

Скрининг селекционных материалов сахарной свёклы на наличие генов устойчивости к засолению

А.А. НАЛБАНДЯН, канд. биолог. наук, зав. лабораторией (e-mail: arpnal@rambler.ru);
А.С. ХУССЕЙН, канд. биолог. наук, ст. научн. сотрудник; **Т.П. ФЕДУЛОВА**, д-р биолог. наук, вед. научн. сотрудник;
И.В. ЧЕРЕПУХИНА, канд. биолог. наук, ст. научн. сотрудник; **Т.И. КРЮКОВА**, канд. с/х. наук, ст. научн. сотрудник;
Т.С. РУДЕНКО, мл. научн. сотрудник; **Н.Р. МИХЕЕВА**, мл. научн. сотрудник; **А.В. МОИСЕЕНКО**, научн. сотрудник
 ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова»

Введение

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 и растения, толерантные к засухе и тяжёлым металлам. Засоление приводит к созданию в почве низкого (отрицательного) водного потенциала, поэтому поступление воды в растение сильно затруднено. Дефицит воды, засоление почвы, резкие колебания температур – главные факторы подавления роста растений сахарной свёклы и снижения их урожайности. Чтобы противостоять таким стрессам, растения отвечают программируемыми изменениями экспрессии генов на уровнях транскрипции, процессинга и трансляции мРНК [4, 8, 9].

Одним из наиболее распространённых и ранних симптомов, связанных с этими стрессами, является нарушение гомеостаза растительной водной среды, которое регулируется группой белков, называемых аквапоринами. Это небольшое семейство белков, адекватная работа которых ведёт к повышению устойчивости растений к абиотическому стрессу. Для сахарной свёклы были идентифицированы 28 аквапоринов (BvAQP), расположенных по всему геному [6, 7].

Одной из важных задач в селекции сахарной свёклы 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, контролируемых белки семейства NHX-антипортеров. Всего выявлено пять предполагаемых генов NHX на четырёх хромосомах у сахарной свёклы. Филогенетический анализ показал, что эти гены сгруппированы в три основных класса, а именно: вакуолярные (Vac: BvNHX1, BvNHX2 и BvNHX3), эндосомальные (Endo: BvNHX4) и плазмалеммарные (PM-класс: BvNHX5) [1, 11].

В процессе эволюции перед высшими растениями возникла необходимость регулировать дальний транспорт Na^+ , т. е. транспорт Na^+ в системе целого растения. В частности, выявлено, что в ответ на повышение концентрации NaCl повышается уровень экспрессии генов, кодирующих белки семейства NHX-антипортеров. Показано, что некоторые из белков переносят ионы Na^+ и K^+ из цитоплазмы в вакуоль в обмен на ионы H^+ . Компартиментация избытка Na^+ в вакуоли – стратегия, используемая многими растениями для выживания при засолении, и солеустойчивость растения при этом зависит от эффективности работы вакуолярного NHX-антипортера. Работа другой части белков направлена на ограничение накопления Na^+ в побеге путём торможения его транспорта из корней в побег, особенно в листья, рециркуляции Na^+ из побега в корни и хранения его в вакуолях клеток корня или стебля [2, 3, 10].

В связи с вышеизложенным цель исследований заключалась в проведении молекулярно-генетического скрининга селекционных материалов сахарной свёклы на наличие генов устойчивости к засолению.

Материалы и методы исследований

Научные исследования выполнены на базе лаборатории маркер-ориентированной селекции с использованием методов молекулярного маркирования на основе ПЦР-анализа. В качестве материалов для экспериментов были использованы проростки

селекционных материалов сахарной свёклы, предоставленные доктором сельскохозяйственных наук В.П. Ошевным и кандидатом сельскохозяйственных наук Н.П. Грибановой, а также гибриды фирмы «Lion Seeds» (Италия).

Выделение геномной ДНК из растительной ткани осуществляли при помощи 20 % SDS и 3,5М ацетата аммония [5]. Качество выделенной ДНК было определено путём электрофореза в 1,5%-м агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Полученная ДНК растворялась в 10 мМ трис-НСl-буфера, рН 8,0, содержащем 0,1 мМ ЭДТА и использовалась для ПЦР-анализа. ПЦР была проведена на амплификаторе «Genius» (Великобритания). В работе использованы следующие праймеры к генам, связанным с устойчивостью к засолению (NHX5.1, NHX5) [11].

Результаты исследований и их обсуждение

Для гена NHX5 из семейства указанных антипортеров на базе данных NCBI (Primer Blast) нами создан специфический праймер NHX5.1, который был использован при отборе генотипов с генами устойчивости к засолению. В результате молекулярно-генетических исследований с данным праймером почти у всех изученных генотипов получен ожидаемый ПЦР-продукт длиной 700 п. н., за исключением образцов № 25 и 30 (рис. 1).

Выделенные селекционные материалы могут быть использованы в селекционном процессе в качестве источников устойчивости к засолению.

При использовании праймера NHX5 на этот же ген NHX5 во всех изученных образцах выявлен ДНК-фрагмент длиной 480 п. н. (рис. 2), что свидетельствует о наличии у них данного гена.

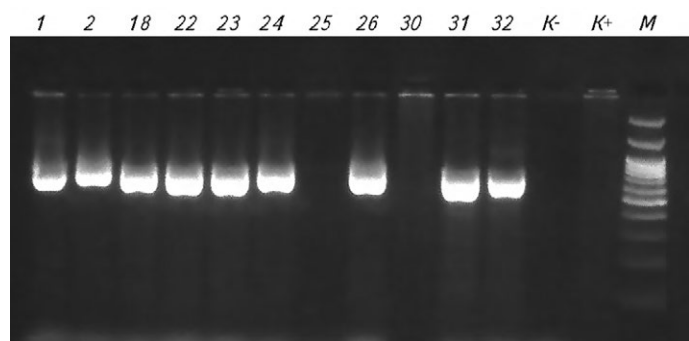


Рис. 1. Электрофоретическое разделение ПЦР-ампликонов, полученных с праймером NHX5.1
Обозначения образцов: 1 – F₁18084, 2 – Оп18085, 18 – Оп18075, 22 – F₁18109, 23 – F₁18110, 24 – Шаннон, 25 – Гранате, 26 – Хамбер, 30 – МС 1(ВИР), 31 – МС 2(ВИР), 32 – Пистиллодий, K⁻ (ПЦР-смесь без ДНК), K⁺ – (ПЦР-смесь без ДНК), K⁺ – (ПЦР-смесь с ДНК), M – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™ (ThermoScientific, США)

Заключение

В результате проведённых экспериментов нами создан праймер NHX5.1 для гена NHX5 из семейства антипортеров NHX для отбора генотипов с генами устойчивости к засолению. С данным праймером почти у всех изученных генотипов получен ожидаемый ПЦР-продукт длиной 700 п. н. При использовании праймера NHX5 во всех изученных образцах выявлен ДНК-фрагмент длиной 480 п. н., что свидетельствует о наличии у них данного гена.

Таким образом, результаты молекулярно-генетических исследований позволили установить наличие гена NHX5 во всех изученных образцах свёклы. Уровень экспрессии генов, ответственных за устойчивость к засолению, будет в дальнейшем изучен методом ПЦР в реальном времени.

Список литературы

1. 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.
2. Almeida, D. Regulation of Na⁺ and K⁺ homeostasis in plants: towards improved salt stress tolerance in crop plants / D. Almeida, M. Oliveira, N. Saibo // *Genetics and Molecular Biology*. – 2017. – V. 40. – P. 326–345.
3. Blumwald, E. Sodium transport and salt tolerance in plants / E. Blumwald // *Current Opinion in Cell Biology* // Review. – 2000. – V. 12. – Issue 4. – P. 431–434.
4. Gui, G. Transcriptome Analysis of Salt-Sensitive and Tolerant Genotypes Reveals Salt-Tolerance Metabolic Pathways in Sugar Beet / G. Gui [and oth.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – V. 20(23): 5910.
5. Hussein, A.S. Efficient and nontoxic DNA isolation method for PCR analysis / A.S. Hussein, A.A. Nalbandyan,

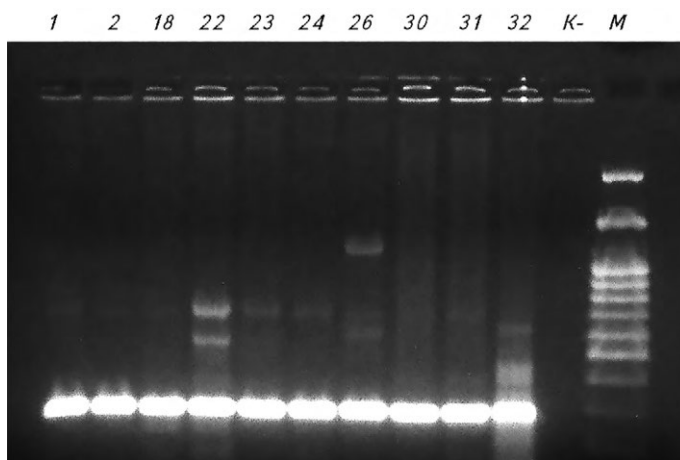


Рис. 2. Электрофоретическое разделение ПЦР-ампликонов, полученных с праймером NHX5