

УДК 633.853.494; 575.224.46.044

МУТАГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОСПОР РАПСА

Жамбакин К.Ж., Затыбеков А.К., Волков Д.В., Шамекова М.Х.

*Институт биологии и биотехнологии растений
ул. Тимирязева, 45, Алматы, 050040, Казахстан
alexbek89@mail.ru*

АБСТРАКТ

Изучалось влияние химических мутагенов в культуре изолированных микроспор рапса. Мутагенезу подвергались как непосредственно микроспоры, так и полученные из них эмбриониды. Показано, что мутагены азид натрия (NaN_3) и этилметансульфанат (ЭМС) при обработке изолированных микроспор в течение одного часа значительно влияют на индукцию эмбриогенеза. Получены удвоенные гаплоиды из обработанных мутагенами эмбрионидов рапса. Из полученных мутантов можно выделить линии с высокими по сравнению с контролем показателями по массе семян с растения и массе 1000 семян. При этом наилучшие результаты показали линии, полученные при 25 mM NaN_3 с 4-часовой экспозицией. Во втором поколении мутантов M2 происходит значительное уменьшение олеиновой кислоты у всех изученных линий с ее высокими показателями в первом поколении M1. При этом одновременно происходит увеличение процента линолевой кислоты у этих линий. Следует отметить уменьшение суммарного содержания ненасыщенных жирных кислот у мутантов второго поколения. В результате проведенной работы получены мутантные удвоенные гаплоиды с признаками высокой урожайности и высокого качества масла семян.

Ключевые слова: рапс, мутагенез, гаплоиды, микроспоры, эмбриониды.

MUTAGENESIS IN MICROSPORE CULTURE OF *BRASSICA NAPUS*

Zhambakin K.Zh., Zatybekov A.K., Volkov D.V., Shamekova M. Kh.

*Institute of Plant Biology and Biotechnology
45 Timiryazev str., Almaty, 050040, Kazakhstan
alexbek89@mail.ru*

ABSTRACT

The influence of chemical mutagens on a culture of isolated microspores of oilseed rape, *Brassica napus*, was studied. Microspores and the embryos derived from them were subjected to mutagenesis. It was observed that the mutagens sodium azide (NaN_3) and ethylmethanesulfonate significantly influenced the induction of embryogenesis within an hour of application to isolated microspores. When compared to the control group, the lines with a higher seed weight and a weight of 1000 seeds could be isolated from the plant material. The best results were observed by the lines that were obtained with 25mM NaN_3 after a 4-hour exposure. There is a significant increase of oleic acid levels due to the decrease in concentration of linoleic acid in the first mutant generation. A significant drop in oleic acid content is seen in all cultured lines in the second generation M2, with oleic acid levels being higher in the first generation M1. At the same time, linoleic acid levels are increased in those lines. Dwarf and ripening forms was observed during the process of growth and development of plants in the field conditions. Most of the obtained mutant strains were sterile. We also observed an average decrease in the unsaturated fatty acid content in the mutants of the second generation. Mutant double haploids with signs of high productivity and high quality of seed oil were obtained in this study.

Keywords: *Brassica napus*, mutagenesis, haploids, microspores, embryos

ВВЕДЕНИЕ

Рапс является ценным источником пищевого и технического масла, кормового белка. В последнее время рапсовое масло используется в качестве дизельного топлива. Мировой опыт свидетельствует о том, что возделывание рапса (*Brassica napus olifera Metzg.*) является одним из наиболее коммерчески выгодных направлений в растениеводстве.

Потребность в семенном материале сортов, адаптированных к местным почвенно-климатическим условиям, будет возрастать. В Казахстане наиболее приемлемыми для выращивания рапса являются Костанайская, Северо-Казахстанская, Акмолинская области. Только при норме высева 6 кг/га потребность при 1 млн. га составит 6000 тонн семенного материала ежегодно. В то же время практически весь семенной материал составляют сорта и гибриды инорайонной селекции (в основном германские и российские). В связи с этим создание конкурентоспособных сортов рапса отечественной селекции является актуальным.

В селекционной работе по выведению новых казахстанских сортов рапса преобладают традиционные методы. Сроки создания отечественных сортов затянуты и не отвечают современным требованиям. При этом селекционная работа над созданием новых сортов затруднена низким уровнем варибельности среди исходного материала. Одним из выходов из этой ситуации является использование в селекции рапса мутагенеза.

Традиционная селекция трудоемка, требует значительного времени. Кроме того, сорта рапса пищевого направления (низкое содержание эруковой кислоты и глюкозинолатов) имеют короткую историю. Впервые такой сорт (*Tower*) появился в 70-х годах прошлого века в Канаде [1] и нынешние сорта ведут свою родословную от этих сортов. Поэтому генетическое разнообразие исходного материала для селекции сортов пищевого направления не имеет достаточно широкого диапазона. Кроме того, особенностью селекции рапса является то, что требование к пищевым маслам варьирует в зависимости от количественного жирнокислотного состава.

Высокий спрос на пищевое масло и биодизель во всем мире способствовал появлению на рынке генетически модифицированных (ГМ) сортов рапса. В то же время критическое отношение к ГМ сельскохозяйственным культурам заставило селекционеров вспомнить о высокоэффективных методах мутагенеза, когда-то широко используемых в середине прошлого века. В настоящее время получены новые сорта с использованием мутагенеза с признаками устойчивости к гербицидам и с повышенным качеством масла.

Опыт работ в этом направлении показывает, что мутагенез способен вызвать у представителей рода *Brassica* проявление таких признаков как устойчивость к определенному классу пестицидов, устойчивость к абиотическим стрессовым факторам, болезням, изменение качественного состава масла [2, 3, 4, 5]. Для выращивания рапса в Казахстане основными лимитирующими факторами является засушливый климат, грибковые заболевания и засоление почв.

Получение мутантов в культуре клеток *in vitro* привлекает прежде всего потому, что в этом случае можно создавать условия непосредственного воздействия мутагеном на сотни и тысячи клеток. Перспективность мутагенеза в культуре клеток и тканей растений доказана многочисленными работами на разных культурах. Для получения культуры клеток используются различные растительные экспланты.

В то же время, по сравнению с культурой соматических клеток, культура изолированных микроспор является более эффективной системой получения мутантных линий сельскохозяйственных культур. Преимуществами мутагенеза гаплоидных клеток является: (1) возможность избежать химеризм; (2) мутанты могут быть быстро обнаружены, (3) выявление рецессивных мутантов возможно уже в первом поколении; (4) цикл получения гомозиготных мутантов сокращается. Кроме того, наличие большого количества микроспор увеличивает вероятность выявления лучших мутантов, в частности, возможен отбор уже на уровне культивирования *in vitro* [6, 7]. Эффективность мутагенеза с использованием культуры изолированных микроспор показана во многих работах [8, 9, 10].

Первые исследования в культуре изолированных микроспор *Brassica* [11, 12] привели к разработке методов эффективного выхода эмбриоидов [13]. Впервые сообщалось об использовании культуры изолированных микроспор *Brassica* в мутагенезе и отборе мутантов на устойчивость к хлорсульфону [14]. Некоторыми из преимуществ культуры изолированных микроспор являются: использование большого количества гаплоидных клеток, низкий уровень соматического изменения, эффективность и равномерность применения мутагенов, выделение рецессивных мутаций, получение конечного продукта с нужными признаками [14].

Ранее авторами проводились исследования по оптимизации условий культивирования изолированных микроспор рапса [15]. Полученные результаты позволили продолжить исследования по использованию

культуры изолированных микроспор для получения мутантов. Использование ЭМС широко практикуется у семейства *Brassica* в качестве мутагена. При этом используются различные концентрации при разной продолжительности обработки. Так, в экспериментах использовались концентрации ЭМС 2 мМ, 4 мМ, 8 мМ, 10 мМ, 12 мМ при 1,5 часах обработки [16]; концентрации ЭМС 0,05 мМ, 0,1 мМ, 0,2 мМ – при 20 минутах обработки [17], а также концентрации ЭМС 1 мМ, 1,5 мМ, 2 мМ, 2,5 мМ, 3 мМ – при обработке 12, 24, 36 часов [18]. Представленные ссылки показывают большую размах в используемых концентрациях, при этом чем выше концентрация, тем короче время экспозиции. Анализ литературных источников показывает, что возможно получение истинных мутантов при довольно широком диапазоне экспозиций этилметансульфаном. Выбранные концентрации и продолжительность обработки не самые жесткие и должны, на наш взгляд, произвести мягкий мутагенный эффект. Азид натрия также широко известен как мутаген и используется в концентрации 0,1-0,5 мМ с различным временем экспозиции – 2, 12 и 24 часа [19].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты

В качестве исходного материала для эксперимента использован сорт ярового рапса российской селекции – Крис, полученный из Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур им. В.С. Пустовойта, а также сорт Викинг, полученный из РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» от автора сорта Я.Э Пилук. Эти два сорта были более отзывчивы к андрогенезу на ранее проведенных нами экспериментах [20].

Методы исследования

1. Обработка мутагеном изолированных микроспор рапса на фоне мутагена

Изолирование и культивирование микроспор рапса проводили по методу E. Swanson [21]. Обработку мутагеном проводили после первого центрифугирования фильтрата (полученного предварительно из цветочных бутонов) при 100 g в течение 7 минут, супернатант сливали, к полученному осадку добавляли раствор мутагена с выбранными концентрациями мутагенов. После истечения 1 часа обработки мутагеном заново центрифугировали суспензию при 100 g в течение 7 минут. Супернатант сливали, к осадку наливали свежую среду Гамборга В5 [22]. Дальнейшие этапы проводили по методу E. Swanson [21]. Среду для культивирования микроспор использовали NLN [21].

2. Обработка мутагеном соматических эмбриоидов, полученных в культуре изолированных микроспор

При достижении размеров 1,5-2,5 мм эмбриоиды перемещали в раствор мутагена. Затем чашки Петри ставили на шейкер (40-50 оборота в минуту) при температуре 25°C в термостат. Обработывали эмбриоиды раствором мутагена в течение 4 и 6 часов. После обработки эмбриоиды сушили на стерильной бумаге в течение 5 секунд.

В дальнейшем, соматические андрогенные эмбриоиды (полученные в обоих вышеназванных экспериментах) пересаживали на твердую питательную среду В5 (0,8% агар) с 2%-ной сахарозой и культивировали в течение 24 часов в термостате при температуре 10°C. Через сутки пробирки с эмбриоидами ставили на свет при температуре 25°C. После двух недель культивирования эмбриоиды пересаживали на свежую среду В5 для регенерации. Регенеранты пересаживали на безгормональную среду Мурасиге и Скуга (МС) [23] с половинным набором солей. После клонирования 1/3 регенерантов оставляли на дальнейшее клонирование, а 2/3 пересаживали в грунт. До пересадки в грунт регенеранты колхицинировали 0,05% раствором колхицина в течение 18 часов при температуре 4°C. Регенеранты накрывали горшком для увеличения влажности и постепенно через 2-3 дня приоткрывали. После акклиматизации растений их пересаживали в вегетационные сосуды, также по три растения на один сосуд. Во время вегетационного периода растения обрабатывали фунгицидом (фитоспорин) и инсектицидом (каратэ). В исследованиях использовались реактивы фирмы AppliChem.

Посев мутантных линий проводился на экспериментальном участке института с соблюдением общепринятых для рапса агротехнических мероприятий. Проводились фенологические наблюдения в процессе роста и развития растений. Структурный анализ растений проводился по общепринятой методике.

Определение жирнокислотного состава рапса проводилось методом газовой хроматографии [24].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация условий культивирования изолированных андрогенных клеток рапса на фоне мутагенов

Были собраны бутоны размером 2-3 мм в количестве 134 шт. сорта Крис и 127 шт. сорта Викинг. На первой стадии эксперимента проводилась оптимизация питательной среды NLN по фитогормонам. Из

наших собственных предыдущих экспериментов и литературных источников определено, что одним из ключевых факторов, влияющих на индукцию эмбриогенеза, являются фитогормоны, а среди них – цитокинины. В связи с этим для оптимизации питательной среды NLN выбраны три варианта добавления гормонов: 1) БАП 0,05 мг/л; 2) Кинетин 0,1 мг/л; 3) БАП 0,01 мг/л + кинетин 0,02 мг/л. Результаты эксперимента показали, что питательная среда NLN с БАП 0,05 мг/л является оптимальной для получения эмбрионидов из культуры изолированных микроспор, как для сорта Викинг, так и для сорта Крис (рисунок 1). При этом индукция эмбриогенеза была выше у сорта Викинг, чем у сорта Крис.

В дальнейшем, для определения оптимальной концентрации мутагена использовалась питательная среда NLN с БАП 0,05 мг/л. Мутагены в культуре изолированных микроспор использовали следующим образом. После первого центрифугирования фильтрата (полученного предварительно из цветочных бутонов) при 100 g в течение 7 минут супернатант сливали, к полученному осадку добавляли раствор мутагена с выбранными концентрациями мутагенов. Пробирку закрывали ставили на штатив, при этом каждые 10 минут взбалтывали. После истечения 1 часа обработки мутагеном заново центрифугировали суспензию при 100 g в течение 7 минут. Супернатант сливали, к осадку наливали свежую среду Гамборга В5 в объеме 20 мл, еще раз центрифугировали при 100 g в течение 5 минут. После промывания микроспоры помещали в чашки Петри диаметром 60 мм с добавлением питательной среды NLN объемом 5-6 мл. Плотность микроспор в среде NLN доводили до 30,000-40,000 микроспор/мл, определяя камерой Горяева. Затем микроспоры помещали в термостат с шейкером (40-50 оборота в минуту) при 32°C на 2 суток. После истечения 2 суток температуру опускали до 25°C и культивировали при данной температуре до появления эмбрионидов.

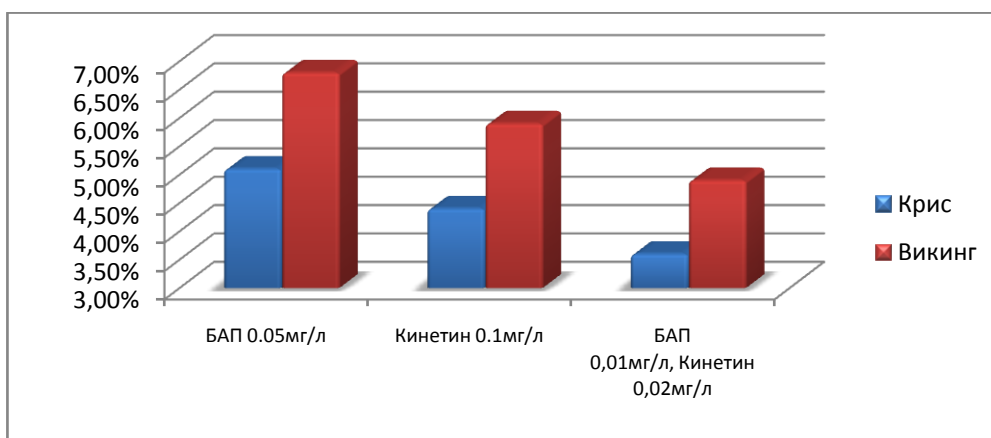


Рис. 1. Влияние различных концентрации гормонов в питательной среде NLN на выход эмбрионидов (% от количества культивируемых микроспор)

Fig. 1. Effect of different concentrations of hormone in the culture medium NLN to yield embryoids (% of the cultured microspore)

В наших экспериментах были выбраны для ЭМС концентрации 4 mM, 8 mM, 12 mM, а для NaN_3 – 0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM со временем обработки 1 час. Предполагаем, что данные концентрации и продолжительность не произведут достаточно серьезных летальных мутаций, а произведут лишь несколько изменений в геноме рапса. В то же время, несмотря на щадящий режим обработки мутагенами, эксперимент показал значительное влияние выбранных вариантов на индукцию эмбриогенеза (рисунок 2).

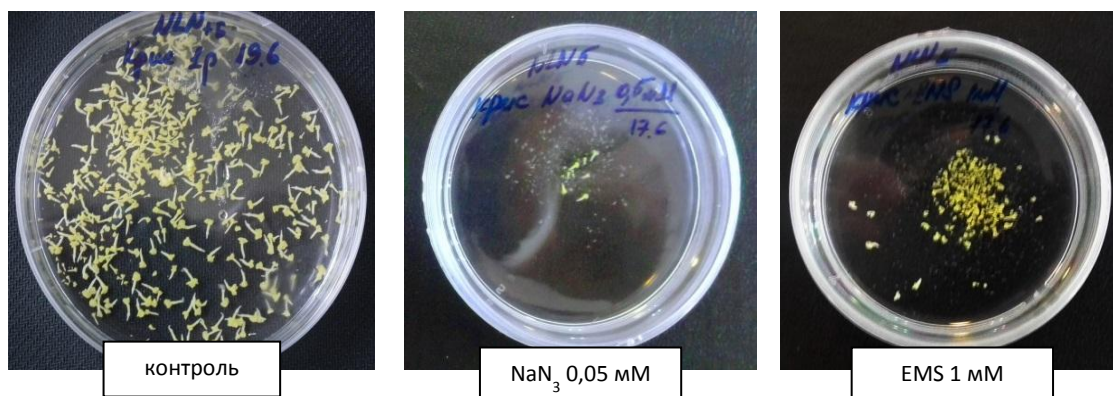


Рис. 2. Образование торпедовидных эмбриоидов на разных концентрациях мутагена у сорта Крис

Fig. 2. The formation of torpedo embryoids for different concentrations of mutagen cultivar Chris

В таблице 1 представлены результаты эмбриогенеза у сорта Крис. Представленные данные показывают, что даже малые концентрации мутагенов значительно влияют на эмбриогенез. В дальнейшем при повышении концентрации мутагена значительно снижается частота эмбриогенеза. Наиболее наглядно данная закономерность проявляется у сорта Викинг. Так, если без мутагена индукция эмбриогенеза от количества культивируемых микроспор у сорта Викинг составила 6,5%, то при концентрации ЭМС 4 мМ – 1,2%, в случае азиды натрия при концентрации 0,01 мМ – 1,1%. В дальнейшем, как и у сорта Крис, процент эмбриогенеза значительно снижается при повышении концентрации мутагенов.

Таблица 1. Количество полученных эмбриоидов в зависимости от концентрации гормонов, сорт Крис

Table 1. Number of obtained embryoid depending on the concentration of hormones, Chris cultivar

Название гибридной комбинации	Количество бутонов в повторности	Количество повторностей	Среднее значение и станд. отклон.	Процент эмбриодогенеза, %
ЭМС 4 мМ	20	3	65,3±6,66	1,11
ЭМС 8 мМ	20	3	47,7±4,51	0,81
ЭМС 12 мМ	20	3	20,7±3,22	0,35
NaN ₃ 0,01 мМ	20	1	73	1,24
NaN ₃ 0,05 мМ	20	3	67,3±2,08	1,15
NaN ₃ 0,1 мМ	20	3	55±3,61	0,94

Таблица 2. Количество полученных эмбриоидов в зависимости от концентрации мутагена, сорт Викинг

Table 2. Number of embryoids derived depending on the concentration of the mutagen, Viking cultivar

Название гибридной комбинации	Количество бутонов в повторности	Количество повторностей	Среднее значение и станд.отклон.	Процент эмбриодогенеза, %
ЭМС 4 мМ	20	3	71±1	1,21
ЭМС 8 мМ	20	3	62,7±2,08	1,07
ЭМС 12 мМ	20	3	27,3±4,51	0,47
NaN ₃ 0,01 мМ	20	3	67±2	1,14
NaN ₃ 0,05 мМ	20	3	63±2,65	1,07
NaN ₃ 0,1 мМ	20	3	54,3±2,31	0,93

После того, как были получены эмбриоиды из культуры изолированных микроспор на фоне мутагенов, необходимо было подобрать оптимальные условия для регенерации растений. Как известно, для эмбриогенеза и дальнейшей регенерации растений необходимо поддерживать баланс фитогормонов в питательной среде. Как описывалось выше, среда для культивирования микроспор, где происходил эмбриогенез, содержала только цитокинины. Известно, что представители рода *Brassica* в культуре изолированных микроспор отрицательно реагируют на присутствие ауксинов. Тем не менее, при подборе среды для регенерации было решено добавить, помимо гибберелловой кислоты, которая известна положительным влиянием на регенерацию и главным образом на рост растений, ауксин в виде индолилуксусной кислоты. Была выбрана питательная среда Гамборга В₅ со следующим вариантом

добавления гормонов: 1) гибберелловая кислота 0,3 мг/л; 2) гибберелловая кислота 0,3мг/л + ИУК 0,2мг/л. Результаты регенерации показаны в таблице 3 и на рисунке 3.

Таблица 3. Количество полученных регенерантов из культуры изолированных микроспор на фоне мутагенов

Table 3. Number of obtained regenerated from isolated microspores culture against the backdrop of mutagens

Концентрация мутагена		Сорт Крис		Сорт Викинг	
		В ₅ + гк 0,3 мг/л, %	В ₅ + гк 0,3 мг/л, ИУК 0,2 мг/л, %	В ₅ + гк 0,3 мг/л, %	В ₅ + гк 0,3 мг/л, ИУК 0,2 мг/л, %
ЭМС	4 мМ	95,8	70,8	75	41,7
	8 мМ	62,5	37,5	37,5	29,2
	12 мМ	37,5	16,7	20,8	12,5
NaN ₃	0,01 мМ	70,8	54,2	87,5	58,3
	0,05 мМ	58,3	50	62,5	37,5
	0,1 мМ	37,5	25	20,8	16,7

Регенерация происходила с достаточно высокой частотой, в какой-то степени можно даже говорить о некотором стимулировании процесса регенерации низкими концентрациями мутагенов. Представленные данные показывают, что добавление ауксина отрицательно сказалось на регенерации при всех изучаемых вариантах, как по сорту Викинг, так и по сорту Крис. Кроме того, отмечено отрицательное влияние повышенных концентраций мутагенов на регенерацию растений. Во время регенерации у некоторых растений наблюдалось изменение формы стебля и листьев, а также альбинизм.

В ходе двухфакторного дисперсионного анализа было выявлено, что на регенерацию растения из эмбриоидов влияет состав гормонов в питательной среде и концентрация мутагена, при этом изученные факторы влияют на регенерацию не независимо друг от друга.

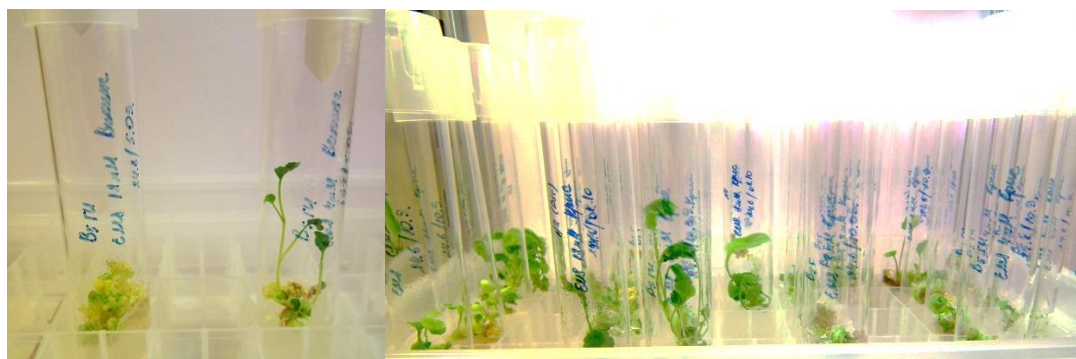


Рис. 3. Регенерация растений из эмбриоидов, полученных в культуре изолированных микроспор на фоне мутагенов

Fig. 3. Regeneration of embryoids derived from plants in the culture of isolated microspores on the background mutagens

Оптимизация условий культивирования изолированных соматических тканей рапса на фоне мутагенов

Соматические эмбриониды были получены в культуре изолированных микроспор. Используя вышеуказанную методику, доводили плотность до $79,1 \times 10^3 \pm 3,5 \times 10^3$ микроспор/мл. В общем количестве было обработано 77 бутонов, выход составил 412 эмбриоидов. Сформировавшиеся эмбриониды имели строго биполярную структуру (рисунок 4), формировались синхронно, имели относительно одинаковую форму и размер при культивировании в одной чашке Петри. Получаемый эмбрионид как правило, находится в гаплоидном состоянии, следовательно, возникающие мутации не будут скрыты эффектом доминирования, а при удвоении будут иметь одно аллельное состояние генов.

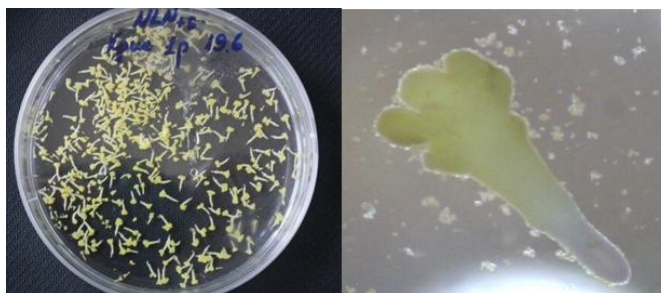


Рис. 4. Андрогенные эмбриониды сорта Крис

Fig. 4. Androgenic embryos of Chris cultivar

Полученные в культуре изолированных микроспор сорта Крис соматические зародыши использовались для получения мутантных линий. Исходя из литературных данных [19], в эксперименте использовались пять концентраций азиды натрия – 5, 10, 25, 50 и 100 μM , при двух вариантах времени обработки – 4 и 6 часов. Модификации заключались в том, что нами выбраны более жесткие условия обработки – как по концентрации, так и по продолжительности обработки. Предполагалось, что в результате эксперимента будет выявлена летальная доза и время экспозиции мутагена. Однако эмбриониды выявили достаточно высокую степень устойчивости и регенерационной способности.

В начале, после обработки мутагеном, эмбриониды испытывают большой стресс, что выражалось в потере зеленого цвета. Большинство таких эмбрионидов образовывалось при высоких концентрациях мутагена. Но спустя день или два, на свету при температуре 25°C часть из них начинает вновь зеленеть и регенерировать (рисунок 5).



Рис. 5. Эмбриониды после обработки мутагеном

Fig. 5. Embryoids after treatment with a mutagen

Результаты по выживаемости эмбрионидов показаны на рисунке 3 и 4. Как и следовало ожидать, наибольшая выживаемость была при низких концентрациях мутагена, а низкая при высоких концентрациях. При этом не наблюдалось большой разницы при 4-часовой обработке 5 и 10 μM , а также между 25 и 50 μM . Существенная достоверная разница в выживаемости эмбрионидов наступала при 100 μM азиды натрия. При 6-часовой обработке график резко опускался вниз, но и при этом количество регенерировавших эмбрионидов при 100 μM составляло более 35% (рисунок 6 и 7). К 12 суткам культивирования эмбрионидов происходила окончательная регенерация растений. Следует отметить, что процесс регенерации у обработанных мутагеном эмбрионидов проходил быстрее, чем у контрольных растений. Обработка мутагеном способствовала увеличению жизнеспособности как эмбрионидов, так и регенерантов, полученных из них (рисунки 8, 9, 10). В дальнейшем процесс регенерации проходил без видимых нарушений за исключением растений, полученных при обработке эмбрионидов 100 μM азиды натрия в течение 6 часов. Наблюдались как мозаичные, так и альбиносные растения (рисунок 11).

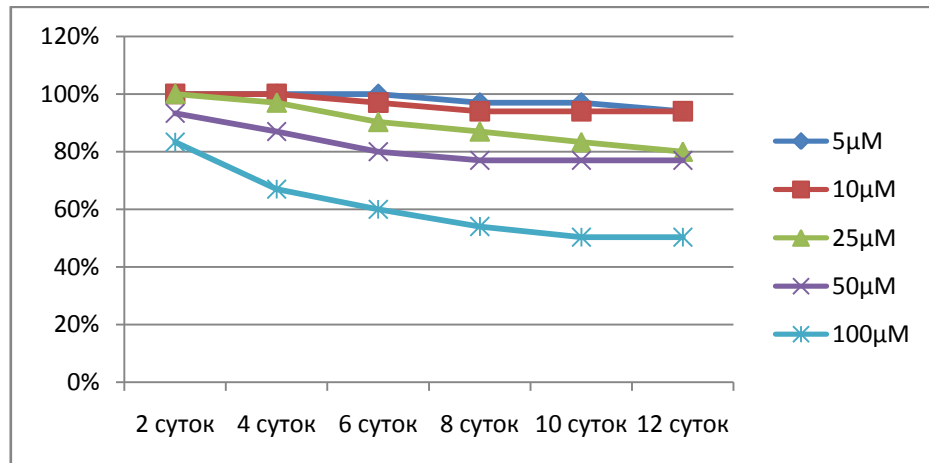


Рис. 6. Показатель выживших эмбрионов после обработки NaN_3 в течение 4 часов

Fig. 6. Indicator embryos surviving after treatment NaN_3 for 4 hours

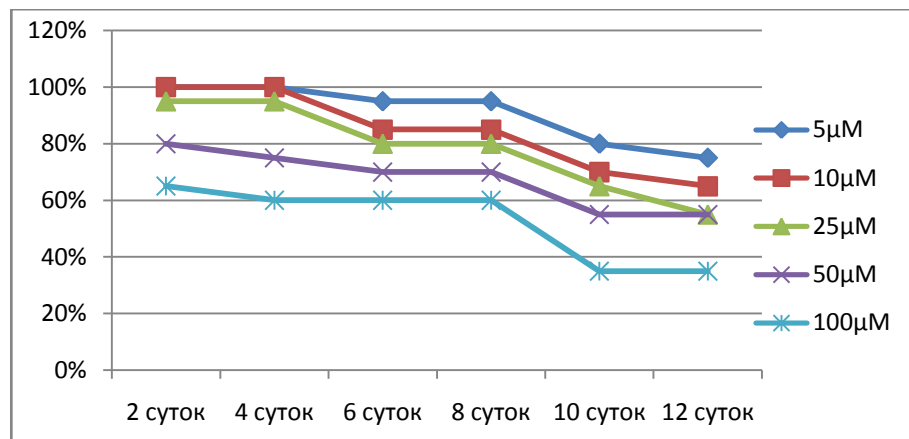


Рис. 7. Показатель выживших эмбрионов после обработки NaN_3 в течение 6 часов

Fig. 7. Indicator embryos surviving after treatment NaN_3 for 6 hours



Рис. 8. Обработанные мутагеном эмбрионы в течение 4 часов

Fig. 8. Mutagen-treated embryos for 4 hours



Рис. 9. Обработанные мутагеном эмбриониды в течение 6 часов

Fig. 9. Mutagen-treated embryos for 6 hours



Рис. 10. Контрольные эмбриониды

Fig. 10. Control embryos



Рис. 11. Альбинизм после обработки эмбрионидов 100 μM азиды натрия в течение 6 часов

Fig. 11. Albinism embryos after processing 100 μM of sodium azide in 6 hours

Проведённый двухфакторный дисперсионный анализ показал, что выживаемость эмбрионидов зависит как от времени обработки, так и от концентрации раствора мутагена. В то же время, время обработки более значимо для выживаемости эмбрионидов. В связи с этим дальнейшая оптимизация обработки азидом натрия будет проводиться с учетом полученных данных, а именно: на увеличение времени обработки эмбрионидов мутагеном.

Получение семенного материала из регенерантов, полученных в культуре соматических андрогенных зародышей на фоне мутагенов и оценка спектра морфологических изменений у растений M2

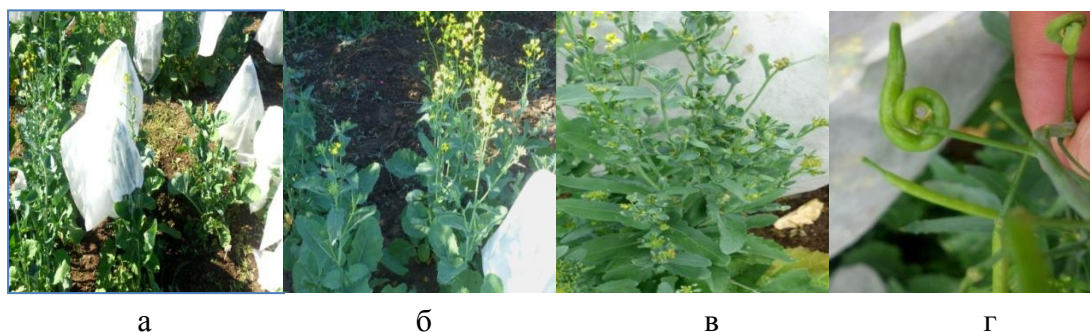
В 2012 году в наших экспериментах мутагенезу подвергались соматические эмбриониды, полученные в культуре изолированных микроспор. В результате этих экспериментов нами были получены гаплоидные регенеранты. В дальнейшем их пересаживали на безгормональную среду Мурасиге и Скуга (МС) с половинным набором солей. Рост и развитие части регенерантов происходило с нарушением, которое сопровождалось появлением химерных листьев и стеблей. Однако основное количество растений росло без нарушений. Клонирование регенерантов проводили на этой же среде. В дальнейшем 1/3 регенерантов оставляли на клонирование, а 2/3 пересаживали в грунт. До пересадки в грунт регенеранты, для удвоения набора хромосом, обрабатывали 0,05% раствором колхицина в течение 18 часов при температуре 4°C. После колхицинирования регенеранты промывали дистиллированной водой три раза и пересаживали в пластиковые горшки диаметром 10-12 см (по три регенеранта в горшок). Растения проверяли на плоидность стандартными цитологическими методами по корешкам, а также по числу хлоропластов в замыкающих устьицах листьев. Регенеранты накрывали пластиковым горшком для увеличения влажности и постепенно

через 2-3 дня приоткрывали. После акклиматизации растения пересаживали в вегетационные сосуды, также по три растения на один вегетационный сосуд.

Во время вегетационного периода растения обрабатывали фунгицидом (фитоспорин) и инсектицидом (каратэ). В результате были получены семена из растений сорта Крис, при всех изучаемых концентрациях азиды натрия.

Полученный семенной материал (M1) был высеян в полевых условиях. Предварительно выборочно на семенных корешках был проведен цитологический анализ на определение количества хромосом.

Вместе с тем, в процессе роста и развития растений в полевых условиях наблюдались карликовые (рисунок 12а) и скороспелые формы (рисунок 12б). Как и ожидалось, большинство изменчивостей наблюдалось в фазе цветения и формирования семян: стерильные формы (рисунок 12в), а также скрученные, но фертильные стручки (рисунок 12г). Признак скороспелости, проявленный у мутантных форм, является безусловно, ценным и будет прослежен в последующих поколениях удвоенных гаплоидов.



а – карликовые формы; б – скороспелые формы; в – стерильные формы; г – скрученные стручки

Рис. 12. Мутантные линии M2 в полевых условиях

a – dwarf forms; b – ripening forms; c – sterile forms; g – twisted pods

Fig. 12. Mutant M2 line in the field

Оценка фертильных мутантных линий

Мутантные линии могут представлять интерес с точки зрения закрепленных хозяйственно-ценных изменчивостей по количественным и качественным признакам. Несмотря на то, что значительная часть мутантных линий была стерильной полностью или частично, удалось получить достаточно линий с хорошо выполненными семенами. Каждая представленная в таблице 4 линия – это отдельное фертильное растение с хорошо развитыми семенами. Из представленных данных видно, что размах изменчивости по всем изучаемым признакам довольно широк. При этом сам донорный сорт показал широкий размах изменчивости, особенно по признаку количества стручков с растения.

Вместе с тем, из полученного растительного материала можно выделить линии с высокими по сравнению с контролем показателями по массе семян с растения и массе 1000 семян. При этом наилучшие результаты показали линии, полученные при 25 mM азиды натрия с 4-часовой экспозицией. Данные линии

будут размножены и изучены в последующие годы на предмет сохранения высоких показателей урожайности в семенном потомстве.

Таблица 4. Структурный анализ мутантных растений рапса сорта Крис, полученных в культуре *in vitro* на фоне мутагена NaN_3

Table 4. Structural analysis of the mutant varieties of rapeseed plants obtained Chris cultivar in *in vitro* culture on the background mutagen NaN_3

Растения, полученные при различных фонах NaN_3	Высота растения, см	Высота до 1-го ветвления, см	Кол-во ветвлений, шт.	Кол-во стручков с растения, шт.	Масса семян с растения, г	Масса 1000 семян, г
Крис (контроль)	110±5,3	-	4,0±1,0	95±41,6	5,9±2,7	3,0
100 mM (4 ч)	74	2	9	151	8,8	3,5
100 mM (4 ч)	110	8	9	104	4,5	3,4
100 mM (4 ч)	112	22	7	151	4,7	4,0
100 mM (4 ч)	106	13	5	26	4,0	4,0
100 mM (4 ч)	105	22	8	131	9,0	3,6
100 mM (4 ч)	118	6	12	1451	9,3	3,7
100 mM (6 ч)	114	37	5	131	5,0	3,7
50 mM (4 ч)	129	3	9	1159	5,8	3,1
50 mM (4 ч)	148	42	3	132	5,2	3,9
50 mM (4 ч)	143	1	6	102	9,4	3,7
25 mM (4 ч)	129	2	12	917	4,4	3,9
25 mM (4 ч)	132	2	10	329	19,9	3,1
25 mM (4 ч)	111	53	2	112	5,2	4,4
25 mM (4 ч)	120	40	3	120	6,0	5,3
25 mM (4 ч)	108	28	6	63	4,3	4,0
25 mM (6 ч)	105	15	7	145	4,9	3,5

Одним из ключевых показателей селекционной ценности рапса является жирнокислотный состав масла семян. Главным показателем пищевого направления рапса является отсутствие в жирнокислотном составе эруковой кислоты. В наших экспериментах ни у донора, ни у мутантных линий эруковой кислоты в масле семян не обнаружено. Следующим важным показателем качества пищевого масла является соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. В этом отношении наилучшим из генотипов считается тот, у которого сумма пальмитиновой и стеариновой насыщенных жирных кислот намного меньше суммы ненасыщенных кислот. Кроме того, для диетического питания приветствуются генотипы рапса, которые обладают высоким содержанием олеиновой кислоты.

Анализ жирнокислотного состава полученных мутантных линий проводился у двух семенных поколений. В таблице 5 представлены только те линии удвоенных гаплоидов, у которых жирнокислотный состав значительно отличался от контроля. Как показывают данные таблицы 5, в первом мутантном поколении у большинства линий происходит значительное увеличение процентного соотношения олеиновой кислоты за счет уменьшения состава линолевой кислоты. Однако во втором поколении происходит значительное уменьшение олеиновой кислоты у всех изученных линий с ее высокими показателями. При этом одновременно происходит увеличение процента линолевой кислоты у этих линий. Следует отметить уменьшение суммарного содержания ненасыщенных жирных кислот у мутантов второго поколения.

Таблица 5. Показатели жирнокислотного состава семян у мутантных линий рапса сорта Крис первого (M1) и второго (M2) поколения, урожай 2013 и 2014 года соответственно

Table 5. Indicators of the fatty acid composition of seeds from mutant strains of rapeseed Chris cultivar first (M1) and second (M2) generation, vintage 2013 and 2014, respectively

Наименование линий, обработанных NaN ₃ (mM)	P (C16:0)	S (C18:0)	O (C18:1)	L (C18:2)	Ln (C18:3)
M ₁ (25)	6,06	2,77	78,89	6,75	1,23
M ₂ (25)	4,73	2,16	70,36	15,92	5,90
M ₁ (50)	10,16	-	53,41	19,90	-
M ₂ (50)	6,10	2,94	66,60	16,53	5,39
M ₁ (100) 1p	6,30	3,44	79,26	8,17	2,83
M ₂ (100) 1p	5,40	2,51	71,27	13,77	2,60
M ₁ (100) 2p	6,82	2,86	76,63	9,65	2,59
M ₂ (100) 2p	5,72	2,59	67,61	16,72	5,00
M ₁ (100) 3p	6,14	2,95	78,51	7,05	2,18
M ₂ (100) 3p	5,73	2,79	69,71	13,69	3,90
M ₁ (100) 4p	6,87	2,70	77,84	7,45	1,76
M ₂ (100) 4p	4,91	2,55	61,36	21,39	6,01
Контроль 2013 г.	4,99	1,87	67,31	16,64	5,18
Контроль 2014 г.	6,03	2,43	67,28	15,02	5,24

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные научные исследования показали, что химические мутагены могут быть эффективно использованы для получения фертильных линий с широким спектром изменчивостей. Показано, что мутагены азид натрия (NaN₃) и этилметансульфанат (ЭМС) при обработке изолированных микроспор в течение одного часа значительно влияют на индукцию эмбриогенеза. В дальнейшем при повышении концентрации мутагена значительно снижается частота эмбриогенеза. При этом наблюдается генотипическая зависимость при малых концентрациях мутагенов. Так, если без мутагена индукция эмбриогенеза от количества культивируемых микроспор у сорта Викинг составила 6,5%, то при концентрации ЭМС 4 мМ – 1,2%, в случае азид натрия при концентрации 0,01 мМ – 1,1%. В дальнейшем у обоих сортов процент эмбриогенеза значительно снижается при повышении концентрации мутагенов.

Регенерация из обработанных мутагеном андрогенных эмбриоидов происходит с достаточно высокой частотой. Низкие концентрации мутагенов стимулируют процесс регенерации. Добавление ауксина отрицательно сказывается на регенерации на всех изучаемых вариантах, как по сорту Викинг, так и по сорту Крис. Кроме того, отмечено, что на регенерацию растений из эмбриоидов влияет состав гормонов в питательной среде и концентрация мутагена. При этом два фактора влияют на регенерацию независимо друг от друга. Во время регенерации у некоторых растений наблюдалось изменение формы стебля и листьев, а также альбинизм.

Проведенный на семенных корешках мутантных линий (M1) цитологический анализ явных нарушений в стадии метафазы не определил. Вместе с тем, в процессе роста и развития растений в полевых условиях наблюдались карликовые и скороспелые формы. Большинство полученных мутантных линий были стерильными.

Размах изменчивости у полученных фертильных линий по всем изучаемым признакам довольно широк. Из полученного растительного материала можно выделить линии с высокими, по сравнению с контролем, показателями по массе семян с растения и массе 1000 семян. При этом наилучшие результаты показали линии, полученные при 25 мМ азид натрия с 4-часовой экспозицией.

В наших экспериментах ни у донора, ни у мутантных линий эруковой кислоты в масле семян не обнаружено. Анализ жирнокислотного состава полученных мутантных линий проводился у двух семенных поколений. В первом мутантном поколении у большинства линий происходит значительное увеличение процентного соотношения олеиновой кислоты за счет уменьшения состава линолевой кислоты. Однако во втором поколении происходит значительное уменьшение олеиновой кислоты у всех изученных линий с ее высокими показателями. При этом одновременно происходит увеличение процента линолевой кислоты у этих линий. Следует отметить уменьшение суммарного содержания ненасыщенных жирных кислот у мутантов второго поколения.

Проведенные научные исследования показали высокую эффективность использования химического мутагенеза в культуре изолированных микроспор для получения селекционно-ценного исходного материала ярового рапса. В результате экспериментов выделены линии с признаками скороспелости, высокой урожайности и высокого качества масла семян. Созданы не просто мутантные линии, а удвоенные гаплоиды, поэтому вероятность того, что данные линии сохраняют мутации в последующих семенных

поколениях, очень высокая. Полученный материал будет использован для получения отечественных сортов ярового рапса.

Финансирование

Работа выполнена в рамках гранта 0038/ГФ по подприоритету «Исследования в области продовольственной безопасности» Бюджетной программы 120, финансируемой Комитетом науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

1. Downey R.K., Rakow G.F.W. Rapeseed and Mustard // In: Principles of cultivar development. Crop Species. Macmillan Publishing Company. – 1987. – Vol. 2. – P. 437-486.
2. Jambhulkar S.J. Mutagenesis: Generation and Evaluation of Induced Mutations, in M. Delseny J.-C. Kader (Editors-in-Chief) // Advances in Botanical Research Incorporating Rapeseed Breeding. Academic Press is an imprint of Elsevier. – 2007. – Vol. 45. – P. 417-434.
3. Improvement of new and traditional industrial crops by induced mutations and related biotechnology / IAEA. – Vienna, 2003. – P. 1-164.
4. Siyuan Tan, Richard R. Evans, Mark L. Dahmer, Bijay K. Singh, Dale L. Shaner. Imidazolinone – tolerant crops: history, current status and future // Pest Manag. Sci. – 2005. – Vol. 61. – P. 246-257.
5. Emrani S.N., Arzani A., Saeidi G. Seed viability, germination and seedling growth of canola (*Brassica napus* L.) as influenced by chemical mutagens // African Journal of Biotechnology. – 2011. – Vol. 10(59). – P. 12602-12613.
6. Maluszynski M., Szarejko Y., Sigurbjurnsson B. Haploidy and mutation techniques / In: S.M. Jain, S.K. Sopory, R.E. Veilleux (eds). *In vitro* haploid production in higher plants // Kluwer, Dordrecht. – 1996. – Vol. 1. – P. 67-93.
7. Szarejko I., Forster B.P. Doubled haploidy and induced mutation // Euphytica. – 2007. – Vol. 158. – P. 359-370.
8. Scott L. McClinchey, Laima S. Kott. Production of mutants with high cold tolerance in spring canola (*Brassica napus*) // Euphytica. – 2008. – Vol. 162. – P. 51-67.
9. Sakhno L.O. Variability in the Fatty Acid Composition of Rapeseed Oil: Classical Breeding and Biotechnology // Cytology and Genetics. – 2010. – Vol. 44, №6. – P. 389-397.
10. Alison M.R. Ferrie, Christian Mollers. Haploids and doubled haploids in Brassica spp. for genetic and genomic research // Plant Cell Tissue Organ Culture. – 2011. – Vol. 104. – P. 375-387.
11. Choung P.V., Beversdorf W.B. High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *B. carinata* // Braun. Plant Sci. – 1985. – Vol. 39. – P. 219-226.
12. Lichter R. From microspores to rape plants: A tentative way to low glucosinolate strains in world crops // In: H. Sorensen (ed.). Production, utilization, description, Nijhoff, Junk, Dordrecht. – 1985. – Vol. 11. – P. 268-277.
13. Swanson E.B., Coumans M.P., Wu S.C., Barsby T.L., Beversdorf W.D. Efficient isolation of microspores and the production of microspore-derived embryos in *Brassica napus* L. // Plant Cell Rep. – 1987. – Vol. 6. – P. 94-97.
14. Swanson E.B., Coumans M.P., Brown G.L., Patel J.D., Beversdorf W.D. The characterization of herbicide tolerant plants in *Brassica napus* L. after *in vitro* selection of microspores and protoplasts // Plant Cell Rep. – 1988. – Vol. 7. – P. 83-87.
15. Жамбакин К.Ж., Шамекова М.Х., Волков Д.В., Затыбеков А.К., Дауров Д.Л., Жорабекова А.К., Халиков А.П. Получение удвоенных гаплоидов рапса // Вестник КазНУ. Серия биологическая. – 2012. – №3(55). – С. 47-57.
16. Ferrie A.M.R., Taylor D.C., Mackenzie S.L., Rakow G., Raneyand J.P., Keller W.A. Microspore mutagenesis of *Brassica species* for fatty acid modifications: a preliminary evaluation // Plant Breeding. – 2008. – Vol. 127. – P. 501-506.
17. Foster B.P. Technical Research on Microspore Mutation with EMS in *Brassica napus*. <http://www.research-degree-thesis.com/agriculture/crop/27161.html>
18. He Jiangming, Wang Jingqiao, Chen Wei, Li Genze, Cun Shouxian. Effect of EMS treatment on microspore embryogenesis *in vitro* in *Brassica napus* // Southwest China Journal of Agricultural Sciences. – 2004. – Vol. 17(6). – P. 690-693.
19. Wan G.L. *In Vitro* Mutagenesis for Selection of Novel Germplasm in *brassica napus* // Crop Science. – 2008. – Vol. 194. – P. 169-247.

20. Отчет о НИР №0109РК00320 по проекту 02.02.02.p3 «Разработка биотехнологии получения генетически модифицированного рапса с повышенной устойчивостью к засолению почв», выполнен в рамках НТП 0.0489. – Алматы, 2009.

21. Eric B. Swanson. Microspore Culture in Brassica // *Plant Cell and Tissue Culture*. – 1990. – Vol. 6. – P. 159-169.

22. ГОСТ Р 51483-99. Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот к их сумме / Государственный стандарт Российской Федерации. – М., 1999. – С. 151-159.

REFERENCES

1. Downey R.K., Rakow G.F.W. Rapeseed and Mustard. In: Principles of cultivar development. Crop Species. Macmillan Publishing Company, 1987, vol. 2, pp. 437-486.

2. Jambhulkar S.J. Mutagenesis: Generation and Evaluation of Induced Mutations, in M. Delseny J.-C. Kader (Editors-in-Chief). *Advances in Botanical Research Incorporating Rapeseed Breeding*. Academic Press is an imprint of Elsevier, 2007, vol. 45, pp. 417-434. doi: 10.1016/S0065-2296(07)45014-5.

3. Improvement of new and traditional industrial crops by induced mutations and related biotechnology. IAEA, Vienna, 2003, pp. 1-164.

4. Siyuan Tan, Richard R. Evans, Mark L. Dahmer, Bijay K. Singh, Dale L. Shaner. Imidazolinone - tolerant crops: history, current status and future. *Pest Manag. Sci.*, 2005, vol. 61, pp. 246-257. doi: 10.1002/ps.993.

5. Emrani S.N., Arzani A., Saeidi G. Seed viability, germination and seedling growth of canola (*Brassica napus* L.) as influenced by chemical mutagens. *African Journal of Biotechnology*, 2011, vol. 10(59), pp. 12602-12613.

6. Maluszynski M., Szarejko Y., Sigurbjornsson B. Haploidy and mutation techniques. In: Jain S.M., Sopory S.K. Veilleux R.E. (eds.). *In vitro haploid production in higher plants*. Kluwer, Dordrecht, 1996, vol. 1, pp. 67-93. doi: 10.1007/978-94-017-1860-8_5.

7. Szarejko I., Forster B.P. Doubled haploidy and induced mutation. *Euphytica*, 2007, vol. 158, pp. 359-370. doi: 10.1007/s10681-006-9241-1.

8. Scott L. McClinchey, Laima S. Kott. Production of mutants with high cold tolerance in spring canola (*Brassica napus*). *Euphytica*, 2008, vol. 162, pp. 51-67. doi: 10.1007/s10681-007-9554-8.

9. Sakhno L.O. Variability in the Fatty Acid Composition of Rapeseed Oil: Classical Breeding and Biotechnology. *Cytology and Genetics.*, 2010, vol. 44, no. 6, pp. 389-397. doi: 10.3103/s0095452710060101.

10. Alison M.R. Ferrie, Christian Mollers. Haploids and doubled haploids in *Brassica* spp. for genetic and genomic research. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2011, vol. 104, pp. 375-387. doi: 10.1007/s11240-010-9831-4.

11. Choung P.V., Beversdorf W.B. High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *B. carinata*. *Braun. Plant Sci.*, 1985, vol. 39, pp. 219-226. doi: 10.1016/0168-9452(85)90178-5.

12. Lichter R. From microspores to rape plants: A tentative way to low glucosinolate strains in world crops. In: Sorensen H. (ed). *Production, utilization, description*, Nijhoff, Junk, Dordrecht, 1985, vol. 11, pp. 268-277.

13. Swanson E.B., Coumans M.P., Wu S.C., Barsby T.L., Beversdorf W.D. Efficient isolation of microspores and the production of microspore-derived embryos in *Brassica napus* L. *Plant Cell Rep.*, 1987, vol. 6, pp. 94-97.

14. Swanson E.B., Coumans M.P., Brown G.L., Patel J.D., Beversdorf W.D. The characterization of herbicide tolerant plants in *Brassica napus* L. after in vitro selection of microspores and protoplasts. *Plant Cell Rep.*, 1988, vol. 7, pp. 83-87. doi: 10.1007/bf00270110.

15. Zhambakin K.Zh., Shamekova M.H., Volkov D.V., Zatybekov A.K., Daurov D.L., Zhorabekova A.K., Halikov A.R. Getting doubling haploids of rape. *KazNU Bulletin. Biology series.*, 2012, vol. 3(55), pp. 47-57.

16. Ferrie A.M.R., Taylor D.C., Mackenzie S.L., Rakow G., Raneyand J.P., Keller W.A.. Microspore mutagenesis of *Brassica species* for fatty acid modifications: a preliminary evaluation. *Plant Breeding*, 2008, vol. 127, pp. 501-506. doi: 10.1111/j.1439-0523.2008.01502.x.

17. Foster B.P. Technical Research on Microspore Mutation with EMS in *Brassica napus*. <http://www.research-degree-thesis.com/agriculture/crop/27161.html>

18. He Jiangming, Wang Jingqiao, Chen Wei, Li Genze, Cun Shouxian. Effect of EMS treatment on microspore embryogenesis in vitro in *Brassica napus*. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2004, vol. 17(6), pp. 690-693.

19. Wan G.L. In Vitro Mutagenesis for Selection of Novel Germplasm in *Brassica Napus*. *Crop Science*, 2008, vol. 194, pp. 169-247.

20. Report on the research project №0109РК00320 02.02.02.r3 "Development of biotechnology produce genetically modified canola with increased resistance to salinity," made in the framework of STP 0.0489. Алматы, 2009.

21. Eric B. Swanson. Microspore Culture in Brassica. *Plant Cell and Tissue Culture*, 1990, vol. 6, pp. 159-169. doi: 10.1385/0-89603-161-6:159.

22. Gamborg O.L., Miller R.A. & Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 1968, vol. 50. 151-158.

23. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum*, 1962, vol. 15, pp. 473-497.

24. GOST 51483-99. Vegetable oils and animal fats. Determination by gas chromatography mass of methyl esters of individual fatty acids to their sum, the State Standard of the Russian Federation. Moscow, 1999, pp. 151-159.

РАПСТЫҢ ОҚШАУЛАНҒАН МИКРОСПОРАЛАРЫНЫҢ ДАҚЫЛЫНДАҒЫ МУТАГЕНЕЗ

Жамбакин К.Ж., Затыбеков А.К., Волков Д.В., Шамекова М.Х.

*Биология және биотехнология институты
Тимирязев к-сі, 45, Алматы, 050040, Қазақстан
alexbek89@mail.ru*

ТҮЙІН

Химиялық мутагендердің рапстың оқшауланған микроспораларының дақылдарына әсері зерттелген. Мутагенезге тікелей микроспоралар да және олардан алынған эмбриодтер де ұшырады. Оқшауланған микроспораларды өңдеген кезде натрий азидтері (NaN_3) мутагендерінің және этилметансульфанаттың (ЭМС) бір сағат ішінде эмбриогенездің индукциясына едәуір әсер ететіндігі көрсетілген. Рапстың мутагендермен өңделген эмбриодтарынан қосарланған гаплоидтар алынды. Алынған мутанттардан өсімдік тұқымдарының массасы және 1000 тұқым массасы бойынша көрсеткіштер бақылаумен салыстырғанда жоғары көрсеткіштерге ие сорттармақтарды бөліп шығаруға болады. Бұл ретте ең жақсы нәтижелерді 25 мМ NaN_3 4 сағаттық экспозициясынан алынған сорттармақтар көрсетті. М1 бірінші ұрпағында оның көрсеткіштері жоғары болған, барлық зерттелген сорттармақтарда М2 мутанттарының екінші ұрпағында олейн қышқылының айтарлықтай азаюы байқалды. Бұл ретте осы сорттармақтарда линоль қышқылы пайызының жоғарылауы жүреді. Екінші ұрпақтың мутанттарында қанықпаған май қышқылдарының жиынтық құрамының төмендегенін атап өткен жөн. Жүргізілген жұмыстың нәтижесінде жоғары өнімділігінің және тұқымдар майының сапасы жоғарылығының белгілері бар мутантты қосарланған гаплоидтер алынды.

Негізгі сөздер: рапс, мутагенез, гаплоидтар, микроспоралар, эмбриодтер.