

Индукцированный мутагенез как способ создания нового исходного материала сахарной свёклы

Е. Н. ВАСИЛЬЧЕНКО, ст. научн. сотрудник

Т. П. ЖУЖЖАЛОВА, гл. научн. сотрудник, д-р биолог. наук, профессор

О. В. ТКАЧЕНКО, мл. научн. сотрудник

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

(e-mail: biotechnologiya@mail.ru)

Введение

В селекционной работе по выведению новых сортов сахарной свёклы преобладают традиционные методы. Традиционная селекция трудоёмка, требует значительного времени. Высокий спрос на сахар способствовал появлению на рынке генетически модифицированных (ГМ) сортов сахарной свёклы. Альтернативным решением данной проблемы является высокоэффективный метод мутагенеза, когда широко распространённый в середине прошлого века. В настоящее время получены новые сорта сельскохозяйственных культур с использованием мутагенеза. Опыт работ в этом направлении показывает, что мутагенез способен вызвать проявление таких признаков, как устойчивость к определённому классу пестицидов, абиотическим стрессовым факторам, болезням [1].

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.

Для мутагенеза удобнее всего применять гаплоиды, поскольку на гаплоидном уровне облегчается отбор рецессивных мутаций. В диплоидных растениях мутации редко затрагивают оба аллельных гена в гомологичных хромосомах. Особь обычно гетерозиготна (два гена различаются), при этом проявляется действие только доминантного (но не рецессивного) гена. Поскольку мутации чаще рецессивны, чем доминантны, их довольно сложно выявить. В гаплоидных же растениях, которые содержат только одну из каждой пары гомологичных хромосом, мутации проявляются немедленно. Селекция на гаплоидном уровне позволяет вести прямой отбор не только доминантных, но и рецессивных признаков [2].

Эффективность мутагенеза с использованием культуры изолированных тканей показана во многих работах [3].

В настоящее время разработана достаточно надёжная база, позволяющая с успехом применять химические мутагены для повышения уровня генетического разнообразия сельскохозяйственных и культурных растений. Среди химических мутагенов этилметансульфонат (ЭМС) считается очень эффективным. Данное вещество является супермутагеном, который способен вызывать мутации даже при слабых концентрациях. Этилметансульфонат вызывает 50–70 % наследственных изменений. Его эффективность в значительной степени продемонстрирована на зерновых культурах, таких как рис, пшеница и ячмень, а также томат [4].

Исследования по экспериментальному мутагенезу у сахарной свёклы проводились в Венгрии, Чехии, Словакии, Беларуси, Казахстане, Японии и на Украине. В России во ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова методом радиомутагенеза были получены отдельноплодные мутанты сахарной свёклы. Применение химических мутагенов диметилсульфоната (ДМС), диэтилсульфоната (ДЭС), этиленimina (ЭИ) на семенном материале сахарной свёклы позволило получить мутантные формы с устойчивостью к корнееду, церкоспорозу и другим болезням [5]. В результате были получены обогащённые мутациями (mutagenized) популяции, о присутствии в них мутантных форм можно было судить по изменениям морфологических, анатомических или физиологических признаков.

В связи с созданием высокопродуктивных гибридов на линейной основе изменились селекционные методы получения нового исходного материала. В настоящее время культура изолированных тканей стала обязательным элементом селекции, способствующим созданию растений с новыми свойствами. Перспективным методом является мутагенез в культуре *in vitro*. Этот метод привлекает исследователей прежде всего

потому, что в этом случае можно создавать условия непосредственного воздействия мутагеном на сотни и тысячи клеток. Перспективность мутагенеза при культивировании клеток и тканей растений доказана многочисленными работами на разных культурах. Для получения культуры клеток используются различные растительные экспланты.

Преимуществами мутагенеза гаплоидных клеток являются: возможность избежать химеризм; вероятность быстрого обнаружения мутантов; выявление рецессивных мутантов уже в первом поколении; сокращение цикла получения гомозиготных мутантов; получение конечного продукта с нужными признаками. Кроме того, представляется возможным вести отбор уже на уровне культивирования *in vitro*.

Эффективность действия мутагенеза зависит от многих факторов, в частности особенностей генотипа, гормонального состава питательной среды, типа экспланта, способа воздействия мутагеном, концентрации ЭМС и времени воздействия на обрабатываемый орган и др. В связи с вышеизложенным получение растений сахарной свёклы с изменёнными признаками методом *random mutagenesis* является важным и актуальным направлением исследований.

Цель исследований была направлена на изучение влияния этилметансульфоната (ЭМС) на культивируемые *in vitro* регенеранты сахарной свёклы.

Материалы и методы исследований

Научные исследования были выполнены на базе лаборатории культуры тканей и молекулярной биологии ФГБНУ «ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова» с применением биотехнологических методов культуры *in vitro*. Материалом для исследований служили различные генотипы сахарной свёклы лаборатории ЦМС.

Питательные среды готовились с использованием макро- и микросолей в количествах, соответствующим прописям Гамборга и Мурасиге-Скуга, витамины по Уайту, Стабба.

В качестве эксплантов отбирали черешки листьев культуральных растений сахарной свёклы различных генотипов и разного уровня пloidности. Для индуцирования генетической изменчивости использовали химический мутаген этилметансульфонат (ЭМС). Черешки листьев погружали в растворы с различным содержанием ЭМС и разной продолжительностью обработки. Культивирование эксплантов с мутагеном осуществляли на шейкере 100 об/мин при 24 °С.

Оценку и отбор материала осуществляли цитофотометрически по уровню пloidности на проточном цитометре Partec PA.

Выделение растений-регенерантов с мутациями осуществляли путём проведения молекулярного RFLP-анализа.

Результаты исследований

Регенерация растений при культивировании изолированных тканей *in vitro* зависит прежде всего от взаимодействия таких факторов, как генотип исследуемого объекта, состав питательной среды, тип экспланта и способ подготовки растительных тканей. Наиболее подходящим типом экспланта для мутагенеза являются черешки листа [6].

Экспериментальные исследования показали, что наибольший процент регенерации эксплантов (83 %) отмечался у эксплантов с ранением, нанесённым за 24 часа до кокультивирования с ЭМС. В течение этого временного интервала растительные ткани находились на безгормональной питательной среде. Процент регенерации снижался до 71,5 % у эксплантов, которые сразу после ранения были подвержены воздействию мутагена (рис. 1).

Высокая регенерационная способность в первом случае объясняется тем, что растительные клетки эксплантов в течение 24 часов восстанавливаются от стресса, нанесённого им во время ранения, и начинают активно делиться, что является важным условием для успешного проведения мутагенеза.

При определении оптимальных условий воздействия мутагена важным является не только сохранение жизнеспособности тканей, но и возможность их регенерации. Поэтому для получения побегов необходимо, с одной стороны, обеспечить максимальный мутагенный эффект при воздействии сублетальных доз ЭМС, с другой – получить жизнеспособные растения.

В результате эксперимента было установлено, что после обработки мутагеном и переноса эксплантов на питательную среду регенерационная способность тканей снижалась с увеличением концентрации мутагена.

Наилучшей регенерационной способностью обладали формы с гаплоидным набором хромосом ($n = 9$).

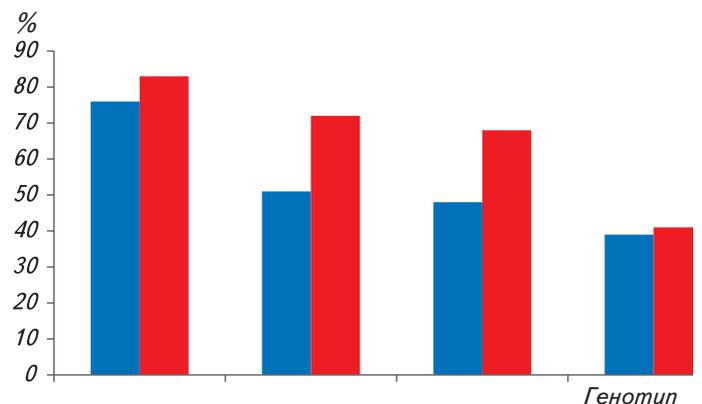


Рис. 1. Регенерационная способность сахарной свёклы в зависимости от способа подготовки эксплантов: ■ – поранение перед кокультивированием; ■ – поранение за 24 часа перед кокультивированием

У генотипа РФ этот показатель варьировал от 39 до 71 %, у МС-формы этот показатель был несколько ниже и составил 29–47 %. У генотипов № 0908 и 09010 отмечалось понижение регенерационной способности эксплантов и максимальный процент регенерации составил 33 и 11 соответственно, что обусловлено двойным набором хромосом растений-доноров (2n = 18) (табл. 1).

Наибольшей регенерационной способностью обладали экспланты, подвергавшиеся воздействию ЭМС в концентрации 8 мМ в течение 20, 30 и 40 минут. При дозе мутагена 10 мМ происходило снижение регенерационной активности эксплантов, отмечался некроз и частичная гибель растительных тканей.

Таблица 1. Регенерационная способность эксплантов различных генотипов сахарной свёклы под влиянием различных концентраций мутагена и экспозиции

Концентрация мутагена (ЭМС), мМ	Экспозиция, мин	Количество регенерировавших эксплантов, %			
		РФ	МС	№ 0908	№ 09010
		Гаплоидные формы		Диплоидные формы	
6	20	48	38	39	17
8		69	40	31	9
10		45	32	19	4
6	30	51	47	28	9
8		71	46	33	11
10		58	29	30	0
6	40	45	31	18	1
8		56	35	20	3
10		39	28	11	0

Регенерация полноценных растений из клеток и тканей в культуре *in vitro* является одним из необходимых условий получения мутантных форм. К числу наиболее важных факторов, способных вызывать регенерационные процессы сахарной свёклы в культуре *in vitro*, является использование экзогенных регуляторов роста.

Экспериментальные исследования показали, что у всех исследуемых генотипов сахарной свёклы наблюдалась прямая регенерация побегов без стадии предварительного каллусообразования (табл. 2).

Установлено, что наилучшей средой для культивирования эксплантов оказалась среда с минеральной основой Мурасиге-Скуга, дополненная БАП 0,3 + ГК 0,2 мг/л, которая обеспечивала появление регенерантов у гаплоидных форм 49,4–75,9 %, а у диплоидных форм этот показатель составил 11,7–36,4 %. Незначительное снижение регенерационной активности отмечалось на среде с минеральной основой по Гамборгу, где процент регенерации составил 46,7–69,8 % у гаплоидных форм и 10,9–32,6 % у диплоидных форм.

На начальных этапах морфогенеза регенеранты имели незначительные размеры (1–2 пары листьев) и отличались между собой по окраске гипокотилия (розовый или зелёный). У генотипов гаплоидных линий отмечалось укорачивание черешков, появление круглых листовых пластинок с волнистым краем, наличием тёмных вкраплений на поверхности листа.

Цитологические исследования показали наличие аномалий развития устьичных клеток у опытных образцов. Часть растений характеризовалась наличием крупных крахмальных зёрен и, как следствие, увеличением размера листовой пластинки. У некоторых микроклонов половина устьичной клетки оставалась пустой, а в другой половине отмечалось наличие хлоропластов с незначительным количеством крахмала.

Таблица 2. Влияние содержания фитогормонов в питательной среде на эффективность регенерации побегов из эксплантов сахарной свёклы

Генотип		Минеральная основа			
		Гамборга (B5)		Мурасиге-Скуга (MS)	
		Регуляторы роста, мг/л			
		БАП 0,3 + ГК 0,2	БАП 0,25 + ИМК 0,1	БАП 0,3 + ГК 0,2	БАП 0,25 + ИМК 0,1
		Количество регенерировавших эксплантов, %			
РФ (1-Н)	Гаплоидные формы	69,8	61,7	75,9	69,4
МС (1-Н)		46,7	39,8	49,4	41,3
09080	Диплоидные формы	32,6	33,1	36,4	38,9
09010		10,9	8,6	11,7	11,2

Цитофотометрическая оценка уровня пloidности показала отличия по пloidности контрольных и опытных образцов. Так, у контрольных (без обработки) растений-регенерантов количество ядерной ДНК соответствовало гаплоидному уровню пloidности $n = 9$. У опытных образцов количество ядерной ДНК соответствовало уровню пloidности как $n = 9$, так и $n = 18$ (рис. 2, 3).

Для предотвращения гибели регенерантов на начальной стадии проводили стабилизацию ростовых процессов путём стимулирования пролиферации меристем и возникновения побегов более высоких порядков, что достигалось добавлением в питательную среду цитокинина БАП 0,2 мг/л, кинетина КН 0,2 мг/л и гиббереллина ГК 0,2 мг/л. В результате в течение 3–4 недель происходило формирование развитых растений с образованием многочисленных пазушных побегов.

Эффективность действия мутагена косвенно может оцениваться по проявлению морфологических изменений. Для более точного анализа проводили молекулярно-генетический анализ с двумя парами специфических праймеров [7]. В результате были установлены

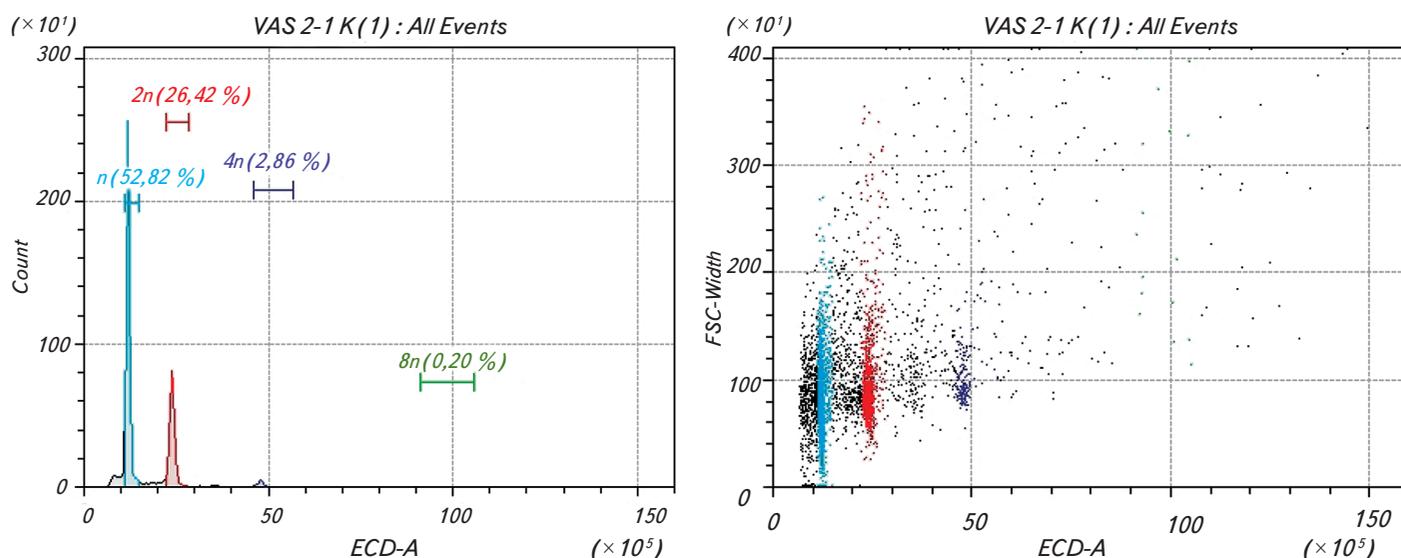
генетические различия между опытными образцами (рис. 4).

Образцы № 86, 52, 65, 114 имели два амплифицированных фрагмента на уровне 800 и 1250 п. н. в отличие от контроля, где этот фрагмент амплифицировался на уровне 800 п. н. У образцов № 77 и 29 наблюдалось наличие одного амплифицированного локуса на уровне 700 п. н. Это свидетельствовало о том, что под воздействием мутагена произошли изменения в генотипах данных образцов сахарной свёклы.

Для более точного установления генетических изменений в дальнейшем необходимо секвенирование амплифицированных фрагментов.

Выводы

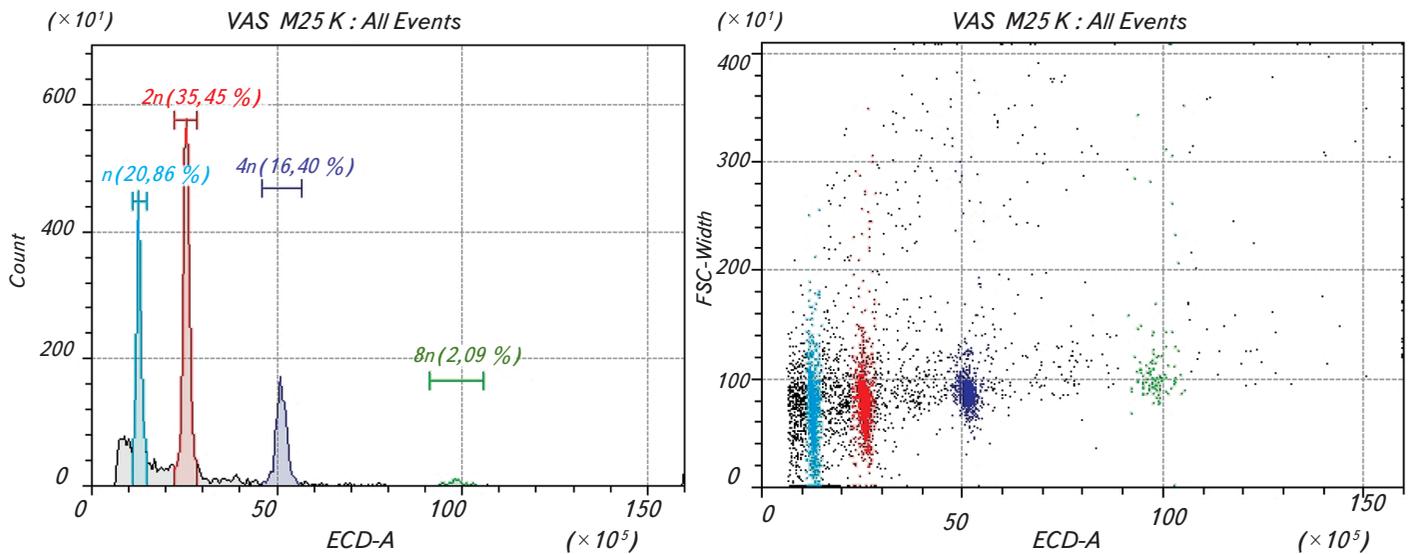
Проведённые исследования позволили выявить влияние обработок мутагеном растительных тканей на выход регенерантов сахарной свёклы с изменёнными признаками. Определена оптимальная концентрация и экспозиция мутагена ЭМС для отбора жизнеспособных регенерантов в культуре *in vitro*. Показано стимулирующее воздействие ЭМС на регенерационную способность гаплоидных тканей



Tube Name: VAS 2-1 K(1)
Sample ID:

Population	Events	% Total	% Parent	Mean ECD-A	Median ECD-A	rCV ECD-A	rSD ...
● All Events	8139	100.0...	100.00 %	1876301.5	1224718.9	12.75 %	1561...
● 2n	2150	26.42 %	26.42 %	2390148.3	2378654.5	2.64 %	6273...
● 4n	233	2.86 %	2.86 %	4846382.0	4784413.5	2.23 %	1065...
● n	4299	52.82 %	52.82 %	1197196.0	1187035.0	3.09 %	3665...
● 8n	16	0.20 %	0.20 %	9761968.0	9807169.0	8.33 %	8167...

Рис. 2. Цитофотометрическая оценка уровня пloidности (контроль)



Tube Name: VAS M25 K
Sample ID:

Population	Events	% Total	% Parent	Mean ECD-A	Median ECD-A	rCV ECD-A	rSD ...
● All Events	5689	100.0...	100.00 %	3030359.3	2520361.0	70.43 %	1775...
● 2n	2017	35.45 %	35.45 %	2542847.5	2541833.5	3.18 %	8073...
● 4n	933	16.40 %	16.40 %	5100120.5	5092202.5	2.78 %	1414...
● n	1187	20.86 %	20.86 %	1275023.6	1267849.9	4.82 %	6116...
● 8n	119	2.09 %	2.09 %	9806938.0	9791263.0	3.04 %	2980...

Рис. 3. Цитофотометрическая оценка уровня пloidности (опыт)

и изменение пloidности растений-регенерантов. Молекулярно-генетический анализ позволил выявить генетические различия в опытных образцах.

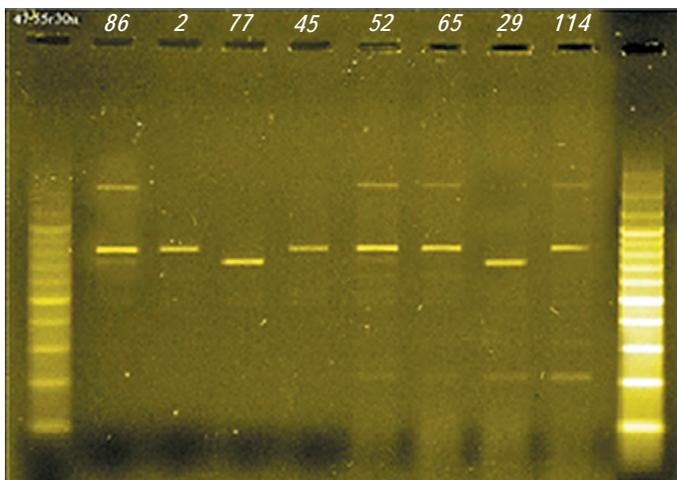


Рис. 4. Электрофореграмма ПЦР-продуктов сахарной свёклы с использованием праймера *mSSCIR47*: № 2 – контроль (без обработки); № 86, 77, 45, 52, 65, 29, 114 – опытные образцы после воздействия мутагеном

Использование метода индуцированного мутагена за увеличивает спектр генетической изменчивости, позволяет за короткий срок создать новый исходный материал, в сочетании с традиционными методами селекции может способствовать улучшению качества и продуктивности такой экономически значимой культуры, как сахарная свёкла.

Список литературы

1. Мутагенез в культуре изолированных микроспор рапса *Biotechnology* / К.Ж. Жамбакин, А.К. Затыбеков, Д.В. Волков, М.Х. Шамякова // *Theory and Practice*. – 2015. – № 3. – С. 20–32.
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.
3. *Emrani, S.N.* Seed viability, germination and seedling growth of canola (*Brassica napus* L.) as influenced by chemical mutagens / S.N. Emrani, A. Arzani, G. Saedi // *African Journal of Biotechnology*. – 2011. – Vol. 10 (59). – PP. 12602–12613.



4. *Кашина, М.С.* Биотехнологические методы в селекции растений / М.С. Кашина. – Саратов, 2018 – 18 с.

5. *Корниенко, А.В.* Основы мутационной селекции свёклы. – М. : Агропромиздат, 1990. – 208 с.

6. *Васильченко, Е.Н.* Биотехнологические методы в роде Beta / Е.Н. Васильченко, Т.П. Жужжалова, Е.О. Колесникова // Сахарная свёкла. – 2020. – № 4. – С. 8–12.

7. *An, L.-J.* Mutation induced by ethylmethanesulphonate (EMS), *in vitro* screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) / L.-J. An // Plant Cell Tiss. Org. – 2007. – P. 77–81.

Аннотация. В статье представлен метод индуцированного мутагенеза в культуре изолированных органов и тканей *Beta vulgaris* L. В результате использования химического мутагена этилметансульфоната (ЭМС) установлено, что наибольшей мутабельностью обладают растворы ЭМС в концентрации

8 мМ при обработке эксплантов в течение 30 минут. Показано стимулирующее воздействие ЭМС на регенерационную способность гаплоидных тканей (75,9 %) и на изменение плоидности растений-регенерантов. Полученные растения-регенеранты различались по морфологическим, цитологическим и молекулярно-генетическим признакам. Применение данного метода увеличивает спектр генетической изменчивости и позволяет за короткий срок создать новый исходный материал сахарной свёклы.

Ключевые слова: сахарная свёкла, экспланты, растения-регенеранты, этилметансульфонат, химический мутагенез.

Summary. In the paper, a method of induced mutagenesis in *Beta vulgaris* L. isolated organs and tissues culture is presented. As a result of using a chemical mutagen – ethylmethanesulphonate (EMS), it has been determined that EMS solutions in concentrations from 8mM have the greatest mutability when treating explants within 30 minutes. Stimulating effect of EMS on regenerative ability of haploid tissues (75,9 %) and on change of ploidy level of plants-regenerants has been shown. The obtained plants-regenerants differ in morphological, cytological and molecular-genetic traits. Use of this method increases a spectrum of genetical variability and allows development of new sugar beet starting material in a short space of time.

Keywords: sugar beet, explants, plants-regenerants, ethylmethane sulphonate, chemical mutagenesis.