

# ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЦМС-Rf СИСТЕМЫ В РОДИТЕЛЬСКИХ ЛИНИЯХ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

**Т.П. Федулова**, доктор биологических наук  
**Т.Н. Дуванова**  
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский  
институт сахарной свеклы и сахара  
имени А.Л. Мазлумова»  
e-mail@biotechnologiya.ru

**Аннотация.** Представлены результаты тестирования молекулярных маркеров ЦМС-Rf системы в образцах коллекции линий сахарной свеклы. В процессе работы определяли набор ДНК-маркеров для идентификации типа цитоплазмы в гаплоидном и линейном селекционном материале. Протестировано 2 пары праймеров, разработанных для амплификации маркерных фрагментов ДНК-локусов, сцеплено наследуемых с генами ЦМС. Рекомендовано использование данных олигонуклеотидов в селекционной и семеноводческой практике для идентификации и отбора генотипов сахарной свеклы по типу цитоплазмы.

**Ключевые слова:** сахарная свекла, цитоплазматическая мужская стерильность, закрепители стерильности, молекулярные маркеры.

**Введение.** Одним из важнейших селекционно-ценных признаков у сахарной свеклы является цитоплазматическая мужская стерильность. В популяциях сахарной свеклы, как и многих других видов растений, встречаются формы, имеющие стерильную пыльцу, то есть обладающие мужской стерильностью. Это ценный для селекции признак, поскольку позволяет экономить время и средства, избегая кастрации гермафродитных цветков при гибридизации. Поэтому изучению генетического контроля данного признака уделяется большое внимание.

Определение состояния генов Rf в селекционном материале сахарной свеклы проводят методом гибридологического анализа. Этот процесс довольно длителен и трудоемок. Он включает проведение скрещиваний и оценку стерильности/фертильности пыльцы растений F1 на стадии цветения. Современные разработки в области молекулярной биологии предлагают новые подходы к решению проблем гибридной селекции и семеноводства сахарной свеклы. Развитие методов молекулярного анализа геномов высших растений позволило установить, что цитоплазматические детерминанты системы ЦМС находятся в митохондриальном геноме, что достоверно и для сахарной свеклы.

Влияние митохондриального и хлоропластного генома на тип цитоплазмы у сахарной свеклы было изучено

китайскими и японскими учеными [1, 2]. Исследования проводились на 42 селекционных линиях культуры. Эти линии оценивали на присутствие нормальной и мужскостерильной (Owen) цитоплазмы по полиморфизму района petG-psbE хлоропластного генома, а также митохондриальных минисателлитных локусов. Полученные результаты показывают, что молекулярная идентификация цитоплазмы позволяет на практике избежать напрасного затрачивания ресурсов при попытке создать закрепляющий генотип из растений с Owen цитоплазмой. Было также показано, что Owen цитоплазма связана с наибольшим количеством мест рестрикции HindIII в petG-psbE межгенном спейсере внутри хлоропластного генома [3], полиморфизм которых позволяет дифференцировать разные типы цитоплазмы. Из всех изученных цитоплазм значение для селекции в связи с использованием ЦМС для получения гибридных семян имеют только 2: стерильная (S vulg.) и фертильная (N vulg.).

Поиск новых источников ЦМС имеет важное научное и практическое значение. Об обнаружении таких источников у дикой свеклы и их взаимоотношениях с другими типами ЦМС сообщает японский исследователь Kawanishi [4].

Митохондриальный геном сахарной свеклы, как несущий основную ответственность за проявление ЦМС, был секвенирован К. Kubo с коллегами [5] и явился одним из двух доступных на сегодняшний день митохондриальных геномов растений наряду с геномом *Arabidopsis th.* Эти данные позволили исследовать митохондриальный геном на наличие маркерных последовательностей к признаку ЦМС. Поиск новых источников ЦМС и их закрепителей стерильности Оуэн-типа (О-типа) имеет важное научное и практическое значение при создании гибридов, обладающих гетерозисным эффектом. Вместе с тем, наследование данного признака в потомстве очень сложное, и требуется постоянно проводить большое количество браковок в тепличных и полевых условиях для его стабилизации. Несоответствие между практически и теоретически ожидаемым расщеплением по фенотипу, которое наблюдается при генетическом анализе, объясняется часто модификационной изменчивостью признака ЦМС. В этой связи большое значение имеет идентификация типа цитоплазмы сахарной свеклы на ранних этапах создания гаплоидных форм в культуре *in vitro* и в процессе закрепительных скрещиваний мужскостерильных аналогов и растений О-типа.

**Материалы и методы исследований.** В качестве материалов для молекулярного исследования были использованы

Таблица. Характеристика использованных праймеров

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5' – 3'	Tm °C	Ссылка
TR1	F AGAACTTCGATAGGCGAGAGG R GCAATTTTCAGGGCATGAACC	59	Nishizawa et al., 2000
TR3	F AGATCCAAACAGAGGGACTG R CGGATCACCCSTATTTCATTTG	56	Nishizawa et al., 2000

проростки МС линий сахарной свеклы, линий закрепителей стерильности Оуэн-типа, гаплоидные регенеранты.

Выделение геномной ДНК из растительной ткани осуществляли при помощи 20 % SDS и 7,5М ацетата аммония [6], а также наборами для выделения ДНК (ООО «Синтол»). Качество выделенной ДНК было определено путем электрофореза в 1,2 % агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Полученная ДНК растворялась в 10 мМ трис-НСI-буфера, рН 8,0, содержащем 0,1 мМ ЭДТА и использовалась для ПЦР-анализа. Классическая полимеразно-цепная реакция была проведена на амплификаторах Genius (Великобритания) и SimpliAmp (By life technologies, Сингапур) при следующих условиях: начальная денатурация при 95°С в течение 2 мин, затем 30–35 циклов при соблюдении температурно-временного режима: отжиг (Tot) при 58–60°С в течение 40 с, элонгация – 1 мин при 72°С, денатурация при 94°С – 30 с, финальная элонгация – 2 мин. Варьирование температуры отжига и количества циклов зависело от нуклеотидной последовательности праймеров. Выявление локусов, сцеплено наследуемых с генами ЦМС, осуществлялось путем тестирования митохондриальных минисателлитных праймеров (TR1, TR3) семейства TR [7]. Праймеры для амплификации маркерных фрагментов ДНК синтезированы ЗАО «Синтол» (Россия) на основе нуклеотидных последовательностей из опубликованных работ (табл.).

Электрофорез продуктов амплификации проводили в 2 % агарозном геле, приготовленном на 1x TAE или 1x SB буфере, с использованием камеры для горизонтального электрофореза (BioRad, США). Окрашивание ПЦР-продуктов осуществляли бромистым этидием. Визуализировали и документировали результаты электрофореза при помощи системы цифровой документации

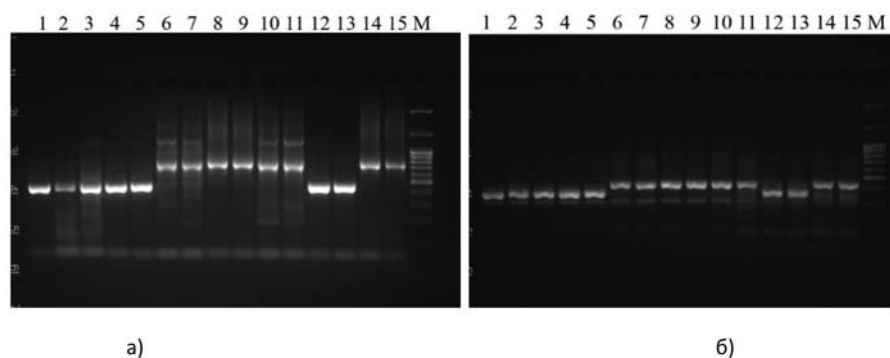


Рисунок 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР с использованием праймера TR1 (а) и TR3 (б).

Дорожки: 1–5, 12, 13 – МС формы, 6–11 – закрепитель стерильности О-типа, 14, 15 – пистиллоидные формы. М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™, 100–3000 п.н. (ThermoScientific, США).

видеоизображения BIO-PRINT (Vilber Lourmat, Франция).

**Результаты исследований и их обсуждение.** Известно, что ЦМС имеет важное значение при создании гибридов сахарной свеклы, обладающих гетерозисным эффектом. Для подтверждения принадлежности исследуемых генотипов культуры к МС и О-тип формам была проведена ПЦР-амплификация ДНК образцов с минисателлитным праймером TR1 и изучено разнообразие митохондриального у 15 гаплоидных растений- регенерантов (рис. 1).

Амплификация ДНК образцов с праймером TR1 выявила фрагменты длиной 400 п.н., характерные для МС форм, обнаруженные у №№1–5, 12 и 13 (рис. 1 а). У генотипов под номерами 6–11, 14 и 15 установлено наличие одного ПЦР-продукта длиной 700 п.н., характерного для форм закрепителя стерильности О-типа.

При амплификации ДНК образцов с праймером TR3 у генотипов №№ 1–5, 12–15 установлено наличие ампликонов длиной 400 п.н., свойственных для МС форм (рис. 1 б). У микроклонов под номерами 6–11 отмечено формирование ампликонов размером 500 п.н., присущих только для данных образцов (О-тип). У номеров 14–15 (пистиллоидные формы) также обнаружено наличие ампликона размером 500 п.н.

Таким образом, тестирование генотипов на ранних этапах развития позволяет идентифицировать гаплоидные растения-регенеранты по типу цитоплазмы на МС и О-тип формы.

Кроме того, нами было протестировано по праймерам TR1 8 генотипов сахарной свеклы первого года жизни по 5 растений каждого, выращенных в полевых условиях, предоставленных лабораторией селекции сахарной свеклы на стерильной основе. В результате проведенных молекулярно-генетических исследований выявлено наличие ПЦР-продукта длиной 400 п.н., характерного для форм с ЦМС у двух генотипов (рис. 2 а).

При амплификации ДНК образцов с данным праймером у растений генотипа № 45 отмечено формирование ампликонов длиной 400 п.н., присущих МС формам и у растений № 47 – наличие продуктов размером 700 п.н., характерных для растений опылителей закрепителей стерильности (рис. 2 б).

Амплификация данных генотипов выявила фрагменты длиной ~ 400 п.н., характерные для МС форм; ампликоны длиной ~ 700 п.н., присущие для форм закрепителя стерильности. У всех растений генотипов под №№ 30 и 31 выявлены ДНК – ампликоны ~ 400 п.н., свойственные МС формам (рис. 2 а).

ПЦР-амплификация растений генотипа под № 45 позволила обнаружить фрагменты, характерные для МС форм: ~ 400 п.н. растения образца под № 47 содержали в своем геноме ДНК-фрагменты, присущие формам закрепителей стерильности О-типа ~700 п.н. (рис. 2 б).

Растения образца № 48 проявили себя как МС формы. У растений образца № 50 выявлены ПЦР-продукты, свойственные закрепителям стерильности ~700 п.н. (рис. 3 а).

ПЦР-анализ генотипов № 51 и 73 с праймером TR1 показал наличие фрагментов длиной ~ 400 п.н., присущих растениям МС форм (рис. 3 б).

Таким образом, в результате проведенных молекулярно-генетических исследований установлено, что апробированный нами минисателлитный праймер TR1 позволяет на ранних этапах селекционного процесса дифференцировать растения сахарной свеклы на МС и ОТ-формы. Благодаря этому значительно экономится время и исключается длительное, кропотливое изучение и браковки по фенотипическому проявлению признаков стерильности и фертильности. Использование данной технологии в селекционной практике позволяет ускорить тестирование линий сахарной свеклы по признаку закрепительной способности, которое в полевых условиях проводится в два этапа: тест-скрещивание с ЦМС линиями и последующий анализ F1.

Также применение этих молекулярных маркеров для анализа партий семян материнских линий гибридов даст возможность определять уровень их засоренности семенами фертильных форм. Это позволяет сокращать сроки создания гетерозисных гибридов сахарной свеклы в 2–3 раза. В результате проведенного молекулярно-генетического анализа на растениях свеклы 1 года жизни отобраны две линии О-типа (№№ 47, 50), шесть МС линий (№№ 30, 31, 45, 48, 51, 73), из гаплоидных регенерантов – девять МС форм, 6 – генотипов, характерных для закрепителя стерильности О-типа, которые переданы селекционерам для дальнейшего их использования при создании гетерозисных гибридов.

#### Список использованной литературы

1. Cheng, D. The distribution of normal and male-sterile cytoplasts in Chinese sugar-beet germplasm / D. Cheng, K. Kitazaki, D. Xu, T. Mikami, T. Kubo // *Euphytica*. – 2009. – № 165. – С. 345-354.
2. Nishizawa, T. Rapeseed species and environmental concerns related to loss of seeds of genetically modified oilseed rape in Japan / T. Nishizawa, M. Tamaoki, M. Aono, A. Kubo, H. Saji, N. Nakajima // *GM Crops*. – 2010. – № 1(3). – С. 143-156.
3. Dufay, M. Variation in pollen production and pollen viability in natural populations of gynodioecious *Beta vulgaris* ssp. maritima: evidence for a cost of restoration of male function / M. Dufay, V. Vaudey, I. de Cauwer, P. Touzet, J. Cuguen, J-F. Arnaud // *J. Evo.l Biol.* – 2008. – №. 21. – С. 202-212.
4. Kawanishi, Y. A new source of CMS found in wild beet and its relationship to other CMS types / Y. Kawanishi, H. Shinada, M.

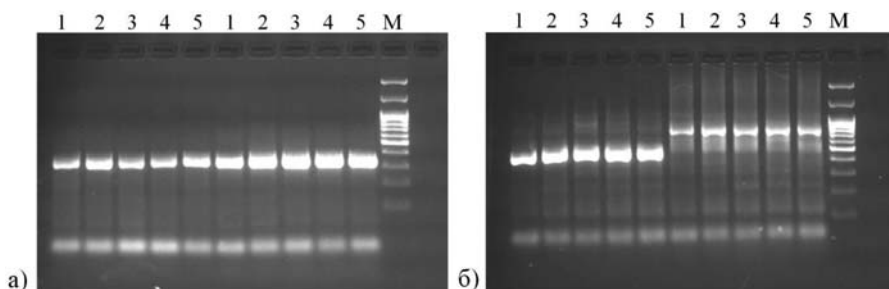


Рисунок 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР с использованием праймера TR1. Дорожки слева направо: а) образцы № 30 и 16) № 45 и 47. М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™, 100-3000 п.н. (Thermo Fisher Scientific, США).

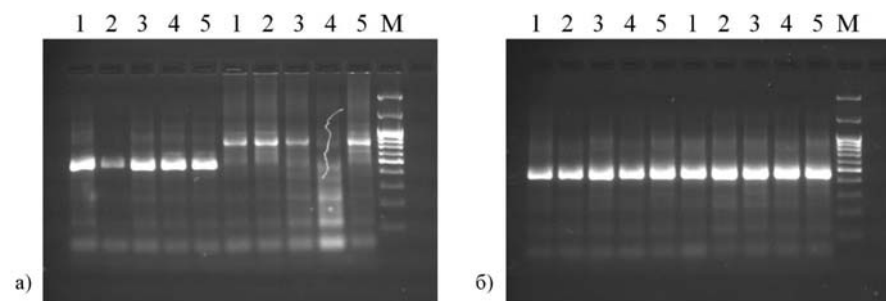


Рисунок 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР с использованием праймера TR1. Дорожки слева направо: а) образцы № 48 и 50 б) № 51 и 73. М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™, 100-3000 п.н. (Thermo Fisher Scientific, США).

Matsunaga, Y. Masaki, T. Mikami, T. Kubo // *Genome*. – 2010. – № 53(4). – С. 251-256.

5. Kubo, T. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNACys(GCA) / T. Kubo, S. Nishizawa, A. Sugawara, N. Itchoda, A. Estiati, T. Mikami // *Nucleic Acids Research*. – 2000. – № 28(13). – С. 2517-2576.

6. Hussein, A.S. Efficient and nontoxic DNA isolation method for PCR analysis / A.S. Hussein, A.A. Nalbandyan, T.P. Fedulova, N.N. Bogacheva // *Russian Agricultural Sciences*. – 2014. – V. 40. – Issue 3. – P. 177-178.

7. Nishizawa, S. Variable number of tandem repeat loci in the mitochondrial genomes of beets / S. Nishizawa, T. Kubo, T. Mikami // *Current Genetics*. – 2000. – № 37. – С. 34-38.

#### Application of molecular markers for identification CMS-Rf system in parental lines of sugar beet

T.P. Fedulova, T.N. Duvanova

**Summary.** The results of testing molecular markers of the CMS-Rf system in samples from the collection of sugar beet lines are presented. The work was carried out in order to determine a set of DNA markers for identifying the type of cytoplasm in haploid and linear breeding material. Two pairs of primers designed for amplification of marker DNA fragments for loci linked to CMS genes were tested. It is recommended to use these oligonucleotides in breeding and seed-growing practice for the identification and selection of sugar beet genotypes according to the type of cytoplasm.

**Key words:** sugar beet, cytoplasmic male sterility, sterility fixers, molecular markers.