

# Создание нового исходного материала *Beta vulgaris* L. с использованием этилметансульфоната

Н.А. КАРПЕЧЕНКО, канд. биолог. наук

Е.Н. ВАСИЛЬЧЕНКО, ст. научн. сотрудник (e-mail: vasilchenko@inbox.ru)

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

## Введение

Перед агропромышленным комплексом и свекло-сахарным производством нашей страны поставлены большие задачи. В повышении продуктивности сахарной свёклы и производства сахара из этой культуры важная роль принадлежит созданию принципиально новых исходных материалов и на их основе – сортов и гибридов, пригодных для возделывания по интенсивной технологии. В связи с тем, что в настоящее время в Российской Федерации остро стоит проблема импортозамещения семенного материала, особенно по сахарной свёкле, актуальным является совершенствование технологий получения новых рекомбинантных форм.

Большое значение в создании высокосахаристых, с хорошими технологическими качествами, устойчивых к болезням и обладающих комплексом других полезных признаков исходных материалов имеют разработка новых принципов и методов генетики и селекции, а также использование физиологически активных веществ.

Одним из путей расширения генетического разнообразия является метод индуцированного мутагенеза. Применение метода химического мутагенеза позволяет за короткий срок создавать новый исходный материал с разнообразными морфологическими и физиологическими признаками, биохимическими показателями, увеличить частоту и расширить спектр оригинальных мутаций [1]. Мутагенез способен вызвать проявление таких признаков, как устойчивость к определённому классу пестицидов, гербицидов, устойчивость к абиотическим стрессовым факторам и болезням [2–4].

Воспроизведение 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.

Для получения культуры клеток используются различные растительные экспланты [5]. Эффективность мутагена в культуре тканей повышается на гаплоидном уровне благодаря проявлению всех рецессивных мутаций в ранних поколениях.

Из химических мутагенов широкую популярность приобрёл этилметансульфонат (ЭМС). Его особенностью является способность производить точковые мутации. Более того, этот мутаген может быть использован как *in vivo*, так и *in vitro*. Перспективность мутагенеза при культивировании клеток и тканей растений доказана многочисленными работами на разных культурах [6–8]. При изучении мутагенеза в культуре тканей на ранних этапах развития используют морфологический отбор. Для изучения природы мутационных изменений в растениях-регенерантах проводят молекулярно-генетическую оценку.

Цель настоящего исследования была направлена на разработку методики создания новых форм сахарной свёклы с изменёнными морфологическими и молекулярно-генетическими признаками на основе мутагенеза *in vitro*.

## Материалы и методы исследований

Объектом исследований служили родительские компоненты диплоидного гибрида сахарной свёклы РМС 127 Рамонской селекции ФГБНУ ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова.

Для экспериментального мутагенеза в качестве эксплантов использовали листовые черешки гаплоидных растений-регенерантов ( $n = 9$ ) сахарной свёклы, культивируемых в условиях *in vitro*. Для индуцирования генетической изменчивости использовали химический мутаген этилметансульфонат (ЭМС). Черешки листьев погружали в водные растворы с различным содержанием ЭМС (0 мМ – контроль, 2 мМ, 6 мМ, 10 мМ) и разной продолжительностью обра-

ботки (15 мин, 30 мин, 60 мин). Кокультивирование эксплантов с мутагеном осуществляли на шейкере 100 об/мин при постоянном встряхивании. Обработанные черешки промывали три раза в стерильной дистиллированной воде в течение 1 мин и затем переносили их на питательные среды для побегообразования.

Питательные среды готовились с использованием макро- и микроэлементов в количествах, соответствующих прописям Гамборга и Мурасиге-Скуга. Стимулирование пролиферации меристем и возникновение побегов более высоких порядков достигалось путём использования в питательной среде ауксинов и цитокининов в разных сочетаниях. Пloidность образцов определяли на проточном цитометре (Partec, ФРГ) согласно рекомендуемому протоколу [8]. Регенеранты культивировали при температуре 24–26 °С, 16-часовом фотопериоде с освещённостью 5000 лк и относительной влажностью воздуха 70 %.

Для получения препаратов тотальной ДНК использовался метод с применением ЦТАБ-буфера (цетилтриэтиламмония бромид).

В целях визуализации выявленных ампликонов проводили электрофорез в 2%-ном агарозном геле с добавлением (3 мкл на 30 мл раствора) 1%-ного бромистого этидия.

Для определения длины (размера) ампликона использовали стандартные маркеры GeneRuler™, (100–10000 п. о.)

Рестрикционный анализ амплифицированных фрагментов проводили с использованием рестриктазы *Alu I*.

### Результаты и их обсуждение

Проведённые экспериментальные исследования позволили разработать методику создания новых форм сахарной свёклы на основе мутагенеза *in vitro*, которая предусматривает трёхлетний цикл биотехнологических и селекционных мероприятий.

На начальном этапе осуществляют индукцию мутантных гаплоидных регенерантов. Важным является подбор концентрации мутагена. Необходимо, с одной стороны, обеспечить максимальный мутагенный эффект при воздействии сублетальных доз ЭМС, с другой стороны – получить жизнеспособные растения. Было установлено, что регенерационная способность тканей снижалась с увеличением концентрации мутагена. При дозе мутагена 10 мМ отмечался некроз и частичная гибель растительных тканей. Наибольшей регенерационной способностью обладали экспланты при воздействии ЭМС в концентрации от 2 до 6 мМ во все временные интервалы. Максимальное количество регенерантов

(51–74 %) было получено при обработке мутагеном в течение 30 мин.

При культивировании черешков листовых эксплантов происходило формирование густо расположенных почек путём эмбриоидогенеза. Клетки отличались высокой способностью к морфогенезу и позволяли использовать это свойство для вегетативного размножения созданного материала. Можно предположить, что воздействие ЭМС стимулировало высокую степень тотипотентности клеток, что является важным условием при проведении мутагенеза.

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

Цитофотометрическая оценка уровня пloidности позволила по количеству ядерной ДНК отобрать и сформировать в культуре *in vitro* линии с гаплоидным (Н) уровнем пloidности  $n = 9$ .

На следующем этапе происходит получение мутантных ДН-линий. Для индукции полиплодных форм сахарной свёклы использовали колхицин. Так как колхицин действует в первую очередь на клетки, находящиеся в стадиях активного деления, а это клетки конуса нарастания и меристематические ткани, то наиболее подходящим материалом для обработки колхицином являлись молодые, быстрорастущие растения-регенеранты. Удвоение числа хромосом происходило при выдержке микроклонов на среде с колхицином (0,1 мг/л) в течение двух суток. Количество диплоидных растений в данном случае составило 90,6 %. Для блокирования в миксопloidной ткани деления гаплоидных клеток использовали кинетин (0,25 мг/л), который максимально (96,8%) стимулировал деление диплоидных клеток сахарной свёклы.

Цитофотометрический анализ позволил с высокой степенью точности и надёжности провести оценку исходного материала на ранних этапах развития растений-регенерантов и сформировать в культуре *in vitro* линии удвоенных гаплоидов (ДН) с уровнем пloidности ( $2n = 18$ ), полученные после проведения мутагенеза.

Биохимический анализ выявил растения-регенеранты, характеризующиеся различной активностью ферментов. Отмечалось повышение в 1,6–4,3 раза общей активности изоцитратлиазы и в 1,7–2,5 раза активности пероксидазы в опытных образцах по сравнению с контролем. Можно предположить, что

повышение активности пероксидазы обусловлено сдвигом биохимических реакций, связанных с усилением защитных свойств организма при воздействии этилметансульфонатом (ЭМС).

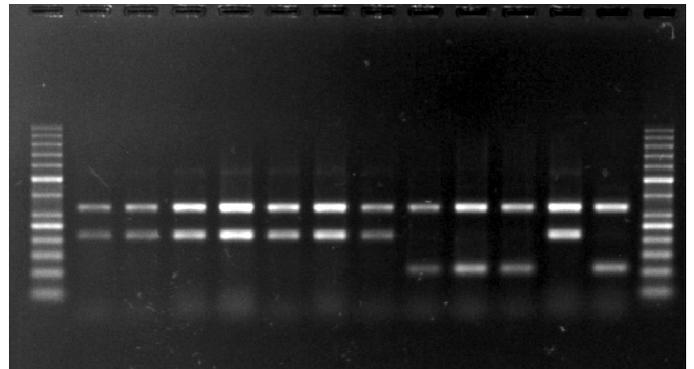
Заключительным этапом явилось получение семенных растений ДН-линий. Индукция ризогенеза у стабилизированных форм с удвоенным набором хромосом была успешной при добавлении в среду ауксинов ИМК (1 мг/л). Частота корнеобразования зависела от генотипа и варьировала в пределах 87,3–99,2 %.

Полученные микроклоны сахарной свёклы с мощной корневым системой и хорошо развитой надземной частью переводили в нестерильные условия почвенного субстрата. Дальнейшее выращивание в течение 2–3 месяцев дало возможность получить небольшие корнеплоды (штеклинки) массой от 50–110 гр. Корнеплоды, прошедшие яровизацию, были высажены в грунт для получения семенных растений.

При создании гомозиготных мутантных линий большое значение имеет отбор генотипов с ценными селекционными свойствами. С целью выявления полиморфизма амплифицированных фрагментов проводили рестрикционный анализ. На полученных электрофореграммах видно, что в результате рестрикции амплифицированного праймерами SvulgF – SvulgR единичного фрагмента (550 п. о.) локуса *petG-psbE* с использованием рестриктазы *AluI* происходило образование от двух (330 и 220 п. о.) (образцы 1–24, 27, 31–44) до трёх (330, 110 и 110 п. о.) (образцы 24–26, 28–30) рестриктных фрагментов. Стоит отметить наличие гомологичного фрагмента во всех образцах (330 п. о.) и полиморфных, более коротких (220 и 110 п. о.) (рис. 1–3).

На основе полученной информации полиморфизма локусов *petG-psbE*, амплифицированных с помощью

17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28



17–28 – номера образцов

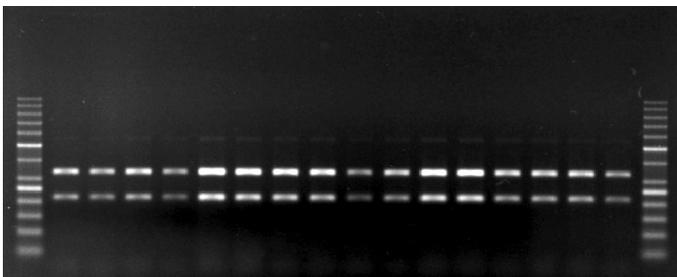
Рис. 2. Электрофореграмма продуктов рестрикции ампликонов, полученных с использованием праймеров SvulgF – SvulgR рестриктазой *AluI*

пары праймеров SvulgF – SvulgR растений сахарной свёклы, всю выборку можно разделить на две группы по типу цитоплазмы: группа № 1 (фертильная цитоплазма, образцы 1–24, 27, 31–44); группа № 2 (стерильная цитоплазма, образцы 24–26, 28–30).

Таким образом, можно сделать вывод, что образцы сахарной свёклы из группы № 1 представлены полностью фертильной формой (нормальная цитоплазма и ядерные гены в одном из доминантных состояний или полностью в рецессивном), образцы из группы № 2 – как стерильной (стерильная цитоплазма и ядерные гены в рецессивном состоянии), так и переходной (стерильная цитоплазма и ядерные гены в одном из доминантных состояний) формами.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что по изменениям в структуре ДНК хлоропластного генома, ассоциированного с цитоплазматической

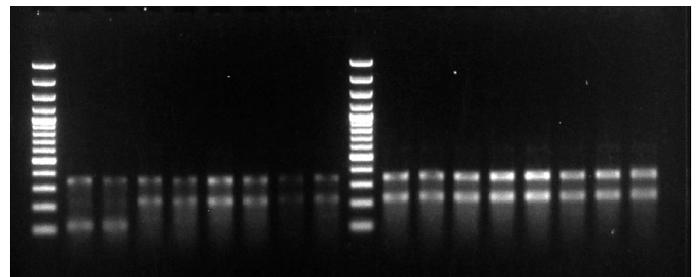
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



1–16 – номера образцов

Рис. 1. Электрофореграмма продуктов рестрикции ампликонов, полученных с использованием праймеров SvulgF – SvulgR рестриктазой *AluI*

29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44



29–44 – номера образцов

Рис. 3. Электрофореграмма продуктов рестрикции ампликонов, полученных с использованием праймеров SvulgF – SvulgR рестриктазой *AluI*

мужской стерильностью у растений сахарной свёклы, можно проводить целенаправленный отбор регенерантов на ранних этапах развития и формировать гомозиготные мутантные линии на заданный селекционный признак по типам цитоплазмы.

#### Заключение

В результате проведённых исследований создана методика ускоренного получения удвоенных линий на основе мутагенеза *in vitro*, которая предусматривает трёхлетний цикл биотехнологических и селекционных приёмов. Метод обеспечивает ускоренное получение качественных семян гомозиготных ДН линий – компонентов высокопродуктивных гибридов. Молекулярно-генетическое тестирование позволило с высокой точностью ранжировать (дифференцировать) исследуемые генотипы на стерильные и фертильные формы.

Сочетание методов биотехнологии и молекулярной генетики даёт возможность формировать новый селекционный материал и повышать качество семенного материала при создании конкурентноспособных отечественных гибридов сахарной свёклы нового поколения.

#### Список литературы

1. Алексеева, Е.С. Экспериментальный мутагенез как метод селекции / Е.С. Алексеева // Радиационный мутагенез вегетативно размножаемых растений. – М., 1985. – С. 49–54.
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* / S.J. Jambhulkar // Academic Press is an imprint of Elsevier. – 2007. – Vol. 45. – P. 417–434.
3. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future / S. Tan, R.R. Evans, M.L. Dahmer [et al.] // *Pest Management Science*. – 2005. – Vol. 61. – P. 246–257.
4. 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. Saeidi // *African Journal of Biotechnology*. – 2011. – Vol. 10(59). – P. 12602–12613.
5. Оптимизация концентрации мутагена ЭМС для обработки семян пшеницы / К.Ж. Жамбакин, Д.В. Волков, А.К. Затыбеков [и др.] // *Известия, нәтижелер*. – 2016. – № 4 (72). – С. 207–214.
6. Getting doubling haploids of rape / K.Zh. Zhambakin, M.H. Shamekova, D.V. Volkov [et al.] // *KazNU Bulletin. Biology series*. – 2012. – Vol. 3(55). – P. 47–57.
7. Maluszynski, M. Haploidy and mutation techniques. *In vitro haploid production in higher plants* / M. Maluszynski, Y. Szarejko, B. Sigurbjornsson // Kluwer Academic Publishers: Dordrecht. – 1996. – Vol. 1. – P. 67–93.
8. Kaul, M.L. Mutagenic effectiveness and efficiency of EMS, DES and gamma rays in rice / M.L. Kaul, A.K. Basu // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1977. – Vol. 50. – P. 241 – 246.

**Аннотация.** Представленный метод индуцированного мутагенеза в культуре изолированных органов и тканей *Beta vulgaris* L. позволяет увеличить частоту и расширить спектр оригинальных мутаций. Показано, что использование химического мутагена этилметансульфоната (ЭМС) в концентрации 2–10 мМ значительно влияет на регенерационную способность растительных эксплантов. Максимальное количество регенерантов (51–74 %) было получено при обработке мутагеном в течение 30 минут. Полученные растения-регенеранты различались по морфологическим, цитологическим, биохимическим и молекулярно-генетическим признакам. Сочетание методов биотехнологии и молекулярной генетики даёт возможность формировать новый селекционный материал и повышать качество семенного материала при создании отечественных гибридов сахарной свёклы нового поколения.

**Ключевые слова:** сахарная свёкла, мутаген, молекулярные маркеры, RFLP-анализ.

**Summary.** The presented method of the induced mutagenesis in culture of isolated *Beta vulgaris* L. organs and tissues allows making original mutations more frequent and extending their range. It has been shown that use of ethyl-methane-sulphonate (EMS), a chemical mutagen, in the concentration of 2–10 mM influences considerably on regeneration ability of vegetative explants. The maximum quantity of regenerants (51–74 %) has been obtained after treatment with the mutagen for 30 minutes. The obtained plants-regenerants differ in morphological, cytological, biochemical and molecular-genetic traits. Combination of biotechnology and molecular genetics methods makes it possible to form new breeding material and to improve quality of seed material when developing domestic sugar beet hybrids of a new generation.

**Keywords:** sugar beet, mutagen, molecular markers, RFLP-analysis.