

## СПРЯМОВАНІСТЬ ГЕНЕТИЧНИХ ЗМІН ПІД ВПЛИВОМ НОВИХ ПОХІДНИХ ДИМЕТИЛСУЛЬФАТУ У ЛЬОНУ ОЛІЙНОГО

А.В. ТІГОВА<sup>1</sup>, А.І. СОРОКА<sup>1</sup>, П.Г. ДУЛЬНЄВ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Інститут олійних культур НААН України, вул. Інститутська, 1, с. Сонячне, Запорізький район, Запорізька область, 69055, Україна

<sup>2</sup> Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, вул. Мурманська, 1, Київ-94, 02094, Україна

E-mail: anna.tigova@gmail.com

На двох сортах льону олійного (Айсберг та Сонячний) вивчали особливості генетичної мінливості за впливу нових хімічних мутагенів, похідних диметилсульфату (ДМС), зокрема комплексу 3-*N,N* диметиламіноссульфолану з диметилсульфатом, диетилсульфату, комплексу *N*-оксиду 2,6-диметилпіридину з диметилсульфатом та комплексу *N*-оксиду 2-метилпіридину з диметилсульфатом. Насіння вказаних сортів обробляли водними розчинами мутагенів в концентрації 0,5 та 0,05 % і в наступних поколіннях оцінювали частоту та спектр індукованої мутаційної мінливості в порівнянні з класичними мутагенами ДМС та ЕМС (етилметансульфонат). Показано, що хімічна модифікація вихідної сполуки суттєво міняє активність її нових похідних, що виявляється у спрямованості генетичних змін. Нові мутагени характеризувалися значно вищою частотою індукованих мутацій, порівняно з ДМС, та проявляли меншу летальність за оцінкою виживання рослин в поколінні  $M_1$ . Найвищу мутагенну дію, порівняно з іншими похідними, демонстрував комплекс ДМС з 3-*N,N* диметиламіноссульфоланом. Спектр викликаних новими мутагенами спадкових змін відрізнявся від спектру як ДМС, так і ЕМС за всіма групами досліджених мутацій, що дозволяє рекомендувати дані сполуки для індукції змін різноманітної спрямованості. В порівнянні з ЕМС частота мутацій, викликана новими мутагенами, була, звичайно нижчою, за виключенням мутацій квітки та забарвлення насіння. Показано, що з нових мутагенів найбільш ефективним для отримання мутацій з порушенням синтезу хлорофілу виявився комплекс *N*-оксиду 2-метилпіридину з диметилсульфатом, для індукції мутацій вегетативних органів — комплекс *N*-оксиду 2,6-диметилпіридину з диметилсульфатом для сорту Айсберг і диетилсульфат для сорту Сонячний, мутацій забарвлення пелюсток віночка і пиляків, забарвлення насіння, мутацій за фізіологічними ознаками росту і розвитку — комплекс 3-*N,N* диметиламіноссульфолану з диметилсульфатом. Обговорюється можливість одержання оригінальних мутантів з підвищеним вмістом олії та зміненням її жирнокислотним складом за допомогою вищезазначених

сполук. Виявлені закономірності дають можливість краще зрозуміти вплив особливостей хімічної будови нових похідних ДМС на їх потенційні мутагенні властивості та цілеспрямовано використовувати дані сполуки для індукції мутацій специфічного напрямку.

**Ключові слова:** льон, хімічний мутаген, диметилсульфат, похідні диметилсульфату, етилметансульфонат, мутація.

**Вступ.** Мутаційна мінливість є постачальником нових ознак у рослин, перекомбінація яких на фоні природного добору і складає основу еволюції культурних видів (Raina et al, 2016, Penna et al, 2017; Jankowicz-Cieslak et al, 2017). Перші дослідження з експериментального мутагенезу льону олійного були розпочаті ще на початку ХХ століття дослідниками, в яких насіння диплоїдних та тетраплоїдних сортів льону опромінювали рентгенівськими променями (Levan, 1944). Проте серед диплоїдів були лише хлорофільні мутанти, а опромінення тетраплоїдів не було ефективним. Пізніше подібні висновки були зроблені при вивченні впливу хімічних мутагенів (НММ, НЕМ, ДМС, ДЕС, ЕІ) на ознаки льону-довгунця (Курянська, 1983).

Раніше також проводились дослідження по використанню мутагену ЕМС в різних концентраціях і обробки гамма-променями різних сортів сортів льону, що дозволило виявити специфічність механізмів дії кожного з них (Віану et al, 1972). В експериментах по вивченню мутагенних ефектів ЕМС і азиду натрію були виявлені особливості мейозу у мутантних популяціях льону-довгунця (Ambreen et al, 2011). Також за допомогою обробки ЕМС були індуковані хлорофільні мутанти льону та вивчено вплив цього мутагену на мінливість ростових процесів і будову клітин (Bretagne-Sagnar et al, 1995). Крім цього, встановлено вплив ЕМС на характер спадковості і мінливості ознак льону у мутантних форм  $M_1$ – $M_3$  поколінь

при вивченні ознаки «зигзагоподібного стебла» (Tejcklova E, 2002).

Шляхом індукованого мутагенезу з використанням як фізичних, так і хімічних мутагенів, в Інституті олійних культур НААН шляхом прямого відбору мутацій раніше отримано ряд сортів льону олійного як технічного, так харчового напрямків. Крім того, за допомогою мутагенів у дикорослих видів льону була одержана серія унікальних сортів зі зміненим забарвленням та формою квітки (Lyakh, 2003; Lyakh, Soroka, 2008). Аналіз результатів досліджень з мутагенезу на культурі льону вказує на те, що цей метод не втратив своєї актуальності й може активно використовуватися як дієвий інструмент в селекційній роботі.

Однак у більшості робіт не розглядаються механізми дії хімічних мутагенів, вплив окремих реакційних груп на здатність мутагену викликати певний спектр спадкових змін, хоча відомо, що навіть незначна зміна хімічної будови речовини чи її стереометрії викликає суттєві зміни в активності сполук, аж до повної їх деактивації. Крім того, кожен вид, сорт чи генотип рослин характеризуються певними особливостями, що в результаті призводить до іншого спектру мінливості у порівнянні з модельними об'єктами. З літературних даних відомо, що сутність мутагенної дії ДМС і ЕМС полягає в реакції алкілювання молекули ДНК шляхом введення етильних або метильних груп (Mahla et al, 2010; Rajarajan et al, 2014).

Як правило, при дії ЕМС і ДМС відбувається алкілювання гуаніну в положенні 7-го атома азоту (N-7), який після цього набуває здатності спаровуватися з тиміном, що призводить до транзиції G-C на A-T, внаслідок чого і може статися мутація. Тим не менше, встановлено, що при дії вищезгаданих речовин на ДНК відбувається також метилювання 6-го атома кисню (O-6) гуаніну, хоча з частотою 0,004 по відношенню до N-7 гуаніну (Lawley et al, 1972). Алкілюючі агенти діють не тільки на ДНК, але і на РНК, взаємодіючи крім гуаніну з невеликою частотою з N-1 атомом аденіну і N-3 атомом цитозину (Lawley et al, 1972). Також відомо, що обробка ЕМС викликає хімічну модифікацію аденіну. За даними Lawley et al до 20 % аденіну може бути модифіковано в 1-N, 3-N, 7-N та 9-N положен-

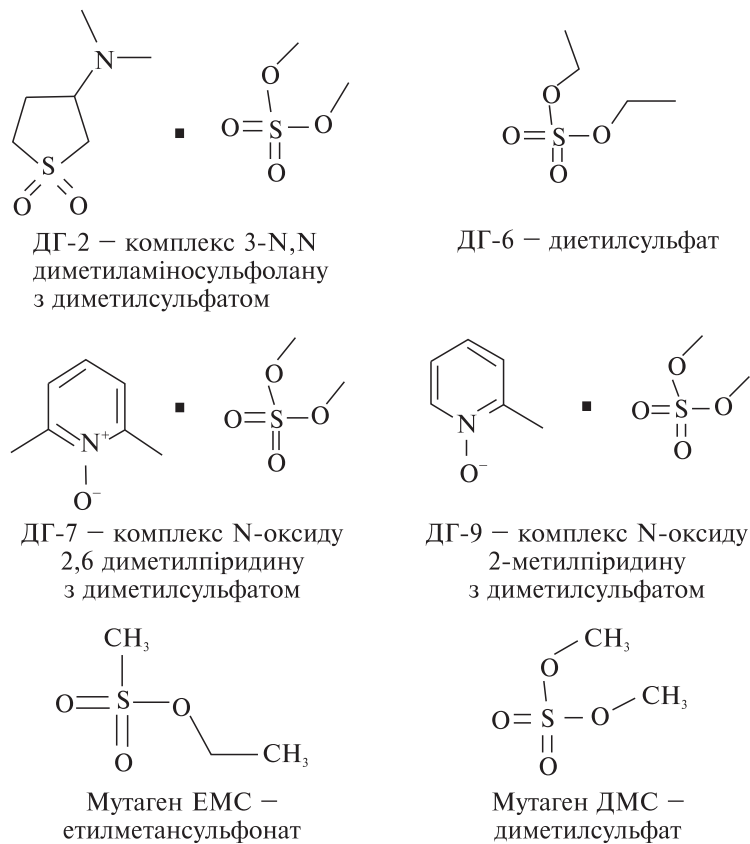
нях, в залежності від часу обробки та концентрації мутагену. По співвідношенню похідних, які утворюються при дії алкілюючих речовин дані автори вказують, що найчастіше відбуваються реакції з N-7 атомом гуаніну та з N-3 атомом аденіну. На ці дві реакції припадає більше 90 % від усіх реакцій алкілювання (Lawley et al, 1975). Також з літературних даних відомо (Luan et al, 2007; Talebi et al, 2012; Deepthi et al, 2016), що ЕМС і ДМС викликають розриви хромосом і що більшість воз'єднань проходить внутрішньохромосомно, призводячи до утворення великої кількості хромосомних мутацій (Vasu and Hasan, 2011).

На сьогоднішній день важливим напрямком досліджень в області експериментального мутагенезу та мутаційної селекції рослин є пошук нових мутагенів з метою цілеспрямованого отримання цінних мутацій з більш високою частотою (Kolar et al, 2015). Крім цього, необхідність охорони навколишнього середовища визначає пошук речовин, що характеризуються високим мутагенним ефектом і меншим ступенем токсичності. Такими речовинами можуть бути нові хімічні сполуки серії ДГ, похідні диметилсульфату та його комплексні сполуки.

У зв'язку з цим встановлення особливостей мутаційної мінливості на різному сортовому матеріалі льону олійного при обробці новими мутагенними сполуками та виявлення специфіки їх дії в залежності від зміни хімічної структури мутагену є вкрай важливим і потребує більш детального вивчення.

**Матеріали й методи.** До досліджень були залучені два сорти льону олійного (*Linum humile* Mill.): Айсберг та Сонячний. Повітряно-сухе насіння обох сортів замочували в 0,05- і 0,5%-них водних розчинах хімічних мутагенів впродовж 16 год. У кожному варіанті використовували по 300 насінин. У контролі насіння відповідних сортів замочували в дистильованій воді. Після обробки насіння промивали впродовж 1 год в проточній воді і в той же день висівали в ґрунт.

Як мутагенні чинники використовували мутагени серії ДГ, похідні диметилсульфату та ЕМС. Похідні серії ДГ є новими хімічними речовинами і раніше в експериментальному мутагенезі на культурі льону не застосовувалися. Мутагени ДГ-2, ДГ-6, ДГ-7, ДГ-9 були синтезовані в Інституті біоорганічної хімії та



**Рис. 1.** Структурно-розгорнуті формули мутагенів серії ДГ у порівнянні з класичними мутагенами ДМС та ЕМС

нафтохімії НАН України та люб'язно надані нам к.х.н. П.Г. Дульневим. За даними кафебри фізико-колоїдної хімії Запорізького державного медичного університету, отриманими методом рідинної хромато-мас-спектрометрії, мутаген ДГ-2 – комплекс 3-N,N диметиламіносурфолану з диметилсурфатом, ДГ-6 – диетилсурфат, ДГ-7 – комплекс N-оксиду 2,6-диметилпіридину з диметилсурфатом і ДГ-9 – комплекс N-оксиду 2-метилпіридину з диметилсурфатом (рис. 1). ДМС ( $C_2H_5O)_2SO_2$ ) і ЕМС ( $CH_3O-SO_2-OC_2H_5$ ) – класичні мутагени, які досить часто використовують в цілях мутаційної селекції.

Мутаген ДГ-2 відрізняється від вихідної сполуки ДМС додатковою групою сурфолану з диметиламіном. Мутаген ДГ-6 містить дві етильні групи замість метильних. Мутагени ДГ-7 та ДГ-9 містять додаткову піридинову групу з однією чи двома метильними групами.

Для аналізу впливу мутагену на рослини в поколінні  $M_1$  досліджували такі показники як виживання рослин, тривалість періоду «сходи-цвітіння», а також ряд морфологічних ознак (висота рослин, кількість бічних пагонів на головному стеблі, кількість коробочок на одній рослині і кількість насіння з однієї рослини).

Посів для отримання поколінь  $M_2$  та  $M_3$  проводили у польових умовах посімейно: сім'я у  $M_2$  – потомство однієї рослини з покоління  $M_1$ ; сім'я у  $M_3$  – потомство сім'ї з  $M_2$ . Сім'ї  $M_2$ , в яких мутації були летальними, збирались повністю з метою виявлення рослин з даними змінами в поколінні  $M_3$ .

Упродовж вегетаційного періоду проводили фенологічні спостереження, відмічали рослини зі зміненими морфологічними і фізіологічними ознаками, в наступних поколіннях проводили перевірку успадкування виділених змін. Вели облік всіх видів мутацій на кожній стадії росту

і розвитку рослин. Мутаціями вважали тільки ті зміни ознак рослин, які успадковувались у наступних поколіннях.

Мутації визначали шляхом візуального огляду рослин під час проходження ними основних фаз вегетації. Виділяли наступні групи мутацій: I – мутації з порушенням синтезу хлорофілу; II – мутації структури стебла, пагонів і листя; III – мутації квітки: зміна забарвлення пелюсток віночка і пиляків, форми пелюсток і бутонів; IV – мутації забарвлення насіння; V – мутації за фізіологічними ознаками росту і розвитку. Відмічали мутації з порушенням синтезу хлорофілу, мутації структури стебла, пагонів і листків, мутації квітки (зміни забарвлення пелюсток віночка і пиляків, форми пелюсток і бутонів), мутації забарвлення насіння, мутації за фізіологічними ознаками росту та розвитку. Таким чином, у кожному варіанті враховували всі типи мутаційної мінливості льону та кількість рослин кожного типу. Частоту мутантних змін визначали у відсотках як відношення числа мутантних сімей до загальної їх кількості у поколінні  $M_2$ . Остаточний висновок про наявність мутацій в  $M_2$  робили після підтвердження їх успадкування в поколінні  $M_3$ .

Експериментально отримані дані обробляли використовуючи класичні методи статистичного аналізу. Відмінності за частотою мутацій між досліджуваними новими та класичними мутагенами оцінювали за t-критерієм. Графіки, які демонструють спрямованість дії мутагенів, були побудовані за допомогою пакета аналізу даних MS Excel (Winston, 2018).

*Вплив хімічних мутагенів на ріст та розвиток рослин льону олійного у поколінні  $M_1$ .* Оцінка чутливості рослин в поколінні  $M_1$  до впливу мутагенів необхідна для визначення ступеня токсичності мутагенних факторів і чутливості до них сортів, ступеня пошкоджуючої дії мутагенів на ріст та розвиток рослин, встановлення зв'язку показників рослин  $M_1$  з виходом мутацій, визначення оптимальних та критичних доз з метою раціонального використання мінімальних вибірок вихідного матеріалу для максимальної ефективності отримання результатів.

Основними, найбільш надійними критеріями чутливості рослин до мутагенної дії, є виживання рослин, ступінь пригнічення про-

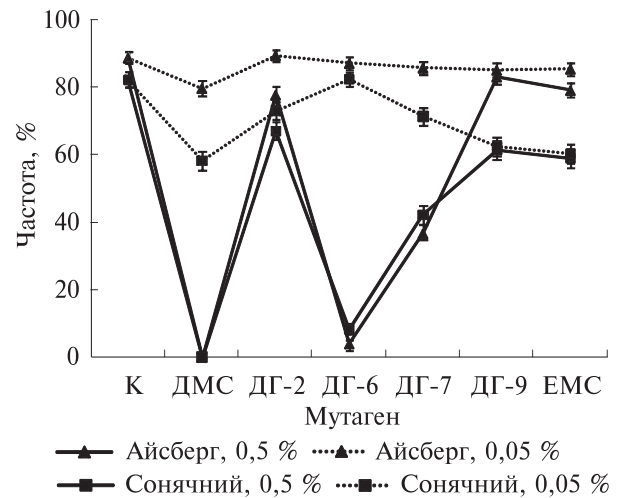


Рис. 2. Виживання рослин сортів Айсберг і Сонячний в поколінні  $M_1$  при обробці насіння мутагенами в концентрації 0,5 та 0,05 %

цесів росту та розвитку. На сортах льону олійного Айсберг та Сонячний встановлено, що мутагенний фактор в поколінні  $M_1$  вплинув на такий важливий показник як «виживання рослин» (рис. 2). Як показують дослідження, цей показник істотно залежав від виду мутагену. Виживання рослин у сорту Айсберг, в залежності від використаного мутагену, коливалось в межах від 0 до 89,3 % порівняно з контролем (88,6 %), а у сорту Сонячний – від 0 до 82,3 % (у контролі 82,0 %). Значні відмінності від контролю за цією ознакою спостерігалися при дії всіх вивчених мутагенів, крім ДГ-9, який не вплинув на виживання рослин сорту Айсберг. Слід зазначити, що при обробці мутагеном ДМС в концентрації 0,5 % у сортів Айсберг і Сонячний загинуло 100 % рослин. Схожу, хоча й не летальну, пригнічуючу дію виявляв новий мутаген ДГ-6 в концентрації 0,5 %. В результаті показник виживання був на рівні 4,0 % у сорту Айсберг і 8,3 % у сорту Сонячний.

Випробувані мутагени впливали й на ряд інших характеристик рослин покоління  $M_1$ . Суттєву зміну відмічали для таких показників як «висота рослин», «кількість коробочок на рослині», «кількість бічних пагонів на головному стеблі» та «кількість насіння з однієї рослини». В основному нові мутагени проявляли пригнічувальну дію, викликаючи змен-

шення цих показників, особливо при використанні більш високої концентрації 0,5 %. Збільшення висоти рослин спостерігали у обох сортів при застосуванні мутагенів ДГ-6, ДГ-7, ДГ-9 в меншій концентрації 0,05 %.

Таким чином, досліджувані хімічні мутагени виявляли суттєву дію на рослини льону у поколінні  $M_1$ , викликаючи загибель рослин, затримку або стимулювання процесів їх росту та розвитку. Така реакція рослин в поколінні  $M_1$  свідчить про ефективність дії вивчених мутагенів і передбачає отримання високої частоти і широкого спектра мутацій в наступних поколіннях.

*Мутаційна мінливість льону олійного у поколінні  $M_2$  під впливом нових хімічних мутагенів.* Мутагени серії ДГ викликали появу спадкових змін різних груп з різною частотою. Так, перша група мутацій з порушенням синтезу хлорофілу виділялася з досить високою частотою, яка наближалась майже до 20 % (таблиця). Хлорофільні мутації є поширеним тестом в

дослідженнях з експериментального мутагенезу рослин, головним чином тому, що їх порівняно легко спостерігати серед великої кількості рослин у досліджуваних популяціях. За частотою хлорофільних мутацій та їх спектром судять про ефективність і специфічність дії мутагенів і мутабільність сортів (Morgun, 1995).

Найбільш ефективними у цій серії виявилися мутагени ДГ-7 та ДГ-9, обробка якими викликала у обох сортів значно вищу частоту хлорофільних мутацій у порівнянні з контрольними варіантами – 7,46–10,95 % у сорту Айсберг і 10,89–18,43 % у сорту Сонячний. Ці мутагени відрізняються від вихідної сполуки ДМС додатковим комплексом N-оксиду метилчи диметилпіридину, що свідчить на користь введення цієї групи з метою суттєвого збільшення кількості мутацій з порушенням синтезу хлорофілу. Інші вивчені мутагени серії ДГ (ДГ-2 та ДГ-6) були також ефективні, хоча і індукували появу хлорофіл-дефіцитних мутацій з більш низькою частотою. Тут можна

**Загальна частота індукованих новими та класичними мутагенами груп мутацій у *Linum humile* Mill. сортів Айсберг та Сонячний в поколінні  $M_2$ , %**

Мутаген	Група мутацій @				
	I	II	III	IV	V
<i>сорт Айсберг</i>					
ДМС	0,00	0,00	0,00	0,00	0,94 ± 0,94
ДГ-2	2,85 ± 1,15 *, #	3,81 ± 1,32 **, #	6,68 ± 1,72 ***	2,88 ± 1,15	1,90 ± 0,94 *
ДГ-6	1,96 ± 1,34#	0,00 #	0,00 #	0,00	0,00 #
ДГ-7	7,46 ± 1,82 ***, #	3,83 ± 1,33 **, #	1,98 ± 0,96 *	1,98 ± 0,96	0,99 ± 0,68
ДГ-9	10,95 ± 2,11 ***, #	1,82 ± 0,90 **, #	3,65 ± 1,27 **	2,74 ± 1,10	0,92 ± 0,64
ЕМС	24,33 ± 2,77	9,36 ± 1,88	3,56 ± 1,20	0,89 ± 0,61	2,56 ± 1,02
<i>сорт Сонячний</i>					
ДМС	0,95 ± 0,95	0,00	1,90 ± 1,33	0,95 ± 0,95	0,95 ± 0,95
ДГ-2	10,76 ± 2,16 ***, #	0,00#	10,72 ± 2,16 ***	10,70 ± 2,16 ***	2,92 ± 1,18
ДГ-6	9,70 ± 2,66 **, #	2,91 ± 1,51 ***, #	1,94 ± 1,24#	5,82 ± 2,10 *	0,00 #
ДГ-7	10,89 ± 2,19 ***, #	1,98 ± 0,98#	6,93 ± 1,79 *	5,94 ± 1,66 **, #	1,98 ± 0,98
ДГ-9	18,43 ± 2,70 ***, #	0,00#	3,88 ± 1,34 #	2,91 ± 1,17 #	0,00 #
ЕМС	39,97 ± 3,24	14,28 ± 2,31	9,13 ± 1,90	11,59 ± 2,11	2,46 ± 1,02

*Примітки.* @ – частота мутацій вказана з похибкою середнього; \*, \*\*, \*\*\* – відмінності частоти мутацій нових мутагенів від ДМС статистично значимі з вірогідністю  $P \geq 95, 99$  та  $99,9$  %, відповідно; # – відмінності частоти мутацій нових мутагенів від ЕМС статистично значимі з вірогідністю  $P \geq 95$  %; I – мутації з порушенням синтезу хлорофілу; II – мутації структури стебла, пагонів і листя; III – мутації квітки: зміна забарвлення пелюсток віночка і пиляків, форми пелюсток і бутонів; IV – мутації забарвлення насіння; V – мутації за фізіологічними ознаками росту і розвитку.

відмітити той факт, що заміна метильних груп ДМС на етильні у ДГ-6 призводила до суттєвого збільшення частоти хлорофільних мутацій. Вихідний мутаген ДМС виявився малоєфективним у плані індукції цих мутацій, оскільки у сорту Айсберг змін даної групи виявлено не було, а у сорту Сонячний частота появи мутацій була мінімальною і склала 0,95 %. Варто зазначити, що жодна з хімічних модифікацій ДМС у вивчених сполук серії ДГ не призводила до такої частоти хлорофільних змін як мутаген ЕМС, де частота появи мутацій з порушенням синтезу хлорофілу була ще більшою і склала 24,33 % у сорту Айсберг і 39,97 % у сорту Сонячний.

Отримані нами результати співпадають з відомими літературними даними, які свідчать про високу мутагенну активність ЕМС в плані отримання хлорофільних мутацій. Так, Jacob M. (1970) вивчав порівняльний мутагенний ефект алкілюючих агентів та гамма-променів у *Arabidopsis thaliana*, і встановив, що найефективнішим був мутаген ЕМС, який індукував найбільшу частоту хлорофільних мутацій в порівнянні з ММС (метилметансульфонат), МNG, BMS та гамма-променями. Проте в більш пізніх дослідженнях Vasu and Hasan (2009, 2011) показано, що заміна в молекулі мутагену етильної групи на метильну призводить до збільшення частоти хлорофільних мутацій приблизно на 2 %, при цьому всі досліджувані концентрації виявились ефективними. З вивчених авторами радіоміетичних агентів, таких як МЕС, ЕМС та ММС, саме ММС характеризувався найширшим спектром мутацій у *Trigonella foenum-graecum* L. Особливо це стосується хлорофільної мутації типу *Albina*, її частота збільшувалась майже в 2–3 рази в залежності від генотипу. Таким чином, не лише хімічні особливості будови мутагену, а й об'єкт його впливу відіграють суттєву роль в плані викликання мутацій з порушенням синтезом хлорофільних пігментів.

Майже всі нові мутагени були ефективними в індукції змін другої групи, що об'єднує мутації структури стебла, пагонів і листків. У сорту Айсберг мутагени ДГ-2 і ДГ-7 індукували появу змін з частотою 3,81 і 3,83 %. Мутаген ДГ-7 виявився також ефективним і для сорту Сонячний. Він викликав зміни даного типу з

частотою 1,98 %. Спостерігалися зміни структури стебла і при дії мутагену ДГ-6, частота яких склала 2,91 %. З наведених даних видно, що хімічна модифікація ДМС чи його комплексів з іншими сполуками мало впливали на появу мутацій даної групи. Суттєве зменшення частоти цієї групи мутацій відмічено лише для ДГ-9, коли вилучення однієї з метильних груп N-оксиду диметилпіридину негативно впливало на ефективність дії даного мутагену, оскільки у сорту Айсберг мутації стебла спостерігали лише у окремих випадках, а у сорту Сонячний їх не було взагалі.

У порівнянні з ДМС всі його хімічні похідні були більш активними і можуть використовуватись для індукції мутацій другої групи. Сам ДМС не викликав зміни структури стебла, пагонів і листків і виявився в цьому плані не ефективним. Що до мутагену ЕМС, то частота змін, індукована мутагенами серії ДГ, не перевищувала частоту мутацій, індукованих мутагеном ЕМС. Обробка цим же мутагеном насіння сорту Сонячний призвела до появи рідкісної мутації (з частотою 0,82 %) зміни структури стебла – «зигзагоподібне стебло», особливістю якої була зміна форми стебла з прямої на зигзагоподібно деформовану.

Використані нові хімічні мутагени в поколінні  $M_2$  викликали у обох сортів зміни в забарвленні пелюсток віночка і пиляків, форми пелюсток і бутонів, які були об'єднані в третю групу мутацій. Найбільш ефективним в індукції мутацій даної групи, як для сорту Сонячний, так і для сорту Айсберг, виявився мутаген ДГ-2 (комплекс 3-N,N диметиламіноссульфолану з диметилсульфатом), який ініціював максимальну частоту таких змін серед усіх вивчених мутагенів. Вона склала 6,68 % у сорту Айсберг і 10,72 % у сорту Сонячний. Навіть класичний високоефективний мутаген ЕМС викликав менше мутацій даної групи, хоча різниця у частоті не була суттєвою на статистичному рівні. Інші похідні ДМС були менш ефективними, проте у випадках комплексного поєднання ДМС з N-оксидом метилпіридинів частота мутацій квітки теж була досить високою. Заміна метильної групи ДМС на етильну не змінювала активності мутагену, вона залишалась дуже низькою і, в залежності від генотипу складала від 0 до 1,94 %. Таким

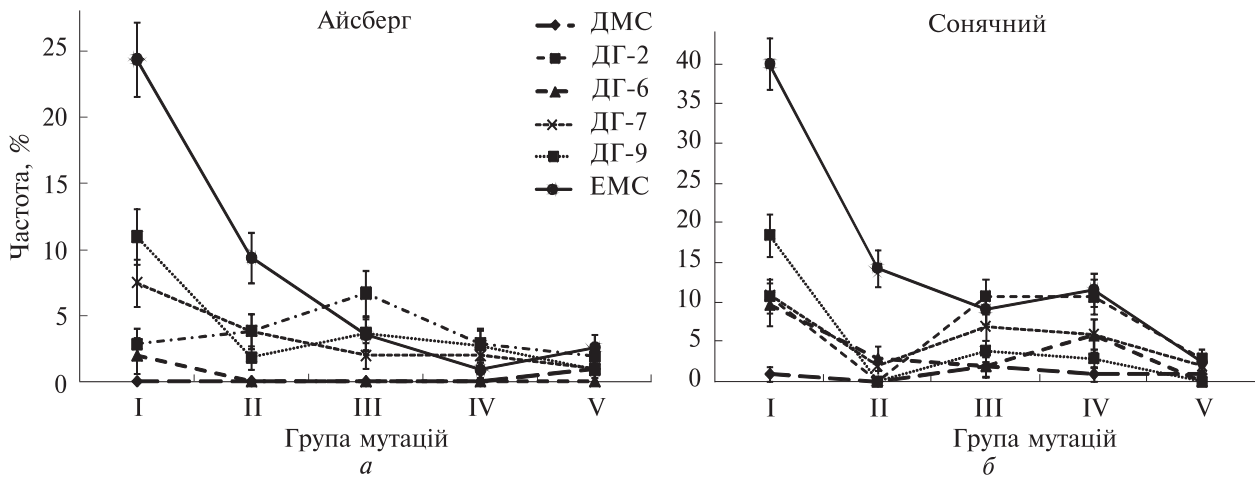


Рис. 3. Спрямованість дії хімічних мутагенів у *Linum humile* Mill. сортів Айсберг (а) і Сонячний (б): I – мутації з порушенням синтезу хлорофілу, II – мутації структури стебла, пагонів і листків, III – мутації форми та забарвлення пелюсток віночка і пиляків, IV – мутації забарвлення насіння, V – мутації за фізіологічними ознаками росту і розвитку

чином використання комплексу 3-N,N диметиламіноссульфолану з диметилсульфатом є набагато ефективнішим за вихідну сполуку ДМС, яка не продемонструвала ефективності в плані індукції змін забарвлення і форми квітки та бутонів у сорту Айсберг, а у сорту Сонячний частота появи мутацій даної групи була мінімальною і становила 1,90 %.

Обробка хімічними мутагенами насінневого матеріалу призвела до зміни, з певною частотою, забарвлення насіння у обох сортів льону олійного в поколінні  $M_2$  (таблиця, рис. 3). Для обох вивчених сортів найбільш ефективним виявився мутаген ДГ-2, який індуктував зміни забарвлення насіння з частотою 2,88 і 10,70 %. Цей мутаген відрізняється від вихідного мутагену ДМС додатковим комплексом 3-N,N диметиламіноссульфолану, що свідчить на користь введення цієї групи з метою суттєвого збільшення кількості мутацій зміни забарвлення насіння. Дія інших похідних ДМС істотно залежала від генотипу. Якщо у сорту Айсберг досить велику кількість змін викликав лише мутаген ДГ-9, то у сорту Сонячний усі нові випробувані мутагени виявляли високу ефективність. Найбільш ефективним із серії мутагенів ДГ для цього сорту виявився мутаген ДГ-2, який індуктував появу зміненого забарвлення насіння з високою частотою – 10,70 %. Ефективною була також заміна у

ДМС метильної групи на етильну, оскільки дана заміна призводила до статистично значимого збільшення частоти мутацій даної групи. Мутаген ДМС виявився не ефективним в плані індукції мутацій забарвлення насіння, оскільки або не викликав жодних змін, або індуктував їх із вкрай низькою частотою. Дія мутагену ЕМС характеризувалась сильною залежністю від використовуваного об'єкту, для сорту Айсберг його ефективність була навіть нижчою за більшість похідних ДМС, проте у сорту Сонячний він викликав зміни забарвлення насіння з високою частотою, яка складала 11,59 %.

Для індукції мутацій за фізіологічними ознаками росту і розвитку у обох вивчених генотипів серед мутагенів серії ДГ найбільш ефективним виявився мутаген ДГ-2, який на відміну від ДМС являє собою комплексну сполуку з диметиламіноссульфоланом. Він викликав зміни з максимальною частотою у сортів Айсберг та Сонячний, що склали 1,90 та 2,92 %, відповідно. Інші нові мутагени, крім ДГ-6, були також ефективні та індуктували з різною частотою мутації даного типу (таблиця). Таким чином, лише хімічна модифікація вихідної сполуки у вигляді заміни метильних груп на етильні (ДГ-6) призводила до втрати мутагенної активності, що свідчить про недоцільність використання даного мутагену для

отримання фізіологічних мутацій. Встановлені закономірності щодо мутагенної активності похідного ДГ-6 корелюють з даними, отриманими Lawley et al. (1975), де автори вивчали особливості впливу алкілюючих агентів на нуклеїнові кислоти і показали, що заміна етильної групи мутагену ЕМС на метильну не лише змінює співвідношення модифікованих азотистих основ, збільшуючи частку метильованого аденіну відносно метильованого гуаніну на 3 %, а й призводить до загального збільшення реакцій алкілювання даних азотистих основ, причому частка алкілювання аденіну збільшується майже в 2 рази, а гуаніну лише до 10 %.

Як видно з наведених вище даних, зміна хімічної будови вихідної сполуки ДМС призводила до суттєвої зміни мутагенної активності усіх вивчених похідних. Найчастіше саме комплексна сполука ДМС з диметиламіноссульфоланом виявляла найвищу мутагенну дію. Причому в залежності від типу хімічної модифікації рівень мутантних змін та спектр мутацій суттєво відрізнялись. Особливо ясно спрямованість дії нових хімічних мутагенів видно на рис. 3, де на прикладі сортів Айсберг і Сонячний показано, який саме тип хімічної модифікації є ефективним в плані індукції мутацій різних груп.

Так, серед нових хімічних мутагенів для індукції мутацій I-ї групи (мутації з порушенням синтезу хлорофілу) у льону найбільш ефективними виявилися мутагени ДГ-9 та ДГ-7. Показово, що обидві сполуки відрізняються від ДМС зв'язаним додатковим комплексом N-оксиду метилпіридину. Це свідчить про доцільність використання даної речовини за необхідності добору хлорофільних мутацій. Ці ж нові мутагени показали ефективність і для отримання інших груп мутацій – мутаген ДГ-7 викликав значну кількість мутацій структури стебла і листків (II група) у сорту Айсберг та мутацій квітки й насіння (III і IV групи) у сорту Сонячний, а ДГ-9 показав досить високу дієвість для індукції мутацій квітки та насіння у сорту Айсберг.

Вдалою виявилася модифікація ДМС додатковою групою диметиламіноссульфолану (мутаген ДГ-2), що призвело до статистично значимого підвищення частоти мутацій квітки й на-

сіння та мутацій за фізіологічними ознаками росту й розвитку у обох вивчених сортів.

Найнижчою активністю характеризувався новий мутаген ДГ-6, де пройшла заміна метильних груп на етильні. Цей мутаген продемонстрував доцільність застосування лише для отримання мутацій окремих груп (наприклад, хлорофільних, забарвлення насіння чи структури стебла і листків), причому показавши високу генотипоспецифічність, оскільки викликав зміни лише у одного сорту, – сорту Сонячний. Крім того, як видно з рис. 2, дану модифікацію варто використовувати лише у низьких концентраціях, так як збільшення концентрації від 0,05 до 0,5 % викликало майже повну загибель експериментальних рослин в поколінні  $M_1$ . Схожі закономірності в ефективності дії мутагену в залежності від присутності у молекулі етильних чи метильних груп були виявлені у *Solanum melongena* L., де диметилсульфат демонстрував як більш високу загальну ефективність, так і підвищену здатність інгібувати проростання насіння та викликати стерильність пилку (Shahab et al, 2018).

В наших дослідженнях показано також значний вплив генотипу використаних зразків на спектр виявлених мутацій. Незалежно від зміни хімічної будови мутагену, мутації, які вони індукували, певною мірою залежали від генетичної основи досліджуваного сорту.

Щодо впливу нових хімічних мутагенів на зміни біохімічного складу олії насіння, то варто зазначити, що вивчені мутагенні сполуки викликали суттєві порушення у співвідношенні вмісту основних жирних кислот – стеаринової, пальмітинової, олеїнової, лінолевої та ліноленої. Як показано нами у попередніх публікаціях (Tigova, Soroka, 2018; Tigova, Soroka, 2019) їхня кількість варіювала як у сторону збільшення, так і у сторону зменшення, що дає можливість добирати мутанти найрізноманітнішого напрямку використання. Наприклад, обидва комплекси ДМС з N-оксидом метилпіридину (ДГ-7 та ДГ-9) стимулювали появу мутантів з найвищим та найнижчим рівнями ліноленої кислоти (від 63,02 до 3,06 %). Відносно олійності насіння, то найширшим діапазоном змін характеризувався новий мутаген ДГ-9 (комплекс N-оксиду 2-метилпіридину з диметилсульфатом), оскільки



саме нащадки рослин, насіння яких обробляли розчином даного мутагену показували найбільш суттєві варіації вказаного показника, — як у сторону збільшення (до 48,88 %), так і у сторону зменшення (до 37,89 %). Інші мутагени серії ДГ теж виявляли активність у даному плані, хоча спектр досліджених мутацій був вузьким.

Таким чином, хімічна модифікація ДМС суттєво змінює мутагенні властивості вихідної речовини, що виявляється у появі спадкових змін різної спрямованості — морфологічних, фізіологічних і, як встановлено нами раніше, біохімічних. Типи мутацій і їх частота залежать від виду модифікації та використовуюваного генотипу, проте всі сполуки демонструють підвищену активність в порівнянні з ДМС. Це дає можливість застосовувати похідні серії ДГ для керованого впливу на мутаційний процес рослин, зокрема льону олійного. Як доведено нашими дослідженнями, нові хімічні мутагени викликали у льону олійного широкий спектр генетичних змін, який залежав від виду і концентрації мутагену та включав мутації наступних типів: хлорофіл-дефіцитні, структури стебла, пагонів і листків; забарвлення пелюсток віночка і пиляків; форми і розміру квітки; забарвлення насіння; фізіологічні ознаки росту і розвитку; біохімічні показники.

Встановлено, що модифікація вихідного мутагену ДМС у вигляді поєднання з метильованим N-оксидом піридину є ефективною для отримання високої частоти мутацій з порушенням синтезу хлорофілу. Виявлено, що мутаген ДГ-2 (комплекс ДМС з 3-N,N диметиламіноссульфоланом) характеризується найвищою мутагенною дією порівняно з іншими похідними ДМС. Встановлено, що з усіх вивчених хімічних модифікацій ДМС заміна метильних груп на етильні у похідному ДГ-6 найменшим чином змінює загальну мутагенну активність даної речовини, однак призводить до підвищення активності нового мутагену порівняно з вихідною сполукою, в плані суттєвого збільшення частоти хлорофільних мутацій і мутацій забарвлення насіння, хоча дія модифікованого мутагену залежить від генотипу. Також встановлено, що всі вивчені похідні ДМС викликали меншу частоту генетичних

змін в порівнянні з класичним мутагеном ЕМС, однак нові мутагени відрізнялися за спектром індукованих мутацій. Відповідно показано, що нові мутагени серії ДГ викликали генетичні зміни певної спрямованості. Так, найбільш ефективним для отримання мутацій з порушенням синтезу хлорофілу виявився мутаген ДГ-9, для індукції мутацій вегетативних органів — мутаген ДГ-7 (для сорту Айсберг) і ДГ-6 (для сорту Сонячний), мутацій забарвлення пелюсток віночка і пиляків, мутацій забарвлення насіння, мутацій за фізіологічними ознаками росту і розвитку — мутаген ДГ-2.

*Автори виносять подяку співробітнику кафедри фізико-колоїдної хімії Запорізького державного медичного університету, кандидату фармацевтичних наук, доценту Варинському Б.О. за допомогу в проведенні дослідження з підтвердження будови мутагенів ДГ-2, ДГ-6, ДГ-7, ДГ-9.*

**Дотримання етичних стандартів.** Ця робота виконана з дотриманням етичних вимог кожним із авторів та не передбачає досліджень, у які залучено тварин або людей.

**Конфлікт інтересів.** Автори задекларували відсутність конфлікту інтересів і фінансових зобов'язань.

**Фінансування.** Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансуючих установ в державному, комерційному або некомерційному секторах.

#### DIRECTION OF GENETIC CHANGES UNDER THE INFLUENCE OF NEW DIMETHYL SULFATE DERIVATIVES IN OIL FLAX

*A.V. Tigova, A.I. Soroka, P.G. Dulnev*

Institute of Oilseed Crops of the NAAS of Ukraine  
1, Instytutska Str., Soniachne village, Zaporizhzhia  
District, Zaporizhzhia Region, 69055, Ukraine

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry  
of the NAS of Ukraine,

1, Murmanska Str., Kyiv-94, 02094, Ukraine

E-mail: anna.tigova@gmail.com

Two varieties of oil flax (Iceberg and Soniachny) were used to study the specificities of genetic variability under the influence of new chemical mutants, derivatives of dimethyl sulfate (DMS), in particular, the complex of 3-N,N dimethylaminosulfolane with dimethyl sulfate, diethylsulfate, the complex of N-oxide 2,6-dimethylpyridine with dimethylsulfate and the com-

plex of N-oxide 2-methylpyridine with dimethylsulfate. The seeds of the abovementioned varieties were treated with aqueous solutions of mutagens in the concentration of 0.5 and 0.05 % and in the subsequent generations, the frequency and spectrum of induced mutational variability were estimated in comparison with those for classic mutagens DMS and EMS (ethyl methanesulfonate). It was demonstrated that chemical modification of the initial compound changed the activity of its new derivatives considerably, which was manifested in the direction of genetic changes. New mutagens were characterized with much higher frequency of induced mutations as compared with DMS and demonstrated lower lethality in the estimation of plant survival in the generation  $M_1$ . The highest mutagenic effect, as compared with other derivatives, was shown by the complex of DMS and 3-N,N dimethylaminosulfolane. The spectrum of hereditary changes, induced by new mutagens, differed from the spectra of both DMS and EMS in all the groups of the investigated mutations, which allows recommending these compounds for the induction of changes of various directions. Certainly, as compared with EMS, the frequency of mutations, induced by new mutagens, was lower except for the mutation of the flower and color of the seeds. It was shown that among the new mutagens, the complex of N-oxide 2-methylpyridine and dimethyl sulfate was the most efficient to obtain mutations with impaired chlorophyll synthesis, the complex of N-oxide 2,6-dimethylpyridine and dimethyl sulfate for Iceberg variety and diethylsulfate for Soniachny variety – to induce mutations of vegetative organs, the complex of 3-N,N dimethylaminosulfolane and dimethylsulfate – to induce the mutations in the color of corolla petals and anthers, the color of seeds, mutations by physiological features of growth and development. We discuss the possibility of obtaining original mutants with increased content of oil and its changed fatty acid composition using the abovementioned compounds. The regularities observed can help in deeper understanding the influence of the specificities of the chemical structure of new DMS derivatives on their potential mutagenic properties and in targeted application of these compounds to induce mutations of a specific direction.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Ambreen A, Myk A, Hissamuddin A. (2011) Cytological effect of ethyl methane sulphonate and sodium azide in (*Linum usitatissimum* L.). Int J Plant Animal Environm Sci 2:70–75
- Bianu M, Marki A, Ochescu C. (1972) The flexuous stem – a new gene in *Linum usitatissimum* induced by the alkylating agents. Botanique 25:171–175
- Bretagne-Sagnar B, Fouilloux G, Chupeau Y. (1995) Induced albino mutations as a tool for genetic analysis and cell biology in flax (*Linum usitatissimum*). J Exp Bot 47:189–194
- Deepthi T, Remesh K. (2016) Impact of EMS induction on morphological, anatomical and physiological traits of Bhindi *Abelmoschus esculentus* (L.). Moench Int J Recent ResLife Sci (IJRRLS) 3:4–11
- Jankowicz-Cieslak J, Mba C, Till J. (2017) Mutagenesis for crop breeding and functional genomics. Biotechnol Plant Mutat Breed doi: 10.1007/978-3-319-45021-6\_1.
- Jacob M. (1970) Comparison of mutagenic effect of alkylating agents and gamma rays in *Arabidopsis thaliana*. Rad Bot 9:251–268
- Kolar F, Ghatge S, Nimbalkar M, Dixit G. (2015) Mutational changes in *Delphinium malabaricum* (Huth.) Munz. A potential ornamental plant. J Horticult Res 23(2):5–15. doi: 10.2478/johr-2015-0012
- Kupyanskaya N. (1983) Effect of chemical mutagens on economically valuable traits of tetraploid flax. Chemical mutagenesis and quality of agricultural products. Moscow: Nauka 145–149.
- Lawley P, Jarman M. (1972) Alkylation by propylene oxide of deoxyribonucleic acid, adenine, guanosine and deoxyguanylic acid. Biochem J 126(4):893–900. doi: 10.1042/bj1260893.
- Lawley P, Orr D, Jarman M. (1975) Isolation and identification of products from alkylation of nucleic acids: ethyl- and isopropyl-purines. Biochem J 145: 73–84. doi: 10.1042/bj1450073
- Levan A. (1944) Experimentally induced chlorophyll mutants in flax. Hereditas, 30(1, 2):225–230.
- Luan Y et al. (2007) Mutation induced by ethylmethanesulphonate (EMS), *in vitro* screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). Plant Cell Tiss Organ Cult. 88(1):77–81. doi: 10.1007/s11240-006-9183-2
- Lyakh V. (2013) Genetics of flower color in *Linum grandiflorum* Desf. Indian J Genet Plant Breed 73(3):335–337. doi: 10.5958/j.0975-6906.73.3.051
- Lyakh V, Soroka A. (2008) Botanical and cytogenetic characteristics of species of the genus *Linum* L. and biotechnological ways of working with them. Zaporozhye: ZNU, 182 p.
- Mahla H et al. (2010) Study on EMS and gamma mutagenesis of clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.). Plant Mutat Rept 2(2):28–32.
- Raina A, Laskar R, Khursheed S, Amin R, Tantray Y, Parveen K, Khan S. (2016) Role of mutation breeding in crop improvement – Past, present and future. Asian Res J Agricult 2(2):1–13. doi: 10.9734/ARJA/2016/29334
- Rajarajan D et al. (2014) Fixation of lethal dose and effect of ethyl methane sulphonate induced mutagenesis in rice Adt (R) 47. Life Sci Leaflets 57:65–72.

- Penna S, Jain M. (2017) Mutant resources and mutagenomics in crop plants. *Emirates J Food Agricult* 29(9):651–657. doi: 10.9755/ejfa.2017.v29.i9.86
- Shahab D, Gulfishan M, Khan AA, Vágvölgyi C, Ansar MYK. (2018) Comparative mutagenic effectiveness and efficiency of physical and chemical mutagens in *Solanum melongena* L. variety Pusa Uttam *Biomed J Sci Tech Res* doi: 10.26717/BJSTR.2018.07.001541
- Talebi A et al. (2012) Ethyl methane sulphonate (EMS) induced mutagenesis in Malaysian rice (cv.MR219) for lethal dose determination. *Am J Plant Sci* 3:1661–1665. doi: 10.4236/ajps.2012.312202
- Tejklova E. (2002) Curly Stem – an induced mutation in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Czech J Genetics Plant Breed* 38(3–4):125–128. doi: 10.17221/6246-CJGPB
- Tigova AV, Soroka AI. (2018) Variation of fatty acid composition in seed oil in the collection of induced oil flax (*Linum humile* Mill.) mutants. *Vavilov J Genetics Breed* 22(7):800–811. doi: 10.18699/VJ18.424
- Tigova AV, Soroka AI. (2019) Using of new derivatives of dimethyl sulfate to obtain hereditary changes in oil flax. *Bull Agricult Sci* 4(793):52–59. doi: 10.31073/agrovisnyk201904-08
- Vasu D, Hasan Z. (2009) Effect of radiomimetic agents on two varieties of *Trigonella* with emphasis on plant height and pod numbers. *Biol Forum* 1(1):98–104.
- Vasu D, Hasan Z. (2011) Comparison of induced chlorophyll mutations and spectrum in two varieties of *Trigonella foenum-graecum* L. *J Phytol* 3(3):37–43.
- Winston W. (2018) Microsoft Excel 2019. Data Analysis and Business Modeling. Microsoft Press, 880 p.

Надійшла в редакцію 29.03.21  
Після доопрацювання 11.08.21  
Прийнята до друку 18.01.22