

ИННОВАЦИОННЫЕ ПРИЕМЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ СЕЛЕКЦИИ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Н.Н. Богачева, кандидат биологических наук, **Т.П. Федулова**, доктор биологических наук,
А.А. Налбандян, кандидат биологических наук

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

Проведен молекулярно-генетический отбор родительских линий сахарной свеклы для гибридизации. Представлены результаты молекулярной оценки исходных линий по микросателлитным маркерам. Объектом исследования были растения мужскостерильных линий и линий многосемянных опылителей. В результате исследования полиморфизма 12 микросателлитных маркеров отобраны 2 пары праймеров: Bv_v 30 + Bv_v 64 и Bv_v 23 + Bv_v 32 как наиболее информативных для выявления гетерогенности исходного материала и эффективных для прогнозирования гетерозиса. ПЦР-анализ 12 исходных линий сахарной свеклы с этими парами микросателлитных праймеров позволил определить специфические ДНК-профили для селекционного материала. Выявлены генетические расстояния и проведен кластерный анализ, позволившие дифференцировать изученные сортообразцы на кластеры в зависимости от генетического родства. Рекомендованы родительские формы для скрещиваний с целью создания высокопродуктивных гибридов. Установлено, что скрещивание линий, наиболее генетически отдаленных друг от друга, играет важную роль в проявлении эффекта гетерозиса у гибридов. Гибридные комбинации с генетическим расстоянием менее 1,41 целесообразно исключать из дальнейшего изучения в связи с низкой продуктивностью. Представленные результаты исследований имеют значение для практической селекции сахарной свеклы при создании гетерозисных гибридов.

INNOVATION METHODS OF *Beta vulgaris* L. MOLECULAR BREEDING

Bogacheva N.N., Fedulova T.P., Nalbandyan A.A.

*The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar,
396030, Voronezhskaya oblast, Ramonsky ryion, p. VNIISS, 86
E-mail: arpnal@rambler.ru*

Molecular-genetic selection of sugar beet parental lines for hybridization has been performed. The results of molecular evaluation of sugar beet initial lines using microsatellite markers are presented. Object of the investigations are plants of male sterile lines and lines-multigerm pollinators. The investigations of polymorphism of 12 microsatellite markers have resulted in selection of 2 primer pairs – Bv_v 30 + Bv_v 64 and Bv_v 23 + Bv_v 32 – as the most informative to reveal heterogeneity of starting material and effective to forecast heterosis. The PCR-analysis of 12 sugar beet initial lines with these pairs of microsatellite primers has allowed determination of specific DNA-profiles for breeding material. Genetical distances have been determined, and the cluster analysis has been performed that allow differentiation of the studied varieties between clusters depending on genetical relationship. Parental forms are recommended for crosses to produce highly productive hybrids. It has been revealed that crossbreeding of the lines being the most distantly related genetically plays an important part in exhibiting heterosis effect in hybrids. It is advisable to exclude hybrid combinations with genetical distance less than 1.41 from further studying in connection with low efficiency. The investigations results presented are important for sugar beet practical breeding when producing heterosis hybrids.

Ключевые слова: сахарная свекла, ПЦР-анализ, микросателлитные праймеры, генетические расстояния, гетерозис, урожайность, полиморфизм

Key words: sugar beet, PCR-analysis, microsatellite primers, genetic distances, heterosis, yield, polymorphism

Для получения гибридов сахарной свеклы с выраженным гетерозисным эффектом в схемах скрещиваний необходимо использовать генотипы с высокой комбинационной способностью, которая часто связана со степенью их генетической дивергенции. Если ранее такой отбор исследователи проводили с помощью анализа фенотипических признаков, то в настоящее время – с использованием молекулярно-генетических маркеров [1]. Молекулярные маркеры становятся неотъемлемым элементом селекционного процесса для быстрого и эффективного отбора нужных генотипов растений. Для оценки генетического разнообразия селекционного материала широко используют ДНК-маркеры, в частности микросателлиты (SSR), для

которых характерна высокая информативность [2, 3-5]. SSR-метод позволяет выявить полиморфизм tandemно организованных повторов ДНК (сателлитов). Длина повторяющейся единицы микросателлитных ДНК составляет менее 10 п.н. (пар нуклеотидов). Длина повторов сателлитных ДНК не имеет каких-либо ограничений и варьирует от 2 до нескольких сотен п.н. [6].

Наиболее перспективный подход при получении высокопродуктивных гибридов сахарной свеклы – использование комплекса методов молекулярного анализа, основанных на анализе полиморфизма ДНК, которые позволяют сгруппировать изучаемый материал по степени генетического родства [7, 8]. Так, иранские ученые провели оценку генетического разнообразия

168 генотипов (пыльцевого родителя и мужскостерильной формы) с помощью 18 SSR-маркеров и агроморфологических характеристик. Кластерный анализ, основанный на этих SSR-маркерах, четко дифференцировал 112 растений, принадлежащих отцовскому родителю и 56 – материнскому. Изученные SSR-маркеры оказались эффективны и надежны для оценки генетического разнообразия родителей при скрещивании [9]. Сербские ученые изучали влияние генов и пропорциональный вклад генотипов родителей в наследование урожая корнеплодов и содержание сахара в диплоидных гибридах сахарной свеклы [10].

Таким образом, большое практическое значение имеет создание надежных способов ускоренного подбора родительских пар с высокой специфической комбинационной способностью на основе молекулярного маркирования, что позволит значительно экономить затраты времени и материальных средств при создании высокопродуктивных гибридов сахарной свеклы.

Методика. В 2015-2017 гг. изучали растения сахарной свеклы – родительские формы: мужскостерильные линии и многосемянные опылители (МС 1134, МС 1141, МС 1117, МС1113, МС 1131, МС 1137, ОП 1165, ОП 1187, ОП 1180, ОП 1203, ОП 1172, ОП 1195), предоставленные зав. лабораторией селекции сахарной свеклы на стерильной основе В.П. Ошевневым. Выделение геномной ДНК из растительной ткани осуществляли фенол-хлороформным методом [11,12]. Качество выделенной ДНК определяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Полученную ДНК растворяли в 10 мМ трис-НСl-буфера, рН 8,0, содержащем 0,1 мМ ЭДТА и использовали для ПЦР-анализа. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на амплификаторе «Genius» (Великобритания). Использовали следующие праймеры: Bvv 23, Bvv 30, Bvv 32, Bvv 64 [13]. Величину истинного гетерозиса вычисляли по формуле: $G_{ист.} = (F_1 - P_n) / P_n \times 100 \%$, где $G_{ист.}$ – истинный

Табл.1. Генетические формулы селекционного материала

Селекционный материал	Генетическая формула	Матрица бинарных признаков
МС 1134	C ₁ C ₀ C ₀ D ₀ D ₀	10000
МС 1141	C ₁ C ₀ C ₀ D ₀ D ₀	10000
МС 1117	C ₀ C ₀ C ₀ D ₀ D ₀	00000
МС1113	C ₀ C ₀ C ₀ D ₁ D ₁	00011
МС 1131	C ₀ C ₀ C ₀ D ₁ D ₁	00011
ОП 1165	C ₁ C ₁ C ₀ D ₀ D ₁	11001
ОП 1187	C ₁ C ₀ C ₀ D ₁ D ₁	10011
ОП 1180	C ₁ C ₀ C ₀ D ₁ D ₁	10011
ОП 1203	C ₁ C ₀ C ₀ D ₀ D ₁	10001
МС 1137	C ₁ C ₁ C ₀ D ₀ D ₁	11001
ОП 1172	C ₁ C ₁ C ₀ D ₁ D ₁	11011
ОП 1195	C ₁ C ₀ C ₁ D ₁ D ₁	10111

Примечание. Соответствие праймеров и букв латинского алфавита, используемых для записи полученных полиморфных фрагментов: А – фрагменты ДНК, выявленные с помощью пары праймеров: С – (Bvv 30 + Bvv 64), D – (Bvv 23 + Bvv 32). Нижним индексом обозначено наличие (1) или отсутствие (0) фрагмента на электрофореграмме.

гетерозис (%); F₁ – значение изучаемого признака у гибридов первого поколения; P_n – значение признака у растений лучшей родительской формы [14]. Математическая обработка результатов проведена с применением программы Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение. Ранее мы провели молекулярно-генетические исследования по выявлению полиморфизма селекционных линий сахарной свеклы с использованием микросателлитных маркеров [15]. Дальнейшее изучение полиморфизма данных 12 микросателлитных маркеров позволило отобрать 2 пары праймеров: Bvv 30 + Bvv 64 и Bvv 23 + Bvv 32 как наиболее информативных для выявления гетерогенности исходного материала и эффективных для прогнозирования гетерозиса. С помощью ПЦР-анализа 12 исходных линий этой культуры с данными парами

Табл. 2. Генетические расстояния между исходными линиями сахарной свеклы

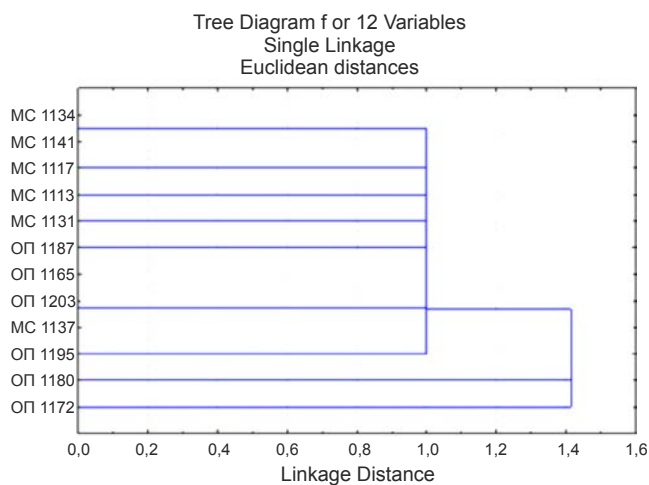
Селекционный материал	Генетическое расстояние											
	МС 1131	МС 1134	МС 1141	МС 1113	МС 1137	МС 1117	ОП 1203	ОП 1195	ОП 1187	ОП 1180	ОП 1172	ОП 1165
МС 1131	0	0	1,00	1,41	1,73	1,41	1,00	1,73	1,41	1,41	1,41	1,41
МС 1134	0	0	1,00	1,41	1,73	1,41	1,00	1,73	1,41	1,41	1,41	1,41
МС 1141	1,00	1,00	0	1,00	1,41	1,73	1,41	2,00	1,73	1,73	1,73	1,73
МС 1113	1,41	1,41	1,00	0	1,00	1,41	1,00	1,73	1,41	1,41	2,00	1,41
МС 1137	1,73	1,73	1,41	1,00	0	1,73	1,41	2,00	1,73	1,73	1,73	1,00
МС 1117	1,41	1,41	1,73	1,41	1,73	0	1,00	1,73	0	0	2,00	1,41
ОП 1203	1,00	1,00	1,41	1,00	1,41	1,00	0	1,41	1,00	1,00	1,73	1,00
ОП 1195	1,73	1,73	2,00	1,73	2,00	1,73	1,41	0,00	1,73	1,73	2,24	1,73
ОП 1187	1,41	1,41	1,73	1,41	1,73	0	1,00	1,73	0	0	2,00	1,41
ОП 1180	1,41	1,41	1,73	1,41	1,73	0	1,00	1,73	0	0	2,00	1,41
ОП 1172	1,41	1,41	1,73	2,00	1,73	2,00	1,73	2,24	2,00	2,00	0	1,41
ОП 1165	1,41	1,41	1,73	1,41	1,00	1,41	1,00	1,73	1,41	1,41	1,41	0

микросателлитных праймеров выявлены специфические ДНК-профили для селекционного материала – всего от 1 до 3 аллелей на пару локусов для индивидуальных генотипов. При проведении молекулярно-генетического анализа исследованных исходных родительских линий обнаружено 27 ампликонов.

Аллельные варианты, выявленные в 4 микросателлитах, комбинируются в исследованных генотипах с диапазоном частот 0,08-0,75. На основе данных ПЦР-анализа составлены молекулярно-генетические формулы для идентификации исходного материала сахарной свеклы (табл. 1).

Результаты ПЦР-анализа с праймерами Bvv 23, Bvv 30, Bvv 32, Bvv 64 использовали для определения уровня дивергенции между исследованными линиями методом кластеризации. На основе полученных данных рассчитаны генетические расстояния (евклидовы) между образцами, которые варьировали от 0 до 2,24 (табл.2).

Значения генетических расстояний между опылителями варьировали от 0 до 2,24, между мужскостерильными линиями – от 0 до 1,73. Наименьшие генетические расстояния (D=0-1,0) выявлены для комбинаций скрещивания MC 1117 x ОП 1180, MC 1117 x ОП 1187, MC 1131 x ОП 1203, MC 1134 x ОП 1203, MC 1113 x ОП 1203, MC 1137 x ОП 1165 и MC 1117 x ОП 1203. Наибольшие генетические расстояния (D=1,73-2,0) определены для родительских пар MC 1117 X ОП 1195, MC 1134 X ОП 1195, MC 1131 X ОП 1195, MC 1137 X ОП 1187, MC 1137 X ОП 1195, MC 1141 X ОП 1195 и др. Весь материал образовал два кластера (рис.): в первый вошли многосемянные опылители № 1180 и № 1172, во второй – мужскостерильные линии №№



Дендрограмма генетических расстояний между линиями сахарной свеклы на основе SSR-анализа с праймерами Bvv 23, Bvv 30, Bvv 32, Bvv 64.

1134, 1117, 1113, 1141, 1131, 1137 и многосемянные опылители №№ 1195, 1165, 1203, 1187 [15].

Процент прогноза успешного получения гетерозисных гибридов по максимальным генетическим дистанциям (D=1,73-2,0) на основе данных SSR-анализа с этими 4 праймерами составляет 42,86. Гибриды с наибольшей величиной истинного гетеро-

Табл. 3. Уровень проявления гетерозиса у пробных гибридов

Комбинация скрещивания	Урожайность корнеплодов у гибридов F ₁ , т/га	Истинный гетерозис, Г _{ист} , %
MC 1117 x ОП 1180	32,8	-0,69
MC 1117 x ОП 1187	30,90	-0,07
MC 1131 x ОП 1203	38,22	0,16
MC 1134 x ОП 1203	37,59	-1,49
MC 1113 x ОП 1203	30,83	-19,20
MC 1137 x ОП 1165	35,19	3,10
MC 1117 x ОП 1203	34,66	-9,17
MC 1131 x ОП 1187	37,29	6,66
MC 1131 x ОП 1180	39,79	13,81
MC 1131 x ОП 1172	32,70	-6,46
MC 1131 x ОП 1165	35,03	0,2
MC 1134 x ОП 1187	35,16	3,23
MC 1134 x ОП 1180	36,49	7,13
MC 1134 x ОП 1172	34,16	-0,02
MC 1134 x ОП 1165	32,50	-4,6
MC 1113 x ОП 1187	34,13	-6,46
MC 1113 x ОП 1180	32,20	-11,7
MC 1113 x ОП 1165	30,36	-16,80
MC 1141 x ОП 1203	36,06	-5,5
MC 1137 x ОП 1203	32,90	-13,78
MC 1117 x ОП 1165	33,59	-0,59
MC 1113 x ОП 1195	34,13	-6,46
MC 1137 X ОП 1172	33,79	-1,28
MC 1141 X ОП 1172	30,10	-12,06
MC 1117 X ОП 1195	34,43	9,3
MC 1131 X ОП 1195	32,60	-6,75
MC 1134 X ОП 1195	38,09	11,83
MC 1137 X ОП 1187	31,26	-8,4
MC 1141 X ОП 1165	38,09	12,72
MC 1141 X ОП 1180	32,26	-3,9
MC 1141 x ОП 1187	39,06	16,28
MC 1117 X ОП 1172	33,43	-2,33
MC 1113 X ОП 1172	32,70	-10,38
MC 1137 X ОП 1195	35,63	4,39
MC 1141 X ОП 1195	34,86	3,78
НСР _{0,5}	1,1	-

зиса (Г_{ист} =12,72, Г_{ист} =16,28) получены при скрещивании линий MC 1141×ОП 1165 и MC 1141×ОП 1187 с генетическими дистанциями 1,73 (табл. 3).

Использование комплекса праймеров (по двум парам одновременно) позволяет удешевить и ускорить проведение ПЦР-анализа микросателлитных локусов сахарной свеклы в 2 раза. Наши исследования показали, что у изучаемых линий по мере увеличения генетических расстояний увеличивался уровень гетерозиса пробных гибридов.

Максимальное значение гетерозиса по урожаю корнеплодов для пробного гибрида МС 1141 х ОП 1187 составило 16,28%, генетическое расстояние между этими родительскими линиями – 1,73. Низкопродуктивные гибриды с урожайностью 91,2-98,8% от стандарта имеют значения генетических расстояний между исходными линиями 1,0-1,41. Исключением стал гибрид № 1179 (МС 1131 х ОП 1180; D=1,41) с урожайностью 119,5% от стандарта ($\Gamma_{\text{ист}}=13,81$). Для гибридных комбинаций МС 1113 х ОП 1195, МС 1117 Х ОП 1172, МС 1137 Х ОП 1172, МС 1113 Х ОП 1172, МС 1141 Х ОП 1172 выявлены минимальные генетические дистанции (D=0-1,00). Вычисленные значения истинного гетерозиса для полученных пробных гибридов имели отрицательные значения (от -1,28 до -12,06).

Таким образом, сопоставление данных по продуктивности исследованного селекционного материала сахарной свеклы с результатами кластерного анализа показало, что скрещивание линий, наиболее генетически отдаленных друг от друга, играет важную роль в проявлении эффекта гетерозиса у гибридов. Гибридные комбинации с генетическим расстоянием менее 1,41 целесообразно исключать из дальнейшего изучения в связи с низкой продуктивностью. Использование методов молекулярного маркирования обеспечивает возможность быстрого массового скрининга селекционного материала этой культуры, повышает эффективность селекции сахарной свеклы при создании гибридов с повышенной продуктивностью путем выявления генетических дистанций между исходными линиями, рассчитанными на основе структуры ДНК-профилей.

Литература.

- Gärtner T., Steinfath M., Andorf S., Lisek Jan, Meyer Rhonda C., Altmann Th., Willmitzer L., Selbig J. Improved Heterosis Prediction by Combining Information on DNA- and Metabolic Markers // *PLoS One*. – 2009. – 4 (4).
- Srivastava S., Pathak A., Kumar R., Joshi B. Genetic diversity of sugar beet genotypes evaluated by microsatellite DNA markers // *Journal of Environmental Biology*. – 2017. – V.37. – P. 777-783.
- Iquebal M., Jaiswal S., Angadi U., Sablok G., Arora V. SBMDb: first whole genome putative microsatellite DNA marker database of sugarbeet for bioenergy and industrial application // *Database*. – 2015. – V.III. – P.1-10.
- Izzatullayeva V., Akparov Z., Babayeva S., Ojaghi D. Efficiency of using RAPD and ISSR markers in evaluation genetic diversity in sugar beet // *Turkish Journal of Biology*. – 2014. – V.38. – P.429-438.
- Zakrzewski F., Wenke T., Holtgrawe D., Weisshaar B., Schmidt Th. Analysis of a Cot-1 library enables the targeted identification of minisatellite and satellite families in *Beta vulgaris* // *BMC Plant Biology*. – 2010. – V.10. – 8. – P.5-14.
- Хемлебен В., Беридзе Т.Г., Бахман Л., Коварик Я., Торрес Р. Сателлитные ДНК // *Успехи биологической химии*. – 2003. – Т.43. – С. 267-306.
- Sandhu S., Sarao N., Goyal M., Uppal SK. Profiling of sugar beet genotypes for agronomical, sugar quality and forage traits and their genetic diversity analysis using SSR markers // *Electronic Journal of Plant Breeding*. – 2015. – V.7. – P. 253-266.
- Taski-Ajdukovic K., Nagi N., Curcic Z., Zoric M. Estimation of genetic diversity and relationship in sugar beet pollinators based on SSR markers // *Electronic Journal of Biotechnology*. – 2017. – V.27. – P. 1-7.
- Abbasi Z., Arzani A., Majidi M. Evaluation of Genetic Diversity of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Crossing Parents Using Agro-morphological Traits and Molecular Markers // *J. Agr. Sci.* – 2014. – V.16. – P. 1397-1411.
- Stancic I., Zivic J., Petrovic S., Knezevic D. Impact of Genes and Proportional Contribution of Parental Genotypes to Inheritance of Root Yield and Sugar Content in Diploid Hybrids of Sugar Beet // *The Scientific World Journal*. – 2014. – Article ID 580623. – P. 1-5.
- Chomczynski P., Sacchi N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction // *Anal. Biochem.* – 1987. – V.162. – P. 156-159.
- Rogers, S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // *Plant Molecular Biology*. – 1985. – V.5. – P. 69-67.
- Smulders M.J.M., Esselink G.D., Everaert I., Riek J.De, Vosman B. Characterisation of sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) varieties using microsatellite markers // *BMC Genetics*. – 2010. – V.11(41). – P. 1-11.
- Омаров, Д.С. К методике учета и оценки гетерозиса у растений // *С.-х. биология*. – 1975. – Т.10. – № 1. – С. 123-127.
- Хуссейн А.С., Богачева Н.Н., Налбандян А.А. Полиморфизм селекционных линий сахарной свеклы по микросателлитным локусам // *Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук*. – 2016. – №2-3. – С. 10-13.

Поступила в редакцию 04.06.18

После доработки 07.08.18

Принята к публикации 25.09.18