

УДК 631.527.528.62:633.854.54

А. В. ТИГОВА¹, мл. науч. сотруд.,

А. И. СОРОКА¹, д. с.-х. н., ст. науч. сотруд., зав. лаб.,

П. Г. ДУЛЬНЕВ², к. х. н.

¹Институт масличных культур НААН, Запорожье,

²Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев

e-mail: anna.tigova@gmail.com

ИЗМЕНЕНИЯ ОКРАСКИ ЛЕПЕСТКОВ ВЕНЧИКА И ПЫЛЬНИКОВ У ЛЬНА МАСЛИЧНОГО (*LINUM USITATISSIMUM* L.) С ПРИМЕНЕНИЕМ НОВЫХ ХИМИЧЕСКИХ МУТАГЕНОВ

*Представлены результаты, описывающие частоту и спектр мутаций окраски лепестков венчика и пыльников в поколении M_2 у *Linum usitatissimum* L., под действием новых химических мутагенов ДГ-2, ДГ-6, ДГ-7, ДГ-9 в сравнении с ДМС и ЭМС, а также числовые значения цветовой схемы RGB, полученные при сканировании лепестков мутантных линий. Выявлены существенные различия между окраской цветка контрольных растений и полученных мутантных линий по характеристикам цвета в системе RGB.*

Ключевые слова: лён масличный, мутаген, окраска, цветок, частота мутаций, спектр мутаций, цифровая характеристика цвета, диметилсульфат.

Введение. В настоящее время уровень селекции требует создания высокопродуктивных сортов, соответствующих требованиям UPOV-тестов (отличимость, однородность и стабильность). Соблюдение этих принципов позволяет легко идентифицировать сорта, решает вопрос защиты авторских прав селекционеров и позволяет осуществлять семеноводство сортов на более высоком уровне. Одним из источников получения новых генотипов для селекции является метод экспериментального мутагенеза [1–5], позволяющий за относительно короткий срок создавать ценный исходный материал, отличающийся от существующих сортов не только лучшими хозяйственными, но и морфологическими характеристиками.

Культура льна обладает незначительным разнообразием морфологических признаков [6]. Достаточный спектр изменчивости наблюдается только по окраске гипокотыля, цветка и семян. Наиболее яркий маркерный признак — окраска лепестков, которая имеет сложную генетическую природу и зависит от 8 до 17 генов, часть которых плейотропно влияет на поверхность лепестков (гладкая или гофрированная), их форму, цвет пыльников и оболочку семян [7; 8]. Интенсивность и равномерность

окраски лепестков контролируются этими же генами. Одни авторы отмечают комплементарное и модифицирующее действие генов окраски цветка, а другие утверждают, что наследование окраски лепестков льна носит полигенный характер [1]. В частности, Т. Таммес предположила, что окраска лепестков обусловлена 8 генами, которые находятся в разных хромосомах. При этом генотип голубой окраски лепестков венчика можно выразить как $AAB_1B_1B_2B_2CCDDEEFFKK$ [1]. В работах Ф. Плонка описан ген *pf1* (*pink flower 1*) с плейотропным действием, определяющий желтый оттенок оболочки семян, розовый венчик и кремово-оранжевые пыльники [7]. По окраске лепестки льна бывают белые, голубые (различной интенсивности: от бледно-голубых до ярко-синих), желтые, розовые, красные и фиолетовые. При этом окраска может быть равномерно распределена по всему лепестку или становится почти белой к его основанию [6; 8].

В изучении морфометрических (размер и форма) и колориметрических (вариации цвета) характеристик таких объектов селекции, как окраска лепестков и цвет семян различных культур, существенно эффективными могут быть современные цифровые технологии [9–12]. Имея числовые данные любого цвета, возможно получить достаточно полное представление об изучаемом предмете, даже не имея его в своем распоряжении.

Целью данной работы было установить спектр и частоту мутаций окраски лепестков венчика и пыльников льна масличного, индуцированных новыми химическими мутагенами ДГ-2, ДГ-6, ДГ-7, ДГ-9, в сравнении с известными в селекционной практике мутагенами диметилсульфатом (ДМС) и этилметансульфонатом (ЭМС), а также описать полученное разнообразие окрасок лепестков венчика мутантных линий методом прямого сканирования с использованием современных компьютерных технологий.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили образцы из генетической коллекции Института масличных культур — два сорта ('Айсберг' и 'Солнечный') льна масличного *Linum usitatissimum* L. 'Айсберг' имеет белые лепестки, кремовые пыльники и звездчатую форму цветка (рис. 1, а). У сорта 'Солнечный' цветки голубые с фиолетовым оттенком и голубые пыльники (рис. 2, а). В качестве мутагенов использовали новые химические соединения, производные диметилсульфата, серии ДГ (ДГ-2, ДГ-6, ДГ-7 и ДГ-9), синтезированные в Институте биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины. Эффективность действия этих соединений сравнивали с исходным веществом (ДМС) и таким широко известным мутагеном, как этилметансульфонат. Сущность мутагенного действия ДМС и ЭМС заключается чаще всего в реакции алкилирования гуанина в положении 7-го атома азота, что приводит к ошибочному спариванию гуанина с тиминном вместо цитозина, в результате которого может возникать мутация типа транзиции [13–16].

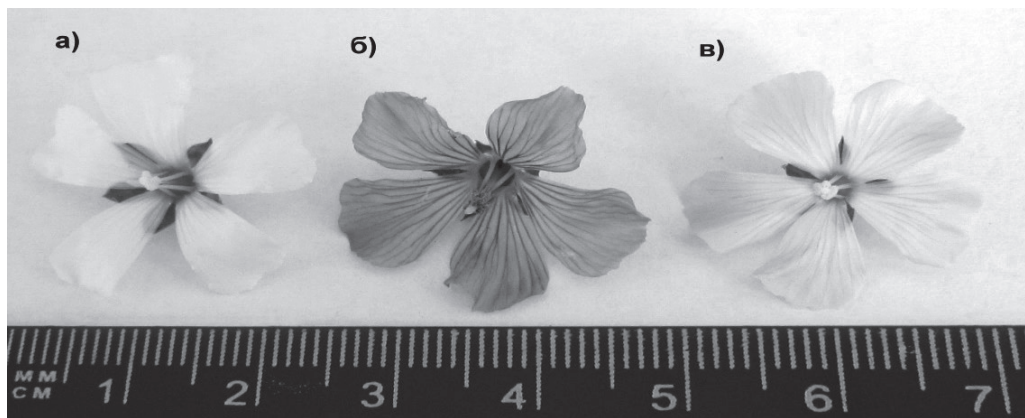


Рис. 1. Мутации окраски лепестков венчика и пыльников у сорта 'Айсберг', полученные при действии химических мутагенов: а) контроль (белые лепестки, кремовые пыльники); б) мутация типа «голубые лепестки, голубые пыльники»; в) мутация типа «светло-голубые лепестки, кремовые пыльники»

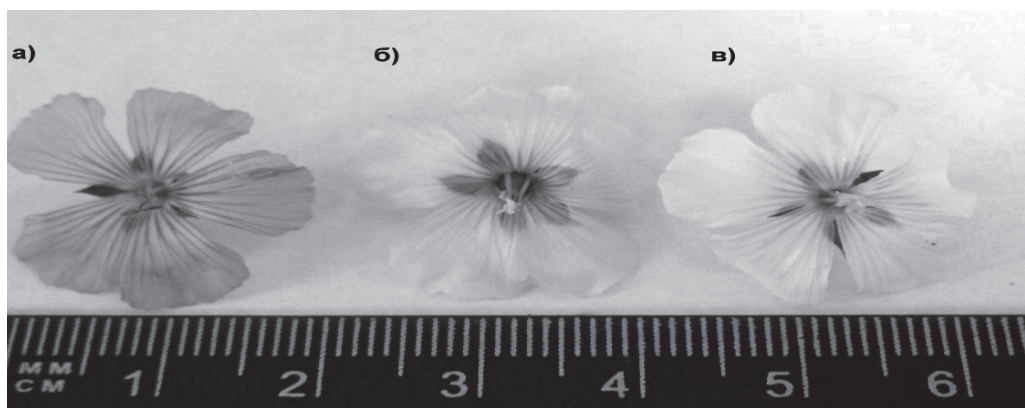


Рис. 2. Мутации окраски лепестков венчика и пыльников у сорта 'Солнечный', полученные при действии химических мутагенов: а) контроль (голубые лепестки, голубые пыльники); б) мутация типа «светло-розовые лепестки, кремовые пыльники, розовый бутон»; в) мутация типа «белые лепестки, кремовые пыльники, белый бутон»

Для осуществления мутагенной обработки триста семян каждого варианта замачивали в 0,05 и 0,5 %-х водных растворах указанных мутагенов в течение 16 часов. Затем семена один час промывали проточной водой для уменьшения повреждающего эффекта и в тот же день высевали в почву. Семена растений поколения M_1 высевали посемейно для получения поколения M_2 . В поколении M_2 проводили предварительную оценку спектра и частоты мутаций изменения окраски лепестков венчика и пыльников. Окончательный вывод о наличии и частоте мутаций делали после подтверждения их наследования в поколении M_3 . Частоту мутантных изменений определяли как отношение числа мутантных семяк к общему их количеству. Для получения цифровых изображений в

одни и те же утренние часы проводили сканирование разложенных монослоем лепестков 5 цветков каждого исследуемого образца льна при помощи сканера Canon MP 250. Компьютерную оценку интенсивности окраски лепестков осуществляли по методике Е. В. Ведмедевой [17]. Она состоит в прямом сканировании лепестков на сканере и сохранении результатов в формате графического файла. Файл обрабатывается в каком-либо графическом редакторе (в нашем случае Paintshop) выделением всей поверхности цветка, за исключением дефектов, и усреднением цвета при помощи фильтра «Размытие». В данной работе мы использовали фильтр «Размытие по Гауссу», дающий более качественные результаты, а также исключили из обработки края лепестков, часто имеющие цветовые артефакты. Полученные показатели записывали в виде трех составляющих (красная, зеленая, синяя) цветовой схемы RGB, включающей 256 градаций (от 0 до 255) каждого цвета. Статистическую обработку результатов, расчет средних ошибок, коэффициента вариации проводили согласно общепринятым методикам [18–20].

Результаты и обсуждение. В результате обработки семян химическими мутагенами в поколении M_2 нами были получены изменения в окраске лепестков венчика и пыльников у обоих сортов льна. Так, у сорта 'Айсберг' встречалось два типа мутаций, а именно — белая окраска лепестков и кремовая окраска пыльников менялись на «голубую окраску лепестков, голубые пыльники» и «светло-голубую окраску лепестков, кремовые пыльники» (рис. 1, б, в).

Мутация типа «голубые лепестки, голубые пыльники» была достаточно распространённой и встречалась при обработке мутагенами ДГ-2, ДГ-7, ДГ-9 и ЭМС в концентрации 0,5 % с частотой 0,94, 1,98, 1,82 и 1,78 % соответственно (табл. 1). При обработке мутагеном ДМС в данной концентрации все растения M_1 погибли, поэтому в поколении M_2 анализ по этому мутагену не проводили и в таблице 1 он не представлен. Кроме того, малое количество изученных семей (5 и 21) при обработке мутагеном ДГ-6 связано с невысокой выживаемостью растений в первом мутантном поколении.

Более низкая концентрация 0,05 % оказалась менее эффективной, поскольку изменение признаков «голубые лепестки, голубые пыльники» наблюдалось при действии только двух изученных мутагенов — ДГ-2 и ДГ-9 с частотой 3,85 и 1,83 % (табл. 2). Мутация окраски типа «светло-голубые лепестки, кремовые пыльники» наблюдалась только в одном варианте — при обработке мутагеном ЭМС в концентрации 0,5 % с частотой 0,89 % (табл. 1).

У сорта 'Солнечный' встречалось два типа мутаций окраски лепестков венчика и пыльников — «светло-розовые лепестки, кремовые пыльники» и «белые лепестки, кремовые пыльники» (рис. 2, б, в). Идентификацию данного типа мутаций удобно проводить по бутону, который ещё не раскрылся и имеет розовый или белый оттенок.

Мутация «*светло-розовые лепестки, кремовые пыльники*» встречалась при обработке мутагенами ДГ-2, ДГ-7, ДГ-9 и ЭМС в концентрации 0,5 % с частотой 3,92, 2,97, 1,94 и 6,56 % соответственно (табл. 1). Обработка в концентрации 0,05 % оказалась также эффективной, поскольку мутация данного типа встречалась при действии всех изученных мутагенов (табл. 2).

Самым эффективным оказался мутаген ДГ-2 в концентрации 0,05 %, который индуцировал изменение данного типа с максимальной частотой 6,80 %. Минимальная частота мутаций типа «*светло-розовые лепестки, кремовые пыльники*» встречалась при действии мутагена ЭМС в концентрации 0,05 % и составила 0,93 %.

Мутация типа «*белые лепестки, кремовые пыльники, белый бутон*» была менее распространенной и встречалась при действии мутагенов ДГ-7, ДГ-9 и ЭМС в концентрации 0,5 % с частотой 0,99, 0,97 и 0,82 %. В концентрации 0,05 % мутация данного типа встречалась в одном варианте обработки при действии мутагена ДГ-7 с частотой 0,99 %.

Таблица 1

Частота мутаций окраски лепестков венчика и пыльников у *Linum usitatissimum* L. в поколении M_2 при обработке семян мутагенами в концентрации 0,5 % у сортов 'Айсберг' и 'Солнечный', %

Тип мутаций	Кол-во семей, шт.	Контроль	Мутаген				
			ДГ-2	ДГ-6	ДГ-7	ДГ-9	ЭМС
	100	100	106	5	101	110	112
'Айсберг'							
Голубые лепестки, голубые пыльники	0,00	0,94±0,94	0,00	1,98±1,39	1,82±1,27	1,78±1,25	
Светло-голубые лепестки, кремовые пыльники	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,89±0,89	
Суммарная частота	0,00	0,94	0,00	1,98	1,82	2,67	
'Солнечный'							
Тип мутаций	Кол-во семей, шт.	100	102	21	101	103	122
Светло-розовые лепестки, кремовые пыльники	0,00	3,92±1,92	0,00	2,97±1,69	1,94±1,36	6,56±2,24	
Белые лепестки, кремовые пыльники	0,00	0,00	0,00	0,99±0,98	0,97±0,97	0,82±0,82	
Суммарная частота	0,00	3,92	0,00	3,96	2,91	7,38	

В результате компьютерного сканирования лепестков четырех мутантных линий льна масличного с измененной окраской венчика цвет-

ка и пыльников получены достаточно стабильные результаты цифровых характеристик красного (R), зеленого (G) и синего (B) цветовых компонентов окраски. Подсчитанные коэффициенты вариации, составляющих окраски по каждому образцу представлены в таблице 3.

Таблица 2

Частота мутаций окраски лепестков венчика и пыльников у *Linum usitatissimum* L. в поколении M₂ при обработке семян мутагенами в концентрации 0,05 % у сортов 'Айсберг' и 'Солнечный', %

Кол-во семей, шт.	Конт- роль	Мутаген					
		ДГ-2	ДГ-6	ДГ-7	ДГ-9	ДМС	ЭМС
Тип мутаций	100	104	102	108	109	106	128
'Айсберг'							
Голубые лепестки, голубые пыльники	0,00	3,85± 1,89	0,00	0,00	1,83± 1,28	0,00	0,00
Светло-голубые лепестки, кремовые пыльники	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Суммарная частота	0,00	3,85	0,00	0,00	1,83	0,00	0,00
'Солнечный'							
Кол-во семей, шт.	0,00	103	103	101	103	105	107
Тип мутаций	0,00	103	103	101	103	105	107
Светло-розовые лепестки, кремовые пыльники	0,00	6,80± 2,48	1,94± 1,36	1,98± 1,39	0,97± 0,97	1,90± 1,33	0,93± 0,93
Белые лепестки, кремовые пыльники	0,00	0,00	0,00	0,99± 0,98	0,00	0,00	0,00
Суммарная частота	0,00	6,80	1,94	2,97	0,97	1,90	0,93

Из таблицы 3 видно, что полученные мутантные линии существенно отличаются от контрольных растений по признаку окраски лепестков венчика. Так, у сорта 'Айсберг' в контроле цифровые характеристики R, G и B компонент составили 232,6, 227,8 и 227,5 соответственно. У мутантов типа «светло-голубые лепестки, кремовые пыльники», полученных при обработке мутагеном ЭМС в концентрации 0,5 % (табл. 2), характеристики R, G и B были на уровне 189,2, 189,2 и 222,8 соответственно и существенно отличались от характеристик контрольных растений, что подтверждается статистически.

У мутантов типа «голубые лепестки, голубые пыльники» цифровые характеристики R, G и B составили 155,7, 149,4 и 207,4, что статисти-

чески значимо отличалось от контроля. Коэффициент вариации у полученных образцов был менее 10 %, что говорит о незначительной изменчивости вариационного ряда, т. е. об однородности и стабильности окраски полученных мутантов.

Таблица 3

Результаты компьютерного сканирования коллекции мутантных линий *Linum usitatissimum* L. по признаку окраски лепестков венчика

Окраска цветка	Красный (R)	Коэффициент вариации R, %	Зеленый (G)	Коэффициент вариации G, %	Синий (B)	Коэффициент вариации B, %
Контроль, 'Айсберг'	232,6± 1,40	1,35± 0,004	227,8± 1,35	1,33± 0,004	227,5± 1,02	1,00± 0,003
Светло-голубые лепестки, белые пыльники	189,2± 2,09***	2,47± 0,008	189,2± 1,33***	1,57± 0,005	222,8± 1,07*	1,08± 0,003
Голубые лепестки, голубые пыльники	155,7± 2,42***	3,48± 0,011	149,4± 1,65***	2,47± 0,008	207,4± 1,05***	1,13± 0,004
Контроль 'Солнечный'	171,4± 2,84	3,70± 0,012	164,9± 2,63	3,57± 0,011	215,5± 1,19	1,23± 0,004
Светло-розовые лепестки, кремовые пыльники	234,1± 0,47***	0,45± 0,001	215,4± 0,72***	0,75± 0,002	226,7± 0,51***	0,51± 0,002
Белые лепестки, кремовые пыльники	234,8± 0,83***	0,79± 0,002	227,6± 1,00***	0,98± 0,003	231,6± 1,10***	1,06± 0,003

Примечание: *, **, *** — отличия от контроля статистически значимы с вероятностью 95, 99 и 99,9 % соответственно.

У сорта 'Солнечный' характеристика окраски контрольных растений составила в красном цвете (R) — 171,4, в зеленом (G) — 164,9 и в синем (B) — 215,5. У мутантной линии типа «светло-розовые лепестки, кремовые пыльники» показатели R, G и B были на уровне 234,1, 215,4 и 226,7 соответственно, что существенно отличалось от контрольной окраски. У растений, несущих мутацию «белые лепестки, кремовые пыльники», цифровые характеристики R, G и B составили 234,8, 227,6 и 231,6 соответственно. У сорта 'Солнечный' две мутантные линии «светло-розовые лепестки, кремовые пыльники» и «белые лепестки, кремовые пыльники» различались только по двум компонентам окраски — G и B, по компоненту R различия между ними были в пределах ошибки. Коэффициент вариации описанных выше мутантных образцов составил менее 10 % (табл. 3), что свидетельствует о незначительной изменчивости цифровых характеристик изучаемого мутантного признака.

Таким образом, компьютерный анализ цифровых параметров окраски лепестков дает возможность оценить их однородность по колориметрическим характеристикам. Любой независимый исследователь,

используя современные инструментальные технологии и получив цветные данные RGB, сможет иметь реальное представление об окраске лепестков и дать объективную оценку их цвета не просто на основе визуальной оценки, но и по соответствующим числовым значениям.

Выводы. 1. Мутагены ДГ-2, ДГ-6, ДГ-7, ДГ-9, а также ДМС и ЭМС в концентрациях 0,5 и 0,05 % индуцировали изменения в окраске лепестков венчика и пыльников у обоих изученных сортов льна масличного. Частота таких изменений, вызванная новыми химическими мутагенами — производными диметилсульфата у сорта 'Айсберг' составила от 0,94 до 3,85 %, а у сорта 'Солнечный' — от 0,97 до 6,80 %.

2. Наиболее эффективным из серии ДГ оказался новый мутаген ДГ-2 в концентрации 0,05 %, обработка которым индуцировала появление мутаций с максимальной частотой 3,85 % у сорта 'Айсберг' и 6,80 % у сорта 'Солнечный'.

3. Проанализированы различные окраски лепестков ряда мутантных линий льна с использованием инструментальных технологий и установлены их числовые характеристики в каналах красного, зеленого и синего цветов спектра.

4. Полученные числовые характеристики цвета характеризуются достаточно малым варьированием, что позволяет использовать данную технологию для надежной идентификации образцов льна, различающихся по окраске лепестков или других частей растения.

СПИСОК БИБЛИОГРАФИЧЕСКИХ ССЫЛОК

1. Лях В. А., Полякова И. А., Сорока А. И. Индуцированный мутагенез масличных культур. Запорожье: ЗНУ, 2009. 266 с.
2. Моргун В. В., Логвиненко В. Ф. Мутационная селекция пшеницы. К.: Наук. думка, 1995. 625 с.
3. Опалко А. І., Опалко О. А. Індуковані мутації рослин: історія і перспективи. Індукований мутагенез в селекції рослин. 2012. С. 38–45.
4. Raina A., Laskar R., Khurshed S., Amin R., Tantray Y., Parveen K., Khan S. Role of Mutation Breeding in Crop Improvement — Past, Present and Future. Asian Research Journal of Agriculture. 2016. Vol. 2(2). P. 1–13.
5. Micke A., Donini B., Maluszynskiy M. Induced mutations for crop improvement. Mutation breeding. 1990. Vol. 7. P. 1–41.
6. Маслинская М. Е., Андроник Е. Л. Исходный материал с маркерными морфологическими признаками для селекции льна масличного. Масличные культуры. 2011. Вып. 1 (146–147). С. 49–52.
7. Пороховинова Е. А. Генетический контроль морфологических признаков проростков, плода и семян у льна (*Linum usitatissimum* L.). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012. Т. 16, № 4/2. С. 936–947.
8. Лях В. О., Мищенко Л. Ю., Полякова И. А. Генетическая коллекция вида *Linum usitatissimum* L.: каталог. Запорожье, 2003. 60 с.
9. Ягло М. Н., Поляков В. А., Лях В. А. Характеристика окраски семян льна с применением современных инструментальных технологий. Вісник Запорізького національного університету. 2014. № 1. С. 39–46.

10. Хохлов О. М. Застосування програми аналізу зображень ImageJ в дослідженнях об'єктів сортовивчення. Виноградарство і виноробство. 2009. С. 179–185.
11. Цевма В. М., Хохлов А. Н. Морфометрическая характеристика зерен пшеницы средствами «Машинного видения». Сборник научных трудов СГИ–НЦСС. Одесса, 2009. Вып. 14 (54). С. 182–189.
12. Ведмедева К. В., Кирпичева Н. М. Результаты изучения коллекции линий подсолнечника по признаку окраски краевых цветков. Наук.-техн. бюл. Института олійних культур НААН. 2014. № 21. С. 22–27.
13. Talebi Ali B., Talebi Amin B., Shahrokhifar B. Ethyl Methane Sulphonate (EMS) Induced Mutagenesis in Malaysian Rice (cv.MR219) for Lethal Dose Determination. American Journal of Plant Sciences. 2012. Vol. 3. P. 1661–1665.
14. Rajarajan D., Saraswathi R., Sassikumar D., Ganesh S. Fixation of lethal dose and effect of Ethyl Methane Sulphonate induced mutagenesis in Rice Adt (R) 47. Life Sciences Leaflets. 2014. Vol. 57. P. 65–72.
15. Luan Y. S., Zhang J., Gao X. R., An L. J. Mutation Induced by Ethylmethanesulphonate (Ems), in Vitro Screening for Salt Tolerance and Plant Regeneration of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2007. Vol. 88 (1). P. 77– 81.
16. Deepthi T., Remesh K. N. Impact of EMS Induction on Morphological, Anatomical and Physiological Traits of Bhindi *Abelmoschus Esculentus* (L.) Moench. International Journal of Recent Research in Life Sciences (IJRRLS). 2016. Vol. 3. P. 4–11.
17. Пат. 87462 Україна, МПК А01G 7/00 Спосіб визначення забарвлення крайових квітів соняшнику. Ведмедева К. В. — № u2013 09730; заяв. 05.08.2013; опубл. 10.02.2014. Бюл. № 3.
18. Литтл Т., Хиллз Ф. Сельскохозяйственное опытное дело. Планирование и анализ. М.: Колос, 1981. 320 с.
19. Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 351 с.
20. Мармоза А. Т. Теорія статистики. К.: Центр учбової літератури, 2013. 592 с.

Надійшла 05.12.2017

UDC 631.527.528.62:633.854.54

Tigova A. V., Soroka A. I., Dulniev P. G. Institute of oil-bearing cultures of NAAS, Institute of bioorganic chemistry and petrochemistry of NAS of Ukraine

e-mail: anna.tigova@gmail.com

FLOWER PETAL AND ANTHHER COLOR MUTATIONS OF FLAX OIL SEED (*LINUM USITATISSIMUM* L.) PLANTS UNDER NEW CHEMICAL MUTAGENS TREATMENT

The article presents the results describing the frequency and spectrum of mutations in the color of petals of the corolla and anthers in the M_2 generation of *Linum usitatissimum* L., under the action of new chemical mutagens DG-2, DG-6, DG-7, DG-9, in comparison with DMS and EMS, as well as the numeri-

cal values of the RGB color scheme obtained by direct scanning of the petals of the mutant lines. Significant differences were found between the color of the flower of the control plants and the obtained mutant lines for RGB color characteristics.

УДК 631.527.528.62:633.854.54

¹Тігова А. В., ¹Сорока А. І., ²Дульнев П. Г. ¹Інститут олійних культур НААН, Запоріжжя, ²Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ

e-mail: anna.tigova@gmail.com

ЗМІНИ ЗАБАРВЛЕННЯ ПЕЛЮСТОК ВІНОЧКА І ПИЛЯКІВ У ЛЬОНУ ОЛІЙНОГО (*LINUM USITATISSIMUM* L.) ЗА ЗАСТОСУВАННЯ НОВИХ ХІМІЧНИХ МУТАГЕНІВ

Представлені результати, що описують частоту і спектр мутацій забарвлення пелюсток віночка і пиляків у поколінні M_2 у *Linum usitatissimum* L. під дією нових хімічних мутагенів ДГ-2, ДГ-6, ДГ-7, ДГ-9 у порівнянні з ДМС та ЕМС, а також числові значення кольорової схеми RGB, отримані при скануванні пелюсток мутантних ліній. Виявлено суттєві відмінності між забарвленням квітки контрольних рослин та отриманих мутантних ліній за характеристиками кольору в системі RGB.