

УДК 631:633.854.78
© 2014

А.І. Сорока,
кандидат
біологічних наук
Інститут олійних
культур НААН

РОЗШИРЕННЯ ГЕНЕТИЧНОГО РІЗНОМАНІТТЯ У СОНЯШНИКУ ПІД ВПЛИВОМ МУТАГЕНУ НА НЕЗРІЛІ ЗАРОДКИ ТА НАСІННЯ

Наведено результати ефективності мутагенної обробки незрілих зародків і насіння двох ліній соняшнику. Встановлено, що обробка етилметансульфонатом була ефективною як за використання незрілих зародків, так і зрілого насіння, однак частота і спектр мутацій у першому випадку більші. Частота мутацій за обробки незрілих зародків становила 15,4–39,9%, а зрілого насіння — 8,7–9,6%.

Ключові слова: соняшник, мутагенез, незрілий зародок, насіння, покоління M_2 , спектр мутацій, частота мутацій, етилметансульфонат.

Соняшник серед олійних культур за обсягом виробленого насіння (36,39 млн т на 2013 р., за даними Державного департаменту США з сільського господарства) займає 5-е місце у світі, що привертає підвищену увагу вчених та аграріїв. Водночас наявна генетична база соняшнику занадто вузька для більшості досліджень, що стримує темп робіт з цією культурою. Тому одним із першочергових завдань будь-якої селекційно-генетичної програми на соняшнику є розширення доступної селекціонерів генетичної мінливості. Це завдання можна вирішувати за допомогою різних способів, наприклад, залучати до схрещування дикорослі види або використовувати біотехнологічні підходи (культуру клітин і тканин *in vitro* або генетичну інженерію). Метод індукованого мутагенезу також дуже важливий у цьому аспекті, оскільки давно і надійно зарекомендував себе як спосіб отримання форм рослин з новими цінними властивостями.

Нині для індукування мутацій найчастіше використовують іонізуюльне випромінювання й хімічні мутагени, хоч ефективними є й інші підходи [5]. За допомогою штучного мутагенезу вже створено сотні нових сортів основних сільськогосподарських культур [1, 3, 4, 8]. Найчастіше як об'єкт під час обробки мутагеном використовують зріле насіння. Однак для ряду культур такий метод не завжди прийнятний або не може забезпечити достатньо високої ефективності. Наприклад, впливаючи γ -променями в 4-х дозах на зріле насіння соняшнику, S.J. Jambhulkar і D.C. Joshua [6] хоч і отримали у 2-му мутантному поколінні ряд морфологічних мутантів, але індуковані зміни виявлено лише у 4-х груп ознак, що зовсім недостатньо

для проведення успішної селекції на цій культурі. З огляду на це залишаються актуальними питання пошуку інших об'єктів обробки мутагеном (пагонів, бульб, бруньок, пилку та ін.), використання яких могло б забезпечити вищий вихід мутацій або розширити їх спектр. Особливо це стосується культурного соняшнику, для якого доступну генетичну мінливість вже майже вичерпано.

Мета роботи — визначення ефективності обробки мутагеном незрілих зародків соняшнику (порівняно зі зрілим насінням) у плані збільшення генетичної різноманітності цієї культури.

Матеріал і методи досліджень. Як матеріал використовували зародки і зріле насіння двох ліній культурного соняшнику *Helianthus annuus* L. запорізької селекції — ЗЛ 809 і ЗЛ 95. Їх обробляли водним розчином хімічного мутагену етилметансульфонату. Елементи технології такої мутагенної обробки апробовано нами раніше на незрілому насінні соняшнику [7].

У варіантах з визначення впливу мутагену на незрілі зародки рослини цих ліній перед цвітінням ізолювали. Через 9–11 і 14–16 днів після примусового самозапилення з кошиків виділяли незрілі сім'янки з зародками відповідного віку, обробляли їх 0,02%-м водним розчином етилметансульфонату (ЕМС) протягом 16-ти годин, відмивали водопровідною водою і стерилізували 70%-м етиловим спиртом, а потім водним розчином хлораміну Б. Зародки звільняли від зовнішньої оболонки і висаджували на модифіковане поживне середовище МС [9] зі зменшеним вмістом макроелементів та збільшеним вмістом вітамінів. Зародки культивували в чашках Петрі за фотоперіод 16 год і кімнатної температури до моменту проростан-

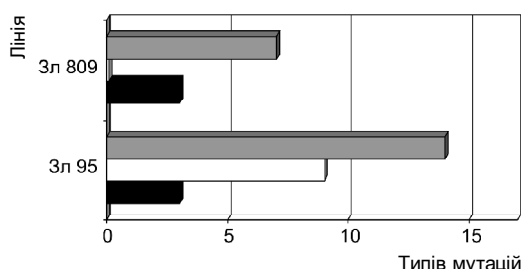


Рис. 1. Кількість типів мутацій в M_2 за обробки мутагеном зрілого насіння і незрілих зародків двох ліній соняшнику: ■ — зародки 14–16 днів; □ — зародки 9–11 днів; ■ — насіння

ня. Сформовані зелені паростки висаджували спочатку в стаканчики, а після появи 2–3-х пар справжніх листків — на поле. Одночасно з незрілими зародками цим мутагеном обробляли й зріле насіння тих самих ліній. Використовували 2 типи контролів — замочування в дистильованій воді зародків віку 9–11 і 14–16 днів і зрілого насіння.

Рослини M_1 у всіх варіантах перед цвітінням індивідуально ізолювали, а під час цвітіння штучно доопилювали. Наступного року насіння рослин M_1 породиною висівали в поле для отримання покоління M_2 . Кожна сім'я M_2 — потомство однієї рослини M_1 . Під час вегетації рослин покоління M_2 у всіх варіантах виявлено рослини з відмінними від вихідних ліній морфологічними і фізіологічними ознаками.

Попередню частоту мутацій в M_2 (у %) визначали за кількістю сімей з видимими змінами морфологічних і фізіологічних ознак, співвіднесених до загальної кількості досліджених

сімей. Остаточну частоту мутацій в M_2 встановлювали після підтвердження успадкування зміненої ознаки в наступному поколінні.

Дані обробляли статистично, використовуючи програму MSTAT-C для ПК [10] і MS Excel. Істотність відмінностей оцінювали за t-критерієм Ст'юдента [2].

Результати та їх обговорення. У всіх варіантах дослідів у поколінні M_1 рослин з мутантними ознаками не виявлено. Всі мутанти виявлено в наступному поколінні M_2 . Результативною була обробка етилметансульфонатом як зрілого насіння, так і незрілих зародків соняшнику. Проте ефективність обробки незрілих зародків — вища. Про це свідчить ширший спектр (рис. 1) і вища частота успадкованих змін (таблиця) під час використання як об'єкт мутагенного впливу незрілих зародків порівняно зі зрілим насінням. Як видно з рис. 1, спектр мутацій за обробки зрілого насіння значно вужчий, ніж за обробки незрілих зародків. У першому випадку в обох ліній виявлено всього по 3 типи мутацій. За використання як матеріал для обробки незрілих зародків — типів мутацій було в кілька разів більше. Так, у лінії ЗЛ 809 використання як об'єкта обробки незрілих зародків дало змогу отримати 7 типів успадкованих змін, тоді як у зрілого насіння — лише 3 типи. У лінії ЗЛ 95 за обробки зрілого насіння також виявлено незначну кількість типів мутацій, на відміну від варіантів обробки незрілих зародків (9 і 14 типів, залежно від їх віку).

Дані про частоту видимих успадкованих змін у M_2 підтвердили істотний вплив мутагену на незрілі зародки, оскільки виявилася значна кількість мутацій. У лінії ЗЛ 809 їх було

Частота мутацій в M_2 після обробки етилметансульфонатом незрілих зародків і зрілого насіння двох ліній соняшнику, %

Група мутацій	Лінія, оброблюваний матеріал				
	ЗЛ 95			ЗЛ 809	
	Зародки 14–16 днів	Зародки 9–11 днів	Зріле насіння	Зародки 14–16 днів	Зріле насіння
Порушення синтезу хлорофілу	1,6	0	0	0	0
Мутації:					
сім'ядолей	4,8	3,1	0	0,9	0
справжніх листків	6,4	3,1	7,2	0	0
стебла	19,1	18,6	2,4	0,9	2,9
суцвіття	8,0	6,2	0	4,5	2,9
насіння	0	3,1	0	0	0
Фізіологічні мутації	0	0	0	9,1	2,9
Загальна частота мутацій	39,9±6,17*	34,1±8,51*	9,6±4,60	15,4±3,46	8,7±4,83

* Відмінності в частоті мутацій між варіантами обробки зрілого насіння і незрілих зародків істотні за $P < 0,001$.

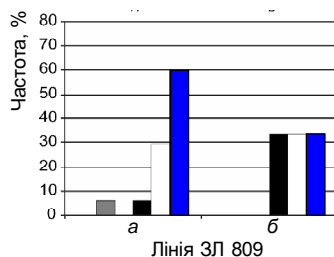
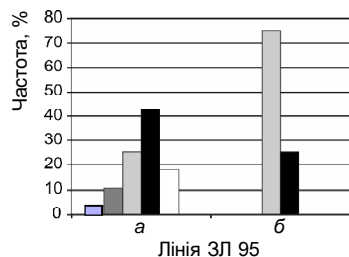


Рис. 2. Співвідношення груп мутацій в M_2 за обробки мутагеном незрілих зародків 14–16-денного віку (а) і зрілого насіння (б) двох ліній соняшнику, %: ■ — хлорофілдефіцитні; ■ — сім'ядолей; ■ — листка; ■ — стебла; □ — суцвіття; ■ — фізіологічні

близько 15%, у ЗЛ 95 — удвічі більше. Частота мутацій за обробки мутагеном зародків обох віків була значно більшою, ніж за обробки зрілого насіння соняшнику обох ліній (див. таблицю). Для лінії ЗЛ 809 перевищення цього показника за обробки незрілих зародків (порівняно зі зрілим насінням) становило майже 180%, тоді як у лінії ЗЛ 95 відмінності були ще більші (в 3–4 рази). Така різниця між лініями, очевидно, зумовлена значними відмінностями в генетичному походженні двох досліджуваних зразків.

На більшості контролів як для незрілих зародків, так і для зрілого насіння мутацій не виявлено. Лише в одному випадку — на контролі

варіанта мутагенної обробки зародків лінії ЗЛ 95 віком 14–16 днів виділено мутацію типу *xantha*.

Установлено кількість груп мутацій і їх співвідношення за дії етилметансульфонату на зріле насіння та незрілі зародки (рис. 2). За обробки насіння лінії ЗЛ 95 виявлено лише 2 групи мутацій — мутації листка і стебла, тоді як за обробки зародків 14–16-денного віку таких груп було більше. Схожу закономірність виявлено й у лінії ЗЛ 809.

Отже, проведені дослідження свідчать, що обробка мутагеном незрілих зародків ефективніша, ніж обробка зрілого насіння. Це виявлялося як у появі ширшого спектра мутацій, так і в більшій частоті успадковуваних змін.

Висновки

Обробка етилметансульфонатом лінійного матеріалу соняшнику була ефективною як за використання зрілого насіння, так і незрілих зародків.

Частота і спектр мутацій за використан-

ня як матеріалу для мутагенної обробки незрілих зародків були більшими, ніж за використання зрілого насіння. Досліджувані лінії розрізнялися рівнем мутабільності за впливу мутагену на незрілі зародки.

Бібліографія

1. Гулян А.А. Эффективность использования экспериментального мутагенеза в селекции озимой мягкой пшеницы: автореф. дис. на соискание науч. степени д-ра биол. наук: спец. 06.01.02/А.А. Гулян. — Ереван, 1999. — 37 с.
2. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований)/Б.А. Доспехов. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.
3. Лях В.А. Индуцированный мутагенез масличных культур: Монография/В.А. Лях, И.А. Полякова, А.И. Сорока. — Запорожье: ЗНУ, 2009. — 266 с.
4. Ahloowalia B.S. Global impact of mutation-derived varieties/B.S. Ahloowalia, M. Maluszynski//Euphytica. — 2004. — 135. — P. 187–204.
5. Encheva J. Mutant sunflower line R12003, produced through *in vitro* mutagenesis/J. Encheva, P. Shindrova, V. Encheva, D. Valkova//Helia. — 2012. — V. 35, № 56. — P. 19–30.
6. 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. — V. 22, № 31. — P. 63–74.
7. Lyakh V. Influence of mature and immature sunflower seed treatment with ethylmethanesulphonate on mutation spectrum and frequency/V. Lyakh, A. Soroka, V. Vasin//Helia. — 2005. — V. 28, № 43. — P. 87–98.
8. 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.
9. Murashige J. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture/J. Murashige, F.A. Skoog//Physiol. Plant. — 1962. — V.15. — P. 473–497.
10. Nissen O. A microcomputer program for the design, management and analysis of agronomic research experiments. User's Guide to MSTAT-C/O.A. Nissen. — USA: Michigan State Univ, 1991. — 418 p.

Надійшла 17.12.2013.