

# Молекулярно-генетическая оценка нового исходного материала *Beta vulgaris* L.

А.С. ХУССЕЙН, канд. биол. наук

Е.Н. ВАСИЛЬЧЕНКО, ст. научн. сотрудник (e-mail: vasilchenko@inbox.ru)

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

## Введение

В настоящее время основным направлением в селекции большинства сельскохозяйственных растений является создание гетерозисных F1-гибридов на основе подбора и скрещивания гомозиготных родительских линий. Традиционный метод создания гомозиготных линий для двулетней культуры *B. vulgaris* L. — самоопыление и отбор на протяжении минимум 4–6 поколений, что требует 8–12 лет [1]. Длительное время, необходимое для выведения родительских линий, — один из существенных недостатков в селекции F1-гибридов. Технологии производства удвоенных гаплоидов позволяют сократить процесс формирования чистых линий свёклы до 3–5 лет [2]. В числе значительных преимуществ данных технологий — возможность добиться полной гомозиготности в одном поколении, а также проявление рецессивных аллелей у гаплоидных растений, замаскированных в гетерозиготном состоянии у диплоидных растений, что облегчает выявление, оценку и отбор растений с полезными признаками. Удвоенные гаплоиды сельскохозяйственных растений производят *in vitro* в культуре изолированных микроспор, пыльников, неоплодотворённых семязачатков и др.

Среди технологий создания удвоенных гаплоидов *B. vulgaris* наиболее распространённой является технология культивирования неоплодотворённых семязачатков (гиногенез) [3]. Этот приём позволяет получить гомозиготные генетически стабильные линии (ДН-линии) по таким селекционно-значимым признакам, как раздельноплодность, стерильность, фертильность и др. Полученные дигаплоидные ДН-линии нуждаются в молекулярно-генетической оценке на ранних этапах развития. Поэтому цель данной работы заключалась в разработке технологии создания дигаплоидных (ДН) линий сахарной свёклы в культуре *in vitro*, их молекулярно-генетическое изучение и отбор по признакам стерильности и фертильности.

## Материалы и методы

Исследования проведены на базе ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова» (ВНИИСС).

Объектом исследований являлись родительские компоненты диплоидного гибрида сахарной свёклы РМС 129: МС-линия и закрепитель стерильности О-типа РФ8 (Рамонская фертильная), предоставленные лабораторией селекции на основе ЦМС.

Для получения гаплоидов в качестве эксплантов использовали неоплодотворённые семязачатки, изолированные из семенных растений с высокой степенью раздельноплодности (99 %) в период бутонизации и начала цветения. В качестве стерилизующего агента использовали 10%-ный раствор Жавелиона, время экспозиции 35 мин. Семязачатки, изолированные в стерильных условиях под микроскопом, помещали в жидкую питательную среду. Затем экспланты, прошедшие дифференциацию, культивировали на твёрдой агаризованной среде (агар 7 г/л) с добавлением ауксинов и цитокининов в разных сочетаниях (6-бензиламинопурина, кинетин, гиббереллин, нафтилуксусная кислота) [4].

Удвоение набора хромосом проводилось путём субкультивирования *in vitro* развитых гаплоидных микроклонов на питательной среде с добавлением стерильного 0,01%-ного раствора колхицина.

Корневая система формировалась при культивировании микроклонов на среде с содержанием нафтилуксусной кислоты (1 мг/л). Регенеранты культивировали при температуре 24–26 °С в течение 16-часового фотопериода с освещённостью 5000 люкс и относительной влажностью воздуха 70 %. Пloidность образцов определяли на проточном цитометре (Partec, Германия) согласно рекомендуемому протоколу [5].

ДНК выделяли из растений-микроклонов, полученных путём прямой регенерации, с использованием наборов для выделения геномной ДНК (ЗАО «Синтол»). Качество образцов ДНК оценивали электрофорезом в 1%-ном агарозном геле, концентрацию определяли с использованием набора HS QubitR (ThermoFisherScientific, США). ПЦР осуществляли на приборе SimpliAmp (ThermoFisherScientific, США).

Протокол ПЦР:

- 1) предварительная денатурация 94 °С в течение 4 мин;
- 2) далее 35 циклов: денатурация 94 °С — 40 сек; отжиг — 40 сек; элонгация при 72 °С — 40 сек;

3) заключительная элонгация при 72 °С – 10 мин.

Состав ПЦР-смеси: 1×ПЦР – буфер, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, по 0,2 мМ смеси dНТФ, 1 ед. Таq ДНК-полимеразы, ДНК 500 нг, праймеры 0,5 мкМ. Список использованных праймеров приведён в таблице.

Секвенирование полученных продуктов амплификации осуществляли по методу Сэнгера на генетическом анализаторе ABI PRISM 310 (Life technologies, США). Результаты прочтения нуклеотидных последовательностей анализировали в программе Mafft, версия 7 [6].

### Результаты и обсуждение

Результаты экспериментальных исследований позволили разработать технологию создания ДН-линий сахарной свёклы, которая включает в себя трёхлетний цикл проведения биотехнологических и селекционных мероприятий [7].

На первом этапе в период бутонизации и начала цветения растения отбирали по признакам раздельно-сростноцветковости, габитусу куста (хорошо обсеменённые, многостебельчатые растения). В качестве доноров эксплантов использовали преимущественно побеги центрального колоса кистевидной части плейохазия. Цитологические исследования позволили отобрать генотипы с высокой степенью фертильности и стерильности пыльцевых зёрен. Оценка растений с использованием проточной цитофотометрии позволила определить степень пloidности донорского материала. Индуцирование регенерантов из неоплодотворённых семязачатков осуществляли в жидкой питательной среде. Процесс стабилизации отобранных нормально развитых гаплоидных регенерантов проводили с использованием микроразмножения на агаризованных средах в культуре *in vitro*.

Следующий этап включал в себя диплоидизацию гаплоидного материала путём колхицинирования, стабилизацию колхицинированных растений-регенерантов, отбор по биохимическим и молекулярно-генетическим признакам и формирование ДН-линий в культуре *in vitro*.

Заключительным этапом технологии явилось укоренение дигаплоидных линий в культуре *in vitro*, выращивание штеклингов и семенных растений в закрытом грунте и получение семян ДН-линий.

Применимая технология дала возможность получить генетически и морфологически выровненный материал в два-три раза быстрее, минуя многократное самоопыление растений.

Для создания гомозиготных линий сахарной свёклы на основе гаплоидов большое значение имел отбор генотипов с ценными селекционными признаками. Известно, что в популяциях сахарной свёклы присутствуют растения с нормальной (N) и стерильной (S) цитоплазмой. У N-растений пыльца фертильная и жизнеспособная, у S-растений она может быть как фертильной, так и стерильной в зависимости от взаимодействия стерильной (S) цитоплазмы с рецессивными аллелями (*rf1* и *rf2*) ядерного гена – восстановителя фертильности. ЦМС является результатом сложного взаимодействия определённых ядерных и митохондриальных генов [8]. Одним из наиболее известных и изученных генетических факторов, участвующих в проявлении признака ЦМС, является именно данный мультилокусный ген восстановления фертильности (*Rf*), супрессор митохондриальных генов, вызывающих стерильность пыльцы [9].

Существуют и другие важные генетические факторы, которые на сегодняшний день недостаточно изучены. Одним из них является митохондриальный ген *nad1* (*BevupMp038*, субъединица 1 НАДН-дегидрогеназы), кодирующий НАДН: субъединицу Н убихинон-оксидоредуктазы. Экспрессия данного гена вносит значительный вклад во взаимодействие ядерного и митохондриального геномов. С использованием маркеров для гена *nad1* проведён анализ дигаплоидных растений-регенерантов сахарной свёклы как фертильных, так и стерильных форм (рис. 1).

Во всех образцах обнаружен фрагмент ДНК размером 400 п. н. Полученные ампликоны были отсеквенированы, выравнивание последовательностей показало их идентичность, за исключением однонуклеотидного полиморфизма. В митохондриальном геноме растений гаплоидных линий сахарной свёклы был впервые описан однонуклеотидный полиморфизм (SNP), позволивший классифицировать микроклоны на фертильные и стерильные формы. Показано, что у всех образцов с фертильной пылью, т. е. у носителей доминантного аллеля ядерного гена *Rf1*, произошла замена нуклеотида С (цитозин) на Т (тимин), при

Характеристика использованных в работе праймеров

Праймер	Последовательность 5'/3'	T <sub>m</sub> , °С	ссылка
TR1	F AGAACTTCGATAGGCGAGAGG R GCAATTTTCAGGGCATGAACC	59	Nishizawa et al., 2000
TR3	F AGATCCAAACAGAGGGACTG R CGGATCACCTATTTCATTTG	56	Nishizawa et al., 2000
nad1B	F TTTCTCTTTATGGATAACCAATTCA R AGGATTCCTTTTGTACCCAAT	55	Soranzo et al., 2003

K1 K1-1 K2 K2-1 K2-2 K3 K3-1 K3-2 K3-3

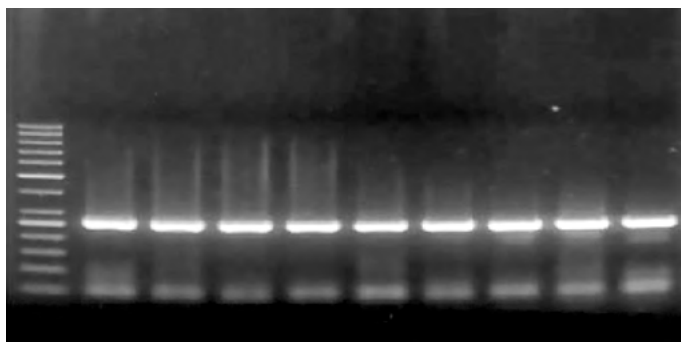


Рис. 1. Электрофореграмма фрагментов ДГ-регенерантов с использованием маркеров к гену *nad1*. K1 – контрольные фертильные растения, K2 – контрольные стерильные растения; K1-1, K2, K2-1, K2-2 – формы с нормальной (N) цитоплазмой; K3-1, K3-2, K3-3 – формы со стерильной (S) цитоплазмой. M – маркеры молекулярных масс (ДНК – маркер MassRuler™, 80–1031 п. н. «Thermo Scientific», США). Размер ампликона – 400 п. н.

этом у всех гаплоидных стерильных форм обнаружился только нуклеотид С. Данный приём исследований позволил в ускоренном режиме создавать гомозиготные линии с ценными признаками (в частности, ЦМС) для включения их в селекционный процесс при создании высокопродуктивных гибридов.

Изучение генетического полиморфизма митохондриального генома *Beta vulgaris* проводили с использованием высоковариабельных tandemных повторов – минисателлитов. В результате ранее проведённых исследований были обнаружены и описаны четыре локуса tandemных повторов (TR1, TR2, TR3 и TR4) в митохондриальном геноме сахарной свёклы. Семейство минисателлитов TR состоит из tandemных повторов длиной 30–32 п. н., количество которых варьировало от 2 до 13 среди исследованных генотипов свёклы [10]. Было показано, что маркеры TR1 и TR3 сцеплены с генами, контролирующими ЦМС. В связи с этим нами был проведён анализ полученных растений-регенерантов с использованием указанных выше праймеров.

Амплификация ДНК-образцов с праймером TR1 выявила фрагменты длиной 700 п. н. у гаплоидных форм О-типа, длиной 400 п. н. – у гаплоидных МС-форм. У образца под № 10 обнаружили оба вышеуказанных ампликона (рис. 2).

У образца под № 10 проявились оба фрагмента, и с определённой отнеси его к МС- или О-типу нельзя. Российскими авторами показано, что как N-, так и Svulg-специфичные маркеры повсеместно присутствуют в цитоплазмах растений как с оуэновским плазмотипом, так и с плазмотипом, обеспечивающим формирование фертильной пыльцы. Данные, полученные авторами, свидетельствуют в пользу существования митохондриальных геномов N-

и Svulg-типов в пределах митохондрий растений одной линии [11].

Амплификация ДНК с праймером TR3 выявила наличие фрагментов длиной 500 п. н. у гаплоидных форм О-типа, длиной 400 п. н. – у гаплоидных МС-форм. У образца № 9 ДНК-фрагментов не обнаружено (рис. 3).

Известно, что минисателлиты широко используются для оценки полиморфизма митохондриального генома. Предположительно, это и объясняет неоднородность паттернов образцов под № 9 и 10, полученных при амплификации с разными минисателлитами семейства TR.

В результате молекулярно-генетических исследований можно констатировать, что данные праймеры позволяют на ранних этапах разделять гаплоидные растения-регенеранты на МС- и О-тип формы, что имеет важную теоретическую и практическую значимость для селекции. Исключение составляют образцы № 10 (два фрагмента при амплификации с маркером TR1) и 9 (нет продукта амплификации с маркером TR3).

#### Заключение

В итоге научных изысканий создана технологическая схема ускоренного получения удвоенных линий (гомозигот) – компонентов высокопродуктивных гибридов. Из четырёх ДН-линий *Beta vulgaris* получены семена, которые применяются при размножении суперэлиты мужскостерильного компонента гибрида РМС 129. По результатам молекулярно-генетического анализа в геноме гаплоидных растений-реге-

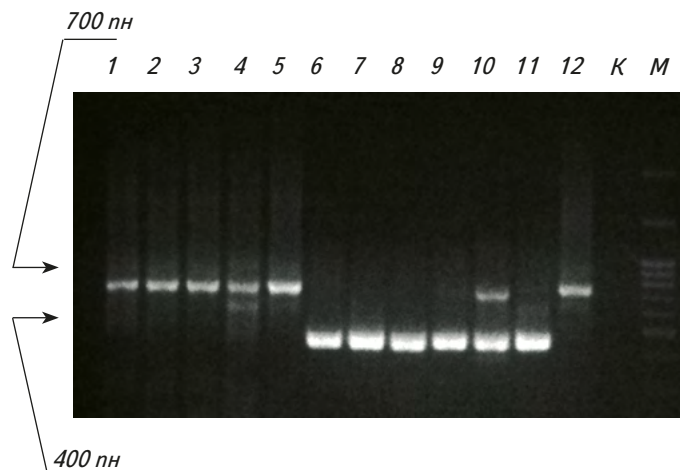


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР с использованием праймера TR1. Дорожки: 1–5, 12 – гаплоидные регенеранты опылителя О-типа; 6–9, 11 – МС-регенеранты (гаплоиды); 10 – гаплоид (микс). M – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™, 100–3000 п. н. (ThermoScientific, США). К – отрицательный контроль (стерильная вода вместо ДНК). Размеры бендов – 700 и 400 п. н.



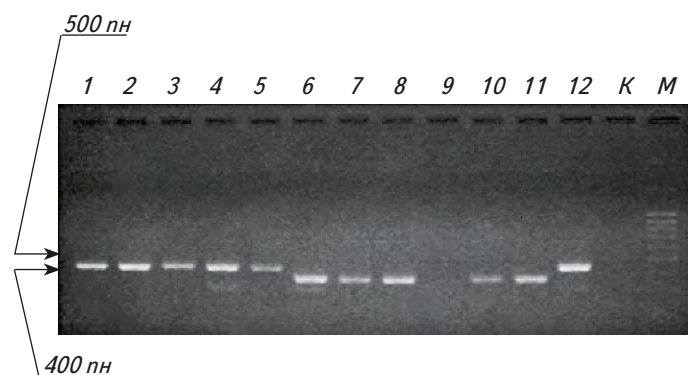


Рис. 3. Электрофореграмма разделения ПЦР-продуктов с использованием маркера TR3. Дорожки: 1–5, 12 – гаплоидные регенеранты опылителя О-типа; 6–9, 11 – МС-регенеранты (гаплоиды); 10 – гаплоид. М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™, 100–3000 п. н. (ThermoScientific, США). К – отрицательный контроль (стерильная вода вместо ДНК). Размеры бендов – 500 и 400 п. н.

нерантов выявлена однонуклеотидная замена (SNP), позволившая разделить их на фертильные и стерильные формы. Установлено, что митохондриальные минисателлитные маркеры (TR1 и TR3) позволяют отнести гаплоидные растения-регенеранты к МС- или О-тип формам.

Сочетание методов биотехнологии и молекулярной генетики с приёмами традиционной селекции даёт возможность получать новый селекционный материал для создания отечественных гибридов сахарной свёклы нового поколения.

#### Список литературы

1. De La Fuente, G.N. Accelerating plant breeding / G.N. De La Fuente, U.K. Frei, T. Lübberstedt // Trends Plant Sci. – 2013. – Vol. 18. – P. 667–672. DOI 10.1016/j.tplants.2013.09.001.
2. Biotechnological methods as a tool for efficient sugar beet breeding / Т.П. Жужжалова, Е.О. Kolesnikova, Е.Н. Vasilchenko, N.N. Cherkasova // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. – 2020. – Vol. 24 (1). – P. 40–47. DOI 10.18699/VJ20.593
3. Klimek-Chodacka, M. Comparison of haploid and doubled haploid sugar beet clones in their ability to micropropagate and regenerate / M. Klimek-Chodacka, R. Baranski // Electron. J. Biotechnol. – 2013. – Vol. 16. – No. 2. – P. 1–12. DOI 10.2225/vol16-issue2-fulltext-3
4. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999.
5. An Efficient High-throughput Flow Cytometric Method for Estimating DNA Ploidy Level in Plants / A. Cousin, K. Heel, W. Cowling, M. Nelson // Cytometry. – 2009. – No. 75 A. – P. 1015–1019.

6. Katoh, K. A simple method to control over-alignment in the MAFFT multiple sequence alignment program / K. Katoh, D. Standley // Bioinformatics. – 2016. – Vol. 32. – No. 13. – P. 1933–1942. DOI org/10.1093/bioinformatics/btw108

7. Жужжалова, Т.П. Пути воспроизведения нового организма сахарной свёклы в культуре *in vitro* / Т.П. Жужжалова, О.А. Подвигина, В.В. Знаменская // Энциклопедия рода Beta. Биология, генетика и селекция свёклы : Сб. науч. тр. Института цитологии и генетики СО РАН. – Новосибирск : Сова, 2010. – С. 403–419.

8. Unusual and Typical Features of a Novel Restorer-of-Fertility Gene of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) / H. Matsuhira, H. Kagami, M. Kurata [et al.] // Genetics. – 2012. – Vol. 192. – P. 1347–1358. DOI https://doi. 10.1534/genetics.112.145409

9. A fertility-restoring genotype of beet (*Beta vulgaris* L.) is composed of a weak restorer-of-fertility gene and a modifier gene tightly linked to the *Rf1* locus / T. Arakawa, D. Uchiyama, T. Ohgami [et al.] // PLoS ONE. – 2018. – Vol. 13. – No. 6. – P. 1–20. DOI 10.1371/journal.pone.0198409

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

11. 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 заключалась в разработке технологии создания дигаплоидных (ДН) линий сахарной свёклы в культуре *in vitro* и их молекулярно-генетическом изучении. Установлено, что ДНК-маркеры митохондриального генома сахарной свёклы, относящиеся к семейству минисателлитов TR (TR1 и TR3), позволяют с высокой эффективностью выявлять гаплоидные микроклональные растения МС-формы и О-типа. При помощи метода культуры *in vitro* получены дигаплоидные линии (ДН) мужскостерильной формы и закрепителя стерильности О-типа гибрида сахарной свёклы РМС 129.

**Ключевые слова:** сахарная свёкла, гомозиготные гаплоидные линии, цитоплазматическая мужская стерильность, ПЦР-анализ.

**Summary.** The aim of this work was to create a di-haploid (DH) lines of sugar beet *in vitro* and their molecular analysis. It has been determined that DNA-markers of mitochondrial genome in sugar beet belonging to the TR mini-satellites family (TR1 and TR3) enable an enough precise classification of haploid microclonal plants as MS and O-type forms. By suggested method, di-haploid lines (DH) of the male-sterile form and the O-type sterility maintainer of the RMS 129 sugar beet hybrid have been obtained *in vitro*.

**Keywords:** sugar beet, homozygous haploid lines, cytoplasmic male sterility, PCR-analysis.