

УДК: 631:633.854.78

## МУТАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ У ПОДСОЛНЕЧНИКА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ МУТАГЕНОМ НА НЕЗРЕЛЫЕ ЗАРОДЫШИ

А.И. Сорока

*Институт масличных культур НААН*

Показано, что обработка незрелых зародышей разного возраста двух линий подсолнечника *Helianthus annuus* L. химическим мутагеном этилметансульфонатом эффективна для индуцирования широкого спектра и высокой частоты наследуемых изменений. Наибольшая частота мутаций в поколении  $M_2$  составила 39,9%. Также установлено, что спектр мутаций в вариантах с различным возрастом незрелых зародышей существенно различался.

**Ключевые слова:** подсолнечник, мутаген, этилметансульфонат, незрелый зародыш, семя, поколение  $M_1$ , поколение  $M_2$ , спектр мутаций, частота мутаций.

**Введение.** Подсолнечник – одна из наиболее важных и широко используемых масличных культур в мире. Однако ограниченность генетической базы подсолнечника зачастую не позволяет вести селекционные работы с данной культурой на должном уровне. В то же время хорошо известно, что такой метод расширения генетической изменчивости как искусственный мутагенез позволяет искусственно получать мутации с высокой частотой. Это касается методов как физического, так и химического мутагенеза. В связи с тем, что с помощью индуцированного мутагенеза уже созданы сотни новых сортов и тысячи образцов исходного материала практически всех сельскохозяйственных культур [1, 5], использование данного подхода является высоко востребованным. А сочетание методов химического мутагенеза и эмбриокультуры *in vitro* выглядит еще более привлекательным, поскольку использование нетипичного объекта для мутагенной обработки может обеспечить появление новых генотипов с ценными признаками.

На подсолнечнике еще в семидесятые годы методом искусственного мутагенеза были созданы низкорослые образцы, скороспелые формы, а также генотипы с повышенным содержанием олеиновой [2] и пальмитиновой кислот [10]. S.J. Jambhulkar и D.C. Joshua [4] показали, что гамма-лучи в дозе 200 Гр являются эффективным средством для создания хлорофилльных и морфологических мутантов этой культуры. А.В. Усатовым с сотр. в 2001 г. [11] получен ряд хлорофилльных мутантов подсолнечника после обработки линии 3629 нитрозометилмочевинной. Предпринимались попытки при помощи физических и химических мутагенов индуцировать устойчивость подсолнечника к *Alternaria*, и в популяциях растений  $M_3$ , полученных после обработки семян ЭМС, было найдено 300 растений без признаков повреждения данным заболеванием [9]. Также Е. Nehnevajova и др. [7], используя химический мутагенез, получили несколько мутантов подсолнечника, которые характеризовались в 3-5 раз более высоким уровнем поглощения и выноса таких тяжелых металлов как кадмий, цинк и свинец, что может найти применение при фиторемедиации загрязненных земель. Успешным было и индуцирование форм подсолнечника с новыми морфологическими и биохимическими признаками, а также устойчивостью к некоторым патогенам при обработке его зародышей

---

© А.И. Сорока

ультразвуком [3]. Эти и другие работы свидетельствуют, что метод индуцированного мутагенеза может быть эффективным приемом в индуцировании генетической изменчивости у подсолнечника.

Целью данной работы было изучение частоты и спектра мутаций при обработке химическим мутагеном этилметансульфонатом (ЭМС) незрелых зародышей подсолнечника.

**Материал и методы исследований.** Незрелые семянки двух линий культурного подсолнечника *Helianthus annuus* L. запорожской селекции – ЗЛ 809 и ЗЛ 95, семена которых были предоставлены лабораторией селекции межлинейных гибридов подсолнечника ИМК, через 9-11 и 14-16 дней после принудительного самоопыления выделяли из корзинок и обрабатывали 0,02% водным раствором этилметансульфоната. После 16-часовой экспозиции семянки промывали проточной водопроводной водой и последовательно стерилизовали 70%-ным этиловым спиртом, а затем водным раствором хлорамина Б. В асептических условиях зародыши освобождали от внешней оболочки и высаживали в чашки Петри на модифицированную питательную среду МС [6] с уменьшенным содержанием неорганических солей. В дальнейшем зародыши культивировали при 16-часовом фотопериоде и комнатной температуре до момента формирования проростков. Укоренившиеся растения высаживали в подготовленную почву в пластиковые стаканы, а после начала активного роста и формирования настоящих листьев – на полевые делянки.

В качестве контроля выступали варианты, в которых незрелые семянки соответствующего возраста замачивали в дистиллированной воде с последующим культивированием выделенных зародышей в условиях *in vitro*. Подобной обработке ЭМС подвергали и зрелые семена тех же линий подсолнечника.

Растения  $M_1$  всех вариантов перед цветением изолировали индивидуальными изоляторами. В конце вегетации измеряли их высоту, а также определяли длину вегетационного периода. Кроме этих, анализировали и некоторые другие параметры. Семена, собранные с растений  $M_1$ , на следующий год посейменно высевали в поле для получения поколения  $M_2$ . Каждая семья  $M_2$  представляла потомство единичного растения  $M_1$ . Во время вегетации отбирали растения с характерными морфологическими и физиологическими признаками, отличающимися от исходных линий. После подтверждения наследования измененного признака в следующем поколении определяли окончательную частоту мутаций в  $M_2$  и анализировали спектр наблюдаемых изменений. Частоту мутаций высчитывали по количеству семей с видимыми изменениями морфологических и физиологических признаков, соотнесенному к общему числу исследованных семей.

Полученные данные обрабатывали статистически, используя компьютерные программы MSTAT-C [8] и MS Excel. Существенность отличий оценивали по t-критерию Стьюдента.

**Результаты исследований и их обсуждение.** После обработки мутагеном, также как и в контроле, основная часть зародышей погибала еще до момента развития нормально сформированных *in vitro* растений и их высадки в поле. Вместе с тем часть семянцев погибала и после высадки в поле, а некоторые растения не образовывали семена.

Как видно из данных таблицы, выжившие растения, полученные после обработки зародышей мутагеном, зацветали с существенным опозданием. Они

характеризувались також удлиненим вегетаційним періодом і відличались по висоті. Ці данні свідчать про те, що обробка незрілих зародків мутагеном була ефективною.

Таблиця

**Влияние мутагенной обработки незрелых зародышей подсолнечника 14-16-дневного возраста на рост и развитие растений М<sub>1</sub>**  
(данні за 2006-2007 гг.)

Признак	Линия ЗЛ 95		Линия ЗЛ 809	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Период до начала цветения, дн.	75,7±0,84	92,1±0,89***	66,4±0,53	81,9±0,76***
Вегетационный период, дн.	118,9±1,73	132,9±0,52***	114,8±1,16	118,4±0,72**
Высота, см	86,2±2,59	98,3±2,88**	55,8±2,58	31,6±1,25***

\*\* , \*\*\* - различия между опытом и контролем существенны при  $p < 0,01$  и  $0,001$  соответственно.

Что касается высоты растений, то исследуемые линии отреагировали на влияние мутагена по-разному. У линии ЗЛ 95 высота растений, выращенных из обработанных мутагеном зародков, значительно увеличилась с 86,2 до 98,3 см, а у линии ЗЛ 809 – существенно уменьшилась, – с 55,8 до 31,6 см.

Изменение степени проявления многих признаков растений М<sub>1</sub> подсолнечника в результате обработки зародков этилметансульфонатом предполагает получение высокой частоты мутаций и их широкого спектра в последующих поколениях. Это было подтверждено при анализе поколения М<sub>2</sub>.

Во втором мутантном поколении частота наследуемых изменений в опытных вариантах была высокой и составляла около 15 % у линии ЗЛ 809 и в два раза выше у линии ЗЛ 95. Разница в частоте между линиями, очевидно, обусловлена значительными различиями в генетическом происхождении двух исследуемых образцов. Сравнивая частоту мутаций при обработке зрелых зародков с частотой мутаций при обработке зрелых семян следует отметить, что она была значительно выше. В случае со зрелыми семенами частота мутаций не превышала 10%.

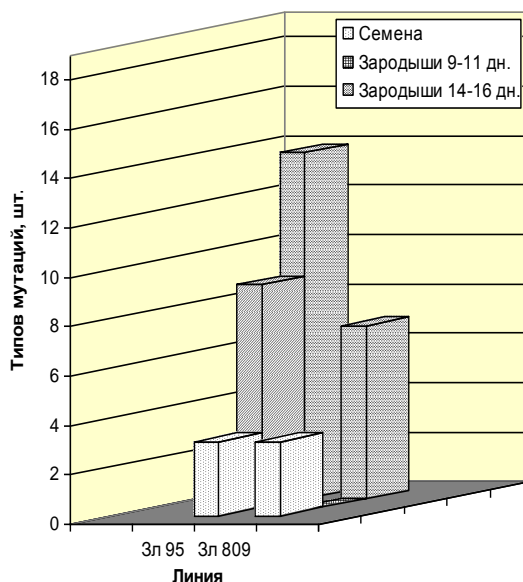


Рис. 1. Количество типов мутаций в М<sub>2</sub> при обработке мутагеном незрелых зародков и семян подсолнечника

Что касается возраста зародышей, то общая частота мутаций была близкой в обоих вариантах. Вместе с тем имелись различия по частоте мутаций отдельных типов. Так, после мутагенной обработки зародышей 14-16-дневного возраста линии ЗЛ 95 с наибольшей частотой встречались мутации габитуса (около 15%). При обработке ЭМС более молодых зародышей этой линии с высокой частотой выявляли мутации листьев обертки, а также ветвления.

Обработка ЭМС незрелых зародышей подсолнечника с последующим их дорастиванием в условиях *in vitro* привела к появлению в  $M_2$  широкого спектра мутаций. Так, у линии ЗЛ-809 использование в качестве объекта обработки незрелых зародышей позволило получить 7 типов наследуемых изменений, а у линии ЗЛ-95 – 9 и 14 типов в зависимости от их возраста (рис. 1).

В поколении  $M_2$  спектр мутаций в вариантах с различным возрастом незрелых зародышей различался. Так, например, в результате обработки зародышей 14-16-дневного возраста наблюдали появление разных типов мутаций габитуса растения с высокой частотой, тогда как при действии мутагена на более молодые зародыши их практически не выявляли.



**Рис. 2. Морфотип мутанта «табакоподобное растение», полученного в результате обработки ЭМС незрелых зародышей подсолнечника**

В поколении  $M_3$  также наблюдали широкий спектр мутаций. Многие из них были оригинальными и не выявлялись в более раннем поколении. К ним можно отнести мутации дихотомического жилкования, формы листа и другие. Одним из интересных мутантов было «табакоподобное» растение. На ранних стадиях развития по своему внешнему виду оно напоминало растение табака. Данный мутант имел несколько измененных признаков. Эта мутация затронула форму семядолей, листа, краевых цветков и семени, а также длину междоузлия (рис. 2). В результате изменился габитус растения, что имеет важное значение в селекционной работе, поскольку предоставляется возможность создания образцов с новым морфотипом.

В целом, выделенные в результате обработки этилметансульфонатом незрелых зародышей мутации, затрагивали ряд важных признаков и свойств подсолнечника,

и могут найти применение в качестве маркерных или представлять хозяйственную ценность.

### **Выводы**

Обработка незрелых зародышей мутагеном влияла на экспрессию ряда морфологических и физиологических признаков растений  $M_1$ . Эти растения зацветали с существенным опозданием, характеризовались удлиненным вегетационным периодом и отличались по высоте.

Обработка этилметансульфонатом незрелых зародышей двух линий подсолнечника привела к появлению высокой частоты и широкого спектра

мутаций. В поколении  $M_2$  частота мутаций составляла около 15% у линии ЗЛ 809 и в два раза больше – у линии ЗЛ 95.

Выделены мутанты подсолнечника, которые могут использоваться в качестве источников маркерных или хозяйственно-ценных признаков.

### *Литература*

1. Лях В.А. Индуцированный мутагенез масличных культур: Монография / Лях В.А., Полякова И.А., Сорока А.И. – Запорожье: ЗНУ, 2009. – 266 с.
2. Солдатов К.И. Использование химического мутагенеза в селекции подсолнечника / К.И. Солдатов // Материалы VII Международной конференции по подсолнечнику, Краснодар (27.06 3.07.1976) – М.: Колос. – 1978. – С. 179-182.
3. Encheva J. Mutant sunflower line R12003, produced through *in vitro* mutagenesis / J. Encheva, P.Shindrova, V.Encheva, D. Valkova // *Helia*. – 2012. – Vol. 35, № 56. – P. 19-30.
4. Jambhulkar S.J. Induction of plant injury, chimera, chlorophyll and morphological mutations in sunflower using gamma rays / S.J. Jambhulkar, D.C. Joshua // *Helia*. – 1999. – Vol. 22, № 31. – P. 63-74.
5. Maluszynski K. Officially released mutant varieties. – The PAO/IAEA database / K. Maluszynski, K. Nichterlein, L Van Zanten // *Mutation breeding review*. – 2000. – № 12. – P. 1-84.
6. Murashige J. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / J. Murashige, F. A. Skoog // *Physiol. Plant*. – 1962. – Vol.15 – P. 473-497.
7. Nehnevajova E. Chemical mutagenesis – a promising technique to increase metal concentration and extraction in sunflowers / E. Nehnevajova, R. Herzig, G. Federer, K.H. Erismann, J.P. Schwitzguebel // *Int J Phytoremediation*. – 2007. – Vol.9, № 2. – P. 149-65.
8. Nissen O. A microcomputer program for the design, management and analysis of agronomic research experiments. User's Guide to MSTAT-C / O. Nissen – USA: Michigan State Univ. – 1991. – 418 p.
9. Oliveira de M.F. Mutation breeding in sunflower for resistance to *Alternaria* leaf spot / M.F. de Oliveira, Neto.T., Leite R.M.V.B.C., Castiglioni V.B.R., Arias C.A.A. // *Helia*. – 2004. – 27, № 41. – P. 41-50.
10. Perez-Vich B. A new sunflower mutant with increased levels of palmitic acid in the seed oil / B. Perez-Vich, Velasco L., Fernandez-Martinez J.M. // *Helia*. – 2008. – 31, № 48. – P. 46-60.
11. Usatov A.V. Mutagenic effect of nitrosomethylurea modified by heat shock at early stages of the sunflower seedlings development / Usatov A.V., Mashkina E.V., Markin N.V., Guskov E.P. // *Russian Journal of Genetics*. – 2001. – 37, № 12. – P. 1388-1393.

## **MUTATIONAL VARIABILITY IN SUNFLOWER UNDER MUTAGEN INFLUENCE ON IMMATURE EMBRYOS**

**A.I. Soroka**

**It has been shown that treatment of immature embryos of different ages with chemical mutagen ethyl methanesulfonate in two sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines was effective to induce a broad spectrum and high frequency of heritable changes. The highest frequency of mutations in  $M_2$**

generation amounted to 39.9%. It was also found that the spectrum of mutations in the treatments with different age of immature embryos differed significantly.

### **МУТАЦІЙНА МІНЛИВІСТЬ У СОНЯШНИКА ПІД ВПЛИВОМ МУТАГЕНУ НА НЕЗРІЛІ ЗАРОДКИ**

**А.І. Сорока**

Показано, що обробка незрілих зародків різного віку двох ліній соняшника *Helianthus annuus* L. хімічним мутагеном етилметансульфонатом ефективна для індукування широкого спектру і високої частоти спадкових змін. Найбільша частота мутацій в поколінні  $M_2$  склала 39,9%. Також встановлено, що спектр мутацій у варіантах з різним віком незрілих зародків істотно розрізнявся.

*Рецензент:* В.А. Лях, доктор биол. наук, професор, зав. кафедрою садово-паркового господарства і генетики рослин Запорозького національного університета