

УДК: 575.224.2:581.132.1:582.741:581.142-035.83

ВПЛИВ ЛЕТАЛЬНОЇ ХЛОРОФІЛЬНОЇ МУТАЦІЇ ТИПУ «ALBINA» НА ОЗНАКИ ПРОРОСТКІВ ЛЬОНУ ОЛІЙНОГО ТА ЇЇ УСПАДКУВАННЯ

Вайло В. В., Лях В. О.

*Запорізький національний університет
Україна, 69600, м. Запоріжжя, вул. Жуковського, 66*

vaival@bk.ru

Представлені результати вивчення спадкування хлорофільної мутації типу «albina» та її вплив на проростання насіння у льону олійного. Отримано два типи проростків, які різко відрізнялись один від одного забарвленням сім'ядольних листків. Хлорофільна зміна завжди летальна і має прояв у вигляді проростків з білими сім'ядольними листками. Дана мутація контролюється одним рецесивним геном. Показано, що вплив мутаційного змінення на ознаки проростка відсутній.

Ключові слова: льон, мутація, летальні гени, проросток, хлорофіл, albina

ВЛИЯНИЕ ЛЕТАЛЬНОЙ ХЛОРОФИЛЬНОЙ МУТАЦИИ ТИПА «ALBINA» НА ПРИЗНАКИ ПРОРОСТКОВ ЛЬНА МАСЛИЧНОГО И ЕЕ НАСЛЕДОВАНИЕ

Вайло В. В., Лях В. А.

Запорожский национальный университет, Украина, 69600, г. Запорожье, ул. Жуковського, 66

Представлены результаты изучения наследования хлорофильной мутации типа «albina» и ее влияние на прорастание семян у льна масличного. Получены два типа проростков, которые резко отличались друг от друга окраской семядольных листьев. Хлорофильное изменение всегда летально и проявляется в виде проростков с белыми семядольными листьями. Данная мутация контролируется одним рецессивным геном. Показано, что влияние мутационного изменения на признаки проростка отсутствует.

INFLUENCE OF LETHAL CHLOROPHYLL MUTATION OF “ALBINA” TYPE ON SEEDLING CHARACTERS IN OIL FLAX AND ITS INHERITANCE

Vaylo V., Lyakh V.

Zaporizhzhya national university, Ukraine, 69600, Zaporizhzhya, Zhukovskogo Street 66.

Changes in hereditary material in result of replication, reparation, recombination systems' mistakes are called mutations. Their appearance becomes apparent through characters (morphology, productivity, reaction on different factors of outdoor environment etc.) changes. Some developmental disorders with mutation cause organism death. Genes that cause such disorder are called lethal. If different lethal genes are present, organisms die at different stages of development. As a rule lethal effect of such genes is recessive and becomes apparent only when they are in homozygous state.

Genome of higher plants has more than 200 genes that are responsible for chlorophyll and other pigments synthesis in plants. Mutation of each of them results in pigmentation disorders, even to its complete absence (“albina” type). In natural conditions spontaneous appearance of such mutations observed with very low frequency. In the first mutant generation these mutations do not observe, as allelic genes in homological chromosomes provide biosynthesis of pigments. Plants with mutant gene are heterozygous for this changed gene. Such plants form two types of gametes: with normal (A) and mutant gene (a). After self-pollination of these mutants three types of zygotes are created: AA, Aa, aa. Thus, in second mutant generation three types of seeds and later plants are found: homozygous normal, heterozygous, homozygous mutant (in ratio of 1:2:1 by genotype and 3:1 – by phenotype). Chlorophyll changes of lethal type allow to give an indication of the degree of variability.

Mutations that become visible on different stages of ontogenesis and influence the characters of seedling (coloration of hypocotyl, type and coloration of cotyledon, shape of first leaves), are of great interest for genetical and breeding researches. Early expression of marker traits can not only reduce the period of study, but also to conduct experiments with a large number of plants in small areas in the laboratory. Segregations that require large areas in the study of characters in adult plants can be accurately determined on the basis of seedling in a small area. Setting correlative relationships between trait that emerges on seed stage or seedling stage, and other commercially valuable characteristics, which can only emerge in adult plants (biomass, yield, etc.) can significantly speed up the breeding process by selecting the desired genotypes in early stages.

The aim of the work was to analyze the inheritance of chlorophyll mutation of “albina” type and its influence on seedling characters in oil flax. The seeds of MC-78 line of oil flax were used for research.

To achieve this goal the germination of seeds of a number of plants of the given sample in test-tubes on a bedding with moistened filter paper was conducted. Visually appearance of apochlorotic seedlings in progeny of separate plants was registered, and the amount of normal plants and amount of plants with changed color was counted up. The parameters of seedling root length and seedling cotyledon length in samples, where the segregation was observed, were measured.

Screening of plants in MC-78 line which had the mutant allele was the first step of the experiment. As a result of this screening several such plants, in heterozygotes, were isolated. In the offspring of such plants observed the seedlings that differ sharply from each other: the normal green and chlorophyll mutation of «albina» type as white or pale yellow cotyledon leaves. Sometimes the plants with chlorophyll deficiency produced the first pair of true leaves. Further development has not found, at this stage the plant of «albina» type always died. The plants with normal pigmentation continued development and formation of true leaves.

Metrics of seedlings with available mutation was not significantly changed compared with normal green plants. This indicates a lack of inhibitory effect of the mutation on the seed germination. Normal growth occurred before the development of seedlings was carried out by the power of the cotyledons.

Hybridological analysis showed that out of 54 seedlings 16 seedlings had changes of “albina” type. Hereby ratio of normal seedlings and seedlings with chlorophyll changes was about 3:1. This indicates the monogenic and recessive character of inheritance of such chlorophyll change.

Thus, the mutation of «albina» type is phenotypically clearly visible already in the phase of seedlings. Mutant plants differ in white color of cotyledon and first true leaves (no pigment). Of course, these mutations are lethal. These plants are not capable of autotrophic nutrition and die in the phase of 1-2 leaves, exhausted reserves of the endosperm. But such mutations are suitable to identify the segregation patterns. The following mutations can be successfully used in educational work for the demonstration of Mendel's laws regarding the segregation of traits.

Key words: flax, mutation, lethal gene, seedling, chlorophyll, albina

ВСТУП

Передача ознак від батьків до нащадків – процес в цілому консервативний, але ця консервативність не абсолютна. Іноді зустрічаються помилки у функціонуванні систем реплікації, репарації, рекомбінації та інших, в результаті чого кількість ДНК в дочірній клітині або послідовність нуклеотидів у ній змінюється. Ці зміни спадкового матеріалу називають мутаціями. Про їх появу можна судити по змінах ознак (морфологія, врожайність, реакція на різні фактори зовнішнього середовища тощо) [1]. У ряді випадків порушення у розвитку організму при мутації бувають настільки сильними, що організм гине. Гени, що викликають таке порушення, називаються летальними (від лат. *lethalis*– смертельний). За наявності різних летальних генів організми гинуть на різних стадіях розвитку. Зазвичай, летальна дія таких генів рецесивна, тобто проявляється лише тоді, коли вони знаходяться у гомозиготному стані [2].

У геномі вищих рослин більше 200 генів (розташованих у різних хромосомах), які відповідальні за синтез хлорофілу та інших рослинних пігментів. Мутування кожного з них призводить до тих чи інших порушень пігментації, аж до повної її відсутності (тип «*albina*»). Спонтанно в природних умовах такі мутації виникають з дуже низькою частотою. У першому мутантному поколінні (M_1) ці мутації зовні (фенотипово) не проявляються, оскільки алельні гени в гомологічних хромосомах забезпечують біосинтез пігментів (одночасне мутування обох алельних генів у двох хромосомах практично неймовірна подія). Таким чином, рослини, у яких мутував будь-який ген, є гетерозиготними з цього зміненого гену. У них утворюються два типи гамет: з нормальним (A) та з мутантним геном (a). При самозапиленні цих мутантів утворюються три типи зигот: AA, Aa, aa. Отже, у другому мутантному поколінні (M_2) виникають три типи насіння і згодом рослин: гомозиготні нормальні, гетерозиготні, гомозиготні мутантні (у співвідношенні 1:2:1 за генотипом і 3:1 – за фенотипом) [3]. Хлорофільні зміни летального типу дозволяють судити про ступінь мінливості генотипів [4].

Мутації, які проявляються на ранніх стадіях онтогенезу і впливають на ознаки сіянців (забарвлення гіпокотилу, тип та забарвлення сім'ядоль, форма перших листків), представляють особливий інтерес для селекційно-генетичних досліджень. Ці ознаки вже помітні на стадії сім'ядоль або до часу появи певної кількості справжніх листків. Ранній прояв маркерних ознак дозволяє не тільки скоротити період дослідження, а й проводити досліди з великим числом рослин на невеликих площах, в лабораторних умовах. Розщеплення, які вимагають великих площ при вивченні ознак у дорослої рослини, можуть бути точно визначені за ознакою сіянця на невеликій площі. Встановлення корелятивних зв'язків між ознакою, що виявляється на стадії насіння або сіянців, та іншими господарсько цінними ознаками, виявити які вдається тільки у дорослої рослини (об'єм біомаси, врожайність тощо), дозволяє значно прискорити селекційний процес за рахунок відбору потрібних генотипів на ранніх стадіях [5].

Мета роботи – проаналізувати спадкування хлорофільної мутації типу «*albina*» та її вплив на метричні характеристики проростків у льону олійного.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Враховуючи той факт, що льон – це один із основних найбільш доступних об'єктів досліджень, легко розмножується насінням, яке в множині дозріває в серпні-вересні і має високу ступінь схожості, для дослідження використовувалось насіння льону олійного лінії МС-78 – спонтанного мутанту лінії МС-2, яка була виділена з голландського зразка [6, 7].

Для досягнення поставленої мети проводилось пророщування насіння певної кількості рослин вказаного зразка в пробірках на підстилці зі зволоженого фільтрувального паперу [7]. Візуально реєструвалась поява безхлорофільних проростків в потомстві окремих рослин. В потомстві рослин з наявними безхлорофільними проростками підраховувалась кількість нормальних (зелених) та зі зміненою ознакою («*albina*») проростків (рис. 1). Також вимірювались параметри довжини кореня і гіпокотилу проростків зразків, в яких спостерігалось розщеплення ознак. Для аналізу розщеплення використовувався критерій χ^2 , для з'ясування впливу мутації на розвиток проростків – критерій Стьюдента [8].

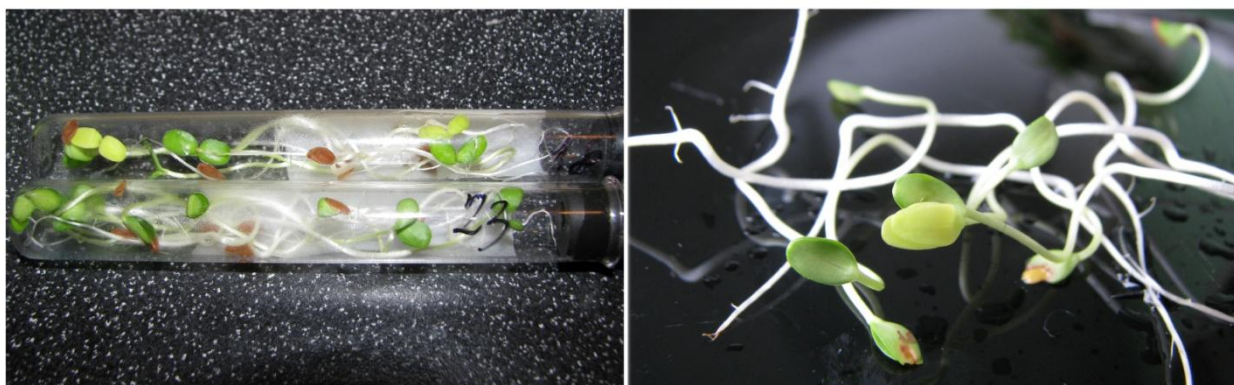


Рисунок 1 – Наявність проростків двох різних типів (зелених та з хлорофільною недостатністю типу «*albina*») у лабораторних умовах

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Оскільки рослини-носії хлорофільної мутації типу «*albina*» гинуть на певній стадії розвитку рослини, підтримка таких мутацій, як правило, здійснюється через гетерозиготи, в потомстві яких вони завжди будуть вищеплятися. Візуально розрізнити рослини-носії мутантного

алелю та рослини, які його не несуть, в обраного для досліджень зразка льону було неможливо. Всі вони були зеленими та нормально розвиненими. У зв'язку з цим початку експерименту з вивчення впливу мутації на ознаки проростку передувало скринінг рослин зразка для добору рослин-носіїв мутантного алелю. В результаті такого скринінгу було виділено кілька таких рослин, тобто гетерозигот.

В потомстві таких рослин спостерігались проростки льону, які різко відрізнялись один від одного: нормальні зелені та з хлорофільною мутацією типу «*albina*» у вигляді білих або блідо-жовтих сім'ядольних листків. Іноді починала формуватися і перша пара справжніх листків. Подальшого розвитку не відбувалося, на цій стадії рослини типу «*albina*» завжди гинули. Нормальні за пігментацією рослини продовжували розвиток і формування справжніх листків (рис. 2).

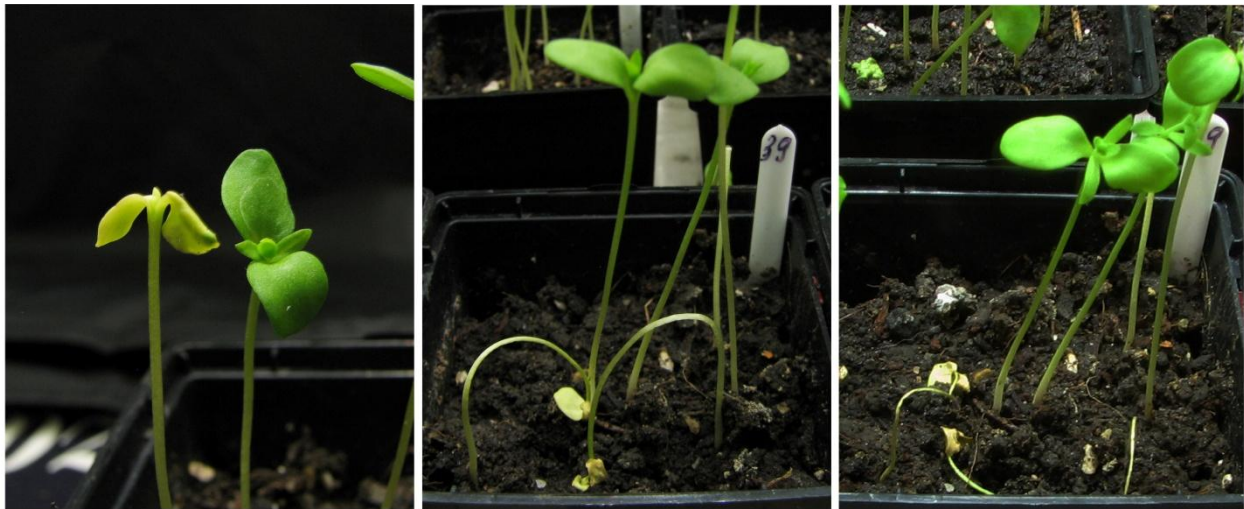


Рисунок 2 – Поступова загибель рослин з наявною мутацією типу «*albina*»

Результати вимірювань довжини окремих частин зелених проростків та проростків-носіїв хлорофільної недостатності наведені в таблиці 1.

Таблиця 1 – Метричні показники зелених проростків та проростків з наявною мутацією типу «*albina*»

Варіант	Кількість проростків	Довжина кореню, см	Довжина гіпокотилу, см
Нормальні проростки	38	4,4±0,25	3,3±0,21
Проростки-носії змінення типу « <i>albina</i> »	16	5,6±0,66 p>0,05	3,4±0,35 p>0,05

Метричні показники проростків з наявною мутацією достовірно не змінювались у порівнянні з нормальними зеленими рослинами. Так, у рослин-мутантів середнє значення довжини кореню складало $5,6 \pm 0,66$ см, а у нормальних зелених проростків $4,4 \pm 0,25$ см ($p > 0,05$). Довжина гіпокотилу у середньому складала $3,4 \pm 0,35$ см у безхлорофільних проростків та $3,3 \pm 0,21$ см у нормальних рослин ($p > 0,05$). Це свідчить про відсутність інгібуючої дії мутаційного змінення на проростання. Нормальний ріст відбувався, поки розвиток проростку здійснювався за рахунок живлення від сім'ядолей.

У таблиці 2 наведені дані результатів розщеплення у потомствах рослин з наявними хлорофільними змінами.

Таблиця 2 – Успадкування хлорофільної мутації типу «*albina*» у льону олійного

Нормальні (зелені) проростки	Проростки-носії летальної мутації « <i>albina</i> »	Модель розщеплення	χ^2
38	16	3:1	0,39

Проведений гібридологічний аналіз показав, що з 54 проростків 16 несли змінення типу «*albina*».

Таким чином, співвідношення нормальних проростків і проростків з хлорофільними змінами було близьким до 3:1. Це свідчить про моногенний і рецесивний характер успадкування даної хлорофільної зміни.

Отже, мутація типу «*albina*» фенотипово чітко проявляється вже у фазі проростків. Мутантні рослини відрізняються білим забарвленням сім'ядоліних і перших справжніх листків (відсутність пігментів). Зрозуміло, ці мутації летальні: такі рослини не здатні до автотрофного харчування і гинуть у фазі 1-2 листків, вичерпавши запаси ендосперму. Але для виявлення закономірності розщеплення ознак цього достатньо. Це дозволяє успішно використовувати такі мутації в учбовій роботі для демонстрації законів Менделя щодо розщеплення ознак.

ВИСНОВКИ

1. У льону олійного в лінії МС-78 виявлено появу успадкованої хлорофільної мутації типу «*albina*». Мутація завжди летальна і проявляється у вигляді проростків з білим сім'ядоліним листям.
2. Хлорофільна мутація типу «*albina*» є рецесивною і успадковується моногенно.
3. Інгібуючий вплив мутаційного змінення на проростання відсутній. Нормальний ріст відбувався, поки розвиток проростку здійснювався за рахунок запасів ендосперму.

ЛІТЕРАТУРА

1. Тоцький В. М. Генетика: Підручник. – Одеса: Астропринт, 2008. – 712 с.
2. Морозов Е. И. Генетика в вопросах и ответах. / Е. И. Морозов, Е. И. Тарасевич. – Мн.: Университетское, 1989. – 288 с.
3. Бабаян Р. С., Айрапетян Р. Б., Саакян М. А. Некоторые данные о природе мутации *albina* у ячменя // Генетика. – 1977. – Т. XIII. № 3. – С.435-443.

4. Бойка О. А., Лях В. О. Успадкування хлорофільної зміни типу «albina» в лунарії. / Вісник Запорізького Національного університету. Серія А: Природничі науки. – 2010. – № 2. – С. 5-7.
5. Бочарникова Н. И. Мутантний генофонд томата и его использование в селекционно-генетических исследованиях. / Вестник ВОГиС. – 2008. – Т. 12. № 4. – С. 644-653.
6. Лях В. А. Генетическая коллекция вида *Linum usitatissimum* L.: Каталог. – Запорожье: Запоріжжя, 2003. – 60 с.
7. Дьяков А. Б. Физиология и экология льна. – Краснодар: Изд-во ВНИИМК, 2006. – 215 с.
8. Лакин Г. Ф. Биометрия: учеб. пособие для биол. спец. ВУЗов / Лакин Г.Ф. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.

REFERENCES

1. Totsky V. M. Genetica: Pidruchnik. – Odessa: Astroprint, 2008. – 712 s.
2. Morozov E. I. Genetica v voprosah i otvetah. / E. I. Morozov, E. I. Tarasevich. – Mn.: Universitetskoe, 1989. – 288 s.
3. Babayan R. S., Ayrapetyan R. B., Saakyan M. A. Nekotorye dannye o prirode mutatsii albina u yachmenya // Genetika. – 1977. – Т. XIII. № 3. – S. 435-443.
4. Boyka O. A., Lyakh V. O. Uspadkuvannya hlorofilnoyi zmini tipu «albina» v lunariyi. / Visnik Zaporiz'kogo Natsional'nogo universitetu. Seriya A: Prirodnichi nauki. – 2010. – № 2. – S. 5-7.
5. Bocharnikova N. I. Mutantniy genofond tomata i ego ispol'zovanie v selektsionno-geneticheskikh issledovaniyah. / Vestnik VOGiS. – 2008. – Т. 12. № 4. – S. 644-653.
6. Lyakh V. A. Geneticheskaya kolleksiya vida *Linum usitatissimum* L.: Catalog. – Zaporozhye: Zaporizhzhya, 2003. – 60 s.
7. Dyakov A. B. Fiziologiya i ekologiya l'na. – Krasnodar: Izd-vo VNIIMK, 2006. – 215 s.
8. Lakin G.F. Biometriya: ucheb. posobie dlya biol. spets. VUZov / Lakin G.F. – M.: Vysshaya shkola, 1990. – 352 s.