

ЭФФЕКТИВНЫЙ ПОДБОР РОДИТЕЛЬСКИХ ПАР САХАРНОЙ СВЕКЛЫ ДЛЯ ГИБРИДИЗАЦИИ НА ОСНОВЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ

Налбандян А.А., кандидат биологических наук
Федулова Т.П., доктор биологических наук
Черепухина И.В., кандидат биологических наук
Багмутова Т.Н., Слепокурова Е.А., младшие научные сотрудники
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова»

Аннотация. Для подбора родительских пар для гибридизации было проведено генотипирование 18 образцов сахарной свеклы по 12-ти SSR-маркерам. Наибольший уровень полиморфизма (PIC) установлен для локусов: *Vv21* (PIC = 0,85), *BQ585656* (PIC = 0,83), *Sb04* (PIC = 0,84), *Sb15* (PIC = 0,74), *FD1002* (PIC = 0,73). Это позволило четко идентифицировать и дифференцировать селекционный материал сахарной свеклы. По результатам ПЦР-анализа рассчитаны генетические расстояния между раздельноплодными МС формами и сростноплодными опылителями. Проведен кластерный анализ и установлена генетическая дивергенция изученных линий сахарной свеклы. Генотипы, находящиеся на значительном удалении друг от друга, рекомендованы для скрещивания (20 комбинаций) и создания высокопродуктивных гибридов.

Ключевые слова: сахарная свекла, гибридизация, SSR-маркеры, генетические расстояния, ПЦР-анализ, гибриды.

Введение. Селекция, генетика, цитология, физиология, биохимия наиболее полно реализуются в процессе разработки эффективных методов создания и оценки селекционного материала и в итоге – при формировании новых высокопродуктивных гибридов.

Применительно к сахарной свекле, на долю которой приходится около 40 % мирового производства сахара, задачи, стоящие перед учеными, непрерывно усложняются. Если в недалеком прошлом основным показателем результативности селекционного процесса был выход сахара с единицы сырья и площади, то сейчас к числу главнейших требований относятся и такие факторы, как возделывание свеклы с минимальными затратами ручного труда, повышение технологического достоинства сырья, выращивание семян с высокими посевными и физическими качествами и т. д. Селекция – мощный рычаг совершенствования культурных растений, создания новых форм, пород

и сортов. Менее чем за полтора века селекционной работы сахарная свекла из огородного растения превратилась в важнейшую техническую культуру, ее урожайность и сахаристость возросли более чем в 3 раза. На смену сростноплодным (многосемянным) сортам пришли раздельноплодные (односемянные), наряду с фертильной стали возделывать стерильную по пыльце свеклу. В практику вошли диплоидные, триплоидные и тетраплоидные формы культуры. Появление новых форм повлекло за собой изменение принципов, направлений и методов селекции. В поле зрения ученых оказалась не только свекла первого года жизни, но и семенные растения (свекла второго года жизни), которым раньше уделялось меньше внимания. Важное значение для селекции приобрело число хромосом (плоидность) и строение клубочков (плодность), стерильность и фертильность пыльников, сроки и период цветения, форма и крупность семян и т. д. Раздельноплодные, тетраплоидные и стерильные по пыльце формы сейчас стали основным объектом селекционно-генетической работы, поскольку они позволяют наиболее плотно использовать эффект гетерозиса при наименьших затратах ручного труда. Именно эти формы послужили фундаментом главного современного направления селекции сахарной свеклы, которое можно сформулировать как создание односемянных (раздельноплодных) диплоидных и триплоидных гибридов на стерильной основе. Параллельно с селекционно-генетической работой ведутся большие исследования по семеноводству: совершенствуются приемы поддержания самоопыленных линий и тетраплоидных компонентов, методов формирования гибридов, схема семеноводства [1].

Главным направлением селекции сахарной свеклы является создание гетерозисных гибридов, устойчивых к био- и абиотическим стрессорам. В настоящее время одним из приоритетных способов повышения

эффективности современной селекции является разработка и использование системы вспомогательных молекулярных маркеров для выявления скрытой генетической изменчивости [2–4]. В ряде исследований выявлена актуальность оценки генетической однородности и отбора дивергентных генотипов с использованием ДНК-маркеров для подбора родительских пар для гибридизации. Принцип маркерного подхода к селекции очень удобен при анализе больших объемов генетических ресурсов [5–7]. Использование методов молекулярного анализа экономически выгодно. Одним из наиболее распространенных методов определения генетического полиморфизма у растений является SSR-метод [8, 9].

При промышленном семеноводстве сахарной свеклы необходимо строго следить за поддержанием качества и размножением линий – компонентов гибридов. Одним из инструментов сопровождения этого процесса может быть метод микросателлитного анализа. Имеется множество сообщений о микросателлитных локусах в геноме сахарной свеклы. Однако для их использования в селекционной практике нужна высокопроизводительная и удобная в применении технология анализа. Для создания такой технологии, позволяющей получать стабильные ДНК-профили, требуется более детальное изучение геномных микросателлитных профилей на большой выборке верифицированного селекционного материала сахарной свеклы. Т.В. Шалаевой с коллегами [10] впервые проведен детальный анализ первичной структуры ряда микросателлитных локусов генома сахарной свеклы с целью определения природы полиморфизма этих участков генома и их пригодности для получения устойчивых ДНК-профилей. В результате генетического анализа 146 линий сахарной свеклы авторами отобрано 35 линий с высокой степенью однородности. Однородные линии сахарной свеклы (все растения имели идентичный ДНК-профиль по микросателлитным локусам) в дальнейшем были вовлечены в селекционный процесс в качестве компонентов для создания новых гибридов. Линии с неполной однородностью (менее 80 %) подвергались дальнейшему самоопылению с последующим ежегодным контролем однородности. Кроме того, в последнее время появилось много работ китайских ученых об активном использовании полногеномного анализа ассоциаций (genome-wide association studies, GWAS) для выявления генов-кандидатов сахарной свеклы, связанных с селекционно-значимыми признаками растений [11, 12]. Так, X. Li с соавторами [11] определил 10 генов устойчивости к болезням и 5 генов, связанных с сахаристостью, 9 генов, ассоциированных с фертильностью пыльцы. D. Liu с соавторами [12] при использовании GWAS - анализа для 977 генотипов из 21 страны идентифицировали гены-кандидаты с участием значимых маркеров для стержневого корня, листьев

и других 13 важных агрономических признаков роста и развития растений сахарной свеклы. Данный метод, требующий использования заведомо большого количества маркеров и применяемый для анализа широкого спектра генотипов, открывает новые возможности для расшифровки молекулярно-генетических механизмов, контролируемых сложные полигенные признаки. Успех метода сильно зависит от генетической структуры анализируемой выборки, от количества и распределения молекулярных маркеров. GWAS стал более доступным благодаря данным полногеномного секвенирования и создания на его основе подходов к высокопроизводительному генотипированию. В последние несколько лет GWAS стал неотъемлемым методом и для выявления новых хозяйственно-ценных генов. Данные исследования имеют важное теоретическое и практическое значение в селекции культуры.

Материалы и методы исследований. В качестве материалов для молекулярного исследования были использованы проростки раздельноплодных МС линий сахарной свеклы, линий-закрепителей стерильности О-типа, сростноплодных опылителей различного происхождения селекции ВНИИСС.

Выделение геномной ДНК из растительной ткани осуществлялось наборами фирмы ООО «Синтол» (г. Москва). Качество выделенной НК определено путем электрофореза в 1%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Полученная ДНК растворялась в 10 мМ трис-НСl-буфера, рН 8,0, содержащем 0,1 мМ ЭДТА и использовалась для ПЦР-анализа. Полимеразно-цепная реакция проводилась на амплификаторе «Genius» (Великобритания). Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований осуществлена с использованием программного обеспечения PAST. При проведении генотипирования селекционных образцов сахарной свеклы были использованы 11 праймеров к микросателлитным локусам генома: Unigene16898, Unigene 17623, Unigene 22373, Unigene 27833 [8], Bv21, Bv23 [6], FD1002, BQ584493, BQ585656 [13] Sb15, Sb04 [14]. Молекулярно-генетические экспериментальные исследования проведены в трехкратной биологической повторности.

Результаты исследований и обсуждение. Для надежной идентификации растений сахарной свеклы определяющее значение имеет подбор наиболее информативных микросателлитных локусов. Одним из современных методов генетического анализа, рекомендуемых экспертами UPOV (Международного союза по охране новых сортов растений) для целей молекулярной идентификации, является метод микросателлитного маркирования, в результате которого можно получить индивидуальную характеристику отдельного генотипа – его ДНК-профиль [15]. Важной особенностью микросателлитных (или SSR – simple sequence repeat) локусов, tandemно повторяющихся

Таблица 1. Матрица генетических расстояний (по Эвклиду) селекционных образцов сахарной свеклы

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	0.00	3.61	3.74	4.24	4.58	3.87	4.90	4.80	4.12	4.58	5.00	4.80	4.80	4.52	4.69	4.80	4.58	4.90
2	3.61	0.00	2.65	3.00	4.00	2.83	4.36	4.24	3.16	3.74	4.24	3.74	3.74	3.64	3.87	3.74	3.74	4.36
3	3.74	2.65	0.00	2.83	3.87	2.65	4.24	4.36	3.32	4.36	4.80	4.12	4.12	4.04	4.47	4.36	4.36	4.24
4	4.24	3.00	2.83	0.00	4.36	2.24	4.47	4.58	3.61	3.61	3.87	3.32	3.00	3.50	3.46	3.61	4.36	4.00
5	4.58	4.00	3.87	4.36	0.00	4.00	1.73	2.00	4.24	4.47	4.47	4.47	4.24	4.16	4.36	4.24	2.83	2.24
6	3.87	2.83	2.65	2.24	4.00	0.00	4.36	4.47	2.83	3.74	4.00	3.74	3.46	3.03	3.61	3.74	4.00	4.12
7	4.90	4.36	4.24	4.47	1.73	4.36	0.00	2.24	4.36	4.36	4.12	4.36	4.12	4.28	4.24	4.36	3.00	2.45
8	4.80	4.24	4.36	4.58	2.00	4.47	2.24	0.00	4.47	4.69	4.69	4.69	4.47	4.63	4.58	4.69	3.16	3.00
9	4.12	3.16	3.32	3.61	4.24	2.83	4.36	4.47	0.00	4.24	4.24	4.47	4.24	3.35	4.12	3.74	3.16	4.36
10	4.58	3.74	4.36	3.61	4.47	3.74	4.36	4.69	4.24	0.00	2.83	2.45	3.16	3.19	2.24	3.16	4.24	4.36
11	5.00	4.24	4.80	3.87	4.47	4.00	4.12	4.69	4.24	2.83	0.00	2.83	2.83	3.35	2.24	3.16	4.24	4.12
12	4.80	3.74	4.12	3.32	4.47	3.74	4.36	4.69	4.47	2.45	2.83	0.00	2.45	3.03	2.65	3.16	4.24	4.12
13	4.80	3.74	4.12	3.00	4.24	3.46	4.12	4.47	4.24	3.16	2.83	2.45	0.00	2.47	2.24	2.45	4.00	3.61
14	4.52	3.64	4.04	3.50	4.16	3.03	4.28	4.63	3.35	3.19	3.35	3.03	2.47	0.00	3.03	2.47	3.35	3.78
15	4.69	3.87	4.47	3.46	4.36	3.61	4.24	4.58	4.12	2.24	2.24	2.65	2.24	3.03	0.00	2.24	4.12	4.00
16	4.80	3.74	4.36	3.61	4.24	3.74	4.36	4.69	3.74	3.16	3.16	3.16	2.45	2.47	2.24	0.00	3.46	3.87
17	4.58	3.74	4.36	4.36	2.83	4.00	3.00	3.16	3.16	4.24	4.24	4.24	4.00	3.35	4.12	3.46	0.00	3.00
18	4.90	4.36	4.24	4.00	2.24	4.12	2.45	3.00	4.36	4.36	4.12	4.12	3.61	3.78	4.00	3.87	3.00	0.00

ди-, три-, тетра- и пентануклеотидных мотивов является их большая подверженность мутационной изменчивости по сравнению со структурными генами. Это связано с тем, что большинство SSR-локусов не несет информации о признаках и свойствах организма и не подвержено воздействию со стороны естественного отбора. Как следствие, микросателлиты очень полиморфны. Высокий полиморфизм в сочетании с распространенным мультиаллелизмом делает их перспективными молекулярными маркерами в селекции растений. На основе выявленных аллелей нами рассчитана матрица генетической дивергенции исследованных генотипов сахарной свеклы, построены кластеры (рис. 1), рассчитано генетическое расстояние (по Эвклиду), в соответствии с алгоритмом PAST, (табл. 1) [16].

Обозначения:

1-МС 020002; 2-МС 020004; 3-МС 020008;
4-МС 020014; 5-МС 020016; 6-МС 020018;
7-МС 020020; 8-МС 020022; 9-МС 020024;
10-ОП 021719; 11-ОП 021722; 12-ОП 021723;
13-ОП 021724; 14-ОП 021727; 15-ОП 021728;
16-ОП 021729; 17-ОП 021730; 18-ОП 021732.

Наибольшие генетические расстояния $D=5,0$ установлены между генотипами: МС 020002 и ОП 021722. Также по результатам кластерного анализа рекомендованы следующие родительские пары для гибридизации, находящиеся на значительном генетическом удалении друг от друга:

МС 020002 и ОП 021730 ($D=4,58$);
МС 020002 и ОП 021729 ($D=4,8$);
МС 020002 и ОП 021728 ($D=4,69$);
МС 020002 и ОП 021727 ($D=4,52$);
МС 020002 и ОП 021732 ($D=4,9$);
МС 020002 и ОП 021719 ($D=4,5$);
МС 020002 и ОП 021723 ($D=4,80$);
МС 020002 и ОП 021724 ($D=4,8$);
МС 020004 и ОП 021732 ($D=4,36$);
МС 020004 и ОП 021722 ($D=4,24$);
МС 020004 и ОП 021729 ($D=3,87$);
МС 020004 и ОП 021730 ($D=3,74$);
МС 020008 и ОП 021732 ($D=4,24$);
МС 020008 и ОП 021729 ($D=4,47$);
МС 020008 и ОП 021722 ($D=4,8$);
МС 020014 и ОП 021732, ($D=4,00$);
МС 020014 и ОП 021730 ($D=4,36$);
МС 020022 и ОП 021727 ($D=4,63$);
МС 020022 и ОП 021729 ($D=4,69$);
МС 020024 и ОП 021723 ($D=4,47$).

Выявленный уровень генетической дифференциации изученных генотипов иллюстрирует их расположение на дендрограмме, полученной при многомерном шкалировании матрицы корреляционного сходства. Образцы, имеющие сходную генетическую структуру по изученным микросателлитным локусам ядерной ДНК, располагаются в непосредственной близости друг от друга и не рекомендуются для скрещиваний.

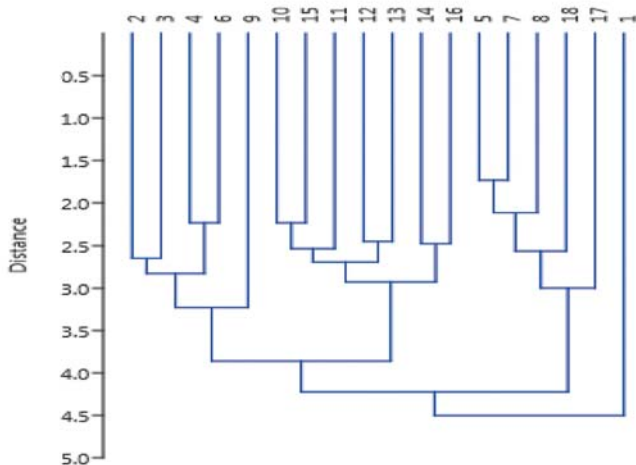


Рисунок 1. Генетические взаимоотношения селекционных образцов на основе межгрупповых связей

Генотипы, выбранные по результатам кластерного анализа и генетически наиболее удаленные друг от друга, были высажены на 6-ти изолированных участках – «клумбах» в посевах подсолнечника:

- «Клумба 42» МС 708 х ОП 21724;
- «Клумба 43» МС 708 х ОП 21727;
- «Клумба 44» МС 708 х ОП 21728;
- «Клумба 45» МС 708 х ОП 021732;
- «Клумба 46» МС 708 х ОП 021723;
- «Клумба 47» МС 1949 х ОП 021722.

В результате проведенной гибридизации получены гибридные семена сахарной свеклы, характеризующиеся высокой степенью раздельноплодности, которые будут высеяны в 2024 г. в полевые условия для проведения предварительных испытаний по продуктивности, технологическим качествам и устойчивости к биотическим и абиотическим стрессорам.

Список использованных источников

1. Балков И.Я. Селекция сахарной свёклы на гетерозис. - М.: Россельхозиздат, 1978. - 137 с.
2. Хлесткина, Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции / Е.К. Хлесткина, // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. - №17(4/2).- С. 1044-1054.
3. Thudi, M. Genomic resources in plant breeding for sustainable agriculture /M. Thudi, R. Palakurthi, J. Schnable // J Plant Physiol. 2021. - V. 257:153351.
4. Liuhuizi, D. Construction of SSR Fingerprint and Analysis of Genetic Diversity of Sugar Beet Varieties / D. Liuhuizi, P. Zhi, W. Zedong // J. Crops. 2021. - V. 37(5). - P.72-78.
5. Michel, S. Genomic selection of parents and crosses beyond the native gene pool of a breeding program / S. Michel, F. Löschenberger, C. Ametz // Plant Genome. 2021. - V. 14. - e. 3. - e20153.
6. Smulders, M. Characterization of sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) varieties using microsatellite markers / M. Smulders, G. Esselink, G. Danny, J. Riek, B. Vosman // BMC Genetics. 2010. - V. 11-41.
7. Galewski, P. Genetic diversity among cultivated beets (*Beta vulgaris*) assessed via population-based whole genome sequences /

P. Galewski, JM. Mcgrath // BMC Genomics. 2020. - V.21. - P. 1-14.

8. Fugate, K. Generation and Characterization of a Sugar beet Transcriptome and Transcript-Based SSR Markers / K. Fugate, D. Fajardo, B. Schlautman, J. Ferrareze, M. Bolton // The Plant Genome. 2014. - V.7 - №2. - P. 1-13.

9. Nalbandyan, A.A. Polymorphic Microsatellite Markers to Study Sugar Beet's (*Beta vulgaris* L.) Genetic Diversity / A.A. Nalbandyan, T.P. Fedulova, T.I. Kryukova, I.V. Cherepukhina, N.V. Kulikova // Russian Agricultural Sciences. 2023. - V. 49. - P. 1-7.

10. Шалаева, Т.В. Исследование микросателлитных локусов генома сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) для создания технологии генетического анализа линий и гибридов / Т.В. Шалаева, Ю.В. Анискина, О.С. Колобова, Н.С. Велишаева, А.В. Логвинов, В.Н. Мищенко, И.А. Шилов // Сельскохозяйственная биология. 2023. - Т. 58(3). - С. 483-493.

11. Li, X. Genomic and transcriptomic-based analysis of agronomic traits in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) pure line IMA1 / X. Li, W. He, J. Fang, Y. Liang et al. // Front. Plant Sci. 2022. - V.13:1028885.

12. Liu, D. Genetic diversity and genome-wide association study of 13 agronomic traits in 977 *Beta vulgaris* L. germplasms / D. Liu // BMC Genomics. 2023. - V. 24:413.

13. Richards, Ch. Polymorphic microsatellite markers for inferring diversity in wild and domesticated sugar beet (*Beta vulgaris*) / Ch. Richards, M. Brownson, Sh. Mitchell // Molecular Ecology Notes. 2004. - V. 4. - P. 243-245.

14. McGrath, J.M. An open-source first-generation molecular genetic map from a sugarbeet x table beet cross and its extension to physical mapping / J.M. McGrath, D. Trebbi, A. Fenwick // Plant Gen. 2007. - V.1. - P. 27-44.

15. Svirshchevskaya, A.M. New germplasm through gynogenesis in sugar beet. Broad Variation and Precise Characterization - Limitation for the Future // XVI EUCARPIA Section Genetic Resources Workshop. - Poland. Poznan. 2002. - V. 100-107.

16. Чесноков, Ю.В. Оценка меры информационного полиморфизма генетического разнообразия / Ю.В. Чесноков, А.М. Артемьева // Сельскохозяйственная биология. 2015. - Т. 50. - № 5. - С. 571-578.

Effective selection of sugar beet parental pairs for hybridization based on microsatellite markers

A.A. Nalbandyan, T.P. Fedulova, I.V. Cherepukhina, T.N. Bagmutova,
E.A. Slepokurova

Summary. To select parental pairs for hybridization, genotyping of 18 sugar beet samples was performed using 12 SSR markers. The highest level of polymorphism (PIC) was established for the loci: Bv21 (PIC=0.85), BQ585656 (PIC=0.83), Sb04 (PIC=0.84), Sb15 (PIC =0.74), FD1002 (PIC =0.73). This made it possible to clearly identify and differentiate the breeding material of sugar beet. Based on the results of PCR analysis, the genetic distances between separate-fruited MS forms and conjoined pollinators were calculated. A cluster analysis was carried out and the genetic divergence of the studied sugar beet lines was established. Genotypes located at a considerable distance from each other are recommended for crossing (20 combinations) and creating highly productive hybrids.

Key words: sugar beet, hybridization, SSR markers, genetic distances, PCR analysis, hybrids.