

Подбор и апробация специфических праймеров к локусу *BR1*, сцепленному с *bolting-gene* в селекционных материалах сахарной свёклы

А.А. НАЛБАНДЯН, канд. биолог. наук, зав. лабораторией маркер-ориентированной селекции (e-mail: arpnal@rambler.ru) ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова»

Введение

Практика возделывания культурных растений показала, что наибольших успехов в создании урожайных, устойчивых и высококачественных сортов и гибридов, отвечающих требованиям современного производства, можно добиться при организации селекционной работы на молекулярно-генетической основе. Молекулярно-генетические методы могут быть использованы для более полной оценки и характеристики исходного материала и создаваемых гибридов. Такие исследования по сахарной свёкле в настоящее время широко проводятся во многих странах Европы, Азии и в США. Однако в Российской Федерации молекулярно-генетические исследования по сахарной свёкле проводятся в ограниченных масштабах, представлены фрагментарно и не используются в достаточном объёме в селекционном процессе.

Значительной проблемой в селекции сахарной свёклы является создание устойчивых к цветущности гибридов. Преждевременное цветение, или *bolting*, является нежелательной характеристикой, которая вызывает серьёзные потери сахара и урожая. Одним из важных признаков сахарной свёклы является время выхода в стрелку. Сахарная свёкла — двулетнее растение, вегетирующее в течение первого года. Удлинение стебля (выход в стрелку) у неё начинается на второй год после выдерживания при низкой температуре в течение определённого периода, сопровождаемого длиннодневными условиями.

О. Мунерати [1] впервые описал локус *B*, контролирующий ранний выход в стрелку (в первый же год) у коммерческого сорта сахарной свёклы. Ф.А. Абегт [2] описал и охарактеризовал ген, контролирующий признак однолетности у свёклы, т. е. выбрасывание цветоноса на первом году вегетации, как доминантный *B* (*bolting* — стрелкование). Помимо однолетности у сахарной свёклы наблюдалась также

цветущность — признак, не связанный генетически с однолетностью, так как проявление цветущности обусловлено исключительно условиями среды [3]. Несмотря на сходство фенотипического проявления, оба эти признака контролируются по-разному.

Перекрытое опыление дикой свёклы *B. maritima* L. с культурной на площадях производства семян родительских компонентов гибридов зарубежной селекции (Италия, Швеция, и др.) может привести к интрогрессии гена *B* в двулетние возделываемые гибриды, результатом чего будет их засорение растениями с ранним выходом в стрелку. Это ведёт к потерям урожая и содержания сахара, возникают проблемы с уборкой. Эл-Мезави [4] одним из первых начал поиск генетических маркеров, тесно сцепленных с геном *B*. Такие маркеры (AFLP и RFLP) были выявлены, показана возможность их раннего использования (уже на стадии проростков) для установления различий между растениями, которые не будут выходить в стрелку в первый год жизни. В настоящее время по разным зарубежным публикациям идентифицировано 3–6 маркеров в разных хромосомах свёклы. Для данного гена идентифицированы AFLP/RFLP/SNP/RAPD-маркеры [5–8].

Анализ данных научных исследований показал недостаточную изученность молекулярно-генетических основ формирования признака цветущности в растениях сахарной свёклы отечественной и зарубежной селекции. Вместе с тем в Российской Федерации в настоящий момент остро стоит проблема импортозависимости семенного материала сахарной свёклы, 98 % всех посевов засеваются импортными семенами. В связи с этим создание отечественных конкурентоспособных, высокопродуктивных гибридов сахарной свёклы с использованием современных приёмов молекулярной селекции представляется весьма актуальным.

Цель исследований – осуществить подбор и апробацию специфических праймеров к локусу *BRI*, сцепленному с *bolting-gene* в селекционных материалах сахарной свёклы.

Материалы и методы исследований

В качестве материалов исследования были использованы гибриды сахарной свёклы иностранной селекции, неустойчивые к цветущности, и отечественные селекционные материалы ВНИИСС, устойчивые к цветущности.

Выделение геномной ДНК из растительной ткани осуществляли при помощи 20% SDS и 3,5М ацетата аммония [9, 10]. Качество выделенной ДНК было определено путём электрофореза в 1,5%-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 была проведена на амплификаторе «Genius» (Великобритания). В работе использованы следующие специфические праймеры на гены устойчивости к цветущности: А 881, А 89, А 884, А 74, DE.

Результаты исследований и их обсуждение

Для изучения селекционного материала на наличие гена *BTС1*, контролирующего работу основных генов устойчивости к цветущности (*FT1* и *FT2*) нами были использованы 5 пар специфических праймеров. В результате проведённого ПЦР-анализа 12 селекционно-ценных образцов сахарной свёклы с использованием пары праймеров А74 F/R у 8 генотипов выявлен один ампликон размером 800 п. н.: № 3 (МС17070), 4 (F1 18092), 5 (ОП 18094), 26 – (F1₁₁), 30 – (МС 1, ВИР), 31 – (МС 2, ВИР), 37 – (1186 РС 8 × 7 цветущный), 41 – (1186 РС 8 × 7, нецветущный). У двух номеров (36 – свекла 1-го года, цветущное растение F1_{1,1}; 38 – F1_{1,2} цветущный) обнаружен ПЦР-продукт длиной 1500 п. н. В генотипах № 3 и 26 обнаружены оба фрагмента (рис. 1).

При использовании сконструированного в Primer BLAST* специфического праймера DE F/R в изученных образцах выявлены следующие фрагменты 200, 300, 600, 800 п. н. у № 1 (МС17070), у растений № 2 (F1 18092) 200, 300, 600, п. н. (рис. 2).

Среди номеров, где обнаружены ПЦР-продукты, присутствуют как цветущные, так и нецветущные растения. Объясняется это наличием в гене *BTС1* определённых SNPs (однонуклеотидные замены), в данном случае в экзонах 9 и 10, что способствует преобразованию цветущного генотипа

3 4 5 26 27 30 31 36 37 38 41 42 К⁻ М

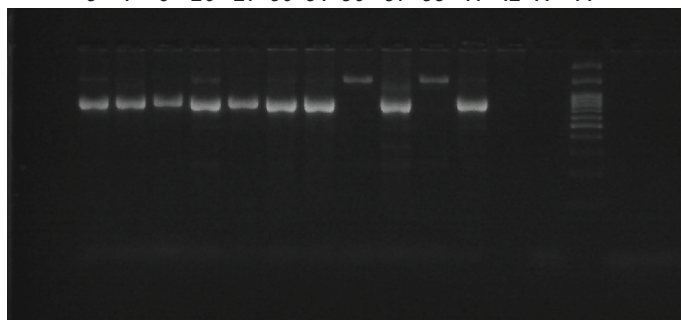


Рис. 1. ПЦР-амплификация генотипов свёклы с праймером А74 F/R.

Обозначения образцов: 3 – МС17070; 4 – F1 18092; 5 – ОП 18094; 26 – F1₁₁; 27 – Beta maritima; 30 – МС 1, ВИР; 31 – МС 2(ВИР); 36 – (свёкла 1-го года, цветущное растение F11.1); 37 – (1186 РС 8 × 7, цветущный); 38 – (F1_{1,2} цветущный); 41 – (1186 РС 8 × 7, нецветущный); 42 – (F1_{1,2} нецветущный); К⁻ – (ПЦР-смесь без ДНК); М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™ (ThermoScientific, США)

в нецветущный [11]. Для изучения данного явления некоторые ампликоны были направлены на секвенирование (№ 4, 26).

Данные по секвенированию 10-го экзона № 26 (F1₁₁), который позиционируется селекционерами как цветущный генотип, были проанализированы в программе Geneious Prime. При сравнении селекционного № 26 и контрольного образца (GenBank, NCBI), обладающего устойчивым генотипом с двухлетним циклом развития, было подтверждено наличие известных SNPs, характерных для цветущих

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 К⁻ М



Рис. 2. ПЦР-амплификация генотипов свёклы с праймером DE F/R.

Обозначения образцов: 1 – МС17070; 2 – F1 18092; 3 – ОП 18094; 4 – F1₁₁; 5 – Beta maritima; 6 – МС 1, ВИР; 7 – МС 2(ВИР); 8 – (свёкла 1-го года, цветущное растение F1_{1,1}); 9 – (1186 РС 8 × 7, цветущный); 10 – (F1_{1,2} цветущный); 11 – (1186 РС 8 × 7, нецветущный); 12 – (F1_{1,2} нецветущный); К⁻ – (ПЦР-смесь без ДНК); М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™ (ThermoScientific, США)

*<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>.

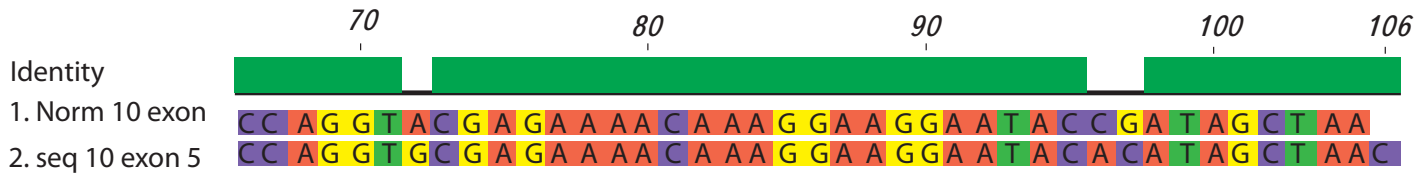


Рис. 3. Фрагмент локализации SNPs в 10-м экзоне образца № 26

генотипов. Также в генотипе образца № 26 было выявлено четыре новых SNPs в экзоне 10. На рис. 3 представлен фрагмент секвенированного по Сэнгеру 10 экзона, где наглядно продемонстрировано положение известной однонуклеотидной замены A/G в позиции 72, а также двух новых – C/A и G/C в позициях 96 и 97 соответственно.

В результате проделанной работы впервые в гене BTC1 были обнаружены новые однонуклеотидные замены в 10-м экзоне, которые меняют аминокислотный состав полипептидной цепи, что в итоге приводит к экспрессии функционально другого белка. Исходя из наличия конкретных однонуклеотидных замен, можно с определённой долей вероятности говорить о предрасположенности тех или иных генотипов к раннему цветению.

Список литературы

1. *Munerati, O.* L'eredita della tendenza alla annualita nella commune barbabietola coltivata / *O. Munerati, A. Reihe // Zeitschrift für Züchtung, Pflanzenzüchtung.* – 1931. – V. 17. – P. 84–89.
2. *Abegg, F.A.* A genetic factor for the annual habit in beets and linkage relationship / *F.A. Abegg // J. Agric. Res.* – 1936. – V. 53. – P. 493–511.
3. *Pin, P.* The Role of a Pseudo-Response Regulator Gene in Life Cycle Adaptation and Domestication of Beet / *P. Pin [et al.]. – Current Biology.* – 2012. – № 22. – P. 1095-1101. doi 10.1016/j.cub.2012.04.007
4. *El-Mezawy, A.* Highresolution mapping of the bolting gene B of sugar beet / *A. El-Mezawy, F. Dreyer, G. Jacobs, C. Jung // Theoretical and Applied Genetics.* – 2002. – V. 105. – P. 100–105.
5. *Biscarini, F.* Genomic predictions for binomial traits in sugar beet populations / *F. Biscarini [et al.] // BMC Genet.* – 2014. – 87(15), 3–9. doi: 10.1186/1471-2156-15-87
6. *Höft, N.* Haplotype Variation of Flowering Time Genes of Sugar Beet and Its Wild Relatives and the Impact

on Life Cycle Regimes / *Höft N. [et al.] // Front Plant Sci.* 2018. – 2211(8). doi: 10.3389/fpls.2017.02211.

7. *Tränkner, C.* A detailed analysis of the BR1 locus suggests a new mechanism for bolting after winter in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) / *C. Tränkner [et al.] // Front. Plant Sci.* – 2016. – № 7. – P. 1662. doi: 10.3389/fpls.2016.01662

8. *Tränkner, C.* Deciphering the complex nature of bolting time regulation in *Beta vulgaris* / *C. Tränkner [et al.] // Theor. Appl. Genet.* – 2017. – 130(8). – P. 1649–1667. doi: 10.1007/s00122-017-2916-2

9. *Hussein, A.S.* Efficient and nontoxic DNA isolation method for PCR analysis / *A.S. Hussein [et al.] // Russian Agricultural Sciences.* – 2014. – № 40(3). – P. 177–178.

10. *Mahuku, G.S.* A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal and bacterial DNA / *G.S. Mahuku // Plant Mol. Biol. Rep.* – 2004. – № 22. – P. 71–81.

11. *Höft, N.* Sequence variation in the bolting time regulator BTC1 changes the life cycle regime in sugar beet / *N. Höft, N. Dally, Ch. Jung // Plant Breeding, Original article,* 2018. doi: 10.1111/pbr.12579

Аннотация. В статье приведены предварительные данные по результатам исследования гена BTC1 (BOLTING TIME CONTROL 1), контролирующего время цветения растений сахарной свёклы, посредством регуляции работы двух генов-кандидатов: супрессора (Flowering Time 1) и индуктора (Flowering Time 2) данного физиологического процесса.

Ключевые слова: генетические маркеры, ПЦР, цветущность, сахарная свёкла.

Summary. In the paper, preliminary data are presented that have resulted from studying the gene BTC1 (BOLTING TIME CONTROL 1) controlling time of sugar beet plant flowering by regulation of two genes-candidates – the supressor (Flowering Time 1) and the inducer (Flowering Time 2) of this physiological process-functioning.

Keywords: genetic markers, PCR, bolting, sugar beet.