

ВЛИЯНИЕ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ НА СОХРАННОСТЬ МАТОЧНЫХ КОРНЕПЛОДОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ И ГЕНЕТИЧЕСКУЮ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПОЛУЧЕННЫХ СЕМЯН

М.А. Смирнов, кандидат экономических наук,
А.А. Налбандян, кандидат биологических наук

Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова,
396030, Воронежская обл., Рамонский р-н, п. ВНИИСС, 86
E-mail: arpnal@rambler.ru

Исследования проводили с целью изучения влияния УФ-излучения на сохранность маточных корнеплодов сахарной свеклы и генетическую изменчивость выращенных семян. Обработку маточных корнеплодов проводили бактерицидной лампой Philips TUV 30W с максимумом на длине волны 253,7 нм (UV-C) с расстояния 50...60 см от поверхности. После этого корнеплоды хранили в полипропиленовых мешках в корнехранилище в нерегулируемых условиях. Схема опыта предусматривала обработку корнеплодов (по 50 шт. в каждом варианте) сростноплодного опылителя гибрида отечественной селекции РМС 127 УФ-излучением с экспозицией – 60 с, 90 с, 120 с и 180 с; контроль – без обработки. В варианте с экспозицией 180 с наблюдали достоверное снижение загнивания корнеплодов, в сравнении с контролем, в 4 раза и уменьшения гнилой массы – в 4,6 раза. Потери массы посадочного материала при хранении сократились с 5,4 % (контроль) до 2,7 %. Биологическая эффективность обработки в этом варианте была максимальной в опыте и составила 78,5 %. Высокая сохранность маточных корнеплодов опылителя отмечена и на фоне УФ-излучения в экспозиции 120 с. Доля загнивших корнеплодов снижалась, в сравнении с контролем, в 2 раза, гнилой массы – в 3,4 раза. Потери массы уменьшались в 2 раза. Биологическая эффективность обработки составила 70,81 %. В дальнейшем в этих вариантах отмечена и более высокая урожайность семенных растений (0,62 т/га). По результатам молекулярно-генетического тестирования с использованием 6 маркеров к микросателлитным локусам Unigenes растений из корнеплодов, обработанных УФ-излучением, мутаций на геном уровне не выявлено.

INFLUENCE OF UV RADIATION ON SAFETY OF SUGAR BEET MOTHER ROOTS AND GENETIC VARIABILITY OF THE OBTAINED SEEDS

Smirnov M.A., Nalbandyan A.A.

A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar,
396030, Voronezhskaya obl., Ramonskii r-n, p. VNISS, 86
E-mail: arpnal@rambler.ru

Aim of the investigations was to study influence of UV-radiation on safety of sugar beet mother roots and genetical variability of the obtained seeds. Mother roots were treated with bactericidal lamp Philips TUV 30W, with maximum wave length of 253.7 nm (UV-C), at the distance of 50-60 cm from their surface. After that, the roots were stored in polypropylene bags under uncontrolled conditions of a beet root storehouse. The studies were conducted with three replications. The experiment scheme provided treatment of roots (50 per each variant) of the multigerm pollinator used to produce a domestic hybrid of RMS 127 with UV-radiation, the exposures being 60, 90, 120 and 180 sec. (without treatment for the control). In the variant with 180 sec. exposure, a reliable 4-fold reduction of decayed root quantity and 4.6-fold rotten mass decrease was observed as compared to the control. Besides, losses of planting material mass during storage decreased from 5.4 % (control) to 2.7 %. Biological efficiency of the treatment was 78.5 %, being the maximum in the experiment. High safety level of the pollinator mother roots was registered when applying UV-radiation with thy exposures of 120 sec. Percent of the decayed root became 2 times less, and the rotten mass showed 3.4-fold decrease in comparison with the control. The mass losses were 2 times less. Biological efficiency of the treatment was 70.81 %. Ultraviolet radiation at the exposures of 120 and 180 sec had a high biological effect concerning influence on mother root rot spread and development that subsequently ensured a high yield of seed-bearing plants (0.62 t/ha). Molecular-genetic testing of plants obtained after UV treatment using six markers for Unigenes microsatellite loci revealed no mutations at a gene level.

Ключевые слова: ультрафиолетовое излучение, компонент гибрида сахарной свеклы, сохранность, семена, SSR-праймеры, ПЦР.

Key words: ultraviolet radiation, sugar beet hybrid component, safety, seeds, SSR-primers, PCR.

Сахарная свекла (*Beta vulgaris* L.ssp. *saccharifera* Alef.) – перекрестно-опыляемая культура с двулетним циклом развития, обладающая рядом рецессивных признаков (односемянность, фертильность и др.), что в значительной мере определяет сложность ее семеноводческого процесса. В первый год жизни сахарная свекла образует мощную прикорневую розетку листьев и маточный корнеплод, который после высадки на следующий год дает цветущие побеги, образующие семена [1].

В производственном цикле высадочного семеноводства сахарной свеклы определяющее значение играет система защиты маточных корнеплодов от неблагоприятных факторов на стадии послеуборочного хранения, поскольку они представляют собой лабильную систему,

быстро реагирующую на изменения при хранении (температура и влажность среды, распространение и развитие болезней). В технологии послеуборочного хранения маточных корнеплодов сахарной свеклы применяют различные способы и приемы. Среди них наибольшее распространение получило хранение с использованием препаратов фунгицидного действия химической и биологической природы, а также различного вида излучений (инфракрасное, низкоинтенсивное когерентное) [2, 3, 4]. Лучевая обработка представляет собой более экологичный и безопасный способ повышения сохранности маточных корнеплодов.

В последние годы с целью сокращения потерь растительного сырья на стадии хранения все шире используют технологии на основе таких физических методов,

как ультрафиолетовое (УФ) и радиационное (гамма, рентгеновское) облучение, воздействие электромагнитных (постоянного, переменного, пульсирующего) и сверхвысокочастотных (СВЧ) полей, микротоковая стабилизация [5, 6, 7].

УФ-излучение – это электромагнитное излучение в спектральном диапазоне между видимым и рентгеновским в интервале от 205 нм до 315 нм. Спектр УФ-излучения делится на три диапазона: UV-A – длинноволновое (315...400 нм); UV-B – средневолновое (280...315 нм); UV-C – коротковолновое (100...280 нм). Обеззараживание под действием УФ-излучения происходит в результате фотохимических реакций внутри микроорганизмов. Так, большинство используемых для обеззараживания источников УФ-излучения воздействует на ядра клеток или вирусов, разрушая их ДНК [8]. Согласно экспериментальным данным у такой обработки есть ряд преимуществ: УФ-излучение не накапливается в продуктах, не изменяет их вкусовых качеств, увеличивает срок хранения, то есть служит экологически безопасным способом воздействия на растительное сырье. При этом главное условие эффективного использования УФ-излучения – правильный выбор режима обработки: мощность дозы и время облучения [9, 10].

В обеспечении защиты растений от заболеваний, вызываемых грибами, бактериями и вирусами, задействован ряд ключевых механизмов, модификацию которых сейчас уже используют для получения устойчивых форм. Известно, что фототрофные организмы (в частности, сосудистые растения), ведущие прикрепленный образ жизни, периодически попадают под воздействие солнечного света. Естественно, растения проявляют биохимическую и фитохимическую адаптацию к УФ-излучению, приобретая защитные механизмы. Однако молекулярно-генетические механизмы, гены и локусы, реагирующие на ультрафиолетовый стресс, у сахарной свеклы изучены не достаточно. Так, недавно был описан локус, локализованный на хромосоме 4 (Gene ID104907676, NCBI), обеспечивающий экспрессию белка, ассоциированного с устойчивостью/защитой к УФ-излучению. Его экспрессия приводит к увеличению размеров хлоропластов благодаря повышению содержания в них хлорофилла, что сопровождается стимулированием фотосинтетической активности растений [11]. На 9 хромосоме (Gene ID104904602, NCBI) локализован ген, ответственный за экспрессию фермента фотолиаза (EC4.1.99.3), которая удаляет пиримидиновые димеры, образующиеся в молекуле ДНК под действием УФ-излучения. Описанные механизмы относятся к числу основных, позволяющих растениям сохранять стабильность/целостность генома [12, 13]. В связи с изложенным, актуально совершенствование технологии хранения маточных корнеплодов сахарной свеклы с применением УФ-излучения.

Цель исследований – оценить влияние УФ-излучения на сохранность маточных корнеплодов сахарной свеклы и генетическую изменчивость полученных семян.

Для ее достижения решали следующие задачи: изучить эффективность УФ-излучения при хранении маточных корнеплодов сахарной свеклы;

определить последствие УФ-излучения при хранении маточных корнеплодов сахарной свеклы на продуктивность семенных растений;

провести молекулярно-генетическую оценку изменчивости генома выращенных семян опылителя.

Методика. Экспериментальные исследования проводили в лаборатории аналитической оценки технологического качества сахарной свеклы и лаборатории

маркер-ориентированной селекции ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова.

Для изучения УФ-излучения на маточных корнеплодах опылителя сахарной свеклы использовали переносную установку. Источником излучения служила бактерицидная (дезинфекционная) лампа Philips TUV 30W, которая излучает коротковолновые ультрафиолетовые лучи с максимумом на длине волны 253,7 нм (UV-C). Бактерицидный поток – 11,2 Вт. Обработку маточных корнеплодов проводили с расстояния 50...60 см от их поверхности. После этого корнеплоды хранили в полипропиленовых мешках в корнехранилище в регулируемых условиях. Количество корнеплодов в пробе – 50 шт. Длительность хранения 167 суток. Все исследования проводили в трехкратной повторности. Математическую обработку экспериментальных данных выполняли методом дисперсионного анализа с использованием приложения Microsoft Excel.

Схема опыта предусматривала обработку корнеплодов сростноплодного опылителя гибрида отечественной селекции РМС 127 УФ-излучением с экспозицией – 60 с, 90 с, 120 с и 180 с, контроль – без обработки.

Для молекулярно-генетического тестирования генома растений изучаемого опылителя выделяли суммарную ДНК из листового аппарата. ДНК экстрагировали модифицированным SDS-методом с использованием ацетата аммония [14]. Качество выделенной ДНК оценивали электрофорезом в 1,2 %-ном агарозном геле. Классическую ПЦР осуществляли на приборе SimpliAmp (ThermoFisherScientific, США). Протокол ПЦР: предварительная денатурация 94 °С в течение 4 мин; далее 35 циклов денатурация 94 °С – 35 с; отжиг – 45 с; элонгация при 72 °С – 60 с; заключительная элонгация при 72 °С – 7 мин.

Американскими учеными на основе транскриптома, определенного в результате анализа данных экспрессии генов сахарной свеклы, были созданы SSR-маркеры для *Unigenes* локусов, которые связаны с различными метаболическими процессами и играют большую роль в защитных механизмах растений свеклы [15]. Нами были использованы 6 полиморфных *Unigenes*-маркеров для молекулярно-генетического типирования растений из маточных корнеплодов, подвергнутых обработке УФ-излучением.

В работе по типированию изучаемых растений сахарной свеклы использовали следующие праймеры к микросателлитным локусам генома сахарной свеклы: Unigene 24552, Unigene 14805, Unigene7492, Unigene 22373, Unigene 27833, Unigene 17623 (табл. 1) [15].

Табл. 1. Характеристика микросателлитных праймеров

Праймер	Последовательность 5'-3'	Tm, °C	Автор
Unigene 24552	F: AACAACTCACTCATCTTCTTC R: ATGAAAGCAAACGACTAGCAG	54,5	Fugate, 2014
Unigene 14805	F: ACATGTCAACTCTCAACAATCC R: TCACTAGGAGAAACCCCTTC	-/-	-/-
Unigene 7492	F: GCTTTCTTCTCATTAGGAACAC R: CACGTATTGTTGCCATATCTC	-/-	-/-
Unigene 22373	F: AAAGGAAACTACCCCTACACTT R: AAAGGAGAAAGAAGACGATGAG	-/-	-/-
Unigene 27833	F: GAGTCATCAACACCAAACTACA R: ATTAGCCAAGAAAATCACCC	-/-	-/-
Unigene 17623	F: ATTACACCTCAATCTTCCAGC R: AATATTGGCAATCTACCAGC	-/-	-/-

Табл. 2. Влияние УФ-излучения на сохранность маточных корнеплодов опылителя

Показатель	Контроль	Продолжительность УФ облучения				НСР ₀₅
		60 с	90 с	120 с	180 с	
Загнивших корнеплодов, %	13,33	10,00	6,67	6,67	3,33	0,31
Проросших корнеплодов, %	90,00	83,33	80,00	76,67	80,00	3,40
Средняя длина ростков, см	4,00	2,88	2,22	2,06	2,28	0,57
Потери массы, %	5,4	3,8	2,9	2,7	2,7	0,48
Среднесуточные потери массы, %	0,032	0,023	0,017	0,016	0,016	–
Масса гнили, %	1,94	1,12	0,70	0,57	0,42	0,05
Биологическая эффективность, %	–	42,15	64,10	70,81	78,50	–

Результаты и обсуждение. Обработка маточных корнеплодов сростноплодного опылителя сахарной свеклы гибрида РМС127 перед закладкой на хранение УФ-излучением в различных экспозициях оказала влияние на их сохранность (табл. 2). Так, в варианте с экспозицией 180 с отмечено достоверное снижение количества загнивших корнеплодов, в сравнении с контролем, в 4 раза, гнилой массы – в 4,6 раза. Кроме того, потери массы посадочного материала при хранении сократились с 5,4 % (контроль) до 2,7 %, или в 2 раза. В результате биологическая эффективность обработки была максимальной в опыте и составила 78,50 %.

Табл. 3. Урожайность гетерозисных семян опылителя сахарной свеклы

Вариант	Урожайность, т/га	Прибавка к контролю, %
Контроль	0,33	–
УФ-излучение	60 с	9,1
	90 с	15,2
	120 с	48,5
	180 с	87,9
НСР ₀₅	0,07	

Высокая сохранность маточных корнеплодов опылителя также отмечена на фоне УФ-излучения в экспозиции 120 с. Количество загнивших корнеплодов снижалась, по отношению к контролю, в 2 раза, гнилой массы – в 3,4 раза, потери массы – в 2 раза. Биологическая эффективность обработки составила 70,81 %.

Эффективность УФ-излучения на стадии послеуборочного хранения маточных корнеплодов сахарной свеклы опылителя гибрида РМС127 может быть связана с ингибированием микроорганизмов, вызывающих микробиологическую порчу посадочного материала. Снижение численности патогенов при воздействии УФ-излучения на растительное сырье отмечали многие авторы [16, 17].

Для маточных корнеплодов сахарной свеклы желательно создавать такие условия хранения, при которых к завершению этого периода они имели бы здоровые ростки длиной не более 2...3 см. Ростки более 6 см свидетельствуют о несоблюдении температурного режима хранения. Количество проросших маточных корнеплодов опылителя по вариантам опыта варьировало от 76,67 до 90,00 %, а длина ростков не превышала 4,0 см.

Максимальная в опыте урожайность семян опылителя (0,62 т/га) отмечена в варианте с обработкой посадочного материала УФ-излучением с экспозицией 180 с, где она была больше, чем в контроле (0,33 т/га), в 1,9 раза. При экспозиции 120 с урожайность семенных рас-

тений опылителя (0,49 т/га) была выше, чем в контроле, в 1,5 раза (табл. 3). Эффект воздействия УФ-излучения на урожайность семенных растений сахарной свеклы, вероятно, связан с лучшей сохранностью и, как следствие, качеством посадочного материала.

Амплификация ДНК с использованием SSR-маркеров Unigene 24552, Unigene 17623 и Unigene 27833 не выявила каких-либо изменений в геноме растений. Исключение составило растение под №4 (без обработки, Unigene 17623), у которого отмечена потеря одного ампликона длиной 200 п.н. (рис. 1).

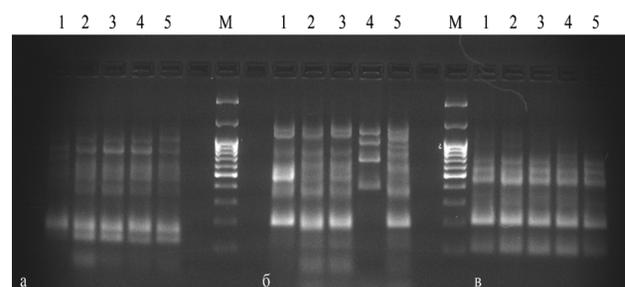


Рис. 1. Электрофоретическое разделение ПЦП-продуктов, полученных с праймерами к SSR-локусам: а) Unigene 24552; б) Unigene 17623; в) Unigene 27833: 1 – экспозиция 60 с; 2 – экспозиция 90 с; 3 – экспозиция 120 с; 4 – без обработки; 5 – экспозиция 180 с; М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™ (ThermoScientific, США).

ПЦП с праймерами Unigene 7492, Unigene 14805 и Unigene 22373 в изученных образцах также не выявила существенных изменений в геноме изучаемого генотипа. Исключение составило растение №5 (180 с, Unigene 14805), у которого происходит потеря одного ДНК-фрагмента, размером 1000 п.н. (рис. 2).

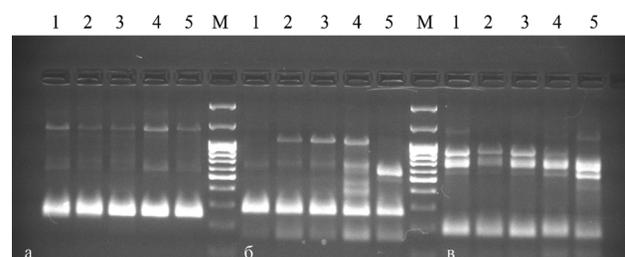


Рис. 2. Электрофоретическое разделение ПЦП-продуктов, полученных с праймерами к SSR-локусам: а) Unigene 7492; б) Unigene 14805; в) Unigene 22373: 1 – экспозиция 60 с; 2 – экспозиция 90 с; 3 – экспозиция 120 с; 4 – без обработки; 5 – экспозиция 180 с; М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™ (ThermoScientific, США).

Можно заключить, что генотипы растений, выращенных из корнеплодов без УФ-обработки и с обработкой не различаются. Предположительно, использованные дозы и время экспозиции облучения не вызвали мутаций на геномном уровне.

Таким образом, применение УФ-излучения обеспечивает лучшую сохранность маточных корнеплодов сростноплодного компонента гибрида сахарной свеклы РМС127. Обработка корнеплодов перед хранением УФ-излучением с экспозицией 120 с и 180 с оказала положительное влияние на продуктивность семенных растений культуры.

В результате проведенного молекулярно-генетического скрининга сахарной свеклы, выращенной из маточных корнеплодов, обработанных УФ-излучением, изменений в их геноме по исследованным SSR-локусах не выявлено.

Литература

1. *Репродуктивная биология сахарной свеклы* / Т.П. Жужжалова, В.В. Знаменская, О.А. Подвигина и др. Воронеж: Тип. ООО «Сотрудничество». 2006. 232 с.
2. *Бартенев И.И. Влияние различных условий хранения на поражаемость болезнями и израстание маточных корнеплодов сахарной свеклы* / И.И. Бартенев, С.В. Саценко, Д.С. Гаврин и др. // *Вестник Алтайского ГАУ*. 2015. №6 (128). С. 25–31.
3. *Подвигина О.А., Бартенев И.И., Саценко С.В. Влияние низкоинтенсивного когерентного излучения на сохранность посадочного материала* // *Лесотехнический журнал*. 2018. №4. С. 23–28.
4. *Смирнов М.А., Бартенев И.И., Нечаева О.М. Эффективный способ хранения маточной сахарной свеклы* // *Сахарная свекла*. 2018. №10. С. 28–32.
5. *Современные методы предотвращения микробиологической порчи и увеличения сроков хранения продукции растениеводства* / Т.В. Першакова, Г.А. Купин, В.Н. Алешин и др. // *Международный журнал гуманитарных и естественных наук*. 2018. №9. С. 115–121.
6. *Цыгвинцев П.Н. Торможение физиологических процессов в клубнях картофеля после облучения* // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2018. №11. С. 341–345.
7. *Effect of gamma irradiation on microbial quality of minimally processed carrot and lettuce: A case study in Greater Accra region of Ghana* / G.K. Frimpong, I.D. Kottoh, D.O. Ofosu, et al. // *Radiation Physics and Chemistry*. 2015. Vol. 110. P. 12–16.
8. *Современные направления развития источников УФ-излучения бактерицидного диапазона* / А.С. Бугаев, Е.П. Шешин, Д.И. Озол и др. // *Вестник Московского государственного областного университета. Серия: Физика-Математика*. 2017. № 4. С. 24–38.
9. *Rai N., Orlando Morales L., Aphalo P. Perception of solar UV radiation by plants: photoreceptors and mechanisms* // *Plant Physiology*. 2021. Vol. 186. No. 3. P. 1382–1396.
10. *An Insight into the Abiotic Stress Responses of Cultivated Beets (Beta vulgaris L.)* / S. Yolcu, H. Alavilli, P. Ganesh, et al. // *Plants*. 2022. Vol. 11. No.1 :12 <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/1/12> (дата обращения: 15.01.2022).
11. *Tomato UV-B receptor SIUVR8 mediates plant acclimation to UV-B radiation and enhances fruit chloroplast development via regulating SIGLK2* / H. Li, Y. Li, H. Deng, et al. // *Scientific Reports*. 2018. Vol. 8:6097 <https://www.nature.com/articles/s41598-018-24309-y> (дата обращения: 10.01.2022).
12. *UVR2 ensures transgenerational genome stability under simulated natural UV-B in Arabidopsis thaliana* / E. Willing, Th. Piofczyk, A. Albert, et al. // *Nature Communications*. 2016. Vol. 7:13522 <https://www.nature.com/articles/ncomms13522> (дата обращения: 12.01.2022).
13. *Rahimzadeh Karvansara P., Razavi S.M. Physiological and biochemical responses of sugar beet (Beta vulgaris L) to ultraviolet-B radiation* // *PeerJ*. 2019. Vol. 7: e6790 <https://peerj.com/articles/6790/> (дата обращения: 14.01.2022).
14. *Efficient and nontoxic DNA isolation method for PCR analysis* / A.S. Hussein, A.A. Nalbandyan, T.P. Fedulova, et al. // *Russian Agricultural Sciences*. 2014. Vol. 40. No. 3. P. 177–178.
15. *Generation and Characterization of a Sugar beet Transcriptome and Transcript-Based SSR Markers* / K. Fugate, D. Fajardo, B. Schlautman, et al. // *The Plant Genome*. 2014. Vol. 7. No. 2. P. 1-13. https://www.academia.edu/18441682/Generation_and_Characterization_of_a_Sugarbeet_Transcriptome_and_Transcript_Based_SSR_Markers (дата обращения: 20.01.2022).
16. *Влияние комбинирования микроволнового и ультрафиолетового методов обработки растительного сырья на ингибирование культуры Salmonella* / А.Ю. Колоколова, Н.В. Илюхина, М.В. Тришканева и др. // *Вестник ВГУИТ*. 2020. Т. 82. №. 1. С. 76–81.
17. *Курбанова М.Н. Влияние γ и УФ-излучения на снижение микробальной обсемененности и ягод черной смородины и плодов вишни* / М.Н. Курбанова, М.Т. Левшенко, А.Ю. Колоколова и др. // *Известия ВУЗов. Пищевая технология*. 2018. № 5-6. С. 64–67.

Поступила в редакцию 16.02.2022

После доработки 01.03.2022

Принята к публикации 25.03.2022