

УДК 582.26:639.64.08

В.Н. Кулепанов¹, Ю.А. Ивановский^{2*}

- ¹ Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр, 690091, г. Владивосток, пер. Шевченко, 4;
- ² Артемовский филиал Дальневосточного государственного университета, 692750, г. Артем, просп. Ленина, 15

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ИНДУЦИРОВАННОГО МУТАГЕНЕЗА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НОВЫХ ФОРМ БУРОЙ ВОДОРОСЛИ ЛАМИНАРИИ (*SACCHARINA JAPONICA*)

Рассматривается возможность применения гамма-излучения для получения новых форм бурой водоросли ламинарии японской, чтобы использовать этот биологический материал в дальнейшем для селекции и культивирования. Подобраны дозы облучения. Облучение проводилось на стадии проростковой трубки (прорастание зооспоры в гаметофит). Был зарегистрирован высокий уровень морфологической изменчивости этой водоросли на фоне ее высокой радиорезистентности. Гамма-облучение может быть перспективным приемом при мутагенезе бурых водорослей.

Ключевые слова: *Saccharina japonica* (= *Laminaria japonica*), мутагенез, гамма-излучение, бурые водоросли, культивирование.

Kulepanov V.N., Ivanovsky Yu.A. Using the methods of induced mutagenesis to create new forms of the kelp laminaria (*Saccharina japonica*) // *Izv. TINRO*. — 2010. — Vol. 160. — P. 258–264.

Possibilities are studied of gamma radiation using for creation new forms of the kelp *Saccharina japonica* (= *Laminaria japonica*) for their further selection and cultivation. Laminaria was exposed to radiation in its germination stage when zoospores sprouted to gametophytes. The irradiation dose necessary for mutation was determined. The level of morphological variability was high, the seaweed was highly radioresistant. Gamma radiation is recommended as perspective technique for mutagenesis of brown seaweeds.

Key words: *Saccharina japonica* (= *Laminaria japonica*), mutagenesis, gamma radiation, kelp, seaweeds cultivation.

Введение

Бурая водоросль ламинария японская *Saccharina japonica* (= *Laminaria japonica*) — один из наиболее культивируемых видов в юго-восточной Азии. Только в Японии добывается более 100 тыс. т ламинарии, из них порядка 70 тыс. т является культивируемой (Ohno, Largo, 1998). На российском Дальнем Востоке в 1980-е гг. выращивалось до 8 тыс. т водорослей ежегодно (Суховеева, Подкорытова, 2006).

* Кулепанов Владимир Николаевич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией, e-mail: kulepanov@tinro.ru; Ивановский Юрий Александрович, доктор биологических наук, директор, e-mail: ivanovskiy@gmail.com.

Одна из составляющих успеха ведения марикультуры водорослей макрофитов — создание высокопродуктивных штаммов, отвечающих требованиям интенсивного культивирования. Исследования по селекции макроводорослей базируются на тех же методологических принципах, которые применяются для высших растений. Одним из перспективных направлений селекции является индуцированный мутагенез. Так, например, линия бурой водоросли ламинарии с повышенной продуктивностью была получена путем обработки спор химическими мутагенами и ионизирующей радиацией. Путем инбридинга и селекции были получены два клона ламинарии, у которых выход биомассы выше на 8–40 %, а содержание йода — на 20–58 % (Wu, 1998). В результате селекции *Porphyra yezoensis* получены 3 новые разновидности, позволяющие повысить урожай от 30 до 130 % (Wu, 1987). Получены межвидовые гибриды у 3 видов макроцистиса (Lewis, 1986). В генетике и селекции водорослей все шире начинают использовать метод культуры тканей. Рядом исследователей получен каллус из соматических тканей различных таксономических групп водорослей путем культивирования их на агаровых средах (Saga et al., 1982; Yokoya, 2000; Wang et al., 2006), в том числе и ламинарии (Qi et al., 1995).

С помощью индуцированного мутагенеза и соматического эмбриогенеза были получены штаммы грацилярии, отличающиеся от дикого типа морфологией и исключительно вегетативным способом размножения (Кулепанов и др., 1996). Это снимает проблему разрушения слоевищ грацилярии при спороношении и способствует введению ее в марикультуру побережья Приморья.

Большое количество радиоморфозов и более высокая выживаемость спорофитов получены при γ -облучении ламинарии японской на стадии зиготы (Багирова, 1992). Таким образом, ранние стадии развития ламинарии наиболее перспективны для целей радиационного мутагенеза. Генофонд популяции ламинарии японской, произрастающей в сублиторали Приморья, соответствует местным климатическим и гидрологическим условиям данного региона. Очевидно, что проведение селекционных работ с этой водорослью необходимо вести на основе материала из местной популяции. В этом случае результат может быть получен значительно раньше. Так, например, метод простого отбора на провокационном фоне позволяет легко выделить теплоустойчивую форму ламинарии (Крупнова, 1988). Одним из методов в селекционной работе с водорослями может стать радиационный мутагенез. Цель данной работы: подобрать дозы облучения и оценить перспективность применения этого метода в селекции ламинарии из местной популяции.

Материалы и методы

В экспериментах были использованы зрелые слоевища ламинарии, доставляемые с плантаций водорослевого хозяйства пос. Глазковка (Приморский край). Стимулирование выхода зооспор и культивирование гаметофитов осуществлялось по методикам, принятым в хозяйствах марикультуры (Буянкина, 1977; Мальцев, 1979; Крупнова, 1985; Kawashima, 1993). Слоевища слегка подсушивали и заворачивали в бумагу на ночь. На следующий день растения помещали в стерилизованную морскую воду. Выход спор проходил в течение часа. Оседание зооспор проводилось в стеклянных сосудах емкостью до 3 л на предметные стекла и стекла с намотанной на них в один слой предварительно вымоченной шелковой нитью. В каждом варианте опыта было не менее 3 повторностей из 10 стекол, 3 из которых были без намотанной нити. Количество воды в сосудах для выращивания — 0,5 л. Соленость воды — 32 ‰, pH — 8,2, температура воды в сосудах — $12,0 \pm 0,5$ °C, освещенность 4000 лк при длительности светового дня 12 ч. Морская вода с добавлением питательных солей NaNO_3 и Na_2HPO_4 менялась на 25 % еженедельно (Provasoli, 1958).

Облучение зооспор ламинарии проводилось на стадии проростковой трубки (прорастание зооспоры в гаметофит) на установке РХ-γ-30 γ-лучами ⁶⁰Со с мощностью дозы 2,5 Гр/мин. Дозы составили 50, 100 и 250 Гр. Полученные данные обрабатывались с использованием методов Фишера и Стьюдента (Шмидт, 1984; Заг, 1996).

Результаты и их обсуждение

Развитие гаметофитов после их облучения на стадии проростковой трубки характеризовалось, с одной стороны, задержкой развития основной массы материала и его повышенной гибелью, а с другой — более ранним вступлением в следующую стадию онтогенетического развития некоторой части популяции. Это хорошо видно при переходе гаметофитов от ранних стадий развития к гаметофитам, образующим органы размножения. Так, при переходе от стадии проростковой трубки к гаметофитной стадии, четвертые сутки после начала эксперимента, в контрольных партиях зарегистрировано 63 ± 5 % ранних форм гаметофитов и не отмечено появления гаметофитов с органами размножения; в партиях, облученных при дозе 50 Гр, ранних форм гаметофитов было 54 ± 8 % и отмечено появление зрелых гаметофитов — $1,0 \pm 0,5$ %; в партиях, облученных при дозе 100 Гр, доля гаметофитов ранних стадий составила 35 ± 10 % и отмечалось появление зрелых форм — $1,0 \pm 0,5$ %. Однако уже через день доля зрелых форм гаметофитов в контроле оказалась равной 37 ± 3 %, в отличие от достоверно меньшего их количества в облученных партиях: при 50 Гр — 26 ± 3 %, при 100 Гр — 25 ± 4 %. Скорость образования зигот в облученных партиях, вначале также превышала контроль. При этом наблюдался значительный отход зигот как в контрольных, так и в облученных партиях (табл. 1). Отмечено слипание зигот, когда они образовывали конгломераты (рис. 1), а также формирование более одного спорофита из одной зиготы (рис. 2).

Таблица 1

Переход от стадии гаметофита к стадии зиготы после облучения, число зигот на поле зрения микроскопа

Table 1

The transition from the stage of gametophyte to the stage of zygote after gamma-irradiation (number of zygotes in the field of microscope vision)

| Время после воздействия, сут | Доза гамма-облучения, Гр | | | |
|------------------------------|--------------------------|---------------|---------------|------------|
| | Контроль | 50 | 100 | 250 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | $0,5 \pm 0,5$ | $0,7 \pm 0,7$ | $2,5 \pm 0,8$ | 31 ± 7 |
| 13 | $6,5 \pm 1,8$ | $3,0 \pm 0,6$ | $2,4 \pm 0,5$ | 17 ± 3 |
| 14 | $1,9 \pm 0,5$ | $2,4 \pm 0,5$ | $1,6 \pm 0,4$ | 19 ± 4 |

Число морфологических нарушений в строении таллома резко возрастало в облученных партиях (табл. 2). Часто встречались нарушения в форме таллома (рис. 3): волнистость, образование утолщения в средней и верхней части, асимметричное относительно главной оси. В норме стадия однослойного спорофита не превышает 7–10 клеток (Kanda, 1936). При дальнейшем росте начинает формироваться второй слой клеток. В облученных же партиях встречались спорофиты с вытянутыми в один ряд клетками таким образом, что таллом приобретал нитевидную форму (рис. 3). Кроме радиоморфозов в виде нарушения формы таллома, было зарегистрировано появление двух форм ламинарии, определенной нами как кустистая (рис. 4) и быстрорастущая, которые могли представлять интерес для дальнейшей селекции, направленной на повышение урожайности.

Кустистой мы считали ту форму, при которой на одном ризоиде формировалось несколько слоевищ спорофитов. Нами были отслежены два возможных ме-

Рис. 1. Слипание зигот ламинарии. Стрелки указывают на образовавшиеся конгломераты зигот после γ -облучения в дозе 250 Гр

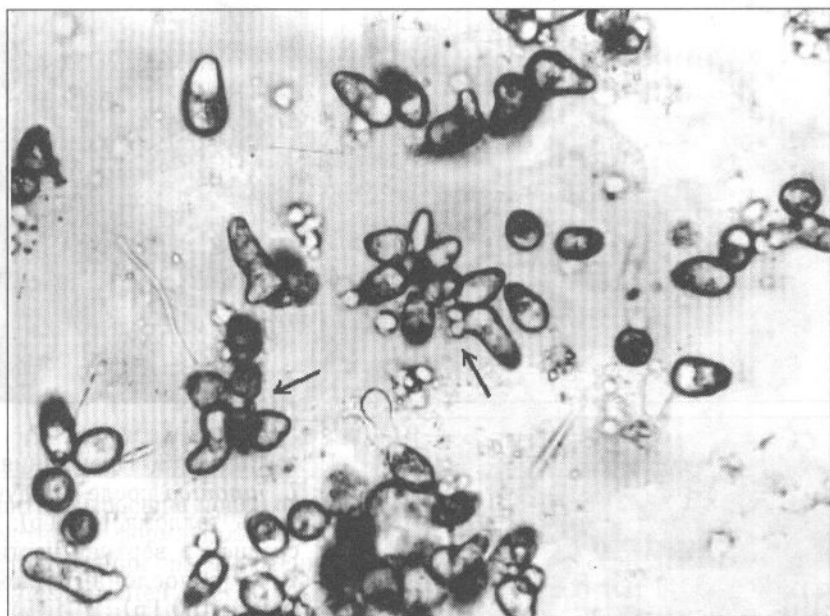


Fig. 1. Adhesion of laminaria zygotes. The arrows point to conglomeration of zygotes formed after exposure to γ -rays (dose 250 Gr)

Рис. 2. Формирование двух спорофитов из одной зиготы. Доза облучения 100 Гр

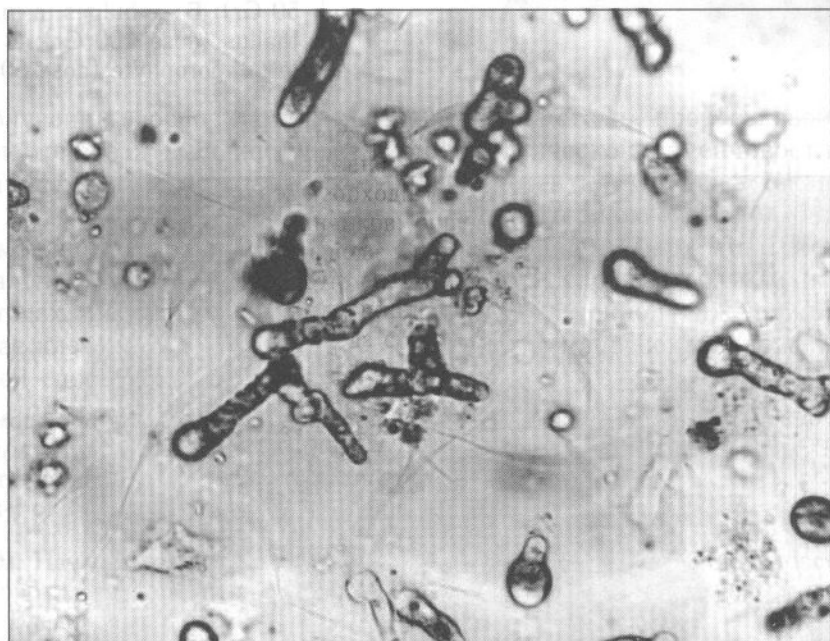


Fig. 2. Forming two sporophytes from one zygote after exposure to γ -rays (dose 100 Gr)

Таблица 2

Доля морфологических нарушений в спорофитах ламинарии (облучение на стадии проростковой трубки), %

Table 2

Percent of morphological abnormalities in sporophytes of laminaria after exposure to radiation at the stage of germination, %

| Доза, Гр | Тип нарушений | | Суммарная доля нарушений |
|----------|---------------------------|----------------|--------------------------|
| | Нарушения в форме таллома | Кустистость | |
| 0 | $3,7 \pm 2,1$ | $4,9 \pm 3,0$ | 9 ± 5 |
| 50 | $19,0 \pm 2,0$ | $6,1 \pm 2,2$ | 25 ± 5 |
| 100 | $17,0 \pm 5,0$ | $14,0 \pm 2,0$ | 31 ± 6 |
| 250 | $11,0 \pm 1,0$ | $20,3 \pm 0,8$ | 31 ± 2 |

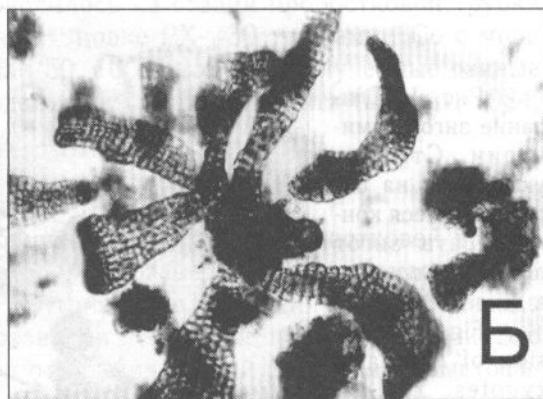
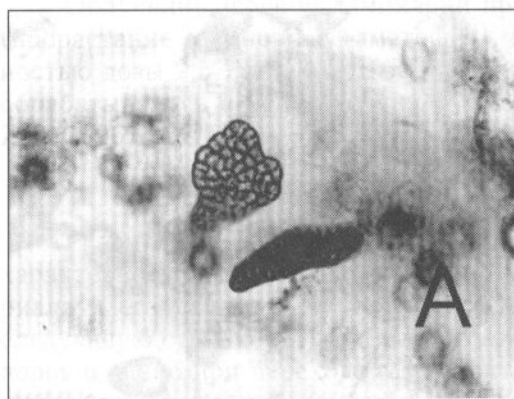


Рис. 3. Нарушения в форме талломов *L. japonica* после γ -облучения: **А** — волнистость таллома (50 Гр); **Б** — утолщения в средней и верхней части таллома (100 Гр); **В** — однослойный спорофит нитевидной формы (50 Гр)

Fig. 3. Abnormalities of thalli shape after exposure to γ -rays: **A** — wave of thallus (dose 50 Gr); **Б** — bulges in middle and top part of thallus (dose 100 Gr); **В** — single-celled filiform sporophyte (dose 50 Gr)

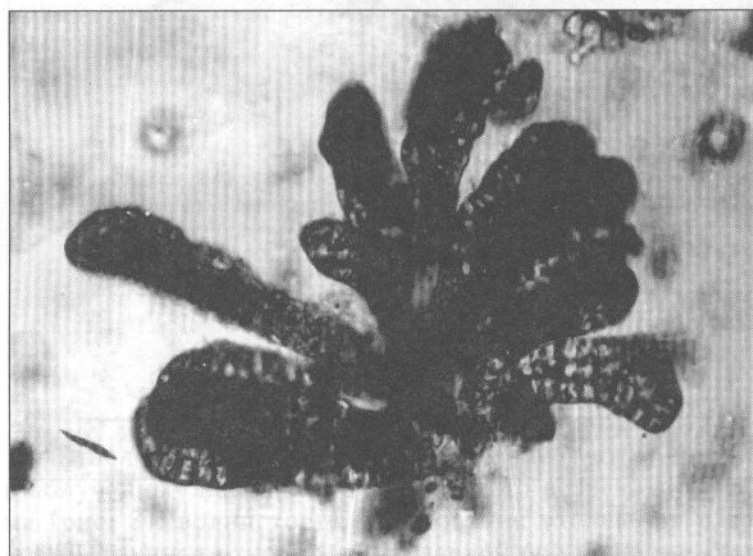


Рис. 4. Кустистая форма таллома (250 Гр)
Fig. 4. Bushy form of thallus after exposure to γ -rays (dose 250 Gr)

ханизма возникновения данного радиоморфоза. Первый — это слипание зигот. В облученных партиях, по неясным для нас причинам, зиготы часто образовывали конгломераты (см. рис. 1). Другой путь — образование более одного спорофита из одной зиготы. Возможность такого хода событий подтверждена прямыми наблюдениями (рис. 2).

Среди облученных водорослей до ювенильных стадий можно было наблюдать кустистые формы (рис. 5, А), а также спорофиты, превышающие по размерам остальные (рис. 5, Б). Эти две формы ламинарии, очевидно, можно считать перспективными для дальнейшей селекционной работы.

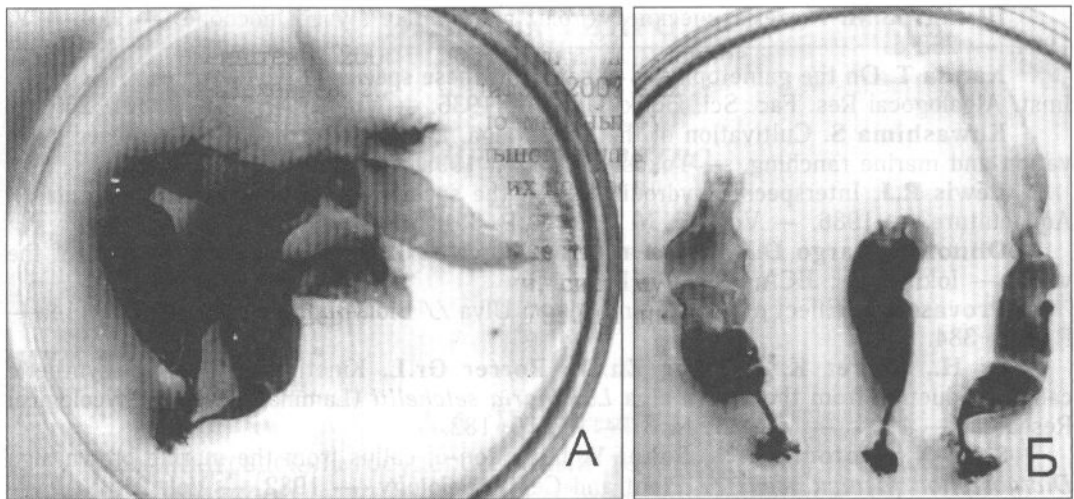


Рис. 5. Спорофиты, выросшие после облучения дозой 100 Гр на стадии проростковой трубки: **А** — кустистая форма таллома; **Б** — ювенильные талломы, имеющие различную скорость роста. Крайний правый ювенильный спорофит — быстрорастущая форма

Fig. 5. Sporophytes sprouted after exposure to γ -rays (dose 100 Gr) in the stage of germination: **A** — bushy form of thallus; **B** — juvenile thalli with various growth rate: the rightmost juvenile sporophyte is a fast-growing form

Заключение

При гамма-облучении зооспор ламинарии японской на стадии проростковой трубки был зарегистрирован высокий уровень морфологической изменчивости этой водоросли, причем на фоне ее высокой радиорезистентности. Даже такая высокая доза, как 250 Гр, не вызвала заметного отхода материала (см. табл. 1). Гамма-облучение можно признать вполне перспективным приемом при мутагенезе ламинарии. Дальнейшая селекционная работа может основываться как на традиционных методах, так и на использовании методов клеточной инженерии. В последнем случае клеточные культуры можно получать из перспективных для практических целей спорофитов.

Авторы выражают благодарность за помощь в техническом обеспечении экспериментов М.В. Багировой.

Список литературы

- Багирова М.В.** Начальные этапы индуцированного мутагенеза ламинарии японской // Экология морских гидробионтов. Морские экосистемы : тез. докл. конф. мол. ученых ТИНРО. — Владивосток : ТИНРО, 1992. — С. 73–74.
- Буянкина С.К.** Биотехника искусственного разведения морской капусты в Приморье // Тр. ВНИРО. — 1977. — Т. 74. — С. 52–56.
- Крупнова Т.Н.** Выделение теплоустойчивой формы ламинарии // Тез. докл. 3-й Всесоюз. конф. по мор. биол. Ч. 2. — Киев, 1988. — С. 205–206.
- Крупнова Т.Н.** Опыт культивирования ламинарии японской по двухгодичному циклу в Приморье : инструкция. — Владивосток : ЦПКТБ Дальрыба, 1985. — 41 с.
- Кулепанов В.Н., Ивановский Ю.А., Никифоров С.М.** Индуцированный мутагенез у красной водоросли *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. // Генетика. — 1996. — Т. 32, № 2. — С. 262–266.
- Мальцев В.Н.** Изучение гаметофита ламинарии японской в связи с ее культивированием // Тр. ВНИРО. — 1979. — Т. 138. — С. 46–51.
- Суховеева М.В., Подкорытова А.В.** Промысловые водоросли и травы морей Дальнего Востока: биология, распространение, запасы, технология переработки : монография. — Владивосток : ТИНРО-центр, 2006. — 243 с.

Шмидт В.М. Математические методы в ботанике : учеб. пособие. — Л. : ЛГУ, 1984. — 288 с.

Kanda T. On the gametophytes of some Japanese species of Laminariales // Sci. Pap. Imst. Algalogical Res. Fac. Sci. Hokk. Univ. — 1936. — Vol. 1, № 2. — P. 221–260.

Kawashima S. Cultivation of the brown alga, *Laminaria* “Kombu” // Seaweed cultivation and marine ranching. — Yokosuka : JICA, 1993. — P. 25–40.

Lewis R.J. Interspecific hybridization of the species of *Macrocystis* in California // Aquaculture. — 1986. — Vol. 57, № 1–4. — P. 35.

Ohno M., Largo D.B. The seaweed resource of Japan // Seaweed resource of the world. — Iokogama : JICA, 1998. — P. 1–14.

Provasoli L. Effect of plant hormones on *Ulva* // Biol. Bull. — 1958. — Vol. 114. — P. 375–384.

Qi H., Rorrer K.A., Jiang Zh.D., Rorrer Gr.L. Kinetics of non-photosynthetic callus production from the brown alga *Laminaria setchellii* (Laminariales) // Phycological Research. — 1995. — Vol. 43, № 3. — P. 179–182.

Saga N., Motomura T., Sakai Y. Induction of callus from the marine brown alga *Dictyosiphon foeniculaceus* // Plant and Cell Physiology. — 1982. — Vol. 23, № 4. — P. 727–730.

Wang A., Shuai L., Duan D. Filament induction in *Halymenia sinensis* (Halymeniaceae, Rhodophyta) // Bot. Mar. — 2006. — Vol. 49, № 4. — P. 352–354.

Wu C.Y. Progress in the genetics and breeding of economic seaweeds in China // Hydrobiol. — 1987. — № 151–152. — P. 57–61.

Wu C.Y. The seaweed resources of China // Seaweed resources of the world. — Yokogama : JICA, 1998. — P. 34–46.

Yokoya N.S. Apical callus formation and plant regeneration controlled by plant growth regulators on axenic culture of the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta) // Phycological Research. — 2000. — Vol. 48, № 3. — P. 133–142.

Zar J.H. Biostatistical Analysis. — New Jersey : Prentice Hall, 1996. — 662 p.

Поступила в редакцию 30.11.09 г.