

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Современные аспекты селекции гибридов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.)

С.Д. Каракотов¹, И.В. Апасов², А.А. Налбандян²✉, Е.Н. Васильченко², Т.П. Федулова²

¹ Акционерное общество «Щелково Агрохим», г. Щелково, Московская область, Россия

² Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара им. А.Л. Мазлумова, пос. ВНИИСС, Рамонский район, Воронежская область, Россия

✉ arpnal@rambler.ru

Аннотация. Показаны высокая эффективность культивирования неоплодотворенных семязачатков растений сахарной свеклы и получение гаплоидных регенерантов (микрклонов) опылителей – закрепителей стерильности О-типа и МС-форм компонентов гибрида сахарной свеклы РМС 120. Предлагается технологический метод, который способствует уменьшению времени создания нового выровненного исходного материала, что ведет к ускорению селекционного процесса. Идентификация гаплоидных регенерантов со стерильной цитоплазмой из исходных популяций имеет важное теоретическое и практическое значение для селекции, так как облегчает задачу создания гомозиготных линий с цитоплазматической мужской стерильностью и высокопродуктивных гибридов на стерильной основе. По результатам проведенного молекулярно-генетического анализа, в митохондриальном геноме гаплоидных растений-регенерантов обнаружен ранее не описанный в литературе однонуклеотидный полиморфизм, позволивший идентифицировать данные микрклоны как фертильные и стерильные формы. Установлено, что ДНК-маркеры митохондриального генома сахарной свеклы, относящиеся к семейству минисателлитов TR (TR1 и TR3), дают возможность с высокой эффективностью выявлять гаплоидные микрклональные растения МС- и О-типа. Установлена информативность маркера OP-S4 для определения раздельноплодных форм. При помощи метода культуры *in vitro* получены дигаплоидные линии (DH) мужско-стерильной формы и закрепителя стерильности О-типа гибрида сахарной свеклы РМС 120. Линии характеризуются высокой степенью выравненности по биоморфологическим признакам, что было подтверждено в полевых условиях. Ключевые слова: сахарная свекла; односемянность; цитоплазматическая мужская стерильность; гомозиготные гаплоидные линии; ПЦР-анализ.

Для цитирования: Каракотов С.Д., Апасов И.В., Налбандян А.А., Васильченко Е.Н., Федулова Т.П. Современные аспекты селекции гибридов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021; 25(4):394-400. DOI 10.18699/VJ21.043

Modern issues of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) hybrid breeding

S.D. Karakotov¹, I.V. Apasov², A.A. Nalbandyan²✉, E.N. Vasilchenko², T.P. Fedulova²

¹ Shchelkovo Agrokhim Company, Shchelkovo, Moscow region, Russia

² The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar, vil. VNISS, Ramonsky district, Voronezh region, Russia

✉ arpnal@rambler.ru

Abstract. High efficiency of the cultivation of unfertilized sugar beet ovules and preparation of haploid regenerants (microclones) of pollinators – maintainers of O-type sterility and MS forms of the RMS 120 hybrid components has been shown. A technological method that accelerates the creation of new uniform starting material is proposed. It speeds up the breeding process two to threefold. The identification of haploid regenerants with sterile cytoplasm in initial populations is of great theoretical and practical importance for breeding, as it facilitates the production of homozygous lines with cytoplasmic male sterility and high-performance hybrids on sterile basis. As shown by molecular analysis, a single-nucleotide polymorphism never reported hitherto is present in the mitochondrial genome of the haploid plant regenerants. It allows identification of microclones as fertile and sterile forms. It has been found that DNA markers of the sugar beet mitochondrial genome belonging to the TR minisatellite family (TR1 and TR3) enable reliable enough identification of haploid microclonal plants as MS- or O-type forms. Fragments of 1000 bp in length have been detected in monogenic forms in the analysis of 11 sugar beet plants cultured *in vitro* by PCR with the OP-S4 random RAPD primer. Testing of the OP-S4 marker's being in the same linkage group as the genes responsible for expression of the economically valuable trait monogermity demonstrates its relative reliability. By the proposed method, dihaploid lines (DH) of the male-sterile form and the O-type sterility maintainer of the RMS 120 sugar beet hybrid have been obtained in *in vitro* culture. These lines are highly uniform in biomorphological traits, as proven under field conditions.

Key words: sugar beet; monogermity; cytoplasmic male sterility; homozygous haploid lines; PCR analysis.

For citation: Karakotov S.D., Apasov I.V., Nalbandyan A.A., Vasilchenko E.N., Fedulova T.P. Modern issues of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) hybrid breeding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021; 25(4):394-400. DOI 10.18699/VJ21.043

Введение

Сахарная свекла (*Beta vulgaris* L.) – наиболее важный источник сахарозы, а сахар является одним из основных компонентов питания человека и ресурсом быстродоступной энергии для организма. Мировой спрос на сахар растет со скоростью около 1 Мт (0.5 %) в год, тогда как население мира увеличивается примерно в три раза быстрее. По площади посевов сахарной свеклы Российская Федерация находится на первом месте в мире (1 млн га), опережая такие страны, как США (490 тыс. га), Германия (350 тыс. га) и Франция (280 тыс. га) (www.fao.org). Вместе с тем в России в последние годы около 98 % посевных площадей сахарной свеклы засевают импортным семенным материалом зарубежной селекции, что крайне негативно влияет на технологическую и экономическую устойчивость функционирования всего свеклосахарного комплекса страны.

Конкурентоспособность отечественных гибридов зависит от возможности практической реализации заложенного в них генетического потенциала. Применение в селекционной практике современных биотехнологических и молекулярно-генетических методов дает возможность ускоренно (в 2 раза) создавать генетически однородный материал, обеспечивающий при репродуцировании высокую выравненность морфологических параметров корнеплодов (размерно-массовые показатели корнеплодов, величина выступления головки, глубина артектиха и т. д.), а также стабильную реализацию основных хозяйственно ценных признаков (односемянность-раздельноплодность, урожайность, сахаристость, устойчивость к абиотическим и биотическим стрессам в период вегетации, высокая лежкоспособность при хранении и т. д.). Сочетание биотехнологии и методов классической селекции не только позволяет повысить продуктивность гибридов сахарной свеклы, но и способствует улучшению качества производимого семенного материала.

Одна из важнейших проблем технологии возделывания сахарной свеклы – необходимость выведения односемянных гибридов на основе цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС). Более 65 лет назад были найдены односемянные спонтанные мутантные растения, послужившие исходными формами для создания раздельноплодных сортов и компонентов гибридов свеклы (Коломиец, 1960; Попов, 1960). Фенотипический полиморфизм много- и односемянных форм сахарной свеклы и его генетический контроль были изучены разными исследователями, но однозначного мнения по поводу наследования и проявления этого признака нет (Nagamine et al., 1989; Dubrovnaia et al., 2003; Nemaayati et al., 2008).

Признак «односемянность (раздельноплодность)» присутствует абсолютно во всех популяциях *B. vulgaris*. Раздельноцветковые формы возникают в сростноцветковых популяциях, предположительно, вследствие естественного мутагенеза (Бордонос, 1966; Малецкий и др., 1991). Ранее исследования В.Ф. Савицкого достоверно показали моногенный характер наследования по локусу М, ответственного за фенотипическое выражение много- и односемянности (Savitsky, 1952). Локус М контролирует раздельно- и сростноплодность (одно- и многосемянность) у растений сахарной свеклы. Рецессивный ал-

лель *m* (от англ. monogerm) ответственен за развитие односемянности, доминантный аллель *M* (от англ. multigerm) – многосемянности. Односемянные (раздельноцветковые, или раздельноплодные) генотипы – гомозиготы по рецессивному аллелю *mm*. Многосемянные (сростноцветковые, или сростноплодные) растения – гомо- и гетерозиготы по доминантному аллелю *M* (*MM*, *Mm*). Отклонения от моногенной схемы наследования описаны в исследованиях С.И. Малецкого с коллегами (1991). Авторы предположили двулокусную модель наследования признака «раздельноплодность» (*mmli*). С.И. Малецкий с коллегами (1991) считают, что *M* – локус структурный и существует второй локус, регуляторный, *I* (*I* – inhibitor). В этом исследовании доминантные аллели регуляторного локуса, подавляющего развитие сростноцветкового (сростноплодного, или многосемянного) фенотипа, обозначены как супрессоры или ингибиторы, а рецессивные аллели этого локуса, не подавляющего развитие сростноцветкового фенотипа, – как энхансеры (усилители). В соответствии с этой гипотезой растения раздельноцветкового (односемянного, или раздельноплодного) фенотипа должны иметь рецессивные аллели локуса *M* и доминантные аллели локуса *I*. В более поздних работах приводятся сведения о нахождении локуса *M* на генной карте *B. vulgaris* в группе сцепления 2 на хромосоме 4 (Schumacher et al., 1997; Amiri et al., 2011). Российскими исследователями был описан еще один новый рецессивный ген раздельноплодности *m*². Он также относится к группе сцепления 2 (Shavrukov, 2000).

На сегодняшний день для создания гомозиготных линий и увеличения генетического разнообразия внедряются методы биотехнологии с получением удвоенных гаплоидов (ДН-технологии) (Dunwell, 2010; Chen et al., 2011; Kikindonov et al., 2016). В селекции сахарной свеклы одна из важнейших проблем – это создание гибридов на стерильной основе, обладающих гетерозисным эффектом. Для получения таких гибридов в качестве материнского компонента используют раздельноплодные мужскостерильные (МС) растения. Отцовским компонентом служат сростноплодные (многосемянные) фертильные растения-опылители. Для достижения константности материнского компонента по признаку «раздельноплодность» обычно получают МС-линии и линии-закрепители стерильности Оуэн (О-типа) путем длительного инбридинга в течение 5–10 поколений, что приводит к инбредной депрессии. Для преодоления такого нежелательного явления в последнее время в селекции сахарной свеклы все шире используется культура неоплодотворенных семязачатков *in vitro*. Этот прием позволяет сократить временные затраты в несколько раз на получение гомозиготных генетически стабильных линий (ДН-линий, удвоенных гаплоидов) по селекционно-значимым признакам – «раздельноплодности», «стерильности/фертильности» и др. Полученные ДН-линии нуждаются в молекулярно-генетической оценке их на ранних этапах развития по признакам «раздельноплодность», «стерильность/фертильность» и др.

Цель настоящего исследования заключается в разработке технологии создания дигаплоидных линий сахарной свеклы в культуре *in vitro* и их молекулярно-генетическом

изучении и отборе по признакам «раздельноплодность», «стерильность/фертильность» и др.

Материалы и методы

Объектом исследований были родительские компоненты диплоидного гибрида сахарной свеклы РМС 120: МС-линия и закрепитель стерильности О-типа РФ8 (Ра-монская фертильная). Авторы гибрида – В.П. Ошевнев, Н.П. Грибанова и др., оригинатор – Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара им. А.Л. Мазлумова (ВНИИСС). Гибрид РМС 120 зарегистрирован в «Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию» на территории РФ в 2008 г. (<https://reestr.gossortrf.ru>).

При работе с культурой ткани эксплантами служили неоплодотворенные семязачатки на этапе формирования бутонов, в качестве стерилизующего агента применяли 10 % раствор хлорамина Б, время экспозиции – 60 мин. Семязачатки, изолированные в стерильных условиях под микроскопом, помещали в жидкую питательную среду. Затем эксплянты, прошедшие дифференциацию, культивировали на твердой агаризованной среде (агар 7 г/л) с добавлением ауксинов и цитокининов в разных сочетаниях (6-бензиламинопури-н, кинетин, гиббереллин, нафтилуксусная кислота) (Бутенко, 1999).

Для гаплоидов использовали жидкую питательную среду с добавлением 6-бензиламинопурина в концентрации 1.0 мг/л. Размножение осуществляли на агаризованной среде с добавлением гиббереллина, 6-бензиламинопурина, кинетина по 0.2 мг/л. Диплоидизацию гаплоидного материала проводили путем добавления в питательную среду 0.01 % колхицина и выдержки на ней эксплантов в течение 36 ч. Корневая система формировалась при культивировании микроклонов на среде с содержанием нафтилуксусной кислоты (1 мг/л). Регенеранты культивировали при температуре 24–26 °С, 16-часовом фотопериоде с освещенностью 5000 лк и относительной влажностью воздуха 70 %. Пloidность образцов определяли на проточном цитометре (Partec, ФРГ) согласно рекомендуемому протоколу (Cousin et al., 2009).

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

кол ПЦР: 1) предварительная денатурация 94 °С в течение 5 мин; 2) далее 30–33 цикла: денатурация 94 °С – 30 с; отжиг – 40 с; элонгация при 72 °С – 60 с; 3) заключительная элонгация при 72 °С – 3 мин. Состав ПЦР-смеси: 1 × ПЦР-буфер, 2.5 mM MgCl₂, по 0.2 mM смеси dНТФ, 1 ед. Таq ДНК-полимеразы, ДНК 500 нг, праймеры 0.5 мкМ (см. таблицу).

Секвенирование полученных продуктов амплификации осуществляли по методу Сэнгера на генетическом анализаторе ABI PRISM 310 (Life Technologies, США). Продукты ПЦР-амплификации обрабатывали наборами ColGen (ЗАО «Синтол»). Результаты прочтения нуклеотидных последовательностей анализировали в программе Mafft, версия 7 (Katoh et al., 2016).

Результаты и обсуждение

Изучение признака односемянности при размножении фертильных опылителей-закрепителей стерильности О-типа показало увеличение количества потомств с полной (100 %) односемянностью с 11 до 68.4 % при увеличении интенсивности отбора и браковки многосемянных растений (Ошевнев и др., 2018) (рис. 1). Возрастало и среднее значение этого признака от 78.2 до 96 % при увеличении поколений отбора от G₁ до G₄.

Многолетние полевые и лабораторные исследования во ВНИИСС позволили разработать технологию создания ДН-линий сахарной свеклы, включающую трехлетний цикл проведения биотехнологических и селекционных мероприятий (Жужжалова и др., 2020) (рис. 2). На начальных этапах осуществляют индуцирование регенерантов из неоплодотворенных семязачатков. Растения отбирают по признакам «раздельноцветковость», «сростноцветковость», габитусу куста (хорошо обсемененные, многостебельчатые растения). В качестве доноров эксплантов используют преимущественно побеги центрального колоса кистевидной части плейохазия. Цитологические исследования позволяют отбирать генотипы с высокой степенью фертильности и стерильности пыльцевых зерен. Осуществляют процесс стабилизации отобранных нормально развитых гаплоидных регенерантов с использованием микроразмножения на агаризованных средах в культуре *in vitro*.

Следующий этап включает проведение диплоидизации гаплоидного материала путем колхицинирования, стабилизации колхицинированных растений-регенерантов, отбора по биохимическим и молекулярно-генетическим признакам и формирование ДН-линии в культуре *in vitro*.

Характеристика праймеров, использованных в работе

Праймер	Последовательность (5' → 3')	T _m , °С	Литературный источник
TR1	F: AGAACTTCGATAGGCGAGAGG R: GCAATTTTCAGGGCATGAACC	59	Nishizawa et al., 2000
TR3	F: AGATCCAAACAGAGGGACTG R: CGGATCACCTATTCATTG	56	
OP-54	CACCCCTTG	35	Amiri et al., 2011
nad1B	F2_ TTTCTCTTTATGGATAACCAATTCA R3_ AGGATTCCTTTTGAACCCAAT	55	Soranzo et al., 2003

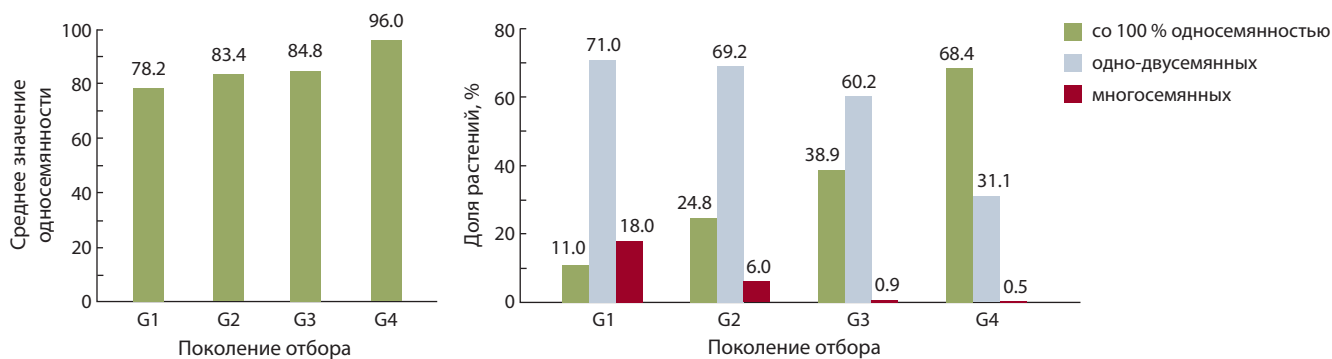


Рис. 1. Наследование признака односемянности у растений опылителя О-типа (Ошевнев и др., 2018).

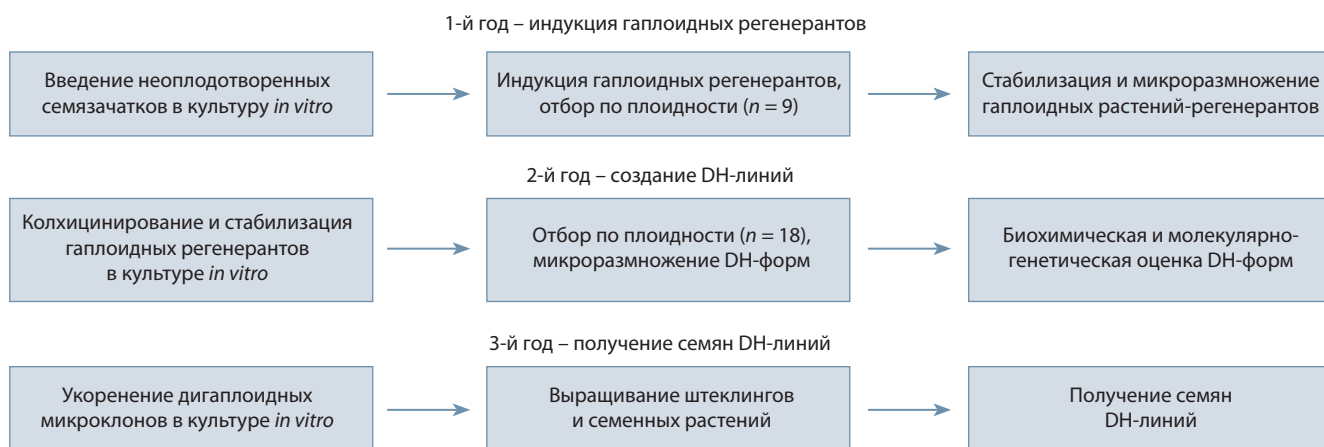


Рис. 2. Схематическое представление этапов получения дигаплоидных линий сахарной свеклы.

Заключительный этап технологии – укоренение дигаплоидных линий в культуре *in vitro*, выращивание штеклингов и семенных растений в закрытом грунте и получение семян ДН-линий. Предлагаемая технология дает возможность создания генетически и морфологически выровненного материала в 2–3 раза быстрее, минуя многократное самоопыление растений (см. рис. 2).

Для создания гомозиготных линий сахарной свеклы на основе гаплоидов большое значение имеет отбор генотипов с ценными селекционными признаками. Известно, что в популяциях сахарной свеклы присутствуют растения с нормальной (N) и стерильной (S) цитоплазмой. У N-растений пыльца фертильна и жизнеспособна, у S-растений она может быть как фертильной, так и стерильной, в зависимости от взаимодействия стерильной цитоплазмы с рецессивными аллелями (*rf1* и *rf2*) ядерного гена-восстановителя фертильности. Результатом сложного взаимодействия определенных ядерных и митохондриальных генов является ЦМС (Matsuhira et al., 2012; Chen et al., 2014). Один из наиболее известных и изученных генетических факторов, участвующих в проявлении признака ЦМС, – именно данный мультилокусный ген восстановления фертильности (*Rf*), супрессор митохондриальных генов, вызывающих стерильность пыльцы (Aragawa et al., 2018).

Дополнительно существуют и другие важные генетические факторы, которые на сегодняшний день недостаточно

изучены. К ним относится митохондриальный ген *nad1* (*BevupMr038*, субъединица 1 НАДН-дегидрогеназы), кодирующий НАДН: субъединицу Н убихинон оксидоредуктазы. Экспрессия этого гена вносит значительный вклад во взаимодействие ядерного и митохондриального геномов. С помощью маркеров для гена *nad1* проведен анализ дигаплоидных растений-регенерантов сахарной свеклы как фертильных, так и стерильных форм (рис. 3).

Амплификация выявила у всех образцов фрагмент ДНК размером 400 п. н. Полученные ампликоны были отсеквенированы, выравнивание последовательностей показало их идентичность, за исключением однонуклеотидного полиморфизма. Показано, что у всех образцов с фертильной пыльцой, т. е. у носителей доминантного аллеля ядерного гена *Rf1*, произошла замена нуклеотида С на Т, при этом у всех гаплоидных стерильных форм находился только нуклеотид С (рис. 4).

Обнаруженная однонуклеотидная замена, предположительно, является значимой (non-synonymous), т. е. может вызвать замену аминокислоты в полипептиде, в результате чего, по-видимому, и происходит продукция функционально другого белка. Наличие установленного SNP, скорее всего, связано с различиями в проявлении признака ЦМС у сахарной свеклы.

Изучение генетического полиморфизма митохондриального генома *B. vulgaris* осуществляли с использованием высоковариабельных tandemных повторов – мини-

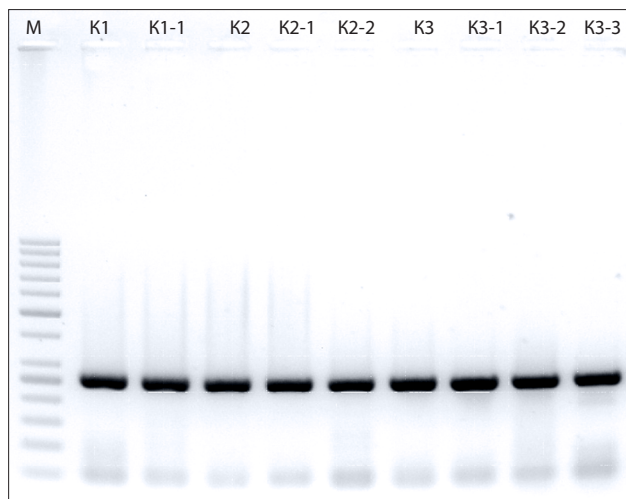


Рис. 3. Электрофореграмма фрагментов ДГ-регенерантов с применением маркеров к гену *nad1*.

K1 – контрольные фертильные растения; K3 – 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., ThermoScientific, США). Размер ампликона – 400 п.н.

сателлитов. Ранее в результате исследований были обнаружены и описаны четыре локуса тандемных повторов, TR1, TR2, TR3 и TR4, в митохондриальном геноме сахарной свеклы (Nishizawa et al., 2000; Liu et al., 2017). Семейство минисателлитов TR состоит из тандемных повторов длиной 30–32 п.н., количество которых варьировало от 2 до 13 среди исследованных генотипов свеклы (Xia et al., 2020). Показано, что маркеры TR1 и TR3 сцеплены с генами, контролирующими ЦМС (Nishizawa et al., 2000). В связи с этим нами был проведен анализ полученных растений-регенерантов с помощью указанных выше праймеров.

Аmplification ДНК образцов с праймером TR1 выявила фрагменты длиной 700 п.н. у гаплоидных форм О-типа,

400 п.н. – у гаплоидных МС-форм. У образца № 10 обнаружены оба вышеуказанных ампликона (рис. 5).

Так как в геноме образца № 10 амплифицируются оба фрагмента, то однозначно говорить о его принадлежности к МС- или О-типу нельзя. Ранее А.Г. Брагин с коллегами (2011) обнаружили, что как N-, так и *Svulg*-специфичные маркеры повсеместно присутствуют в цитоплазмах растений как с оуэновским плазмотипом, так и с плазмотипом, который обеспечивает образование фертильной пыльцы. Данные, полученные авторами, свидетельствуют в пользу независимого сосуществования митохондриальных геномов N- и *Svulg*-типов в пределах митохондрий растений одной линии.

Аmplification ДНК с праймером TR3 показала наличие фрагментов длиной 500 п.н. у гаплоидных форм О-типа, 400 п.н. – у гаплоидных МС-форм. У образца № 9 ДНК-фрагментов не обнаружено (рис. 6).

Известно, что минисателлиты широко используют для оценки полиморфизма митохондриального генома. Предположительно, это и объясняет неоднородность паттернов образцов № 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 формы МС- и О-типа, 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).

Важнейший селекционно-ценный признак у сахарной свеклы – односемянность, который контролируется рецессивным аллелем гена *M-m*. Как и в случае с митохондриальными генами, точная локализация генов (локусов), контролирующих признак «раздельноплодность», не установлена (Shavrukov, 2000). Однако выявлен локус, сцепленный с этим признаком в поколениях F₁ и F₂. R. Amiri с коллегами (2011) проверили 297 одноцепочечных декамеров RAPD-праймеров в популяции F₂ гибри-

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7,217)

```

ccK2      attcttatctgaattgcgagaataactgactaagccgtgcggtgccataagcggtcattct
ccK1-1    attcttatctgaattgcgagaataactgactaagccgtgcggtgccataagaggtcattct
ccK2-1    attcttatctgaattgcgagaataactgactaagccgtgcggtgccataagaggtcattct
ccK2-2    attcttatctgaattgcgagaataactgactaagccgtgcggtgccataagaggtcattct
ccK3-2    -----attgcgagaataactgactaagccgtgcggtgccataagaggtcattct
ccK3-3    attcttatctgaattgcgagaataactgactaagccgtgcggtgccataagaggtcattct
ccK3      attcttatctgaattgcgagaataactgactaagccgtgcggtgccataagaggtcattct
ccK3-1    attcttatctg-attgcgagaataactgactaagccgtgcggtgccataagaggtcattct
ccK1      attcttatctg-attgcgagaataactgactaagccgtgcggtgccataagaggtcattct
          *****

ccK2      csaacggggacagggccaagccttaggttggttaagtaagttgggtgacagatcggcca
ccK1-1    csaacggggacagggccaagccttaggttggttaagtaagttgggtgacagatcggcca
ccK2-1    csaacggggacagggccaagccttaggttggttaagtaagttgggtgacagatcggcca
ccK2-2    csaacggggacagggccaagccttaggttggttaagtaagttgggtgacagatcggcca
ccK3-2    csaacggggacagggccaagccttaggttggttaagtaagttgggtgacagatcggcca
ccK3-3    csaacggggacagggccaagccttaggttggttaagtaagttgggtgacagatcggcca
ccK3      csaacggggacagggccaagccttaggttggttaagtaagttgggtgacagatcggcca
ccK3-1    csaacggggacagggccaagccttaggttggttaagtaagttgggtgacagatcggcca
ccK1      csaacggggacagggccaagccttaggttggttaagtaagttgggtgacagatcggcca
          *****
    
```

Рис. 4. Локализация SNP у образцов растений-регенерантов в гене *nad1*.

ccK3, ccK3-1, ccK3-2, ccK3-3 – стерильные формы; ccK1, ccK1-1, ccK2, ccK2-1, ccK2-2 – фертильные формы.

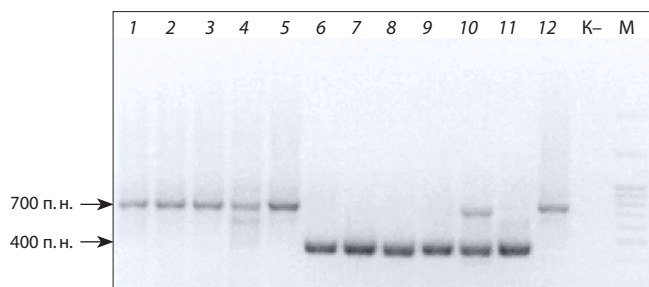


Рис. 5. Электрофореграмма ПЦР-продуктов с использованием праймера TR1.

Дорожки: 1–5, 12 – гаплоидные регенеранты опылителя О-типа; 6–9, 11 – МС-регенеранты (гаплоиды); 10 – гаплоид (микс). М – маркер молекулярных масс (ДНК GeneRuler™; 100–3000 п. н., ThermoScientific, США). К – отрицательный контроль (стерильная вода вместо ДНК). Размеры бэндов – 700 и 400 п. н.

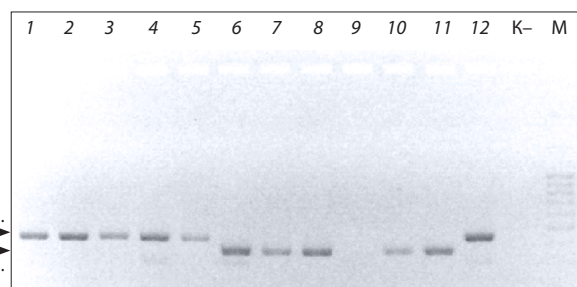


Рис. 6. Электрофореграмма разделения ПЦР-продуктов с помощью маркера TR3.

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 бэндов – 500 и 400 п. н.

дов как раздельно-, так и сростноплодных растений сахарной свеклы. Ближайшим генетическим маркером (менее 50 сМ), который наследуется сцепленно с геном раздельноплодности, оказался маркер OP-S4.

В наших опытах при проведении амплификации ДНК у 11 образцов сахарной свеклы, полученных в культуре *in vitro*, с праймером OP-S4 установлена амплификация фрагментов длиной 1000 п. н. у всех образцов. У некоторых образцов (№ 1, 2, 3, 10, 11) синтезировался второй фрагмент размером около 2800 п. н. Генотипы № 4 и 5, которые, по данным селекционеров (В.П. Ошевнев, Н.П. Грибанова), являются сростноплодными, имели слабо выраженные ДНК-фрагменты (рис. 7).

Результаты, полученные при апробации праймера OP-S4, находящегося в одной группе сцепления с геном раздельноплодности, не позволяют говорить о достоверном ранжировании образцов по признаку «раздельноплодность» на этапе микроклонов-гаплоидов. Возможно, это связано с низкой специфичностью и повышенной чувствительностью к условиям реакции, характерной для праймеров RAPD. Для идентификации гомозиготных односемянных генотипов требуется более детальный и глубокий анализ с применением большого количества как образцов растений сахарной свеклы, так и молекулярно-генетических маркеров с более высокой степенью специфичности.

Заключение

Разработана технологическая схема ускоренного получения удвоенных линий (гомозигот) – компонентов высокопродуктивных гибридов. Из четырех ДН-линий *B. vulgaris* отобраны семена, которые применяются при размножении суперэлиты мужскостерильного компонента гибрида сахарной свеклы РМС 120. В результате молекулярно-генетического анализа в геноме гаплоидных растений-регенерантов выявлен SNP, позволивший разделить их на фертильные и стерильные формы. Установлено, что митохондриальные минисателлитные маркеры TR1 и TR3 дают возможность отнести гаплоидные растения-регенеранты к формам МС- или О-типа. С помощью ПЦР-анализа 11 полученных в культуре *in vitro* раздельно- и сростноплодных образцов, проведенного с RAPD праймером

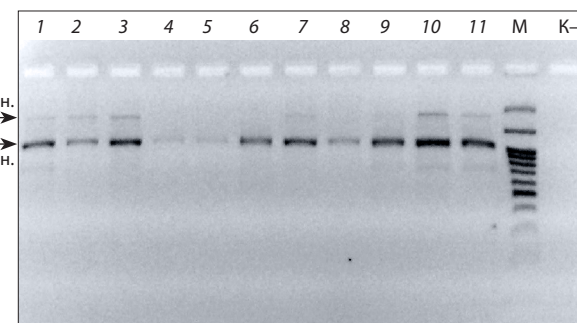


Рис. 7. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных с использованием праймера OP-S4.

Дорожки: 1–3 – О-тип; 4–5 – ГО (гетерозисный опылитель); 6–11 – МС. М – маркер молекулярных масс ДНК (GeneRuler™ 100–3000 п. н., ThermoScientific, США). К – отрицательный контроль (стерильная вода вместо ДНК). Размеры ДНК-ампликонов – 1000 и 2800 п. н.

OP-S4, обнаружены фрагменты длиной 1000 п. н. у односемянных растений-регенерантов.

Сочетание методов биотехнологии и молекулярной генетики с приемами традиционной селекции дает возможность формировать новый селекционный материал для создания отечественных гибридов сахарной свеклы нового поколения.

Список литературы / References

- Бордонос М.Г. Особенности наследования односемянности плодов у гибридов первого поколения сахарной свеклы. *Вестн с.-х. науки.* 1966;12:60-61.
- [Bordonos M.G. Features of monogermity inheritance in first-generation sugar beet hybrids. *Vesti Sel'skokhozyaystvennoy Nauki = Agricultural Science News.* 1966;12:60-61. (in Russian)]
- Брагин А.Г., Иванов М.К., Федосеева Л.А., Дымшиц Г.М. Анализ гетероплазматического состояния митохондриальной ДНК фертильных и мужскостерильных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris*). *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2011;15(3): 524-530.
- [Bragin A.G., Ivanov M.K., Fedoseeva L.A., Dymshits G.M. Analysis of mitochondrial DNA heteroplasmy of fertile and male-sterile sugar beet plants (*Beta vulgaris*). *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2012; 2(1):53-57. DOI 10.1134/S2079059712010030.]
- Бутенко П.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999.

- [Butenko R.G. Biology of Higher Plant Cells *in vitro* and Biotechnology Based on Them. Moscow: FBK-PRESS Publ., 1999. (in Russian)]
- Жужжалова Т.П., Колесникова Е.О., Васильченко Е.Н., Черкасова Н.Н. Методы биотехнологии как потенциал развития селекции сахарной свеклы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(1):40-47. DOI 10.18699/VJ20.593.
- [Zhuzhhalova T.P., Kolesnikova E.O., Vasilchenko E.N., Cherkasova N.N. Biotechnological methods as a tool for efficient sugar beet breeding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(1):40-47. DOI 10.18699/VJ20.593. (in Russian)]
- Коломиец О.К. Селекция и методика работ, применяемых по выведению сортов сахарной свеклы с односемянными плодами на Белоцерковской опытно-селекционной станции. В: Односемянная сахарная свекла. 4-е изд. М.: Изд-во МСХ СССР, 1960;22-45. [Kolomiets O.K. Breeding methods and protocols used to develop sugar beet varieties with monogerm seeds in the Belotserkovskaya Breeding Station. In: Monogerm Sugar Beet. Moscow: USSR Ministry of Agriculture, 1960;22-45. (in Russian)]
- Малецкий С.И., Вепрев С.Г., Шавруков Ю.Н. Генетический контроль размножения сахарной свеклы. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1991. [Maletskiy S.I., Veprev S.G., Shavrukov Yu.N. Genetic Control of Sugar Beet Reproduction. Novosibirsk: Nauka Publ., 1991. (in Russian)]
- Ошевнев В.П., Грибанова Н.П., Васильченко Е.Н., Бердников Р.В. Стабилизация признака односемянности при создании компонентов гибридов сахарной свеклы. *Изв. Самарского научного центра Российской академии наук*. 2018;20(2-2):186-191. [Oshevnev V.P., Gribanova N.P., Vasilchenko E.N., Berdnikov R.V. Stabilization of the monogermity trait when developing sugar beet hybrid components. *Izvestiya Samarskogo Nauchnogo Tsentra Rossiyskoy Akademii Nauk = Izvestiya of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. 2018;20(2-2):186-191. (in Russian)]
- Попов А.В. Результаты работы Ялтешковского селекционного пункта по выведению и изучению односемянной сахарной свеклы. В: Односемянная сахарная свекла. 4-е изд. М.: Изд-во МСХ СССР, 1960;45-73. [Popov A.V. The results of Yaltushkov Breeding Station work on the development and study of monogerm sugar beet. In: Monogerm Sugar Beet. Moscow: USSR Ministry of Agriculture, 1960; 45-73. (in Russian)]
- Amiri R., Sarafraz E., Sadat Noori S.A., Norouzi P., Seyedmohammadi N. A new molecular marker linked to gene for monogermity in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Rom. Agric. Res.* 2011;28:95-101.
- Arakawa T., Uchiyama D., Ohgami T., Ohgami R., Murata T., Honma Y. 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 *Rfl* locus. *PLoS One*. 2018;13(6):e0198409. DOI 10.1371/journal.pone.0198409.
- Chen J.F., Cui L., Malik A.A., Mbira K.G. *In vitro* haploid and diploid production via unfertilized ovule culture. *Plant Cell Tissue Cult.* 2011;104(3):311-319. DOI 10.1007/s11240-010-9874-6.
- Chen L., Liu Y. Male sterility and fertility restoration in crops. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2014;65:579-606. DOI 10.1146/annurev-arplant-050213-040119.
- Cousin A., Heel K., Cowling W., Nelson M. An efficient high-throughput flow cytometric method for estimating DNA ploidy level in plants. *Cytometry*. 2009;75A:1015-1019.
- Dubrovnaia O.V., Lial'ko I.I., Parii F.N. Genetic control of morphological characters of the beet (*Beta vulgaris* L.). *Tsitol. Genet.* 2003; 37(4):57-72. (in Russian)
- Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnol. J.* 2010;8:377-424. DOI 10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x.
- Hemayati S., Taleghani D., Shahmoradi Sh. Effects of steckling weight and planting density on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) monogerm seed yield and qualitative traits. *Pak. J. Biol. Sci.* 2008;11(2):226-231.
- Katoh K., Standley D. A simple method to control over-alignment in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics*. 2016;32(13):1933-1942. DOI 10.1093/bioinformatics/btw108.
- Kikindonov G., Kikindonov Tz., Enchev S. Economical qualities of crosses between doubled haploid sugar beet lines. *Agric. Sci. Technol.* 2016;8(2):107-110. DOI 10.15547/ast.2016.02.018.
- Liu Q., Liu L., Luo Ch., Cheng D., Dai C., Shi Sh., Liang N., Liu T. Analysis of cytoplasm polymorphism on the TR2 locus of mitochondria genome in leaf beet line SK-5. *Adv. Biol. Sci. Res.* 2017;4: 292-296.
- Matsuhira H., Kagami H., Kurata M., Kitazaki K., Matsunaga M., Hamaguchi Y., Hagihara E., Ueda M., Harada M., Muramatsu A., Yui-Kurino R., Taguchi K., Tamagake H., Mikami T., Kubo T. Unusual and typical features of a novel restorer-of-fertility gene of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Genetics*. 2012;192:1347-1358. DOI 10.1534/genetics.112.145409.
- Nagamine T., Catty G., Ford-Lloyd B. Phenotypic polymorphism and allele differentiation of isozymes in fodder beet, multigerm sugar beet and monogerm sugar beet. *Theor. Appl. Genet.* 1989;77(5): 711-720.
- Nishizawa S., Kubo T., Mikami T. Variable number of tandem repeat loci in the mitochondrial genomes of beets. *Curr. Genet.* 2000;37: 34-38. DOI 10.1007/s002940050005.
- Savitsky V.F. A genetic study of monogerm and multigerm character in beet. *Proc. Am. Soc. Sug. Beet Technol.* 1952;7:331-338.
- Schumacher K., Schondelmaier J., Barzen E., Steinlicken G., Borchard D., Weber W.E., Jung C., Salamini F. Combining different linkage maps in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) to make one map. *Plant Breed.* 1997;116:23-38.
- Shavrukov Y. Localization of new monogerm and late-bolting genes in using RFLP markers. *J. Sugar Beet Res.* 2000;37(4):107-115.
- Soranzo N., Alia R., Provan J. Patterns of variation at a mitochondrial sequence-tagged-site locus provides new insights into the postglacial history of European *Pinus sylvestris* populations. *Mol. Ecol.* 2003;9(9):1205-1211. DOI 10.1046/j.1365-294x.2000.00994.x.
- Xia H., Zhao W., Shi Y., Wang X., Wang B. Microhomologies are associated with tandem duplications and structural variation in plant mitochondrial genomes. *Genome Biol. Evol.* 2020;12(11):1965-1974. DOI 10.1093/gbe/evaa172.

ORCID ID

A.A. Nalbandyan orcid.org/0000-0001-5959-047X

Благодарности. Исследования проведены в рамках Федеральной научно-технической программы развития сельского хозяйства на 2017–2025 гг, в которой ФГБНУ «ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова» и ООО «СоюзСемСвекла» участвовали в комплексном научно-техническом проекте «Создание высокопродуктивных гибридов сахарной свеклы отечественной селекции и организация системы их семеноводства» (КНТП). Реализация КНТП предполагает преодоление существенного отставания в разработке и применении современных биотехнологических и молекулярно-генетических методов в селекционном процессе сахарной свеклы, что приведет к повышению продуктивности создаваемых отечественных гибридов этой культуры. На основе объединения научных биотехнологических подходов селекционно-генетическими центрами уже получены и производятся новые, высокопродуктивные, рентабельные гибриды сахарной свеклы, отвечающие требованиям современного производства. Это позволит снизить уровень импортозависимости по семенам гибридов сахарной свеклы в Российской Федерации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.02.2021. После доработки 29.03.2021. Принята к публикации 29.03.2021.