

Тестирование растений сахарной свёклы на устойчивость к засолению

А.А. НАЛБАНДЯН, канд. биол. наук (e-mail: arpnal@rambler.ru)

Т.П. ФЕДУЛОВА, д-р биол. наук

Т.С. РУДЕНКО, мл. научн. сотрудник

А.В. МОИСЕЕНКО, мл. научн. сотрудник

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

Введение

Как показывает практика возделывания культурных растений, наибольших успехов в создании урожайных, устойчивых и высококачественных сортов и гибридов, отвечающих требованиям современного производства, можно добиться при организации селекционной работы на молекулярно-генетической основе [1, 2]. За последние три десятилетия на помощь традиционной селекции пришли новые технологии — технологии ДНК-маркеров, что сделало селекцию более эффективной, отвечающей современным реалиям. Молекулярно-генетические маркеры являются надёжным инструментом в руках экспериментатора, так как в основном наследуются сцепленно, моногенно и доминантно [4, 6, 10].

Как известно, влияние абиотических стрессоров на растения сахарной свёклы крайне негативно сказывается на урожае данной культуры, что является большой проблемой для продовольственной безопасности. В ответ на изменения климата и ухудшение состояния окружающей среды растения инициируют молекулярные, клеточные и физиологические изменения, чтобы адаптироваться к различным типам абиотического стресса. Селекционно-ценными являются солеустойчивые растения, толерантные и к засухе. Засоление приводит к созданию в почве низкого (отрицательного) водного потенциала, поэтому поступление воды в растение сильно затруднено. Чтобы противостоять таким стрессам, растения отвечают программируемыми изменениями экспрессии генов на уровнях транскрипции, процессинга и трансляции мРНК.

Цель исследования

В связи с вышеизложенным целью исследования заключалась в проведении молекулярно-генетического тестирования селекционных образцов сахарной свёклы на наличие генов устойчивости к засолению.

Материалы и методы исследований

В качестве материалов для исследования нами были использованы проростки МС-линий сахарной свёклы, сростноплодных опылителей, гибридов, полученных с их участием, предоставленные доктором сельскохозяйственных наук В.П. Ошевным и кандидатом сельскохозяйственных наук Н.П. Грибановой. Выделение суммарной ДНК из растительной ткани осуществляли наборами для выделения ДНК (ООО «Синтол») [5]. Классическая полимеразно-цепная реакция (ПЦР) была проведена на амплификаторе Genius (Великобритания). Условия проведения ПЦР оптимизировали в соответствии с характеристиками используемых праймеров. Для выявления генов, контролирующих работу белков семейства *NHX*-антипортеров, ответственных за адаптацию растений к засолению, были использованы специфические олигонуклеотиды *NHX4*, *NHX5.1*, *NHX5*, созданные в программе PRIMER BLAST (NCBI) [3].

Солевой стресс моделировали путём обработки 10 растений каждого генотипа 3мМ раствором NaCl в качестве контроля, а также при действии концентрации 70мМ и 210мМ в качестве индуктора стресса. Активность аскорбатпероксидазы в листьях сахарной свёклы изучали по модифицированной методике Nakano, Asada (1981). Уровень экспрессии генов *NHX1*, *NHX4*, *NHX5* и *APX1* был исследован методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX 96 (США).

Результаты исследований и их обсуждение

Одним из важных направлений на современном этапе исследований является идентификация генов устойчивости к абиотическому фактору — засолению. Большой успех в решении проблемы адаптации растений к засолению достигнут с развитием методов молекулярной генетики, что позволило идентифицировать многие гены, активирующиеся при засолении.

Так, выявлено, что в ответ на повышение концентрации NaCl увеличивается уровень экспрессии генов, контролирующих работу белков семейства *NHX*-антипортеров [3, 8, 9].

Нами было использовано три специфических праймера к генам *NHX4* и *NHX5* из семейства указанных антипортеров: *NHX4*, *NHX5*, *NHX5.1*. В результате молекулярно-генетических исследований с данными праймерами у всех изученных генотипов получен ожидаемый ПЦР-продукт длиной 140, 250 и 700 п. н. соответственно (рис. 1).

То, что результаты молекулярно-генетических исследований позволили установить наличие генов устойчивости к засолению во всех изученных образцах свёклы, не случайно, так как данный ген относится к генам «домашнего хозяйства», т. е. присутствует у всех растений, в частности у сахарной свёклы как вида, относящегося к умеренно солеустойчивым. Относительный уровень экспрессии генов *NHX1*, *NHX4*, *NHX5*, ответственных за устойчивость растений к засолению, был оценён методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе BioRad CFX96 (рис. 2–4). Провокационный фон создавался путём обработки проростков растений сахарной свёклы раствором NaCl в концентрации 210 мМ.

Анализируя графики, можно предположить, что в формирование устойчивости к засолению особый вклад вносят гены *BvNHX1* и *BvNHX5*, т. е. они могут работать как самостоятельные единицы, а вот *BvNHX4* предположительно только совместно с ними, и при ингибировании *BvNHX1* и *BvNHX5* он не может обеспечить относительную устойчивость.

У иностранных гибридов Хамбер и Портланд проявились достаточно высокие показатели при анализе относительного уровня транскриптов генов *BvNHX1* и *BvNHX5*. К устойчивым генотипам можно также от-

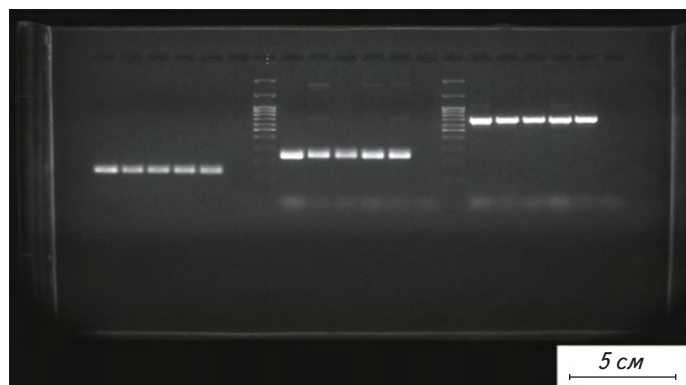


Рис. 1. Электрофоретическое разделение ПЦР-ампликонов, полученных с праймерами *NHX4*, *NHX5*, *NHX5.1*. Обозначения образцов: 1 – Портланд; 2 – Оп18094; 3 – Хамбер; 4 – F_1 18092; 5 – МС17070; К⁺ (ПЦР-смесь без ДНК); М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™ (ThermoScientific, США)

нести и отечественные образцы МС17070 и Оп18094, а вот гибрид F_1 18092 не проявил никакой активности.

Кроме того, в процессе исследований нами была изучена активность аскорбатпероксидазы (АПО; КФ 1.11.1.11) – ключевого фермента антиоксидантной системы растений, которая использует аскорбат в качестве донора электронов при восстановлении H_2O_2 до воды. Аскорбатпероксидаза локализуется

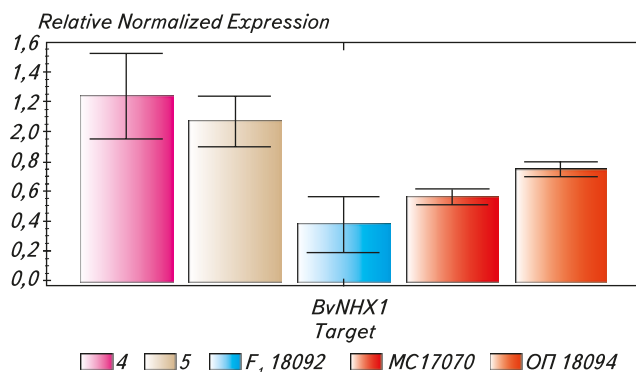


Рис. 2. Относительный уровень транскриптов гена *BvNHX1*. Обозначения образцов: 1 – F_1 18092; 2 – МС17070; 3 – Оп18094; 4 – Хамбер; 5 – Портланд

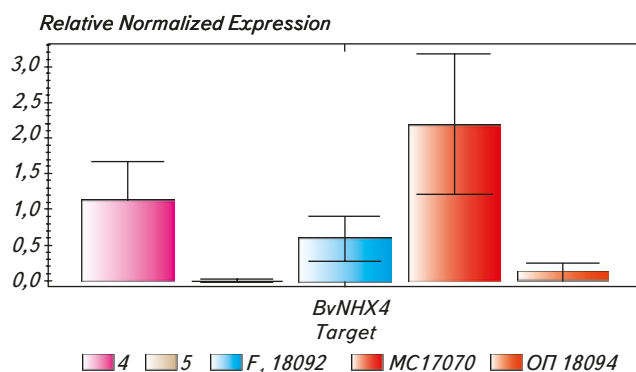


Рис. 3. Относительный уровень транскриптов гена *BvNHX4*. Обозначения образцов: 1 – F_1 18092; 2 – МС17070; 3 – Оп18094; 4 – Хамбер; 5 – Портланд

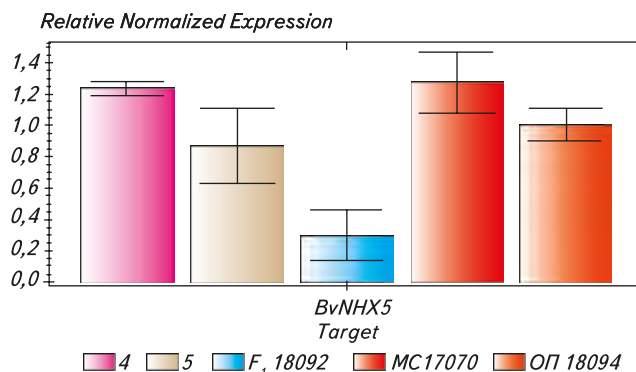


Рис. 4. Относительный уровень транскриптов гена *BvNHX5*. Обозначения образцов: 1 – F_1 18092; 2 – МС17070; 3 – Оп18094; 4 – Хамбер; 5 – Портланд

в различных клеточных компартментах, таких как хлоропласты, цитозоль, митохондрии, пероксисомы. Активность и экспрессия генов АПО в разных видах растений изменяется в ответ на воздействие различных стрессоров, в частности засухи и засоления. Активность аскорбатпероксидазы в листьях сахарной свёклы изучали при действии 3мМ раствора NaCl в качестве контроля, а также при действии 70мМ и 210мМ раствором NaCl в качестве индуктора солевого стресса по модифицированной методике Nakano, Asada (1981) [7] (рис. 5).

Так, при действии стресса в виде 3мМ раствора NaCl выявлено повышение удельной активности данного фермента у растений гибрида иностранной селекции Хамбер и МС-формы № 17070 Рамонской селекции до 48Е/г.с.м. При воздействии на растения сахарной свёклы раствором NaCl в концентрации 70мМ также у данных генотипов установлена более высокая активность аскорбатпероксидазы, у гибрида Хамбер

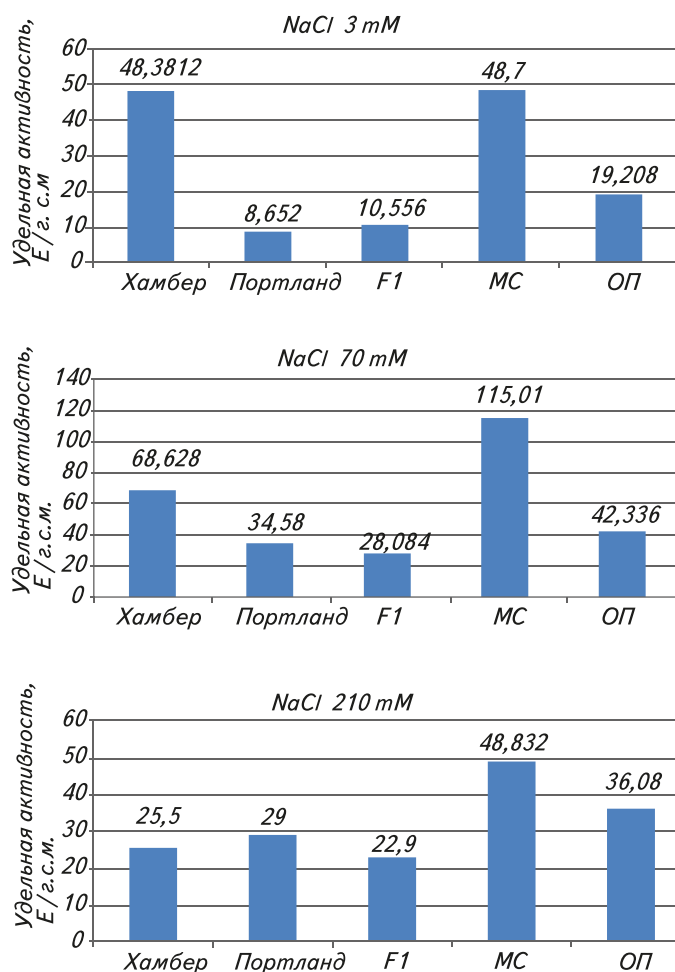


Рис. 5. Удельная активность аскорбатпероксидазы при концентрациях раствора NaCl 3мМ, 70мМ и 210мМ соответственно

(68Е/г.с.м.) и МС-формы (115Е/г.с.м.). При использовании раствора NaCl в концентрации 210мМ наивысшая активность фермента обнаружена у растений МС-формы, она составила 48Е/г.с.м. Полученные результаты свидетельствуют о повышенной устойчивости растений данных генотипов к солевому стрессу и о лучшей их адаптации к нему.

Относительный уровень экспрессии гена *APX1*, ответственного за работу фермента аскорбатпероксидазы, изменяется при действии различных стресс-факторов, вызывающих ОС (оксидативный стресс), чему способствует наличие cis-элемента в промоторной части гена. Работа данного гена тоже была оценена методом ПЦР в реальном времени (рис. 6).

ПЦР в режиме реального времени подтвердила результаты, полученные при оценке активности аскорбатпероксидазы на спектрофотометре. Отечественные селекционные материалы сохраняли относительно высокий уровень экспрессии гена *APX1* и при стрессе, вызванном критической концентрацией NaCl (210мМ) по сравнению с зарубежными гибридами Хамбер и Портланд.

Заключение

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о том, что для изучения проявления генов *NHX4* и *NHX5* из семейства антипортеров *NHX* и отбора генотипов с генами устойчивости к засолению могут быть использованы созданные нами специфические праймеры *NHX4*, *NHX5.1*, *NHX5*. Установлено, что отечественные селекционные материалы МС17070 и Оп18094 можно рекомендовать как источник устойчивости к данному стресс-фактору. Высокий уровень относительной экспрессии показал и иностранный гибрид Хамбер. По удельной активности аскорбатпероксидазы также наиболее высокие показатели отмечены у отечественных генотипов.

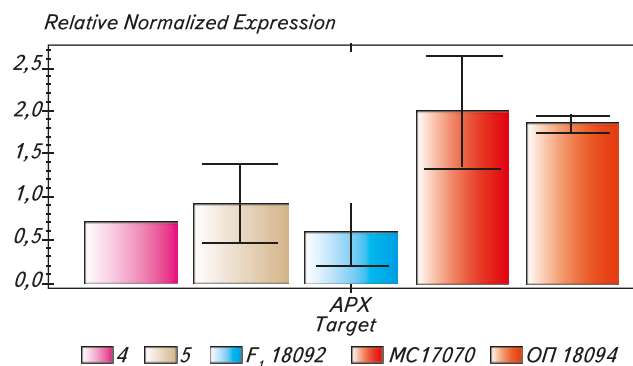


Рис. 6. Относительный уровень транскриптов гена *APX1*. Обозначения образцов: 1 – F₁18092; 2 – МС17070; 3 – Оп18094; 4 – Хамбер; 5 – Портланд

Мы знаем о сахаре всё!

А вы?



Список литературы

1. Корниенко, А.В. Генетика и селекция сахарной свёклы *B. vulgaris* L. / А.В. Корниенко, А.К. Буторина // Воронеж : Воронежский ЦНТИ, 2012. — 391 с.
2. Буренин, В.И. Генетические ресурсы рода *Beta* L. (свёкла) / В.И. Буренин. — СПб., 2007. — 274 с.
3. Adler, G. The sugar beet gene encoding the sodium/proton exchanger 1 (*BvNHX1*) is regulated by a MYB transcription factor / G. Adler, E. Blumwald, D. Bar-Zvi // *Planta*. — 2010. — V. 232. — P. 187–195.
4. Broccanello, Ch. Comparison of three PCR-based assays for SNP genotyping in plants [et al.] // *Plant Methods*. — 2018. — V. 14:28.
5. Hussein, A.S. Efficient and nontoxic DNA isolation method for PCR analysis / A.S. Hussein, A.A. Nalbandyan, T.P. Fedulova, N.N. Bogacheva // *Russian Agricultural Sciences*. — 2014. — V. 40. — Is. 3. — P. 177–178.
6. Izzatullayeva, V. Efficiency of using RAPD and ISSR markers in evaluation of genetic diversity in sugar beet / V. Izzatullayeva [et al.] // *Turkish Journal of Biology*. — 2014. — V. 38. — P. 429–438.
7. Nakano, Y. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts / Y. Nakano, K. Asada // *Plant Cell Physiol*. — 1981. — V. 22. — P. 867–880.
8. Rodríguez-Rosales, M. Plant *NHX* cation/proton antiporters [et al.] // *Plant Signaling & Behavior*. — 2009. — V. 4 (4). — P. 265–276.
9. Shafaqat, A. Biochar soil amendment on alleviation of drought and salt stress in plants: a critical review / A. Shafaqat [et al.] // *Environmental Science and Pollution Research*. — 2017. — V. 24. — P. 12700–12712.

Аннотация. В статье рассматриваются вопросы молекулярно-генетической оценки селекционных образцов сахарной свёклы на устойчивость к солевому стрессу. Установлено, что повышение концентрации NaCl при обработке растений увеличивало уровень экспрессии генов, контролирующих белки семейства *NHX*-антипортеров. У иностранных гибридов Хамбер и Портланд также отмечена повышенная экспрессия транскриптов генов *BvNHX1* и *BvNHX5*. К устойчивым генотипам относятся и отечественные образцы MC17070 и Op18094. Отечественные селекционные материалы сохраняли относительно высокий уровень экспрессии гена *APX1* и при стрессе, вызванном критической концентрацией NaCl (210мМ) по сравнению с зарубежными гибридами Хамбер и Портланд.

Ключевые слова: сахарная свёкла, солевой стресс, NaCl , белки семейства *NHX*-антипортеров, уровень экспрессии гена *APX1*, аскорбатпероксидаза.

Summary. In the article, questions of molecular-genetic evaluation of sugar breeding samples beet for resistance to salt stress are considered. It has been that increase of NaCl concentration, when treating plants, has led to increase of expression level of the genes controlling proteins of the *NHX*-antiporter family. In the foreign hybrids Humber and Portland, higher expression of the genes *BvNHX1* and *BvNHX5* transcripts also has been noted. The domestic samples of MC17070 and Op18094 are among resistant genotypes as well. Domestic breeding materials have retained a relatively high expression level of the *APX1* gene even under stress conditions caused by critical concentration of NaCl (210mM) as compared to the foreign hybrids, Humber and Portland.

Keywords: sugar beet, salt stress, NaCl , proteins of the *NHX*-antiporter family, the *APX1* gene expression level, ascorbat-peroxidase.