

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ РОСЛИН І ГЕНЕТИКИ

На правах рукопису

Карпець
Андрій Іванович

ІНДУКОВАНИЙ МУТАГЕНЕЗ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН
І ТКАНИН ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ

ОЗ. 00. 15 - генетика

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ 1993

Робота виконана в Інституті фізіології
АН України / м. Київ



00814726 (S)

Науковий керівник : доктор біологічних наук, академік АН України,
професор
В. В. Моргув

Офіційні опоненти : доктор біологічних наук, член-кореспондент
АН України і УААН
В. А. Сидоров

кандидат біологічних наук
Т. М. Чеченева

Провідна установа : Київський державний університет
ім. Т. Г. Шевченка

Захот відбудеться "17" червня 1993 р. в 10 годин на засіданні
Спеціалізованої ради Д 016.57.01 в Інституті фізіології рослин
та генетики АН України
(252022, Київ-22, вул. Васильківська, 31/17)

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту

Автореферат розісланий "17" травня 1993 р.

Вчений секретар
Спеціалізованої ради
кандидат біологічних наук

В. А. Труханов

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність досліджень. Овима пшениця є важливою сільськогосподарською культурою, яка має велике значення як продукт харчування для людей і цінний корм для сільськогосподарських тварин.

На теперішній час валові збори зерна овимої пшениці в Україні не задовольняють потреб переробних галузей промисловості.

Найефективнішим шляхом збільшення виробництва зерна є створення нових більш продуктивних сортів. Останнім часом поряд з традиційними методами у селекційних стратегіях, направлених на прискорене виведення нових високопродуктивних, стійких до несприятливих умов середовища сортів культурних рослин все ширше використовуються експериментальна мутаційна мінливість та біотехнологічні підходи, основою яких є методи культури клітин і тканин. Біотехнологічний шлях, який являє собою відокремлення клітини або групи клітин від організму та перенесення їх у штучно створені умови культивування, в тому числі в мутагенними чинниками, практично повністю виключає вплив тканьових, органічних та організмennих захисних та регуляторних систем, які забезпечують стабільність геному (Моргун, Бондаренко, 1991). Внаслідок цього можна одержати широку генетичну мінливість.

Застосування мутагенів в культурі *in vitro* може значно розширити мутаційну мінливість клітин, що культивуються, а в подальшому і регенерованих з них рослин.

Тому важливе значення має вивчення специфічності мутаційної мінливості рослин-регенерантів, одержаних при застосуванні в культурі *in vitro* фізичних та хімічних мутагенів, особливо, у такої цінної культури як овима пшениця, з метою підвищення ефективності створення нових селекційно-цінних форм.

Дослідження механізмів, які викликають соматональну мінливість, є однією з фундаментальних проблем генетики.

Визначення частоти та спектру соматональної мінливості у різних генотипів овимої пшениці допоможе виявити головні причини цього явища, що дасть можливість більш ефективного його використання, як додаткового шляху розширення генетичної мінливості поряд з традиційними методами гібридизації та експериментального мутагенезу.

Мета і завдання досліджень. Мета роботи - вивчення специфіки індукованої мутаційної мінливості озимої пшениці, викликаной застосуванням фізичних та хімічних мутагенів *in vitro*.

У зв'язку з цим передбачалось:

- дослідити частоту калусоутворення і регенерації в культурі тканин недозрілих зародків озимої пшениці при впливі фізичними та хімічними мутагенами;

- вивчити частоту та спектр соматональної мінливості у рослин різних генотипів озимої пшениці, регеноерованих в умовах культури *in vitro* недозрілих зародків;

- дослідити специфіку індукованої мінливості рослин і ефективність індукування селекційно-цінних мутацій у озимій пшениці при впливі фізичними та хімічними мутагенами в культурі тканин;

- вивчити основні господарські характеристики виділених практично-цінних соматональних і мутантних ліній.

Наукова новизна досліджень. Наукова новизна досліджень полягає у розробці нових методів розширення генетичної мінливості рослин озимої пшениці, завдяки застосуванню фізичних та хімічних мутагенів в культурі клітин і тканин; вивченні закономірностей мутаційної мінливості озимої пшениці при дії мутагенними факторами *in vitro*. В результаті досліджень встановлена залежність частоти мутацій від різних варіантів впливу мутагенами. Показано вперше, що додавання мутагенів у поживне середовище забезпечує найбільший вихід мутацій, в тому числі селекційно-цінних. Виявлена специфічність у появі певних типів мутацій після впливу мутагенними чинниками в культурі *in vitro*. На широкому спектрі сортів озимої пшениці вивчена соматональна мінливість рослин, одержаних в культурі тканин недозрілих зародків.

Практична цінність. Розроблено спосіб дії мутагенними чинниками в культурі тканин озимої пшениці, та досліджена його ефективність у одержанні опадкових змін. Одержані селекційно-цінні мутантні лінії, які заслуговують на використання в генетичних, біохімічних, фізіологічних дослідженнях і практичній селекції. Деякі з них включені у селекційний процес

і проходять випробування у дослідному сільськогосподарському виробництві ІФРГ АН України.

Апробація роботи. Дослідження проводилися за планом науково-дослідних робіт інституту.

Матеріали дисертації представлені на:

- XII Міжнародному Конгресі Еукарпіа в Готтінгені, ФРН (1989);
- Всесоюзній нараді в експериментального мутагенезу в Москві (1990);
- Республіканській конференції молодих вчених в проблем генетики і селекції сільськогосподарських рослин в Одесі (1990);
- VI з'їзді Українського товариства генетиків та селекціонерів ім. М. І. Вавилова в Полтаві (1992);
- Конференції молодих вчених в проблем фізіології рослин і генетики в Києві (1992).

Публікація результатів досліджень. Експериментальні дані і основні положення дисертації відображені у 8 публікаціях.

Обсяг і структура роботи. Дисертація викладена на 160 сторінках машинописного тексту. Складається із вступу, шести глав, висновків, практичних рекомендацій, списку літератури. Містить 24 таблиці і 12 малюнків. Список використаної літератури включає 203 найменування, в тому числі 157 на іноземних мовах.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктом досліджень було вибрано ряд сортів озимої пшениці: Лютеценс 7, Харківська 11, Миронівська 61, Миронівська 808, Киянка, Верхняцька 20, Бучани, а також селекційну лінію УК-8.

Рослини-регенеранти у пробірках були одержані співробітниками відділу цитогенетики та поліплоїдії і лабораторії клітинної селекції ІФРГ, та відділу ембріології інституту клітинної біології та генетичної інженерії.

Для одержання калусної культури 14-ти добові зрізочки після видалення в колосків стерилізували на протязі 19-20 хвилин, видаляли недозрілі зародки і розташовували їх на поживному

середовищі Мурасіге і Скуга з 1.5 мг/л 2,4-Д, 250 мг/л гідролізату казеїну та 200 мг/л глютаміну. У випадку застосування середовища з мутагенами, їх додавали в рівних концентраціях. Культивування проводили у темноті при температурі 26+1°C на протязі 1-1.5 місяця. Для регенерації калуси переносили на середовище МС із зменшеною у 2 рази концентрацією макросолей, без 2,4-Д, глютаміну, гідролізату казеїну і доповнене 1 мг/л бензиламінопурину і 0.5 мг/л індоліл-3-оцтової кислоти. Далі культивування проводили при світлі - освітленість 2500-3000 люкс. Фотоперіод становив 16 годин - день, 8 годин - ніч. Через місяць рослинки-регенеранти висаджували у пробірки.

В експерименті при використанні хімічного мутагену в культурі *in vitro* застосовувались два способи обробки хімічними мутагенами. Перший спосіб - намочування недозрілих зернівок у розчинах мутагенів. Другий - додавання хімічних мутагенів у середовище для культивування.

Як мутагенні фактори використовувались N-нітровоетилсечовина (НМС) і 1,4-біс-діазаацетилбутан (ДАБ). При першому способі (намочуванні) недозрілі зернівки видаляли з колосків та клали у розчин мутагену на 15 годин при 22°C. Після цього зернівки відмивали у декількох порціях води та стерилізували. Контролем були зернівки, намочувані у дистильованій воді. При другому способі (додаванні мутагену в середовище) їх вилучали із колосків, стерилізували, відділяли зародки та садили їх на поживне середовище, яке містило в собі мутаген.

У експерименті по вивченню дії іонізуючої радіації, гамма-променями діяли на насіння, а в одержаних рослин М. брали недозрілі зародки для введення в культуру тканин.

Із пробірок рослинки-регенеранти для кращого коренеутворення переносили у вологий перліт в теплицю. Створювали вологу камеру. Далі зміцнені рослини висаджували в удобрену ґрунтову суміш в маленькі посудини.

Яровізації проводили у кліматичних камерах низьких температур (КНТ) на протязі 45-50 днів при температурі 1-2°C.

Після цього рослини вирощували у великих сосудах в теплиці. На протязі вегетації проводили біометрію морфологічних ознак, відзначали змінені рослини. Вирощування R₁, R₂ та наступних поколінь регенерантів проводили в полі. Друге покоління

висівали посімейно за схемою: 1 колос - 1-метровий рядок в міжряддях 30 см. Під час вегетації проводили облік мутацій по загально прийнятій методиці. Всі рослини, відібрані у другому поколінні, висівали в R= двохметровими рядками. В кожному поколінні через 10 рядків регенерантів висівали 1 ряд вихідного генотипу - контроль. На протязі вегетації рослин відзначали дати настання основних фізіологічних фаз розвитку, перевіряли успадкування змінених ознак, виділених у 2-му поколінні, робили описання та структурний аналіз мутантних сімей. Ті з них, які мали селекційно-цінні ознаки висівали у контрольному ровсаднику на ділянках площею 10 м². Збирання проводили в період повної стиглості насіння. Під час збирання вимірювали врожай в ділянки.

Оцінку ураженості рослин борошнестов росом та бурю листовою іржею проводили за шкалами Саарі та Прескотт і Петерсона (Методи селекції и оцінки устойчивости пшеницы и ячменя к болезням в странах-членах СЗВ, 1988).

Вміст білку в зерні соматоклональних ліній визначали за допомогою приладу "Інфранід". Визначали також вміст сирої клейковини (Пумпянский, 1971), її якість оцінювали використовуючи прилад ВДК (вимірювач деформації клейковини).

Амінокислотний аналіз зерна мутантних ліній проводили методом кислотного гідролізу з визначенням вмісту амінокислот на автоматичному амінокислотному аналізаторі ААА 339.

Для виявлення змін у глітенінкодуючих локусах мутантів був проведений електрофорез за модифікованою методикою Лемлі на 10% і 15% гелях.

Статистичну обробку експериментальних даних проводили використовуючи метод дисперсійного аналізу (Доспехов, 1985), достовірність різниці між середніми значеннями ознак оцінювали за критеріями Ст'юдента та Фішера (Плюхинский, 1970). Математичні обчислення проводили з використанням персональних ЕОМ.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вплив фізичних та хімічних мутагенів на калусоутворення і регенерацію в культурі тканин овимої пшениці.

Для розширення генетичної мінливості рослин-регенерантів овимої пшениці ми використовували попереднє гамма-опромінення сухого насіння для одержання донорних рослин Ма, недозрілі зародки вернівок яких були екоплантами для калусної культури. З неї в подальшому отримували регенеранти.

При такому впливі в цілому спостерігалось зменшення частоти ініціації калусу у сортів Харківська 11 та Миронівська 61. При підвищенні дози опромінення до 200 Гр процент калусоутворення значно зменшувався в порівнянні з цим показником при дові 100 Гр.

Опромінення викликало значне пониження частоти регенерації, лише при дові 100 Гр у сорта Харківська 11 не відбувалося достовірного зменшення проценту регенерації в порівнянні з контролем. Найнижчим цей показник був при впливі дозою 200 Гр у сорту Харківська 11 (17.2%).

При дії хімічними супермутагенами N-нітродиметилсечовиною (НМС) та 1,4-біс-діазацетилбутаном (ДАБ) нами не виявлені зміни калусоутворення у сортів Лютесценс 7 та Харківська 11 у межах вастосованих концентрацій. Процент калусоутворення не залежав від варіантів обробки (самоочування, додавання у поживне середовище), а також від вивчених нами концентрацій НМС та ДАБ.

Хімічні мутагени впливали на процес формування ембріогенних калусних тканин і, відповідно, на регенерацію рослин, оскільки відзначалось значне зменшення цього показника водночас із підвищенням концентрації мутагенів. Залежність частоти регенерації у обох досліджуваних сортів від варіанту впливу мутагеном спостерігалась при вастосуванні НМС. У випадку вастосування ДАБ подібна залежність існувала у сорта Харківська 11.

Серед одержаних регенерантів після обробки фізичними та хімічними мутагенами відзначали значні зміни морфологічних та фізіологічних ознак, таких як висота рослин, довжина та форма колосу, довжина вегетаційного періоду. В більшості випадків у рослин спостерігалось зниження середніх значень морфологічних

овнак та елементів структури урожаю. При оцінці виживання при дорощуванні регенерантів нами відзначалось зменшення цього показника та підвищення проценту стерильних форм при вастосуванні хімічних мутагенів.

Частота та спектр соматональної мінливості рівних генотипів овимої пшениці.

Соматональна мінливість вивчалась нами без впливу мутагенних чинників в культурі тканин.

У соматонів всіх досліджуваних сортів спостерігали значне збільшення генетичної мінливості в порівнянні з вихідними рослинами. Частота видимих мутацій підвищилась у 2.2-6.2 рази (табл. 1). Відзначали значну різницю між сортами по цьому показнику, що вказує на його сортоспецифічний характер. Так, найбільший процент мутацій був виявлений у соматонів сорту Миронівська 61 - 11.76%, а найменший у соматонів Верхняцької 20 - 2.41%. Значну кількість мутацій отримано у регенерантів сортів Харківська 11 (6.52%), Лотесценс 7 (5.56%), Бучани (8.28%), селекційної лінії УК-8 (9.95%), помітно меншу - у сортів Миронівська 808 (4.52%), Киянка (4.25%).

Відрізнялись досліджувані сорти також за процентом виділених із них селекційно-цінних видимих мутацій. Найбільша їх кількість спостерігалась у соматонів сорту Миронівська 61 (5.29%), а найменша - у сорту Миронівська 808 (1.25%).

У R_1 - R_2 поколіннях рослин-регенерантів ми спостерігали широкий спектр соматональної мінливості. Вона зачіпала висоту рослин, довжину та форму колосу, восковий наліт, ширину листка, тривалість вегетаційного періоду та стійкість до хвороб. В той же час у вихідних сортів спостерігали 1-2 типи мутаційних змін.

Найбільша кількість типів мутацій виявлена у регенерантів сорту Миронівська 61 (16 типів), а найменша - Верхняцької 20 (2 типи).

З високою частотою виникали низькорослі форми, рослини зі зміненою довжиною та формою колосу (довгий колос, рихлий та щільний колос). Серед соматонів селекційної лінії УК-8 високу частоту мали форми стійкі до борошнистої роси (4.49%).

Більшість соматонів досліджуваних сортів мали не одну мутантну ознаку, а комплекс мутаційно змінених ознак.

Таблиця 1
Частота виникнення мутацій у соматоклонів R₁-R₃ різних
генотипів озимої пшениці.

Сорт, лінія	Число дослід- жених сімей	Число мутант- них сімей	Частота мутант- них сі- мей	% селекційно- цінних мутацій	
				від за- гальної кількос- ті сімей	від за- гальної кількос- ті мутацій
Миронівська 808, (вихідний сорт)	147	3	2,04	0,0	0,0
Миронівська 808, соматоклони	398	18	4,52	1,25*	28,9*
УК-8, (вихідна лінія)	421	4	0,95	0,0	0,0
УК-8, соматоклони	2110	210	9,95*	4,59*	26,7*
Миронівська 61, (вихідний сорт)	160	3	1,88	0,0	0,0
Миронівська 61, соматоклони	170	20	11,76*	5,29*	32,8*
Лютесценс 7, (вихідний сорт)	300	1	0,33	0,0	0,0
Лютесценс 7, соматоклони	683	38	5,56*	2,03*	35,2*
Киянка, (вихід- ний сорт)	340	1	0,29	0,0	0,0
Киянка, соматоклони	212	9	4,25*	1,88*	38,1*
Харківська 11, (вихідний сорт)	400	1	0,25	0,0	0,0
Харківська 11, соматоклони	414	27	6,52*	2,17*	46,3*
Бучани, (ви- хідний сорт)	310	2	0,65	0,0	0,0
Бучани, соматоклони	471	39	8,28*	4,46*	45,9*
Верхнячська 20, (вихідний сорт)	340	1	0,29	0,0	0,0
Верхнячська 20, соматоклони	166	4	2,41*	2,41*	80,0*

* Різниця достовірна в порівнянні з вихідним сортом при P < 0,05

Структурний аналіз соматоклональних ліній показав значні відмінності багатьох в них від вихідних сортів за висотою рослин та за кількісними ознаками, що мають вплив на продуктивність рослин, такими як довжина колосу, кількість зерен в головному колосі та маса 1000 зерен (табл. 2). Деякі з них відрізнялись значним збільшенням або зменшенням цих ознак в порівнянні з рослинами вихідного сорту. Спостерігали також значну різницю за цими показниками між соматоклональними лініями одного й того ж генотипу. Так, максимальне відхилення за висотою рослин між лініями УК-8 становило 43.3 см, за кількістю зерен у головному колосі - 24 зернини.

Частота та спектр мутаційної мінливості озимої пшениці при дії мутагенами в культурі тканин.

Проведені нами дослідження показали значне підвищення мутаційної мінливості у регенерантів при застосуванні фізичних і хімічних мутагенів в культурі тканин недоврілих зародків в порівнянні з рівнем соматоклональної мінливості.

Серед рослин, одержаних в культурі тканин недоврілих зародків М. при попередньому гамма-опроміненні насіння сортів Миронівська 61 та Харківська 11, відзначено помітне збільшення частоти видимих мутацій в порівнянні з варіантом без опромінення: при дозі 100 Гр у регенерантів сорту Миронівська 61 - у 1.7 рази, сорту Харківська 11 - у 2.2, а при дові 200 Гр, відповідно, у 2 та 3.5 рази (табл. 3). Спостерігалась залежність проценту мутацій від дови опромінення.

Підвищувалась також частота селекційно-цінних мутацій. Найбільша кількість їх виявлена при опроміненні довою 200 Гр (4.16% та 4.76%), яка більш ніж у 2 рази перевищувала частоту цих мутацій у варіанті "без опромінення", тобто у соматоклонів.

При застосуванні хімічних супермутагенів N-нітрозометилсечовини (НМС) та 1,4-біс-діазацетилбутану (ДАБ) *in vitro* ми спостерігали значне збільшення частоти мутаційних змін у регенерантів та їх потомства. Так, додавання НМС у культуральне середовище збільшило кількість мутантних сімей серед рослин R₂M₂ сорту Лютесценс 7 більш ніж у 3 рази, а аналогічне застосування ДАБ - майже у 5 разів в порівнянні з рівнем соматоклональної мінливості (табл. 4).

Таблиця 2

Морфологічні ознаки соматональних ліній R₅ різних сортів озимої пшениці.

Номер соматональ- ної лінії	Висота рослин, см X±Sx	Параметри головного колосу			Маса зерна з голов- ного ко- лосу, г X±Sx	Маса 1000 зерен, г X±Sx
		довжина, см X±Sx	кількість колосків X±Sx	кількість зерен, X±Sx		
МИРОНІВСЬКА 808						
Вихідний сорт	109,0±1,4	10,2±0,2	15,7±0,3	42,2±1,2	1,3±0,1	38,0±1,1
1067	81,5±1,9*	8,2±0,2*	16,5±0,3	43,5±1,7	1,0±0,1	36,1±1,6
УК-8						
Вихідна лінія	80,8±1,0	9,2±0,2	15,2±0,2	45,7±1,9	1,1±0,0	35,8±0,9
1043	109,5±4,3*	8,6±0,1*	16,0±0,9	43,3±2,1	2,0±0,2*	43,3±2,1*
8077	100,6±1,2*	8,3±0,2	16,2±0,8	22,7±1,8*	1,5±0,3	47,3±0,3*
8083	72,9±2,1	7,5±0,3*	15,0±0,4	33,5±1,8*	1,8±0,5*	28,8±0,6*
184	91,8±1,0	7,9±0,2*	15,2±0,3	30,4±1,5*	1,2±0,1	33,4±1,4*
8382	116,2±1,6*	12,2±0,3*	17,4±0,3*	46,7±4,2	1,2±0,1	26,6±0,7*
ЛЮТЕСЦЕНС 7						
Вихідний сорт	94,6±1,5	7,4±0,3	15,3±0,6	31,4±2,0	1,0±0,1	35,9±2,5
1044	93,7±1,1	9,2±0,2*	16,4±0,4	39,3±2,3*	1,8±0,1*	38,4±1,3
ВЕРХНЯЧСЬКА 20						
Вихідний сорт	107,3±1,8	8,3±0,3	15,3±0,7	31,3±1,8	1,0±0,2	36,3±1,2
8293	89,9±2,3*	9,3±0,2*	17,4±0,2*	46,1±1,4*	0,9±0,0	31,3±1,0*

* В порівнянні з варіантом "вихідний сорт" різниця достовірна P < 0,05

Таблиця 3

Частота мутацій у рослин озимої пшениці $R_1M_2 - R_2M_3$, отриманих в культурі тканин недозрілих зародків M_1 при попередньому гамма-опроміненні насіння.

Варіанти впливу	Кількість досліджених сімей	Кількість мутантних сімей	% мутантних сімей	% селекційно-цінних мутацій
МИРОНІВСЬКА 61				
Вихідний сорт	160	1	0,63	0,00
без опромінення	140	16	11,43	1,43
опромінення насіння 100 Гр	150	30	20,00*	2,66*
опромінення насіння 200 Гр	120	27	22,50*	4,16
ХАРКІВСЬКА 11				
Вихідний сорт	200	1	0,50	0,00
без опромінення	149	10	6,71	2,01
опромінення насіння 100 Гр	128	19	14,84*	2,34
опромінення насіння 200 Гр	126	30	23,81*	4,76*

* В порівнянні з варіантом "без опромінення" різниця достовірна при $P < 0,05$

Таблиця 4

Частота мутацій в $R_1M_1-R_3M_3$ при впливі хімічними мутагенами в культурі тканин недоарілих зародків озимої пшениці.

Варіанти впливу	Мутаген, концентрація мг/л %	Кількість досліджених сімей	Кількість мутантних сімей	% мутантних сімей	% селекційно-цінних мутацій
ЛЮТЕСЦЕНС 7					
Вихідний сорт	-	300	1	0,33	0,00
Замочування недоарілих зернівок у воді	-	683	38	5,56	2,03
Замочування недоарілих зернівок у розчині мутагену	НМС 50 (0,005)	282	36	12,77*	2,48
Додавання мутагену у поживне се-	НМС 2,5 (0,00025)	230	40	17,39*	2,61*
	ДАБ 50 (0,005)	168	21	12,50*	3,57*
	ДАБ 100 (0,01)	154	41	26,62*	5,84*
ХАРКІВСЬКА 11					
Вихідний сорт	-	400	1	0,25	0,00
Замочування недоарілих зернівок у воді	-	414	27	6,52	2,17
Замочування недоарілих зернівок у розчині мутагену	НМС 50 (0,005)	370	39	10,54*	4,32*
Додавання мутагену в поживне се-	НМС 2,5 (0,00025)	208	26	12,50*	2,28
редовище	ДАБ 50 (0,005)	190	15	7,89	1,58
	ДАБ 100 (0,01)	123	2	1,63*	0,81

* Різниця в порівнянні з варіантом "замочування недоарілих зародків у воді" достовірна при $P < 0,05$

При використанні *in vitro* НМС відзначено залежність частоти виникнення мутацій від варіанту дії мутагену: додавання його у поживне середовище викликало появу більшої кількості мутацій, ніж замочування недозрілих зернівок у розчині мутагену.

Виявлено зростання проценту мутантних сімей в R₂M₂ у сорту Лютесценс 7 із збільшенням концентрації ДАБ.

Кількість селекційно-цінних мутацій при використанні хімічних мутагенів в культурі тканин також підвищувалась в порівнянні в їх процентом у соматклонів.

Виявлена сортоспецифічність у реакції сортів на вплив мутагенами, яка проявлялась у значно меншому підвищенні частоти мутацій у сорту Харківська 11 в порівнянні в сортом Лютесценс 7.

Нами спостерігався широкий спектр мутаційної мінливості у рослин досліджуваних сортів озимої пшениці при застосуванні мутагенів в культурі тканин. Всього при гамма-опроміненні виявлено 9 типів мутацій, а при хімічному мутагенезі *in vitro* - 14.

Найбільший процент при попередньому гамма-опроміненні в R₂M₂ сортів Миронівська 61 та Харківська 11 становили нивкорослі, напівкарликові сім'ї, з довгим і рихлим колосом, окверхедним колосом, щільноколосі та пізньостиглі форми. Серед ре-генерантів сорту Миронівська 61 знайдено сім'ї стійкі до борошнистої роси. Серед рослин R₂M₂ сорту Харківська 11 із значною частотою виникали високорослі сім'ї та ранньостиглі.

Хімічні мутагени в R₂M₂ сорту Лютесценс 7 в найбільшою частотою викликали появу нивкорослих, напівкарликових, а також високорослих сімей, довгоколосих, рихлоколосих та пізньостиглих, а Харківської 11 - нивкорослих, в рихлим колосом та пізньостиглих.

Результати структурного аналізу мутантних ліній показували значні відмінності їх по багатьох морфологічних ознаках, зокрема по висоті та елементах продуктивності рослин, таких як кількість продуктивних стебел, довжина головного колосу, кількість колосків та зерен у головному колосі, маса зерна в головному колосі та рослини. Так у рослин лінії 3833, отриманої при гамма-опроміненні насіння сорту Миронівська 61 дозою 100 Гр, у головному колосі спостерігали, в середньому, на 8.7 зерен менше, ніж у вихідного сорту. Головний колос у рослин лінії 3956, одержаної при опроміненні насіння 200 Гр, був на 1.7 см довший.

У ньому виявлено на 5.9 зерен більше, ніж у рослин сорту Харківська 11. Лінії 7764 і 7750, отримані при додаванні ДАВ у культуральне середовище у сорту Лютесценс 7, були вищими, ніж вихідний сорт, із збільшеною кількістю продуктивних стебел, більшою довжиною головного колосу та кількістю зерен у ньому. Те ж можна сказати про лінію 1045, одержану при замочуванні недозрілих зернівок у розчині НМС.

Покращення елементів продуктивності у рослин мутантних ліній, отриманих завдяки застосуванню мутагену *in vitro* вказує на можливість використання цих ліній для потреб селекції.

Урожайність соматоклональних ліній та біохімічні ознаки їх зерна.

В результаті аналізу урожайності виділених соматоклональних ліній за результатами контрольного та попереднього випробувань, нами виявлені значні відхилення як у сторону збільшення, так і зменшення їх урожайності відносно вихідного сорту та прийнятого стандарту (табл. 5).

Таким чином, соматоклональна мінливість через зміну кількісних ознак, в тому числі елементів продуктивності регенерантів, безпосередньо впливає на урожайність одержаних соматоклональних ліній, яка в деяких випадках може бути вищою, ніж у вихідної форми, що демонструє перспективність використання мінливості, викликонаї умовами *in vitro*, в селекційних програмах.

Аналіз хлібопекарських якостей соматоклональних та мутантних ліній досліджуваних сортів показав значні відмінності їх від вихідних сортів за такими показниками, як вміст клейковини та білку в зерні і показник ВДК (вимірвач деформації клейковини) (табл. 6).

Підвищення показників вмісту клейковини та білку у деяких соматоклональних ліній дає підставу сподіватись на можливість використання соматоклональної мінливості для селекції на покращення хлібопекарської якості.

Дослідження амінокислотного складу білків зерна соматоклональних ліній виявило суттєві зміни за вмістом деяких амінокислот, і, зокрема лівину, в порівнянні з вихідними сортами. Це явище може бути використано в селекції для покращення харчової цінності зерна.

Таблиця 5

Урожайність соматональних ліній в контрольному випробуванні.

Польовий номер 1991 року	Сорт, селекційна лінія	Змінена ознака	Врожайність ц/га	Відхилення \pm від середньої врожайності стандарту ц/га	Група врожайності
st 1044	Миронівська 61 Лотесценс 7 4847	- напівкарликовість, слабо вражується фузаріозом колосу	47,0 43,0	+ - 4,0	- - I
1050	Харківська 11 (вихідний сорт)	-	43,0	- 4,0	- I
1045	4863	довгий колос, висококущистість	61,0	14,0	+ III
1065	УК-8 (вихідна лінія)	-	46,0	- 1,0	- 0
1069	5303	щільний колос	45,0	- 2,0	- 0
1043	4812	довгий колос, крупне зерно	48,0	1,0	- 0
1068	Миронівська 808 (вихідний сорт)	-	51,0	4,0	+ I
1067	4882	низькорослість щільний колос	42,0	- 5,0	- I
1040	Бучани (вихідний сорт)	-	48,0	1,0	+ 0
1039	4419	висококущистість	50,0	3,0	+ 0
1042	4782	висококущистість	53,0	6,0	+ I
1046	4378	висококущистість, щільний колос	56,0	9,0	+ II

НСР_{0.05} - 3,6 ц/га
m - \pm 1,6 %

Таблиця 6

Деякі біохімічні ознаки соматоклональних ліній озимої пшениці.

Сорт, номер соматоклональної лінії	Вміст клейковини в зерні, %	Показник ВДК	Вміст білку, %	Вміст лізину, %
Миронівська 808 (вихідний сорт)	29,6±0,2	62,1±0,2	14,1±0,1	2,77±0,05
1067	31,6±0,1*	65,2±0,1*	14,7±0,1*	3,08±0,01*
УК-8, (вихідна лінія)	28,2±0,3	76,0±0,3	13,8±0,2	2,69±0,05
8382	30,6±0,2*	100,0±0,6*	14,6±0,1*	-
184	32,2±0,1*	78,8±0,2*	15,3±0,1*	2,31±0,01*
1069	31,6±0,4*	80,2±0,4*	14,8±0,1*	2,31±0,01*
Лютесценс 7 (вихідний сорт)	30,1±0,1	82,6±0,1	14,4± 0,2	2,69±0,01
1044	25,6±0,3*	85,0±0,3*	12,3± 0,1*	2,38±0,01*
7764	32,4±0,4*	79,2±0,2*	15,2± 0,2*	-
7750	28,6±0,5	83,6±0,4	13,8± 0,1*	2,38±0,05*
Харківська 11 (вихідний сорт)	30,5±0,1	74,2±0,1	14,5± 0,2	3,23±0,01
1066	30,1±0,2	76,6±0,4*	14,4± 0,1	3,08±0,01*

* Різниця достовірна в порівнянні з вихідним сортом при $P < 0,05$

Вивчення електрофоретичних спектрів глютенінів показало наявність змін у них у рослин деяких соматоклональних та мутантних ліній. Спостерігали відсутність одного з компонентів спектру, який кодується локусом Glu1A, при співпаданні розташування інших у соматоклонів і вихідного сорту. В більшості випадків електрофоретичні спектри соматоклонально змінених ліній та їх вихідних сортів не відрізнялись, що вказує на те, що, очевидно, мутація не зачіпала глютенінкодуєчі локуси.

ВИСНОВКИ

1. Застосування фізичних і хімічних мутагенів в культурі тканин недовірлих зародків озимої пшениці значно збільшувало (у 1.5 - 4.8 рази) частоту мутаційної мінливості по багатьох морфологічних ознаках рослин-регенерантів в порівнянні з рівнем соматоклональної мінливості.

2. Дія мутагенами викликала широкий спектр мутаційних змін. Специфічність його полягала у значному збільшенні частоти окремих типів мутацій в порівнянні з появою їх у соматоклонів.

3. Хімічні мутагени N-нітросометилсечовина та 1,4-біс-діазоацетилбутан, застосовані в межах оптимальних доз, не пригнічують процеси калусоутворення, як при замочуванні недовірлих зернівок у водних розчинах мутагенів, так і при додаванні мутагенів у поживне середовище. В той же час частота регенерації та кількість одержуваних регенерантів зменшується. Додавання мутагенів у поживне середовище в більшій мірі пригнічує формування ембріогенного калусу, ніж при замочуванні недовірлих зернівок у водному розчині мутагенів.

4. Метод додавання хімічних мутагенів у поживне середовище забезпечує появу у 1.5 - 2 рази більшої кількості мутаційних змін, ніж замочування недовірлих зернівок у водному розчині мутагенів.

5. Встановлено значну соматоклональну мінливість серед рослин-регенерантів R₁-R₈ ряду сортів озимої пшениці, яка у 2.2 - 6.2 рази перевищувала спонтанний рівень виникнення мутацій. Частота спадкових змін у соматоклонів залежала від генотипу. Виявлено широкий спектр спадкових змін у соматоклонів по багатьох

кількісних ознаках, в тому числі по елементах продуктивності.

6. У виділених соматоклональних та мутантних лініях виявлені значні відхилення від вихідного сорту або лінії як у сторону зменшення, так і збільшення продуктивності, а також вмісту білку і клейковини, та невамінної амінокислоти лізину.

7. Виділено перспективні соматоклональні та мутантні лінії, які відрізнялись від вихідних сортів покращеними селекційно-цінними ознаками.

8. При використанні культури клітин і тканин з метою одержання спадкових змін у рослин овимої пшениці, для підвищення частоти і спектру мутаційної мінливості слід застосовувати мутагенні чинники.

Практичні рекомендації.

1. Для одержання максимальної частоти і широкого спектру видимих мутацій рослин овимої пшениці, отриманих через культуру *in vitro*, найбільш ефективно застосовувати дію НМС та ДАБ на калус, що росте, при додаванні мутагенів у поживне середовище.

2. З метою підвищення частоти мутаційної мінливості в культурі тканин слід попередньо використовувати високі дози гамма-опромінення насіння овимої пшениці в подальшим введенням зародків рослин *M₂* в культуру *in vitro*.

3. Нові соматоклональні та мутантні лінії, виділені у сортів Лютесценс 7 (7750, 7764), Миронівська 808 (1067) та Харківська 11 (1046) пропонуються для використання в практичній селекції пшениці.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА МАТЕРІАЛАМИ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Сидорова Н. В., Моргун В. В., Логвиненко В. Ф., Карпец А. И. Влияние гамма-облучения на культуру незрелых зародышей овимой пшеницы // Частная генетика растений. Тез. конф. 23-25 мая, 1989 г. - Киев, 1989. - т. 2. - С. 72.

2. N. Sidorova, V. Morgun, V. Logvinenko, A. Karpets. Effect of gamma radiation on immature winter wheat embryo culture // Science for Plant Breeding. Book of Poster Abstracts XII Eucarpia Congress. Febr. 27 - March. 4, 1989, Gottingen,

Germany F. R., 1989. - P. 125-126.

3. Банникова В. П., Моргун В. В., Майстров П. Д., Барабанова Е. А., Логвиненко В. Ф., Карпец А. И. Влияние нитрозоаметилмочевины на процессы каллусообразования и регенерации в культивируемых in vitro зародышах пшеницы//Цитология и генетика. -1990. -т. 24, N 6. -С. 31-34.

4. Карпец А. И. Изучение соматклональной изменчивости растений озимой пшеницы, полученных методом культуры ткани незрелых зародышей// Сб. науч. трудов. Методы интенсификации селекционного процесса. -ВСГИ. - Одесса, 1990. -С. 62.

5. Моргун В. В., Логвиненко В. Ф., Сидорова Н. В., Карпец А. И. Генетическая изменчивость соматклонов, полученных из культуры незрелых зародышей озимой пшеницы//Сб. Теоретические и прикладные аспекты биотехнологии. -Киев, 1991. -С. 4-8.

6. Логвиненко В. Ф., Моргун В. В., Сидорова Н. В., Карпец А. И. Генетическая изменчивость соматклонов, полученных из культуры незрелых зародышей озимой пшеницы//II Съезд Всес. о-ва физиологов раст., Минск, 24-29 сент., 1990. Тев. докл. ч. 2. -М., 1992. -С. 121.

7. Карпец А. И., Логвиненко В. Ф., Майстров П. Д. Получение новых форм растений при использовании химических мутагенов в культуре ткани озимой пшеницы//VI Съезд Украинского об-ва генетиков и селекционеров им. Н. И. Вавилова (Полтава, 1992). -Киев, 1992. -т. 2. -С. 120.

8. Карпец А. И. Применение химического мутагенеза в культуре тканей для создания исходного материала озимой пшеницы//Актуальные проблемы физиологии растений и генетики. Тев. V конф. молодых ученых. -Киев, 1992. -С. 130.

Карпец

Підписано до друку 29.04.93. Формат 60x84 1/16. Папір офсетний.
Офсетний друк. Ум. друк. арк. 1,16. Тираж 100 прим. Зам. 962в.

ВНП корпорації УкрТІ, 252171, Київ 171, вул. Горького, 180.

465093

AB 27.432