

«Сейфуллин окулары – 18: « Жастар және ғылым – болашаққа көзқарас» халықаралық ғылыми -практикалық конференция материалдары = Материалы международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения – 18: « Молодежь и наука – взгляд в будущее» - 2022.- Т.І, Ч.ІІІ. - С. 207-211

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ SSR-МАРКЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ОДНОРОДНОСТИ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

*Амангелдиева А.А. магистр,
Табынбаева Л.К. доктор PhD
ТОО «Казахский научно-исследовательский институт земледелия и
растениеводства»,
пос. Алмалыбак*

Производство сахарной свеклы является стратегической отраслью экономики республики [1], поскольку сахар благодаря своей высокой энергетической ценности, играет важную роль как продукт питания, а также в качестве сырья. Основным сырьем для промышленного производства сахара являются сахарный тростник и сахарная свекла, причем из 160–170 млн.т. мирового производства сахара в год 40% вырабатывается – из сахарной свеклы. Площадь сахарной свеклы увеличилась в 2014–2018 гг. с 1,2 тыс. га до 19,6 тыс. га., валовый продукт с 23,9 до 598,8 тысяч т. а также выход сахарной свеклы с 240,6 ц/га до 305 ц/га, чем подтверждает рост сахарной отрасли страны. Однако, не смотря на увеличение объема производства сахарной свеклы она не удовлетворяет потребности населения [2]. Для увеличения площади возделывания и валового сбора сахарной свеклы необходимо создать высокопродуктивные, экологический пластичные, генетически однородные гибриды и линий этой культуры.

Сахарная свёкла – двулетнее перекрёстно опыляемое растение. Большое генетическое разнообразие этой культуры сформировалось в результате аллогамии и самонесовместимости [3,4]. Однако использование ограниченного числа генотипов в качестве родительских форм в селекционных программах привело к уменьшению генетической изменчивости и сокращению генетической базы коммерческих гибридов сахарной свёклы [4,5].

Важнейшей задачей современной селекции сахарной свеклы является получение новых исходных форм и ускоренное создание гибридов с повышенной продуктивностью и другими хозяйственно полезными признаками и свойствами [6]. Независимо от средств и методов селекции самой сложной частью работы является выявление генетической изменчивости в исходном селекционном материале и отбор желаемых генотипов [7]. Запасы такой изменчивости составляют генетический

потенциал формообразования вида и популяции, но в силу сложности обнаружения селекционеру они малодоступны, а некоторые из них обычными методами генетического анализа совсем не раскрываются.

Приоритетным направлением в селекции сахарной свёклы является создание высокопродуктивных гибридов на основе линейного исходного материала [8, 9]. Эффективность селекции во многом зависит от подбора исходных компонентов гибридизации [3]. Для получения гетерозисных гибридов важным этапом является создание константных (гомозиготных) исходных линий с высокой комбинационной способностью [10]. Традиционно выровненные линии сахарной свёклы получают путём многократно повторяющегося отбора самоопылённых линий по устойчивости к болезням с высокой комбинационной способностью. Однородность исходных линий в гетерозисной селекции один из важных признаков. Возможность использования фенотипических признаков ограничена их количеством, временем и чёткостью генетического проявления, которые в значительной степени зависят от условий выращивания и стадии развития растений [10,11]. Классическая селекция линий и гибридов сахарной свёклы на основе фенотипических признаков – трудоёмкий и длительный процесс. Сложности селекции и поддержания генетической однородности племенного материала обусловлены двулетним циклом развития сахарной свёклы, инбредной депрессией, явлением само-и перекрёстной несовместимости [3,9]. Использование ДНК – маркеров для оценки и контроля однородности является значимым инструментом в поддержании генетической чистоты в семеноводстве сахарной свёклы.

Первостепенной задачей является оценка генетического разнообразия, благодаря которой снижаются трудоёмкость и расходы на определение подходящих родительских линий и их выравнивание [12]. Для повышения эффективности создания линий и гибридов необходима разработка технологии генетического анализа на основе молекулярных маркеров, позволяющей проводить достоверную оценку их подлинности и однородности на всех этапах селекционного процесса. Применение генетического анализа в дополнение к оценке по фенотипическим признакам даёт возможность повысить достоверность идентификации линий, а также сократить сроки селекционного процесса [13].

Анализ генетического разнообразия с помощью генетических маркеров позволяет оценить комбинационную способность линий, которая во многом определяется степенью генетической дивергенции. Данные, полученные в результате такого анализа, могут быть использованы для прогнозирования гетерозиса и обеспечат ускоренный отбор в селекции [11]. Предварительный

анализ линий и гибридов с помощью молекулярных маркеров перед посевом может помочь в планировании полевых испытаний и дать первое представление об однородности и отличимости линий при условии достаточного количества маркеров.

Цель данного исследования – оценка генетического разнообразия и однородности исходного материала и гибридов сахарной свёклы с помощью анализа полиморфизма длин микросателлитных фрагментов и отбор перспективных форм для создания высокопродуктивных гибридов.

Для достижения поставленной цели предусматривалось решение следующих задач:

- 1) Подобрать *SSR*-маркеры и оптимизировать ПЦР-анализ;
- 2) Оценить генетическое разнообразие исходного материала и гибридов сахарной свеклы с использованием *SSR*-маркеров.

Научные исследования выполняли на базе лаборатории биотехнологии, биохимии, физиологии растений и оценка качества продукции ТОО «КазНИИЗиР» с применением методов молекулярного маркирования на основе *SSR*-анализа. В качестве материалов для молекулярно-генетических исследований были использованы отечественные и зарубежные 20 линий компонентов гибридов, 9 гибридов и 1 сорт и 1 дикая популяция сахарной свеклы (*Beta vulgaris*), в состав которых входили: *FMS161*; *FMS162*; *FMS Rh167*; *FMS173*; *FMS Cr183*; *FMS 1 Rh184* (Польша); №16150, О-тип №1; №16951, *Beta maritime* х О-тип; №16952, *Beta papula* х О-тип №1; №16953, О-тип №2; №16954, *Beta maritime* х О-тип №2; №16955, О-тип №2; №16956, *Beta papula* х О-тип; Константа; ЦМС; гетерозисный опылитель (Украина); *Iranskaya belaya*; *L53 O-type*; Белоцерковская односемянная улучшенная; О-типа; ОП-14044; 17-231ОП, 17-232ОП; КАЗМС; Шекер; Тараз; Аксу; Алихан; Айдын; Енбекши; Память Абугалиева, предоставленных ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова» (г. Рамонь, Россия), ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Института биоэнергетических культур и сахарной свеклы (г. Киев, Украина), и лаборатории сахарной свеклы «КазНИИЗиР».

Для получения достоверных результатов использовали растительный материал 20 разных растений каждой линии. Геномную ДНК выделяли из зелёных листьев методом экстракции с использованием СТАВ-метода [14]. Качество выделенной ДНК определяли на спектрофотометре (Jenway). Полученную ДНК растворяли в свободной от нуклеаз стерильной воде (Биолабмикс). ПЦР-анализ проводили в амплификаторе Eppendorf (Mastercycler pro, Германия). Амплификацию проводили с использованием 9 *SSR*- маркеров: *Bvv21*, *Bvv53*, *Bvv155* [15], *FDSB957*, *FBSB1001*, *FDSB1007* [16], *FDSB1002* [17], *SB 04* [12], *BvGTT1* [18]. Детекцию ПЦР-продуктов осуществляли методом электрофореза в 8% акриламидном геле. Размер ПЦР-фрагментов устанавливали с помощью гельдокументирующей системы «Quantum ST 4» (Франция).

Результаты исследований

Проведена оптимизация ПЦР-анализа со всеми подобранными маркерами. Общее количество реакционной смеси – 15 мкл. Для работы были использованы ДНК (100 нг/мл), dNTP (25 mM), MgCl₂ (25 mM), Taq-полимераза (Биосан, Россия), 10xTaq buffer с KCl (Биосан, Россия), БСА. Результаты оптимизации ПЦР-режима представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Оптимизация ПЦР-режима для SSR-маркеров

Маркеры Bvv21, Bvv53, Bvv155		
Начальная денатурация	94° С – 3 минут	
Денатурация	94° С – 30 секунд	30 цикл
Отжиг	53° С – 30 секунд	
Элонгация (синтез)	72° С – 1 минут	
Финальная элонгация	72° С – 3 минут	
Маркеры FDSB957, FDSB1001, FDSB1002, BvGTT1		
Начальная денатурация	94° С – 3 минут	
Денатурация	94° С – 1 минут	30 цикл
Отжиг	58° С – 1 минут	
Элонгация (синтез)	72° С – 1 минут	
Финальная элонгация	72° С – 5 минут	
Маркер FDSB1007		
Начальная денатурация	95° С – 3 минут	
Денатурация	94° С – 30 секунд	35 цикл
Отжиг	55° С – 45 секунд	
Элонгация (синтез)	72° С – 45 секунд	
Финальная элонгация	72° С – 10 минут	
Маркер SB04		
Начальная денатурация	94° С – 3 минут	
Денатурация	94° С – 30 секунд	30 цикл
Отжиг	54° С – 40 секунд	
Элонгация (синтез)	72° С – 50 секунд	
Финальная элонгация	72° С – 5 минут	

В процессе исследований нами осуществлена оценка SSR – маркеров для выявления генетического полиморфизма селекционных материалов, а также использования их для эффективного подбора родительских форм в гетерозисной селекции.

Каждый из праймеров обеспечил стабильную амплификацию полиморфных фрагментов ДНК. По изучаемым SSR-маркерам выявлен полиморфизм микросателлитных локусов линий и гибридов сахарной свеклы. У индивидуальных генотипов по результатам ПЦР со всеми парами праймеров получены воспроизводимые электрофоретические профили с количеством амплифицированных

фрагментов ДНК от 1 до 3. Всего по девятию микросателлитным локусам обнаружено 21 аллелей в 31 селекционных образцах. Установлено, что диапазон длин полученных ДНК-фрагментов составляет от 120 п.н. (*BvGTT1*) до 365 п.н. (*FDSB1001*). Наибольшее количество аллелей (3) было детектировано у маркеров *Bvv 155* (200/298 п.н., 250/298 п.н., 298 п.н.), *Bvv53* (185 п.н., 200 п.н., 250 п.н.) и *FDSB957* (121 п.н., 126 п.н., 134 п.н.). Уровень полиморфизма варьировал в пределах от – 0 (*FDSB1001*, *FDSB1002*, *SB04*) до – 66.6 (*Bvv155*, *FDSB957*). Фрагменты ДНК длиной 200/298 п.н., 250/298 п.н., 298 п.н. выявлены только у двух образцов: *FMS162* (Польша), О-типа (Украина) из всех изученных, что может служить одним из тест-признаков при её генотипировании.

Наибольшая однородность (100%) отдельных индивидуальных растений внутри линии по 6 маркерам была отмечена у 2 линий: *FMS IRh186* (Польша), О-типа (Украина), по 5 маркерам у 7 образцов: *FMS162*, *FMS Rh167*, *FMS173* (Польша), О-типа (США), *Iranskaya belaya* (дикая популяция), 17-232-ОП, 17231-ОП, по 4 маркерам у 2 образцов: Белоцерковская односемянная улучшенная, №16950, О-тип №1. Анализ ДНК спектров в разрезе индивидуальных растений показал, что изучаемые линии сахарной свеклы не достаточно однородны. Неоднородность по всем 9 маркерами была зафиксировано у 6 образцов: №16951, *Beta maritime* x О-тип, №16954, *Beta maritime* x О-тип №2, №16955, О-тип №2, Константа (Украина), Шекер, Тараз (ТОО «КазНИИЗиР»).

В результате проведенных молекулярных исследований установлено, что маркеры *FDSB957*, *Bvv53*, *Bvv155* характеризуется высоким уровнем генетического полиморфизма от 33,3 до 66,6. Это свидетельствует о том, что их можно использовать для генотипирования и паспортизации линий и гибридов сахарной свеклы.

С использованием 9 SSR-маркеров проведена идентификация 31 образца сахарной свеклы, в том числе 20 линий (компоненты гибридов), 9 гибридов 1 сорт и 1 дикая популяция сахарной свеклы, оценена их генетическая однородность. Выделены исходные линии с высокой однородностью: *FMS IRh186* (Польша), О-типа (Украина), *FMS162*, *FMS Rh167*, *FMS173* (Польша), О-типа (США), *Iranskaya belaya* (дикая популяция), 17-232-ОП, 17231-ОП, которые рекомендуются для создания гетерозисных гибридов.

Результаты проведенных молекулярно-генетических исследований имеют как научную, так и практическую значимость для селекции сахарной свёклы. Полученные данные могут быть использованы при планировании скрещиваний и создании высокопродуктивных гибридов культуры.

Финансирование

Исследования выполнены в рамках бюджетной программы 217 Комитета науки МОН РК по проекту *ИРН АРО09057999* «Создание гибридов сахарной свеклы с генетически идентифицированными свойствами на основе молекулярной селекции и биотехнологии для устойчивого внедрения их в производство».

Список использованной литературы

- 1 <http://www.akorda.kz>[Электрон. ресурс]. - 2022. - (дата обращения 14.03.2022).
- 2 Карибаев М.Б. Современное состояние и перспективы развития производства сахарной свеклы в республике Казахстан [Текст]: / Материалы XXIV международной научно-практической конференции «Россия и Европа: связь культуры и экономики» Прага, Чешская Республика 21 июня 2019 года, 95-97 с.
- 3 Балков И.Я. Genetic diversity of sugar beet genotypes evaluated by microsatellite DNA markers / И.Я. Балков, С.Д. Каракотов, А.В. Логвинов, В.Н. Мищенко [Текст]: // Эволюция сахарной свёклы: от огородных форм до современных рентабельных гибридов. - Щёлково : АО «Щёлково Агрохим». - 2017. - С. 384.
- 4 Abbasi Z. Evaluation of genetic diversity of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). crossing parents using agromorphological traits and molecular markers [Text]: // Journal of Agricultural Science and Technology. - 2014. - Vol. 16. - P. 1397-1411.
- 5 McGrath J.M. An open-source first-generation molecular genetic map from a sugar beet × table beet cross and its extension to physical mapping [Text]: // The Plant Genome. - 2007. - No. 1. - P. 27 - 44.
- 6 Богачёва Н.Н. Генетическая изменчивость родительских форм гетерозисных гибридов сахарной свёклы на основе молекулярных маркеров [Текст]: /Богачёва Н.Н., Федулова Т.П., Налбандян А.А., Ошевнев В.П., Грибанова Н.П., // Технология высоких урожаев. – 2017. – С.16-20.
- 7 Богомолов М.А. Гетерозис у гибридов сахарной свёклы (*Beta vulgaris* L.) [Текст]: // Технология высоких урожаев. – 2019. – №3. – С.36-39.
- 8 Васильченко Е.Н. Ускоренное получение новых гомозиготных линий сахарной свёклы (*B. vulgaris* L.) [Текст]: // Сахар. – 2020. – № 2. – С. 30–32.
- 9 Мищенко В.Н. Теоретические и практические аспекты использования цитоплазматической мужской стерильности сахарной свёклы [Текст]: // Сахарная свёкла. – 2016. – № 1. – С. 16–19.
- 10 Федулова Т.П. ДНК-фингерпринтинг в изучении генетического разнообразия *Beta vulgaris* [Текст]: / Федулова Т.П., Федорин Д.Н., Богомолов М.А., Голева Г.Г. // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. – 2018. – № 3 (58). – 8 с.
- 11 Налбандян, А.А. Перспективы использования SSR-маркеров для генотипирования сахарной свёклы [Текст]: // Сахар. – 2019. – № 11. – С. 36–39.

12 Ksenija T.A. Estimation of genetic diversity and relationship in sugar beet pollinators based on SSR markers [Text]: /Ksenija T.A., Nevena N., Zivko C., Miroslav Z. // Electronic Journal of Biotechnology. – 2017. – 6 pp.

13 Логвинов А.В. Новые гибриды сахарной свёклы [Текст]: // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2020. – № 3 (82). – С. 80-89.

14 Graner A. Construction of an RFLP map of barley [Text]:/ Graner A., Jahoor A., Schondelmaier J., Siedler H., Pillen K., Fischbeck G. et al. // Theoretical and Applied Genetics. – 1991. Vol.– 83(2). – P. 250-256.

15 Smulders M. JM.Characterisation of sugar beet (*Beta vulgaris L. ssp. vulgaris*) varieties using microsatellite markers [Text]: Smulders M. JM., Esselink G.D., Everaert I., Riek J.D., Vosman B. // BMC Genetics. – 2010. – Vol.11. – 11pp.

16 Laurent V. Comparative effectiveness of sugar beet microsatellite markers isolated from genomic libraries and GenBank ESTs to map the sugar beet genome [Text]: / Laurent V., Devaux P., Thiel T., Viard F., Mielordt S., Touzet P., Quillet M.C., // Theor. Appl. Genet. – 2007. – Vol.115. – P.793-805.

17 Richards M. Genetic structure and gene flow in *Beta vulgaris* subspecies *maritima* along the Atlantic coast of France [Text]: Richards M., Reeves P. A., Fenwick A. L., Panella L. // Genet. Resour. Crop. Evol. – 2014. - Vol. 61. – P.651-662.

18 Surinder K.S. Profiling of sugar beet genotypes for agronomical, sugar quality and forage traits and their genetic diversity analysis using SSR markers [Text]: Surinder K.S., Navraj K.S., Meenakshi G., Uppal S.K., Pritpal S., Satveer K., Jaspreet K.// Electronic Journal of Plant Breeding. – 2015. –Vol.7 (2). – P. 253-266.