KAHL
akahl.com

УДК 633.63:631.52
doi.org/10.24412/2413-5518-2022-3-38-41

Скрининг исходных материалов сахарной свёклы на наличие минисателлитных локусов TRs, связанных с ЦМС*, S

Т.П. ФЕДУЛОВА, *д-р биолог. наук*
А.А. НАЛБАНДЯН, *канд. биолог. наук (e-mail: arpnal@rambler.ru)*
Т.Н. ДУВАНОВА, *мл. научный сотрудник*
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова»

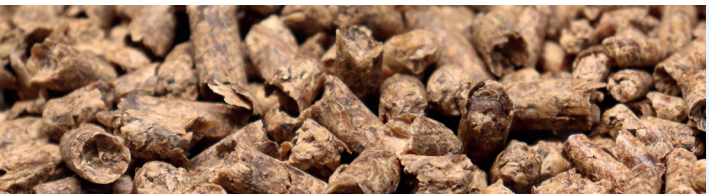
Введение

Приоритетным направлением в современной селекции сахарной свёклы является создание высокопродуктивных гибридов на ЦМС-основе с использованием линейного исходного материала. Развитие методов молекулярного анализа генов высших растений позволило изучать не только ядерные, но и митохондриальные, и хлоропластные геномы. Так, установлено, что цитоплазматические детерминанты системы ЦМС, использование которой в селекции имеет большое значение, находятся в митохондриальном геноме. Была определена полная нуклеотидная последовательность (501020 п. н.) митохондриального генома из цитоплазматической мужской стерильности (CMS) сахарной свёклы [1, 2]. Это позволило сравнить последовательность с ранее опубликованной для митохондриального генома нормальной сахарной свёклы с мужской фертильностью. Сравнение показало, что два генома имеют одинаковый набор генов с известной функцией. Гены рРНК и тРНК, закодированные в митохондриальном геноме CMS, обладают 100%-ной идентичностью последовательностей с соответствующими аналогами в нормальном геноме.

Обнаружены в общей сложности 24 однонуклеотидные замены (SNP) в 11 белковых генах, кодируемых митохондриальным геномом CMS. Однако ни один из них, по-видимому, не является причиной мужского бесплодия. Кроме того, было выявлено, что несколько ОРС (открытые рамки считывания) генома активно транскрибируются в митохондриях сахарной свёклы. Среди них установлено, что Norf246 присутствует в нормальном митохондриальном геноме, но отсутствует в геноме CMS. Наоборот, геном CMS содержит четыре транскрибируемых ОРС (Satp6presequence, Scox2-2, Sorf324 и Sorf119), отсутствующих в нормальном геноме. Было показано, что эти ОРС, которые являются потенциальными кандидатами в гены CMS, генерируются перестройками митохондриального генома [3]. Цитоплазматическая мужская стерильность (CMS), «митохондриально» наследуемый признак, который приводит к абортированию пыльцы, часто встречается в диких популяциях. Это порождает систему размножения, называемую гинодиэцией. В растениях *Beta vulgaris* ssp. *maritima* обнаружено, что CMS-G широко распространена во всём ареале этого вида. Несмотря на секвенирование митохондриального генома CMS-G, фактор стерилизации митохондрий, вызывающий CMS-G, до сих пор неизвестен. Путём биохимической характеристики CMS-G авторы настоящей статьи выявили, что у растений CMS-G изменена экспрессия нескольких митохондриальных белков. В частности, Cox1, основная субъединица цитохром-с-оксидазы (комплекс IV), крупнее, но всё ещё может собираться в комплекс IV. Однако CMS-G-специфический комплекс IV был обнаружен только в виде стабилизированного димера. Авторы не наблюдали изменения сродства комплекса IV к цитохрому С, но в CMS-G ёмкость комплекса IV снижена. Показано, что CMS-G сохраняется во многих естественных популяциях, несмотря на то что он связан с атипичным комплексом IV. Предполагается, что модифицированный комплекс IV может играть роль в поддержании гинодиэции в диких популяциях [4]. Наличие митохондриального гена/локуса, обеспечивающего стерильность у растений-регенерантов сахарной свёклы, изучали с использованием минисателлитных праймеров семейства TR: TR1, TR2, TR3 и TR4. Известно, что минисателлиты – высоковариабельные тандемные повторы широко используются для оценки полиморфизма митохондриального генома. Ранее в результате исследований иностранных авторов были обнаружены и описаны четыре локуса тандемных повторов (TR1, TR2, TR3 и TR4) в митохондриальном геноме сахарной свёклы. Семейство минисателлитов TR состоит из тандемных повторов длиной 30–32 п. н., количество которых варьировало от 2 до 13 среди исследованных генотипов свёклы.

*ЦМС – цитоплазматическая мужская стерильность

[S] Выбор спонсора научных публикаций осуществляется по усмотрению редакции, любая взаимосвязь между видами деятельности спонсора и результатами научной работы исключается


ВЫСОКОКАЧЕСТВЕННЫЙ КОРМ
ИЗ ПОБОЧНЫХ ПРОДУКТОВ
akahl.com

Было показано, что маркеры TR1 и TR3 сцеплены с генами, контролирующими ЦМС. Признак ЦМС – один из немногих связанных с генами митохондрий у высших растений. Он выражается в формировании пыльников со стерильной пыльцой [5–7].

В связи с этим выявление локус-специфических ДНК-маркеров для молекулярного генотипирования и идентификации локусов, сцепленных с признаком ЦМС у растений сахарной свёклы, является актуальным направлением исследований.

Материалы и методы исследований

В качестве материалов для исследований были изучены 50 генотипов сахарной свёклы селекции ФГБНУ ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова, любезно предоставленные доктором сельскохозяйственных наук В.П. Ошевневым (лаборатория ЦМС) под амбарными номерами № 120–170. Тотальную ДНК (в пяти повторностях) экстрагировали из зелёной листовой массы с использованием наборов для выделения ДНК (ЗАО «Синтол») [8]. Качество образцов оценивали электрофорезом в 1,2%-ном агарозном геле, концентрацию определяли с помощью набора HS QubitR (ThermoFisherScientific, США). ПЦР осуществляли на приборе SimpliAmp (ThermoFisherScientific, США).

Протокол ПЦР: 1) денатурация 94 °С в течение 4 мин; 2) далее 30 циклов: денатурация 94 °С – 35 сек; отжиг – 45 сек; элонгация при 72 °С – 60 сек; 3) заключительная элонгация при 72 °С – 7 мин.

Состав ПЦР-смеси: 1×ПЦР – буфер, 2,5мМ $MgCl_2$, по 0,2мМ смеси dНТФ, 1 ед. Taq ДНК-полимеразы, ДНК 500 нг, праймеры 0,5мкМ. Для молекулярно-генетического изучения генотипов сахарной свёклы нами были использованы 2 пары минисателлитных праймеров семейства TR (TR1 и TR3) [5]. Нуклеотидные последовательности и характеристики использованных пар праймеров представлены в таблице.

Результаты исследований и их обсуждение

Поиск новых источников ЦМС имеет важное научное и практическое значение для селекции сахарной свёклы. Из всех изученных цитоплазм практическую ценность для селекции в связи с использованием ЦМС в целях получения гибридных семян имеют только две: стерильная (*S vulg.*) и фертильная (*N vulg.*). Для выявления минисателлитных локусов TR, связанных с ЦМС у растений сахарной свёклы, нами было проведено молекулярно-генетическое тестирование 50 образцов на ЦМС, которая контролируется митохондриальными генами. Для подтверждения молекулярно-генетическими методами принадлежности исследуемых генотипов сахарной свёклы к МС- и О-тип-формам нами проведена амплификация ДНК образцов с праймерами TR1 и TR3. Амплификация ДНК изучаемых генотипов с праймером TR1 выявила фрагменты длиной ~700 п. н., характерные для форм закрепителя стерильности О-типа; с праймером TR3 ~500 п. н. Ампликоны длиной ~400 п. н. присущи МС-формам (при амплификации и с TR1, и с TR3).

В качестве примера приводим некоторые рисунки амплифицированных фрагментов ДНК, выявленные с использованием данных олигонуклеотидов у инбредных линий сахарной свёклы различного происхождения (рис. 1). У всех растений генотипов под № 140 и 141 выявлены ДНК-ампликоны, характерные для МС-форм: ~400 п. н.

Амплификация растений генотипа под № 154 позволила обнаружить ДНК-фрагменты, характерные для форм закрепителей стерильности О-типа; генотипы под № 155 и 156 содержали в своём гено-

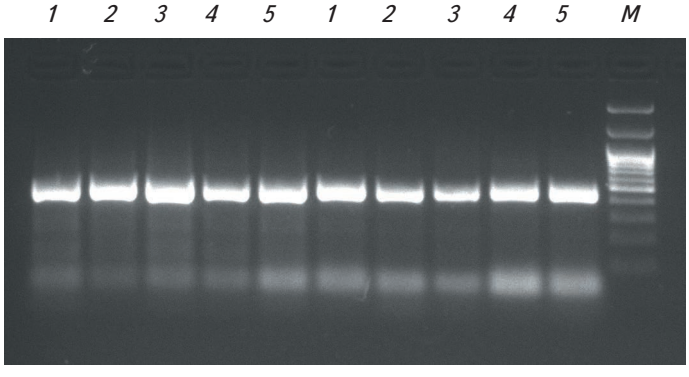
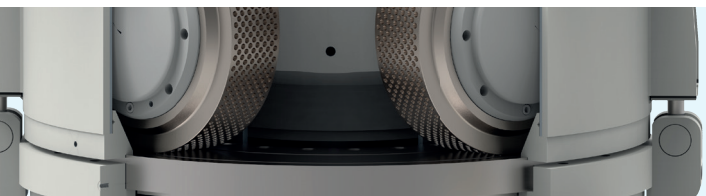


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР с использованием праймера TR3. Дорожки слева направо: № 140 и 141 (по 5 растений). М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™, 100–3000 п. н. (Thermo Fisher Scientific, США)

Нуклеотидные последовательности и характеристики минисателлитных праймеров

Праймеры	Последовательность 5/–3/	Tm, °C	(ссылка)
TR1	F: AGAACTTCGATAGGCGAGAGG R: GCAATTTTCAGGGCATGAACC	59	Nishizawa, 2000
TR3	F: AGATCCAAACAGAGGGACTG R: CGGATCACCCTATTCATTTG	56	– // –


ПРЕСС-ГРАНУЛЯТОРЫ
AMANDUS KAHL
KAHL

KAHL
akahl.com

ме ДНК-фрагменты, присущие МС-форме: ~700 п. н. и ~400 п. н. соответственно (рис. 2).

Генотипы № 160–162 также были амплифицированы с праймером TR1. Растения первых двух генотипов проявили себя как МС-формы. В растениях генотипа № 162 обнаружили оба вышеуказанных ампликона. Поскольку в геноме выявляются оба фрагмента, однозначно говорить о его принадлежности к МС- или О-типу нельзя. Доказано, что как N-, так и S-специфичные маркеры присутствуют в цитоплазмах растений и с оуэновским плазмотипом, и с плазмотипом, который обеспечивает образование фертильной пыльцы. Данные, полученные А.Г. Брагиным [9], свидетельствуют о том, что имеет место совместное присутствие митохондриальных геномов N- и S-типов в пределах митохондриального генома растений одной линии. Этим и можно объяснить неоднородность генотипа № 162 (рис. 3).

Амплификация ДНК генотипов № 122 и 123 с праймером TR3 показала наличие фрагментов длиной ~500 п. н. (присущие растениям О-типа с данным праймером) у растений генотипа № 123. Ампликоны длиной ~400 (свойственные растениям МС-форм) присутствовали у растений генотипа № 122 (рис. 4).

Заключение

Таким образом, в результате проведённых молекулярно-генетических исследований можно констатировать, что апробированные нами праймеры TR1 и TR3 позволяют на ранних этапах селекционного процесса разделять растения сахарной свёклы на мужскостерильные (МС) и опылители – закрепители стерильности Оуэн-типа (О-тип) формы, что имеет важную теоретическую и практическую значимость для селекции. Из всех 50 исследованных линий сахарной свёклы на основе данных олигонуклеотидных праймеров выделено 44 генотипа, характерных для ЦМС-форм и 2 – свойственных формам Оуэн-типа. 4 генотипа имели растения как МС-, так и О-тип форм. 1 генотип характеризовался наличием растений с МС- и Оп-формами. Проведённые молекулярные исследования позволяют избежать длительного и кропотливого изучения и браковки растений сахарной свёклы по фенотипическому проявлению признаков стерильности/фертильности, закрепительной способности в тепличных и полевых условиях, сокращая сроки создания гибридов в два-три раза.

Отобранные по изученным молекулярно-генетическим маркерам генотипы сахарной свёклы будут вовлечены в дальнейшую селекционную работу по созданию высокопродуктивных гибридов на основе ЦМС с закреплённым уровнем гетерозиса.

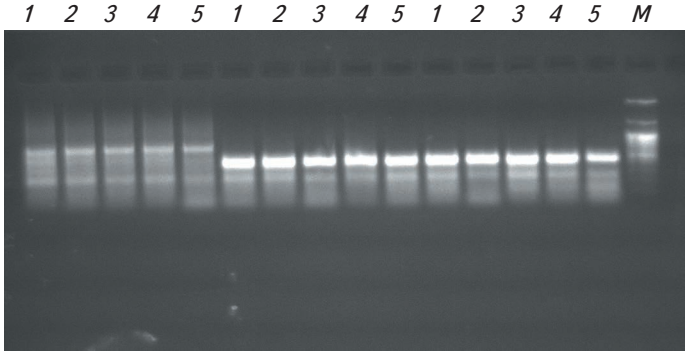


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР с использованием праймера TR1. Дорожки слева направо: № 154, 155, 156 (по 5 растений). М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™, 100–3000 п. н. (Thermo Fisher Scientific, США)

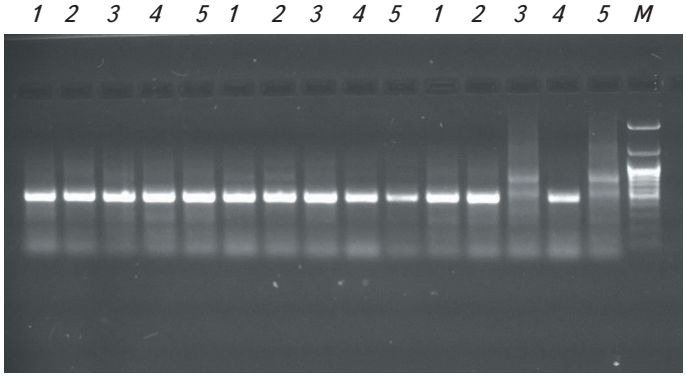


Рис. 3. Амплифицированные ПЦР-продукты с использованием праймера TR1. Дорожки слева направо: № 160, 161, 162 (по 5 растений). М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™, 100–3000 п. н. (Thermo Fisher Scientific, США)

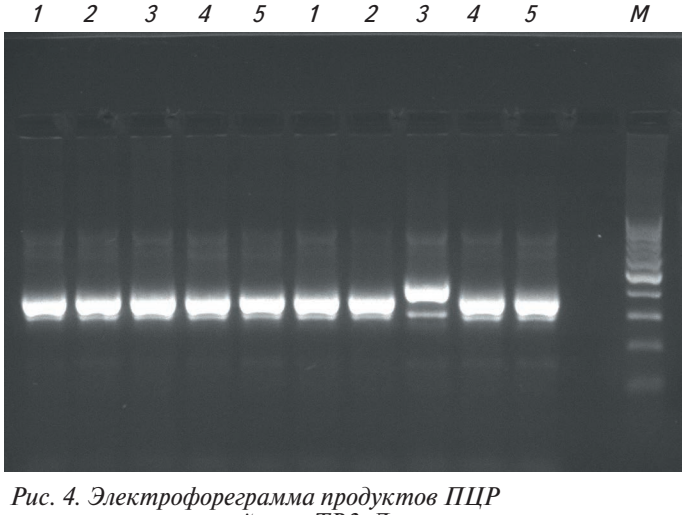
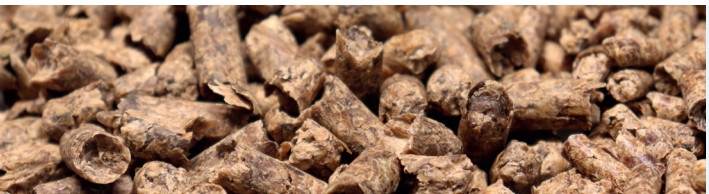


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов ПЦР с использованием праймера TR3. Дорожки слева направо: № 122 и 123 (по 5 растений). М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™, 100–3000 п. н. (Thermo Fisher Scientific, США)


ВЫСОКОКАЧЕСТВЕННЫЙ КОРМ
ИЗ ПОБОЧНЫХ ПРОДУКТОВ
akahl.com

ЖУРНАЛ САХАР

Журнал «Сахар» объявляет стихотворный конкурс к 220-летию российской свеклосахарной отрасли!

Лучшие стихи будут опубликованы в номерах журнала «Сахар» 04(22)–12(22)*

Тексты** редакция просит присылать до 30 сентября 2022 г. на электронный адрес редакции журнала «Сахар»: *sahar@saharmag.com*

ВАЖНО
Должны быть указаны:
ФИО автора;
название предприятия;
контакты автора (телефон, e-mail).

(*) Требования: текст должен быть уникальным, состоять из 16 строк и включать слова: «220 лет», «свеклосахарная отрасль», «Россия».
(**) Отправляя текст на конкурс, автор соглашается с передачей редакции журнала «Сахар» прав на опубликование текста и/или использование его в других материалах журнала «Сахар», сайтов www.rossahar.ru и www.saharmag.com, а также на обработку персональных данных.

25 лет С Днём Сахарника!

Впиши себя в историю свеклосахарной отрасли России!

Список литературы

1. *Satoh, M.* The cytoplasmic male-sterile type and normal type mitochondrial genomes of sugar beet share the same complement of genes of known function but differ in the content of expressed ORFs / M. Satoh, T. Kubo, S. Nishizawa [et al.] // Molecular Genetics and Genomics. – 2004. – V. 272. – P. 247–256. DOI: 10.1007/s00438-004-1058-9

2. *Каракотов, С.Д.* Современные аспекты селекции гибридов сахарной свёклы (Beta vulgaris L.) / С.Д. Каракотов, И.В. Апасов, А.А. Налбандян [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2021. – V. 25. – № 4. – P. 394–400. DOI 10.18699/VJ21.043

3. *Satoh, M.* The Owen mitochondrial genome in sugar beet (Beta vulgaris L.): possible mechanisms of extensive rearrangements and the origin of the mitotype-unique regions / M. Satoh, T. Kubo, T. Mikami // Theor Appl Genet. – 2006. – V. 113. – P. 477–484. DOI 10.1007/s00122-006-0312-4

4. *Meyer, E.* CMS-G from Beta vulgaris ssp. maritima is maintained in natural populations despite containing an atypical cytochrome C oxidase / E. Meyer, C. Lehmann, S. Boivin [et al.] // Biochem J. – 2018. – V. 23. – 475(4). – P. 759–773. DOI 10.1042/BCJ20170655

5. *Nishizawa, S.* Variable number of tandem repeat loci in the mitochondrial genomes of beets / S. Nishizawa, T. Kubo, T. Mikami // Current Genetics. – 2000. – V. 37. – P. 34–38. DOI 10.1007/s002940050005

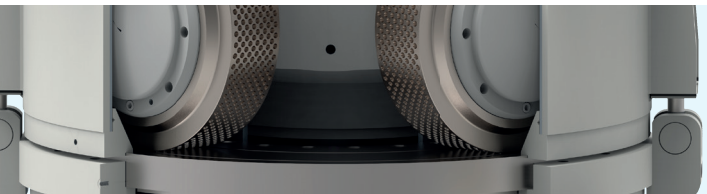
6. *Liu, Q.* Analysis of Cytoplasm Polymorphism on the TR2 Locus of Mitochondria Genome in Leaf Beet Line SK-5 / Q. Liu, L. Liu, Ch. Luo [et al.] // Advances in Biological Sciences Research. – 2017. – № 4. – P. 292–296. DOI 10.2991/bbe-17.2017.48

7. *Xia, H.* Microhomologies Are Associated with Tandem Duplications and Structural Variation in Plant Mitochondrial Genomes / H. Xia, W. Zhao, Y. Shi [et al.] // Genome Biol. Evol. – 2020. – V. 12. – № 11. – P. 1965–1974. DOI 10.1093/gbe/evaa/172

8. A Low-Cost High-Throughput Method for Plant Genomic DNA Isolation / P. Gupta, H. Salava, Y. Sreelakshmi, R. Sharma // Methods Mol Biol. – 2020. – V. 2072. – P. 1–7. DOI 10.1007/978-1-4939-9865-4_1

9. Анализ гетероплазматического состояния митохондриальной ДНК фертильных и мужскостерильных растений сахарной свёклы (Beta vulgaris) / А.Г. Брагин, М.К. Иванов, Л.А. Федосеева, Г.М. Дымшиц // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – Т. 15. – № 3. – С. 585–590.

Аннотация. Цель исследований – проведение молекулярно-генетического изучения растений сахарной свёклы отечественной селекции. Представлены результаты скрининга данных линий сахарной свёклы по двум минисателлитным маркерам TR1 и TR3. Установлено, что ДНК-маркеры митохондриального генома сахарной свёклы позволяют идентифицировать генотипы как МС- и О-тип формы. Для растений-опылителей (закрепителей стерильности) О-типа характерно наличие ДНК-ампликонов длиной 700 п. н. для праймера TR1 и 500 п. н. – для TR3. Растения МС-форм содержат ампликоны размером 400 п. н.
Ключевые слова: сахарная свёкла, митохондриальный геном, цитоплазматическая мужская стерильность, ПЦР-анализ.
Summary. Aim of the investigations is to carry out molecular-genetic study of sugar beet plants of domestic selection. The results of screening data of sugar lines by two mini-satellite markers TR1 and TR3 are presented. It has been established that DNA-markers of sugar beet mitochondrial genome allow high-reliable identification of plants as MS- and O-type forms. It has been revealed that plants-pollinators (sterility maintainers) of O-type are characterized by presence of DNA-amplicons: 700 bp in length when using the primer TR1 and 500 bp in length when using the primer TR3. The fragments of 400 bp are typical of MS plants.
Keywords: sugar beet, mitochondrial genome, cytoplasmic male sterility, PCR.



ПРЕСС-ГРАНУЛЯТОРЫ AMANDUS KAHL

KAHL