

УДК: 633.854.78: 631.53.011

А.И. СОРОКА

Институт масличных культур НААН

ул. Институтская, 1, пос. Солнечный, г. Запорожье, 70417, Украина

E-mail: imkia@mail.ru

ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ ИНДУЦИРОВАННЫХ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* МУТАНТОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА ПО СПЕКТРУ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ СЕМЯН

В работе изучены по спектрам запасных белков семян мутанты подсолнечника, выделенные ранее по морфологическим маркерным признакам, полученным при обработке этилметансульфонатом незрелых зародышей двух линий подсолнечника запорожской селекции – ЗЛ-95 и ЗЛ-809. Мутанты характеризовались различным типом хлорофильной недостаточности, измененным габитусом и мутациями соцветия. Приведена характеристика этих мутантов по ряду агрономических признаков. Показано, что исследуемые мутанты различались по высоте растения и количеству дней до цветения. Изменения затрагивали и показатели массы 1000 семян и урожайности. Часть изученных морфологических мутантов подсолнечника несли изменения в спектре запасных белков семян по двум локусам. Отличия в электрофоретических спектрах мутантов от исходных линий проявлялись в высокополиморфном локусе *Hel 4*, а также двухкомпонентном локусе *Hel 6*. Проведенный электрофоретический анализ запасных белков семян, выявивший отличия в спектрах мутантов от исходных линий, дополнительно свидетельствует о генетических изменениях, произошедших у анализируемых мутантных образцов. Изученные линии представляют интерес в качестве доноров измененного габитуса растения, раннего цветения, а также легко идентифицируемых маркерных признаков. **Ключевые слова:** *подсолнечник, мутант, эмбриокультура, химический мутаген, электрофорез запасных белков семян, агрономические признаки.*

ВВЕДЕНИЕ

Имеющееся генетическое разнообразие подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) в настоящее время не удовлетворяет запросы селекции. В связи с этим ведется постоянный поиск путей его увеличения. Наиболее часто с этой целью используют искусственное индуцирование наследуемых изменений либо привлекают генетические ресурсы близких видов.

Использование мутагенов *in vitro* может являться оригинальным приемом, обеспечивающим расширение генетической изменчивости у различных растений. Данные подходы разрабатываются во многих научных лабораториях [1, 2]. Нами на подсолнечнике было показано, что при обработке зародышей химическим мутагеном, возможно получить достаточно широкий спектр видимых мутаций [3]. В основном эти изменения фиксировали на уровне морфологии растения. Однако по молекулярным маркерам, в частности по запасным белкам, выделенные морфологические мутанты не оценивались. Эти мутанты представляют интерес для селекции в качестве доноров таких признаков как измененный габитус растения, раннее цветение, увеличенное количество листьев и др., а также обладают маркерными признаками, которые легко идентифицируются начиная с ранних стадий развития.

Молекулярные маркеры в настоящее время широко используются для идентификации и отбора различных генотипов у многих культур [4-6]. Белковые маркеры, несмотря на определенные ограничения, связанные в первую очередь с незначительной долей охватываемого ими генома, также эффективны для этих целей. В частности, они легко читаются и достаточно надежно воспроизводятся [7, 8].

Электрофорез запасных белков семян нашел широкое применение у подсолнечника. Его используют в первую очередь для определения генетической чистоты линий и создаваемых на их основе гибридов. Кроме того, при использовании данного метода анализу можно подвергать даже часть семянки, сохраняя оставшуюся для высева в грунт или других тестов.

Целью данной работы было выявить по спектрам запасных белков семян генетические различия у мутантов подсолнечника, выделенных ранее по морфологическим маркерным признакам при обработке незрелых зародышей этилметансульфонатом.

МАТЕРИАЛЫ, УСЛОВИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве материала использовали четыре мутанта линии ЗЛ-95 и три мутанта линии ЗЛ-809, полученные в результате обработки химическим мутагеном этилметансульфонатом (ЭМС) незрелых зародышей подсолнечника. Обе исходные линии созданы в Институте масличных культур. Изучаемые мутанты характеризовались различным типом хлорофильной недостаточности, измененным габитусом (наклоненный стебель, низкорослость) и мутациями соцветия: *xantha 1*, *xantha 2*, наклоненный стебель, красно-коричневая окраска семенной оболочки (мутанты линии ЗЛ-95) и *viridis*, низкорослость, уменьшенное количество краевых цветков и листьев обертки (мутанты линии ЗЛ-809).

В отношении генетики вышеуказанных признаков известно, что, например, в контроле короткостебельности участвуют от одного до трех рецессивных генов с разным типом взаимодействия [9]. По данным тех же авторов светло-зеленая окраска листовой пластинки (*viridis*) контролируется одним рецессивным геном, а желто-зеленая – является рецессивной гомозиготой по аллелям трех генов.

Агрономически-важные признаки анализировали в полевых условиях 2013 г. Посев проводили квадратно-гнездовым способом 70x70 см, оставляя по два растения в гнезде. Для оценки высоты растения и количества дней до начала цветения анализировали по десять растений. Урожайность определяли с делянок площадью 9,8 м² в двухкратной повторности.

Для выделения запасных белков семян подсолнечника [10] из каждой семянки извлекали ядра, индивидуально измельчали до гомогенного состояния, отделяли масло, а из остатка экстрагировали гелиантинины. Полученный супернатант с добавкой концентрирующего и дезагрегирующего раствора отстаивали в течение ночи. Для проведения электрофореза по 100 мкл раствора супернатанта наносили в слоты 13%-ного полиакриламидного геля. Электрофорез осуществляли в электродном ацетатном растворе при силе тока 100 мА и напряжении 450 вольт в течение 2,5 часов. Окраску гелей проводили в течение 16-17 часов в растворе кумасси бриллиантового синего R-250. Электрофоретические гели сканировали при помощи офисного сканера, после чего анализировали визуально, а также используя специальное программное обеспечение для анализа гелей (Gel Analyzer 2010 и аналогичное). Описание электрофоретических спектров белков проводили на основании локализации и интенсивности белковых компонентов. В каждом образце анализировали по 5 семян.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Мутанты подсолнечника, полученные в результате обработки этилметансульфонатом незрелых зародышей с последующим их доращиванием в условиях *in vitro* первоначально были оценены по ряду агрономических показателей (табл. 1). Как видно из таблицы 1, часть мутантов отличалась от исходных линий по высоте растений и количеству дней до

цветения. Лишь некоторые из них, такие как мутанты с хлорофильной недостаточностью, имели меньшую массу 1000 семян и пониженную урожайность.

Таблица 1

Характеристика мутантов подсолнечника по ряду агрономически-важных показателей, 2013 г.

Название линии	Фенотипическое проявление мутации	Высота растения, см	Дней до цветения	Масса 1000 семян, г	Урожайность, т/га
ЗЛ-809	Исходная линия	106±1,5	53±1,2	34,0±1,62	1,3±0,07
SLM2	Уменьшенное число краевых цветков и листьев обертки	101±1,2*	48±1,2*	33,5±1,55	1,2±0,08
SLM7	Низкорослое растение	95±1,7*	53±1,5	33,7±1,63	1,4±0,06
SLM5	Светло-зеленое растение (<i>viridis</i>)	100±1,3*	57±1,1*	29,1±0,90*	1,0±0,06*
ЗЛ-95	Исходная линия	120±2,7	63±1,5	47,2±1,62	2,1±0,11
SLM6	Желто-зеленое растение с некротическими секторами (<i>xantha 2</i>)	92±1,5**	65±1,1	22,5±1,85**	0,5±0,06**
SLM11	Желто-зеленое растение (<i>xantha 1</i>)	108±2,5*	64±1,2	45,2±1,74	1,9±0,15
SLM3	Красно-коричневая окраска семенной оболочки	118±2,0	63±1,5	46,4±1,95	2,0±0,13
SLM9	Наклоненный стебель (около 40-50° от земли)	117±1,5	63±1,6	47,6±1,55	2,0±0,18

*, ** – различия между мутантами и исходной линией существенны на 5% и 1% уровнях значимости, соответственно

Анализ электрофореграмм мутантных образцов линии ЗЛ-95 свидетельствует о наличии в некоторых из них различий в электрофоретических спектрах запасных белков семян по сравнению с исходной линией (рис. 1). Эти различия заключались как в наличии-отсутствии компонентов, так и их интенсивности в составе белковых спектров. Характерно, что различия в электрофоретических спектрах наблюдали лишь относительно низкомолекулярных белков (локусы *Hel 4* и *Hel 6*).

Как видно из рис. 1 и табл. 2, для электрофоретического спектра запасных белков семян исходной линии ЗЛ-95 характерно лишь наличие первого компонента в двухкомпонентном локусе *Hel 6*. Аналогичный спектр в данном локусе характерен и для мутантных образцов SLM11 (*xantha 1*) и образца SLM3 (с красно-коричневой окраской семян). Вместе с тем, электрофоретический спектр локуса *Hel 6* линии SLM6 (*xantha 2*) представлен вторым компонентом этого локуса, а линии, имеющей SLM9 (наклоненный стебель) – обоими компонентами.

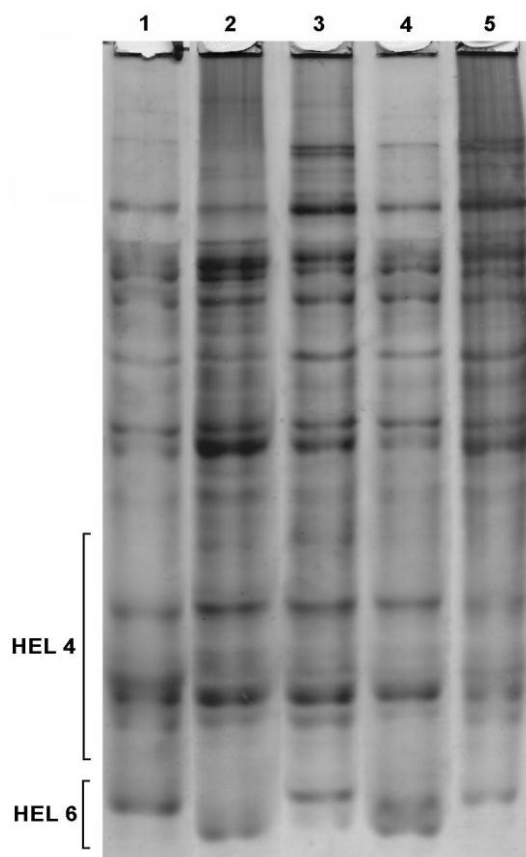


Рис. 1. Электрофоретические спектры запасных белков семян мутантных и исходной линии ЗЛ-95 подсолнечника: 1 – линия ЗЛ-95, 2 – SLM6 (*xantha* 2), 3 – SLM11 (*xantha* 1), 4 – SLM9 (наклоненный стебель), 5 – SLM3 (красно-коричневая окраска семенной оболочки).

Отличительной особенностью электрофоретического спектра ряда мутантов линии ЗЛ-95 является также иной компонентный состав и большая степень интенсивности отдельных белковых компонентов в локусе *Hel* 4 по сравнению с исходной линией. Эти отличия от исходной линии несли мутанты SLM11 (*xantha* 1), SLM6 (*xantha* 2) и SLM9 (наклоненный стебель).

Таблица 2

Подвижность полипептидов подсолнечника мутантных образцов и исходной линии ЗЛ-95 в локусах *Hel* 4 и *Hel* 6, rf

Зона	Образец				
	ЗЛ-95	SLM6	SLM11	SLM9	SLM3
<i>Hel</i> 4					
0		0,61	0,61		
1	0,70	0,70	0,70	0,69	0,69
2		0,75	0,75	0,75	
3		0,77	0,77	0,77	
4	0,79				0,78
5	0,81	0,81	0,82	0,81	0,81
6	0,84	0,84		0,83	0,83
<i>Hel</i> 6					
1	0,94		0,93	0,94	0,93
2		0,98		0,97	

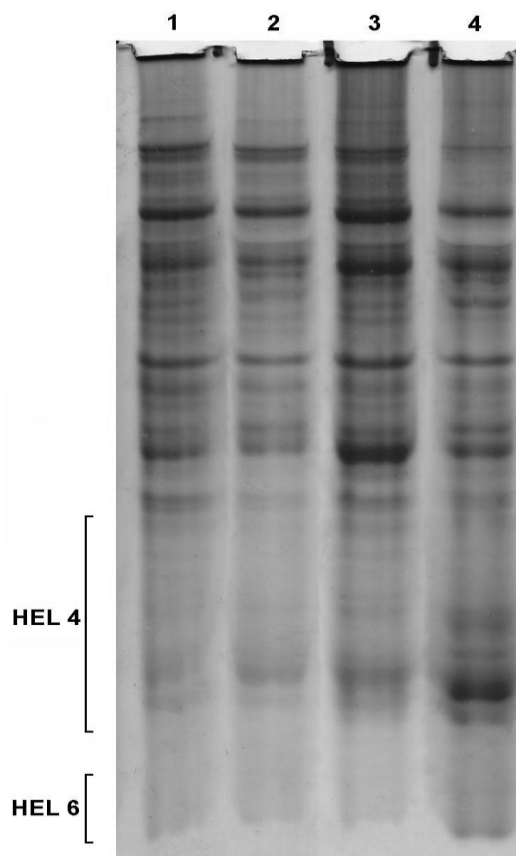


Рис. 2. Электрофоретические спектры запасных белков семян мутантных и исходной линии 3Л-809 подсолнечника: 1 – линия 3Л-809, 2 – SLM5 (*viridis*), 3 – SLM7 (низкорослое растение), 4 – SLM2 (мало краевых цветков).

Таким образом, из представленных на рис. 1 электрофореграмм четырех мутантных линий, полученных на основе линии 3Л-95, три линии отличались по спектру запасных белков семян от исходной линии. Мутантные линии SLM6 (*xantha* 2), и SLM9 (наклоненный стебель) несли отличия в двух локусах – *Hel* 4 и *Hel* 6, при этом спектры обеих линий отличались друг от друга. Линия SLM11 (*xantha* 1) отличалась от исходной по белковому спектру локуса *Hel* 4. И лишь электрофоретический спектр запасных белков семян мутанта SLM3 (красно-коричневая окраска семенной оболочки) полностью совпадал со спектром исходной линии по всем локусам. Возможно, мутации, приведшие к изменению данных морфологических признаков растений *xantha* 1, *xantha* 2 и наклон стебля затронули гены, кодирующие запасные белки семян данных мутантных линий в отличие от мутанта SLM3 (красно-коричневая окраска семенной оболочки).

Что касается мутантов линии 3Л-809, то линия SLM5 (*viridis*), по спектру запасных белков семян не отличалась от исходной линии 3Л-809 (рис. 2). Мутантная линия SLM7 (низкорослое растение), также как и мутант SLM2 (мало краевых цветков) характеризовались иным количеством белковых компонентов в локусе *Hel* 4 и их иной интенсивностью. Кроме того, линия с малым количеством краевых цветков характеризовалась наличием одного из белковых компонентов в локусе *Hel* 6.

Известно, что у подсолнечника локус *Hel* 4 характеризуется высокой степенью полиморфизма. Это позволяет использовать различные аллельные варианты данного локуса для установления генетических различий между линиями [11].

Таким образом, проведенный электрофоретический анализ запасных белков семян некоторых мутантных линий, полученных в результате обработки мутагеном незрелых зародышей подсолнечника, выявил у ряда из них отличия от исходных линий в

электрофоретическом спектре белков. Это дополнительно свидетельствует о генетических изменениях, произошедших у анализируемых мутантных образцов.

Изученные мутанты перспективны для вовлечения в селекционный процесс в качестве источников низкорослости и раннего цветения. Кроме того, они легко визуально идентифицируются по морфологическим признакам, которые могут служить маркерами для обеспечения генетической чистоты в семеноводстве.

ВЫВОДЫ

Показано, что мутанты подсолнечника, полученные в результате обработки химическим мутагеном незрелых зародышей, различались по высоте растения, количеству дней до цветения, затрагивали показатели массы 1000 семян и урожайности. Эти изменения, в основном, касались мутантов с хлорофильной недостаточностью и образца с редуцированным количеством краевых цветков.

Установлено, что часть морфологических мутантов подсолнечника несут изменения в спектре запасных белков семян. Отличия в электрофоретических спектрах мутантов подсолнечника от исходных линий проявлялись в высокополиморфном локусе *Hel 4*, а также двухкомпонентном локусе *Hel 6*.

Изученные линии могут быть использованы в качестве доноров хозяйственно-ценных и маркерных признаков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sonali S., Datta A.K. Mutagenic effectiveness and efficiency of seven chemical mutagens in sesame (*Sesamum indicum* L.) // Plant Arch. – 2003. – Vol. 3. – № 1. – P. 45-50.
2. Latado R.R., Adames A.H., Neto A.T. In vitro Mutation of Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) with Ethylmethanesulphonate (EMS) in Immature Floral Pedicels // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2004. – Vol. 77. – № 1. – P. 103-106.
3. Soroka A., Lyakh V. Genetic variability in sunflower after mutagen treatment of immature embryos of different ages // Helia. – 2009. – Vol.32 (51). – P. 33-45.
4. Solodenko A., Sivolap Yu. Genotyping of Helianthus based on microsatellite sequences // Helia. – 2005. – V. 28 (42). – P. 19-26.
5. Schnabel U., Engelmann U., Horn R. Development of markers for the use of the PEF1 cytoplasm in sunflower hybrid breeding // Plant Breed. – 2008. – Vol. 127. – P. 587–591.
6. Leonova I.N. Molecular markers: implementation in crop plant breeding for identification, introgression, and gene pyramiding // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. – 2013. – Vol. 17. – №2. – P. 314-325.
7. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. – М.: Наука, 1985. – 272 с.
8. Shewry P. R., Halford N.G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization // Journal of Experimental Botany. – 2002. – Vol. 53. – No. 370. – Inorganic Nitrogen Assimilation Special Issue. – P. 947-958.
9. Гаврилова В.А., Анисимова И.Н. Генетика культурных растений. Подсолнечник. – СПб.: ВИР, 2003. – 209 с.
10. Попереля Ф.О. Генетична інтерпретація електрофореграм геліантину насіння F1 соняшника // Цитологія і генетика. – 2000. – Т.34. – N.2. – С. 84-90.
11. Aksyonov I.V. Protein markers specificity of sunflower inbred lines // Helia. – 2005. – Vol. 28. – Nr. 43. – P. 49-54.

REFERENCES

1. Sonali S., Datta A.K. Mutagenic effectiveness and efficiency of seven chemical mutagens in sesame (*Sesamum indicum* L.) // Plant Arch. – 2003. – Vol. 3. – № 1. – P. 45-50.
2. Latado R.R., Adames A.H., Neto A.T. In vitro Mutation of Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) with Ethylmethanesulphonate (EMS) in Immature Floral Pedicels // Plant

- Cell, Tissue and Organ Culture. – 2004. – Vol. 77. – № 1. – P. 103-106.
3. Soroka A., Lyakh V. Genetic variability in sunflower after mutagen treatment of immature embryos of different ages // *Helia*. – 2009. – Vol.32 (51). – P. 33-45.
 4. Solodenko A., Sivolap Yu. Genotyping of *Helianthus* based on microsatellite sequences // *Helia*. – 2005. – V. 28 (42). – P. 19-26.
 5. Schnabel U., Engelmann U., Horn R. Development of markers for the use of the PEF1 cytoplasm in sunflower hybrid breeding // *Plant Breed.* – 2008. – Vol. 127. – P. 587–591.
 6. Leonova I.N. Molecular markers: implementation in crop plant breeding for identification, introgression, and gene pyramiding // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. – 2013. – Vol. 17. – №2. – P. 314-325.
 7. Sozinov A.A. Proteins polymorphism and it significance in genetics and breeding. – M.: Nauka, 1985. – 272 s.
 8. Shewry P. R., Halford N.G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization // *Journal of Experimental Botany*. – 2002. – Vol. 53. – No. 370. – Inorganic Nitrogen Assimilation Special Issue. – P. 947-958.
 9. Gavrilova V.A., Anisimova I.N. Genetics of crops. Sunflower. – SPb.: VIR, 2003. – 209 s.
 10. Poperellya F.O. Genetic interpretation of electrophoregrams of seed heliantins of sunflower F1 // *Cytologia i genetika*. – 2000. – T.34. – №2. – S. 84-90.
 11. Aksyonov I.V. Protein markers specificity of sunflower inbred lines // *Helia*. – 2005. – Vol. 28. – Nr. 43. – P. 49-54.

А.І. Сорока

Інститут олійних культур НААН

вул. Інститутська, 1, сел. Сонячне, м. Запоріжжя, 70417, Україна

E-mail: imkia@mail.ru

ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЯКИХ ІНДУКОВАНИХ У КУЛЬТУРІ *IN VITRO* МУТАНТІВ СОНЯШНИКА ЗА СПЕКТРОМ ЗАПАСНИХ БІЛКІВ НАСІННЯ

Мета. Виявити за спектрами запасних білків насіння генетичні відмінності у мутантів соняшника, виділених раніше за морфологічними маркерними ознаками при обробці незрілих зародків етилметансульфонатом.

Результати та обговорення. У результаті обробки етилметансульфонатом незрілих зародків двох ліній соняшника було виділено ряд мутантів з легко ідентифікованими маркерними ознаками. Наведена характеристика цих мутантів за рядом агрономічних ознак і спектрами запасних білків насіння. Показано, що досліджувані мутанти розрізнялися також за висотою рослини і кількістю днів до цвітіння. Зміни торкалися і показників маси 1000 насінин та врожайності. Частина морфологічних мутантів соняшника несли зміни в спектрі запасних білків насіння за двома локусами.

Висновки. Встановлено, що частина морфологічних мутантів соняшника з маркерними морфологічними ознаками розрізнялася не тільки за агрономічними показниками, а й несли зміни в спектрі запасних білків насіння. Відмінності в електрофоретичних спектрах мутантів від вихідних ліній проявлялися в високополіморфному локусі *Hel 4*, а також двокомпонентному локусі *Hel 6*.

Ключові слова: соняшник, мутант, ембріокультура, хімічний мутаген, електрофорез запасних білків насіння, агрономічні ознаки.

A.I. Soroka

Institute of Oilseed Crops NAAS

Institutskaia str, 1, Settl. Solnechny, Zaporozhye, 70417, Ukraine

E-mail: imkua@mail.ru

ESTIMATION OF SOME INDUCED *IN VITRO* CULTURE MUTANTS OF SUNFLOWER IN SEED PROTEIN SPECTRUM

Goal. According to the spectra of seed storage proteins, to reveal genetic differences in the sunflower mutants, which were previously identified for morphological traits after immature embryo treatment with ethylmethanesulfonate.

Results and discussion. Treatment of immature embryos of two sunflower lines with ethyl methanesulphonate resulted in selection of several mutants with easily identifiable marker traits. Characteristic of these mutants for a number of agronomic traits and spectra of seed storage proteins is presented. The studied mutants differed as well in plant height and number of days to flowering. The changes also affected 1000 seed weight and yield performance. The part of morphological mutants of sunflower was characterized by the changes in the spectrum of seed storage proteins for two loci.

Conclusions. It was established that some morphological mutants of sunflower with marker morphological characteristics differed not only in agronomic performance but also carried the changes in the spectrum of seed storage proteins. Differences in electrophoretic spectra of the mutants from the parental lines were manifested for highly polymorphic *Hel* 4 locus, as well as a two-component *Hel* 6 locus.

Key words: *sunflower, mutant, embryo rescue, chemical mutagen, electrophoresis of seed storage proteins, agronomic traits.*