

# Оценка устойчивости *Beta vulgaris* L. к ионной токсичности в культуре *in vitro* молекулярными методами

Т.П. ФЕДУЛОВА, вед. научн. сотр., д-р биолог. наук

Н.Н. ЧЕРКАСОВА, ст. научн. сотр.

А.А. НАЛБАНДЯН, ст. научн. сотр., канд. биолог. наук (e-mail: arpnal@rambler.ru)

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова»

## Введение

Проблема повышения устойчивости сельскохозяйственных растений является одной из важнейших в селекции. Возрастающее ухудшение окружающей среды и резкая перемена климата делают её первоочередной. В связи с этим возникает острая потребность в новых формах растений, которые могли бы обеспечить выживание как в условиях постоянно действующего стресса, так и при смене параметров окружающей среды. Перспективным направлением для создания устойчивых форм является применение методов биотехнологии [1].

Разработка методов на основе селективных систем *in vitro* позволяет проводить испытание и отбор устойчивых генотипов на клеточном уровне и также создавать новый устойчивый исходный материал в более короткий период, тем самым сокращая сроки получения высокопродуктивных сортов, приспособленных к возделыванию в стрессовых условиях [2, 3]. Если в качестве селективного фактора использовать стрессор, отличающийся широким спектром токсического воздействия, можно отобрать варианты с комплексной стрессоустойчивостью. Этому условию отвечают ионы тяжёлых металлов (ИТМ), токсичные в следовых количествах и характеризующиеся широким спектром патологического действия. В связи с этим

целесообразно использовать ИТМ для отбора клеточных вариантов, устойчивых к абиотическим стрессам [4, 5]. Среди абиотических стрессоров наиболее агрессивным считается осмотический стресс. Ионы кадмия отличаются разносторонним отрицательным действием [6]. Негативное влияние они оказывают на белки поздней стадии эмбриогенеза (LEA), к которым относятся дегидрины, обогащённые глицином, гистидином, лизином протеины. Их обнаруживают в ядре, цитоплазме, митохондриях. Как установлено, защитная роль дегидринов состоит в предупреждении коагуляции молекул и поддержании целостности клеточных мембран, что становится особенно актуальным при обезвоживании [7]. Это позволило использовать ионы кадмия для проведения отбора форм, устойчивых к ионному стрессу. Применение современных молекулярно-генетических методов анализа при идентификации различных стрессовых факторов играет значительную роль в сельском хозяйстве. Данная технология уникальна и при создании нового исходного материала сахарной свёклы биотехнологическими методами.

## Материалы и методика исследований

В качестве исходного материала в опытах были использованы генотипы сахарной свёклы, предостав-

ленные доктором сельскохозяйственных наук М.А. Богомоловым: МС-форм (МС 94 Ар, МС 2113, МС ЛБС16, МС 2093 и МС Перла), закрепителя стерильности Оуэн-типа (О-тип 010, О-тип ЛБО 17) и сростноплодных опылителей (ОП 15676, ОП 15465 и ОП 14044).

Культивирование микроклонов осуществляли при 16-часовом фотопериоде, температуре 23–26 °С, освещённости 5 тыс. люкс и влажности воздуха 70 %. В качестве эксплантов использовали микроклоны, зрелые зародыши семян сахарной свёклы. Для моделирования селективных условий к основной питательной среде добавляли ацетат кадмия  $Cd(CH_3CO_2)_2$  в различной концентрации (1–30 мМ).

ДНК выделяли из зелёной массы регенерантов с использованием наборов для выделения геномной ДНК (ЗАО «Синтол»). Качество образцов ДНК оценивали электрофорезом в 1%-ном агарозном геле в 1×ТВЕ-буфере, концентрацию определяли наборами для анализа ДНК HS QubitR (Thermo Fisher Scientific, США). Классическую полимеразно-цепную реакцию осуществляли в амплификаторе Genius (Великобритания). Для визуализации результатов ПЦР-анализа использовали УФ-трансиллюминатор Vilber Lourmat (Франция). В целях определения экспрессии изучаемого гена *MTP4* выделяли РНК реагентом Extract RNA (ЗАО «Евроген»).

Молекулярный анализ проводили на приборе ПЦР-РВ CFX 96 (BioRad).

В работе были использованы следующие специфические праймеры на ген устойчивости к тяжёлым металлам *МТР4*: F390/R390, F337.1/R337.1, F334/R334, F304/R304, F299/R299, F344/R344, F381/R381 [8]. Для ПЦР в реальном времени был сконструирован праймер RT\_147F/R. Дизайн и конструирование олигонуклеотидов проводили в программе Primer BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Секвенировали полученные ДНК-фрагменты методом Сэнгера на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500.

### Результаты исследований

В результате отбора регенерантов сахарной свёклы на питательных средах, содержащих ацетат кадмия в различной концентрации (1–6 мМ), было выявлено, что относительно низкие концентрации селективного агента (1 мМ) не оказывали негативного действия на прорастание зрелых зародышей семян, которое составило 58,3–77,7 % при выживаемости проростков 40,0–44,4 % (рис. 1).

При повышении концентрации селективного агента (Cd) до 8 мМ было заметно его ингибирующее действие, существенно замедлялся

Повторный отбор регенерантов сахарной свёклы на селективных средах

Селективные агенты	Выживаемость генотипов, %	
	МС-2113	О-тип 010
Ацетат кадмия, 4 мМ	58,3	53,8
Ацетат кадмия, 6 мМ	34,7	35,7

процесс прорастания семян, количество выживших проростков уменьшалось в 2 раза и составило 8,3–8,7 %. Семена начинали прорастать, а при дальнейшем увеличении селективной нагрузки (11 мМ) ростки погибали через несколько дней, что приводило к уменьшению выживаемости до 5,6 % и полной их гибели (15 мМ). По-видимому, этап набухания семени и прорастания корешка менее чувствителен к ионам кадмия, чем последующий рост проростков. Это связано с тем, что оболочка семян практически не проницаема для металла, и его проникновение в зародыш возможно только на заключительной стадии набухания, когда семенные покровы нарушаются. Высокое содержание ионов кадмия существенно замедляет или даже полностью останавливает процесс прорастания, что, вероятно, связано с непосредственным действием металла на процесс деления и растяжения клеток [9]. Поэтому для отбора устойчивых к ионной токсичности регенерантов сахарной свёклы оптимальной оказалась среда с содержанием

ацетата кадмия 4–6 мМ. При этом всхожесть семян *in vitro* составила 54,2–38,9 %, а выживаемость проростков – 38,1–13,3 %.

Так как не все отобранные в селективных условиях регенеранты сохраняют признак устойчивости, после нахождения их в обычных условиях целесообразно проводить повторный отбор на идентичных селективных средах. Повторный отбор в селективных условиях (4–6 мМ кадмия) показал их высокую адаптивную способность. Количество выживших регенерантов составило 34,7–58,3 (см. табл.).

Микроклоны хорошо развивались в селективных условиях с образованием нормальных черешковых листьев с цельной пластинкой, тупой верхушкой и клиновидным основанием, сбегающим по черешку. Прирост высоты к начальной у устойчивых регенерантов варьировал от 12,5 до 22,0 % в отличие от контрольных растений, у которых она была значительно меньше, что в течение 10–25 дней приводило к пожелтению листьев, некрозу точек роста, а в дальнейшем – к гибели микроклонов (рис. 2).

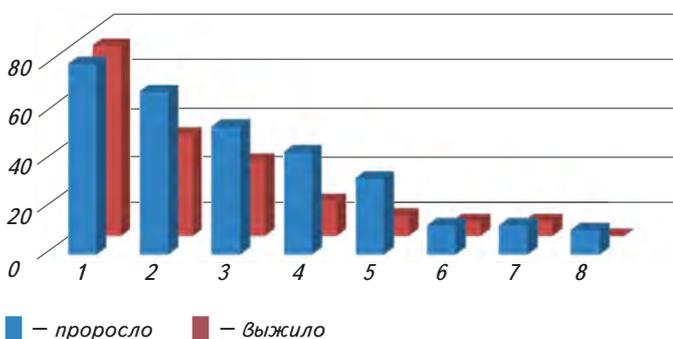


Рис. 1. Влияние различных концентраций ионов кадмия на прорастание семян (среднее для генотипов) сахарной свёклы *in vitro*: 1 – 0 мМ; 2 – 1 мМ; 3 – 2 мМ; 4 – 4 мМ; 5 – 6 мМ; 6 – 8 мМ; 7 – 11 мМ; 8 – 15 мМ



Рис. 2. Повторный отбор регенерантов: 1, 2 – контроль; 3, 4 – устойчивые

Результаты исследований позволили отобрать устойчивые к ионной токсичности растения-регенеранты сахарной свёклы.

Ионы металлов как один из наиболее негативных абиотических факторов вызывают изменения в метаболизме растений, угнетая нормальное функционирование физиологических процессов. В базе данных по *Beta vulgaris* L. описаны локусы на разных хромосомах, экспрессирующих белки, ответственные за устойчивость сахарной свёклы к тяжёлым металлам [10, 11]. Для выявления полиморфизма геномов устойчивых и чувствительных генотипов растений-регенерантов к тяжёлым металлам была поставлена серия экспериментов (классическая ПЦР и секвенирование по Сэнгеру).

10 образцов, из которых 6 были фенотипически отобраны как устойчивый материал, 4 – как чувствительные, протестированы на наличие гена устойчивости к тяжёлым металлам *MTP4*.

Секвенирование образцов растений-регенерантов по Сэнгеру выявило полиморфизм, который выражается в наличии однонуклеотидных замен (SNP), делеций/вставок. В результате анализа биоинформатических данных, полученных в программе Geneious Prime, установлен предполагаемый вариант трансляции нуклеотидной последовательности экзона 7 с нуклеотидными заменами, вставками и делециями. Установлено, какие SNPs являются значимыми (nonsynonymous), т. е. заменами, приводящими к изменению ами-

нокислотной последовательности в кодируемых полипептидах. Например, замена в позиции 155 (G/A) приводит к замещению аминокислоты серин (S) на аспарагин (N); SNP в позициях 160 (C/T) и 161 (T/C) вызывают замены: лейцин (L) – треонин (T). Однонуклеотидная замена в позиции 42 (C/T), наоборот, является нонсенс-мутацией и не инициирует замещение аланина (A) в аминокислотной последовательности (рис. 3).

Дорожки: № 2, 3, 5, 6 – устойчивые генотипы (на фрагментах 31–34); № 9, 10 – чувствительные (на фрагментах 35, 36). Exon 7 – HQ709091.1 (NCBI) (GenBank № HQ709091.1 NCBI).

Результаты обработки проведённого генетического анализа

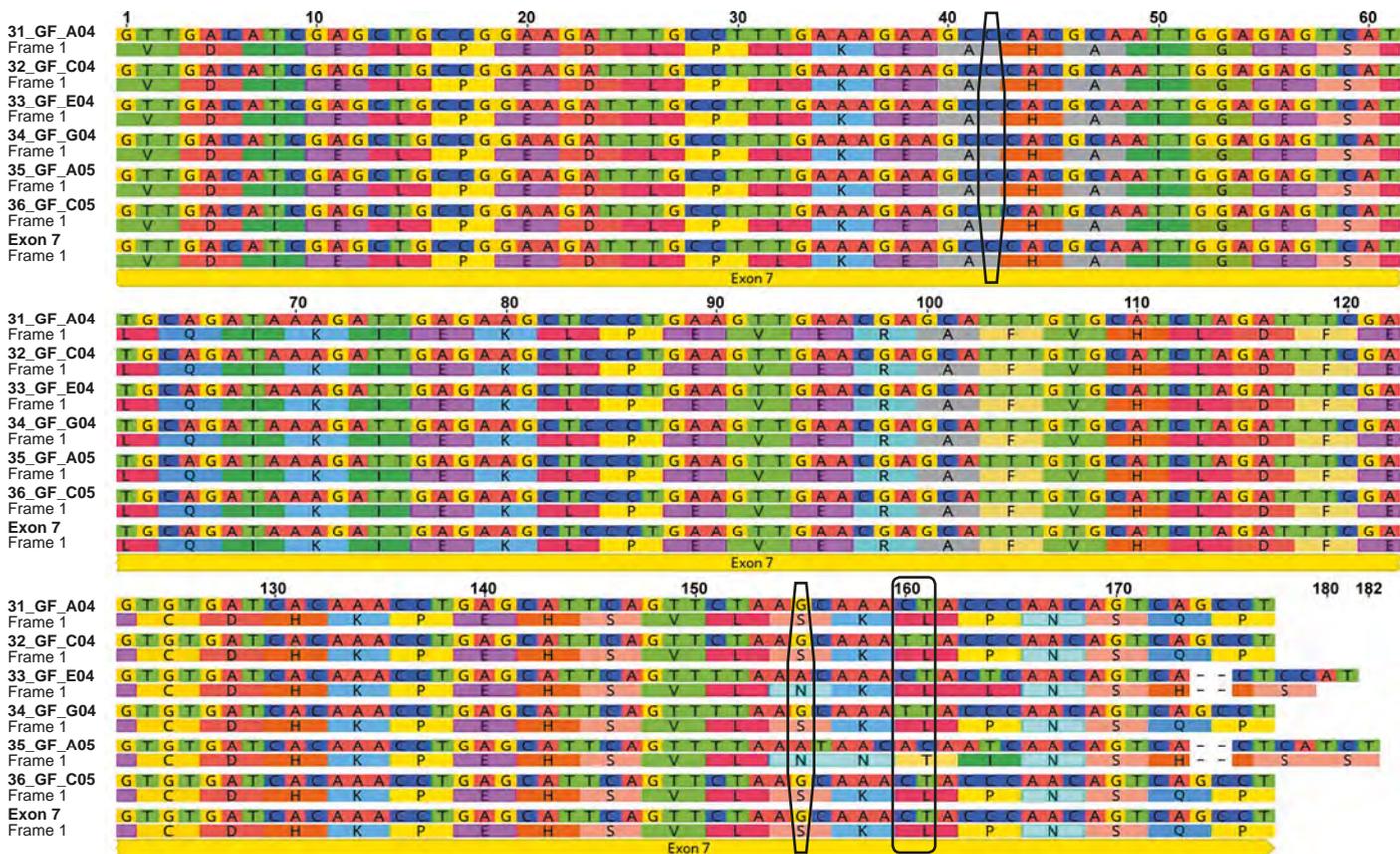


Рис. 3. Фрагмент выравнивания нуклеотидных последовательностей экзона 7 гена *MTP4* и дедуктивные аминокислотные последовательности

показали, что ген *MTP4* не является самостоятельной единицей (моногеном), чёткого ранжирования на резистентные и восприимчивые генотипы не прослеживается. Следовательно, можно утверждать, что если он и вносит свой вклад в резистентность растений сахарной свёклы, то только в tandem с другими генами семейства *MTP*. Вместе с тем в дальнейшем планируется изучение молекулярного полиморфизма, экспрессии следующих генов, в частности *MTP1* и *MTP2*, для оценки их вклада в формирование устойчивости растений сахарной свёклы к тяжёлым металлам.

Исследования в культуре *in vitro* позволили выявить оптимальные дозы ацетата кадмия (4–6 мМ) для отбора устойчивых регенерантов. Наиболее высокой регенерационной способностью в селективных условиях обладали зрелые зародыши семян сахарной свёклы, в отличие от микроклонов. Отобраны устойчивые растения-регенеранты. Результаты исследований будут использованы для разработки метода получения растений-регенерантов сахарной свёклы, устойчивых к комплексу стрессовых факторов и создания гибридов нового поколения.

#### Список литературы

1. Кошкин, Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных растений / Е.И. Кошкин. — М.: Дрофа, 2010. — 638 с.
2. Никитина, Е.Д. Разработка отдельных элементов технологии клеточной селекции яровой пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессам / Е.Д. Никитина, Л.П. Хлебова, О.В. Ерещенко // Известия Алтайского государственного университета. — 2014. — Т. 2. — № 3. — С. 50–54.
3. Дубровная, О.В. Селекция *in vitro* пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессовым факторам / О.В. Дубровная // Физиология растений и генетика. — 2017. — Т. 49. — № 4. — С. 279–292.
4. Сергеева, Л.Е. Клеточная селекция с ионами тяжёлых металлов: новые аспекты комплексной устойчивости / Л.Е. Сергеева, Л.И. Бронникова, Е.Н. Тищенко // Матер. X Междунар. конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология». — Казань, 2013. — С. 82.
5. Губанова, Н.Я. Клеточная селекция кормовой свёклы на устойчивость к нескольким стрессовым факторам / Н.Я., Губанова, О.В. Дубровная, Т.В. Чугункова // Биополимеры и клетка. — 2002. — Т. 18. — № 3. — С. 565–571.
6. Серёгин, И.В. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения / И.В. Серёгин, В.Б. Иванов // Физиология растений. — 2001. — Т. 48. — № 4. — С. 606–630.
7. Аллагулова, Ч.Р. Дегидрины растений: их структура и предполагаемые функции / Ч.Р. Аллагулова, Ф.Р. Гималов, Ф.М. Шакирова, В.А. Вахитов // Биохимия. — 2004. — Т. 68. — Вып. 9. — С. 1157–1165.
8. Erbasol, G. Characterization of two genes encoding metal tolerance proteins from *Beta vulgaris* subspecies *maritima* that confers manganese tolerance in yeast / G. Erbasol [et al.] // Biometals. — 2013. — V. 26. — P. 795–804.
9. Титов, А.Ф. Устойчивость растений к тяжёлым металлам / А.Ф. Титов, В.В. Таланова, Н.М. Казнина, Г.Ф. Лайдинен // Институт биологии КарНЦ РАН. — Петрозаводск: Карельский научный центр, 2007. — 172 с.
10. Migocka, M. Advance Access publication 24 November, 2014 Two metal-tolerance proteins, *MTP1* and *MTP4*, are involved in Zn homeostasis and Cd sequestration in cucumber cells / M. Migocka [et al.] // Journal of Experimental Botany. — 2015. — № 66 (3). — P. 1001–1015. doi:10.1093/jxb/eru459
11. Yolcu, S. An Insight into the Abiotic Stress Responses of Cultivated Beets (*Beta vulgaris* L.) / S. Yolcu [et al.] // Plants. — 2022. — № 11(1). — P. 12.

**Аннотация.** Выявлены оптимальные дозы селективных агентов (ионы кадмия) для отбора устойчивых регенерантов сахарной свёклы в культуре *in vitro*. Показана высокая регенерационная способность зрелых зародышей семян в селективных условиях развития. Отобраны растения-регенеранты сахарной свёклы, устойчивые к ионной токсичности. Секвенирование ДНК-фрагментов микроклонов выявило полиморфизм в гене *MTP4*. Установлено наличие однонуклеотидных замен, вставок и делеций.

**Ключевые слова:** стресс, растения-регенеранты, *in vitro*, ацетат кадмия, селективная питательная среда, сахарная свёкла, ионная токсичность, специфические праймеры.

**Summary.** Optimum doses of selective agents (cadmium ions) to select resistant sugar beet regenerants under *in vitro* culture have been determined. High regenerative ability of mature seed embryos under selective development conditions has been shown. Sugar beet plants-regenerants resistant to ionic toxicity have been selected. Sequencing of microclones' DNA-fragments of has revealed polymorphism in *MTP4* gene. Presence of single nucleotide polymorphisms, insertions and deletions has been determined.

**Keywords:** stress, plants-regenerants, *in vitro*, cadmium acetate, selective nutrient medium, sugar beet, ionic toxicity, specific primers.