

Молекулярно-генетический и цитологический контроль *Beta vulgaris* L.

Е.О. Колесникова*, С.В. Пономарева, Р.В. Бердников

ООО «СоюзСемСвекла», 396030, Воронежская область, м.р-н Рамонский, с. п. Айдаровское, п. ВНИИСС, Россия

* kolesnikovaeo@souzssemsvekla.ru

Цель: разработать систему контроля и отбора перспективных форм сахарной свёклы с применением молекулярно-генетического и цитологического анализа для повышения результативности скрещиваний в селекционной практике.

Материалы и методы: объектами исследования явились растения О-типов и МС форм *Beta vulgaris* L. Материалы в виде листьев и бутонов отбирали в групповых изоляторах в полевых условиях по 100 образцов каждой формы. В ходе работ был проведен молекулярно-генетический анализ отобранных образцов сахарной свёклы с использованием ДНК-маркеров подтверждения стерильности цитоплазмы и идентификации преобладающего невосстанавливающего аллеля цитоплазматической мужской стерильности. Детекцию продуктов ПЦР проводили с помощью электрофореза в 1хTBE буфере в 2% агарозе. Анализ и обработку электрофореграмм проводили с помощью системы гель-документирования GelDoc Go BioRad и программного обеспечения Image Lab. Для проведения микроскопического анализа пыльцы у образцов были взяты бутоны верхних частей соцветий. Окраску материала проводили раствором ацетокармина. Затем подсчитывали количество пыльцевых зерен в полях зрения, вычисляли процент фертильности пыльцы отношением количества хорошо окрашенных фертильных пыльцевых зерен к количеству слабоокрашенных, имеющих прозрачную цитоплазму и деформированных – стерильных пыльцевых зерен, изучали строение и измеряли размер зерен. Цитологические исследования, фотографии и измерения проводили с помощью Zeiss Axiolab A1 с цифровой фотокамерой, объективом с увеличением ×40.

Результаты: в ходе молекулярно-генетического исследования нами были отработаны условия для проведения ПЦР с маркерами, позволяющими выявить тип цитоплазмы и тип ядра, используя ДНК-маркеры подтверждения стерильности цитоплазмы и идентификации преобладающего невосстанавливающего аллеля цитоплазматической мужской стерильности. При отработке данного подхода было установлено, что все исследуемые образцы соответствовали предполагаемой селекционной форме. При этом нормальную цитоплазму и стерильное ядро, характерные для О типа, имели 100% фертильных образцов. Все образцы МС формы имели стерильную цитоплазму и стерильное ядро. Цитологический анализ позволил получить данные о строении и размере пыльцевого зерна, качеству пыльцы, посчитать процент фертильности и распределения фертильной и стерильной пыльцы у исследуемых образцов, выявить наличие дефектных зерен. Качество данных исследуемых показателей является составляющей успеха опыления и завязываемости семян. Были выделены группы растений О типа с фертильностью 85–100%, 100% стерильные растения МС формы и полуфертильные растения О типа с фертильностью 48–65%. Изучаемые пыльцевые зерна фертильных растений сахарной свёклы имели округлую форму, крупное вегетативное ядро и два спермия. Визуализировались две оболочки: наружная – экзина, прочная и стойкая, и внутренняя – интина. В экзине различались тонкие участки или отверстия, апертур – борозды или поры. Измерение размера ярко окрашенных пыльцевых зерен у фертильных образцов показало, что их диаметр в среднем составляет 10,0–10,9 мкм. Деформация и наличие стерильных пыльцевых зерен в образцах отсутствовали. Пыльца полуфертильного образца включала ярко и слабоокрашенные пыльцевые зерна, микро- и макропыльцу, зерна с прозрачной оболочкой – стерильные и деформированные пыльцевые зерна. Размеры зерен варьировались от 17,4 мкм (макропыльца) до 5,0 мкм (микропыльца). У стерильных образцов пыльцевые зерна отсутствовали, либо встречались в небольшом количестве (прозрачные, деформированные, размером от 6,3 до 7,8 мкм). Полученные данные позволили распределить исследуемые образцы на группы с различной степенью фертильности. Результаты молекулярно-генетического и цитологического исследований соотносились между собой и подтвердили соответствие отобранных образцов соответствующей селекционной форме.

Выводы: Использование системы маркеров позволило провести анализ и подтвердить тип цитоплазмы и ядра у исследуемых образцов генотипов-носителей ЦМС и О типа. С помощью цитологического контроля были выделены группы растений с высокими показателями фертильности и стерильности, которые можно рекомендовать для дальнейших селекционных работ. Внедрение разработанной системы контроля, включающей молекулярно-генетическую и цитологическую оценку растений *Beta vulgaris*, дало возможность сократить масштаб отбора, значительно снизить время и трудозатраты, необходимые для реализации селекционных программ. Отработанные подходы легли в основу технологии отбора образцов, что позволило интенсифицировать процесс создания перспективных линий и гибридов сахарной свёклы.