

# ИНДУЦИРОВАННЫЙ МУТАГЕНЕЗ *BETA VULGARIS* L. В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ

**Е.Н. Васильченко**

**Н.А. Карпеченко**, кандидат биологических наук

**Н.Н. Черкасова, О.В. Ткаченко**

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

e-mail: [biotechnologiya@mail.ru](mailto:biotechnologiya@mail.ru)

**Аннотация.** Представлен метод индуцированного мутагенеза в культуре изолированных органов и тканей *Beta vulgaris* L. Показано, что использование химического мутагена этилметансульфоната (ЭМС) в концентрации 2–10 мМ существенно 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 и молекулярно-генетическим признакам. Использование данного метода увеличивает диапазон генетической изменчивости, способствует сокращению сроков создания исходного материала, что приводит к ускорению селекционного процесса.

**Ключевые слова:** сахарная свекла, растения-регенеранты, мутаген, молекулярные маркеры, RFLP-анализ.

Одним из путей расширения генетического разнообразия является метод индуцированного мутагенеза. Использование 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, 2].

Мутагенез способен вызвать проявление таких признаков как устойчивость к определенному классу пестицидов, гербицидов, устойчивость к абиотическим стрессовым факторам и болезням. Среди химических мутагенов этилметансульфонат (ЭМС) считается очень эффективным, так как он вызывает 50–70 % наследственных изменений. Особенностью данного мутагена является его способность производить точковые мутации [3].

Для мутагенеза удобнее всего использовать гаплоиды, поскольку на гаплоидном уровне облегчается отбор рецессивных мутаций. Преимуществами мутагенеза гаплоидных клеток является: возможность из-

бежать химеризм (генетическая аномалия, при которой в одном организме находится два набора ДНК); выявление рецессивных мутантов возможно уже в первом поколении; цикл получения гомозиготных мутантов сокращается; представляется возможным вести отбор уже на уровне культивирования *in vitro* [4–7].

При изучении мутагенеза в культуре тканей на ранних этапах развития используется 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 свеклы с измененными морфологическими и молекулярно-генетическими признаками на основе мутагенеза *in vitro*.

Объектом исследований служили родительские компоненты диплоидного гибрида сахарной свеклы РМС 127 Рамонской селекции ФГБНУ «ВНИИСС имени А. Л. Мазлумова».

В качестве эксплантов использовали листовые черешки гаплоидных растений-регенерантов (n=9) сахарной свеклы, культивируемых в условиях *in vitro*. Для индуцирования генетической изменчивости использовали химический мутаген этилметансульфонат (ЭМС). Питательные среды готовились с использованием макро- и микросолей в количествах, соответствующим прописям Гамборга и Мурасиге-Скуга с добавлением ауксинов и цитокининов в разных сочетаниях [8]. Пloidность образцов определяли на проточном цитометре (Partec, ФРГ). Регенеранты культивировали при температуре 24–26 °С, 16-ти часовом фотопериоде с освещенностью 5000 лк и относительной влажностью воздуха 70 %.

Рестрикционный анализ амплифицированных фрагментов проводили с использованием рестриктазы *Alu I*. [9].

Проведенные экспериментальные исследования позволили разработать методику создания новых

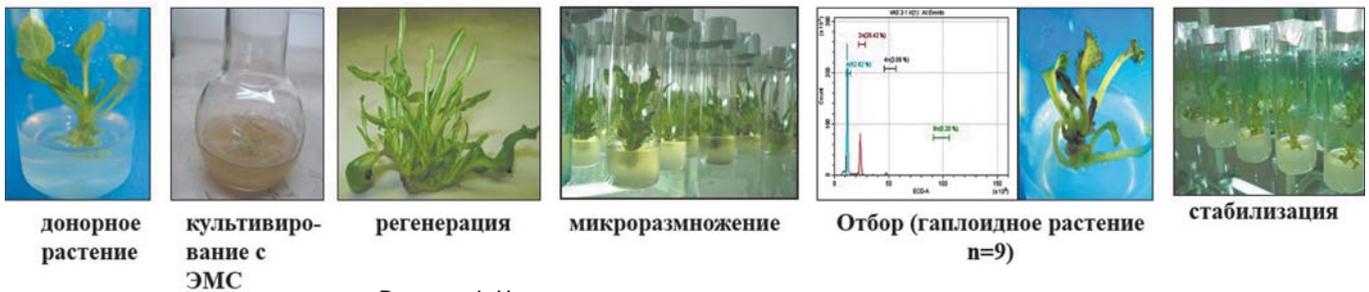


Рисунок 1. Индукция мутантных гаплоидных регенерантов

форм сахарной свеклы на основе мутагенеза *in vitro*, включающую трехлетний цикл проведения биотехнологических и селекционных мероприятий.

На начальном этапе осуществляли индукцию мутантных гаплоидных регенерантов (рис. 1).

Важным явился подбор концентрации мутагена, так как с одной стороны необходимо обеспечить максимальный мутагенный эффект при воздействии сублетальных доз ЭМС, с другой – 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 мМ до 10 мМ во все временные интервалы. Максимальное количество регенерантов (51–74 %) было получено при обработке мутагеном в течение 30 минут.

При культивировании черешков листовых эксплантов происходило формирование густо расположенных почек путем 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 зеленый). У генотипов гаплоидных линий отмечалось укорачивание черешков, появление круглых листовых пластинок с волнистым краем, наличием темных вкраплений на поверхности листа.

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

Следующий этап включал получение мутантных ДН-линий (dihaploid) (рис. 2).

Для индукции полиплоидных форм сахарной свеклы использовали колхицин, который действует в первую очередь на клетки, находящиеся в стадиях активного деления. Учитывая, что это клетки конуса нарастания и меристематические ткани, то наиболее подходящим материалом для обработки колхицином являлись молодые, быстро растущие растения-регенеранты. Удвоение числа хромосом происходило при выдержке микроклонов на среде с колхицином в течение двух суток. Количество диплоидных растений в данном случае составило 90,6 %. Для блокирования в миксоплоидной ткани деления гаплоидных клеток использовали кинетин, который максимально (96,8 %) стимулировал деление диплоидных клеток сахарной свеклы.

Цитофотометрический анализ позволил с высокой степенью точности и надежности провести оценку полученных регенерантов на ранних этапах их развития и сформировать в культуре *in vitro* линии удвоенных гаплоидов (ДН) с уровнем плоидности ( $2n=18$ ), полученные после проведения мутагенеза.

Биохимический анализ позволил выявить 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

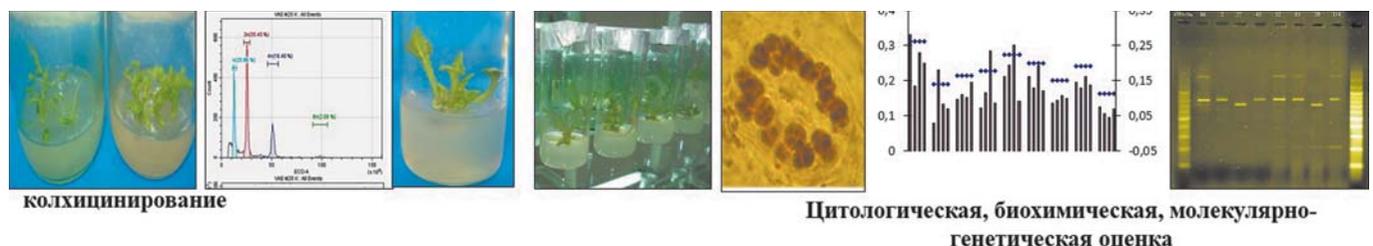


Рисунок 2. Получение мутантных ДН-линий



Рисунок 3. Получение семенных растений мутантных ДН-линий

реакций, связанных с усилением защитных свойств организма при воздействии этилметансульфонатом (ЭМС).

Заключительным этапом явилось получение семенных растений ДН-линий (рис. 3).

Индукция ризогенеза у стабилизированных форм с удвоенным набором хромосом была успешной при добавлении в среду ауксинов ИМК. При этом частота корнеобразования зависела от генотипа и варьировала в пределах 87,3–99,2 %.

Полученные микроклоны сахарной свеклы с мощной корневой системой и хорошо развитой надземной частью переводили в нестерильные условия почвенного субстрата теплицы. Дальнейшее выращивание в течение 2–3 месяцев дало возможность получить небольшие корнеплоды (штеклинки) массой от 50–110 г. 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.

Для 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* происходит образование от двух (330 п.о. и 220 п.о., образцы 1-24, 27, 31-44) до трех (330 п.о., 110 п.о. 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 п.о. и 110 п.о.) (рис.4).

На основе полученной информации полиморфизма локусов *petG-psbE*, амплифицированных с помощью пары праймеров SvulgF - SvulgR растений сахарной свеклы, всю выборку можно разделить на 2 группы

по типу цитоплазмы: группа № 1 (фертильная цитоплазма, образцы); группа № 2 (стерильная цитоплазма, образцы).

Основываясь на полученных данных, можно сделать вывод, что образцы сахарной свеклы 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, ассоциированном с цитоплазматической мужской стерильностью у растений сахарной свеклы, можно проводить целенаправленный отбор регенерантов на ранних этапах развития и формировать гомозиготные мутантные линии на заданный селекционный признак по типам цитоплазмы.

На основе выполненных исследований была разработана методика ускоренного получения удвоенных линий на основе мутагенеза *in vitro*, включающих трехлетний цикл проведения биотехнологических и селекционных приемов. Метод позволяет ускоренно получать качественные семена гомозиготных ДН линий — компонентов высокопродуктивных гибридов. Молекулярно-генетическое тестирование позволило с высокой точностью ранжировать/дифференцировать генотипы на стерильные и фертильные формы.

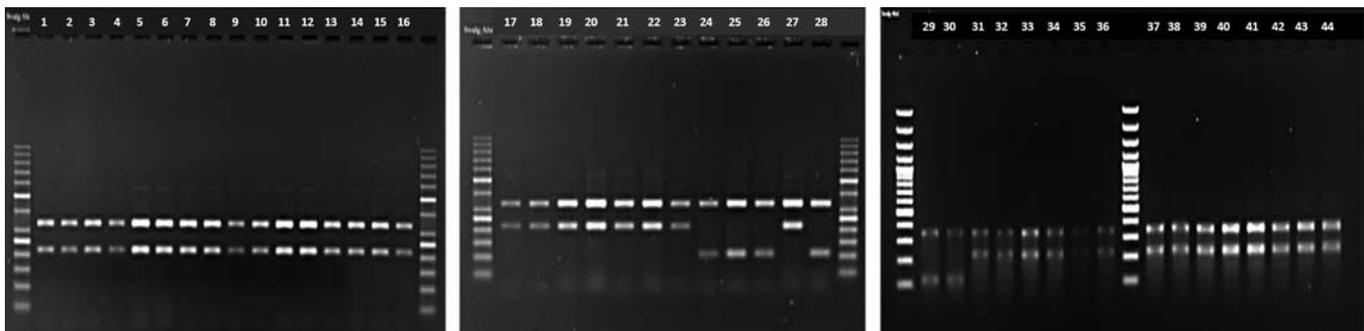


Рисунок 4. Электрофореграмма продуктов рестрикции ампликонов полученных с использованием праймеров SvulgF – SvulgR рестриктазой *AluI*.

Дорожки (образцы сахарной свеклы): 1-24, 27, 31-44 — закрепители стерильности О-типа; №№ 24-26, 28-30 — МС-формы.

Сочетание методов биотехнологии и молекулярной генетики дает возможность формировать новый селекционный материал и повышать качество семенного материала при создании конкурентоспособных отечественных гибридов сахарной свеклы нового поколения.

#### Список использованной литературы

1. Алексеева, Е.С. Экспериментальный мутагенез как метод селекции / Е.С. Алексеева // Радиационный мутагенез вегетативно размножаемых растений. - Москва, 1985. - С. 49-54.
2. Luan, Zh. Mutation induced by ethylmethanesulphonate (EMS) in vitro screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) / Zh. Luan, J. Zhang // Plant Cell Tiss Organ Cult. - 2007. - Vol. 88. - P.77-81.
3. Zhambakin, K. Zh. Getting doubling haploids of rape / K. Zh. Zhambakin, M.H. Shamekova, D.V. Volkov, A.K. Zatybekov, D.L. Daurov, A.K. Zhorabekova, A.R. Halikov // Kaz NU Bulletin. Biology series. - 2012. - Vol. 3(55). - P. 47-57.
4. Maluszynski, M. Haploidy and mutation techniques. In vitro haploid production in higher plants/ M. Maluszynski, Y. Szarejko, B. Sigurbjornsson // Kluwer Academic Publishers: Dordrecht.
5. Szarejko, I. Doubled haploidy and induced mutation/ I. Szarejko, B.P. Forster// Euphytica 2007. - Vol. - 158. - P. 359-370.
6. 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.

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

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

9. Cousin, A. An efficient high-throughput flow cytometric method for estimating DNA ploidy level in plants./ A. Cousin, K. Heel, W. Cowling, M. Nelson // Cytometry. 2009. Vol. 75A. P. 1015-1019.

#### Induced mutagenesis of *Beta vulgaris* L. in tissue culture E.N. Vasilchenko, N.A. Karpechenko, N.N. Cherkasova, O.V. Tkachenko

**Summary.** A method of induced mutagenesis in *Beta vulgaris* L. isolated organs and tissues culture is presented. It has been shown that the use of the chemical mutagen ethylmethanesulphonate (EMS) at a concentration of 2-10 mM significantly affects the regenerative ability of plant explants. The maximum number of regenerants (51-74 %) was obtained during mutagen treatment for 30 minutes. The resulting regenerating plants differed in morphological, cytological, and molecular genetic sign. The use of this method increases the range of genetic variability, helps to reduce the time of creation of the source material, which leads to an acceleration of the breeding process.

**Key words:** sugar beet, plants-regenerants, mutagen, molecular markers, RFLP-analysis.



**5 ИЮЛЯ**

ЛИПЕЦКИЙ РАЙОН,  
БРУСЛАНОВКА,  
ОБЛАСТНАЯ  
СОРТОИСПЫТАТЕЛЬНАЯ  
СТАНЦИЯ

**День  
Липецкого  
поля 2024**

lipagro.ru

6+  
реклама

Выставочная фирма  
Центр      Тел.: (473) 233-09-60  
E-mail: pole@vfcenter.ru

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ СПОНСОР

**РОСТСЕЛЬМАШ**

ОФИЦИАЛЬНЫЙ СПОНСОР

**МАЛКОМ**

ПАРТНЕРЫ ВЫСТАВКИ

**ЛипецкКомплект**  
С/Х ОБЩЕСТВЕННАЯ КОМПАНИЯ

**TECHNODOM**

ОПЕРАТОР ВЫСТАВКИ

**ЦЕНТР**  
ВЫСТАВОЧНАЯ ФИРМА

ОФИЦИАЛЬНЫЙ  
ПОСТАВЩИК УДОБРЕНИЙ

**ФОСАГРО**  
ЛИПЕЦК