

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОРТООБРАЗЦОВ СВЁКЛЫ РОДА *BETA*

Т. П. Федулова<sup>1</sup>, Д. Н. Федорин<sup>2</sup>, М. А. Богомолов<sup>1</sup>, В. П. Ошевнев<sup>1</sup>, Н. П. Грибанова<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 17.03.2017 г.

**Аннотация.** Представлены результаты молекулярно-генетической оценки перспективных селекционно-ценных материалов сахарной, кормовой белой, кормовой красной свёклы и гибридов на их основе. Установлена генетическая изменчивость селекционных материалов сахарной, кормовой свёклы и гибридов с их участием, характеризующаяся полиморфизмом по 5-ти SSR-маркерам. Показана возможность использования микросателлитных локусов в селекционном процессе сахарной свёклы

**Ключевые слова:** свёкла сахарная, кормовая, SSR-маркеры, аллель, праймеры, локус, генетический полиморфизм

**Abstract.** The results of molecular-genetic assessment of perspective valuable breeding materials of sugar, white fodder and red fodder beet and hybrids produced on their basis are presented. Genetic variability of breeding materials of sugar beet, fodder beet and hybrids produced with their participation that is characterized by polymorphism in 5 SSR-markers has been determined. Possibility of using microsatellite loci in sugar beet breeding process has been shown.

**Keywords:** sugar beet, fodder beet, SSR-markers, allele, primers, locus, genetic polymorphism

При создании новых сортов и гибридов сельскохозяйственных культурных растений актуальной проблемой является разработка принципов создания трансгрессивных форм с прогнозируемой степенью превосходства над исходными сортами. Существующие селекционные технологии при этом малоэффективны и часто базируются на длительном и малопродуктивном методе проб и ошибок. Среди сформировавшихся в эволюции генетических механизмов повышения продуктивности ведущее положение занимают гетерозис и трансгрессии. Несмотря на своё исключительно большое эволюционное и селекционное значение, эти феномены недостаточно активно используются в селекции. Причина такого несоответствия между значимостью и востребованностью гетерозиса и трансгрессии состоит в неполном раскрытии их генетической природы, что привело к от-

сутствию корректных методов прогноза и оценки [1]. Современные представления о генетических механизмах гетерозиса и трансгрессии почти не изменились за последнее столетие. Версия чрезвычайной редкости формирования селекционно-ценных трансгрессий возникла и получила широкое распространение под влиянием постулата полигенной структуры количественных признаков [2]. Дополнительным фактором, сдерживающим практическое использование трансгрессий, является отсутствие эффективных методов оценки их формирования и наследования. Одним из надёжных и перспективных методов выявления и оценки трансгрессий может являться использование молекулярно-генетических маркеров.

Наиболее подходящими и востребованными для селекционных целей оказались микросателлитные (SSR) маркеры. С их помощью можно проводить отбор по генотипу, тогда как в традиционной селекции отбор индивидуумов для скрещивания осуществляется на основе анализа феноти-

© Федулова Т. П., Федорин Д. Н., Богомолов М. А., Ошевнев В. П., Грибанова Н. П., 2017

па. Анализ ряда важных хозяйственных признаков растений проводится после стадии развития, по которой может быть осуществлена гибридизация, поэтому скрещивание отобранных образцов проводится уже в следующий вегетационный период [3]. При использовании SSR-маркеров можно подобрать подходящие пары и осуществить трансгрессивную гибридизацию в текущем поколении. Благодаря этим преимуществам применение молекулярных маркеров стало неотъемлемой частью селекционного процесса во многих странах мира [4, 5, 6]. Так, иностранными авторами Simko, Eujal, e.a., [7] проведено генотипирование 54 гибридов сахарной свеклы пяти семенных компаний с помощью 702 ДArT, 345 SNP и 30 маркеров SSR. Наивысшая степень успешности была для SSR-маркеров и самая низкая для маркеров ДArT-ДНК-технологии для изучения генетического разнообразия. Авторами отобраны тип и количество маркеров, необходимых для анализа генетического разнообразия гибридов сахарной свеклы и использования в практической селекции.

Белорусскими учёными 15 SSR-маркеров были использованы для оценки генетического разнообразия 29 линий сахарной свёклы [8]. На основании полученных данных сделан вывод о возможности генетической паспортизации диплоидных линий сахарной свёклы с использованием 7 и более микросателлитных маркеров.

Обобщение частотных характеристик идентифицированных аллельных вариантов SSR-локусов в выборке украинских линий сахарной свёклы позволило выявить различное селективное влияние на исследованные микросателлитные локусы *Bvm 3*, *Bvm 4* *GZM 017* подверженные отбору в отличие от аллелей локусов *GZM 086* и *GZM 058* [9].

Украинскими учёными проведено исследование молекулярно-генетического полиморфизма рода *Beta L.*, установлена генетическая изменчивость и подтверждены филогенетические взаимоотношения в пределах данного рода [10]. На молекулярном уровне доказано существующее ранее представление о происхождении культурного вида свёклы *Beta vulgaris L.* от дикого вида *Beta maritima*. Вместе с тем, исследования по выявлению трансгрессивных форм свеклы рода *Beta* на основе ДНК-маркеров в России не проводятся, и поэтому является актуальными.

Исходя из вышеизложенного, цель исследований заключалась в выявлении полиморфизма SSR-маркеров, характеризующих генетическую

изменчивость селекционных материалов свёклы рода *Beta* для использования в трансгрессивной селекции.

### 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, предоставленные лабораториями исходного материала и ЦМС.

Геномную ДНК выделяли из 0.2 г зеленых листьев растений свёклы с помощью коммерческого набора Проба-ГС 100 (ВГУП НИИ Эпидемиологии, Россия) согласно инструкции производителя. Качество выделенной ДНК определяли электрофорезом в 1 % агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Полученную ДНК растворяли в 10мМ трис-НСl-буфера, рН 8.0, содержащем 0,1мМ ЭДТА и использовали для ПЦР-анализа. ПЦР-анализ с микросателлитными праймерами *Sb04*, *Sb06*, *Sb07*, *Sb09*, *Sb10* проводили в амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия). Параметры амплификации были следующие: предварительная денатурация при 95°C в течение 5 минут, затем 35 циклов 95°C – 30с., 54°C – 30с., 72°C – 30с. и финальный этап элонгации цепи 72°C - 1мин. Для выявления полиморфизма и генетической структуры родительских форм сахарной, кормовой свёклы и их гибридов использовали 5 SSR-праймеров серии *Sb*: *Sb 04*, *Sb06*, *Sb07*, *Sb09*, *Sb10* [11]. Характеристика использованных праймеров представлена в таблице 1.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Молекулярные (или ДНК) маркеры – это новое поколение генетических маркеров, отличающихся от прежних большим количеством и частой встречаемостью в геномах эукариот и основанных на универсальных, а значит широко востребованных и постоянно развивающихся методах анализа. Целесообразным и экономически оправданным оказалось использование ДНК - маркеров в прикладных областях, в частности в селекции [12]. Еще в первые десятилетия развития генетики стало ясно, что генетические маркеры могли быть полезными при анализе сложных признаков. Однако низкая встречаемость и ряд других недостатков не позволили классическим генетическим маркерам, а в последствии и белковым широко войти в селекционную практику.

Таблица 1.

Характеристика микросателлитных локусов

Праймер	Последовательность	Число наблюдаемых аллелей	Диапазон размеров аллелей (bp)	Лейтмотив ядра	Значение PIC
SB04	Форвард: 5'-ACC GAT CAC CAA TTC ACC AT-3'	6	172–187	(GGA) <sub>4</sub>	0.771
	Реверс: 5'-GTT TTG TTT TGG GCG AAA TG-3'				
SB06	Форвард: 5'-AAA TTT TCG CCA CCA CTG TC-3'	8	144–168	(CTT) <sub>6</sub>	0.682
	Реверс: 5'-ACC AAA GAT CGA GCG AAG AA-3'				
SB07	Форвард: 5'-TGT GGA TGC GCT TTC TTT TC-3'	6	246–276	(TC) <sub>10</sub>	0.724
	Реверс: 5'-ACT CCA CCC ATC CAC ATC AT-3'				
SB09	Форвард: 5'-TGC ATA AAA CCC CCA ACA AT-3'	2	129–132	(CAT) <sub>7</sub>	0.354
	Реверс: 5'-AGG GCA ACT TTG TTT TGT GG-3'				
SB10	Форвард: 5'-TTC GTC CCT TGA TTG TGT CA-3'	2	193–197	(GAT) <sub>6</sub>	0.325
	Реверс: 5'-GAG ATT GGG GAT CAC TCT GC-3'				

Поскольку различие длин аллелей микросателлитных локусов определяется числом повторяющихся единиц, представляющих собой ди-, три-, тетра-, пента-, и гексануклеотиды, то при выборе праймеров мы учитывали, чтобы амплифицируемые фрагменты были небольшой длины (не более 300 п.н.). В этом случае повышается надёжность идентификации аллельных вариантов, различающихся небольшим количеством повторов. По исследуемым парам праймеров для каждого исследуемого генотипа выявлен определённый набор фрагментов, отличающий его от других образцов.

Анализ результатов ПЦР геномной ДНК образцов свёклы №1015 (РС 1119), 16055 (F<sub>1</sub> РС 1119 ОП - кормовая белая) и №1054 (ОП - кормовая белая) показал, что гибрид №16055 имеет сходство с родительскими формами в плане наследования ампликонов, обусловленных праймерами Sb04, Sb06, Sb07, Sb09 (рис.1).

Установлено, что данный гибрид имеет характерный ДНК-фрагмент, свойственный только ему, проявляемый при амплификации с праймерами Sb10 длиной более 3 т.п.н. Появление в гибриде ДНК-ампликона, отличного от родительских

форм, может быть вызвано формированием генетического материала при гибридизации путем комбинации родительских ДНК. Гибрид №16054 (F<sub>1</sub> РС 8 x №1054 (ОП-кормовая белая) имеет абсолютное сходство с МС - формой №1009 (РС 8) в плане наследования ДНК-фрагментов (рис.2). При этом ампликоны, обусловленные праймерами Sb06 и Sb09, имеют такое же проявление и у отцовской формы №1054 ОП-кормовая белая. Гибрид №16054 унаследовал от материнской формы №1009 два ДНК-фрагмента 200 и 300 п.н, обусловленных праймерами Sb04 и Sb07.

В результате амплификации геномной ДНК образцов свёклы гибрида F<sub>1</sub> Шериф и кормовая белая выявлено, что родительские формы Шериф и кормовая белая характеризуются разнородностью продуктов амплификации со всеми используемыми праймерами (рис.3).

По локусам Sb04 и Sb09 выявлен одинаковый продукт амплификации размером 150 п.н. Для отцовской формы - кормовая белая по микросателлитному локусу Sb07 характерен отличительный вариант ампликона размером 250 п.н., отсутствующий у образца Шериф. Для гибрида Шериф x кормовая

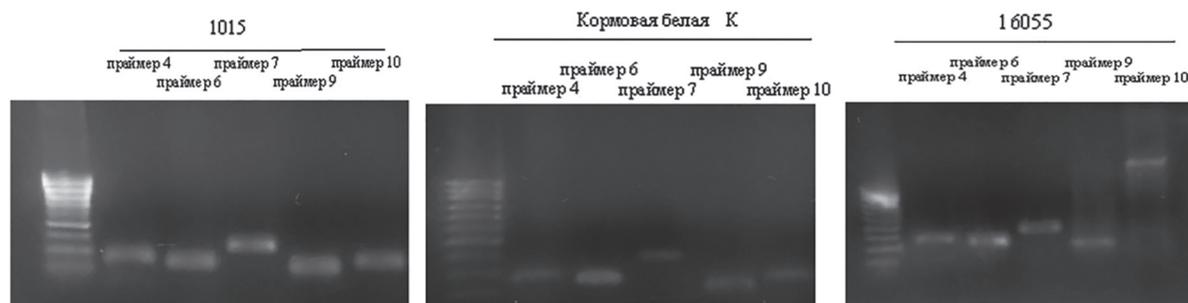


Рис. 1. Амплификация геномной ДНК образцов свёклы №1015, 16055 и Кормовая белая. Слева представлены маркеры молекулярных масс ДНК GeneRuler™ (Thermo Scientific, США): снизу вверх – 100- 1000 п.н. Обозначения: №1015 (РС 1119); №1054 (ОП - Кормовая белая); 16055 (F<sub>1</sub> РС 1119 x №1054 (ОП - Кормовая белая)).

белая характерно отличие в наборе генетического материала от родительских форм, в частности, признак, обусловленный праймерами Sb06, переданся ему от родительской формы Шериф. Установлено отсутствие проявления ДНК – фрагментов для праймеров Sb07 и Sb10, что тоже, вероятно, обусловлено передачей от родителя Шериф. Его отсутствие может быть результатом потери части генетического материала при гибридизации. Специфичный фрагмент 250 п.н. образца кормовая белая по праймеру Sb07 при гибридизации не был передан гибриду.

В результате амплификации геномных ДНК растений свёклы с праймерами Sb04 и Sb06, было

установлено, что все растения, как гибрид, так и родительские формы, имеют ПЦР-продукты сходной длины размером 150 п.н., что свидетельствует об однородности родительских форм по данному признаку и передаче его в гибридном поколении (рис.4).

При этом у каждой из родительских форм наблюдается признак, обусловленный наличием ДНК последовательности к Sb07, Sb09 и Sb10, сходный для обоих родителей. Однако в гибриде данные ПЦР-анализа свидетельствуют об их отсутствии, что, вероятно связано с потерей при передаче генетического материала.

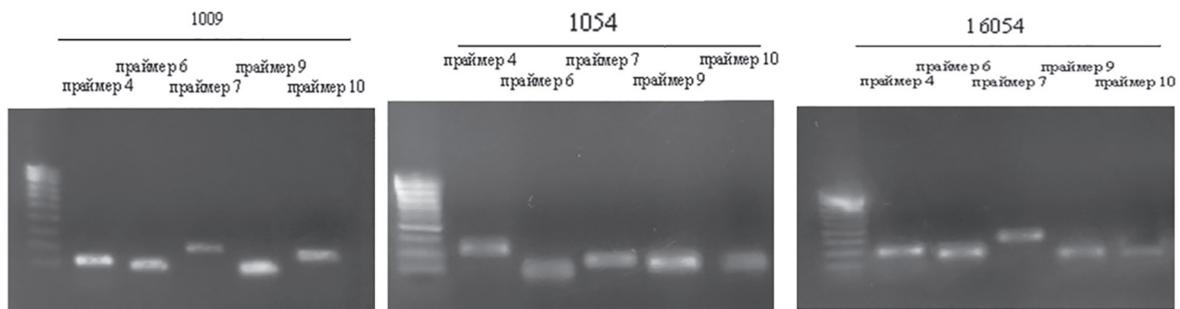


Рис. 2. Амплификация геномной ДНК свёклы. Обозначения: №1009-РС 8; №1054-ОП-кормовая белая; № 16054- F1 РС 8 x №1054 (ОП-кормовая белая).

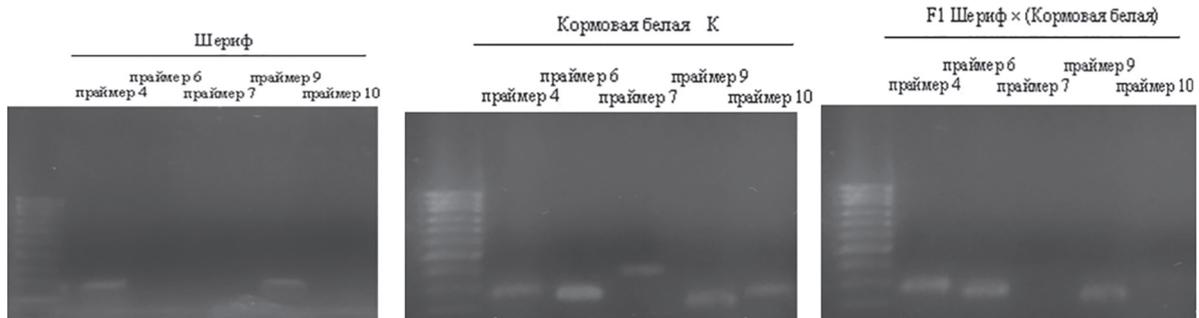


Рис. 3. Амплификация геномной ДНК образцов свёклы Шериф, Кормовая белая и гибрида Шериф Кормовая белая.

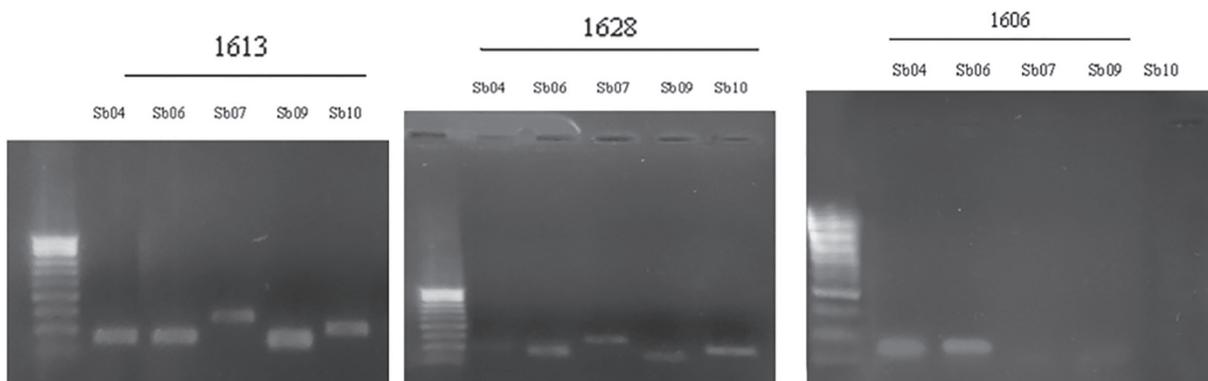


Рис. 4. Амплификация геномной ДНК гибрида №1606, родительских форм №1613 и №1628 с затравками Sb04, Sb06, Sb07, Sb09, Sb10. Обозначения: №1613- МС-2113; №1628-ОП-кормовая красная; №1606 - F<sub>1</sub> МС-2113 x №1628-ОП-кормовая красная

Анализ результатов ПЦР образцов №1606, №1613 и №1628 свидетельствует о частичном сходстве генетического материала гибрида и родительских форм, о чем свидетельствует продукт длиной 150 п.н. для Sb04 и Sb06. При этом нет четкой корреляции в передаче данной ДНК последовательности при скрещивании, т.к. наблюдается потеря части генетического материала родительских форм.

Для образцов №1601, 1602, 1603, 1604, 1606, 1607 характерна высокая гетерогенность продуктов амплификации с применяемыми праймерами для данного ПЦР-анализа. Отличительный характер амплификации наблюдается для образца №1601, у которого проявляется только один ампликон с праймером 4, что может быть его селективным признаком.

В результате ПЦР-анализа 20-ти селекционных номеров свёклы выявлено, что наименьшей полиморфностью обладает праймер Sb 06. При амплификации геномной ДНК всех исследуемых материалов свёклы был получен только один ПЦР-продукт длиной около 150 п.н. Следовательно, данный праймер не может быть использован в селекции для идентификации образцов свёклы. Праймер Sb10 показал наибольшую полиморфность, поскольку в разных образцах ДНК он имел продукт разной длины. В частности, он является специфичным при определении гибрида №16055, поскольку с его ДНК образуется уникальный ампликон длиной более 3000 п.н, что является селективным признаком для данного образца свёклы. Праймеры Sb06, Sb07, Sb09 имеют разную степень полиморфности в разных образцах ДНК свеклы, при этом не обнаруживается какой-либо определенной зависимости, как селективного признака, для всех исследуемых образцов. Вместе с тем, данные исследования требуют своего продолжения в плане увеличения количества используемых SSR-локусов и проведения фрагментного анализа ДНК.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований определена молекулярно-генетическая структура родительских форм: МС – растений сахарной, кормовой свёклы и гибридного потомства F<sub>1</sub> от их скрещивания по 5-ти SSR-маркерам: Sb04, Sb06, Sb07, Sb09 и Sb10, позволившая провести их идентификацию. Выявлены специфические ПЦР – продукты длиной более 3 т.п.н. в гибридном образце свёклы №16055 по локусу Sb10, что от-

личает его от других генотипов и может служить генетическим маркером для идентификации. Гибрид №16054 унаследовал от материнской формы №1009 два ДНК-фрагмента 200 и 300 п.н, обусловленных праймерами Sb04 и Sb07.

В результате ПЦР-анализа 20-ти селекционных номеров свёклы выявлено, что наименьшей полиморфностью обладает праймер Sb 06. При амплификации геномной ДНК всех исследуемых материалов свёклы был получен только один ПЦР-продукт длиной около 150 п.н. Праймер Sb10 показал наибольшую полиморфность, поскольку в разных образцах ДНК он имел продукт разной длины.

Таким образом, молекулярно-генетическая оценка селекционных образцов свёклы представляет научный и практический интерес для осуществления генетической паспортизации, защиты авторских прав селекционеров и подбора родительских пар для скрещиваний.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Методология прогнозирования трансгрессий по хозяйственно-ценным признакам растений / Г.В. Макарова [и др.]. — Методические рекомендации. — СПб., 2009. — С.4-31.
2. Tatebe T. Studies on the heritage of root schape in the Japanese and Chinese radish / T. Tatebe // J.Hortic Soc.Japan. - 1937. - № 8. - P.336.
3. Сатина Т.Г. Технология генотипирования на основе микросателлитного анализа в селекции рапса (*Brassica L.*) / Т.Г. Сатина // Автореф. дисс. канд. биол. наук. — Москва, 2010. — 21 с.
4. Mumm M. Molecular plant breeding as the foundation for 21 century crop improvement / M. Mumm // Plant Physiol. — 2008. — V.147. — P. 969-977.
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. SNP and SSR marker – systems for genotyping, clustering, and assigning sugar beet hybrid varieties in to populations / I. Simko, I.Eujal, van T.J. Hintun // J. Plant Science. — 2012. — P. 54-62.
8. Использование микросателлитных ДНК-маркеров для молекулярной идентификации ли-

ний и гибридов сахарной свеклы / А.М. Свищевская [и др.] // Инновации в свеклосахарном производстве: Сб. науч. трудов, посвященный 90-летию ГНУ ВНИИСС Россельхозакадемии. – Воронеж. — 2012. — С. 52-59.

9. Кляченко О.Л. Изучение аллельного состояния микросателлитных локусов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) / О.Л. Кляченко, Л.М. Присяжнюк // Живые и биокосные системы. — 2014. — №8. — 7с.

10. Исследование молекулярно-генетического полиморфизма рода *Beta* L. С помощью полиме-

разной цепной реакции / Н.В. Роик [и др.]. - Киев, 2007. — 26 с.

11. Polymorphic microsatellite markers for inferring diversity in wild domesticated sugar beet (*Beta vulgaris* L.) / С.М. Richards [et al.] // Molecular Ecology Notes. — 2004. — 4. — P.243-245.

12. Хлёткина Е.Н. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях в селекции / Е.Н. Хлёткина // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2013. — Т.17. -№4/2. — С.1044-1054.

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

Федулова Т. П., д. б. н., заведующая лабораторией биохимии и молекулярной биологии, »

Тел.: +7 (47340) 5-33-27

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

Богомолов М. А., д.с.-х.н., заведующий лабораторией исходного материала

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

Ошевнев В. П., д.с.-х.н., заведующий лабораторией ЦМС

Грибанова Н. П., к.с.-х.н., ведущий научный сотрудник лаборатории ЦМС

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет»

Федорин Д. Н., к.б.н., доцент кафедры физиологии и биохимии клетки

Тел. +7 910 288-45-10

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

Federal State Budgetary Scientific Institution “The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar”

Fedulova T. P., PhD, Head of the Laboratory of biochemistry and molecular biology,

Ph.: +7 (47340) 5-33-27

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

Bogomolov M. A., PhD, Head of the Laboratory of starting material

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

Oshevnev V. P., PhD, Head of the CMS laboratory,

Gribanova N. P., PhD, leading research officer of the CMS laboratory

Voronezh State University

Fedorin D. N., PhD, associate professor of the Department of physiology and biochemistry of the Cell

Ph.: +7 910 288-45-10

E-mail: [rybolov@mail.ru](mailto:rybolov@mail.ru)