



УДК 582.998:58.084.5/.087(57.044/.063.7+576.08)

## Биоморфологические и цитогенетические изменения в *Calendula officinalis* L. после химического мутагенеза

Т. Е. Саматадзе<sup>1\*</sup>, О. Ю. Юркевич<sup>1</sup>, Ф. М. Хазиева<sup>2</sup>, А. И. Морозов<sup>2</sup>, С. А. Зошук<sup>1</sup>,  
Н. Л. Большева<sup>1</sup>, А. В. Амосова<sup>1</sup>, О. В. Муравенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, ул. Вавилова, 32, г. Москва, 119991, Россия.

\*E-mail: tsamatadze@gmail.com

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, ул. Грина, 7,  
г. Москва, 117216, Россия. E-mail: vilar.6@yandex.ru

\*автор для переписки

**Ключевые слова:** геном, календула лекарственная, кариотип, мейоз, мутагены, Ag-ЯОР-окрашивание, C/DAPI-дифференциальное окрашивание.

**Аннотация.** Проведено исследование по воздействию химических мутагенов ДМС (диметилсульфат) и ДЭС (диэтилсульфат) различной концентрации на сорта календулы (*Calendula officinalis* L.) ‘Райский сад’ и ‘Золотое море’ и дана оценка их биолого-морфологическим и цитогенетическим изменениям в поколениях  $M_1$  и  $M_2$ . Показано, что число растений с морфологическими изменениями после обработки мутагенами в  $M_1$  больше в процентном соотношении у ‘Золотого моря’ по сравнению с ‘Райским садом’. Выявлено, что мутагены оказали ингибирующее действие на всхожесть семян календулы, а также на выживаемость рассады в полевых условиях. Обнаружены достоверные различия по высоте растений, числу разветвлений и количеству листьев у сортов календулы при обработке мутагенами. Обработка мутагенами у сорта ‘Райский сад’ привела к увеличению числа соцветий, в отличие от ‘Золотого моря’ в  $M_1$  и  $M_2$  поколениях.

Анализ мейоза показал дозозависимое повышение частоты мультивалентов в МКП при повышении концентрации мутагенов. Кариотип сортов и мутантных форм состоит из 16 пар мелких хромосом размером 3,5–5,0 мкм. В кариотипах сортов и мутантных форм ноготков не выявлены хромосомные аномалии. Изучение рисунка Ag-ЯОР-окрашивания выявило наличие транскрипционно активных районов (Ag-положительных) в области вторичных перетяжек спутничных хромосом.

## Biological and cytogenetic variability induced by chemical mutagens in *Calendula officinalis* L.

T. E. Samatadze<sup>1</sup>, O. Yu. Yurkevich<sup>1</sup>, F. M. Hazieva<sup>2</sup>, A. I. Morosov<sup>2</sup>, S. A. Zoshchuk<sup>1</sup>,  
H. L. Bolsheva<sup>1</sup>, A. V. Amosova<sup>1</sup>, O. V. Muravenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 32, Vavilov St., Moscow, 119991, Russian Federation

<sup>2</sup> All-Russian Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Federal Agency for Scientific Organizations, 7, Green St.,  
Moscow, 117216, Russian Federation

**Keywords:** Ag-NOR staining, genome, karyotype, meiosis, mutagenesis, C/DAPI-banding.

**Summary.** The influence of chemical mutagens DMS (dimethyl sulphate) and DES (diethyl sulphate) in different concentrations on two cultivars of *Calendula officinalis* L. (cv. ‘Zolotoe more’ and ‘Rayskiy sad’) was studied. The

morphological, meiotic and cytological variability in their mutant lines (M1 and M2 generations) was estimated. More families (in percentage terms) with morphological changes were observed among M1 plants of cv. 'Zolotoe more' compared to cv. 'Rayskiy sad'. Between *Calendula* cultivars, significant differences in plant height, ramification degree and number of leaves were revealed after the DMS and DES treatment. In cv. 'Rayskiy sad', mutagenesis resulted in increase of number of inflorescences in M1 and M2 generations.

The analysis of meiosis indicated dose-dependent increase of polyvalent frequency in microsporocytes of mutant plants. The karyotype of the studied cultivars and mutant forms consists of 16 pairs of small-sized chromosomes (3.5–5.0  $\mu\text{m}$ ). In the studied *C. officinalis* karyotypes, any chromosomal rearrangements were not detected. The Ag-NOR staining revealed transcriptionally active (Ag-positive) regions in the secondary constriction areas of the satellite chromosomes.

## Введение

Род *Calendula* L. (календула, ноготки) включает около 20–30 видов травянистых растений, распространенных преимущественно в Средиземноморье, Западной Европе, Передней Азии (Vasilchenko, 1961). Химический состав календулы изучен достаточно подробно. В цветках и траве присутствуют: флавоноиды, ксантофиллы и каротиноиды, эфирное масло, кумарины (скополетин) (Hiller, Melzig, 2010), водорастворимые полисахариды (14,75 %) (Haensel, Sticher, 2007). Выделенные из цветков календулы тритерпеновые гликозиды обладают мощным цитотоксическим эффектом против рака прямой кишки, лейкемии и меланомы (Ukiya et al., 2006). Показано, что конъюгированные жирные кислоты эффективны при лечении ожирения и обладают антиканцерогенными свойствами (Suzuki et al., 2001; Chardigny et al., 2003; Yasui et al., 2006; Cruceriu et al., 2018). Рутин, найденный в цветках ноготков, обладает антиоксидантной и противовоспалительной активностью, а также онкопротекторным действием (Bissa, Bohra, 2011; Khalid, Silva, 2012). Выявлено ингибирование экстрактом календулы (70–100 %) пролиферации различных типов опухолевых клеток человека и мышинных клеточных опухолевых линий (Jiménez-Medina et al., 2006; Sak et al., 2017). Благодаря своим антигенотоксическим/защитным, а также противоопухолевым и антималярийным эффектам, доказанным на моделях животных, *C. officinalis* может иметь важные будущие последствия в разработке новых стратегий лечения рака, уже сейчас календула используется для уменьшения побочных эффектов при лучевой терапии (Cruceriu et al., 2018).

Известно, что химический мутагенез – это простой подход, используемый для создания мутаций в хозяйственно ценных растениях для улучшения их агрономических параметров (Roychowdhury, Tah, 2011; El-Nashar, Asrar, 2016). На основе этого метода возможно получе-

ние искусственно-мутантных форм, являющихся ценным исходным материалом для селекции (Rapoport, 1993; Singh, Singh, 2001; Shu et al., 2012; Bhat, Wani, 2017). Показано, что с помощью ионизирующего излучения и химических мутагенов возможно устранить отдельные недостатки у сортов и создавать формы растений с хозяйственно ценными признаками (скороспелые, с повышенным содержанием эфирного масла, неполегающие формы, карликовые формы и т. д.) (Cvejić et al., 2011; Roychowdhury et al., 2012; Khaziyeva et al., 2014; El-Nashar, Asrar, 2016; Bhat, Wani, 2017). Исследования по экспериментальному мутагенезу направлены на изучение влияния химических веществ с целью увеличения генетической изменчивости организма и способствующие их адаптивности с целью получения генетически полиморфного растительного материала, что является достаточно актуальным и перспективным для целей селекции (Roychowdhury, Tah, 2011; Oladosu et al., 2016). В некоторых случаях возникновение мутаций может являться ценной стратегией размножения растений, а также может быть единственным продуктивным способом вызвать высокую частоту и широкий спектр изменчивости у растений при создании новых сортов (Predieri, 2000; Ahloowalia, Maluszynski, 2001; Bhat, Wani, 2017).

Как правило, более высокие концентрации мутагена приводят к большему биологическому ущербу в виде снижения всхожести семян, угнетения роста рассады, стерильности пыльцы и снижения выживаемости растений в зрелом возрасте, что можно считать показателем мутагенных эффектов (Rapoport, 1993; Chopra, 2005). Для уменьшения негативного воздействия на параметры растений требуются дополнительные знания о влиянии времени воздействия и концентрации мутагена (Khan et al., 2009). Кроме того, чтобы понять, как мутагены действуют на геном растений, необходимо привлечение современных методов хромосомного анализа (Muravenko, Zelenin, 2009). Современные ме-

тоды хромосомного анализа помогают выявить особенности хромосомной организации генома видов растений, провести идентификацию хромосомом, а также анализ их функциональной активности (Badaeva, Salina, 2013). В настоящее время хромосомный анализ является единственным надежным способом выявления и идентификации хромосомных aberrаций у растений, в том числе и после воздействия на генетический аппарат клетки химическими мутагенами. Для их детекции используют анализ мейотической конъюгации хромосом в материнских клетках пыльцы, а также кариогеномный анализ митотических хромосом с использованием различных методов дифференциального окрашивания.

Целью нашей работы было выявить особенности действия химических мутагенов ДМС (диметилсульфат) и ДЭС (диэтилсульфат) в зависимости от их концентрации при обработке семян сортов *C. officinalis* ‘Золотое море’ и ‘Райский сад’ на различные биоморфологические, цитогенетические и кариогеномные изменения растений в поколениях  $M_1$  и  $M_2$ .

#### Материалы и методы

Материалом для исследования послужили молодые соцветия и корневая меристема ноготков ‘Золотое море’ (К-36829) и ‘Райский сад’ (К-36837) и их мутантные формы, выращенные в Ботаническом саду Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР, г. Москва) в 2014–2015 гг. Семена замачивали в растворах мутагенов: ДМС (диметилсульфат) – 0,04 и 0,08 % и ДЭС (диэтилсульфат) – 0,025 и 0,05 %, экспозиция 18 часов. Контроль – семена, замоченные в воде. После обработки семена промывали в чистой воде и высевали в теплице для получения рассады, которую после образования 4–5 настоящих листьев высаживали в поле по схеме 60 × 30 см. Питомник растений  $M_2$  заложен семенами, полученными с индивидуальных растений в  $M_1$ .

Частоту мутаций в  $M_1$  определяли как число семей с мутациями на число исследованных растений. В  $M_1$  учитывали показатели всхожести семян, а также выживаемость рассады в полевых условиях, после воздействия мутагенов. Для определения лабораторной всхожести семян, обработанных мутагенами, их проращивали в чашках Петри по 100 штук в четырехкратной повторности при температуре +20... +25 °С в течение 12 суток. В  $M_2$  анализировали изменения, которые были отнесены к различным группам: высота растений, число разветвлений, количе-

ство листьев, число соцветий на растении, которые учитывали в конце вегетации. В  $M_1$  и  $M_2$  по мере распускания цветков определяли морфологические изменения соцветий.

При оценке изучаемых доз мутагенов руководствовались указаниями, изложенными в методике по использованию мутагенных факторов в селекции садовых культур (Dryagina et al., 1979). Для статистической интерпретации экспериментальных данных по влиянию химических мутагенов по исследуемым характеристикам использовались стандартные функции Microsoft Excel.

Предобработку корневых меристем интеркалятором ДНК – 9 аминокридином, приготовление хромосомных препаратов проводили согласно описанным ранее методикам (Muravenko, Zelenin, 2009). Анализ мейоза, Ag-ЯОР-окрашивание проводили по описанным ранее методикам (Samatadze et al., 2005; Muravenko et al., 2009; Samatadze et al., 2018a). Просмотр препаратов, отбор метафазных пластинок и их анализ проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Olimpus BX61, снабженного черной ПЗС (прибор с зарядовой связью) камерой CoolSnap (RoperScientificInc., США). Полученные изображения обрабатывали, используя программы хромосомного анализа, согласно технологии, принятой в лаборатории (Muravenko, Zelenin, 2009).

#### Результаты

Среди морфологических изменений, возникших после обработки мутагенами в  $M_1$  и  $M_2$  поколениях, выявлены: карликовость растений, различные изменения в соцветиях, такие как наличие нескольких корзинок на одном соцветии, (многоморфность) соцветий и их фасциация, появление махровых форм с увеличенным диаметром соцветия и др. Выявлено, что число растений с морфологическими изменениями больше в процентном соотношении у ‘Золотого моря’ по сравнению с ‘Райским садом’.

Установлено, что химические мутагены оказали ингибирующее действие на всхожесть семян календулы лекарственной, а также на выживаемость рассады в полевых условиях (табл. 1). Наиболее угнетающее влияние на лабораторную всхожесть семян ‘Золотого моря’ оказывают мутагены ДМС в концентрации 0,08 % и ДЭС в дозе 0,05 %, тогда как у ‘Райского сада’ наиболее угнетающее действие отмечается при более низких концентрациях данных мутагенов (табл. 1).

Таблица 1

Влияние химических мутагенов на всхожесть семян и выживаемость рассады в  $M_1$  поколении у календулы лекарственной (среднее за 2014–2015 гг.)

| Варианты опыта    | Лабораторная всхожесть |            | Выживаемость рассады в полевых условиях |            |
|-------------------|------------------------|------------|---|------------|
|                   | %                      | к контролю | %                                       | к контролю |
| 'Золотое море', К | 80                     | 100        | 80                                      | 100        |
| ДМС 0,04          | 45                     | 56         | 61                                      | 76         |
| ДМС-0,08          | 21                     | 26         | 76                                      | 95         |
| ДЭС-0,025         | 50                     | 62         | 78                                      | 104        |
| ДЭС-0,05          | 32                     | 40         | 45                                      | 60         |
| 'Райский сад', К  | 87                     | 100        | 82                                      | 100        |
| ДМС 0,04          | 34                     | 39         | 64                                      | 78         |
| ДМС-0,08          | 44                     | 51         | 83                                      | 101        |
| ДЭС-0,025         | 43                     | 49         | 58                                      | 70,7       |
| ДЭС-0,05          | 52                     | 60         | 46                                      | 56,1       |

Выживаемость рассады в полевых условиях у обоих сортов превышала лабораторную всхожесть. Снижение выживаемости рассады отмечается у обоих сортов при обработке ДМС в дозе 0,04 % и ДЭС в дозе 0,05 %. У 'Золотого моря' было отмечено стимулирующее действие при обработке ДЭС в дозе 0,025, а у 'Райского сада' – при ДМС 0,08 %.

Для оценки влияния различных концентраций мутагенов на растения ноготков лекарствен-

ных в течение вегетационного периода были проведены следующие биометрические наблюдения: высота растений, число разветвлений, количество листьев и число соцветий на растении.

Обнаружены различия по высоте растений сортов календулы при обработке мутагенами (табл. 2). Растения 'Золотое море' при обработке ДМС 0,08 и ДЭС 0,025 % отмечались наименьшей высотой в  $M_1$ . У 'Райского сада' в  $M_1$  высота растений была на уровне контроля ДЭС 0,05 %.

Таблица 2

Влияние химических мутагенов на морфологические изменения в  $M_1$  и  $M_2$  поколении у календулы лекарственной

| Мутагены, концентрация | Высота растений, см |       | Число разветвлений, шт. |       | Количество листьев на растении, шт. |       | Число соцветий на растении, шт. |       |
|------------------------|---------------------|-------|-------------------------|-------|-------------------------------------|-------|---------------------------------|-------|
|                        | $M_1$               | $M_2$ | $M_1$                   | $M_2$ | $M_1$                               | $M_2$ | $M_1$                           | $M_2$ |
| 'Золотое море'         |                     |       |                         |       |                                     |       |                                 |       |
| К                      | 55,2                | 55,5  | 6,38                    | 6,16  | 29,1                                | 30,8  | 11,0                            | 10,1  |
| ДМС 0,04               | 56,2                | 55,0  | 7,44*                   | 7,53* | 29,1                                | 32,9  | 14,8*                           | 15,6* |
| ДМС 0,08               | 47,8*               | 49,8* | 5,83                    | 5,17* | 22,2*                               | 25,5* | 10,2                            | 11,4  |
| ДЭС 0,025              | 48,8*               | 47,8* | 5,21*                   | 5,60  | 27,5                                | 28,9  | 15,0*                           | 16,3* |
| ДЭС 0,05               | 50,4*               | 50,6* | 5,01*                   | 6,65  | 23,8*                               | 24,5* | 14,6*                           | 14,9* |
| 'Райский сад'          |                     |       |                         |       |                                     |       |                                 |       |
| К                      | 57,1                | 56,3  | 6,64                    | 6,49  | 28,2                                | 27,9  | 11,3                            | 10,8  |
| ДМС 0,04               | 55,5                | 56,6  | 7,82*                   | 8,51* | 32,5*                               | 30,4* | 16,3*                           | 15,5* |
| ДМС 0,08               | 57,9                | 59,6  | 6,44                    | 7,06  | 25,8*                               | 31,7* | 12,6                            | 16,8* |
| ДЭС 0,025              | 57,6                | 59,1  | 6,71                    | 6,79  | 20,9*                               | 22,3* | 14,6*                           | 15,5* |
| ДЭС 0,05               | 62,1                | 63,8  | 6,23                    | 6,86  | 28,6                                | 29,2  | 17,5*                           | 18,4* |

Примеч.: \* – различия достоверны при  $P \leq 0.05$ .

Химические мутагены и их доза обработки не оказали существенного влияния на число разветвлений в  $M_1$ -поколении на сорта календулы лекарственной; в  $M_2$  наблюдаем различия в сторону стимуляции у 'Райского сада' при обработ-

ке мутагеном ДМС. Наибольшее количество ветвлений на растении наблюдалось у обоих сортов при обработке ДМС в дозе 0,04 %.

На среднее количество листьев на одном растении 'Золотое море' в  $M_1$  оказали влияние му-



тагены в высоких концентрациях ДМС (0,08) и ДЭС (0,05), у ‘Райского сада’ наблюдалось уменьшение данного показателя при обработке ДЭС в дозе 0,025 как в  $M_1$ , так и  $M_2$ . Среднее число соцветий на растении у ‘Райского сада’ превышает ‘Золотое море’.

Обработка мутагенами у ‘Райского сада’ привела к увеличению числа соцветий, в отличие от ‘Золотого моря’ (табл. 2). Обработка ДЭС 0,05 у ‘Райского сада’ стимулировала этот показатель, являющийся одним из основных при отборе календулы.

Анализ мейоза показал, что все изучаемые формы ноготков в метафазе I содержали 16 бивалентов ( $16^{II}$ ) (рис. 1а). Наряду с нормальным течением мейоза, в метафазе I (M-I) были обнаружены различные хромосомные ассоциации: триваленты, квадрилваленты, а также были выявлены хромосомы, которые находились за пределами метафазной пластинки, сбоку от нее или у полюсов микроспороцита (рис. 1б, в). В анафазе I (A-I) и анафазе II (A-II) у всех форм ноготков

в основном встречались клетки как с нормальным расхождением хромосом к полюсам (16:16), так и клетки с нарушениями (отставание хромосом, хаотическое расхождение хромосом, мосты, фрагменты хромосом и т. д.) (рис. 1г, д, е). Процент микроспороцитов с нарушениями в M-I и A-I у растений ‘Золотое море’, обработанных ДЭС, был несколько выше (2,5 %), чем у растений ‘Райский сад’, обработанных ДМС.

Доминирующими aberrациями в телофазе I (T-I) и телофазе II (T-II) были нарушения полярности, наличие микроядер и цитомиксис. На стадии T-II обнаружены клетки с разным числом ядер, клетки с микроядрами, образовавшимися в результате ошибок при распределении хромосом между дочерними ядрами на предыдущих стадиях мейоза. Выявлены нарушения на стадии образования тетрад (формирование пентад, гексад, наличие одного или двух микроядер в одной из микроспор тетрады), а также клетки с линейными тетрадами (рис. 1ж, з).

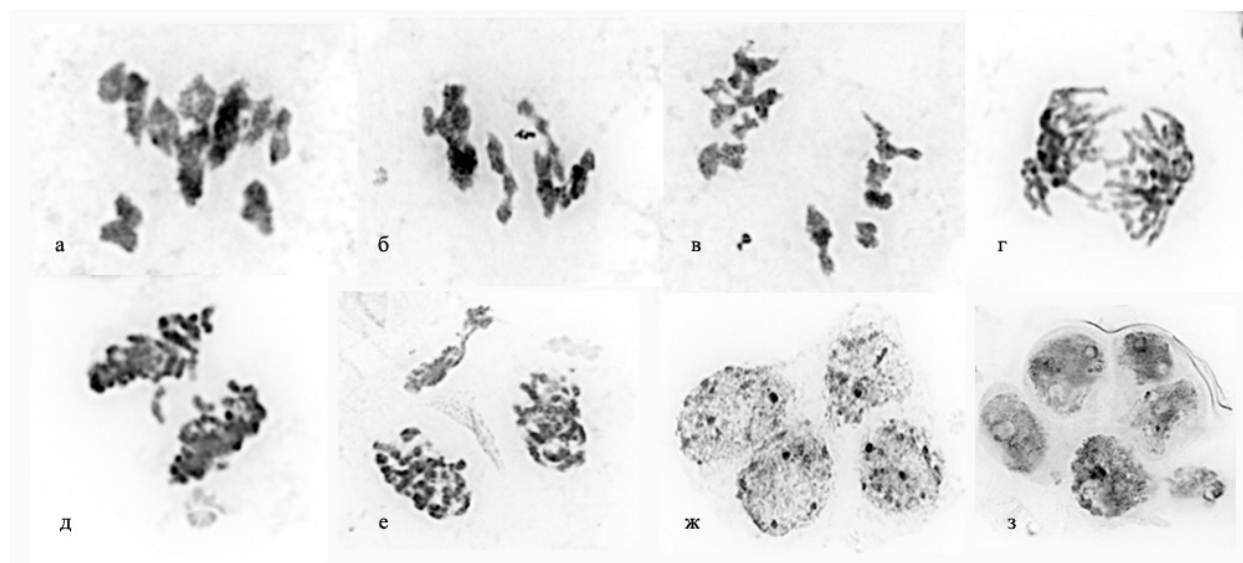


Рис. 1. Мейотическое деление и формирование пыльцевых зерен у календулы лекарственной: а – метафаза I ( $16^{II}$ ); б – поливалентные ассоциации в метафазе I; в – хаотическое расхождение хромосом в анафазе I; г – образование мостов в анафазе I; д – отстающие хромосомы в анафазе I; е – слипание (нерасхождение) групп хромосом в анафазе II; ж – тетрада с микроядрами; з – гексада.

Использование интеркалятора ДНК 9-аминоакридина позволило увеличить размеры хромосом в исследуемых кариотипах календулы, а также уточнить морфологию хромосом. Морфометрический анализ хромосом ноготков лекарственных показал, что в кариотипе сортов и мутантных форм календулы 16 пар мелких хромосом размером 3,5–5,0 мкм. Кариотип представлен в основном субметацентрическими хро-

мосомами и характеризуется наличием двух пар спутничных хромосом (1 и 9) у всех изученных сортов и мутантных форм ( $K = 2(4m + 10sm + 2sm^{st})$ ). Спутничные хромосомы имели вторичную перетяжку в прицентромерном районе и сходный рисунок C/DAPI-окраски. Крупные гетерохроматические блоки расположены в прицентромерных районах хромосом, а средние и небольшие C/DAPI-бэнды – преимущественно в

теломерных и интеркалярных районах (рис. 2). В кариотипах всех изучаемых сортов и мутантных форм ноготков не выявлены хромосомные аномалии.

Изучение рисунка Ag-ЯОР-окрашивания у всех изучаемых сортов и мутантных форм ноготков лекарственных выявило наличие Ag-

положительных районов в области вторичных перетяжек на спутничных хромосомах 1 и 9 (рис. 3). На хромосоме 1 всегда наблюдался более крупный Ag-ЯОР. В интерфазных ядрах и у сортов, и у мутантных форм ноготков при этом наблюдалось от одного до четырех Ag-окрашенных ядрышек.

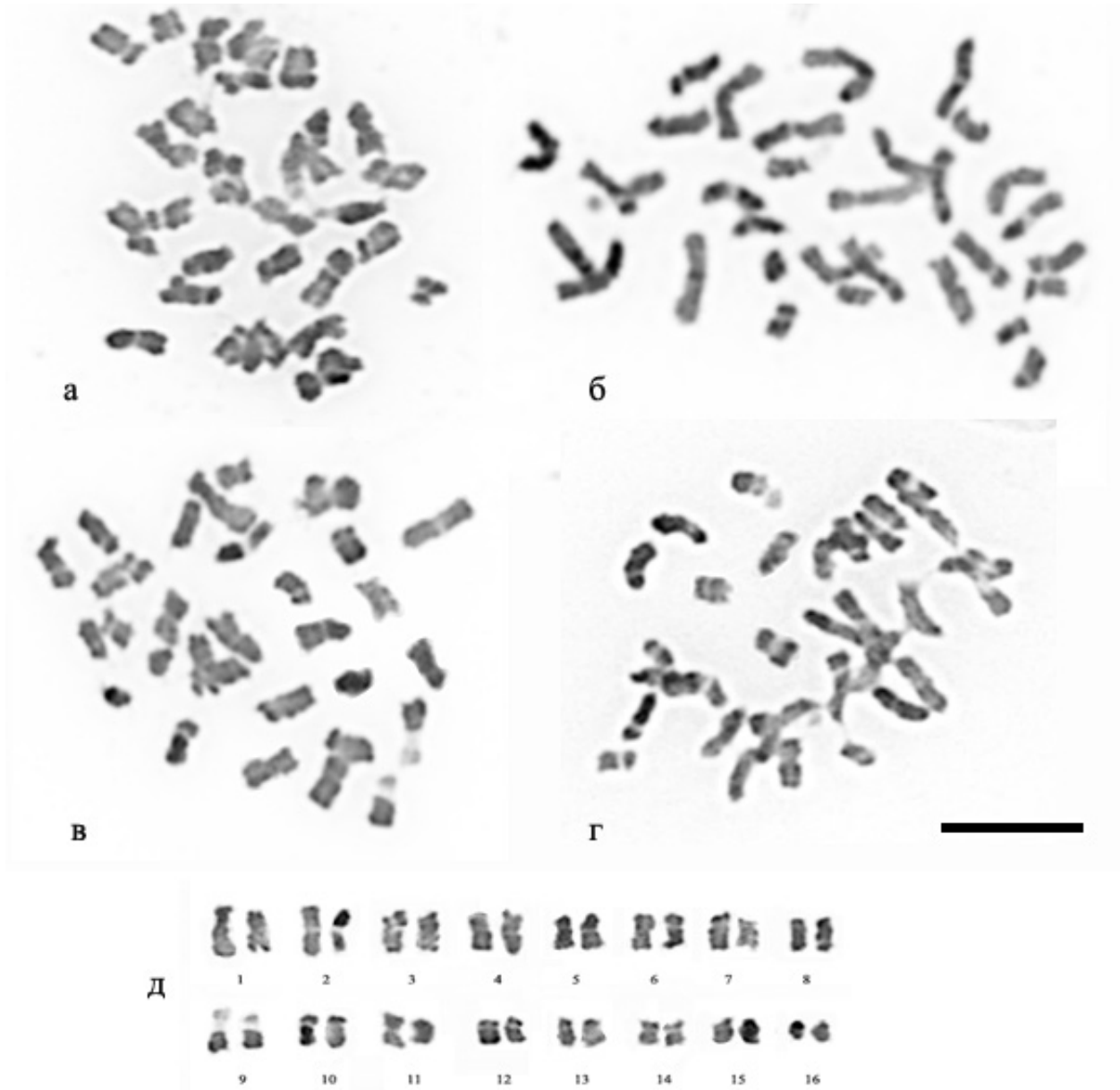


Рис. 2. С/DAPI-(инвертированное) дифференциальное окрашивание метафазных хромосом календулы лекарственной (32) сортов и мутационных форм: а – 'Золотое море'; б – 'Райский сад'; в –  $M_1$  'Золотое море'; г –  $M_2$  'Райский сад'; д – кариотип  $M_1$  'Золотое море'. Масштаб – 5 мкм.

### Обсуждение

Известно, что более высокие концентрации мутагена приводят к большему биологическому угнетению вида, которое может выражаться в задержке прорастания семян и роста сеянцев

растений, а также их возможной гибели, стерильности цветков, снижением выживаемости растений в процессе онтогенеза (Gaul, 1964). В нашем случае обработка мутагенами также вызвала ингибирующее действие на всхожесть семян календулы, а также на выживаемость расса-

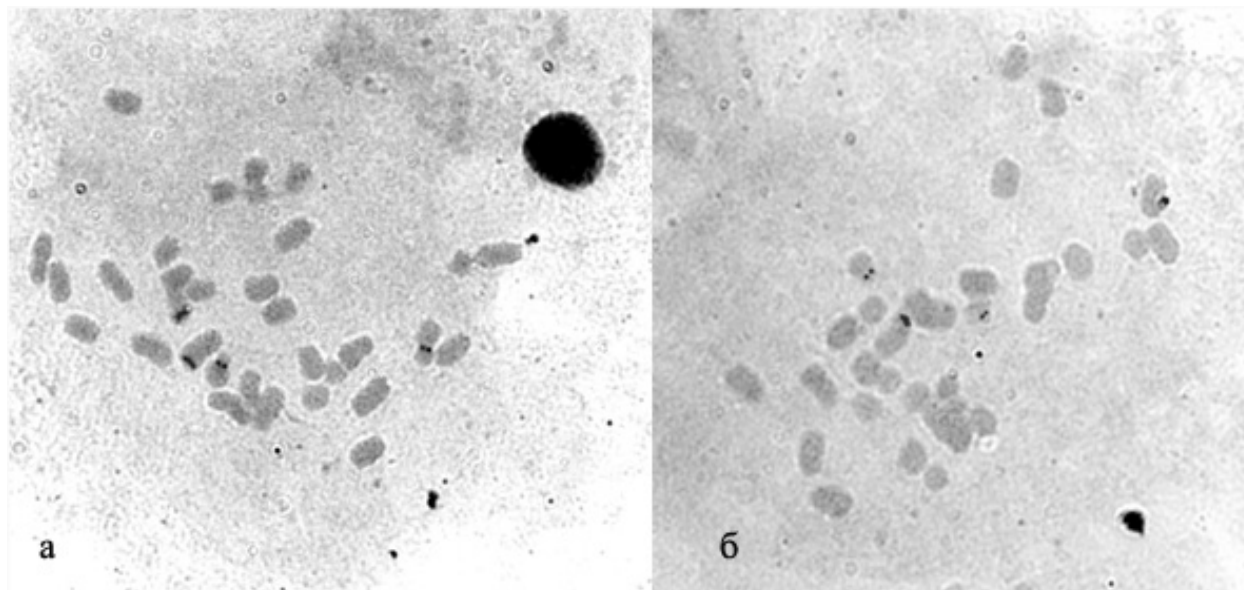


Рис. 3. Метафазные пластинки Ag-YOP-окрашенных хромосом календулы лекарственной ( $2n = 32$ ) 'Золотое море' (а) и 'Райский сад' (б).

ды в полевых условиях для обоих сортов, с различной реакцией сортов на эти показатели (табл. 1). Наиболее угнетающее влияние на лабораторную всхожесть семян 'Золотое море' оказывают мутагены ДМС в концентрации 0,08 % и ДЭС в дозе 0,05 %, тогда как у 'Райского сада' наиболее угнетающее действие отмечается при более низких концентрациях данных мутагенов: ДМС 0,04 % и ДЭС 0,025 %. Аналогичные результаты получены и для других видов растений, когда увеличение концентрации мутагенов приводит к уменьшению всхожести семян и выживаемости растений (Khan et al., 2009; Oladosu et al., 2016). Такие изменения могут быть обусловлены не только воздействием мутагенов, но и воздействием окружающей среды, наличием влаги в семени, а также концентрации самих мутагенов (Abd El-Maksoud, El-Mahrouk, 1992). У 'Золотого моря' низкая концентрация мутагена ДЭС (0,025) стимулировала всхожесть семян (табл. 1). Стимулирующее действие низких и промежуточных концентраций мутагенов может быть связано с ферментативной активацией при пробуждении начала деления меристемных клеток. Нарушение образования ферментов, участвующих в процессе прорастания, в частности при больших дозах мутагенов, приводит к уменьшению всхожести семян. Наши результаты согласуются с предыдущими исследованиями, где было показано стимулирующее действие мутагенов на всхожесть семян *Tagetes* (Badr et al., 2000), *Amaranthus* (El-Nashar, Asrar, 2006), *Calendula* (El-Nashar, Asrar, 2016) после воздействия раз-

личных мутагенов.

Снижение выживаемости рассады до критического уровня отмечается у обоих сортов при обработке ДМС 0,04 % и ДЭС 0,05 %. Малая же концентрация мутагена ДЭС 0,025 так же, как и высокая концентрация ДМС 0,08, стимулировала выживаемость рассады по отношению к контролю у сортов календулы 'Золотое море' и 'Райский сад' соответственно (табл. 1).

Признак высоты растений привлекает особое внимание исследователей в связи с селекцией на ограничение ростовых процессов в узловых меристемах стебля. Поэтому определенный интерес представляет изучение возможности использования химических мутагенов для получения короткостебельных форм. Одно из первых проявлений реакции растений на обработку семян мутагенами – изменение роста растений (Sinhamahapatra, Rakshit, 1990; El-Nashar, 2006, El-Nashar, Asrar, 2016). Низкая концентрация мутагена приводит к увеличению высоты растений. Такие результаты были получены на других видах цветковых растений, таких как *Salvia splendens* (Hussein et al., 1974), *Euonymus japonicus* (El-Torky, 1992) и *Amaranthus* (El-Nashar, 2006). В нашем эксперименте все обработки мутагенов оказали стимулирующее действие на высоту растений календулы, исключение составила обработка ДМС в дозе 0,04 % – высота растений оказалась на уровне контроля (табл. 2). Такая стимуляция роста растений обоих сортов календулы в  $M_2$  может говорить о том, что физиологические повреждения, вызванные

действием мутагенов и продуктов их гидролиза на клетки растений в предыдущем поколении  $M_1$ , нивелировались.

Физиологические эффекты от воздействия мутагенов и продуктов их гидролиза смогли также стать причиной стимуляции числа ветвей и листьев в каждом растении. Так, у 'Райского сада' в  $M_2$ -поколении обработка мутагеном ДМС стимулировала число разветвлений (табл. 2). Наибольшее количество ветвлений на растении наблюдалось у обоих сортов при обработке ДМС в дозе 0,04 %. На среднее количество листьев на одном растении в  $M_1$  оказали влияние мутагены в высоких концентрациях ДМС (0,08) и ДЭС (0,05) на растения 'Золотое море', у 'Райского сада' наблюдалось уменьшение данного показателя при обработке ДЭС в дозе 0,025 как в  $M_1$ , так и  $M_2$ . Среднее число соцветий на растении у 'Райского сада' превышает 'Золотое море' (табл. 2). Эти результаты согласуются с выводами Hussein et al. (1974) на *Salvia splendens* и El-Nashar (2006) на *Amaranthus*. Такая неодинаковая реакция сортов календулы лекарственной на мутагены различной концентрации может указывать на генотипические особенности исследуемого материала.

Показано, что многие химические мутагены поражают генетическую структуру организмов и могут вызвать нарушения в ходе протекания мейоза. В свою очередь, это может приводить к возникновению как типичных анафазных aberrаций (фрагменты, мосты, отставание хромосом), так и массовой фрагментации, нерасхождению, слипанию хромосом и другим нарушениям. Качество и количество мейотических aberrаций является надежным показателем определения сублетальных доз химических мутагенов, а также является эффективной системой мониторинга успешного селекционного процесса (Bhat, Wani, 2017).

Известно, что наличие открытых бивалентов не нарушает общего течения мейоза, но может указывать на ослабление конъюгации. Отсутствие конъюгации хромосом является причиной нарушений при прохождении последующих стадий мейоза. Отклонения от нормальной бивалентной конъюгации заключаются в образовании не только унивалентов, но и мультивалентов (Golubovskaya, 1975; Poddubnaja-Arnoldi, 1976). В нашем исследовании было установлено, что наряду с нормальным течением мейоза, в  $M-I$  были обнаружены хромосомные ассоциации: триваленты, квадриваленты, а также были выяв-

лены униваленты, которые находились за пределами метафазной пластинки, сбоку от нее или у полюсов микроспорочита. Появление поливалентных ассоциаций наблюдалось и у других видов растений после воздействия мутагенами (Zeerak, 1992; Bhat, Wani, 2017; etc.). Вероятно, мутагены индуцируют образование унивалентов посредством структурных изменений хромосом в результате ограничения спаривания между гомологичными хромосомами, и таким образом снижается частота хиазм (Zeerak, 1992).

Значительным нарушением мейоза на стадии анафазы является неравное расхождение хромосом к полюсам, что приводит к утрате отдельных хромосом и неравному распределению генетического материала. В  $A-I$  у всех форм ноготков в основном встречались клетки с нормальным расхождением хромосом к полюсам (16:16), хотя также были обнаружены клетки с нарушениями (отставание хромосом, хаотическое расхождение хромосом, мосты, фрагменты хромосом и т. д.) (рис. 3г, д, е).

В целом, проведенный анализ мейоза подтверждает данные биоморфологических показателей растений, обработанных мутагенами, и доказывает актуальность их использования в низких концентрациях. С увеличением дозы мутагенного воздействия увеличивается количество мутаций и резко снижается жизнеспособность растений, что в конечном итоге снижает вероятность регистрации истинного количества наследственных изменений.

В нашей работе морфометрический анализ хромосом сортов календулы лекарственной показал, что в их кариотипах содержится 16 пар мелких хромосом ( $2n = 32$ ) размером 3,5–5,0 мкм. Известно, что у мелкохромосомных видов растений гетерохроматин в основном локализуется в центромерных и реже в интеркалярных и теломерных районах хромосом (Muravenko et al., 2009; Yurkevich et al., 2013; Samatadze et al., 2018 b). Результаты C/DAPI-дифференциального окрашивания показали, что в геноме основное количество гетерохроматина содержится в прицентромерных и интеркалярных районах хромосом изучаемых сортов и мутантных форм календулы.

Механизмы C-бэндинга и окрашивания AT-специфичными флуорохромами, к которым принадлежит DAPI, различные. C-бэндинг выявляет районы структурного гетерохроматина, а DAPI – только AT-богатые районы, которые обычно расположены в гетерохроматических районах,



что и подтверждается сходством рисунков С- и DAPI-бэндинга хромосом (Guerra, 2000). Обогащенность гетерохроматина АТ-парами оснований характерна для многих видов растений (Muravenko et al., 2009; Yurkevich et al., 2013; Samatadze et al., 2018a, b).

Незначительный полиморфизм С/DAPI-бэндов был обнаружен на хромосомах обоих изученных сортов календулы. В их кариотипах была выявлена наибольшая вариабельность размеров у DAPI-бэндов, прилегающих к вторичной перетяжке и самой спутничной нити. Это обычно связывают с изменчивостью числа рибосомных генов и их различной функциональной активностью (Samatadze et al., 2005; Muravenko et al., 2009; Samatadze et al., 2018a).

В нашем исследовании было установлено наличие Ag-положительных районов в области вторичных перетяжек на спутничных хромосомах 1 и 9 у всех изучаемых сортов и мутантных форм календулы. Причем на хромосоме 1 всегда наблюдался более крупный Ag-ЯОР. В интерфазных ядрах и у сортов, и у мутантных форм ноготков при этом наблюдалось от одного до четырех Ag-окрашенных ядрышек. Поскольку ранее было показано, что размеры Ag-ЯОР коррелируют с функциональной активностью расположенных в этом районе рибосомных генов (Amosova et al., 1986; Samatadze et al., 2005), можно предположить большую функциональную активность Ag-ЯОР хромосомы 1 по сравнению с ЯОР хромосомы 9. Гетероморфизм спутничных

хромосом по активности ЯОР был отмечен и у других объектов, что указывает на наличие различных механизмов взаимодействия между активными ЯОР (Amosova et al., 1989; Samatadze et al., 2005a).

Таким образом, проведенное исследование по воздействию химических мутагенов различной концентрации на сорта календулы позволило дать их оценку по биолого-морфологическим и цитогенетическим изменениям в поколениях  $M_1$  и  $M_2$ . Установлено, что эффективность использования химических мутагенов зависела от их концентрации. Выявлено дозозависимое повышение частоты мультивалентов в МКП при повышении концентрации мутагенов. Уточнено хромосомное число вида ( $2n = 32$ ), идентифицированы все хромосомы в кариотипах календулы. Изучение рисунка С/DAPI-дифференциального окрашивания и Ag-ЯОР-окрашивания позволило выявить хромосом-специфичные маркеры в кариотипах сортов и мутантных форм. Применение химических мутагенов в определенных концентрациях позволяет расширить генетическое разнообразие растений и значительно увеличить возможности селекции *C. officinalis*.

#### Благодарности

Работа поддержана Российский фондом фундаментальных исследований (проект № 18-016-00167) и Программой фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы (тема № 0120136 3824).

#### REFERENS / ЛИТЕРАТУРА

- Abd El-Maksoud B., El-Mahrouk E. M.** 1992. Effect of ethyl methane sulfonate on the growth and interior quality of *Asparagus densiflorus* (Kunth) Jessop C. V. «SPRENGER» Egypt. *J. Appl. Sci.* 7: 116–132.
- Ahloowalia B. S., Maluszynski M.** 2001. Induced mutations a new paradigm in plant breeding. *Euphytica* 118, 2: 167–173. DOI: 10.1023/A:1004162323428.
- Amosova A. V., Podugol'nikova O. A., Kaminir L. B.** 1986. Quantitative assessment of the size of Ag-stained nucleolus-organizing regions in human chromosomes. *Cytology* 28, 1: 113–116. [In Russian] (**Амосова А. В., Подугольникова О. А., Каминир Л. Б.** Количественная оценка площади Ag-окрашенных ядрышкообразующих районов хромосом человека // Цитология, 1986. Т. 28, № 1. С. 113–116).
- Amosova A. V., Badaev N. S., D'yachenko L. F., Onoprienko V. S., Kaminir L. B.** 1989. The area of Ag-stained nucleolus-organizing regions of soft wheat chromosomes correlates with the ribosomal gene content. *Reports of the USSR Academy of Sciences* 305, 2: 453–458. [In Russian] (**Амосова А. В., Бадаев Н. С., Дьяченко Л. Ф., Оноприенко В. С., Каминир Л. Б.** Площадь Ag-окрашенных ядрышкообразующих районов хромосом мягкой пшеницы коррелирует с содержанием рибосомальных генов // Доклады Академии наук СССР, 1989. Т. 305, № 2. С. 453–456).
- Badaeva E. D., Salina E. A.** 2013. Genome structure and chromosomal analysis of plants. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii* [Vavilov's Journal of Genetic and Selection] 17, 4/2: 1017–1043. [In Russian] (**Бадаева Е. Д., Салина Е. А.** Структура генома и хромосомный анализ растений // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2013. Т. 17, № 4/2. С. 1017–1043).
- Badr M., El-Torky M. G., El-Shennawy O., El-Nashar Y.** 2000. Effect of chemical mutagens on *Tagetes erecta*. *J. Agr. Sci. Mansoura Univ.* 25: 5241–5256.

- Bhat T. A., Wani A. A.** 2017. Mutagenic Effects on Meiosis in Legumes and a Practical Case Study of *Vicia faba* L. *Chromosome Structure and Aberrations* 11: 219–244. DOI: 10.1007/978-81-322-3673-3\_11
- Bissa S., Bohra A.** 2011. Antibacterial potential of pot marigold. *J. Microbiol. Antimicrob.* 3, 3: 51–54.
- Chardigny J. M., Hasselwander O., Genty M., Kraemer K., Ptock A., Sebedio J. L.** 2003. Effect of conjugated FA on feed intake, body composition, and liver FA in mice. *Lipids* 38, 9: 895–90. DOI: 10.1007/s11745-003-1142-5.
- Chopra V. L.** 2005. Mutagenesis investigating the process and processing the outcome for crop improvement. *Curr. Sci.* 89: 353–359.
- Cruceriu D., Balacescu O., Rakosy E.** 2018. *Calendula officinalis*: Potential roles in cancer treatment and palliative care. *Integrative Cancer Therapies* 17, 4: 1068–1078. DOI: 10.1177/1534735418803766.
- Cvejić S., Jocić S., Prodanović S., Terzić S., Miladinović D., Balalić I.** 2011. Creating new genetic variability in sunflower using induced mutations. *HELIA* 34, 55: 47–54. DOI: 10.2298/HEL1155047C.
- Dryagina I. V., Potapov S. P., Ravkin A. S.** 1979. *Metodicheskiye ukazaniya po ispolzovaniyu mutagennykh faktorov v selektsii sadovykh vegetativno-razmnozhayemykh rasteniy* [Guidelines for the use of mutagenic factors in plant breeding garden vegetatively propagated]. Moscow: Agricultural Sciences. 75 pp. [In Russian] (**Дрягина И. В., Потанов С. П., Равкин А. С.** Методические указания по использованию мутагенных факторов в селекции садовых вегетативно-размножаемых растений. М.: ВАСХНИЛ, 1979. 75 с.).
- El-Nashar Y.** 2006. *Effect of chemical mutagens (sodium azide and diethyl sulphate) on growth, flowering and induced variability in Amaranthus caudatus L. and A. hypochondriacus L.* Doctoral thesis, Faculty of Agriculture Alexandria University, 217 pp.
- El-Nashar Y. I., Asrar A. A.** 2016. Phenotypic and biochemical profile changes in calendula (*Calendula officinalis* L.) plants treated with two chemical mutagenesis. *Genetics and Molecular Research* 15, 2: 1–14. DOI: 10.4238/gmr.15028071
- El-Torky M. G.** 1992. Effect of EMS (Ethyl methane sulphonate, on variegation type and some other horticultural traits in *Euonymus japonicus*, Linn. *Alex. J. Agric. Res.* 37, 1: 249–260.
- Vasilchenko I. T.** 1961. *Calendula* L. In: *Flora SSSR [Flora of the USSR]*. Vol. 26. Moscow, Leningrad. Pp. 857–861. [In Russian] (**Васильченко И. Т.** *Calendula* L. – Календула // Флора СССР. Т. 26. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1961. С. 857–861).
- Gaul H.** 1964. Mutation in plant breeding. *Radiat. Bot.* 4: 155–232.
- Golubovskaya I. N.** 1975. Genetic control of chromosome behavior in meiosis. In: *Citologiya i genetika mejoza [Cytology and Genetics of Meiosis]*. Moscow: Nauka. Pp. 321–338. [In Russian] (**Голубовская И. Н.** Генетический контроль поведения хромосом в мейозе // Цитология и генетика мейоза. М.: Наука, 1975. С. 321–338).
- Cruceriu D., Balacescu O., Rakosy E.** 2018. *Calendula officinalis*: Potential roles in cancer treatment and palliative care. *Integrative Cancer Therapies*. 17(4): 1068–1078. DOI: 10.1177/1534735418803766
- Guerra M.** 2000. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Gen. Mol. Biol.* 23, 4: 1029–1041. DOI: 10.1590/S1415-47572000000400049.
- Haensel R., Sticher O.** 2007. *Pharmakognosie-Phytopharmazie. 8. Ueberarbeitete und aktualisierte Auflage.* Heidelberg: Springer. S. 1151–1155.
- Hiller K., Melzig M. F.** 2010. *Lexikon der Heilpflanzen und Drogen, 2. Auflage.* Heidelberg: Spektrum, Akademischer Verlag. S. 106–107.
- Hussein H. A. S., Sallam S. H., Kamel H. A., Labib T.** 1974. The mutagenic effects of EMS on *Saliva splendens*. *Egypt. J. Genet. Cytol.* 30: 193–203.
- Jiménez-Medina E., García-Lora A., Paco L., Algarra I., Collado A., Garrido F.** 2006. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cancer* 6: 119. DOI: 10.1186/1471-2407-6-119.
- Khalid A. K., Silva J. A.** 2012. Biology of *Calendula officinalis* Linn. – Focus on Pharmacology, Biological Activities and Agronomic Practices. *Med Aromat Plant Sci Biotechnol.* 6, 1: 12–27.
- Khan S., Al-Qurainy F., Anwar F.** 2009. Sodium azide: A chemical mutagen for enhancement of agronomic traits of crop plants. *Environ. We Int. J. Sci. Tech.* 4: 1–21.
- Khaziyeva F. M., Basalaeva I. V., Totskaya A. S., Gryaznov M. Yu., Sidelnikov N. I., Burova A. E.** 2014. Influence of chemical mutagens on *Calendula officinalis* L. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry* 4: 66–67. [In Russian] (**Хазиева Ф. М., Басалаева И. В., Тоцкая С. А., Грязнов М. Ю., Сидельников Н. И., Бурова А. Е.** Влияние химических мутагенов на *Calendula officinalis* L. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, 2014. № 4. С. 66–67).
- Muravenko O. V., Yurkevich O. Yu., Bolsheva N. L., Samatadze T. E., Nosova I. V., Zelenina D. A., Volkov A. A., Popov K. V., Zelenin A. V.** 2009. Comparison of genomes of eight species of sections *Linum* and *Adenolinum* from the genus *Linum* based on chromosome banding, molecular markers and RAPD analysis. *Genetica* 135, 2: 245–255. DOI: 10.1007/s10709-008-9273-7.

- Muravenko O. V., Zelenin A. V.** 2009. Chromosomal organization of the genomes of small chromosome plants. *Russ. J. Genet.* 45(11): 1516–1529. [In Russian] (**Муравенко О. В., Зеленин А. В.** Исследование хромосомной организации геномов мелкохромосомных растений // Генетика, 2009. Т. 45, № 11. С. 1516–1529).
- Oladosu Y., Rafii M. Y., Abdullah N., Hussin G., Ramli A., Rahim H.A., Miah G., Usman M.** 2016. Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 30, 1: 1–16. DOI: 10.1080/13102818.2015.1087333.
- Poddubnaja-Arnoldi V. A.** 1976. *Cytoembriologiya pokrytosemennykh rasteniy* [Cytoembriology angiosperm]. Moscow: Nauka. 508 pp. [In Russian] (**Поддубная-Арнольди В. А.** Цитоэмбриология покрытосеменных растений. М.: Наука, 1976. 508 с.).
- Predieri S.** 2000. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 64, 23: 185–210. DOI: 10.1023/A:1010623203554.
- Rapoport I. A.** 1993. *Otkrytiye khimicheskogo mutagenеза. Izbrannye trudy* [Discovery of chemical mutagenesis]. Moscow: Nauka. 304 pp. [In Russian] (**Рапопорт И. А.** Открытие химического мутагенеза. Избранные труды. М.: Наука, 1993. 304 с.).
- Roychowdhury R., Tah J.** 2011. Chemical mutagenic action on seed germination and related agro-metrical traits in  $M_1$  *Dianthus* generation. *Curr. Bot.* 2: 19–23.
- Roychowdhury R., Datta S., Gupta P., Tah J.** 2012. Analysis of genetic parameters on mutant populations of Mungbean (*Vigna radiate* L.) after ethyl methane sulphonate treatment. *Not. Sci. Biol.* 4: 137–143.
- Sak K., Nguyen T. H., Ho V. D., Do T. T., Raal A.** 2017. Cytotoxic effect of chamomile (*Matricaria recutita*) and marigold (*Calendula officinalis*) extracts on human melanoma SK-MEL-2 and epidermoid carcinoma KB cells. *Cogent Medicine* 4: 2–7. DOI: 10.1080/2331205X.2017.1333218.
- Samatadze T. E., Muravenko O. V., Bolsheva N. L., Amosova A. V., Gostimsky S. A., Zelenin A. V.** 2005. Investigation of chromosomes in varieties and translocation lines of pea *Pisum sativum* L. by FISH, Ag-NOR, and differential DAPI staining. *Russ. J. Genet.* 41(12): 1381–1388. [In Russian] (**Саматадзе Т. Е., Муравенко О. В., Большеева Н. Л., Амосова А. В., Гостимский С. А., Зеленин А. В.** Изучение хромосом сортов и транслокационных линий гороха посевного (*Pisum sativum* L.) с использованием FISH, Ag-ЯОР и DAPI- дифференциального окрашивания // Генетика, 2005. Т. 41, № 12. С. 1665–1673).
- Samatadze T. E., Zoshchuk S. A., Khomik A. S., Amosova A. V., Svistunova N. Yu., Suslina S. N., Hazieva F. M., Yurkevich O. Yu., Muravenko O. V.** 2018a. Molecular cytogenetic characterization, leaf anatomy and ultrastructure of the medicinal plant *Potentilla alba* L. *Genet. Res. Crop. Evol.* 65, 6: 1637–1647. DOI: 10.1007/s10722-018-0640-7
- Samatadze T. E., Badaeva E. D., Popov K. V., Bolsheva N. L., Levinskikh M. A., Sychev B. N., Amosova A. V., Zoshchuk S. A., Yurkevich O. Yu., Muravenko O. V.** 2018b. “Space” Pea *Pisum sativum* L. and Wheat *Triticum compactum* host. Plants as Objects of Cytogenetic Studies. *Biology Bulletin* 45, 6: 528–536. [In Russian] (**Саматадзе Т. Е., Бадаева Е. Д., Попов К. В., Большеева Н. Л., Левинских М. А., Зошук В. А., Юркевич О. Ю., Амосова А. В., Сычев В. Н., Муравенко О. В.** «Космические» растения гороха (*Pisum sativum* L.) и пшеницы (*Triticum compactum* host.) как объекты цитогенетических исследований // Известия РАН. Серия биол., 2018. Т. 45, № 6. С. 603–611). DOI: 10.1134/S0002332918060115
- Shu Q. Y., Forster B. P., Nakagawa H.** 2012. Principles and applications of plant mutation breeding. *Plant mutation breeding and biotechnology*. Wallingford: CABI. Pp. 301–325.
- Singh J., Singh S.** 2001. Induced mutations in basmati rice (*Oryza sativa* L.). *Diamond Jub. Symp. New Delhi* 212 pp.
- Sinhamahapatra S. P., Rakshit S. C.** 1990. Response to selection for plant height in X-ray treated population of jute (*Corchorus caspularis* L.) c. v. JRC 212. *Euphytica* 51: 95–99.
- Suzuki R., Noguchi R., Ota T., Abe M., Miyashita K., Kawada T.** 2001. Cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on mouse tumor and human monocytic leukemia cells. *Lipids* 36, 5: 477–482.
- Ukiya M., Akihisa T., Yasukawa K., Tokuda H., Suzuki T., Kimura Y.** 2006. Anti-inflammatory, anti-tumorpromoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*Calendula officinalis*) flowers. *Journal of Natural Products* 69: 1692–1696.
- Yasui Y., Hosokawa M., Kohno H., Tanaka T., Miyashita K.** 2006. Growth inhibition and apoptosis induction by all-trans-conjugated linolenic acids on human colon cancer cells. *Anticancer Res* 26 (3A): 1855–1860.
- Yurkevich O. Yu., Naumenko-Svetlova A. A., Bolsheva N. L., Samatadze T. E., Rachinskaya O. A., Kudryavtseva A. V., Zelenina D. A., Volkov A. A., Zelenin A. V., Muravenko O. V.** 2013. Investigation of genome polymorphism and seed coat anatomy of species of section *Adenolinum* from the genus *Linum*. *Genet. Res. Crop. Evol.* 60, 3: 661–676. DOI: 10.1007/s10722-012-9865-z.
- Zeerak N. A.** 1992. Cytogenetical effects of gamma rays and ethyl methane sulphonate in tomato (*Lycopersicon esculentum* var. Cerasiforme). *Phytomorphology* 42: 81–86.