

Изучение биохимических и молекулярно-генетических особенностей межвидовых гибридов сахарной свёклы

Е.Н. ВАСИЛЬЧЕНКО, ст. научн. сотрудник

Т.П. ЖУЖЖАЛОВА, гл. научн. сотрудник, д-р биолог. наук, профессор

О.А. ЗЕМЛЯНУХИНА, научн. сотрудник, канд. биолог. наук

Е.О. КОЛЕСНИКОВА, ст. научн. сотрудник

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова»

(e-mail: biotechnologiya@mail.ru)

Введение

В современных условиях развития сельскохозяйственного производства приоритетным направлением в селекции сахарной свёклы является создание высокопродуктивных гибридов на линейной основе. В повышении продуктивности сахарной свёклы и производства сахара из этой культуры важная роль принадлежит созданию принципиально новых исходных материалов и на их основе сортов и гибридов, пригодных для возделывания по интенсивной технологии. Большая экономическая значимость сахарной свёклы в России требует в настоящее время внедрения в селекционный процесс нетрадиционных биотехнологических методов на основе культуры изолированных органов и тканей, позволяющих целенаправленно получать генетически улучшенный исходный материал для создания перспективных гибридов нового поколения. Данные технологии могут быть реализованы лишь с учётом специфики морфо-генетических потенций развития органов растений, обеспечивающих в условиях *in vitro* активные процессы морфогенеза, регенерации и размножения [1].

Важнейшим методом обогащения культурных растений явля-

ется межвидовая гибридизация, посредством которой совершается передача ценных признаков от диких видов к культурным. Это позволяет расширить спектр генетической изменчивости сахарной свёклы, а также получить адаптивные генотипы с хозяйственно ценными признаками [2]. По литературным данным известно, что отдалённая и межвидовая гибридизация являются мощным стрессовым фактором, способным вызывать структурные изменения гибридизуемого генома в процессе его стабилизации [3].

Особое значение при разработке биотехнологических схем культивирования приобретает использование биохимических маркерных признаков, ускоряющих и облегчающих процессы создания и отбора форм растений с новыми свойствами в условиях *in vitro*. Физиолого-биохимический анализ на начальных стадиях развития созданных форм может помочь выделить наиболее интересные экземпляры с точки зрения устойчивости к разному роду стрессам, включая получение гибридных растений. Это связано с тем, что сами по себе условия *in vitro* являются стрессовыми, меняют программу работы генов, другими словами – изменяют эпигенетическую программу [4].

Для более эффективного применения в селекции полученных интрогрессивных форм, несущих новые гены устойчивости, представляет интерес исследование особенностей интрогрессии элементов донора.

Детекцию интрогрессии чужеродного генетического материала в геноме сахарной свёклы проводят с помощью ДНК-маркеров. В настоящее время широко используются методы исследования полиморфизма на уровне ДНК – установление нуклеотидной последовательности, метод полимеразной цепной реакции, метод рестрикционного анализа и др.

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), или специфичной амплификации ДНК, – наиболее простой и не требует больших материальных затрат, с его помощью изучают структуру генома, определяют степень гибридности, идентифицируют сорта, гибриды и линии. На данный момент разработаны различные модификации ПЦР и оценена их возможность для решения прикладных задач.

В связи с вышеизложенным целью настоящих исследований явилось выявление физиолого-биохимических и молекулярно-генетических особенностей у растений-регенерантов сахарной свёклы, полученных при межвидовой

гибридизации, культивируемых в условиях *in vitro*.

Материалы и методы

В работе были использованы материалы Рамонской селекции ФГБНУ ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова.

Для получения межвидовых гибридов использовали мужско-стерильную (МС) односемянную форму *B. vulgaris* L. ($2n = 18$) и фертильную многосемянную дикую форму *B. corolliflora* Z. ($4n = 36$). В целях получения межвидовых гибридов проводили принудительное опыление пыльцой дикого вида. Асептические незрелые зародыши от межвидовой гибридизации *B. vulgaris* × *B. corolliflora* вводили в культуру *in vitro* на агаризованные питательные среды. Отбор полученных в результате скрещивания межвидовых форм с разным набором хромосом ($2n = 18$; $3n = 27$; $2n = 27$; 18) и их родительских компонентов осуществляли с помощью проточной цитофотометрии на анализаторе плоидности Partec PA.

Активность пероксидазы (ПО; КФ 1.11.1.7) определяли в гомогенатах тканей растений в реакции окисления бензидина. Активность

глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФД; КФ 1.1.1.49), определяли по методике А.А. Землянухина [5].

Детекцию интрогрессии чужеродного генетического материала в геном сахарной свёклы проводили методом ПЦР-амплификации с использованием видоспецифических праймеров [6].

Результаты исследований

В результате исследований выявлено, что диплоидные ($2n = 18$), триплоидные ($3n = 27$) и миксоплоидные ($2n = 27$; 18) гибридные растения, полученные от скрещивания *B. vulgaris* L. × *B. corolliflora* Z., различались по общей активности фермента пероксидазы (ПО). Так, у диплоидных растений она оказалась примерно равной активности ПО у материнской формы и составила 9 ФЕ/мл; эта активность примерно на 4 ФЕ/мл выше, чем у отцовского компонента – дикой свёклы (рис. 1).

Следует отметить, что активность пероксидазы миксоплоидных растений-регенерантов была значительно (почти в 3 раза) ниже, чем у материнской формы, и её показатель соответствовал 3,5 ФЕ/мл. Триплоидные растения характеризовались понижен-

ной активностью данного фермента по сравнению с культурной свёклой в 3 раза (3,8–3,9 ФЕ/мл) и в 1,5 раза в сравнении с дикими видом *B. corolliflora*.

Изучение общей активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (глюкозо-6-Ф-ДГ) выявило значительное её повышение по сравнению с родительскими формами, которая у 27-хромосомных растений была выше в 2 раза (0,12 ФЕ/мл), а у 18-хромосомных растений – в 3,5 раза (0,18 ФЕ/мл). У миксоплоидных форм этот показатель составил 0,06 ФЕ/мл и практически не отличался от родительских компонентов (рис. 2).

Изменения ферментативной активности вызваны, по-видимому, стрессовым состоянием метаболизма гибридных растений при интрогрессии генома дикой свёклы в геном сахарной, а также изменением плоидности клеток.

В результате молекулярного анализа методом ПЦР у части растений, полученных от скрещивания *B. vulgaris* L. × *B. corolliflora* Z., был выявлен чужеродный генетический материал, присущий дикому виду. ПЦР-анализ позволил выявить у диплоидных и миксопло-

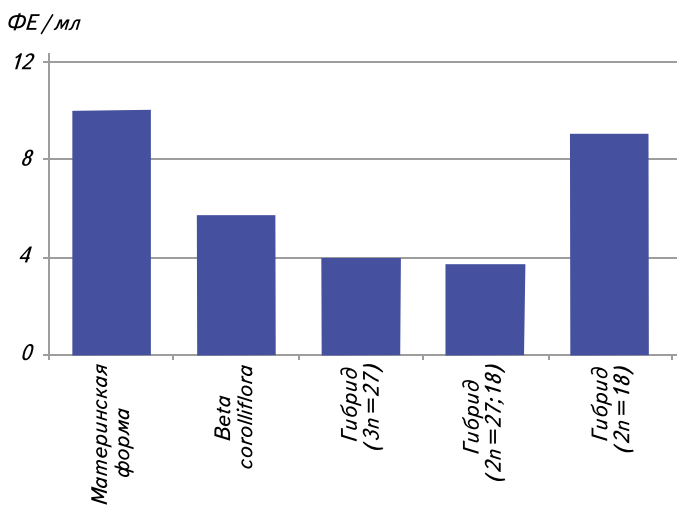


Рис. 1. Общая активность пероксидазы у родительских форм и межвидовых гибридов

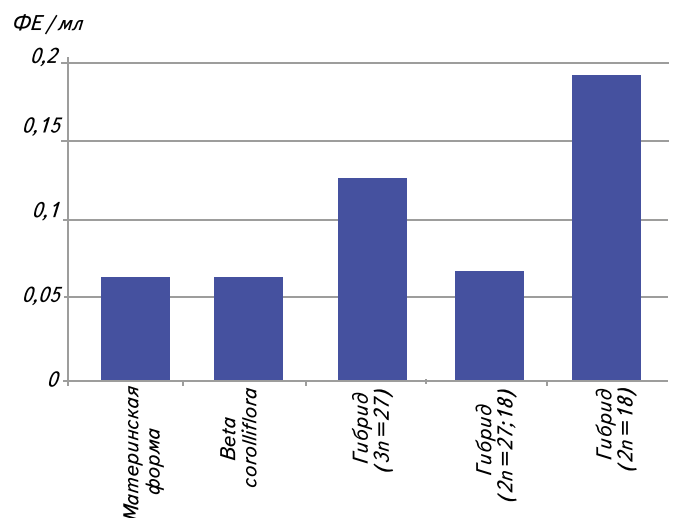


Рис. 2. Общая активность глюкозо-6-Ф-ДГ родительских форм и гибридных растений

идных гибридных потомств сателлитные участки ДНК (размер амплифицированного фрагмента составил 161 п. н.), видоспецифичные для *B. corolliflora* Z. (рис. 3). У материнских МС-растений и 27-хромосомных растений данного фрагмент отсутствовал.

Выявленный продукт полимеразной цепной реакции (161 п. н.) является результатом специфического связывания праймера с матрицей, что подтверждает наличие сателлитной последовательности *Haе III*, которая представляет собой видоспецифический признак дикого вида свёклы *B. corolliflora* в геноме исследуемых растений. Результаты экспериментов указывают на то, что в составе генетического аппарата растений, полученных от скрещивания *B. vulgaris* × *B. corolliflora*, присутствуют некоторые элементы дикой свёклы. Это позволило нам предположить, что 18-хромосомные растения, несущие фенотип культурной свёклы, являются гибридными, имеющими отдельные элементы генома дикого вида; поэтому их можно использовать при отборе исходных форм для селекционной работы [7]. Кроме того, для выявления межвидовых гибридов свёклы ис-

пользуют также праймеры к сателлитной ДНК, видоспецифичной для *B. vulgaris*.

Амплификация ДНК родительских форм и растений от межвидового скрещивания *B. vulgaris* × *B. corolliflora* показала наличие элементов генома культурной свёклы в гибридных формах (рис. 4).

В результате амплификации геномных ДНК растений, полученных от скрещивания *B. vulgaris* × *B. corolliflora*, со специфическими праймерами, было установлено, что искомая сателлитная ДНК присутствует в диплоидной, миксоплоидной и триплоидной формах гибридов в разной степени выраженности. В миксоплоидной форме чётко выражены 4 tandemных повтора, в то время как в диплоидных и триплоидных растениях сателлитная последовательность повторяется большее число раз, о чём свидетельствует наличие минорных продуктов амплификации. Результаты указывают на то, что в составе генетического аппарата как диплоидных, триплоидных, так и миксоплоидных растений, полученных от скрещивания *B. vulgaris* × *B. corolliflora*, присутствуют элементы ДНК культурной свёклы. Анализ полученных электрофореграмм свидетельствует, что в гено-

ме *B. vulgaris* наблюдается наличие двух tandemов сателлитной ДНК. В геноме *B. corolliflora* таких повторов обнаружено не было.

Выводы

Представленные результаты показывают физиолого-биохимические особенности у растений свёклы в условиях *in vitro*, позволяющие проследить изменения активности фермента окислительного стресса – пероксидазы и некоторых ключевых ферментов основных метаболических циклов клетки.

В результате молекулярного анализа у диплоидных гибридов ($2n = 18$) и миксоплоидов ($2n = 27; 18$), полученных от скрещивания *B. vulgaris* L. × *B. corolliflora* Z., были выявлены сателлитные участки ДНК, видоспецифичные для дикого вида *B. corolliflora* Z.

Проведённый ПЦР-анализ родительских и гибридных форм с использованием праймеров к видоспецифической сателлитной ДНК *B. vulgaris* является точным методом идентификации

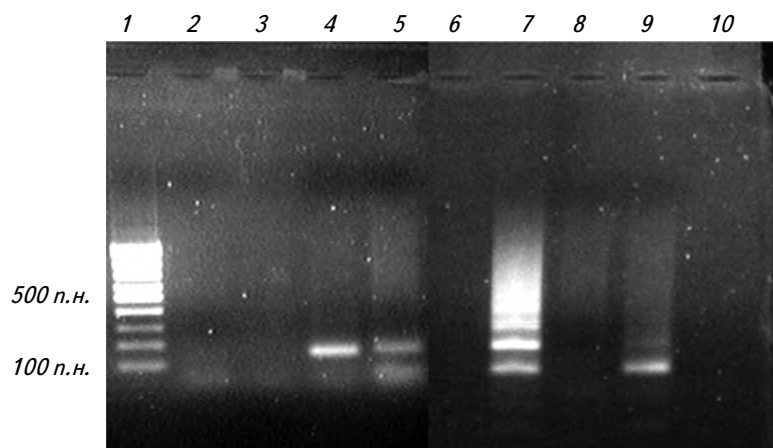


Рис. 3. ПЦР-продукты родительских форм и межвидовых гибридов: 1 – маркер молекулярной массы; 2, 6 – материнская МС-форма; 3, 8 – растения ($2n = 27$); 4, 9 – растения-миксоплоиды ($2n = 27; 18$); 5 – растение ($2n = 18$); 7 – *B. corolliflora*; 10 – отрицательный контроль (вода)

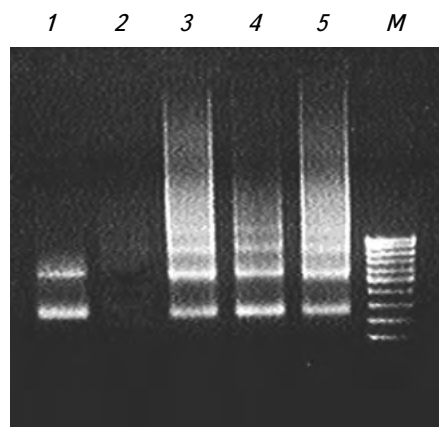


Рис. 4. Амплификация геномной ДНК родительских форм свёклы и гибридных растений со специфическими праймерами к сателлитной ДНК *B. vulgaris*: 1 – *B. vulgaris*; 2 – *B. corolliflora*; 3 – диплоидные растения ($2n = 18$); 4 – миксоплоидные растения ($2n = 27; 18$); 5 – триплоидные растения ($3n = 27$); М – маркеры молекулярной массы ДНК

Мы знаем о сахаре всё!

А вы?



чужеродного материала в геноме гибридных растений. В частности, метод амплификации геномной ДНК со специфическими праймерами к данной сателлитной ДНК можно использовать для оценки генетического родства гибридных и родительских форм свёклы.

В результате экспериментов выделены и отобраны межвидовые гибриды сахарной свёклы с морфологическими и функциональными изменениями генома, которые можно использовать в качестве исходных форм в процессе селекционной работы.

Список литературы

1. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – Р.Г. Бутенко. – М., 1999. – 160 с.

2. Бунин, М.С. Межвидовая гибридизация в роде *Capsicum* L. и её использование в селекции. Методика / М.С. Бунин [и др.]. – М., 2008 – 82 с.

3. Тютюрев, С.Л. Экологически безопасные индукторы устойчивости растений к болезням и физиологическим

стрессам / С.Л. Тютюрев // Вестник защиты растений. – 2015. – Т. 1. – № 83. – С. 3–13.

4. Ванюшин, Б.Ф. Эпигенетика сегодня и завтра // Вавиловский журнал селекции и генетики. – 2013. – Т. 17. – № 4–2. – С. 805–832.

5. Землянухин, А.А. Большой практикум по физиологии и биохимии растений / А.А. Землянухин, Л.А. Землянухин. – Воронеж : ВГУ, 1996. – 188 с.

6. Буренин, В.И. Генетические ресурсы рода *Beta* (свёкла) / В.И. Буренин. – СПб., 2007. – 274 с.

7. Федулова, Т.П. Использование ПЦР-анализа для идентификации межвидовых гибридов *Beta vulgaris* × *Beta corolliflora* zoss / Т.П. Федулова [и др.] // Биотехнология: состояние и перспективы развития. Пятый московский международный конгресс. Ч. 1. – М., 2009. – Стр. 312–313.

Аннотация. В статье приведена физиолого-биохимическая и молекулярно-генетическая оценка межвидовых форм сахарной свёклы в культуре *in vitro*. Показано, что диплоидные ($2n = 18$), триплоидные ($3n = 27$) и миксоплоидные ($2n = 27; 18$) растения, полученные от скрещивания *B. vulgaris* L. × *B. corolliflora* Z., различались по общей активности пероксидазы и глюкозо-6-Р-дегидрогеназы. В результате проведённого молекулярного анализа методом ПЦР у части растений, полученных от скрещивания, был выявлен чужеродный генетический материал, присущий дикому виду.

Ключевые слова: сахарная свёкла, межвидовые гибриды, биохимическая оценка, ПЦР-анализ.

Summary. The article presents a physiological-biochemical and molecular-genetic assessment of interspecific forms of sugar beet in *in vitro* culture. It was shown that diploid ($2n = 18$), triploid ($3n = 27$) and mixoploid ($2n = 27; 18$) plants obtained from crossing *B. vulgaris* L. × *B. corolliflora* Z. differed in the total activity of peroxidase and glucose-6-P-dehydrogenase. As a result of the conducted molecular analysis by PCR in some plants obtained from crossing, foreign genetic material inherent in the wild species was identified.

Keywords: sugar beet, interspecific hybrids, biochemical assessment, PCR analysis