сорте Кирена выявлено достоверное различие по частоте таких мутаций как интенсивный восковой налет и раннеспелость.

Среди мутантов, полученных с помощью хиральных мутагенов, были выделены практически

ценные. У сорта Federer отобраны формы, прибавка к урожаю которых по сравнению с исходным сортом составила более 9 ц/га, у трех линий – 11,3 ц/га. Наибольшее количество практически ценных линий было выделено у сорта Кирена. Прибавка урожая по сравнению с исходным сортом составляла от 9,5 ц/га до 15,6 ц/га. Кроме мутантов, которые существенно превышали исходные сорта по урожаю, были выделены оригинальные мутантные формы, которые возможно использовать как доноры отдельных признаков для обогащения генетического разнообразия сортов озимой мягкой пшеницы.

Таким образом, впервые на растениях озимой мягкой пшеницы исследована мутагенная активность новых R(-) и S(+) стереоизомеров 1-N-нитрозо-1-N-метил-3-N-втор-бутилмочевины. Установлено, что энантиомеры вызывают значительное количество мутантных изменений в растениях пшеницы. По частоте и спектру мутаций они находятся на уровне известных супермутагенов, что позволяет рекомендовать хиральные мутагены для использования в мутационной селекции озимой пшеницы.

Авторы искренне благодарны заведующему лаборатории стереохимии Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН д.х.н., профессору

Р.Г. Костяновскому за предоставленные хиральные стереоизомеры 1-N-нитрозо-1-N-метил-3-N-втор-бутилмочевины согласно договору о творческом сотрудничестве.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. FAO/IAEA Mutant Variety Database. (<http://mvgs.iaea.org>).
2. Моргу́н В.В. Досягнення інституту фізіології рослин і генетики НАН України (до 65-ї річниці від дня заснування) // Физиология и биохимия культурных растений. 2011. Т. 43. № 3. С. 187-211.
3. Meng Q., Redetzke D.L., Hackfeld L.C., Hodge R.P., Walker D.M., Walker V.E. Mutagenicity of stereochemical configurations of 1,2-epoxybutene and 1,2:3,4-diepoxybutane in human lymphblastoid cells // *Chemico-Biological Interactions*. 2007. V. 166. N 1-3. P. 207-218.
4. Jones N. Scientists learn to tell left from right // *New Scientist*. 2002. N 2329. P. 19.
5. Воронков Л.Г. Клиническое использование хиральных молекул как новое направление в кардиоваскулярной медицине // *Здоров'я України*. 2007. № 21/1. С. 31-32.
6. Чугаев Д.В., Раменская Г.В. Влияние оптических изомеров на фармакокинетику лекарственных средств // *Фармация*. 2008. № 1. С. 50-52.
7. Omokawa H., Ryoo J.H. Enantioselective Response of Rice and Barnyard Millet on Root Growth Inhibition by Optically Active α -Methylbenzyl Phenylureas // *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2001. V. 70. № 1. P. 1-6.
8. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа. 1990. 352 с.

THE USE OF NEW STEREOISOMERS NITROSOALKILUREAS IN SELECTION OF WINTER WHEAT

©2013 V.V. Morgun, A.M. Katerynychuk, T.V. Chugunkova

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

The influence of the stereoisomers nitrosoalkilureas on chromosome apparatus, seeds germination, survival, growth and development of winter wheat were studied. The frequency and spectrum of mutations in the generations of M₁-M₃ were investigated, and the optimal concentrations of chiral mutagens for use in mutation breeding of wheat were established.

Key words: wheat, chiral mutagens, the optimal concentration, chromosomal aberrations, the frequency and spectrum of mutations.

Vladimir Morgun, academician, director, e-mail: plant@ifrg.kiev.ua; Alexander Katerynychuk, junior researcher, e-mail: katerynychuks@mail.ru; Tatyana Chugunkova, Doctor of Biology, professor, e-mail: t.chugunko@gmail.com