Раздел IV
ГЕНЕТИКА И БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 633.63:631.52 DOI 10.5281/zenodo.20511039

ИНДУЦИРОВАННЫЙ МУТАГЕНЕЗ *IN VITRO* КАК МЕТОД РАСШИРЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ *BETA VULGARIS* L.

INDUCED MUTAGENESIS *IN VITRO* AS A METHOD FOR EXPANDING THE GENETIC DIVERSITY OF *BETA VULGARIS* L.

Е.Н. Васильченко, А.И. Доденко
E.N. Vasilchenko, A.I. Dodenko
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова» Воронежская обл.
FSBSI "All-Russian Scientific Research Institute of Sugar Beet and Sugar named after A.L. Mazlumov", Voronezh Oblast
E-mail: vasilchenko@inbox.ru

Аннотация. *В работе представлены результаты применения метода индуцированного мутагенеза в культуре изолированных тканей сахарной свеклы (Beta vulgaris L.). Использование химического мутагена этилметансульфоната (ЭМС) в системе in vitro позволило существенно расширить спектр наследственной изменчивости и повысить частоту возникновения оригинальных мутаций. Предложенный подход способствует сокращению сроков создания выровненного исходного материала, интенсифицируя селекционный процесс.*

Abstract. *The article presents the results of applying the induced mutagenesis method in culture of isolated sugar beet (Beta vulgaris L.) tissues. The use of the chemical mutagen ethyl methanesulfonate (EMS) in an in vitro system significantly expanded the spectrum of hereditary variability and increased the frequency of original mutations occurrence. The proposed approach reduces the time required for creating uniform source material, thereby intensifying the breeding process.*

Ключевые слова: *сахарная свекла, этилметансульфонат (ЭМС), молекулярные маркеры, RFLP-анализ.*

Keywords: *sugar beet, ethyl methanesulfonate (EMS), molecular markers, RFLP analysis.*

ВВЕДЕНИЕ

Сахарная свекла (*Beta vulgaris* L.) относится к числу стратегически значимых технических культур. Российская Федерация занимает лидирующие позиции в мире по площади возделывания данной куль-

туры, ежегодно засевая около 1 млн га, что составляет приблизительно четверть мировых посевных площадей. Для сравнения: аналогичные показатели в США достигают 490 тыс. га, в Германии – 350 тыс. га, во Франции – 280 тыс. га [1]. В условиях реализации политики импортозамещения и обеспечения продовольственной безопасности страны особую актуальность приобретает создание высокопродуктивных гибридов, адаптированных к интенсивным технологиям возделывания. Современные гибридные формы способны обеспечивать урожайность на уровне 80-90 т/га при сахаристости 18-21%.

Ключевым фактором успешной селекции является наличие генетического разнообразия исходного материала. Одним из эффективных инструментов его расширения выступает индуцированный мутагенез [2, 3]. Применение химических мутагенов, в частности этилметансульфоната (ЭМС), позволяет в относительно короткие сроки получать формы с комплексом хозяйственно ценных признаков: устойчивостью к гербицидам, патогенам и абиотическим стрессорам [4, 5, 6]. Особую перспективность представляет сочетание мутагенеза с культурой *in vitro*, где воздействию могут подвергаться тысячи клеток в контролируемых условиях, а на гаплоидном уровне обеспечивается быстрое фенотипическое проявление рецессивных мутаций [7].

Цель настоящей работы заключалась в разработке эффективной методики получения новых форм сахарной свеклы с модифицированными морфологическими и молекулярно-генетическими характеристиками на основе индуцированного мутагенеза в системе *in vitro*.

МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

В качестве эксплантов для проведения экспериментального мутагенеза использовали черешки листьев, полученные от гаплоидных растений-регенерантов (n=9), культивируемых *in vitro*. Индукцию мутационной изменчивости осуществляли путем обработки эксплантов водными растворами этилметансульфоната (ЭМС) в трех концентрациях: 2 мМ, 6 мМ и 10 мМ. Контрольную группу обрабатывали дистиллированной водой. Варьируемым параметром также выступала продолжительность экспозиции: 15, 30 и 60 минут. Инкубацию эксплантов с мутагеном проводили на орбитальном шейкере при 100 об/мин. По окончании обработки черешки трижды отмывали стерильной дистиллированной водой (по 1 минуте) и переносили на питательные среды для индукции побегообразования.

Питательные среды готовили на основе прописей Гамборга (B5) и Мурасиге-Скуга (MC), добавляя 7 г/л агар-агара. Для стимуляции пролиферации и морфогенеза среду дополняли регуляторами роста: гиббереллиновой кислотой, 6-бензиламинопурином и кинетином в концентрации 0,2 мг/л каждого [8]. Индукцию полиплоидии проводили путем двухсуточной выдержки стабилизированных гаплоидных регенерантов в темноте на среде, содержащей 0,1 мг/л колхицина. Последующее культивирование на среде с кинетином (0,25 мг/л) способствовало селективному делению диплоидных клеток.

Уровень плоидности полученных регенерантов определяли методом проточной цитометрии на приборе Partec (Германия) согласно стандартному протоколу. Корнеобразование индуцировали на среде с 1 мг/л нафтилуксусной кислоты или индолилмасляной кислоты. Культивирование осуществляли при температуре 24–26 °C, 16-часовом фотопериоде и освещенности 5000 лк.

Выделение тотальной ДНК проводили ЦТАБ-методом [9]. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) выполняли в смеси следующего состава: 2.5 мкл 10× ПЦР-буфера (100 мМ Трис-HCl, pH 8.8; 500 мМ KCl), 25 мМ $MgCl_2$, смесь 10 мМ нуклеотидтрифосфатов, 10 мМ праймеров, 1 ед. Taq-ДНК-полимеразы и 1 мкл ДНК (20 нг/мкл). Разделение продуктов амплификации проводили электрофорезом в 2%-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Для рестрикционного анализа использовали эндонуклеазу AluI.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Разработанная методика создания новых форм сахарной свеклы на основе мутагенеза *in vitro* включает три последовательных этапа: индукцию мутантных гаплоидных регенерантов, получение удвоенных гаплоидных (DH) линий и формирование семенного потомства.

Индукция мутантных гаплоидных регенерантов. Критическим параметром на данном этапе является выбор оптимальной концентрации мутагена, обеспечивающей баланс между максимальным мутагенным эффектом и сохранением жизнеспособности тканей. Установлено, что повышение концентрации ЭМС до 10 мМ вызывает выраженный некротический эффект и гибель значительной части эксплантов. Наибольшую регенерационную способность (формирование 51-74% жизнеспособных регенерантов) наблюдали при использовании концентраций 2-6 мМ с экспозицией 30 минут.

В процессе культивирования черешков листовых эксплантов отмечено образование множественных адвентивных почек по типу эмбриоидогенеза, что свидетельствует о высокой тотипотентности клеток под

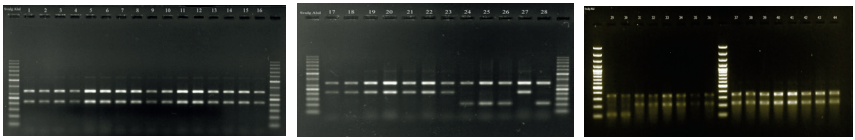
влиянием мутагенного стресса. На ранних этапах развития регенеранты дифференцировались по окраске гипокотиля (розовая или зеленая), а также по морфологическим параметрам: укорачивание черешков, формирование округлых листовых пластинок с волнистым краем, появление антоциановых пятен. Цитофотометрический анализ позволил подтвердить гаплоидный статус (n=9) отобранных линий.

Получение мутантных DH-линий. Для удвоения числа хромосом использовали колхициновую обработку молодых активно делящихся регенерантов. Экспозиция на среде с 0,1 мг/л колхицина в течение 48 часов обеспечила получение 90,6% диплоидных растений. Включение в среду кинетина (0,25 мг/л) на последующих этапах способствовало подавлению пролиферации гаплоидных клеток и селективному размножению диплоидных линий (эффективность до 96,8%).

Биохимический анализ выявил существенные изменения в активности ферментов у мутантных форм. Отмечено повышение активности изоцитратлиазы в 1,6-4,3 раза и пероксидазы в 1,7-2,5 раза по сравнению с контрольными образцами. Полученные данные согласуются с представлениями о роли пероксидазы в защитных реакциях растений в ответ на стрессовое воздействие, в том числе химических мутагенов [10].

Формирование семенных растений и молекулярно-генетическая характеристика. Укоренение стабилизированных DH-линий с эффективностью 87,3-99,2% достигалось при использовании индолилмасляной кислоты (1 мг/л). Полученные растения-регенеранты с развитой корневой системой успешно адаптировали к нестерильным условиям с последующим получением штеклингов массой 50-110 г и семенных растений.

Ключевым этапом оценки созданного материала явилось молекулярно-генетическое типирование по признаку цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС), имеющему фундаментальное значение для гетерозисной селекции. Рестрикционный анализ амплифицированного с праймерами SvulgF-SvulgR фрагмента локуса *petG-psbE* (550 п.о.) с использованием эндонуклеазы AluI выявил полиморфизм длин рестриктных фрагментов. Установлено, что для образцов с фертильной цитоплазмой характерно образование двух фрагментов (330 и 220 п.о.), тогда как для растений со стерильной цитоплазмой – трех фрагментов (330, 110 и 110 п.о.) (рис.1). Наличие консервативного фрагмента 330 п.о. у всех изученных генотипов подтверждает видеспецифичность использованных маркеров.



1-16 - номера образцов *17-28 - номера образцов* *29-44 - номера образцов*

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

На основании полученных данных вся выборка была дифференцирована на две группы: образцы 1-24, 27, 31-44 отнесены к фертильным формам (нормальная цитоплазма N); образцы 25, 26, 28-30 идентифицированы как формы со стерильной (S) цитоплазмой. Предложенный подход позволяет проводить раннюю диагностику типа цитоплазмы на этапе *in vitro*, задолго до цветения растений, что существенно ускоряет селекционный процесс при создании гомозиготных мутантных линий с заданными свойствами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная методика получения удвоенных гаплоидных линий сахарной свеклы на основе индуцированного мутагенеза *in vitro* включает трехлетний цикл биотехнологических и селекционных мероприятий и обеспечивает ускоренное создание качественного семенного материала гомозиготных DH-линий. Показано, что оптимальными параметрами обработки эксплантов ЭМС является концентрация 2-6 мМ при экспозиции 30 минут. Эффективность удвоения хромосом колхицином достигает 90,6% при последующей селекции диплоидных клеток кинетином. Применение RFLP-анализа с рестриктазой AluI позволяет с высокой достоверностью проводить ранжирование полученных генотипов по типам цитоплазмы (фертильные/стерильные), что критически важно для гибридной селекции.

Интеграция методов экспериментального мутагенеза, культуры тканей и молекулярного маркирования представляет собой эффективную стратегию формирования нового исходного материала и повышения качества семенной продукции при создании конкурентоспособных отечественных гибридов сахарной свеклы нового поколения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каракотов С.Д., Апасов И.В., Налбандян А.А., Васильченко Е.Н., Федулова Т.П. Современные аспекты селекции гибридов сахарной свеклы (*Beta*

vulgaris L.) // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2021. – Т. 25, № 4. – С. 394-400.

2. Алексеева Е.С. Экспериментальный мутагенез как метод селекции // Радиационный мутагенез вегетативно размножаемых растений. – М., 1985. – С. 49-54.

3. Luan Y.S., Zhang J. Mutation induced by ethylmethanesulphonate (EMS), *in vitro* screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2007. – Vol. 88. – P. 77-81.

4. Jambhulkar S.J. Mutagenesis: Generation and Evaluation of Induced Mutations // Advances in Botanical Research. – 2007. – Vol. 45. – P. 417-434.

5. Tan S., Evans R.R., Dahmer M.L., Singh B.K., Shaner D.L. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future // Pest Management Science. – 2005. – Vol. 61. – P. 246-257.

6. Emrani S.N., Arzani A., Saeidi G. Seed viability, germination and seedling growth of canola (*Brassica napus* L.) as influenced by chemical mutagens // African Journal of Biotechnology. – 2011. – Vol. 10, № 59. – P. 12602-12613.

7. Жамбакин К.Ж., Волков Д.В., Затыбеков А.К., Шамекова М.Х., Бехзад М.А. Оптимизация концентрации мутагена ЭМС для обработки семян пшеницы // Ізденістер, нәтижелер. – 2016. – № 4 (72). – С. 207-214.

8. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.

9. Калаев В.Н. Разработка метода получения препарата суммарной ДНК высокого качества из растений рода *Rhododendron* // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 1 (5). – С. 148-152.

10. Ванюшин Б.Ф. Метилирование ДНК – эпигенетическая регуляция роста и развитие растений // Биология развития: морфогенез репродуктивных структур и роль соматических, стволовых клеток в онтогенезе и эволюции: материалы Междунар. конф., посвящ. 50-летию Лаборатории эмбриологии и репродуктивной биологии БИН РАН. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2010. – С. 41-43.