

ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ МУТАГЕНОМ НЕЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ КУНЖУТА НА ИХ ВЫЖИВАЕМОСТЬ

А.В. Повхан, А.И. Сорока, И.Г. Глущенко

Институт масличных культур НААН

Изучены особенности развития незрелых зародышей 4-х генотипов кунжута в условиях *in vitro* при их обработке 0,001% раствором этилметансульфоната. Установлено, что обработанные мутагеном зародыши по сравнению с контролем на питательной среде погибали чаще, что говорит об эффективности мутагенного воздействия. Частота выживаемости высаженных в почву опытных проростков была достаточно высокой и варьировала от 54,0 до 91,7%.

Введение. В последнее время обеспечение нужд в растительном масле в Украине основывается на выращивании подсолнечника. Тем не менее, развитие пищевой и других областей промышленности требует создания разнообразия ассортиментов масел. Одним из решений этого вопроса есть масло из семян кунжута. Кунжутное масло – одно из лучших пищевых масел, которое по вкусовым качествам приближается к оливковому и используется в консервной, пищевой, кондитерской промышленности, а также в медицине [3].

Современная селекция кунжута базируется на гибридизации образцов с мало отличимыми морфологическими и другими типами признаков. В связи с этим вопросы по разработке новых способов расширения генетической изменчивости этой культуры нуждаются в постоянном внимании ученых.

Одним из путей расширения генетического многообразия является метод индуцированного мутагенеза, применение которого для кунжута почти не исследовано. Мутагенез занимает ведущее место среди тех приемов, которые можно с успехом использовать для получения новых сортов. На сегодня разработано много методов искусственного индуцирования мутаций. В основе их лежит влияние на организмы разных физических и химических факторов, которые называют мутагенами. Как правило, химические и физические мутагенные факторы даже при высокой частоте характеризуются низкой специфичностью. Результаты воздействия мутагенов зависят от дозы и концентрации фактора, продолжительности его действия, наличия систем репарации повреждений в генетическом материале (ДНК), а также соответствия мутаций конкретным условиям среды. Мутации являются следствием повреждения в молекулах ДНК, повреждений хромосом или нарушений процессов деления клеток [1,4].

Использование мутагенеза в культуре зародышей позволяет получить иной спектр и частоту мутаций, чем при обработке зрелых семян, что дает возможность расширять генетическую базу исходного материала. Данную методику использовали на подсолнечнике, в результате чего был выявлен широкий спектр мутаций, ранее недоступный [7]. Также при использовании культуры зародышей можно гораздо быстрее получать взрослые растения, преодолевая период покоя за счет фаз развития и созревания семян и тем самым значительно сокращая период вегетации [6].

Учитывая вышесказанное, установление закономерностей мутационной изменчивости, индуцированной в культуре зародышей *in vitro* одним из эффективных химических мутагенов, является актуальным и своевременным.

Целью нашей работы было выявить особенности развития зародышей кунжута в условиях *in vitro* после обработки мутагеном и установить частоту выживаемости полученных из них растений.

Материал и методы исследований. Объектом исследования служили зародыши кунжута 20-дневного возраста, выделенные после самоопыления четырех генотипов этой культуры (рис. 1). Считается, что на 20-ый день после опыления зародыш уже полностью сформирован и занимает почти весь объем семянки. Этот период называют окончанием роста, хотя еще некоторое время зародыш продолжает

увеличиваться в размерах.

Возраст зародышей является очень важным фактором для успешного использования эмбриокультуры.

Очень молодые зародыши нуждаются в более сложной по составу питательной среде, отстают в росте, легко образуют каллус, что является нежелательным [5]. Кроме того, выделение зародышей

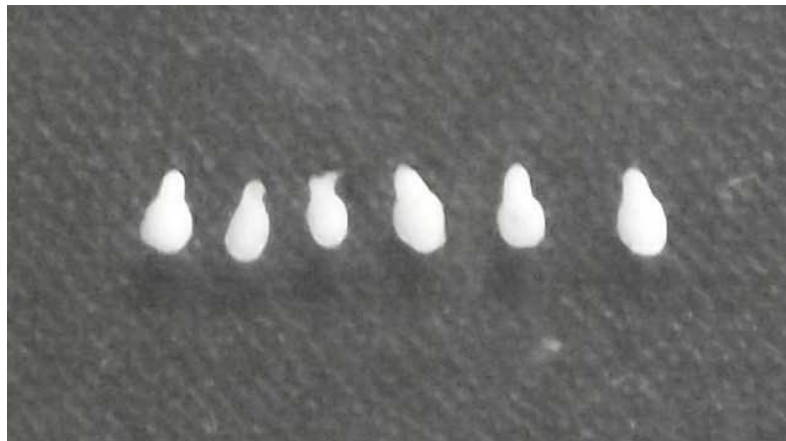


Рис. 1. Зародыши кунжута 20-дневного возраста перед высаживанием на питательную среду

на ранних этапах чаще всего неэффективно, поскольку значительно сокращается количество жизнеспособных зародышей [2]. Полностью зрелые семена нежелательно использовать в связи с тем, что выделение из них зародышей затруднено, они сильнее инфицированы, а также существенно увеличивается длительность периода от опыления до ввода материала в культуру *in vitro*.

Для получения зародышей коробочки кунжута, собранные с выращенных в полевых условиях и самоопыленных растений, промывали водой с моющим средством, ополаскивали дистиллированной водой, после чего помещали на 12 минут в 6%-ый раствор хлорамина. По окончании обработки материал промывали 5 раз дистиллированной водой и в асептических условиях выделяли из коробочек зародыши. Выделенные зародыши помещали в капроновых мешочках в раствор 0,001% этилметансульфоната (ЭМС) на 16 часов. После обработки мутагеном зародыши промывали на протяжении 30 минут дистиллированной водой. Контрольные зародыши выдерживали такое же время в дистиллированной воде. Затем зародыши высаживали на предварительно приготовленную стерильную питательную среду Мурасиге и Скуга (MS) [8], помещали в темноту на один день, а потом выращивали в условиях искусственного освещения с фотопериодом 18/6 часов. Учет зародышей, которые начали рост, дали корни и побеги или сформировали каллус, проводили еженедельно.

Полученные проростки с хорошо развитыми корешками из асептических условий пересаживали в стерильный грунт в стаканчики, с добавлением песка в качестве разрыхлителя. Проростки, которые прижились, выращивали в теплице при 18-часовом суточном освещении. Через определенное время растения пересаживали в емкости большего объема (рис. 2).



Рис. 2. Растения кунжута, полученные через культуру зародышей

Результаты исследований и их обсуждение. Сравнивая развитие на питательной среде незрелых зародышей

на первой неделе культивирования, можно отметить, что на начальных этапах развития обработанных ЭМС зародышей между генотипами наблюдалось больше отличий, чем в конце культивирования (рис. 3). Так, зародышевые корешки формировались у всех генотипов, но с разной частотой – от 9,8 % у №23 до 36% у сорта Гусар. Семядольные листья же развивались к этому времени лишь у двух генотипов (№3 и Боярин), с частотой соответственно 28 и 11%.

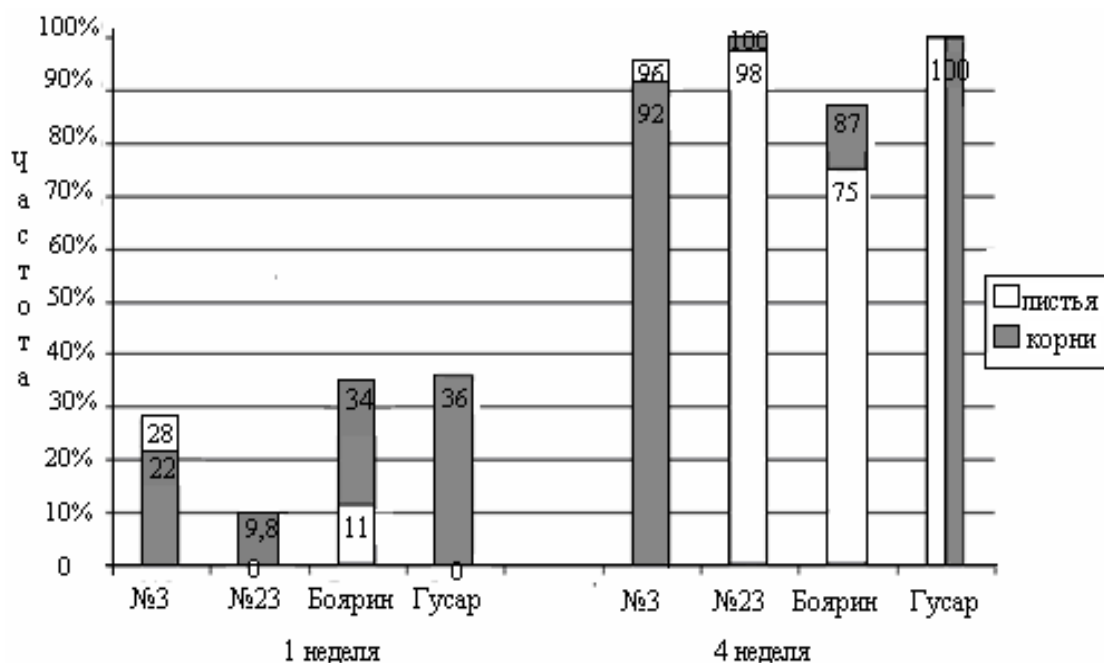


Рис. 3. Частота образования корней и семядольных листьев у зародышей разных генотипов кунжута после их обработки ЭМС на первой и 4-й неделе культивирования

Через 4 недели культивирования различия между генотипами нивелировались и уже все генотипы сформировали как корешки, так и развитые семядольные листья с почти 100%- частотой. Исключением стал лишь сорт Боярин, зародыши которого прорастали на питательной среде с наименьшей частотой.

Результаты культивирования незрелых зародышей кунжута *in vitro* приведены в таблице.

Из данных таблицы видно, что зародыши кунжута в условиях *in vitro* вели себя по-разному. Вместе с нормальным развитием растений на искусственной питательной среде можно отметить и некоторые отклонения, а именно: развитие одних листьев, или, наоборот, только корней, а иногда уже раскрытые и позеленевшие семядоли прекращали развитие. Появление каллуса на зародышах в течение всего времени наблюдения отмечено не было.

Можно заметить, что в контрольных вариантах при культивировании на питательной среде зародыши погибали меньше, чем в случае обработки мутагеном. Так, если в контроле не развивались лишь единичные зародыши, то в опытных вариантах таких было до 14,0%. Исключение составил генотип №3, где в контроле из-за инфекционного заражения процент гибели зародышей был достаточно высоким.

Таблица

Результаты культивирования незрелых зародышей кунжута *in vitro* после их обработки мутагеном (ЭМС) в сравнении с контролем (К)
(данные за 2012 г.)

Генотип	Вариант обработки	Высажено зародышей <i>in vitro</i>	Сформировано проростков (с корнями)	Сформировано проростков (без корней)	Погибло	Дней до высадки в почву	Высажено в почву		Выжило растений		
							шт.	%	шт.	% от высаж. в почву	% от высаж. зародышей
№3	К	26	20	6	17	11	9	34,6	6	66,7±15,71	23,1±8,27
	ЭМС	50	46	4	7		43	86,0	26	60,5±7,45	52,0±7,07*
№23	К	22	22	0	1	12	21	95,5	15	71,4±9,86	68,2±9,93
	ЭМС	51	51	0	1		50	98,0	27	54,0±7,05	52,9±6,99
Боярин	К	22	22	0	0	8	22	100	16	73,0±9,47	73,0±9,47
	ЭМС	53	46	7	7		46	86,8	42	91,3±4,16	79,2±5,58
Гусар	К	24	24	0	0	11	24	100	22	91,7±5,63	91,7±5,63
	ЭМС	47	47	0	0		47	100	28	59,6±7,16	59,6±7,16***

* ***, – различия между контрольными и опытными вариантами значимы на 5% и 0,1% уровнях значимости соответственно.

Что касается выживаемости растений после высаживания в почву, то, в целом, она составила от 54,0% до 91,7%. У трех генотипов из четырех частота выживших после пересадки растений в опытных вариантах (после обработки ЭМС) была ниже, чем в контроле. Очевидно, растения, развившиеся из

обработанных мутагеном зародышей, были более ослабленными. В целом видно, что процент полученных растений от числа высаженных зародышей составлял от 23,1% у генотипа №3 до 91,7% у сорта Гусар. Таким образом, эффективность культивирования как необработанных, так и обработанных мутагеном зародышей кунжута в искусственных условиях оказалась достаточно высокой. Наилучшей их выживаемостью характеризовались сорта кунжута Боярин и Гусар, у которых в контрольных вариантах после пересадки проростков в почву было сформировано 73,0 и 91,7% растений соответственно. У сорта Боярин также выживало больше всего зародышей и в вариантах их обработки этилметансульфонатом.

Выводы

Этилметансульфонат в концентрации 0,001% и время воздействия 16 часов возможно использовать для обработки зародышей кунжута.

Через неделю культивирования зародыши всех обработанных мутагеном генотипов образуют корни, а часть из них и листья, а через 4 недели все генотипы образуют корни и листья с высокой частотой.

Частота выживания растений после высадки в почву была достаточно высокой и варьировала в целом от 54,0 до 91,7 %, при этом в вариантах обработки мутагеном она в ряде случаев была ниже, чем в контроле.

Лучшими генотипами кунжута для использования в культуре незрелых зародышей *in vitro* являются сорта Гусар и Боярин.

Эффективность образования растений из обработанных ЭМС зародышей является достаточной для использования данного приема в исследованиях по индуцированию мутационной изменчивости.

Литература

1. Алексеева Е.С. Экспериментальный мутагенез как метод селекции // Радиационный мутагенез растений, - М., 1985. С. 49-54.
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. Учебное пособие. - М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. - 160с.
3. Гаврилюк М.М., Салатенко В.Н., Чехов А.В. Олійні культури в Україні: Монографія. / За ред. А.В. Чехова. К.: Основа, 2007. – 416с.
4. Зоз Н.Н. Методика использования химических мутагенов в селекции сельскохозяйственных культур // Мутационная селекция. – М.: Наука, 1968. – С. 217–230.
5. Сорока А.И. Влияние возраста незрелых зародышей на частоту их прорастания и выход жизнеспособных растений у подсолнечника // Науково-технічний бюлетень (Збірник наукових праць) ІОК.- Запоріжжя, 2005. – № 10. – С. 29-33.
6. Сорока А.И. Использование культуры незрелых зародышей для получения дополнительных поколений у подсолнечника // Сб. докл. Межд. науч.-практ. конф. "Современные проблемы научного обеспечения производства подсолнечника", Краснодар: ВНИИМК, 2006. - С. 159-161.
7. Лях В.А. Индуцированный мутагенез масличных культур: монография / В.А. Лях, И.А. Полякова, А.И. Сорока; под ред. В.В. Моргуна. – Запорожье: ЗНУ, 2009. – 266 с ил.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.*, 1962.- V.15. – P.431-497.

ВПЛИВ ОБРОБКИ МУТАГЕНОМ НЕЗРІЛИХ ЗАРОДКІВ КУНЖУТУ НА ЇХ ВИЖИВАННЯ

А.В. Повхан, А.І.Сорока, І.Г. Глущенко

Вивчено особливості розвитку незрілих зародків 4-х генотипів кунжуту в умовах *in vitro* при їх обробці 0,001% розчином етилметансульфонату. Встановлено, що оброблені мутагеном зародки в порівнянні з контролем на поживному середовищі гинули частіше, що говорить про ефективність мутагенного впливу. Частота виживання висаджених в ґрунт дослідних проростків була досить високою й варіювала від 54,0 до 91,7%.

EFFECT OF MUTAGENIC TREATMENT OF SESAME IMMATURE EMBRYOS ON THEIR SURVIVAL

A.V. Povhan, A.I. Soroka, I.G. Gluschenko

There were studied characteristics of immature embryos development of 4 sesame genotypes under *in vitro* conditions after their treatment with ethylmethanesulphonate 0.001% solution. It was found that mutagen treated embryos, compared to control ones, died more often on a nutrient medium, which indicates efficacy of mutagenic treatment. The survival frequency of treated seedlings in the soil was fairly high and ranged from 54.0 to 91.7%.

Рецензент: В.А. Лях, доктор биол. наук, профессор, зав. кафедрой садово-паркового хозяйства и генетики растений Запорожского национального университета.