

Генетическая изменчивость родительских форм гетерозисных гибридов сахарной свёклы на основе молекулярных маркеров

Н.Н. БОГАЧЁВА, канд. биолог. наук, **Т.П. ФЕДУЛОВА**, д-р биолог. наук, **А.А. НАЛБАНДЯН**, канд. биолог. наук, **В.П. ОШЕВНЕВ**, д-р с/х наук, **Н.П. ГРИБАНОВА**, канд. с/х наук
(e-mail: biotechnologiya@mail.ru)

Введение

При создании гибридов сахарной свёклы с выраженным гетерозисным эффектом в схемах скрещиваний необходимо использовать генотипы с высокой комбинационной способностью, которая часто связана со степенью их генетической дивергенции. В настоящее время одним из приоритетных способов повышения эффективности современной селекции является разработка и использование системы вспомогательных молекулярных маркеров для выявления скрытой генетической изменчивости, что позволяет решать проблему недостатка морфологических маркеров. Оценка генетического разнообразия исходного селекционного материала с помощью молекулярно-генетических маркеров, полиморфизма различных участков ДНК расширяет возможности и значительно сокращает затраты времени при дифференцировании генотипов. Результаты таких исследований могут быть полезными при отборе пар скрещиваний в гетерозисной селекции, ускоряя её [7]. Принцип маркерного подхода к селекции очень удобен при анализе больших объёмов генетических ресурсов. Использование методов молекулярного анализа является экономически выгодным. В то же время другие исследователи не обнаружили высоких ассоциаций между

величинами гетерозиса гибридов и значениями генетических дистанций, рассчитанными на основе молекулярного анализа [5, 9]. Одним из наиболее распространённых методов выявления генетического полиморфизма у растений является SSR-метод [1]. Он выявляет полиморфизм tandemно организованных повторов ДНК (сателлитов). Длина повторяющейся единицы микросателлитных ДНК менее 10 п.н. Длина повторов сателлитных ДНК не имеет каких-либо ограничений. Она варьирует от 2 п.н. до нескольких сотен [4]. Белорусскими учёными осуществлена идентификация линий и гибридов сахарной свёклы с применением 15 пар микросателлитных праймеров, составлены формулы-стандарты [3]. Изучение эффективности и возможности использования систем молекулярных маркеров при исследовании генетического разнообразия родительских форм сахарной свёклы, выявление критериев оценки их генетической изменчивости при разработке технологии создания гетерозисных гибридов сахарной свёклы на основе MAS-селекции является актуальным направлением исследований.

Цель исследований заключалась в выявлении научно обоснованных критериев оценки генетической изменчивости родительских форм свёклы по SSR-маркерам.

Материалы и методы исследований

В качестве материалов для исследований были использованы мужскостерильные линии сахарной свёклы (МС 1101, МС 1126) и многосемянные опылители (ОП 1122, ОП 1207, ОП 1211, ОП1128, ОП 1239). Выделение геномной ДНК из растительной ткани осуществляли стандартным методом [6]. Качество ДНК определяли электрофорезом в 1,5%-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. Полимеразно-цепную реакцию проводили на амплификаторе «Genues» (Великобритания). В работе использованы следующие произвольные праймеры: Sb04, Sb06, Sb07, Sb09, Sb10 [8]. Нуклеотидные последовательности праймеров указаны в табл. 1. Величину истинного гетерозиса вычисляли по формуле

$$\Gamma_{\text{ист.}} = (F_1 - P_{\text{л}}) / P_{\text{л}} \times 100\%,$$

где $\Gamma_{\text{ист.}}$ — истинный гетерозис (%); F_1 — значение изучаемого признака у гибридов первого поколения; $P_{\text{л}}$ — значение признака у растений лучшей родительской формы [2].

Математическую обработку результатов исследований осуществ-



вляли с использованием программы Past 2.17.

Результаты экспериментов и их анализ

В процессе исследований нами осуществлена оценка SSR-праймеров (Sb04, Sb06, Sb07, Sb09, Sb10) для выявления генетического полиморфизма селекционных материалов, а также использования их для эффективного подбора родительских пар в гетерозисной селекции. Каждый из праймеров обеспечил стабильную амплификацию полиморфных фрагментов ДНК. У индивидуальных генотипов по результатам ПЦР с парами праймеров Sb10, Sb04, Sb06 получены

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности SSR-праймеров

Праймеры	Нуклеотидная последовательность
Sb04	Forward: 5/- ACC GAT CAC CAA TTC ACC AT -3/ Reverse: 5/- GTT TTG TTT TGG GCG AAA TG -3/
Sb06	Forward: 5/- AAA TTT TCG CCA CCA CTG TC -3/ Reverse: 5/- ACC AAA GAT CGA GCG AAG AA -3/
Sb07	Forward: 5/- TGT GGA TGC GCT TTC TTT TC -3/ Reverse: 5/- ACT CCA CCC ATC CAC ATC AT -3/
Sb09	Forward: 5/- TGC ATA AAA CCC CCA ACA AT-3/ Reverse: 5/- AGG GCA ACT TTG TTT TGT GG -3/
Sb10	Forward: 5/- TTC GTC CCT TGA TTG TGT CA -3/ Reverse: 5/- GAG ATT GGG GAT CAC TCT GC -3/

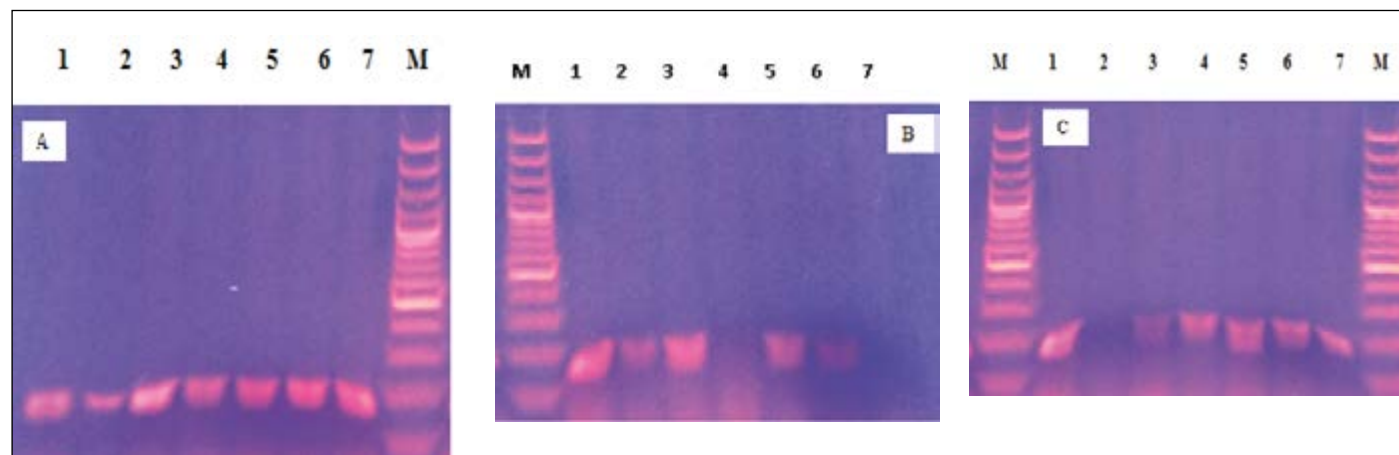


Рис. 1. Электрофореграммы разделения ПЦР-продуктов, полученных с парами праймеров Sb10 (A), Sb06 (B), Sb04 (C): 1 – MC 1101, 2 – ОП 1122, 3 – ОП 1207, 4 – ОП 1211, 5 – MC 1126, 6 – ОП 1128, 7 – ОП 1239, М – маркер молекулярных масс (субэнзим) 100–3 000 п.н.

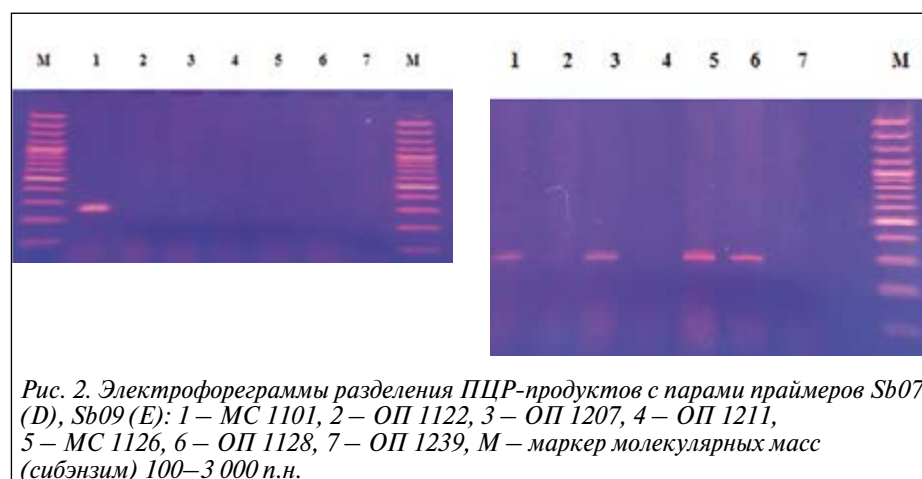


Рис. 2. Электрофореграммы разделения ПЦР-продуктов с парами праймеров Sb07 (D), Sb09 (E): 1 – MC 1101, 2 – ОП 1122, 3 – ОП 1207, 4 – ОП 1211, 5 – MC 1126, 6 – ОП 1128, 7 – ОП 1239, М – маркер молекулярных масс (субэнзим) 100–3 000 п.н.

воспроизводимые электрофоретические профили с количеством амплифицированных фрагментов ДНК от 0 до 2. Детектированы ДНК-фрагменты длиной 150, 190, 200, 210 и 240 п.н. (рис. 1). Уровень полиморфизма варьировал в пределах от –33,3% до –100%. С парой праймеров Sb10 у всех изученных материалов выявлен ампликон длиной 200 п.н. Остальные полосы на электрофореграммах были полиморфными. Уровень несоответствия между изученными материалами варьировал от 50% (для

МС 1101 и ОП 1239) до 10% (для МС 1126 и ОП 1128). Фрагмент ДНК длиной 190 п.н. выявлен только у селекционной линии МС 1101 из всех изученных, что может служить одним из тест-признаков при её генотипировании.

В результате ПЦР-анализа с парами праймеров Sb07 и Sb09 выявлены ампликоны длиной от 260 до 300 п.н. (рис. 2). Электрофоретические профили для исследованных материалов характеризовались присутствием/отсутствием данных фрагментов ДНК. Уровень полиморфизма составил 100%. У селекционных линий ОП 1122, ОП 1211, и ОП 1239 не было обнаружено продуктов ПЦР с данными праймерами. Уровень несоответствия между изученными материалами варьировал от 0% (для ОП 1128 и МС 1126) до 100% (для МС 1126 и ОП 1211).

По результатам ПЦР-анализа с 5 парами SSR-праймеров составлена матрица присутствия/отсутствия ампликонов (табл. 2).

Таблица 2. Матрица присутствия/отсутствия ДНК-ампликонов на электрофореграммах разделения продуктов SSR-анализа селекционных линий

№ п/п	1	2	3	4	5	6	7	Длина ДНК-фрагментов, п.н.	Наименование праймеров
Наименование селекционного материала	МС 1101	ОП 1122	ОП 1207	ОП 1211	МС 1126	ОП 1128	ОП 1239		
Присутствие/отсутствие ДНК-фрагментов на электрофореграммах	0	0	0	1	1	1	1	210	Sb 10
	1	1	1	1	1	1	1	200	
	1	0	1	0	0	0	0	190	
	0	0	1	1	0	0	0	240	Sb 04
	0	0	1	1	1	1	0	210	
	1	0	0	0	1	1	1	200	
	1	0	0	0	1	0	0	190	
	1	1	1	0	1	1	0	200	Sb 06
	0	0	1	0	1	1	0	190	
	1	0	0	0	0	0	0	150	
	1	0	0	0	1	1	0	260	Sb 07
	1	0	1	0	1	1	0	300	Sb 09

Результаты ПЦР-анализа с 5 парами SSR-праймеров позволили рассчитать генетические дистанции (евклидовы) и разделить экспериментальные образцы сахарной свёклы на два дивергентных класса в соответствии с алгоритмом UPGMA (рис. 3).

Значения генетических дистанций между исследованными материалами варьировали в основном от 1,0 (для пары МС 1126 и ОП 1128) до 2,54 (для пары МС 1101 и ОП 1239 и др.). Максимальное евклидово расстояние ($D=3,16$) выявлено для пары скрещиваемых форм МС 1101 и ОП 1211. По максимальным

генетическим дистанциям отобрано 5 из 5 (100%) родительских пар, при гибридизации которых получены гетерозисные гибриды ($\Gamma_{ист.}=5,7-11,28$; урожайность корнеплодов от 26,31 до 30,47 т/га). В то же время 37,5% отобранных по максимальным генетическим дистанциям между исходными формами гибридов имели отрицательные значения гетерозиса от $-5,02$ до $-1,25\%$). Для селекционных материалов МС 1126 и ОП 1128, при скрещивании которых получен низкоурожайный гибрид ($\Gamma_{ист.}=-1,25\%$; урожайность корнеплодов от 21,21 т/га), выявлено самое низкое для изученных материалов евклидово генетическое расстояние $D=1,0$.

Также для выявления степени разнообразия исследуемых материалов (большей визуализации степени сходства и различия) был рассчитан коэффициент Жаккара (бинарная мера сходства). Для группы исследованных

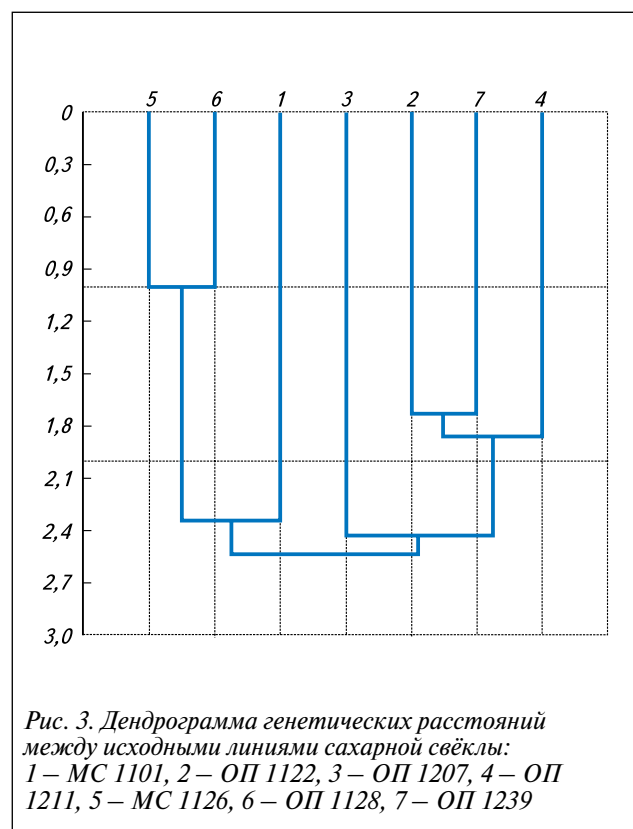


Рис. 3. Дендрограмма генетических расстояний между исходными линиями сахарной свёклы: 1 – МС 1101, 2 – ОП 1122, 3 – ОП 1207, 4 – ОП 1211, 5 – МС 1126, 6 – ОП 1128, 7 – ОП 1239



Таблица 3. Коэффициенты сходства Жаккара (K_j), рассчитанные для исходных селекционных материалов сахарной свёклы

Селекционные материалы	МС 1101	ОП 1122	ОП 1207	ОП 1211	МС 1126	ОП 1128	ОП 1239
МС 1101	1	0,25	0,36364	0,090909	0,54545	0,45455	0,22222
ОП 1122	0,25	1	0,28571	0,2	0,22222	0,25	0,25
ОП 1207	0,36364	0,28571	1	0,375	0,45455	0,5	0,11111
ОП 1211	0,090909	0,2	0,375	1	0,3	0,33333	0,4
МС 1126	0,54545	0,22222	0,45455	0,3	1	0,88889	0,33333
ОП 1128	0,45455	0,25	0,5	0,33333	0,88889	1	0,375
ОП 1239	0,22222	0,25	0,11111	0,4	0,33333	0,375	1

материалов его величина варьировала от 0,09 до 0,8 (табл. 3). Наибольший индекс сходства выявлен для МС 1126 и ОП 1128 ($K_j=0,88$). Наименьшее значение коэффициента Жаккара ($K_j=0,09$) установлено для пары родительских компонентов МС 1101 и ОП 1211.

На основе полученных данных была построена дендрограмма генетических взаимоотношений исходных родительских линий сахарной свёклы (рис. 4). Результаты кластерного анализа демонстрируют условное родство между исследованными генотипами

сахарной свёклы. Математический анализ позволил сгруппировать селекционные материалы в два основных кластера. В первый вошли мужскостерильные линии МС 1126 и МС 1101, а также многосемянные опылители ОП 1128, ОП 1207. Во второй кластер вошли многосемянные опылители ОП 1211 и ОП 1239. Селекционная линия ОП 1122 не вошла ни в одну из указанных групп сходства материалов.

Была исследована взаимосвязь генетической отдалённости селекционных материалов и значений уровня истинного гетерозиса (табл. 4). Расчёты показали, что скрещивание линий с минимальным значением коэффициента Жаккара ($K_j = 0,09-0,22$) позволило получить два гибрида (МС 1101 x ОП 1211 и МС 1101 x ОП 1239) с максимальными значениями истинного гетерозиса ($\Gamma_{ист.} = 7,19-11,28$). Для пар линий

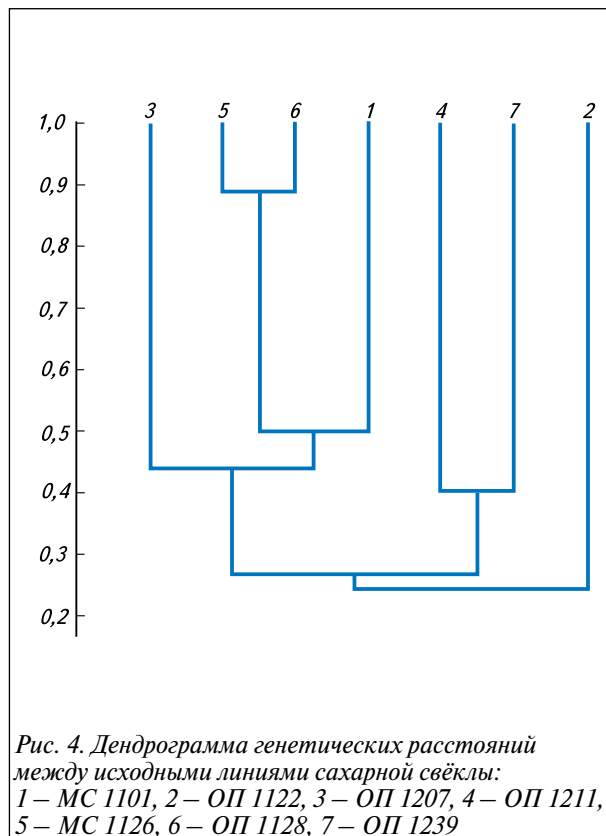


Таблица 4. Уровень проявления гетерозиса у пробных гибридов сахарной свёклы

Селекционный материал	Коэффициент Жаккара (K_j)	Урожайность корнеплодов, т/га	Истинный гетерозис ($\Gamma_{ист.}$), %
МС 1126	—	21,21	—
ОП 1128	—	21,48	—
ОП 1207	—	24,89	—
ОП 1211	—	25,59	—
ОП 1239	—	27,38	—
МС 1101	—	17,53	—
ОП 1122	—	20,30	—
МС 1126 x ОП 1128	0,88889	21,21	-1,25
МС 1126 x ОП 1207	0,45455	26,31	5,7
МС 1126 x ОП 1211	0,30000	27,43	7,19
МС 1126 x ОП 1239	0,33333	26,62	-2,77
МС 1126 x ОП 1122	0,22222	21,21	0
МС 1101 x ОП 1122	0,25000	19,28	-5,02
МС 1101 x ОП 1207	0,36364	26,31	5,7
МС 1101 x ОП 1211	0,090909	27,43	7,19
МС 1101 x ОП 1128	0,45455	21,21	-1,25
МС 1101 x ОП 1239	0,22222	30,47	11,28
НСР0,5	—	1,1	—

с максимальными значениями индекса сходства ($K_j = 0,45-0,88$) выявлены отрицательные значения истинного гетерозиса ($G_{ист.} = -1,25$). При скрещивании материалов, у которых значения коэффициента Жаккара варьировали в пределах $K_j = 0,3-0,4$, получены гибриды как с положительными, так и с отрицательными значениями истинного гетерозиса. Процент успешного прогнозирования уровня СКС составил 66,6% (при отборе материалов с $K_j = 0,3-0,09$).

Выводы

Для эффективного отбора родительских пар с высокой СКС следует дополнить математический анализ результатами ПЦР с дополнительными маркерами, позволяющими точнее дифференцировать селекционные материалы. Для эффективного прогнозирования уровня СКС следует оценивать генетическую вариабельность селекционных материалов с использованием высокодифференцирующих молекулярных маркеров, позволяющих выявлять как высокую ($D=2,243,16$), так и низкую ($D=0-1,41$) степень генетического родства исходных родительских форм. Получаемый фингерпринт ДНК с такими маркерами должен быть высоко полиморфен и воспроизводим. Молекулярные маркеры, выявляющие генетические дистанции от $D=3,16$ и более, нецелесообразно использовать для предсказания уровня истинного гетерозиса.

Список литературы

1. *Боронникова, С.В.* Молекулярное маркирование и генетическая

паспортизация ресурсных и редких видов растений с целью оптимизации сохранения их генофондов / С.В. Боронникова // Аграрный вестник Урала. — 2009. — № 2 (56). — С. 57–59.

2. *Омаров, Д.С.* К методике учёта и оценки гетерозиса у растений / Д.С. Омаров // Сельскохозяйственная биология. — 1975. — Т. 10. — № 1. — С. 123–127.

3. *Свирищевская, А.М.* Микросателлитный анализ линейного материала сахарной свёклы / А.М. Свирищевская [и др.] // Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты: материалы Международной научной конференции. — Минск, 2008. — С. 160–162.

4. *Хемлебен, В.* Сателлитные ДНК / В. Хемлебен [и др.] // Успехи биологической химии. — 2003. — Т. 43. — С. 267–306.

5. *Шаптуренко, М.Н.* Использование RAPD-маркеров для оптимизации отбора исходного материала перца сладкого (*Capsicum annuum* L.) в селекции на гетерозис / М.Н. Шаптуренко [и др.] //

Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2013. — Т. 17. — № 1. — С. 63–71.

6. *Hussein, A.S.* Efficient and nontoxic dna isolation method for pcr analysis / A.S. Hussein [and oth.] // Russian Agricultural Sciences. — 2014. — Т. 40. — № 3. — С. 177.

7. *Krystkowiak, K.* Relationship between phenotypic and genetic diversity of parental genotypes and the specific combining ability and heterosis effects in wheat (*Triticum aestivum* L.) / K. Krystkowiak [and oth.] // Euphytica. — 2009. — Vol. 165. — P. 419–434.

8. *Richards, C.M.* Polymorphic microsatellite markers for inferring diversity in wild and domesticated sugar beet (*Beta vulgaris* L.) / C.M. Richards [and oth.] // Mol. Ecol. Notes. — 2004. — № 4. — P. 243–245.

9. *Riday, H.* Comparison of genetic and morphological distance with heterosis between *Medicago sativa* and subsp. *Falcate* / H. Riday [and oth.] // Euphytica. — 2003. — Vol. 131. — P. 37–45.

Аннотация. В статье представлены результаты оценки генетической изменчивости родительских форм сахарной свёклы по SSR-маркерам для разработки технологии создания гетерозисных гибридов на основе MAS-селекции. Определены индексы сходства Жаккара для изученных селекционных материалов. Осуществлена кластеризация и паспортизация (электронная) селекционных линий.

Ключевые слова: сахарная свёкла, ПЦР-анализ, SSR-маркеры, истинный гетерозис, генетические дистанции, коэффициент Жаккара, кластерный анализ, полиморфизм.

Summary. In the paper, results of evaluation of genetic variability of sugar beet parental forms using SSR-markers to develop a technology for heterosis hybrids' production on the basis of MAS-breeding are presented. To study breeding materials, Jaccard indices have been determined. Clustering and certification (electronic) of breeding lines have been carried out.

Keywords: sugar beet, PCR-analysis, SSR-markers, true heterosis, genetic distances, Jaccard similarity coefficient, clustering analysis, polymorphism.