

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ В СЕЛЕКЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ СВЁКЛЫ

Т. П. Федулова¹, Д. Н. Федорин², М. А. Богомолов¹, В. П. Ошевнев¹, Н. П. Грибанова¹

¹ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова»

²ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»
Поступила в редакцию 07.07. 2016 г.

Аннотация. В результате экспериментальных исследований установлена генетическая изменчивость селекционных материалов сахарной, кормовой свёклы и гибридов с их участием, характеризующаяся полиморфизмом по 4-м произвольным RAPD- маркерам. По данным ПЦР-анализа рассчитаны генетические расстояния между изученными селекционными образцами и проведена их кластеризация. Селекционные материалы, находящиеся на большом генетическом расстоянии друг от друга, рекомендованы для гибридизации при создании высокопродуктивных гибридов свёклы.

Ключевые слова: свёкла сахарная, кормовая, RAPD - маркеры, аллель, праймеры, локус, генетические расстояния

Abstract. As a result of experimental researches genetic changeability of plant-breedings materials of sugar, feed beet and hybrids is set with their participation, characterized polymorphism on a 4-mcode to the arbitrary RAPD- markers. From data of PCR-analysis genetic distances are expected between the studied plant-breedings standards and their clusterization is conducted. Plant-breedings materials, being on large genetic distance from each other, are recommended for hybridization at creation

Keywords: a beet is saccharine, feed, RAPD are markers, allele, primer, loci, genetic distances

Селекционные программы опираются на генетическую изменчивость, позволяя создавать новые гибриды с измененными признаками и свойствами. Селекция растений наряду с генетической изменчивостью в последние годы достаточно широко использует эпигенетическую изменчивость и трансгрессии, что существенно расширило возможности селекционного улучшения растений [1, 2, 3]. Однако дальнейшие селекционные работы по сахарной свекле ограничивались узостью ее генетической основы, обусловленной спецификой ее происхождения. Возможность изучения изменчивости на молекулярном уровне могла бы значительно расширить перспективы для отбора и сократить время, необходимое селекционеру для создания новых гибридов. И такая возможность была обеспечена достижениями молекулярной биологии и геномики в конце XX

века, позволившими проводить параллельно классическую и молекулярную селекцию сахарной свеклы при взаимном проникновении их методов [4].

Следует указать на особую важность в настоящее время селекции сахарной свеклы на устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам. При селекции на устойчивость используются разные подходы и очень важным при этом является выявление генов устойчивости и определение их источников. У свеклы установлен ряд генов устойчивости, например к ризомании – одному из наиболее опасных заболеваний сахарной свеклы.

В мировой практике для изучения особенностей генома близкородственных форм, которыми являются сорта, гибриды и линии культурных растений, используют методы молекулярного маркирования на основе RAPD - и микросателлитных локусов. Большинство идентифицированных микросателлитных локусов являются варибель-

© Федулова Т. П., Федорин Д. Н., Богомолов М. А., Ошевнев В. П., Грибанова Н. П., 2016

ными по длине, что обусловлено различным количеством тандемных последовательностей. Анализ длины RAPD - и микросателлитов, как правило, позволяет выявить значительное количество аллельных вариантов, а их распространение по всему геному позволяет охватить значительную его часть. В последние годы проведен ряд исследований, посвященных поиску варибельных по длине микросателлитных последовательностей в геноме сахарной свеклы, а также разработаны маркеры, позволяющие исследовать их аллельное состояние, в частности маркеры серии GZM [5, 6].

Мультилокусные RAPD – маркеры успешно применяются для идентификации видов в разных группах растений. Доказано, что они особенно полезны для выявления гибридов. Внутривидовая гибридизация имеет широкие перспективы, в частности, может повышать генетическую изменчивость и генерировать новые признаки или комбинации. Полученные данные свидетельствуют о повышенной генетической изменчивости гибридов по сравнению с исходными формами и появлению у них новых признаков (фрагментов ДНК) [7].

Цель данной работы заключалась в выявлении полиморфизма RAPD-маркеров, характеризующих генетическую изменчивость селекционных материалов свёклы рода *Beta*.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве материалов для исследований были использованы проростки следующих разновидностей корнеплодной свеклы: кормовой красной и белой свёклы; мужскостерильные образцы сахарной свёклы; гибридные комбинации с их участием; гибрид урожайно-сахаристого направления Витязь и гибриды иностранной селекции, предоставленные лабораториями исходного материала (д. с.- х. н. Богомоловым М.А.) и ЦМС (д.с.-х. н. Ошевневым В.П.).

Геномную ДНК выделяли из 0.2 г зеленых листьев растений свеклы с помощью гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформного метода с использованием СТАВ. Качество выделенной ДНК определяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Полученную ДНК растворяли в 10 мМ трис-НСl-буфер, рН 8.0, содержащим 0.1 мМ ЭДТА и использовали для ПЦР-анализа. ПЦР-анализ проводили в амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия). Параметры амплификации были следующие: предварительная денатурация при 95°C в течение 10 минут, затем 30 циклов: 95°C-40с, 62°C-40с, 72°C-40с и финальный этап элонгации цепи 72°C- 5 мин. Для выявления генетической структуры родительских форм сахарной, кормовой свёклы и их гибридов использовали одноцепочечные RAPD-праймеры [8, 9]: OP-09: 5'-TCGGTCATAG-3'; AB3-3: 5'-TCTCCGCTTG-3'; AB6-15: 5'-AGTCGCCCTT-3'; UBC278: 5'-GA-CAACAGGA-3'.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате ПЦР - анализа геномных ДНК родительских форм свёклы (МС – растений сахарной свёклы, кормовой свёклы и гибридов с их участием) по одноцепочечному RAPD – праймеру AB3-3 отмечено, что максимальный набор продуктов амплификации наблюдается у многосемянного образца кормовой белой свёклы Оп (600 и 800 п.н.) (рис. 1).

Данный признак не является доминирующим при передаче потомству при гибридизации (не у всех гибридов он проявляется). При передаче в образце РС 1119 × Оп проявляется только ампликон 800 п.н. Аналогичный продукт амплификации имеется и у образца РС 1119 × РФ 1119. В остальных номерах данный признак обнаружен только в гибриде Витязь.

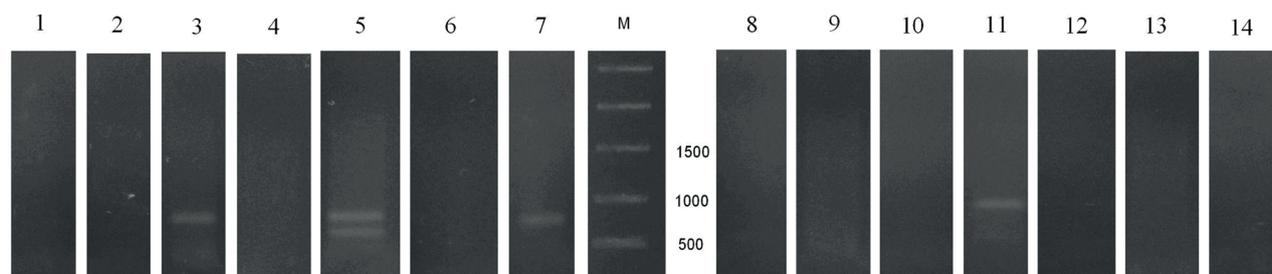


Рис. 1. Амплификация геномной ДНК растений свёклы праймером АВ-3-3. Обозначения: 1) РС 1119, 2) РС 8, 3) (РС 1119 × Оп), 4) (РС 8 × Оп), 5) Оп – кормовая белая свёкла, 6) РС1119 × Оп, 7) РС 1119 × РФ 1119, 8) МС – 94 Ар, 9) кормовая красная свёкла, 10) МС 94 × Ар корм.красн., 11) Витязь, 12) Портланд, 13) Муррей, 14) Хамбер.

По локусу ОР-09 в гибриде РС 8 × Оп и растениях кормовой белой свёклы - Оп обнаружен одинаковый набор продуктов амплификации, что, вероятно, связано с передачей признака при гибридизации в неизменном состоянии (рис. 2).

В образце, полученном при гибридизации стерильных растений сахарной свёклы с закрепителем стерильности «Оуэн-типа» (О – типом) РС 1119 × РФ 1119, обнаружено 2 ПЦР - продукта, 600 и 800 п.н. Все остальные генотипы не имеют проявления этого признака в своем составе, что свидетельствует о глубоком генетическом отличии данных селекционных форм. В номерах МС 94 Ар и опылителе - кормовой красной свёкле присутствуют ампликоны 300, 600 и 800 п.н. У всех остальных номеров данный локус не обнаружен.

По праймеру АВ6-15 образцы МС 94 Ар, многосемянный опылитель - кормовая красная свёкла, гибриды Витязь и Муррей имеют одинаковый на-

бор ампликонов 400, 600, 700 и 1000 п.н. (рис. 3).

У всех номеров имеется общий аллель длиной 600 п.н. Обособленно выглядит образец Портланд, т.к. он имеет 2 продукта амплификации. Селекционные материалы лаборатории ЦМС имеют практически полное однообразие в ампликонах, при этом признак передается гибридам от опылителя без потерь. Однако, при гибридизации стерильной формы и опылителя сформировался новый вариант исследуемого признака с длиной 1400 п.н. (возможно, это результат дупликации имеющегося ранее у опылителя признака длиной 700 п.н.).

По локусу UVC278 (рис. 4) в материалах лаборатории ЦМС выявлено, что при гибридизации происходит передача полного набора исследуемого признака опылителя – кормовой белой свёклы, поскольку у всех гибридов присутствует полный набор ампликонов (600, 700, 1000 и 1200 п.н.), характерных для опылителя.

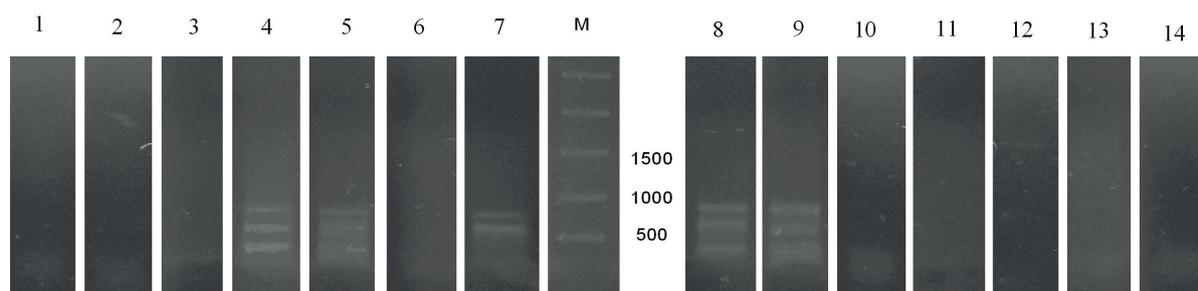


Рис. 2. Амплификация геномной ДНК растений свёклы праймером ОР-09. Обозначения: см. рис. 1.

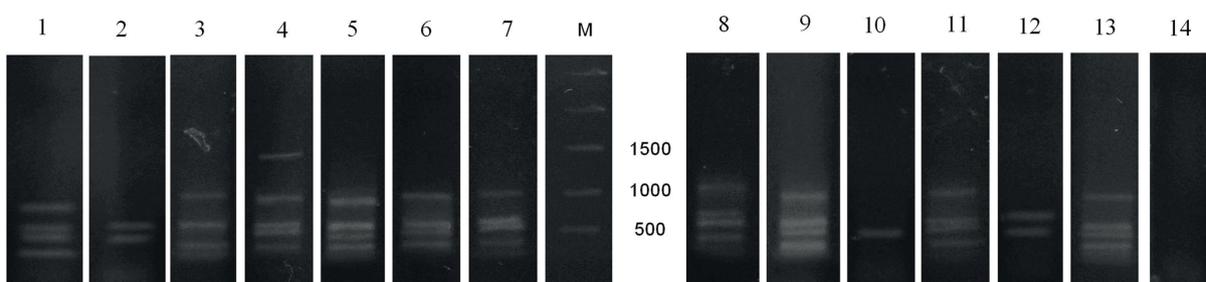


Рис. 3. Амплификация геномной ДНК растений свёклы праймером АВ6-15. Обозначения: см. рис. 1.

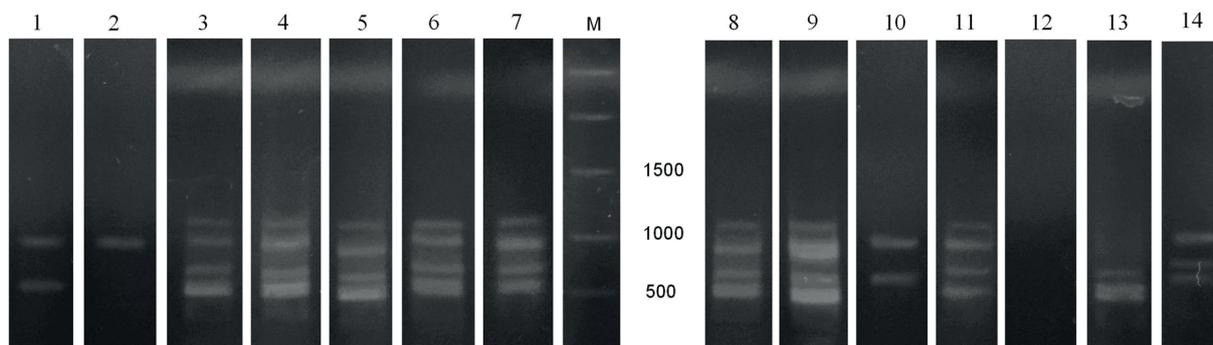


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК свёклы рода *Beta* праймером UVC278. Обозначения: см. рис. 1.

Общим для всех исследуемых образцов является ампликон в 1200 п.н. В исследуемых селекционных материалах лаборатории исходного материала обнаружено, что в ходе гибридизации сахарной и кормовой красной свёклы наблюдается частичное наследование признака, передаются только ампликоны 700 и 1000 п.н. У гибрида Портланд полностью отсутствует данный признак.

Большинство амплифицированных фрагментов оказались полиморфными и выявляли различия между изученными генотипами. При этом значительная часть выявленных аллелей относится к редким. Число фрагментов, амплифицируемых одним праймером, варьирует от 1 (ОР - AN 9) до 8 (АВ 9-3), что свидетельствует о высоком уровне полиморфизма рассматриваемых RAPD – локусов в соответствии с таблицей 1. По результатам ПЦР – амплификации составлены матрицы наличия (1) / отсутствия (0) дескриптов по 4 –м RAPD – праймерам.

На основании наличия /отсутствия выявленных ДНК-ампликонов рассчитаны генетические расстояния (евклидовы) между МС - растениями сахарной и кормовой свёклы, которые варьировали от 1,41 между гибридом Портланд и мужско-стерильной формой РС 8 до 4,8 между Оп и F₁ РС 1119 × Оп, Оп и РС 8; Оп и гибридом Портланд.

С использованием рассчитанных генетических расстояний построена дендрограмма генетических взаимоотношений между изученными селекционными материалами (рис. 5). Образцы с минимальными генетическими дистанциями вошли в один объединяющий кластер. Селекци-

онные номера с большими генетическими расстояниями находятся в разных кластерах. Исследованные образцы на дендрограмме образовали 5 объединяющих кластеров, куда вошли 10 селекционных номеров, 4 номера не вошли ни в один кластер. Селекционные материалы, находящиеся на большом генетическом расстоянии друг от друга, рекомендуются для проведения скрещиваний. Следует отметить существенные различия у апомиктической МС-формы МС-94 Ар (№8). Данный образец также находится обособленно на дендрограмме.

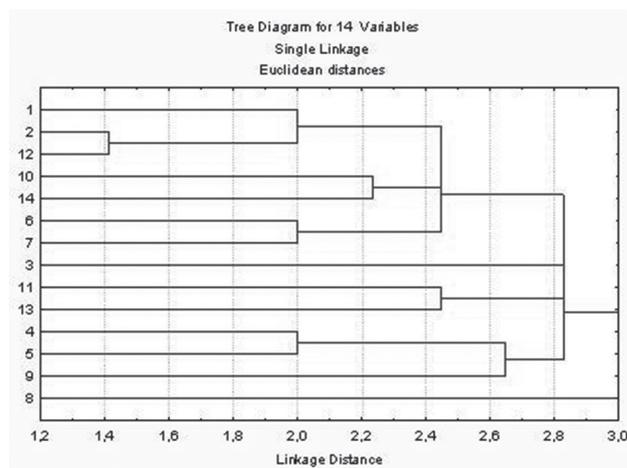


Рис. 5 Дендрограмма генетических дистанций селекционных образцов свёклы. Обозначения: см. рис. 1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований позволили сделать следующие выводы:

Таблица 1.

Матрица наличия/отсутствия дескриптов по 4 –м RAPD – праймерам

Локус	Селекционные образцы														Длина ампликона, п.н.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
АВ 3-3	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	600
	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	800
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1000
ОР 0-9	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	300
	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	600
	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	800
UVC 278	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	500
	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	600
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	700
	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1000
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1200
АВ 6-15	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	400
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	600
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	700
	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1000
	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1400

Таблица 2.

Генетические расстояния (евклидовы) между селекционными материалами свёклы

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0.00	2.00	3.46	4.12	4.36	2.83	3.16	3.00	3.46	2.83	3.46	2.45	3.16	3.32
2	2.00	0.00	3.74	4.36	4.80	3.16	3.46	3.32	4.00	2.45	4.00	1.41	3.74	2.65
3	3.46	3.74	0.00	3.00	3.00	2.83	2.83	3.32	3.74	3.16	2.83	3.74	3.16	3.61
4	4.12	4.36	3.00	0.00	2.00	3.61	3.32	3.16	2.65	4.12	3.00	4.36	3.32	4.47
5	4.36	4.80	3.00	2.00	0.00	3.87	3.32	3.74	3.00	4.36	3.00	4.80	3.32	4.69
6	2.83	3.16	2.83	3.61	3.87	0.00	2.00	3.32	3.74	2.45	3.16	3.46	3.16	3.00
7	3.16	3.46	2.83	3.32	3.32	2.00	0.00	3.00	3.46	2.83	3.46	3.74	3.46	3.32
8	3.00	3.32	3.32	3.16	3.74	3.32	3.00	0.00	3.32	3.32	3.61	3.32	4.12	3.46
9	3.46	4.00	3.74	2.65	3.00	3.74	3.46	3.32	0.00	4.00	3.16	4.24	2.83	4.36
10	2.83	2.45	3.16	4.12	4.36	2.45	2.83	3.32	4.00	0.00	3.46	2.45	3.16	2.24
11	3.46	4.00	2.83	3.00	3.00	3.16	3.46	3.61	3.16	3.46	0.00	4.00	2.45	3.87
12	2.45	1.41	3.74	4.36	4.80	3.46	3.74	3.32	4.24	2.45	4.00	0.00	3.74	3.00
13	3.16	3.74	3.16	3.32	3.32	3.16	3.46	4.12	2.83	3.16	2.45	3.74	0.00	3.87
14	3.32	2.65	3.61	4.47	4.69	3.00	3.32	3.46	4.36	2.24	3.87	3.00	3.87	0.00

Обозначения: 1) РС 1119, 2) РС 8, 3) (РС 1119 × Оп), 4) (РС 8 × Оп), 5) Оп – кормовая белая свёкла, 6) РС1119 × Оп, 7) РС 1119 × РФ 1119, 8) МС – 94 Ар, 9) кормовая красная свёкла, 10) МС 94 × Ар корм.красн., 11) Витязь, 12) Портланд, 13) Муррей, 14) Хамбер.

- Определена молекулярно-генетическая структура родительских форм: МС – растений сахарной, кормовой свёклы и гибридного потомства F₁ от их скрещивания по 4 – м произвольным RAPD – маркерам: ОР-09, АВ3-3, АВ6-15, UBC278, позволившая провести их идентификацию.

- Максимальный набор продуктов амплификации выявлен у опылителя - кормовой белой свёклы 600 и 800 п.н. по праймеру АВ 3-3. Отмечено, что данный локус не является доминирующим при передаче гибриднему потомству.

- По локусу ОР – 09 у апомиктичной МС формы (МС-94 Ар) и гибрида Витязь установлен одинаковый набор ампликонов 400, 600, 700, 1000 п.н., что свидетельствует об их генетическом сходстве.

- По RAPD- локусу АВ 6-15 селекционные материалы лаборатории ЦМС имеют полное однообразие в ампликонах. При гибридизации стерильной формы и опылителя сформировался новый вариант исследуемого признака длиной 1400 п.н.

- По результатам RAPD – анализа рассчитаны генетические расстояния изученных селекционных номеров, варьирующие от 1,41 у гибрида Портланд и РС 8 до 2,65 у генотипов кормовой белой свёклы (Оп) и гибрида МС – 94 Ар × кормовая красная свёкла; Оп и гибрида Витязь; кормовой белой свёклы и Портланд, позволившие осуществить их кластеризацию и подбор родительских пар для скрещиваний.

- Получены экспериментальные данные для разработки методики выявления трансгрессив-

ных форм свёклы на основе ДНК-маркеров, которые могут быть использованы при планировании скрещиваний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ванюшин Б.Ф. Метилирование ДНК ферментами как эпигенетический контроль генетических функций клетки / Б.Ф. Ванюшин // Биохимия. — 2005. — Т.70. — С. 488-499.
2. Соотношение между гетерозисом и трансгрессией / Г.А. Макарова, [и др.] // Материалы междунауч. научно-практич. конф. «Современные тенденции в селекции и семеноводстве овощных культур». — М. 2008. — Т.2. — С. 164-166.
3. Малецкий С.И. Эпигеномная и эпипластомная изменчивость у гаплоидных и дигаплоидных растений сахарной свёклы / С.И. Малецкий, Е.И. Юданова, Е.И. Малецкая // Сельскохозяйственная биология. — 2015. — Т.50. — №5. — 2015. — С. 579-589.
4. Корниенко А.В. Молекулярная селекция сахарной свёклы / А.В. Корниенко, А.К. Буторина // Сахарная свёкла. — 2014. — №1. — С. 12-15.
5. Entwicklung D.J. Charakterisierung und Kartierung von Mikrosatellitenmarkern bei Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.): Dissertation Doktors der Agrarwissenschaften / D.J. Entwicklung, — Gatersleben. 2001. — P. 100.
6. Characterisation of sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) varieties using microsatellite markers / M. Smulders [et al.] // BMC Genetics. — 2010. — P. 11-41.
7. Богачева Н.Н. Изучение генетического разнообразия селекционных материалов сахарной свёклы с использованием молекулярных марке-

Федулова Т. П., Федорин Д. Н., Богомолов М. А., Ошевнев В. П., Грибанова Н. П.

ров: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.- Рамонь, 2012. — 23 с.

8. Tagging of resistance genes to rhizomaniya disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) / A.R. Nouhi [et al.] // American Journal of Biotechnology. — 2008. — V.7, N.4. — P. 430-433.

9. A new RAPID marker for beet necrotic yellow vein virus resistance gene in *Beta vulgaris* / A.R.

Mesbah [et al.] // Biologia plantarum. — 2009. — V.53, V.1. — P. 112-119.

10. RFLP markers for sugar beet breeding: chromosomal linkage maps and location of major genes for rhizomania resistance, monogerm and hypocotyls colour / E. Barzen [et al.] // Plant J. — 1992. — 2. — P.601-611.

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

*Федулова Т. П., заведующая лабораторией биохимии и молекулярной биологии
Тел. 89030307959
E-mail: biotechnologiya@mail.ru*

Богомолов М. А., заведующий лабораторией исходного материала

Ошевнев В. П., зав. лабораторией ЦМС.

Грибанова Н. П., ведущий научный сотрудник лаборатории ЦМС.

*Воронежский государственный университет
Федорин Д. Н., доцент кафедры биохимии и физиологии клетки,
Тел.: (473) 22-88-77
E-mail: rybolov@mail.ru*

All-Russian Research Institute for sugar beet and sugar, A.L. Mazlumov

*Fedulova T. P., Head of the Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology,
Ph.: 89030307959
E-mail: biotechnologiya@mail.ru*

Bogomolov M. A., Head of the Laboratory of the raw material

Oshevnev V. P., Head of the Laboratory of CMS

Gribanova N.P., Leading Research Laboratory of CMS

*Voronezh State University
Fedorin D. N., associate professor, dept. of biochemistry and cell physiology,
Ph.: (473) 22-88-77
E-mail: rybolov@mail.ru*