



УДК 633.63:575:632.52.577.1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА СОРТОТИПОВ СВЁКЛЫ КОРНЕПЛОДНОЙ *BETA VULGARIS*L.

Т.П. Федулова**Д.Н. Федорин**

Всероссийский НИИ сахарной свёклы им. А.Л. Мазлумова, Россия, 396030, Воронежская обл., Рамонский р-н, п. ВНИИСС, д.86

E-mail: biotechnologiya@mail.ru

Данная работа посвящена молекулярно-генетическому изучению сортотипов свёклы корнеплодной (*Beta vulgaris* L.). Выявлена генетическая структура и полиморфизм по ретротранспозонам и микросателлитным локусам сортобразцов сахарной, кормовой, столовой и полусахарной свёклы и внутривидовых гибридов с их участием. Показаны отличительные черты организации генома у образцов сахарной и кормовой свёклы по микросателлиту Bvv 48.

Ключевые слова: сахарная, столовая и кормовая свёкла, ПЦР-анализ, микросателлиты

Введение

В селекции сахарной свёклы остро стоит проблема создания исходного материала с новыми признаками и свойствами. От степени разнообразия такого материала, его генетической изученности в решающей степени зависит успех селекционной работы. Естественное внутривидовое генетическое разнообразие свёклы невелико. Лучшие современные сорта и гибриды свёклы имеют узкую генетическую основу. В настоящее время одной из актуальных задач является создание генетической базы сортотипов свёклы корнеплодной, используемых в селекции.

В культуре известны четыре группы разновидностей свёклы. Столовая свёкла относится к числу скороспелых, урожайных растений, её корнеплоды обладают хорошей лёжкостью при длительном хранении и овальной формой, оптимальной для современной свеклоуборочной техники. Кормовая свёкла характеризуется высокой урожайностью за счет большой массы корнеплода. Сахарная свёкла относится к высокосахаристым и урожайным культурам. Листовая свёкла используется в основном в декоративных целях. В последние годы в нашей стране и за рубежом все больше получают распространение сорта и гибриды полусахарной свёклы. Использование сортов такого типа позволяет механизировано проводить уборку корнеплодов, применяя машины, сахарно-свекловичного уборочного комплекса. Сорта и гибриды полусахарной свёклы отличаются средним уровнем урожайности, но имеют повышенное содержание сухого вещества в корнеплодах. По выходу сухого вещества на единицу площади полусахарные формы превосходят типично кормовые. Поэтому перед селекционерами стоит задача по созданию новых сортов и гибридов полусахарной свёклы, адаптированных к возделыванию в разных регионах Российской Федерации [1].

Полусахарная, кормовая и столовая свёклы используются в гибридизации с сахарной свеклой при создании гетерозисных гибридов с оптимальной формой корнеплода. Генетические ресурсы свёклы состоят из генетического разнообразия разных разновидностей и диких популяций.

При создании и внедрении новых сортов и гибридов свёклы, отвечающих требованиям современных технологий, особую значимость приобретает научно-обоснованный выбор исходного материала и его оценка по молекулярно-генетическим маркерам. Для изучения генетической структуры и проведения по полученным данным генотипирования и паспортизации сортотипов свёклы пригоден микросателлитный анализ, так как он обладает высокой разрешающей способностью и позволяет характеризовать большую часть исследуемой ДНК. На первоначальном этапе необходимо:

– подобрать пары праймеров для генотипирования сортотипов рода *Beta*;

– провести скрининг коллекции разновидностей свеклы на генетическую однородность по происхождению.

Известно, что простые повторения последовательностей генома (SSR) показывают высокие степени вариабельности даже среди близкородственных индивидов. Так, с использованием микросателлитных маркеров была выявлена высокая генетическая изменчивость среди диких разновидностей свёклы, низкая среди культурных, и средняя среди сорняковых форм [2]. Сочетание трёх полиморфных локусов позволило провести индивидуальную идентификацию у 17/17 диких и 15/15 сорняковых разновидностей свёклы и 21/32 преимущественно гомозиготных, культурных разновидностей свёклы. В результате ПЦР-анализа коллекции селекционных материалов сахарной свёклы были отобраны 15 пар микросателлитных праймеров, позволяющих выявить полиморфизм генотипов данной культуры [3], которые амплифицировали от 2 до 21 аллели на локус. Авторами разработано 25 новых микросателлитных маркеров для сахарной свёклы, из которых были отобраны 12 с моделями высокого качества, чтобы охарактеризовать 40 диплоидных и триплоидных гибридов. Эти маркеры могут также использоваться для картирования и в молекулярной селекции.

Так, методом ПЦР была установлена общая структура, которая закрепляет 331 маркер, включая 23 новых, нанесенных на генетическую карту маркера повторения простой последовательности (SSR), имеющей совокупно в общей сложности 526.3 сМ среди девяти групп связей свеклы. Источником картирования была популяция от скрещивания сахарной свеклы со столовой [4].

SSR-маркеры до сих пор широко используются в популяционной генетике свёклы например, контроль потока генов от культурных к диким разновидностям [5, 6, 7], но совсем мало применяются в генетике свёклы, хотя эти кодоминантные маркеры особенно подходят для помощи селекции, характеризуя гетерозиготные состояния. У свёклы были образованы несколько библиотек геномных ДНК, но создано ограниченное число SSR-маркеров [2, 8, 9]. В связи с этим выявление ДНК-маркеров для идентификации сортотипов в генофонде корнеплодной свеклы (*Beta vulgaris* L.), проведения скрининга и паспортизации является актуальным направлением исследований.

Исходя из вышеизложенного, цель исследований заключалась в выявлении микросателлитных последовательностей, информативных для идентификации сортотипов рода *Beta*.

Материал и методы исследований

В качестве материалов для исследований были использованы проростки следующих разновидностей корнеплодной свеклы: столовой свеклы (*convar. esculenta salise*) – сортотипов Бордо, Хавская односеменная, Цилиндра; кормовой (*convar. crassa Alef.*) – сортотипов Эккендорфская желтая, Полусахарная белая, образцы односемянной кормовой белой свёклы; сахарной (*convar. saccharifera Alef.*) – урожайно-сахаристый сортотип – РМС-73, РМС-90; сорта-популяции Рамонского, Белоцерковского, Ялтушковского, Веселоподолянского происхождения. Геномная ДНК выделялась из 0,2 г зеленых листьев растений свеклы с помощью гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформного метода с использованием СТАВ. Качество выделенной ДНК определялось электрофорезом в 1%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Полученная ДНК была растворена в 10 мМ трис-НСl-буфер, рН 8,0, содержащим 0,1 мМ ЭДТА, и использована для ПЦР-анализа. ПЦР-анализ проводился в амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия). Параметры амплификации были следующие: предварительная денатурация при 95°C в течение 10 минут, затем 30 циклов: 95°C-40с, 62°C-40с, 72°C-40с и финальный этап элонгации цепи 72°C-5 мин. В качестве праймеров использовали умеренно повторяющиеся последовательности нуклеотидов Raw S 6, Raw S 16 к семейству ретротранспозонов [10], [] и гомологичные их консервативным участкам. В работе были использованы также праймеры к микросателлитным локусам: Bvv 48, Bvv 51, Bvv 53, Bvv 54 [3].

Опыты были проведены в трехкратной биологической повторности.



Результаты исследований и их обсуждение

Проведенный ПЦР-анализ геномной ДНК с праймерами к умеренно повторяющимся последовательностям и последующий электрофорез продуктов реакции в 1%-ном агарозном геле показали высокий генетический полиморфизм исследуемых образцов по локусам RawS 6 и RawS 16.

В результате амплификации геномных ДНК растений с праймерами RawS 6 выявлено, что в составе генома всех исследованных организмов обнаруживается общий ампликон с длиной около 700 п.н. (рис 1). При этом в растениях №1, 5 (кормовая красная свёкла), №11 (гибрид ЛБС-16×КБ) и №12 (ЛБС-16) – это единственный ПЦР-продукт, что указывает на сходство их генетического материала. Кроме того, полное сходство состава ампликонов наблюдается и в образцах 1, 6, 10, 14, где длины ампликонов составляют 700 и 900 п.н. Наибольшее число сайтов амплификации обнаружено у образца сахарной свёклы №3 (гибрид «Витязь»), которые обеспечивают образование продуктов с длинами 250, 400, 700, 800 и 900 п.н.

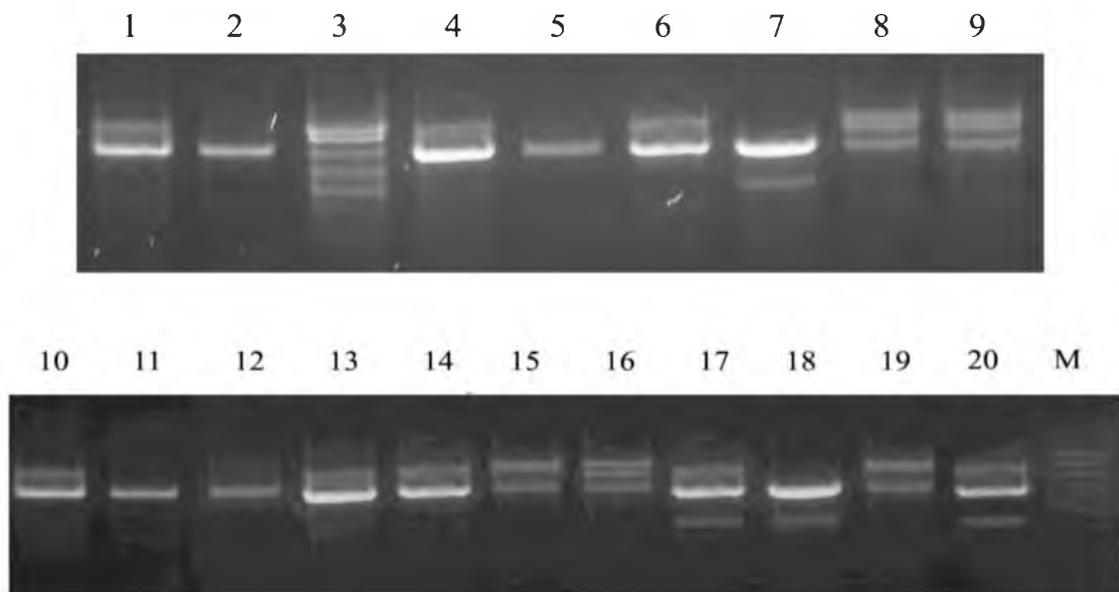


Рис. 1. Амплификация геномной ДНК свёклы праймерами RawS 6.

Обозначения (здесь и далее): 1 – Кормовая красная Р4, 2 – МС 14044 Р2, 3 – Витязь, 4 – МС 90-47 Р4, 5 – Кормовая красная Р3, 6 – Бордо ×ЛБС-16, 7 – Золеа 1007, 8 – Кормовая красная Р5, 9 – МС 14044 Р1, 10 – Золеа 1006, 11 – ЛБС-16×КБ, 12 – ЛБС-16, 13 – Бордо, 14 – Цилиндра, 15 – Кормовая белая КО-11, 16 – РМС46, 17 – Кормовая красная Р1, 18 – Кормовая красная Р2, 19 – КО-16, 20 – МС 90-47 Р3, М – маркеры ДНК

Сравнительный анализ комбинативных пар образцов растений показал, что у образцов 2 (МС-форма) и 18 (кормовая красная) имеется как сходный продукт амплификации (700 п.н.), так и дополнительный в образце 18 с длиной 400 п.н., что свидетельствует о неоднородности их генетического материала. Кроме того, неоднородность ДНК обнаруживается и между парами образцов 9 и 17, 5 и 20, а также 1, 4 и 8; 11, 12 и 15.

По результатам ПЦР-амплификации геномной ДНК с праймерами RawS 16 установлено, что в образцах №1, 2, 11, 12, 18 и 19 не обнаруживается продуктов амплификации с данными праймерами. Сходство в результатах амплификации наблюдается у следующих образцов:

№5, 6, 7, 9, 10, 17 и 20 – ампликоны 800 п.н.,

№3, 8 и 15 – ампликоны 800 п.н и 550 п.н.,

№13 и 14 – ампликоны 550, 800 и 900 п.н.

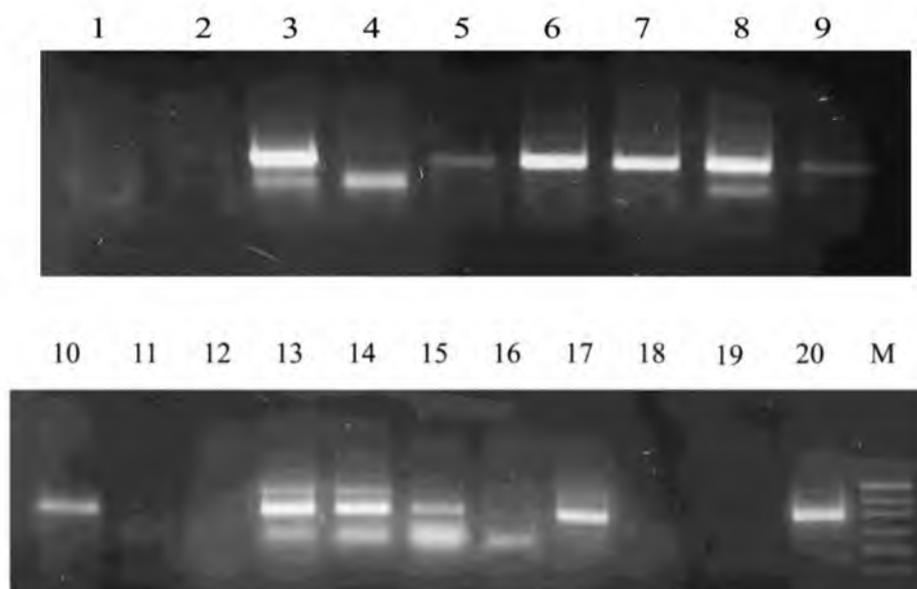


Рис. 2. Амплификация геномной ДНК свеклы праймерами PawS 16.

Сравнительный анализ комбинации образцов показал, что пары 2 и 8 не однородны по генетическому материалу. Такие пары образцов как 9 и 17, 5 и 20 имеют одинаковое проявление данного признака в геноме, и в ходе амплификации обнаруживается один продукт длиной 800 п.н. у всех образцов. Сочетание ДНК образцов 1, 4 и 8, а также 11, 12 и 15 показало, что ДНК этих растений отличается между собой, хотя внутри системы комбинации определяются сходные элементы.

Результаты исследований показали, что при проведении гибридизации МС растений сахарной свёклы с растениями столовой свёклы «Бордо» по локусу PawS 6 у гибридов F₁ выявлены все продукты амплификации, характерные для обеих родительских форм (700, 800, 900 п.н.). Получено всего гибридов F₁ 239 штук корнеплодов, из них 135 с красной и 104 с зелёной окраской корнеплода (табл. 1). Среди корнеплодов с красной окраской наблюдаются растения с овальной, как у столовой свёклы и с удлиненной формой, как у сахарной свёклы.

Таблица 1

Характеристика потомства F₁ от скрещивания с кормовой и столовой свёклой (по данным Богомолова М.А., 2011 г.)

Гибридная комбинация	Количество растений, по окраске корнеплода, шт.		Общее количество корнеплодов, шт.
	зелёная	розовая	
ЛБС-16×Бордо	104	135	239
ЛБС-16× Корм.Белая	46	0	46
Линии с признаками окраски вегетативных органов	Количество растений по форме корнеплода, шт.		Общее количество корнеплодов, шт.
	♀	♂	
ЛБС-16×Бордо ♀	88	26	104
ЛБС-16×Бордо ♂	105	30	135
ЛБС-16× Корм.Белая ♀	38	8	46
ЛБС-16× Корм.Белая ♂	0	0	0

Так, у потомства от скрещивания со столовой свёклой среди зелёных корнеплодов 84,6% оказались с материнской формой корнеплода, т. е. удлиненно-конической и 15,4% красноокрашенных овальной формы, как у отцовского родителя. У потомства от скрещивания с кормовой свёклой 84,7% корнеплодов также оказались зеленоокра-



шенными и удлинненно-конической формы, как у МС-формы и 15,3% наследовали окраску и форму корнеплода кормовой свёклы.

По праймеру RawS 16 для гибридной комбинации F₁ ЛБС-16хБордо обнаружено наследование ампликонов отцовского родителя 800 п.н.

В результате скрещиваний МС растений сахарной свёклы с растениями кормовой белой свёклы по локусу RawS 16 у гибридов F₁ выявлено в основном присутствие ДНК-фрагментов материнского типа (700 п.н.). Форма корнеплодов у гибридов F₁ также наследуется по материнскому типу. По локусу RawS 16 у гибрида F₁ ЛБС-16хКБ, как и у материнской формы не обнаружено продуктов амплификации с данными праймерами, тогда как у отцовского родителя выявлены ДНК-фрагменты длиной 550 и 800 п.н. Данные локусы, по-видимому, находятся в одной группе сцепления с генами, контролирующими форму корнеплода. Установлено, что ДНК-фрагмент длиной 900 п.н. является специфичным для образцов столовой свёклы и отсутствует у растений кормовой и сахарной свёклы. Сходство состава ампликонов обнаружено в образцах кормовой свёклы и у гибрида сахарной свёклы иностранной селекции «Золеа» (800 п.н.).

Проведенный ПЦР-анализ геномной ДНК с полученными специфическими праймерами и последующий электрофорез продуктов реакции в 1% агарозном геле показали неоднородность генетического материала исследуемых образцов при использовании маркеров PAWS 6 и PAWS 16. Применение данных праймеров при проведении ПЦР-анализа позволило установить сходство и отличие в генетическом материале образцов свёклы и провести скрининг гибридов.

В результате ПЦР-анализа геномной ДНК со специфическими праймерами к микросателлиту Bvv48 установлено наличие полиморфизма данного локуса у представленных образцов (рис. 3). Максимальное количество ПЦР-продуктов наблюдалось в ДНК следующих растений: 2, 3, 5, 6, 8, 9 с длинами 250, 500 и 800 п.н. Полученные данные свидетельствуют о высоком родстве их генетического материала. Кроме того, использование сателлиты Bvv48 показало сходство ДНК между образцами МС-линий №№1 и 7, где проявляется только один продукт с длиной 250 п.н., что свидетельствует об их высокой степени гомозиготности. Данный продукт полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами является универсальным, поскольку проявляется у всех представленных образцов. Отличительные черты организации генома выявлены у образцов №4 (кормовая красная свёкла) и №10 «Золеа», где исследуемая сателлита имеет двойное проявление, т. е. встречается два раза в их геноме.

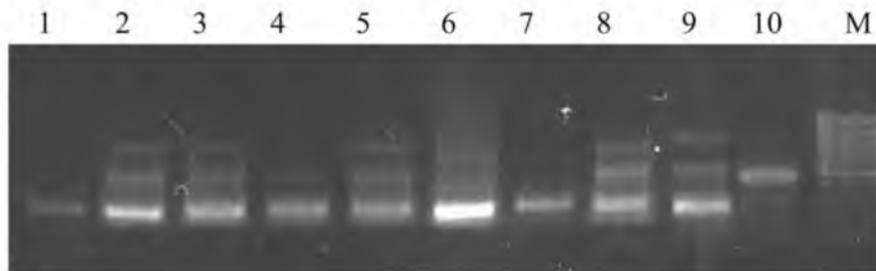


Рис. 3. Амплификация геномной ДНК родительских форм свёклы и гибридных растений, со специфическими праймерами к сателлитной ДНК Bvv48

Обозначения: 1 – МС 90-47 P2, 2 – КО-16, 3 – ЛБС 16, 4 – Кормовая красная P3, 5 – Кормовая красная P5, 6 – Золеа 1007, 7 – МС 14044 P2, 8 – Бордо, 9 – Цилиндра, 10 – Золеа 1006, М – маркеры ДНК.

В результате амплификации геномных ДНК растений, со специфическими праймерами к микросателлиту Bvv48, было установлено, что искомая сателлитная ДНК присутствует во всех образцах, но в разной степени вырожденности.

Выводы

1. Выявлена генетическая структура и полиморфизм по ретротранспозонам и микросателлитным последовательностям ДНК сортотипов сахарной, столовой и кормовой свёклы (*B. vulgaris* L.) и внутривидовых гибридов для проведения их идентификации.

2. В составе генома сортотипов сахарной, столовой и кормовой свёклы обнаружен общий ампликон длиной 700 п.н., что указывает на некоторое сходство их генетического материала.

3. В образцах кормовой свёклы по локусу PawS 6 установлен дополнительный ампликон 400 п.н., свидетельствующий об отличии их от остальных сортотипов.

4. Установлено, что при амплификации геномной ДНК с праймерами PawS 16 фрагменты 900 п.н. являются специфическими для образцов столовой свёклы.

5. Выявлены отличительные черты организации генома у образцов кормовой свёклы и гибрида сахарной свёклы иностранной селекции «Золеа», у которых микросателлитный локус Bvv48 имеет двойное проявление в их геноме длиной 250 п.н.

Список литературы

1. Буренин В.И. Генетические ресурсы рода Beta L.(Свёкла). С.-Пб., 2007.- 274 с.
2. Andersen N.S. Siegismund H.R. Meyer V., Jorgensen R.B. Low level of gene Xow from cultivated beets (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) into Danish populations of sea beet *Beta vulgaris* L. ssp. *maritima* (L.) Arganeli. – Mol. Ecol. 14. – 2005. – P. 1391 – 1405.
3. Arnaud J.F. , Viard F. Delescluse M., Cuguen J. Evidence for gene Xow via dispersal from crop to wild relatives in *Beta vulgaris* Chenopodiaceae): consequences for the release of genetically modified crop species with weedy lineages. – Proc r Soc Lond.-2003. – P. 1565-1571.
4. Cureton A.N., Burns M.J., Ford-Lloyd B.V., Newbury H.J. Development of simple sequence repeat (SSR) markers for the assessment of gene flow between sea beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *maritima*) populations. – Mol. Ecol. Notes. – 2002. – 2. P. 402-403.
5. Mörchen M. Cuguen J., Michaelis G. Hanni C. Saumitou – Laprade P. Abundance and length polymorphism of microsatellite repeat in *Beta vulgaris* L. Theor. Appl. Genet. – 92. – 1996. – P. 326-333.
6. Mitchell M.G., Shaw R.S., Reyes B.G., Weiland J.J. Construction of a Sugar Beet BAC Library From a Hybrid With Diverse Traits /Plant Molecular Biology Reporter .- 22. – 2004.-P. 23-28.
7. Rae S., Aldam C., Domingez I., Hoebrechts M., Barnes S., Edwards K. Development and incorporation of microsatellite markers into the linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) Theor. Appl. Genet. – 100. – 2000. – P. 1240-1248.
8. Rogovsky P.M., Sherpherd K.W. / Genome . – 1992. – V. 35, №4. – P. 621 – 626.
9. Smulders M. J.M., Esselink G.D., Everaert I., Riek J.D., Vosman B. Characterisation of sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) varieties using microsatellite markers. – BMS Genetics. – 2010. – 11: 41.
10. Viard F., Arnaud J.F., Delescluse M., Cuguen J. Tracing bac seed and pollen Xow within the crop – wild *Beta vulgaris* complex: genetic distinctiveness vs. hot of hybridization over a regional scale.- Mol. Ecol.- 2004 ,13.– P. 1357-1364.

USING PCR-ANALYSIS TO REVEAL GENETIC POLYMORPHISM OF BEET (*BETA VULGARIS* L.) CULTIVARS

T.P. Fedulova

D.N. Fedorin

A.L. Mazhumov All-Russian
Research Institute of Sugar Beet RAA,
Ramon, Voronezh region, 396030,
Russia

E-mail: biotekhnologiya@mail.ru

This work is devoted to molecular-genetic study of beet (*Beta vulgaris* L.) cultivars. By retrotransposons and microsatellite loci, genetic structure and polymorphism of sugar, table and fodder beet cultivars and intraspecific hybrids produced with their participation have been revealed. Using the Bvv 48 microsatellite, characteristic features of genome organization in sugar and fodder beet are shown.

Key words: sugar, table and fodder beet, PCR-analysis, microsatellites.