

А.В. Корниенко,

доктор сельскохозяйственных наук

А.К. Буторина,

доктор сельскохозяйственных наук

Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы им. А.Л. Мазлумова Российской Академии Наук

Молекулярная селекция свеклы сахарной (*Beta vulgaris* L.) на устойчивость к биотическим и абиотическим факторам

Молекулярна селекція (MAS) – найновіший напрям селекції, який отримав розвиток багатьох сільськогосподарських культур і, зокрема буряку цукрового. У статті надається огляд в Росії та за її межами праць із молекулярної селекції буряку цукрового. Обговорюються використувані методи та отримані результати, а також перспективи подальшого розвитку цього напрямку.

Ключові слова:

молекулярна селекція, маркер-усереднений відбір, буряк цукровий, стійкість, маркерні системи, молекулярні маркери, генетичне картування, фізичне картування, перенесення генів, епігенетика.

Вступление. Развитие методов молекулярной биологии в конце XX века способствовало становлению нового направления в селекции растений, и в том числе свеклы сахарной, – молекулярной селекции (McGrath, 2010) [1]. Это позволило изучать изменчивость организмов на молекулярном уровне, что значительно расширило возможности отбора, и обеспечило получение молекулярных маркеров генов. Молекулярную селекцию, однако, McGrath рассматривает как вспомогательную селекцию «assisted breeding», методы которой дополняют методы классической селекции, использующие отбор по видимым и измеряемым признакам, которые также являются маркерами контролирующих их генов. Разработка и использование методов молекулярной селекции у свеклы сахарной основывается на результатах ее молекулярно-генетических исследований, обзор которых по состоянию на 2011–2012 г. приводится в статье А.К. Буториной, А.В. Корниенко и монографии А.В. Корниенко, А.К. Буториной [2, 3, 4]. Ряд цитируемых далее источников имеется

в списке литературы к данным публикациям.

Главным методом молекулярной селекции стал маркеропосредованный отбор (Marker assisted selection – MAS), который осуществляется именно по молекулярным маркерам. Их получение особенно важно для поиска генов, контролирующих хозяйственно-ценные признаки, главным из которых на сегодняшний день является устойчивость к биотическим и абиотическим факторам. Для оценки генетического разнообразия могут быть использованы и нейтральные анонимные маркеры.

Обзор. Показателем степени генетической изученности вида является плотность генетических карт его хромосом, которая в значительной мере определяет успех селекции. Первые генетические карты хромосом, созданные Wagner et al. (1991), включали в основном морфологические маркеры, а также были дополнены биохимическим – изоферментами и запасными белками. Биохимические маркеры широко использовали для целей селекции учеными из Института цитологии и генети-

ки, г. Новосибирск (Малецкий, Коновалова, 1985; Левитес и др., 1991; Малецкий и др., 1991).

Во ВНИИ свеклы сахарной Россельхозакадемии (г. Рамонь) на основе результатов электрофоретического анализа запасных белков и изоферментов, используемых как молекулярные маркеры, была проведена паспортизация линий, сортов и гибридов свеклы сахарной и создана электронная база данных «Спектр» (Федулова, Митин, 2004). С помощью белковых маркеров проводилось также изучение генетического разнообразия инбредных линий свеклы сахарной (Fedulova, Mitin, Kornienko, 2004). Однако число изоферментов, хотя и превышало число морфологических маркеров, но было также ограничено. К тому же белки как молекулярные маркеры оценивают полиморфизм только незначительной, кодирующей части генома. В отличие от них, молекулярные маркеры ДНК способны оценить полиморфизм всего генома и не зависят от стадий развития организмов и условий среды. С их помощью удалось создавать плотные генетические

и физические карты хромосом, включающие кодирующие и не-кодирующие ее районы.

Первыми молекулярными маркерами ДНК были ПДРФ (англ. RFLP). Метод полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (Restriction Fragment Length Polymorphism) основан на установлении с помощью гелеэлектрофореза различий по длине фрагментов ДНК генома конкретного организма, полученных при разрезании его ДНК специфическими ферментами рестриктазами эндонуклеазами по определенным нуклеотидным последовательностям (Алтухов, 2003). Различия по длине между фрагментами ДНК служат свидетельством изменений в них на молекулярном уровне, произошедших вследствие мутационных событий. Если такие различия совпадают с наиболее частым проявлением определенного признака, например конкретным заболеванием, то они становятся маркерами этого признака и используются как простые генетические маркеры. Более широкие возможности для получения молекулярных маркеров открылись с разработкой метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). На основе ПЦР были разработаны такие маркеры как RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – случайная амплификация полиморфных последовательностей ДНК) и AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов), которые в ряде случаев оказались ассоциированными с хозяйственно-ценными признаками. Наибольшую популярность среди молекулярных маркеров в последнее время приобрели повторы некодирующей (сателлитной) ДНК, различающиеся длиной повторяющейся едини-

цы – «мотива» (от 1 до 4 п. н. у микросателлитов до 100 п. н. – у минисателлитов). Изменчивость числа многокопийной последовательности (минисателлитов), наблюдающаяся в разных хромосомах вследствие возможных мутаций и рекомбинаций, получила название варьирования числа tandemных повторов (VNTR – variable number of tandem repeats). Микросателлиты, обозначаемые как SSR – simple sequence repeat (повтор простой последовательности), STR – short tandem repeat (короткий tandemный повтор), можно использовать и для изучения экспрессии генов, поэтому их стали рассматривать как товар, и к началу XXI века частные семенные компании, получающие их, делали информацию о них недоступной (Jung, 2004) [4]. Преимуществом этих маркеров является то, что их генотипирование требует малого количества образца ДНК, они легко амплифицируются с помощью ПЦР, характеризуются кодоминантным наследованием, имеют множество аллелей, очень многочисленны в геномах растений и пригодны для использования при физическом картировании генома. Интенсификация получения таких маркеров способствовала тому, что для свеклы сахарной при использовании уже сотен SSR маркеров созданы высокоплотные генетические карты (McGrath, 2010), которые в настоящее время являются общедоступными [1]. Геномная организация различных микросателлитных повторов у образцов свеклы сахарной широко варьирует, так как они чаще других последовательностей ДНК генома подвергаются ошибкам репликации. Это позволяет устанавливать различия между образцами. Микросателлитный анализ обеспечивает возмож-

ность различать аллели гена, не прибегая к их секвенированию, и оценивать полиморфизм по всему геному. С помощью микросателлитных праймеров можно избирательно амплифицировать фрагменты ДНК, находящиеся между двумя близко расположенными и ориентированными навстречу друг другу копиями определенной микросателлитной последовательности. На этом основан метод ISSR (inter-simple sequence repeat), который нашел применение в работах ряда исследователей.

Наиболее многочисленный класс молекулярных маркеров – (SNP – Single Nucleotide Polymorphism – однонуклеотидные полиморфизмы, или полиморфизмы единичного нуклеотидного сайта) также установлен в геноме свеклы сахарной.

Чаще всего SNP представлены двумя аллельными вариантами, обусловленными заменами одного нуклеотида в последовательности ДНК (Хлесткина, Салина, 2006) [5]. Отмечается, что наибольшую трудность при получении SNP составляет определение основной нуклеотидной последовательности, с которой можно проводить сравнение. Mohring et al. (2004) получили множественные группоспецифические наборы SNP для быстрого картирования и фингерпринтинга свеклы сахарной. Если же известна ДНК определенного гена, то для его локализации на хромосоме проводится гибридизация *in situ*. В настоящее время *in situ* гибридизация рассматривается как мощная уникальная технология, которая устанавливает корреляцию между молекулярной информацией в последовательности ДНК и физическим положением этой последовательности вдоль хромосомы или в геноме. Таким образом, устанавливается по-

ложение последовательностей на физической карте и это часто служит единственным способом определения количества и распределения повторяющихся последовательностей, составляющих большую часть генома.

Молекулярные маркеры в настоящее время уже в ряде стран широко используются в коммерческих селекционных программах (Eathington et al., 2007), так как доказано, что отбор геномов по молекулярным маркерам способствует значительному повышению эффективности внутрилинейных скрещиваний [6].

При построении генетических карт хромосом особенно важной является идентификация локусов, отвечающих за признак. Использование молекулярных маркеров, сцепленных с генами, позволило интенсифицировать этот процесс.

Большинство хозяйственно-ценных признаков относится к количественным, полигенным, которые наследуются сложно. Поэтому картирование генов количественных признаков значительно труднее, чем моногенных. В связи с этим количественные признаки подразделяют на различные компоненты – локусы количественных признаков (QTL), которые могут быть картированы у особей в популяции, когда они связаны с молекулярными маркерами, положение которых на хромосомах известно. Сама возможность картирования количественных признаков связана с успехами функциональной геномики. Для картирования QTL используют кандидатные гены и метод позиционного клонирования генов. Для идентификации генов, лежащих в основе QTL, в качестве кандидатных используют гены с известными функциями. Такие гены могут быть отобраны на основе их физиологических

и биохимических продуктов. Выявление специфических кандидатных генов осуществляется с применением ESTs (Expressed Sequence Tag – маркеры экспрессирующихся, кодирующих последовательностей.) Такие последовательности определяют путем выделения из клеток организма типичной для проявления исследуемого признака мРНК и с помощью фермента обратной транскриптазы, синтезируют кодирующий ее ген, секвенируют его и синтезируют праймеры от начала и конца гена. В первую очередь исследуются гены, кодирующие различные этапы биохимических путей, определяющих формирование интересующего признака. Применительно к свекле сахарной «законсервированные» гены углеводного метаболизма были отобраны как кандидатные и картированы для идентификации локусов важнейших количественных признаков, отвечающих за урожай и количество сахара (Shneider et al., 2002) [7].

Доступность коллекций EST является необходимым условием для идентификации генов. ESTs являются важной составляющей метода ДНК-микрочипов (ДНК-микрочипов). Для многих ESTs в зависимости от уровня сходства между любыми двумя последовательностями были установлены предполагаемые функциональные классы протеинов, большинство из которых относятся к биохимическим путям. Полный набор нуклеотидных последовательностей организма определяет типы его биохимических реакций, а специфический набор в специализированных клетках и тканях указывает на их биохимический статус. Дифференциальная экспрессия генов, особенно среди генов главного метаболического пути, обеспечивает меру

важности любого отдельного биохимического процесса при росте и развитии организма, что может быть использовано непосредственно для отбора на желаемый признак на протяжении наиболее критических фаз развития и при ответе на стрессы (Laurent et al, 2007) [8]. В настоящее время создана база данных, включающая миллионы таких последовательностей. Каждой последовательности присвоен свой идентификационный номер. Это обеспечивает идентификацию и поиск новых генов, что особенно важно для сложноустроенных геномов эукариот, к которым относится и сахарная свекла. На основании гомологии с полученной последовательностью в базе данных необходимо найти подходящий EST – маркер, например, с помощью алгоритма BLAST при использовании различных интерфейсов, в частности, находящегося на сайте Центра биотехнологической информации (Center for Biotechnology Information – NCBI <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>) (Laurent et al, 2007) [8]. Запрос в форме нуклеотидной или аминокислотной последовательности делается, чтобы установить наличие или отсутствие в базе данных идентичной или гомологичной последовательности EST, а также выяснить экспрессируется ли эта последовательность в клетках и можно ли ее использовать для позиционного клонирования. Полиморфизм экспрессирующихся, кодирующих последовательностей генома (ESTs) определяется главным образом присутствием в них SNP. Schneider et al. (2002) на основе полученных SNP-маркеров у свеклы сахарной рассмотрены возможности позиционного клонирования генов хозяйственно-ценных признаков [7].

К настоящему времени у свеклы сахарной изолировано уже свыше 20000 ESTs, которые находятся в Национальном Банке Биотехнологической Информации (электронный адрес: Gene Bank. www.ncbi.nlm.nih.gov) (Laurent et al, 2007) [8].

Стратегия позиционного картирования (Positional Gene Cloning) применяется тогда, когда ничего не известно о продукте гена, ответственного за исследуемый признак. Для этого используют ПДРФ (RFLP) – анализ и сравнивают наследование признака и нескольких десятков ПДРФ-маркеров в нескольких поколениях семей. Полученная генетическая карта показывает, какие из этих маркеров не сцеплены с геном и какие хромосомы не включают этот ген (Клаг, Каммингс, 2007). Далее устанавливают хромосомы, в которых искомый ген может находиться, и определяют локализацию (позицию) гена на конкретной хромосоме. Если при этом удается установить сцепление признака интересующего селекционера признака (например, устойчивости к заболеванию) и какого-либо полиморфного маркера у всех членов семьи (линии), осуществляется клонирование крупных фрагментов ДНК, включающих эти маркеры, их секвенирование, выявление открытых рамок считывания и обнаружение возможных мутаций, отсутствующих у здоровых индивидов (Патрушев, 2004). По нуклеотидным последовательностям установленного гена определяют последовательность аминокислот в соответствующем белке. Позиционное клонирование позволяет использовать только один специфический район хромосомы вместо сканирования всего генома при помощи большого числа полиморфных маркеров. Как отмечает McGrath (2010),

базы данных, доступные через Интернет, становятся необходимыми механизмами для геномного анализа.

Создание высокоплотных генетических карт важно для определения локусов количественных признаков (QTL), характеристики их эффектов, а когда они интегрированы в физические карты, то их положение на карте обеспечивает возможность клонирования генов, лежащих в основе QTL. Это необходимо, в частности, для точного переноса генов между организмами различного генетического происхождения, что обеспечивает возможность осуществления генетической инженерии (ГИ). ГИ позволяет конструировать сорта с заданными признаками, например такими, как устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам окружающей среды, с измененным метаболизмом для альтернативного использования свеклы сахарной. Кроме того, при получении и использовании трансгенных форм существенно сокращаются сроки селекции. А.В. Корниенко с соавторами (1994) впервые в мировой практике были получены и изучены трансгенные формы свеклы сахарной, устойчивые к гербицидам. Имеющиеся достижения в деле создания трансгенных сортов и форм свеклы сахарной освещаются также в работах McGrath (2005), Кищенко (2007), Левенко (2010), Жужжаловой, Васильченко (2009) и ряда других авторов [9].

Помимо запасных белков и изоферментов, а также молекулярных маркеров ДНК в качестве молекулярных маркеров устойчивости организмов возможно использование защитных пептидов и ДНК-связывающих белков.

У разных видов растений удалось клонировать многие гены

устойчивости к заболеваниям, которые эффективны против различных классов патогенов и вовлечены в узнавание потенциального патогена, обусловленное высокой степенью консервативности ДНК-связывающих последовательностей, имеющих общие функциональные домены, подобные нуклеотид-связывающим доменам (NBS). Эти ДНК-связывающие домены относятся к транскрипционным факторам (структурам, передающим первичный сигнал, полученный от рецепторов плазмалеммы на гены). Изменение под действием сигнала биологической активности транс-фактора приводит к ингибированию или стимулированию определенных групп генов. Были идентифицированы также сверхрегулируемые при инфекции гены. Многие из них кодировали относящиеся к патогенезу протеины, или так называемые защитные пептиды (PRs), которые были классифицированы в 14 PR семейств. Индукция защитных протеинов имеет исключительно важное значение для проявления устойчивости у инфицированных растений (Van Loon et al., 2006). На основании их последовательности и консервативной структуры стало возможным клонирование и генетическое картирование аналогов генов устойчивости (RGAs) и белков устойчивости (защитных пептидов – PRs) с предполагаемыми функциями ответа на патоген из различных геномов, используя подход вырожденного (дегенеративного) праймера – затравки.

Молекулярными маркерами типов цитоплазмы могут также служить фрагменты митохондриальной ДНК (мтДНК) и хлоропластной ДНК (хпДНК), связанные у свеклы с ЦМС, что делает очевидным целесообразность молекулярной идентификации

цитоплазмы селекционных образцов свеклы сахарной (Cheng et al., 2009).

Расширение возможностей изучения генетической изменчивости на молекулярном уровне может быть обеспечено путем использования метода – TILLING (Tageting Induced Local Lesions in Genomes – целенаправленного поиска локальных повреждений в геноме.)

Использование индуцированного мутагенеза значительно увеличивает спектр генетической изменчивости свеклы сахарной, как это было показано в работе А.В. Корниенко (1990). Традиционный экспериментальный мутагенез широко использовался для развития генетических стратегий и обеспечил получение более 2000 мутантных сортов сельскохозяйственных культур. В последние годы, однако, особое значение приобрел такой метод экспериментального мутагенеза, как TILLING. Было установлено, что мутаген, как EMS (этилметансульфонат) вызывает стабильные точковые мутации и таким образом продуцирует серии аллелей за счет изменений типа укорочения и миссенс (образования мутантного кодона с новым кодирующим смыслом), которые могут давать

ряд измененных фенотипов. TILLING уже нашел применение в селекции более 20 видов растений. Применительно к свекле сахарной TILLING-платформа была установлена учеными Университета Христиана Албертса (г. Киль, Германия). В настоящее время за рубежом получил развитие уже TILLING-сервис, который обеспечивает тысячами индуцированных мутантов международное научное сообщество (Till et al., 2008). Перспективы развития TILLINGa в России рассматриваются в статье Корниенко, Буториной (2012) [3].

Селекции свеклы сахарной в XXI веке, как считает J. Scott Camerton – сотрудник ARS – Сельскохозяйственного Научного Сервиса США, пойдет по пути преимущественного использования при отборе исходного материала молекулярных методов. Это, по мнению J. Scott Camerton, позволит в XXI веке совершить революционный переход от традиционных методов селекции, основанных на признаках, к селекции, основанной на генах. «При этом фермеры смогут отбирать сорта по желаемым генам. Знание генов и продуктов их деятельности – белков сделает селекцию более быстрым процессом, чем когда-

либо, поскольку можно будет предсказать результаты скрещиваний и выбрать наиболее эффективные пути для достижения желаемой цели».

Однако для дальнейшего развития направления молекулярной селекции у свеклы сахарной требуется решение еще многих проблем, например, оценки эффектов взаимодействия генов, учета возможности эпигенетической изменчивости, связанной с изменениями не в составе нуклеотидов ДНК хромосом, а в структуре хроматина (Малецкий и др., 2005.)

Выводы. Ещё в 1990 г. А.В. Корниенко на основании результатов собственных исследований разработал метод маркер-групповой селекции (MGS), при котором отбор нужных признаков у индивидуальных растений ведётся по морфотипу организма (основным групповым ассоциативным признакам) с учётом их проявления и наследования. Использование фенотипических маркеров полигенных групповых признаков уже принесёт положительные результаты при наличии чётких генетических представлений о том, как они формируют проявление хозяйственно-ценных признаков.

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- McGrath, J.M. Sugar Tec / J.M. McGrath // h. 2010. V. 12. P. 187.
- Буторина, А.К. Генетика / А.К. Буторина, А.В. Корниенко. – 2011. Т.47. №10. С. 1285–1296.
- Корниенко, А.В. «Генетика и селекция сахарной свеклы *Beta vulgaris* L. (прошлое, настоящее и будущее)» / А.В. Корниенко, А.К. Буторина. – Воронеж, Воронежский ЦНТИ. 2012.
- Jung, C. Genome analysis: Mapping in sugar beet / C. Jung // Biotechnology in Agriculture and Forestry. 2004. P. 121.
- Хлесткина, Е.К. Генетика / Е.К. Хлесткина, Е.А. Салина. – 2006. Т.42. № 6. С.725.
- Eathington. S.R., Crosbie T.M., Edwards M.D.,Reiter R.S., Bull J.K. // Crop Sci. 2007. V.47. P. 154.
- Schneider K., Schafer-Pregl R., Borchardt D.C., Salamini F. // Theor. Appl. Genet. 2002. V. 104. P. 1107.
- Laurent V., Devaux P., Thiel T. Viard F., Mielordt S., Touzet P., Quilelet M.C. //Theor. Appl. Genet. 2007. V. 115. P. 793.
- Жужжалова, Т.П. V съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров / Т.П. Жужжалова, Е.Н. Васильченко // Тез. докладов. Москва, 21–28 июня 2009. Ч. 1. – С. 228.
- Корниенко, А.В. Успехи современной биологии / А.В. Корниенко, А.К. Буторина. – 2012. Т. 132. № 6. С. 582–593.