

УДК: 582.751.42:581.154

ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ МУТАЦИЙ ХЛОРОФИЛЛДЕФИЦИТНОСТИ НА РАННИХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА ЛЬНА МАСЛИЧНОГО

Полякова И.А., к.б.н., доцент, Яранцева В.В., магистр,
Левчук А. Н., ассистент, Лях В.А., д.б.н., профессор

Запорожский национальный университет

В статье приведено описание фенотипического проявления 9 типов хлорофиллдефицитных мутаций льна масличного: *albina*, *xantha*, *chlorina*, *viridis*, *lutescent*, *striata*, *xanthoviridis*, *xanthocorroded*, *albocorroded*. Установлено сильное отставание в росте и развитии большинства линий с хлорофилльной недостаточностью в сравнении с зелеными растениями. Наибольшей угнетенностью характеризуются мутантные линии, относящиеся к типам *xantha* и *xanthocorroded*. У линий типа *chlorina* не выявлено угнетенности по высоте растения, при этом отмечено существенное удлинение периода «всходы-цветение».

Ключевые слова: *Linum humile* Mill., хлорофиллдефицитная мутация, фенотипическое проявление, стадия семядольных листьев, стадия «ранней елочки», степень угнетения.

Полякова І.О., Яранцева В.В., Левчук Г. М., Лях В.О. Фенотиповий прояв мутацій хлорофілдефіцитності на ранніх етапах онтогенезу льону олійного / Запорізький національний університет, Україна.

У статті наведено опис фенотипового прояву 9 типів хлорофілдефіцитних мутацій льону олійного: *albina*, *xantha*, *chlorina*, *viridis*, *lutescent*, *striata*, *xanthoviridis*, *xanthocorroded*, *albocorroded*. Встановлено сильне відставання в рості і розвитку більшості ліній з хлорофільною недостатністю в порівнянні з зеленими рослинами. Найбільшою пригніченістю характеризуються мутантні лінії, які відносяться до типів *xantha* і *xanthocorroded*. У лінії типу *chlorina* не виявлено пригніченості за висотою рослин, однак відмічено суттєве збільшення періоду «сходи-цвітіння».

Ключові слова: *Linum humile* Mill., хлорофілдефіцитна мутація, фенотиповий прояв, стадія сім'ядольних листків, стадія «ранньої ялинки», ступінь пригнічення.

Polyakova I.A., Yaranceva V.V., Levchuk A.N., Lyakh V.A. Phenotypical appearance of chlorophyll-deficient mutations at early stages of ontogenesis in oil flax / Zaporizhzhya National University, Ukraine

Article describes phenotypical appearance of 9 types of chlorophyll-deficient mutations in oil flax: *albina*, *xantha*, *chlorina*, *viridis*, *lutescent*, *striata*, *xanthoviridis*, *xanthocorroded*, *albocorroded*. A considerable lagging in growth and development of the most lines with a chlorophyll deficiency compared to green plants is established. The most significant lagging is shown for *xantha* and *xanthocorroded* mutant lines. For *chlorina*-type lines the inhibition of plant height did not reveal, but a significant increase in 'emergence – flowering' period was found.

Key words: *Linum humile* Mill., chlorophyll-deficient mutation, phenotypical appearance, cotyledon stage, initial growth stage, degree of depression.

ВВЕДЕНИЕ

Мутации, полученные экспериментальным путем в течение многих десятилетий, успешно используют в генетико-селекционных работах во многих странах мира. По данным академика В.В. Моргуна к настоящему времени создано более 31 тыс. мутантов, охватывающих 130 видов растений [1]. Полученные мутанты каталогизируются, сохраняются и поддерживаются, они доступны для использования исследователями различных стран [2]. Все полученные мутантные формы, прежде чем могут быть использованы в селекции, должны пройти всестороннее генетическое изучение.

Хлорофилльные мутанты имеют значительные морфологические изменения окраски растений. Принято считать, что они являются результатом точечных рецессивных мутаций [3]. Однако существуют предположения, что причиной нарушения синтеза хлорофилла также могут быть пластидные мутации и хромосомные aberrации [по 1].

В течение многих лет хлорофиллдефицитные мутанты являются удобной моделью для изучения процессов фотосинтеза и структур, которые принимают в нём непосредственное участие [4, 5]. Описано более чем 200 генов, контролирующих синтез хлорофилла [6].

У многих растений установлено, что некоторые свойства хлоропластов – органелл, содержащих хлорофилл, – находятся под двойным контролем, с одной стороны, ядерных генов, а с другой – ДНК хлоропластов [1].

В настоящее время выделены мутанты с хорошо развитой структурой хлоропластов и высокой продуктивностью, на основе чего сделано заключение о возможности влияния на продуктивность растений путем воздействия на хлоропласты [7].

Генетика льна изучена недостаточно [8]. Известно всего около 60 генов, которые контролируют разные признаки, при этом многие из них, возможно, аллельны [9]. Лен не имеет большого морфологического разнообразия, поэтому для изучения частной генетики данной культуры актуальным является поиск новых генов, которые влияют на морфологические признаки.

При использовании индуцированного мутагенеза у ряда генотипов льна масличного (*Linum humile* Mill.) нами была выделена серия мутаций хлорофиллдефицитности различных типов. Эти мутанты имеют различное морфологическое проявление на одних и тех же стадиях развития [10,11]. На данный момент проводится разносторонняя работа, как по изучению данной группы мутантов, так и по вовлечению их в селекционный процесс [12, 13, 14].

Целью настоящей работы было выявить особенности фенотипического проявления мутаций хлорофиллдефицитности различных типов на ранних этапах онтогенеза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала использовали линии льна масличного с различным проявлением хлорофилльной недостаточности из коллекции кафедры садово-паркового хозяйства и генетики растений Запорожского национального университета. Большинство линий были получены нами в результате проведения исследований по индуцированному мутагенезу [10, 12]. Выделенные мутантные линии были проверены на константность в течение ряда лет во многих поколениях.

На протяжении 2003-2013 гг. у растений данных линий анализировали ряд морфологических и физиологических признаков растений, характеризующих особенности их роста и развития в полевых условиях. При этом учитывали высоту растения, количество боковых стеблей и продолжительность периода «всходы-цветение».

Математическую обработку проводили по общепринятым методикам статистической обработки экспериментальных данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В наших исследованиях хлорофиллдефицитные мутации различаются как по фенотипическому проявлению, так и по степени угнетенности мутантного растения от летальных до нормально жизнеспособных растений (табл. 1, 2; рис.1, 2).

При характеристике хлорофиллдефицитных изменений мы пользовались классификацией хлорофилльных мутаций, разработанных на колосовых зерновых [1]. На наш взгляд, данная классификация достаточно точно определяет выделенные нами хлорофилльные изменения, хотя в отдельных случаях требуются уточнения из-за разницы в строении стебля и листьев у льна и злаков. Так, изначально нами была обозначена большая группа растений типа *viridis* [10]. В дальнейшей работе мы уточнили особенности проявления и наследования отдельных типов и предлагаем выделить из этой группы часть линий, учитывая особенности проявления мутаций на ранних этапах онтогенеза.

Таблица 1 – Фенотипическое проявление хлорофиллдефицитных мутаций у растений льна масличного на ранних этапах онтогенеза

Тип мутации	Образец	Происхождение		Проявление признака	
		генотип	доза	стадия семядольных листьев	стадия «ранней елочki»
<i>albina</i>	МС-78	МС-2	Спонтанный	Семядоли и 1-2 пары настоящих листьев белые.	Погибает в фазе всходов
-	Циан	-	-	Семядольные листья зеленые. Гипокотиль без антоциана	Все растение зеленое
<i>xanthocorroded</i>	М-70	Сорт Циан	400 Гр	Семядольные листья зеленые	Листья деформированы, край листа подсыхает и сворачивается
<i>lutescent</i>	М-79	Сорт Циан	400 Гр	Семядольные листья зеленые. Гипокотиль без антоциана	Верхняя часть растения светло-зеленая с желтым оттенком, остальная часть растения зеленая
<i>lutescent</i>	М-80	Сорт Циан	400 Гр	Семядольные листья зеленые Гипокотиль без антоциана.	Верхняя часть растения светло-зеленая с желтым оттенком, остальная часть растения зеленая
<i>xantha</i> ген white-yellow-green (<i>wyg</i>) [15]	М-81	Сорт Циан	400 Гр	Семядольные листья светло-зеленые с беловатой жилкой. Настоящие листья светло-желтые. Гипокотиль без антоциана.	Верхняя часть растения желтая; в средней части окраска плавно переходит в светло-зеленую с белой жилкой листьев; нижняя светло-зеленая
<i>lutescent</i>	М-127	Сорт Циан	ЭМС	Семядольные листья зеленые. Гипокотиль без антоциана.	Верхняя часть растения светло-зеленая с желтым оттенком, остальная часть растения зеленая
<i>xantha</i>	М-206	Сорт Циан	400 Гр	Семядольные листья светло-зеленые с беловатой жилкой. Настоящие листья светло-желтые. Гипокотиль без антоциана.	Верхняя часть растения желтая; в средней части окраска плавно переходит в светло-зеленую с белой жилкой листьев; нижняя светло-зеленая
-	М-24	Сорт Циан	700 Гр	Семядольные листья зеленые. Гипокотиль без антоциана.	Все растение зеленое
<i>xanthoviridis</i> ген dirty-yellow-green (<i>dyg</i>) [16]	М-84	Линия М-24	700 Гр	Семядольные листья желто-зеленые. Настоящие листья желто-зеленые. Гипокотиль с антоцианом.	Верхняя часть растения зеленовато-желтая; в средней части окраска листьев неровными желто-зелеными пятнами; нижняя часть растения зелено-желтая
-	К-6080	-	-	Семядольные листья зеленые. Гипокотиль без антоциана.	Растение зеленое
<i>striata</i>	М-83	Линия К-6080	400 Гр	Семядольные листья зеленые. Гипокотиль без антоциана.	Растение зеленое, листья имеют желтоватую жилку и продольные тонкие

Тип мутації	Образец	Происхождение		Проявление признака	
		генотип	доза	стадия семядольных листьев	стадия «ранней елочки»
					белые полосы
-	Л-3	-	-	Семядольные листья зеленые. Гипокотиль с небольшим количеством антоциана.	Растение зеленое
<i>chlorina</i>	М-28	Линия Л-3	700 Гр	Семядольные листья желто-зеленые. Настоящие листья желто-зеленые. Гипокотиль с антоцианом.	Все растение желто-зеленое
-	Antares	-	-	Семядольные листья зеленые. Гипокотиль без антоциана.	Растение зеленое
<i>viridis</i> ген light-green (<i>lg1</i>) [17]	М-5	сорт Antares	400 Гр	Семядольные листья зеленые. Гипокотиль без антоциана.	Окраска листьев бледно-зеленая
<i>chlorina</i>	ЛР – 5	М-5× М-25	-	Семядольные листья светло-желто-зеленые. Настоящие листья желто-зеленые. Гипокотиль с малым количеством антоциана.	Все растение желто-зеленое
-	Астрал	-	-	Семядольные листья зеленые. Гипокотиль с антоцианом.	Растение зеленое
<i>albocorroded</i>	М 202	сорт Астрал	-	Семядольные листья зеленые. Настоящие листья бело-зеленые, некротичные. Гипокотиль с антоцианом.	Растение зеленое, листья выглядят некротичными, подсыхающими.

Как видно из таблицы 1, нами выделено 9 типов хлорофилльных мутаций согласно их фенотипическому проявлению на ранних этапах онтогенеза льна масличного:

- 1) *albina* – сеянец белый, проростки слабые. При достаточной влажности и невысокой температуре формируется 1-2 пары настоящих листьев белого цвета. Растение погибает на стадии семядольных листьев;
- 2) *xantha* – семядольные листья светло-зеленые с беловатой жилкой. Настоящие листья светло-желтые. Самые яркие часто погибают. Сильно отстают в росте и развитии;
- 3) *chlorina* – семядольные листья желто-зеленые. Появляющиеся настоящие листья также желто-зеленые и по мере роста растение не меняет цвет;
- 4) *viridis* – семядольные листья зеленые. Настоящие листья и все растение бледно-зеленое, тонкое. Наблюдается отставание в росте;
- 5) *lutescent* – семядольные листья зеленые. При дальнейшем росте четко выделяется светло-зеленая с желтым оттенком верхняя часть растения, остальное растение при этом остаётся зеленым. Наиболее подходит к описанию изменения типа “золотистая верхушка»;
- 6) *striata* – семядольные листья зеленые. Растение зеленое, листья имеют желтоватую жилку и продольные тонкие белые полосы;
- 7) *xanthoviridis* – семядольные и первые настоящие листья желто-зеленые. При дальнейшем росте верхняя часть растения приобретает зеленовато-желтую окраску, в средней части

листья окрашиваются неравными желто-зелеными пятнами, а нижняя часть растения также зелено-желтая;

- 8) *xanthocorroded* – семядольные листья зеленые. Настоящие листья желто-зеленого цвета и деформированы, край листа подсыхает и сворачивается. Растение сильно угнетено;
- 9) *albocorroded* – семядольные листья зеленые. Настоящие листья бело-зеленые, поврежденные, с сильным проявлением некротичности. Растение сильно угнетено.

Таблица 2 – Проявление некоторых морфологических и физиологических признаков у минус-хлорофилльных мутантов

Тип мутации (образец)	Период «всходы-цветение», дн.	Высота, см.	Количество боковых стеблей, шт.
контроль (Циан)	42,3 ± 0,79	56,1 ± 2,65	2,1 ± 0,25
<i>xanthocorroded</i> (M-70)	59,8 ± 2,97***	22,6 ± 3,58***	1,4 ± 0,20**
<i>lutescent</i> (M-80)	49,8 ± 1,12***	44,3 ± 1,71***	1,5 ± 0,08*
<i>xantha</i> (M-81)	58,6 ± 2,93***	34,6 ± 0,98***	0,3 ± 0,05***
контроль (M-24)	43,1 ± 1,30	58,3 ± 2,53	2,1 ± 0,35
<i>xanthoviridis</i> (M-84)	53,7 ± 1,96***	45,8 ± 1,43**	1,2 ± 0,11***
контроль (Л-3)	53,4 ± 1,84	62,9 ± 1,16	3,5 ± 0,50
<i>chlorina</i> (M-28)	60,9 ± 1,65**	66,3 ± 1,24**	3,4 ± 0,25
<i>chlorina</i> (ЛР-5)	59,1 ± 0,91**	60,5 ± 1,83	1,7 ± 0,19***

Примечание: *, **, *** – отличия от контроля существенны при $P < 0,05, 0,01$ и $0,001$, соответственно.

Как известно, фотосинтез играет важную роль в продукционном процессе из-за его тесной связи с процессами роста, развития, дыхания, водного и минерального питания. Нами установлено сильное отставание в росте и развитии всех мутантных линий в сравнении с контрольными растениями (табл. 2). Как видно из представленных результатов, угнетение мутантов проявлялось в существенном увеличении периода «всходы-цветение», снижении высоты растения и количества боковых стеблей. Так например, задержка цветения составила от 17,5 дн. у линии M-70 до 5,7 дн. у образца ЛР-5. Снижение высоты растений было значительным у большинства мутантных линий, особенно у M-70 (40,3 %) и M-81 (38,3 %). Наибольшее снижение количества боковых стеблей на растении зафиксировано также у этих генотипов. Оно составило всего 0,3 шт. у M-81 и 1,4 шт. у M-70 в сравнении с 2,1 шт. у сорта Циан.

У линий типа *chlorina* не выявлено угнетенности по высоте растения, при этом у линии M-28 отмечено существенное увеличение данного показателя. Для линий этого типа хлорофилльных мутаций характерным есть удлинение периода «всходы-цветение» на 5,7 дн. у ЛР-5 и 7,5 дней у линии M-28.

Гибель и пониженная жизнеспособность являются одной из причин генетической не изученности большинства хлорофилльных мутантов. Нами проведено изучение наследования некоторых из полученных нами мутаций и присвоены символы впервые описанным генам: гену окраски, вызывающему тип мутации *xantha*, присвоен символ white-yellow-green – *wyg* (бело-желто-зеленый) [15]; ген окраски, отвечающий за характерную окраску листьев растений льна грязно-желтыми пятнами, был назван dirty-yellow-green – *dug* [16]; мутация типа *viridis*, вызывающая бледно-зеленую окраску растений льна, была названа нами light-green, а гену присвоен символ *lg1* [17]. Установлено, что данные признаки имеют рецессивное моногенное наследование.



а) контроль (Циан)



б) *albina* (MC-78)



в) *xantha* (M-81)



г) *xanthoviridis* (M-84)



д) *chlorina* (M-28)



ж) *chlorina* (LP-5)



з) *albocorroded* (M-202)



и) *striata* (M-83)

Рисунок 1 – Фенотипическое проявление мутаций хлорофиллдефицитности у растений льна масличного на стадии всходов:
а) контроль (Циан); б) *albina* (MC-78); в) *xantha* (M-81); г) *xanthoviridis* (M-84); д) *chlorina* (M-28); ж) *chlorina* (LP-5); з) *albocorroded* (M-202); и) *striata* (M-83)



а) контроль (Циан)



б) *lutescent* (M-80)



в) *xantha* (M-81)



г) *xanthoviridis* (M-84)



д) *chlorina* (M-28)



ж) *chlorina* (LP-5)



з) *albocorroded* (M-202)



и) *striata* (M-83)

Рисунок 2 – Фенотипическое проявление хлорофиллдефицитных мутаций у растений льна масличного на стадии «ранней елочки»:
а) контроль (Циан); б) *lutescent* (M-80); в) *xantha* (M-81); г) *xanthoviridis* (M-84); д) *chlorina* (M-28); ж) *chlorina* (LP-5); з) *albocorroded* (M-202); и) *striata* (M-83)

Сведения о генетической природе мутантов являются необходимыми и для составления планов их дальнейшего использования в селекционной практике. Кроме того интерес к изучению хлорофиллдефицитных растений объясняется возможностью использования таких растений при выяснении значения различных пигментов хлоропластов для фотосинтеза. Ранее было установлено [18], что хлорофилльные мутанты могут участвовать как партнеры при скрещивании на гетерозис. Интересен тот факт [19], что карлики и хлорофилльные мутанты, у которых мутантный ген в гомозиготном состоянии часто вызывает депрессию, при скрещивании с сортами дают значительный гетерозис по продуктивности.

Известно, что гены, детерминирующие мутации типа *xantha*, *albina* и *viridis*, могут вызывать изменение различных биохимических свойств хлоропластов (отсутствие образования протохлорофиллов, блокирование превращения их в хлорофилл и т.д.) [6], а также определять появление у хлоропластов различных морфологических дефектов [20].

ВЫВОДЫ

1. В зависимости от фенотипического проявления на ранних этапах онтогенеза у льна масличного выделено 9 типов хлорофиллдефицитных мутаций: *albina*, *xantha*, *chlorina*, *viridis*, *lutescent*, *striata*, *xanthoviridis*, *xanthocorroded*, *albocorroded*.
2. Установлено сильное отставание в росте и развитии большинства линий с хлорофилльной недостаточностью в сравнении с контрольными растениями. Наибольшей угнетенностью характеризуются мутантные линии, относящиеся к типам *xantha* и *xanthocorroded*.
3. У линий типа *chlorina* не выявлено угнетенности по высоте растения, при этом отмечено существенное удлинение периода «всходы-цветение» на 5,7 дн. у ЛР-5 и 7,5 дней у линии М-28.

ЛИТЕРАТУРА

1. Моргун В.В. Мутационная селекция пшеницы / В.В. Моргун, В.Ф. Логвиненко. – Киев: Наукова думка, 1995 -652 с.
2. Singh R.B. Genetic analysis of mutated adult pea plants (*Pisum sativum* L.) // Int.Symp.Induced Mutat.Tool Crop Plant Improv., Vienna, 1981. Extended Sunop. – Vienna, s.a. – P. 93-26.
3. Валева С.А. Принципы и методы применения радиации в селекции растений / С.А. Валева. – М.: Атомиздат. – 1967. – 88 с.
4. Ладыгин В.Г. Роль комплексов фотосистем в ультраструктурной организации хлоропластов мутантов гороха / В.Г. Ладыгин, Г.А. Семенова // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 5. – С. 672-682.
5. Рассадина В.В. Активность системы биосинтеза хлорофилла и структурно-функциональная организация хлоропластов в пластомном мутанте подсолнечника *en: clorina -5* / В.В. Рассадина, А.В. Усатов, Г.М. Федоренко, Н.Г. Аверина // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 5. – С. 683-693.
6. Найлен Р.А. Природа индуцированных мутаций у высших растений // Генетика. – 1967. – № 7. – С. 3-21.
7. Ладыгин В.Г., Тагеева С.В., Семенова Г.А. Селекция по физиологическим тестам на фотосинтетическую продуктивность // Фотосинтез и продукционный процесс. – М., 1988. – С. 252-257.
8. Кутузова С.Н. Генетика льна / С.Н. Кутузова // Генетика культурных растений. – Санкт-Петербург, 1998. – С. 6-52.
9. Пороховинова Е. А. Создание и изучение генетической коллекции льна (*Linum usitatissimum* L.): автореф. диссер. на соискание уч.степ.канд. биол. наук: спец. 03.00.15 «Генетика» / Е. А. Пороховинова. – Санкт-Петербург, 2002. – 18 с.

10. Полякова И.А. Наследственная изменчивость у льна масличного, индуцированная гамма-излучением: дис. кандидата биол. наук: 03.00.15 «Генетика» / Ирина Алексеевна Полякова. – Киев, 2003. – 166 с.
11. Лях В.А. Генетическая коллекция вида *Linum usitatissimum* L. (каталог)/ В.А. Лях, Л.Ю. Мищенко, И.А. Полякова. – Запорожье, 2003. – 60 с.
12. Лях В.А. Индуцированный мутагенез масличных культур/ В.А. Лях, И.А. Полякова, А.И. Сорока. – Запорожье: ЗНУ, 2009. – 266 с.
13. Лях В.А. Динамика пигментного комплекса у хлорофилльных мутантов льна / В.А. Лях, Н.В. Онуфриева, И.А. Полякова // Физиология и биохимия культурных растений. – 2007. – 39, № 6. – С. 531-537.
14. Левчук А.Н. Особенности морфологии пластидного аппарата хлорофилльных мутантов льна масличного / А.Н. Левчук, И.А. Полякова, Е.Н. Войтович, В.А. Лях // Физиология и биохимия культурных растений. – 2012. – Т. 44. – № 3. – С. 232-239.
15. Полякова И.А. Хлорофилльная мутация *xantha*, индуцированная гамма-лучами у льна масличного/ И.А. Полякова, В.А. Лях // Сб. науч. материалов «Льноводство: Реалии и перспективы». – Могилев, 2008. – С. 127-130.
16. Полякова И.А. Наследование хлорофильной мутации *xanthoviridis* у льна масличного / И.А. Полякова // Наук.-техн. бюл. ЮК УААН. – 2009. – Вып. 14. – С. 52-56.
17. Полякова И.А. Мутация *viridis*, индуцированная у льна масличного / И.А. Полякова // Вісник ЗНУ. – 2008. – № 2. – С. 87- 90.
18. Сальникова Т.В. Факторы, влияющие на спектр и типы мутантов при химическом мутагенезе (на примере мутантных сортов) / Т.В. Сальникова // Химический мутагенез и качество сельскохозяйственной продукции. – М.: Наука, 1983. – С. 38-51.
19. Сальникова Т.В. Использование хемомутантов сельскохозяйственных растений в скрещиваниях как способ повышения эффективности мутационной селекции / Т.В. Сальникова // Новые сорта, созданные методом химического мутагенеза. – М.: Наука, 1988. – С. 30-50.
20. Henningsen Knud W., Boynton J.E., Wettstein D. von., Boardman N.K. Nuclear Genes Controlling Chloroplast Development in Barley // Biochem. Gene Express. High. Organisms. – Dordrecht; Boston, 1972. – P. 457-478.