

Создание современных гибридов сахарной свёклы с применением микросателлитного анализа

И.А. ШИЛОВ¹, д-р биол. наук (e-mail: ishilov@rambler.ru), **Ю.В. АНИСКИНА**¹, канд. биол. наук, **Т.В. ШАЛАЕВА**¹, **О.С. КОЛОБОВА**¹, **Н.С. ВЕЛИШАЕВА**¹, канд. биол. наук, **В.Н. МИЩЕНКО**², канд. с/х. наук, **А.В. ЛОГВИНОВ**², канд. с/х. наук

¹ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»

²ФГБНУ «Первомайская селекционно-опытная станция сахарной свёклы»

Введение

Сахарная свёкла (*Beta vulgaris* L.) — важная техническая культура, выращиваемая в основном для получения рафинированного сахара. Она имеет большое экономическое значение. Мировое производство сахара из сахарной свёклы составляет около 25 % [1]. В России производство сахара осуществляется преимущественно путём переработки сахарной свёклы.

Сахарная свёкла — двулетнее перекрёстноопыляемое растение. Большое генетическое разнообразие этой культуры сформировалось в результате аллогамии и самонесовместимости [2, 3]. Однако использование ограниченного числа генотипов в качестве родительских форм в селекционных программах привело к уменьшению генетической изменчивости и сокращению генетической базы коммерческих гибридов сахарной свёклы [3, 4].

Приоритетным направлением в селекции сахарной свёклы является создание высокопродуктивных гибридов на основе линейного исходного материала [5, 11]. Эффективность селекции во многом зависит от подбора исходных компонентов гибридизации [2]. Для получения гетерозисных гибридов важным этапом является создание константных (гомозиготных) исходных линий с высокой комбинационной способностью [6]. Традиционно выровненные линии сахарной свёклы получают путём

многократно повторяющегося отбора самоопылённых линий по устойчивости к болезням с высокой комбинационной способностью. Возможность использования фенотипических признаков ограничена их количеством, временем и чёткостью генетического проявления, которые в значительной степени зависят от условий выращивания и стадии развития растений [6, 9]. Классическая селекция линий и гибридов сахарной свёклы на основе фенотипических признаков — трудоёмкий и длительный процесс. Сложности селекции и поддержания генетической однородности племенного материала обусловлены двулетним циклом развития сахарной свёклы, инбредной депрессией, явлением само- и перекрёстной несовместимости [2, 5].

Первостепенной задачей является оценка генетического разнообразия, благодаря которой снижаются трудоёмкость и расходы на определение подходящих родительских линий и их выравнивание [1]. Для повышения эффективности создания линий и гибридов необходима разработка технологии генетического анализа на основе молекулярных маркеров, позволяющей проводить достоверную оценку их подлинности и однородности на всех этапах селекционного процесса. Применение генетического анализа в дополнение к оценке по фено-

типическим признакам даёт возможность повысить достоверность идентификации линий, а также сократить сроки селекционного процесса [12].

Микросателлитные маркеры являются эффективным инструментом для изучения генетического разнообразия, поскольку они равномерно распределены в геноме растений и характеризуются специфичным расположением на хромосоме, высокой вариабельностью, точностью воспроизведения результатов и кодоминантным типом наследования, что позволяет получать информацию о гомозиготном или гетерозиготном состоянии локусов. Путём анализа полиморфизма длин микросателлитных локусов устанавливается индивидуальная характеристика каждого отдельного генотипа — ДНК-профиль. Микросателлитные маркеры сахарной свёклы разработаны независимо несколькими исследовательскими группами [4, 7, 8] и широко применялись для разработки генетических карт, исследования дрейфа генов и генетического разнообразия культурных и дикорастущих растений данной культуры [1, 3, 8].

Метод анализа полиморфизма микросателлитов — надёжный инструмент для идентификации исходного материала и подбора родительских пар для скрещивания. Генетические паспорта, созданные на основе выявленных

дескрипторов, характеризуют генетическое разнообразие линий и гибридов сахарной свёклы. Кроме того, благодаря данному генетическому анализу можно установить степень сходства исследуемых образцов путём определения генетических дистанций между выявленными генотипами линий [9].

Анализ генетического разнообразия с помощью генетических маркеров позволяет оценить комбинационную способность линий, которая во многом определяется степенью генетической дивергенции. Данные, полученные в результате такого анализа, могут быть использованы для прогнозирования гетерозиса и обеспечат ускоренный отбор в селекции [9]. Предварительный анализ линий и гибридов с помощью молекулярных маркеров перед посевом может помочь в планировании полевых испытаний и дать первое представление об однородности и отличимости линий при условии достаточного количества маркеров.

Таким образом, разработка технологии генетического анализа на основе микросателлитных маркеров сделает возможным целенаправленный отбор однородных линий с высокой комбинационной способностью и тем самым значительно ускорит процесс создания гетерозисных гибридов, сократив сроки на изучение и затраты на полевые испытания.

В качестве целей данного исследования предполагались оценка генетического разнообразия и однородности селекционного материала сахарной свёклы с помощью анализа полиморфизма длин микросателлитных фрагментов и отбор перспективных линий для создания высокопродуктивных гибридов.

Материалы и методы

Исследование проводили на 129 линиях сахарной свёклы (*Beta vulgaris*), в состав которых входили 24 МС-линии, 28 линий О-типа, 76

линий-опылителей, предоставленных ФГБНУ «Первомайская селекционно-опытная станция сахарной свёклы». Для получения достоверных результатов использовали растительный материал пяти разных растений каждой линии.

Геномную ДНК выделяли из зелёных листьев методом экстракции с использованием СТАВ и хлороформа [10].

Аmplификацию проводили с locus-специфичными праймерами 521.6, FDSB502, FBSB1001, FDSB1033 [4], Unigene 27833, Unigene 26753, Unigene 16898, Unigene 17623B, Unigene 15915, Unigene 17923 [7], SB 04, SB 09, SB 15 [8], мечеными флуоресцентными красителями FAM, R6G, TAMRA и ROX.

Детекцию ПЦР-продуктов осуществляли методом высокоразрешающего капиллярного электрофореза в денатурирующих условиях на генетическом анализаторе ABI PRISM 3130XL (Applied Biosystems, США). Размер ПЦР-фрагментов устанавливали с помощью программного обеспечения «ДНК Фрагментный анализ» (Россия).

Кластерный анализ проводили методом UPGMA с использованием программного обеспечения DARWIN 6.0.14. Результирующая дендрограмма приведена на рис. 3.

Результаты

Для надёжного различения и идентификации образцов растений определяющее значение имеет подбор наиболее информативных микросателлитных локусов. С этой целью из литературных источников было отобрано 40 микросателлитных локусов по следующим критериям: количество аллелей, выявленных в локусе, — не менее трёх; расположение на разных хромосомах, обеспечивающее независимое наследование ДНК-маркеров; размер фрагмента от 100 до 400 п. н. для проведения достоверного анализа длин ПЦР-фрагментов. По-

лиморфизм данных локусов был исследован экспериментально у селекционных образцов сахарной свёклы. Мономорфные, трудно амплифицируемые локусы или дающие неоднозначные и нестабильные результаты были исключены из исследования. По результатам анализа для различения и идентификации образцов сахарной свёклы были отобраны 13 локусов с наибольшей вариабельностью длин микросателлитных фрагментов (аллелей), с использованием которых получены чётко интерпретируемые и воспроизводимые результаты (см. табл.).

Следует отметить, что данные локусы используются для оценки генетического разнообразия отечественных линий и гибридов сахарной свёклы впервые. Для амплификации микросателлитных локусов была установлена единая температура отжига 55 °С, что в дальнейшем позволило проводить анализ нескольких локусов в одной пробирке. Также были оптимизированы условия денатурации и элонгации.

С использованием отобранных локусов был проведён генетический анализ 129 линий сахарной свёклы из рабочих коллекций ФГБНУ «Первомайская селекционно-опытная станция сахарной свёклы». В результате для каждого образца получена индивидуальная характеристика — генетический профиль (совокупность фрагментов всех локусов). На основе полученных цифровых характеристик для каждого образца сахарной свёклы составлен генетический паспорт.

На рис. 1 в качестве примера представлен генетический профиль линии От11301, полученный в результате анализа полиморфных микросателлитных локусов методом высокоразрешающего капиллярного электрофореза в денатурирующих условиях на генетическом анализаторе ABI PRISM 3130XL.

Таблица 1. Характеристика отобранных микросателлитных локусов

Локус	Мотив	Число выявленных аллелей	Диапазон длин аллелей, п.н.	Литературный источник
Unigene 15915	(CA)n/(TG)n	5	305–383	Fugate and al., 2014
Unigene 16898	(CAA)n/(TTG)n	4	276–291	
Unigene 17623B	(CAA)n/(TTG)n	5	147–173	
Unigene 17923	(AC)n/(GT)n	6	197–224	
Unigene 26753	(CAA)n/(TTG)n	8	279–329	
Unigene 27833	(ATA)n/(TAT)n	6	190–214	
SB04	(GGA)n(GTT)n/(TCC)n(AAC)n	5	186–201	Richards and al., 2004
SB09	(CAT)n/(ATG)n	3	130–136	
SB15	(CT)n/(AG)n	6	146–174	
521.6	—	8	278–309	McGrath and al., 2007
FDSB502	—	6	271–295	
FBSB1001	—	6	315–351	
FDSB1033	—	9	177–221	

Каждый пик на электрофореграмме представляет собой фрагмент соответствующего микросателлитного локуса определённой длины. Длина каждого микросателлитного фрагмента установлена с точностью до одного нуклеотида.

При создании конкурентоспособных гибридов сахарной свёклы важной задачей является селекция выровненных линий. Для анализа однородности исследуемых линий использовали растительный материал пяти разных растений каждой линии. Чтобы снизить вероятность ошибки, отбор растений проводили в поле по фе-

нотипическим характеристикам. В результате генетического анализа 129 линий высокая степень однородности выявлена у 35 линий сахарной свёклы. У 13 линий степень однородности (гомогенности) составила 100 % (рис. 2а). Данные линии являются компонентами скрещивания перспективного гибрида сахарной свёклы Первомайский, включённого в этом году в Государственный реестр селекционных достижений РФ, допущенных к использованию, и гибридов Фрегат и Корвет, переданных в Государственное испытание с 2020 г.

Однородность селекционных МС-линий сахарной свёклы достигается множественными возвратными скрещиваниями с линиями О-типа. Большинство проанализированных линий характеризуются низкой степенью однородности, поскольку являются самоопылёнными линиями 2–3-го поколений инбридинга. Так, приведённые генетические профили растений свидетельствуют о неоднородности линии Оп12100 П163.02 J4 роз (рис. 2б).

Данная методика генетического анализа позволяет определить также степень сходства исследуемых образцов путём определения генетических расстояний между выявленными генотипами. Изучение генетических взаимосвязей между селекционными линиями помогает подобрать лучшие комбинации для скрещивания, что обеспечивает получение высокопродуктивных выровненных по всем признакам гибридов. В результате кластерного анализа данных фрагментного анализа в программе DARwin 6 построена дендрограмма (рис. 3), отражающая генетические взаимосвязи между однородными линиями сахарной свёклы.

Для построения дендрограммы были использованы результа-

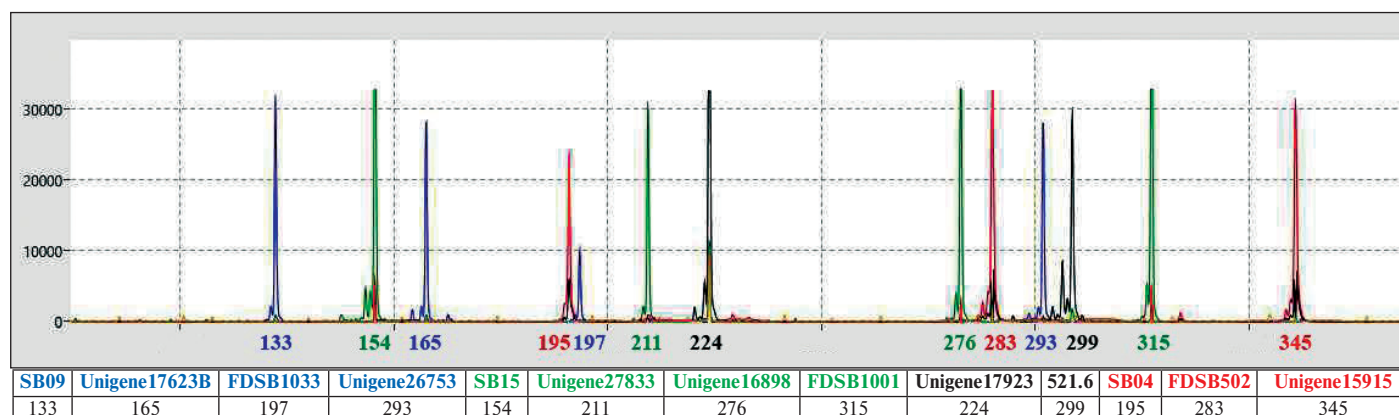


Рис. 1. Генетический профиль линии От11301 зел, полученный в результате анализа микросателлитных локусов. Цвет пика (фрагмента) соответствует каналу детекции на приборе ABI PRISM 3130XL и указывает принадлежность фрагмента к определённому локусу: SB09, Unigene 17623B, FDSB1033, Unigene 26753 – FAM (синий), SB15, Unigene 27833, Unigene 16898, FDSB1001 – R6G (зелёный), Unigene 17923, 521.6 – TAMRA (чёрный), SB04, FDSB502, Unigene 15915 – ROX (красный). Цифрами обозначена длина выявленных фрагментов, п. н.

а

Растение	SB09	Unigene17623B	FDSB1033	Unigene26753	SB15	Unigene27833	Unigene16898	FDSB1001	Unigene17923	521.6	SB04	FDSB502	Unigene15915
1	133	165	197, 221	288	170	205, 211	276, 285	315, 351	197, 208	299	195, 201	293	345
2	133	165	197, 221	291	150, 170	211	276	315	201, 224	299	195, 198	283	305, 348
3	133	162, 165	197	285, 291	170	208, 211	276	315	208, 224	299, 303	195, 201	295	345, 348
4	133	162, 165	221	288	150, 170	199, 211	276	333	197, 208	299	186, 204	271, 295	305, 345
5	133	165	197, 221	285, 288	150	205, 211	279, 285	351	201, 224	295, 299	195	271	345

б

Растение	SB09	Unigene17623B	FDSB1033	Unigene26753	SB15	Unigene27833	Unigene16898	FDSB1001	Unigene17923	521.6	SB04	FDSB502	Unigene15915
1	136	165	177	293	150	211	276	351	224	299	195	283	345
2	136	165	177	293	150	211	276	351	224	299	195	283	345
3	136	165	177	293	150	211	276	351	224	299	195	283	345
4	136	165	177	293	150	211	276	351	224	299	195	283	345
5	136	165	177	293	150	211	276	351	224	299	195	283	345

Рис. 2. Генетический анализ однородности линий сахарной свёклы: а – генетические паспорта растений линии От 12122(2) р-3/16-3/18 J3; б – генетические паспорта растений линии От 12100 П163.02 J4 роз

ты анализа 35 однородных линий сахарной свёклы. По 13 микросателлитным локусам было выявлено от 3 до 6 аллелей. Совокупное количество дескрипторов генетического разнообразия проанализированных линий по всем локусам составило 77.

На основании сходства и различия генетических профилей линии сахарной свёклы распределились в четыре отдельных кластера. Согласно дендрограмме наиболее генетически обособленными являются линии ОпФа (СЭС) и Оп21695. Наименьшие генети-

ческие расстояния наблюдаются между линиями с одинаковым генетическим профилем. Так, линии сахарной свёклы Оп6279 2.10 П98.14, Оп6279 2.10 П46.14J2 и Оп6279 2/10 П46/14 J3 являются разными поколениями беккроссов инцухта и объединились в один

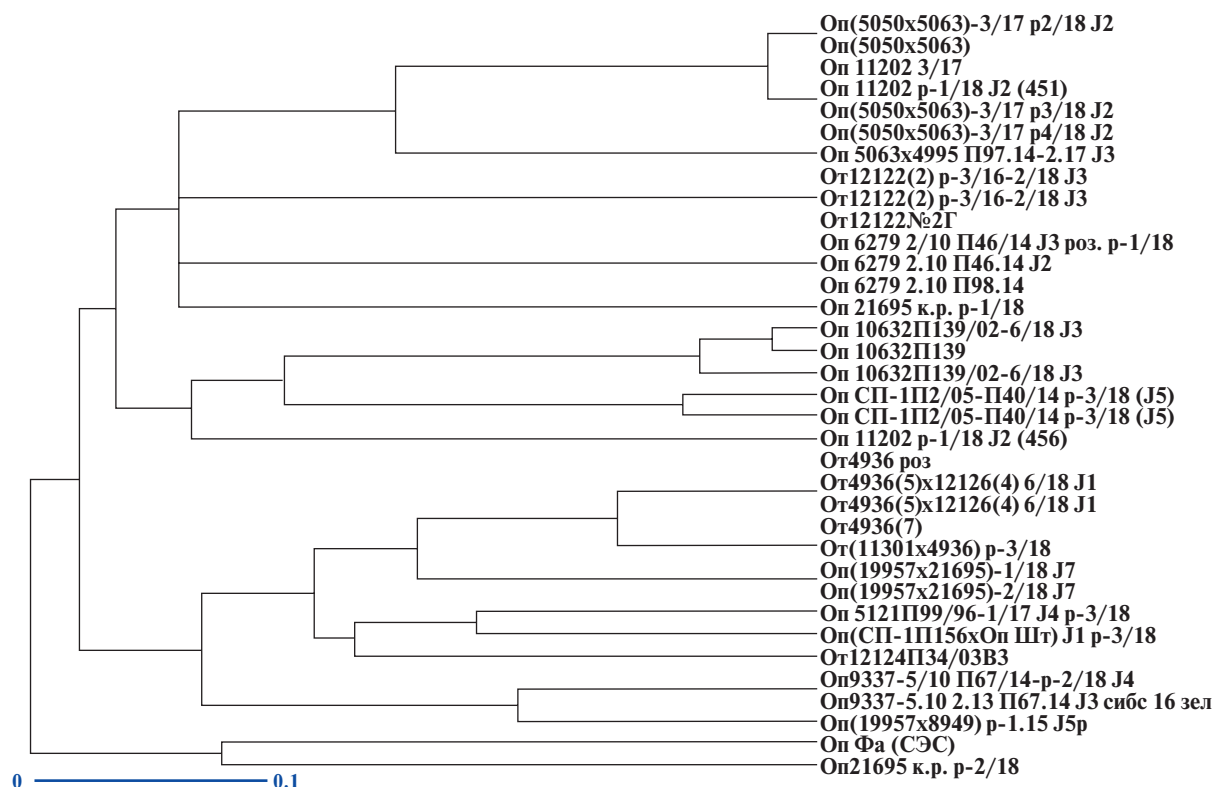


Рис. 3. Дендрограмма, отражающая генетические взаимосвязи однородных линий сахарной свёклы, установленные с помощью микросателлитного анализа

кластер. Линии, полученные в результате скрещивания одной пары родителей, образуют один кластер, например линии-опылители Оп(5050×5063) и Оп(5050×5063)-3/17. Наблюдается объединение в один кластер линий, содержащих одинаковые селекционные компоненты, например линии О-типа От4936(7), От (11301×4936) p-3/18, От4936(5)×12126(4) 1/18 J1 (511), От4936(5)×12126(4) 6/18 J1 (516) и От4936 роз.

Заключение

Предлагаемая методика микросателлитного анализа самоопылённых линий сахарной свёклы позволяет оценить константность селекционных линий в процессе создания исходных селекционных материалов, вести более строгий контроль гибридности, эффективно подбирать пары скрещивания для окончательной оценки по комбинационной способности. Получение уникальной генетической характеристики (ДНК-паспорта) каждой линии и гибрида обеспечивает защиту авторских прав селекционера.

При данном подходе существенно сокращаются сроки создания конкурентоспособных гибридов сахарной свёклы. Благодаря автоматизации всех этапов анализа в формате 96-луночного планшета предлагаемая технология позволяет осуществлять широкомасштабный скрининг селекционных образцов. Анализ на современном высокоточном оборудовании значительно повышает надёжность интерпретации результатов в отличие от эмпирической оценки в геле без точного определения длин анализируемых фрагментов [9].

Список литературы

1. *Taški-Ajduković, K.* Estimation of genetic diversity and relationship in sugar beet pollinators based on SSR markers / K. Taški-Ajduković, N. Nagl, Ž. Čurčić, M. Zorić // *Electronic Journal of Biotechnology*. — 2017. — No. 27. — P. 1–7.

2. *Балков, И.Я.* Genetic diversity of sugar beet genotypes evaluated by microsatellite DNA markers / И.Я. Балков, С.Д. Каракотов, А.В. Логвинов, В.Н. Мищенко // *Эволюция сахарной свёклы: от огородных форм до современных рентабельных гибридов*. — Шёлково : АО «Шёлково Агрохим», 2017. — С. 384.

3. *Abbasi, Z.* Evaluation of genetic diversity of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). crossing parents using agromorphological traits and molecular markers / Z. Abbasi, A. Arzani, M.M. Majidi // *Journal of Agricultural Science and Technology*. — 2014. — Vol. 16. — P. 1397–1411.

4. *McGrath, J.M.* An open-source first-generation molecular genetic map from a sugar beet × table beet cross and its extension to physical mapping / J.M. McGrath [and al.] // *The Plant Genome*. — 2007. — No. 1. — P. 27–44.

5. *Васильченко, Е.Н.* Ускоренное получение новых гомозиготных линий сахарной свёклы (*B. vulgaris* L.) / Е.Н. Васильченко, Т.П. Жужжалова, Е.О. Колесникова // *Сахар*. — 2020. — № 2. — С. 30–32.

6. *Федулова, Т.П.* Теоретические и практические аспекты молекулярно-генетического маркирования в селекции сахарной свёклы (*Beta*

vulgaris L.) Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. — С. 44.

7. *Fugate, K.K.* Generation and Characterization of a Sugarbeet Transcriptome and Transcript-Based SSR Markers / K.K. Fugate [and al.] // *The Plant Genome*. — 2014. — Vol. 7. — № 2. — P. 1–13.

8. *Richards, C.M.* Polymorphic microsatellite markers for inferring diversity in wild and domesticated sugar beet (*Beta vulgaris*) / C.M. Richards [and al.] // *Molecular Ecology Notes*. — 2004. — Vol. 4. — No. 5. — P. 243–245.

9. *Налбандян, А.А.* Перспективы использования SSR-маркеров для генотипирования сахарной свёклы / А.А. Налбандян [и др.] // *Сахар*. — 2019. — № 11. — С. 36–39.

10. *Doyle, J.J.* A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / J.J. Doyle, J.L. Doyle // *Phytochemical Bulletin*. — 1987. — No. 19. — P. 11–15.

11. *Мищенко, В.Н.* Теоретические и практические аспекты использования цитоплазматической мужской стерильности сахарной свёклы / В.Н. Мищенко [и др.] // *Сахарная свёкла*. — 2016. — № 1. — С. 16–19.

12. *Логвинов, А.В.* Новые гибриды сахарной свёклы / А.В. Логвинов [и др.] // *Труды Кубанского государственного аграрного университета*. — 2020. — № 3 (82). — С. 80–89.

Аннотация. Для оценки генетического разнообразия и однородности линий сахарной свёклы проведён анализ 129 линий сахарной свёклы из рабочей коллекции ФГБНУ «Первомайская селекционно-опытная станция сахарной свёклы» с использованием 13 полиморфных микросателлитных локусов. В результате показана высокая степень однородности у 35 линий, из которых у 13 степень гомогенности составила 100 %. Данные линии были вовлечены в селекционный процесс, в результате которого был создан перспективный гибрид Первомайский, а также новые гибриды Фрегат и Корвет, переданные в Государственное испытание. На основе результатов анализа 35 линий с высокой степенью однородности построена дендрограмма, отражающая генетические взаимосвязи между селекционными образцами. Изучение генетических расстояний позволяет целенаправленно подбирать пары для скрещивания с целью оценки их комбинационной способности.

Ключевые слова: сахарная свёкла, микросателлитные маркеры, генетическое разнообразие, однородность, кластерный анализ.

Summary. To assess the genetic diversity and homogeneity 129 sugar beet lines from the collection of the Pervomaik Selection and Experimental Station were analyzed using 13 polymorphic microsatellite loci. As a result, a high level of homogeneity was shown for 35 lines, of which 13 lines had the 100 % level of homogeneity. These lines were involved in the breeding process, which resulted in the development of the new perspective hybrid Pervomaiksky, as well as new hybrids Fregat and Corvette, transferred to the State test in 2020. The dendrogram was constructed based on the results of the analysis of 35 lines with a high level of homogeneity. It reflects the genetic relationships between breeding samples. The study of genetic distances allows to purposefully select pairs for crossing in order to assess their combination ability.

Keywords: sugar beet, microsatellite marker, genetic diversity, homogeneity, cluster analysis.