

БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 633.41/44:631.526

doi: 10.31360/2225-3068-2018-66-98-105

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ДИКИХ ВИДОВ И НЕКОТОРЫХ СТОЛОВЫХ СОРТ-ПОПУЛЯЦИЙ СВЕКЛЫ (*BETA L.*) АРМЕНИИ КАК СЕЛЕКЦИОННЫЙ ИСХОДНЫЙ МАТЕРИАЛ

Алоян Т. Б., Бадалян М. В., Меликян А. Ш.

*Национальный Аграрный Университет Армении,
г. Ереван, Армения, e-mail: Tatev.Aloyan20@mail.ru*

В последние годы в селекции растений начали применять новые методы в основе которых находится ген, отвечающий за определенный признак растения. С этой точки зрения характеристика аллелофондов и генотипов некоторых сортов свеклы и их диких сородичей имеет важное научно-практическое значение. Поскольку генофонд является национальным достоянием и его правильное применение имеет большое стратегическое значение, следовательно, с целью уточнения генетической характеристики видов и использования их в качестве маркеров в процессе селекционных работ, была поставлена задача по исследованию полиморфизма белков некоторых сортов-популяций и диких видов свеклы. Результаты исследований позволили сделать вывод, что локус глобулина всех изученных образцов полиморфный и определить индексы генетического сходства между ними.

Ключевые слова: свекла, электрофорез, аллелофонд, генотип, глобулин, генетический маркер, селекционный материал.

Армения находится на территории Кавказа – одной из 25 наиболее важных и богатых точек с уязвимым биоразнообразием. Богатое разнообразие флоры обусловлено его природно-географическим расположением, которое включает около 3 600 видов сосудистых растений, из которых 124 – эндемики. Армения занимает одно из первых мест в мире по количеству видов растений на единицу площади (100 видов на 1 м²) и считается центром происхождения многих культурных растений, дикие сородичи которых встречаются в Армении [2, 8].

Одной из наиболее важных задач селекции является получение нового исходного материала и ускорения процесса создания высокоурожайных гибридов с экономически полезными свойствами.

Самой сложной частью работы, независимо от селекционных методов, является выявление генетической изменчивости селекционного материала и отбор желаемых генотипов. Запасы такой изменчивости составляют генетический потенциал формообразования вида или популяции, однако они малодоступны, а некоторые из них обычными методами генетического анализа совсем не раскрываются. Методы молекулярного маркирования открывают широкие возможности для идентификации селекционного материала, что позволяет решить дефицит морфологических маркеров [9, 10].

С селекционной точки зрения дикие виды свеклы имеют ряд полезных признаков, в частности, они выделяются морозостойкостью, что позволяет высевать их осенью, отсутствием преждевременного цветения, засухоустойчивостью, устойчивостью листьев к церкоспорозу и жёлтому вирусу. Необходимо отметить также односемянность плода, которая характерна только для вида *Beta lomatogona* Fisch. et C.A. Mey. Корнеплоды некоторых видов характеризуются устойчивостью к нематодe. Сорта-популяции свеклы в Армении культивируются многие годы, они хорошо адаптированы к местным климатическим условиям и выделяются ценными селекционными признаками. Эти и многие другие ценные свойства можно использовать при отдалённой гибридизации культурной свеклы и диких видов семейства *Beta* L. [7, 3, 4].

Цель исследования. Поскольку генофонд является национальным достоянием и его правильное применение имеет большое стратегическое значение, следовательно, с целью уточнения генетической характеристики видов и использования их в качестве маркеров в процессе селекционных работ, была поставлена задача по исследованию полиморфизма белков некоторых столовых сортов-популяций и диких видов свеклы. Использование генетических маркеров позволяет определить генетическую чистоту и идентификацию некоторых сортов и видов, независимо от жизненного цикла растения, и одновременно разработать генетический паспорт данного образца, что очень важно для оценки и устойчивого использования существующих генетических ресурсов [5].

Объектами исследования являлись распространённые в РА:

1. Дикие виды свеклы: *B. corolliflora* Zosimovic & Buttler, *B. macrorhiza* Steven, *B. lomatogona* Fisch. et C.A. Mey.
2. Столовые сорта-популяции свеклы: 'Апаранская', 'Ширакская' и 'Арамусская'.

Методика. Оценка морфологической характеристики исследуемых сортов-популяций и диких видов свеклы была дана в Проблемной лаборатории генофонда и селекции растений, а генетические исследования проводились в Лаборатории биологических исследований НАУА.

В материал, предварительно прошедший гомогенизацию, добавляли экстракционный буфер. Через 24 часа его подвергали центрифугированию со скоростью 4 000 оборотов/час. Экстракционную жидкость отделяли и хранили при температуре $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$. По методу Дейвиса электрофорез был проведён в 10%-ном полиакриламидном геле [11]. В таблице 1 приведены соответствующие реагенты и их количества для приготовления геля.

Таблица 1

Состав геля и количество реагентов

№	Реагенты	Количество	
		Разделительный гель	Концентрирующий гель
1.	30%-ный акриламид 0,8%-ный бис-акриламид (мл)	4,0	0,66
2.	Гелевый буфер (мл)	2,4	0,8
3.	Вода (мл)	5,6	2,54
4.	ТЕМЕД (мкл)	10	4,0
5.	10%-ный персульфат аммония (мкл)	60	20

Весь процесс электрофореза состоит из следующих этапов:

1. Установка вертикального аппарата электрофореза.
2. Приготовление разделительного геля согласно таблице 1.
3. Заполнение геля в сэндвичи в размере $3/4$ его объёма.
4. Добавление 0,8 мл дистиллированной воды на гель для предотвращения поступления кислорода.
5. Приготовление концентрирующего геля (табл. 1).
6. Удаление дистиллированной воды из сэндвичей, добавление концентрирующего геля, установка гребёнок.
7. Присоединение сэндвичей к аппарату электрофореза.
8. Удаление резиновых прокладок, обеспечивая прямой контакт геля с электродным буфером.
9. Удаление гребёнок.
10. С помощью автоматической пипетки добавление 10 мкл исследуемого образца в каждый карман.
11. Подключение аппарата электрофореза к регулятору мощности.
12. Проведение электрофореза двумя этапами
 - 20 минут, 100 Вт, под напряжением 28 миллиампер,
 - 280 Вт, под напряжением 35 миллиампер до конца электрофореза.
13. Отключение устройства от источника питания, извлечение электродного буфера и разделение сэндвичей.

14. Удаление лишних частей геля.
15. Фиксация геля в течение 1–1,5 часов.
16. Окрашивание геля в течение 30–45 минут.
17. Помещение окрашенного геля в омывающий раствор для удаление лишнего количества красителя.
18. Считывание фореграммы.
19. Интерпретация и документация результатов с помощью фотографирования и дегидратации геля.

В качестве электродного буфера использовали 0,016 М трис-глицин (рН = 8,7), а в качестве гелевого буфера – 0,18 М трис-НСl (рН = 8,8). Фиксирующий раствор готовится из смеси этилена, уксусной кислоты и дистиллированной воды в соотношении 4 : 1 : 6. Для окраски фиксированных молекул белка в полиакриламидном геле был использован 0,025%-ный раствор уксусной кислоты R-250 ярко-синей краски Кумасси. Отмывание и удаление лишних частей геля проводилось в 15%-ном растворе уксусной кислоты. С целью титрования образцов, увеличения плотности и фиксации конца форега использовался экстрагированный буфер, в состав которого входит: дистиллированная вода – 0,8 мл, активный электродный буфер – 1,0 мл, глицерин – 3,0 мл и бромфенол синий – 0,2 мл 0,5%-ный.

Во время анализа генетических систем популяций были использованы ряд формул.

Частота аллелей изученных образцов было определено по формуле:

$$P_i = \frac{n_i}{N},$$

где: P_i – частота I аллелей,

n_i – количество растений, несущих данную аллель,

N – общее количество изученных растений.

Коэффициент генетического сходства был определен формулой

$$r = \frac{\sum x_1 x_2}{\sqrt{\sum x_1^2 x_2^2}},$$

где: r – коэффициент генетического сходства,

x_1 и x_2 – группы, сопоставимые друг с другом.

Для каждого локуса отдел гомозиготности генотипов определялся по принципу обычного сравнения общего количества изученных растений. Локус глобулина принято обозначать буквенным обозначением GL, а генотипы – GLa/GLb, поскольку гетерогенный белок наследуется типами

кодминантности, то есть 2 родительских признака проявляются у потомства одинаково, следовательно, данный фенотип соответствует его фенотипу и регистрируется следующим образом: GLAA, GLBB и т. д. [1, 6].

Результаты исследований. С целью представления более полной картины, в ходе наших исследований 6 образцов свеклы подверглись форефу в трёхкратной повторности. Анализ фореграммы полиакриламидного геля был выполнен с использованием компьютерной программы Gel Analyzer. Известно, что локус глобулина представляет собой полиморф, состоящий из 3 аллелей. Все известные локусы проявились в течение наших исследований.

Таблица 2

**Относительная подвижность
фрагментов белка исследуемых сортов и диких видов свеклы**

Относительная подвижность фрагментов белка	Вид и сорт		Аллели локуса		
			11SGLA	11SGLB	11SGLC
Дикие виды	Свекла венчиковая (<i>B. corolliflora</i> Zosimovic & Buttler)		0,918	0,599	0,263
	Свекла крупнокорневая (<i>B. macrorhiza</i> Steven)		–	0,733	0,229
	Свекла раздельноплодная (<i>B. lomatogona</i> Fisch. et C.A. Mey)		0,926	0,498	–
Сорт-популяции	‘Апаранская’		–	0,750	0,320
	‘Ширакская’		–	0,641	0,372
	‘Арамусская’		0,899	0,650	0,301

Согласно им, во время электрофореза фрагменты молекулы белка, в зависимости от их массы, перемещаются по полиакриламидному гелю с разной скоростью, более того лёгкие фрагменты проходят длинный, а тяжёлые – короткий путь. Из данных таблицы 2 видно, что молекулы белка, характеризующие одинаковые аллели у образцов, имеют разную подвижность (RF). Во время идентификации сортов свеклы можно использовать здесь относительную подвижность фрагментов белка как маркер молекулы.

Результаты фореграммы полиакриламидного геля (анализ компьютерной программы Gel analyzer) обобщены в таблице 3.

Из данных таблицы становится очевидным, что у всех исследуемых образцов свеклы локус глобулина полиморфный, поскольку он наделён множественным аллелизмом.

Таблица 3

Частота аллелей исследуемых образцов свеклы

		Вид и сорт	Аллели локуса		
			11SGLA	11SGLB	11SGLC
Частота аллелей	Дикие виды	Свекла венчиковая (<i>B. corolliflora</i> Zosimovic & Buttler)	0,14	0,14	0,49
		Свекла крупнокорневая (<i>B. macrorhiza</i> Stevtn)	–	0,44	0,78
		Свекла раздельноплодная (<i>B. lomatogona</i> Fisch. et C.A. Mey)	0,10	0,14	–
Сорт-популяции		‘Апаранская’	–	0,54	0,18
		‘Ширакская’	–	0,40	0,25
		‘Арамусская’	0,35	0,48	0,69

Что касается генотипов (табл. 4), следует отметить, что у всех исследуемых образцов аллели А и С проявляются в гомозиготном состоянии (АА, СС), что нельзя сказать об аллеле В, поскольку у видов *Beta macrorhiza* Steven и *Beta lomatogona* Fisch. et C.A. Mey он проявляется в гетерозиготном состоянии (BC).

Таблица 4

Генотипы диких видов и исследуемых сорт-популяций свеклы

		Вид и сорт	Генотипы локуса			
			11SGL AA	11SGL BB	11SGL BC	11SGL CC
Частота генотипов	Дикие виды	Свекла венчиковая (<i>B. corolliflora</i> Zosimovic & Buttler)	AA	BB	–	CC
		Свекла крупнокорневая (<i>B. macrorhiza</i> Steven)	–	–	BC	CC
		Свекла раздельноплодная (<i>B. lomatogona</i> Fisch. et C.A. Mey)	AA	–	BC	–
Сорт-популяции		‘Апаранская’	–	BB	–	CC
		‘Ширакская’	–	BB	–	CC
		‘Арамусская’	AA	BB	–	CC

Для отбора правильных пар используют их белковые маркеры с целью получения гибридного поколения с высоким уровнем гетерозиса. Результаты генетического сходства исследуемых образцов приведены ниже.

**Генетическое сходство исследуемых сорт-популяций
и диких видов свеклы по генетическим маркерам**

Вид и сорт	Дикие виды			Сорт-популяции		
	С. венчи- цветная	С. крупно- корневая	С. раздель- ноплодная	‘Апаранская’	‘Ширакская’	‘Арамусская’
Свекла венчиоцветная	0	0,98	0,04	0,33	0,97	0,41
Свекла крупнокорневая		0	0,06	0,44	0,51	0,53
Свекла раздельноплодная			0	0,18	0,18	1,00
‘Апаранская’				0	0,98	0,68
‘Ширакская’					0	0,83
‘Арамусская’						0

Выводы. Таким образом, становится очевидным, что во время гетерозисной селекции из исследуемых образцов свеклы, в качестве исходных родительских форм, могут быть выбраны следующие пары:

1. *Beta corolliflora* Zosimovic & Buttler и *Beta macrorrhiza* Steven;
2. *Beta corolliflora* Zosimovic & Buttler и ‘Ширакская’ сорт-популяция;
3. *Beta lomatogona* Fisch. et C.A. Mey и ‘Арамусская’ сорт-популяция;
4. ‘Апаранская’ сорт-популяция и ‘Ширакская’ сорт-популяция;
5. ‘Ширакская’ сорт-популяция и ‘Арамусская’ сорт-популяция.

В вышеприведенных парах у гибридного поколения, независимо от метода скрещивания (прямой или реципрокный), возникает явление частного гетерозиса в зависимости от веса корнеплода.

Библиографический список

1. Богачева Н.Н., Федулова Т.П., Федорин Д.Н. Получение интрогрессивных форм свеклы при проведении межвидовой гибридизации // Сахарная свёкла. – 2010. – № 4. – С. 10-12. – ISSN: 0036-3359.
2. Бузанов И.Ф. Биология и селекция сахарной свеклы. – М., 1968. – С. 9-28.
3. Жуковский П.М. Культурные растения и их сородичи. – Ленинград. – 1971. – 750 с.
4. Зосимович В.П. Дикие виды и происхождения культурной свеклы. – Киев, 1940. – Т. 1. – С. 17-83.
5. Конарев В.Г. Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян. – СПб., 2000. – 186 с.
6. Лесневич Л.А. Электрофоретическое и иммунохимическое изучение запасных белков семян свеклы // Физиол. и биохим. культ. раст. – 1997. – Т. 29. – № 3. – С. 200-208. – ISSN: 0522-9310.
7. Меликян А.Ш. Биологические особенности и возможности использования некоторых диких растений, распространённых в Армении. – Ереван, 2001. – 171 с.
8. Тахтаджян А.Л. Флора Армении, Т. 2. – Ереван, 1957. – С. 519.

9. Федулова Т.П., Богачева Н.Н., Федорин Д.Н., Богомолов М.А., Ошевнев В.П. Молекулярно-генетическое изучение родительских форм и гибридов сахарной свеклы // Сахарная свёкла. – 2010. – № 8. – С. 8-10. – ISSN: 0036-3359.
10. Федулова Т.П., Богомолов М.А., Богачева Н.Н., Жужжалова Т.П., Федорин Д.Н., Ошевнев В.П., Хуссейн А.С. Подбор родительских пар для гибридизации с использованием ДНК-маркеров // Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы VI Московского международного конгресса. – М., 2011. – Ч. I. – С. 234-235. – ISBN: 5-7237-0372-2.
11. Davis B.J. Disc electrophoresis to human serum protein // Ann. N. – Y. Acad. Sci. –1964. – Vol. 121. – P. 404-427.

**GENOTYPIZATION OF WILD SPECIES
AND SOME TABLE VARIETIES OF BEET (*BETA L.*)
OF ARMENIA AS SELECTION INITIAL MATERIAL**

Aloyan T. B., Badalyan M. V., Melikyan A. Sh.

*Armenian National Agrarian University,
c. Yerevan, Armenia, e-mail: Tatev.Aloyan20@mail.ru*

In recent years, plant breeding began to apply new methods based on the gene responsible for a certain feature of the plant. This point of view describing allelofonds and genotypes of beet cultivated varieties and their wild relatives has a important, scientific and practical significance. As the gene pool is a national treasure and its correct application has a great strategic importance, therefore, in order to clarify the genetic characteristics of species and use them as markers in the selection process, a task was set to study the polymorphism of proteins of some varieties and wild species of beet. Results of research allow to conclude that the locus of globulin all studied samples polymorphic and determine the indices of genetic similarity between them.

Key words: beet, electrophoresis, allelofond, genotype, globulin, genetic marker, selection material.