

## СПЕКТР И ЧАСТОТА ИНДУЦИРОВАННЫХ МУТАЦИЙ ЛЬНА МАСЛИЧНОГО В ПОКОЛЕНИИ M<sub>2</sub>

Д. А. БАТЮКОВ, Е. Л. АНДРОНИК, Е. В. ИВАНОВА

РУП «Институт льна»,  
аг. Устье, Республика Беларусь, 211003, e-mail: andronik1@rambler.ru

(Поступила в редакцию 15.02.2024)

Обоснована необходимость использования химического мутагенеза как успешного способа решения задач селекции по увеличению генетической изменчивости и улучшению отдельных признаков сортов. В статье представлены результаты исследований, проведенных по изучению спектра и частоты индуцированной изменчивости в поколении M<sub>2</sub> у растений льна масличного. Установлено, что мутагены НЭМ и НММ являются эффективными в индикации мутационной изменчивости разного типа у сортов льна масличного, характер которой определяется видом и концентрацией использованного мутагена, а также генотипическими особенностями сорта. Выявлены отличия в мутабельности исследуемых сортов, которые проявлялись в различной частоте и спектре видимых мутаций. Спектр полученных в поколении M<sub>2</sub> морфологических мутаций зависел от вида и концентрации мутагена. Концентрация мутагенов НЭМ и НММ 0,006 % оказывала наибольшее влияние на проявление и выраженность морфологических признаков растений масличного льна в поколении M<sub>2</sub>. В результате исследований обнаружены 29 типов изменений, которые были разделены на пять групп в зависимости от их характера и направленности: мутации с нарушением синтеза хлорофилла у всходов и взрослых растений (9 типов); мутации структуры стебля, побегов и листьев (5 типов); мутации окраски лепестков венчика и пыльников, формы лепестков и бутонов (7 типов); мутации окраски семян (4 типа); мутации по физиологическим признакам роста и развития (4 типа). Выявлены соматические мутации окраски листьев и лепестков цветка, визуально идентифицирующиеся по спектрам, наблюдали многочисленные тератологические изменения в формировании органов цветка. Наибольшую частоту имели мутации окраски лепестков венчика и пыльников. Установлено, что высокой мутагенной способностью обладает НММ, под действием которого у различных сортов получено до 20,95 % растений с мутациями. В вариантах действия НЭМ обнаружено значительно меньшее количество мутаций (max 13,15 %).

**Ключевые слова:** лен масличный, мутагенез, нитрозоэтилмочевина (НЭМ), нитрозометилмочевина (НММ), поколение M<sub>2</sub>, спектр, частота.

*The necessity of using chemical mutagenesis as a successful way to solve breeding problems to increase genetic variability and improve individual traits of varieties is substantiated. The article presents the results of research into the spectrum and frequency of induced variability in the M<sub>2</sub> generation in oil flax plants. It has been established that the mutagens ENU and NMU are effective in indicating mutational variability of various types in oil flax varieties, the nature of which is determined by the type and concentration of the mutagen used, as well as the genotypic characteristics of the variety. Differences in the mutability of the studied varieties were revealed, which manifested themselves in different frequencies and spectrum of visible mutations. The spectrum of morphophysiological mutations obtained in the M<sub>2</sub> generation depended on the type and concentration of the mutagen. The concentration of ENU and NMU mutagens of 0.006 % had the greatest effect on the manifestation and severity of morphological characteristics of oil flax plants in the M<sub>2</sub> generation. As a result of the research, 29 types of changes were discovered, which were divided into five groups depending on their nature and direction: mutations with impaired chlorophyll synthesis in seedlings and adult plants (9 types); mutations in the structure of the stem, shoots and leaves (5 types); mutations in the color of the corolla petals and anthers, the shape of the petals and buds (7 types); seed color mutations (4 types); mutations according to physiological signs of growth and development (4 types). Somatic mutations in the color of leaves and flower petals, visually identified by spectra, were identified, and numerous teratological changes in the formation of flower organs were observed. Mutations in the color of the corolla petals and anthers had the highest frequency. It has been established that NMU has a high mutagenic ability, under the influence of which up to 20.95 % of plants with mutations were obtained in various varieties. In the variants of action of ENU, a significantly smaller number of mutations were found (max 13.15 %).*

**Key words:** oilseed flax, mutagenesis, ethylnitrosourea (ENU), nitrosomethylurea (NMU), M<sub>2</sub> generation, spectrum, frequency.

### Введение

Химический мутагенез зарекомендовал себя как успешный способ решения таких задач селекции, как увеличение генетической изменчивости и улучшение отдельных признаков сортов. Наиболее важным этапом в реализации программ по мутационной селекции сельскохозяйственных растений является анализ второго мутантного поколения (M<sub>2</sub>) с целью идентификации и отбора наиболее ценных мутантных генотипов. Распространенным тестом в исследованиях по экспериментальному мутагенезу у сельскохозяйственных растений являются хлорофильные мутации, что объясняется как высокой частотой встречаемости, так и сравнительной простотой их фенотипической оценки [1, с. 33]. Обзор литературных источников показал, что морфологические признаки являются наиболее частым объектом мутаций у льна масличного [2, с. 173; 3, с. 525; 4, с. 117]. Хлорофильные мутации позволяют судить о наследственных изменениях растений уже во втором поколении. По другим видимым изменениям говорить о мутагенном действии факторов можно с третьего поколения [5].

Целью данной научной статьи является выявление особенностей фенотипического проявления мутаций различных типов на всех этапах онтогенеза растений льна масличного в поколении M<sub>2</sub>.

## Основная часть

Объектом исследований являлись 6 сортов льна масличного из коллекции РУП «Институт льна»: Илим (отечественной селекции, среднеспелый, крупносемянный, крупноцветковый); Визирь и Бонус (отечественной селекции, среднеспелые, продуктивные); Фокус (отечественной селекции, раннеспелый, продуктивный), Дар (отечественной селекции, продуктивный, с измененным жирнокислотным составом); Altess (французской селекции, низкорослый, раннеспелый, продуктивный, крупноцветковый). В качестве химических мутагенов использовали супермутагены: N-нитроэтилмочевину (НЭМ) и N-нитрозометилмочевину (НММ). Концентрации рабочего раствора мутагенов – 0,006 %; 0,012 %; 0,025 %; экспозиции – 6, 12, 18 часов. Для проведения исследований использована методика Н. Н. Зоз [6]. При описании хлорофиллдефицитных изменений пользовались классификацией хлорофилльных мутаций по главному резко выраженному мутантному признаку в сравнении с таковым у исходного генотипа на всех стадиях развития растений, начиная с фазы всходов и до фазы полной спелости, описанной в исследованиях И. О. Поляковой с соавторами [7, с. 50]. Частоту мутаций (Mf) рассчитывали по С. F. Konzak et al. (1965) [8, с. 56].

Оценку значимости и вклада мутагенного фактора в формирование полевой всхожести семян льна масличного в поколении M<sub>2</sub> определяли путем многофакторного дисперсионного анализа. Под фактором «генотип» понимали генетические особенности каждого из изученных коллекционных образцов льна. Под фактором «мутаген» рассматривали применяемые мутагены, под фактором «концентрация» – концентрации химического мутагена, фактор «экспозиция» отражал период, на протяжении которого происходило воздействие мутагена.

Наличие достоверных эффектов мутагенного фактора, а также его взаимодействия с другими факторами подтверждено статистически (F<sub>факт.</sub> > F<sub>теор.</sub>, p-значимость < 0,01). Наибольший вклад в формирование рассматриваемого признака вносил фактор «концентрация» (25,98 %), а также взаимодействие факторов «мутаген\*экспозиция» (18,92 %) (табл. 1).

Таблица 1. Вклад факторов в формирование полевой всхожести семян льна масличного в поколении M<sub>2</sub>

Источник варьирования	Степень свободы	Средний квадрат	F <sub>факт.</sub>	P-Значение
{1}Сорт	5	2882,00	125,489	< 0,01
{2}Мутаген	1	8700,74	378,852	< 0,01
{3}Концентрация	2	24067,00	1047,938	< 0,01
{4}Экспозиция	2	2109,00	91,831	< 0,01
Сорт*Мутаген	5	882,74	38,437	< 0,01
Сорт*Концентр	10	477,53	20,793	< 0,01
Мутаген*Концентр	2	2113,52	92,028	< 0,01
Сорт*Экспоз	10	501,80	21,850	< 0,01
Мутаген*Экспоз	2	17522,61	762,979	< 0,01
Концентр*Экспоз	4	358,47	15,609	< 0,01
Сорт*Мутаген*Концентр	10	382,79	16,668	< 0,01
Сорт*Мутаген*Экспоз	10	1485,85	64,698	< 0,01
Сорт*Концентр*Экспоз	20	299,19	13,027	< 0,01
Мутаген*Концентр*Экспоз	4	3740,89	162,888	< 0,01
1*2*3*4	20	514,91	22,420	< 0,01
Ошибка	216	22,97		

Обработка химическими мутагенами привела к появлению в M<sub>2</sub> большого количества мутаций в растениях масличного льна. Спектр мутаций включал 29 типов изменений морфологических и физиологических признаков. Найденные хлорофилльные мутации различались по внешнему проявлению и степени угнетенности растения, несущего мутацию (от летального исхода – до растений с нормальной жизнеспособностью). Все 29 типов изменений, выявленных в результате исследований, были разделены на пять групп, представленных ниже.

I группа. Мутации с нарушением синтеза хлорофилла у всходов и взрослых растений. Получены у всех исследованных сортов. Выявлено 9 типов: albina, viridialbina, xantha, chlorina, viridis, lutescent, striata, xanthoviridis и xanthocorroded. Мутации типов albina, viridialbina, chlorina и xantha приводили к летальному исходу на разных стадиях развития растения.

II группа. Мутации структуры стебля, побегов и листьев были представлены 5 типами изменений: растения с измененным количеством семядолей (с тремя семядолями); низкорослые растения, карлики, высокорослые растения, растения с зигзагообразным стеблем [9–10].

III группа. Мутации окраски лепестков венчика и пыльников, формы лепестков и бутонов (всего 7 типов) (рис. 1). Так, у сорта Дар голубая окраска лепестков менялась на светло-голубую, а у сорта Фокус серые пыльники – на оранжевые, у сорта Илим выделилась мутантная линия с белым венчи-

ком. Мутация формы цветка – «нераскрывающийся венчик», которая оказалась стерильной, а также звездчатая форма венчика были получены также у сорта Фокус. Данная мутация наблюдалась при обработке мутагеном НММ в концентрации 0,012 % с экспозицией 18 часов. Однако не все сорта оказались мутабельными по проявлению изменений этой группы – у сорта Визирь отсутствовали мутации окраски частей и формы цветка.

IV группа. Мутации окраски семян. Выделено 4 типа: желтая, коричневая, горчичная, пёстрая. Как правило, окраска семян менялась вместе с цветом окраски лепестков венчика и пыльников. Однако встречались семьи, в которых происходила смена окраски лепестков венчика и пыльников, а цвет семян не изменялся.

V группа. Мутации физиологические (изменения в росте и развитии растения). Выделено 4 типа: раннеспелые растения, позднеспелые растения, растения с нарушением развития семян (обнаружена при обработке мутагеном НЭМ у сортов Фокус и Бонус) и стерильность (полное отсутствие коробочек после цветения на вполне здоровом растении либо их недоразвитие).



Рис. 1. Фенотипическое проявление мутаций окраски лепестков венчика и пыльников, формы лепестков и бутонов под воздействием химических мутагенов в поколении M<sub>2</sub>

Специфичность действия мутагенов и различная реакция сортов наблюдается в количестве каждого типа мутаций в общем их спектре. У сорта Altess в варианте обработки НЭМ хлорофильные мутации составляют 60 % от выявленных, а у сорта Фокус в варианте с НММ мутации изменения окраски семян составляют 40 %. У сорта Илим и Дар изменения формы и окраски цветков занимают 90 % всех отклонений.

Полученные данные дают основание заключить, что появление отдельных типов мутаций и доля каждого типа их в общем спектре зависят от сортовых особенностей и специфичности действия примененных химических мутагенов.

В результате фенологических наблюдений были выявлены соматические мутации окраски листьев и лепестков цветка, визуально идентифицирующиеся по спекторам (рис. 2–3). Проявлялись эти мутации в период «всходы – конец цветения». Так, например, большая часть обнаруженных нами хлорофильных химер, проявлялись в фазе бутонизации. На рис. 2 на листьях хорошо видны мутантные сектора, представленные группой клеток белой окраски. Кроме этого на настоящих листьях отмечали белые сектора в виде продольных полос или полос, окаймляющих лист. В дальнейшем в пазухах таких листьев иногда развивались полностью белые побеги, которые после образования нескольких пар листьев приостанавливали рост и отмирали. В общем количестве хлорофильных химер преобладали растения с белыми секторами на листьях центрального стебля. Но встречались и растения третьего типа, несущие оба типа хлорофильных химер.



Рис. 2. Соматические хлорофильные мутации, индуцированные НММ



Рис. 3. Спонтанные соматические мутации окраски венчика

При обработке семян льна сорта Altess мутагеном N-нитрозозтилмочевиной (НЭМ) в концентрации 0,012 % при экспозиции обработки 12 часов наблюдали многочисленные тератологические изменения в формировании органов цветка (рис. 4а и 4б). Встречающиеся отклонения от нормального строения цветка растений льна масличного в  $M_2$  не препятствовали их нормальному функционированию. Достаточно четко прослеживалась диморфная гетеростилия у сорта Илим, у которого были идентифицированы длиннопестичные морфы (рис. 4в). Впервые константная длиннопестичная форма была получена при помощи химического мутагенеза во ВНИИ масличных культур в 70-е годы прошлого столетия К.И. Солдатовым. С точки зрения морфологии такие цветки для вида *L. usitatissimum* L. являются тератологическими изменениями, в то время как для большинства других видов рода *Linum* они являются нормой (*L. perenne*, *L. narbonense* и *L. thracicum*). Такое строение цветков льна способствует их переходу к перекрестному опылению [11]. Такая особенность делает полученные растения интересным объектом для изучения механизмов опыления и несовместимости.

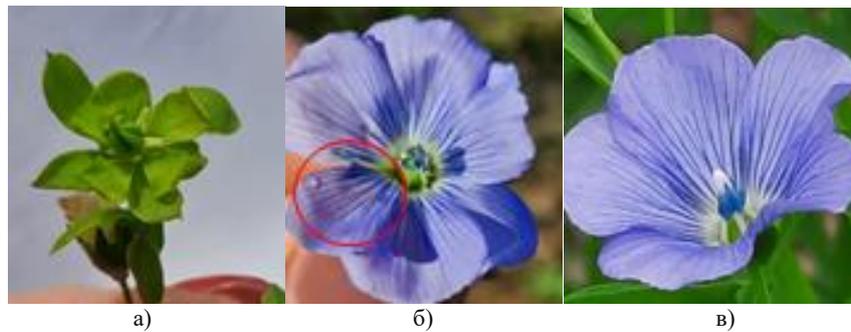


Рис. 4. Тератологические изменения в формировании органов цветка льна масличного

Основными показателями, определяющими генетическую активность и эффективность мутагенов, является частота и спектр мутаций. Частоту мутаций рассчитывали как процентное соотношение мутировавшего потомства  $M_2$  как для хлорофилльных, так и для морфологических мутаций для каждой обработки. В  $M_2$  выделено 2058 растений с видимыми изменениями. Суммарная частота мутаций в варианте с меньшей концентрацией составила 9,8 %, с высокой – 4,19 % (рис. 5–6).

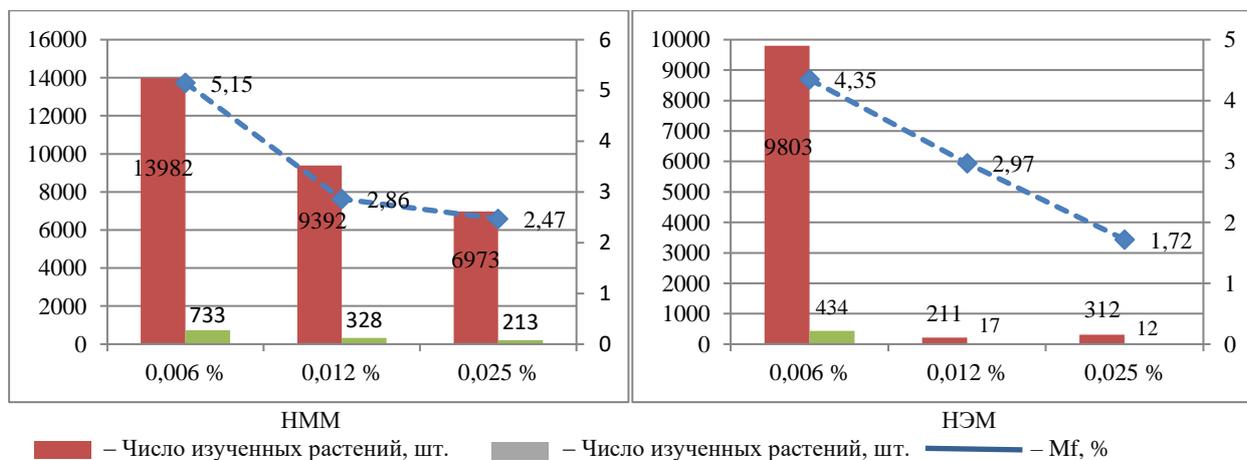


Рис. 5. Частота мутаций (Mf) у генотипов льна масличного в поколении  $M_2$

В результате проведенного изучения установлено, что количество мутаций возрастает до определенного оптимума, а затем либо снижается, либо остаётся на этом же уровне и не повышается при увеличении концентрации мутагена. Такую закономерность наблюдали на всех сортах.

При изучении сравнительной эффективности использованных химических мутагенов установлено, что они по своей мутагенной активности не равнозначны. Самой высокой мутагенной способностью обладает НММ, под действием которого у различных сортов получено до 20,95 % растений с мутациями. В вариантах действия НЭМ обнаружено значительно меньшее количество мутаций (мах – 13,15 %).

### **Заключение**

Эффективными мутагенами в плане индуцирования мутационной изменчивости разного типа у льна масличного являются НЭМ и НММ. Характер этой изменчивости определяется видом и концентрацией использованного мутагена, а также генотипическими особенностями сорта. Отличия в мутабельности проявлялись в различной частоте и спектре видимых мутаций.

Мутагены НЭМ и НММ в концентрации 0,006 % оказывают существенное влияние на выраженность многих морфологических признаков растений масличного льна в поколении М<sub>2</sub>.

Спектр полученных в поколении М<sub>2</sub> морфофизиологических мутаций был достаточно широким, зависел от вида и концентрации мутагена (обнаружены 29 типов изменений). Хлорофиллдефицитные мутации включали группу из 9 типов изменений, мутации структуры стебля, побегов и листьев – 5 типов, мутации окраски венчика и пыльников, формы и размера цветка – 7 типов, мутации окраски семян – 4 типа, физиологические мутации роста и развития – 4 типа.

### *ЛИТЕРАТУРА*

1. Биологические особенности северных популяций многолетних злаков. Генетический груз и выживаемость / О. Н. Лебедева и др.; под общей ред. А. Ф. Титова. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2012. – 261 с.
2. Лях В. А., Полякова И.А., Сорока А. И. Индуцированный мутагенез масличных культур. – Запорожье: ЗНУ, 2009. – 266 с.
3. Тигова А. В., Сорока А. И. Частота и спектр мутаций у растений льна (*Linum humile* Mill.) под действием новых производных диметилсульфата // Физиология растений и генетика. – 2017. – Т.49, № 6. – С. 521–532.
4. Ущиповский И. В. Особенности индуцированного мутагенеза на культуре льна // Научные труды ВНИИЛ. – Торжок, 2002. – Вып. 30. Том 1.– С. 109–120.
5. Шпота В. И., Коновоалов Н. Г., Палкин П. М. Хлорофилльные мутации у горчицы Сарептской // Селекция и семеноводство. – 1995. – №1. – С. 29–32.
6. Зоз Н. Н. Методика использования химических мутагенов в селекции сельскохозяйственных культур // Мутационная селекция. – М.: Наука, 1968 – С. 23–27.
7. Фенотипическое проявление мутаций хлорофилл дефицитности на ранних этапах онтогенеза льна масличного / И. А. Полякова и др. // Вісник ЗНУ. – 2013. – № 1. – С. 49–57.
8. Efficient chemical mutagenesis / C.F. Konzak [at all] // Radiation Botany. – 1965. – Vol. 5. – P. 49–70.
9. Tejklova, E. Curlu stem an induced mutation in flax (*Linum usitatissimum* L.) / E. Tejklova // Czech j. genet. plantbreed. – 2002. – Vol. 38. – P. 125–128.
10. Наследование маркерных признаков у растений *Linum humile* mill. / А. В. Тигова и др. // Науково-технічний бюлетень Інституту олійних культур НААН. – 2018. – № 25. – С. 35–40.
11. Галкин Ф. М. Тератологические изменения элементов цветка льна (*Linum usitatissimum* L.) // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2008. – № 1(138). – С. 66–69.