



ПРАВИТЕЛЬСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
(СПбГУ)

Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034  
тел./факс 328-97-88  
<http://www.spbu.ru>  
ОКПО 02068516 ОГРН 1037800006089  
ИНН/КПП 7801002274/780101001

Генеральному директору  
ООО «СоюзСемСвекла»  
Р.В. Бердникову

п. ВНИИСС, д.81  
Воронежская область, 396030  
Рамонский район

25.09.2024 № 01/1-39-12874

на № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

О направлении отчёта о НИР

Уважаемый Роман Владимирович!

Настоящим Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» направляет в Ваш адрес отчётные документы по I этапу договора на НИР от 20.05.2024 № от 20-05/2024 по теме: «Разработка молекулярных маркеров, ассоциированных с признаком «размер корнеплода» у сахарной свеклы, изучение влияния генов-регуляторов развития корнеплода на формирование урожайности сахарной свеклы».

Приложение: Отчет о НИР на 20 л. в 1 экз.

Проректор по научной работе

С. В. Микушев

ПРАВИТЕЛЬСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
(СПбГУ)

УДК 575.1



УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе

С.В. Микушев

2024 г.

ОТЧЕТ  
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ  
по договору № 20-05/2024 от 15.03.2024

«Разработка молекулярных маркеров, ассоциированных с признаком «размер  
корнеплода «у сахарной свеклы, изучение влияния генов-регуляторов развития  
корнеплода на формирование урожайности сахарной свеклы»




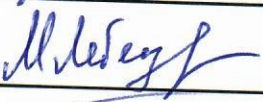




(промежуточный, 1 этап)

Руководитель НИР:  
д.б.н., профессор Кафедры генетики  
и биотехнологии

Л. А. Лутова

Санкт-Петербург  
2024

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

<p><b>Руководитель темы</b>          д.б.н., профессор кафедры          генетики и биотехнологии СПбГУ          Л.А. Лутова</p>	 подпись	Лутова Л.А.
<b>Исполнители</b>		
к.б.н. И.Е. Додуева		
к.б.н. В.Е. Творогова		
к.б.н. М.А. Лебедева		
к.б.н. М.С. Ганчева		
к.б.н. М.С. Бурлаковский		
К.А. Кузнецова		
к.б.н. И.С. Бузовкина		
<b>Представители заказчика</b>		
к.б.н. Е.О. Колесникова		
Е.Н. Малыхин		
Е.Г. Кислинская		

## РЕФЕРАТ

Отчет 20 с., 6 рис., 3 табл., 10 источников.

**Ключевые слова:** сахарная свекла, запасающий корень, регуляторные гены, молекулярные маркеры.

**Объект исследования:** 40 линий сахарной свеклы, предоставленные заказчиком.

### Цель работы

Разработать и протестировать молекулярные маркеры, ассоциированные с признаком “размер корнеплода” у сахарной свеклы, оценить влияние редактирования гена *BvBEL1* на развитие корнеплода свеклы, получить данные о механизмах влияния биопрепарата «Флавобактерин» на развитие корнеплода.

### Задачи работы

Задача 1 (на первый этап работы): Выявление полиморфизмов, ассоциированных с признаком «размер корнеплода» у свеклы

1. Секвенирование и анализ последовательностей генов *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1* и *BvBEL1* у 20 линий свеклы, предоставленных заказчиком.
2. Биоинформатический анализ последовательностей генов свеклы *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1*, *BvBEL1* у линий свеклы по данным, полученным за отчетные периоды 2023 и 2024 года (всего 40 линий)
3. Анализ распределения выявленных полиморфизмов последовательностей генов свеклы *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1*, *BvBEL1* у линий свеклы с разным размером корнеплода

Задача 2: Получение композитных растений свеклы, содержащих редактированный ген *BvBEL1* в корнях

1. Трансформация проростков двух предоставленных заказчиком линий свеклы штаммом *Agrobacterium rhizogenes*, содержащим вектор для редактирования гена *BvBEL1*, и контрольным штаммом
2. Выращивание композитных растений свеклы
3. Генотипирование корней композитных растений свеклы
4. Фенотипирование композитных растений свеклы

Задача 3: Изучение механизмов действия биопрепарата «Флавобактерин» на проявление признака “размер корнеплода”:

1. Обработка предоставленных заказчиком форм свеклы биопрепаратом «Флавобактерин» и контрольным биопрепаратом;
2. Выращивание растений в контролируемых условиях до стадии активного роста корнеплода;
3. Анализ анатомии и гистологии корнеплода и экспрессии маркерных генов у растений свеклы, обработанных биопрепаратом «Флавобактерин» и контрольным биопрепаратом.

Задача 4. Разработка молекулярного маркера, ассоциированного с признаком «размер корнеплода»: (будет выполнена в случае выявления разницы по распределению полиморфизмов любого из генов *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1* и *BvBEL1* у линий с разным проявлением признака «размер корнеплода»):

1. Разработка и тестирование ПЦР-маркеров, ассоциированных с признаком «размер корнеплода», и полученных на основе данных секвенирования генов свеклы *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1* и *BvBEL1*, проведенного исполнителем за отчетные периоды 2023 и 2024 года.

За первый отчетный период нами была полностью выполнена работа по задаче 1, а также начаты и частично выполнены работы по задачам 2 и 3.

### **Основные результаты работы за первый отчетный период**

За отчетный период было проведено выявление и анализ полиморфизмов последовательностей генов *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1* и *BvBEL1* у 20 линий свеклы, предоставленных заказчиком в 2023 году и 20 линий свеклы, предоставленных заказчиком в 2024 году (всего 40 линий).

Были получены следующие результаты:

1. Проведено секвенирование ПЦР-фрагментов, полученных нами на матрице ДНК 20 линий свеклы, предоставленных заказчиком в 2024 году, с праймерами к перекрывающимся участкам генов *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1* и *BvBEL1*.

2. Выявлен ряд различий между линиями по последовательностям кодирующих областей генов *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1* и *BvBEL1* у 20 линий свеклы, предоставленных заказчиком в 2023 году и 20 линий свеклы, предоставленных заказчиком в 2024 году (всего 40 линий).

3. Проведен статистический анализ распределения выявленных полиморфизмов последовательностей генов *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1* и *BvBEL1* у линий свеклы, различающихся по среднему размеру корнеплода.

4. Установлено, что шесть полиморфизмов в генах *BvLET6*, *BvFT1* и *BvBEL1* демонстрируют статистически значимую разницу распределения у линий с разными показателями среднего размера корнеплода.

5. Определены участки последовательностей генов *BvLET6*, *BvFT1* и *BvBEL1* с кандидатными полиморфными вариантами, пригодные для подбора праймеров, необходимых при разработке ПЦР-маркеров для признака «размер корнеплода».

### **Вывод**

Показано, что линии свеклы с разными полиморфными вариантами последовательностей участков генов *BvLET6*, *BvFT1* и *BvBEL1* демонстрируют статистически значимую разницу по среднему размеру корнеплода. Данные полиморфизмы, предположительно ассоциированные с размером корнеплода, могут быть использованы для создания ПЦР-маркеров, предположительно ассоциированных с размером корнеплода. Определены участки последовательностей генов *BvLET6*, *BvFT1* и *BvBEL1* с кандидатными полиморфными вариантами, пригодные для подбора праймеров, необходимых при разработке ПЦР-маркеров для признака «размер корнеплода».

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение	7
Основная часть	8
1. Обоснование направлений исследований	8
2. Материал и методы исследований	9
3. Результаты исследований	12
3.1. Анализ последовательностей генов <i>BvBEL1</i> , <i>BvKNOX6</i> , <i>BvLET6</i> , <i>BvFT1</i> у линий свёклы	12
3.2. Анализ распределения полиморфных вариантов участков генов <i>BvBEL1</i> , <i>BvKNOX6</i> , <i>BvLET6</i> , <i>BvFT1</i> у линий свеклы с разной средней массой корнеплода	12
3.3. Работы по получению композитных растений свеклы, содержащих редактированный ген <i>BvBEL1</i> в корнях	17
3.4. Работы по изучению эффектов обработки растений свеклы биопрепаратом «Флавобактерин» на анатомию корня и экспрессию генов	18
4. Заключение	19
Список использованных источников	20

## ВВЕДЕНИЕ

Сахарная свекла (разновидность *Beta vulgaris*) занимает центральное место среди корнеплодных культур, культивируемых в России, а также входит в десятку самых значимых сельскохозяйственных растений (Kuznetsova et al., 2020; Fernie, Yan, 2019). В связи с этим, выявление генетических механизмов развития запасующих корней у свеклы является актуальным на сегодняшний день исследованием.

Так, к числу выявленных регуляторов развития запасующего корня у свеклы относятся гены, кодирующие транскрипционные факторы семейств BELL (BELLRINGER-LIKE) и KNOX (KNOTTED-RELATED HOMEОBOX) (Lin et al., 2013), которые взаимодействуют в контроле разных программ развития растений и имеют множество мишеней (Niu, Fu, 2022). К мишеням комплексов транскрипционных факторов BELL-KNOX являются гены, кодирующие белки семейства FT, которые выполняют функцию туберигенов – регуляторов развития запасующих органов (Teo et al., 2017). Предполагается, что регуляторный модуль BELL-KNOX и FT участвует также в развитии запасующего корня у свеклы (Natarajan et al., 2019).

Важнейшей задачей современной селекции является разработка молекулярных маркеров (или ДНК-маркеров). В настоящий момент широко применяются технологии использования различных видов ДНК-маркеров на основе методов ПЦР, рестрикции, микрочипов, а также комбинации этих методов. Наиболее дешевыми в применении являются ПЦР-маркеры – как внутригенные, так и на основе повторов (например, микросателлитных). Наличие надежного молекулярного маркера по селективируемому признаку значительно повышают эффективность селекции, так как позволяет быстро производить отбор требуемых характеристик растений, не дожидаясь проявления признака на морфологическом уровне, а также подбирать оптимальные родительские пары для получения гибридов (Хлесткина, 2013).

Различают маркеры с известной локализацией (в определенном участке хромосомы, в конкретном гене, вблизи конкретного гена) и маркеры, о локализации которых ничего не известно (как правило, это мультилокусные маркеры). Молекулярные маркеры с неизвестной локализацией широко используют в филогенетических исследованиях и для паспортизации сортов растений, тогда как внутригенные маркеры или маркеры, тесно сцепленные с определенным геном дают возможность для геномной селекции по определенным признакам с известным генетическим контролем.

Вместе с тем, надежных молекулярных маркеров для признака «размер корнеплода» у свеклы ранее разработано не было.

В связи с этим, в число задач нашей работы входит разработка и тестирование внутригенного ДНК-маркера по признаку «размер корнеплода» у свеклы на основе данных по полиморфизму последовательностей генов *BvBELL1*, *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1* у линий свеклы с разной массой корнеплода. Гены *BvBELL1* (из семейства *BEL*), *BvKNOX6*, *BvLET6* (из семейства *KNOX*), *BvFT1* (из семейства *FT*) входят в список наиболее вероятных регуляторов роста корнеплода свеклы (Natarajan et al., 2019).



В наших ранее проведенных исследованиях, проведенных совместно с ООО «СоюзСемСвекла», было показано, что гены *BvBEL1*, *BvKNOX6*, *BvLET6* демонстрируют рост уровней экспрессии в ходе роста корнеплода, что также свидетельствует об их функции в качестве регуляторов этого процесса.

В связи с этим, на первом этапе в задачи нашей работы входило изучение полиморфизма последовательностей генов *BvBEL1*, *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1* у предоставленных заказчиком линий свёклы с разным размером корнеплода с целью разработки ДНК-маркера для признака «размер корнеплода». В работе были использованы данные секвенирования этих генов у 20 линий свеклы, предоставленных заказчиком в 2023 году, а также данные, полученные в 2024 году для еще 20 линий свеклы (итого для разработки маркера было секвенировано 4 гена у 40 линий). В результате для выявленных полиморфных вариантов последовательностей участков генов *BvLET6*, *BvFT1* и *BvBEL1* показана статистически достоверная разница по распределению у линий свеклы, различающихся по среднему размеру корнеплода.

Кроме того, за отчетный период мы начали работу по получению композитных растений свеклы с редактированным геном *BvBEL1*, который по нашим данным является регулятором развития корнеплода. Предоставленные заказчиком асептические проростки двух линий свеклы были трансформированы штаммом *Agrobacterium rhizogenes*, несущим вектор для редактирования гена *BvBEL1*, полученный нами в 2023 году в рамках сотрудничества с ООО «СоюзСемСвекла», а также контрольным штаммом. Полученные данные войдут во второй промежуточный отчет по проекту.

Также была начата работа по изучению эффектов обработки растений свеклы биопрепаратом «Флавобактерин», который по данным 2023 года показал стимулирующее влияние на рост корнеплода свеклы, на анатомию корня и экспрессию генов. Растения предоставленных заказчиком четырех форм свеклы были обработаны биопрепаратом «Флавобактерин» и контрольным биопрепаратом 070 и выращиваются в климокамере. Полученные данные войдут в итоговый отчет по проекту.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### 1. Обоснование направлений исследований

В связи со значением сахарной свеклы как одной из важнейших сельскохозяйственных культур, выявление генетических механизмов развития запасующих корней у этого объекта является актуальным на сегодняшний день исследованием. Важной задачей также является разработка молекулярных маркеров для признака «размер корнеплода», которых у свеклы ранее разработано не было. В нашей работе мы проводим разработку внутригенных маркеров для этого признака на основе полиморфизма последовательностей генов *BvBEL1*, *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1* у предоставленных заказчиком линий свёклы с разным размером корнеплода.

Для подтверждения регуляторной функции гена *BvBEL1* в контроле размера корнеплода, а также для возможного получения растений, формирующих корнеплод вне зависимости от средовых условий, мы получили генетическую конструкцию для

редактирования гена *BvBEL1*. В 2024м году мы начали работу по получению и изучению композитных растений свеклы с редактированным геном *BvBEL1* в корне.

Важным фактором в контроле развития корня и роста корнеплода также является микробиом почвы. По нашим данным 2023 года биопрепарат «Флавобактерин» положительно влияет на рост растений свеклы и развитие крупного корнеплода. В 2024 году была начата работа по изучению действия биопрепарата «Флавобактерин» на анатомию корня и экспрессию генов.

## **2. Материалы и методы исследований**

### **2.1. Растительный материал**

В качестве объекта исследований были использованы линии свеклы, предоставленные ООО «Союзсемсвекла».

Материал 20 линий для разработки молекулярного маркера был предоставлен в виде замороженных листьев. Линии характеризуются разной массой корнеплода.

Материал 2 линий свеклы для получения и изучения композитных растений свеклы с редактированным геном *BvBEL1* в корне был предоставлен в виде асептических проростков в стерильных банках на твердой среде Мурасиге-Скуга.

Материал 4 линий свеклы для изучения действия биопрепарата «Флавобактерин» был предоставлен в виде семян.

### **2.2. Выбор участков генов свеклы для разработки молекулярного маркера**

В рамках реализации проекта в 2023 году у 20 линий свеклы было проведено секвенирование генов *BvBEL1*, *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1*, *BvHD3A*. Для этого имеющиеся в базе данных NCBI последовательности кодирующих частей этих генов были разбиты на перекрывающиеся участки, к которым были подобраны праймеры с помощью программы Vector NTI (Invitrogen) с тем расчетом, чтобы получались продукты длиной 200-600 нп (оптимальная длина ПЦР-продукта для секвенирования). ПЦР-продукты, полученные на матрице ДНК 20 линий свеклы секвенировали и анализировали полученные последовательности. При сравнении последовательностей генов у разных линий были получены данные по их полиморфизму.

В 2024 году были выбраны полиморфные участки данных генов, последовательности которых были проанализированы по данным 2023 года, а также у новых 20 линий свеклы, предоставленных заказчиком в 2024 году. По результатам анализа список генов был сокращен: ген *BvHD3A* исключили из рассмотрения как наиболее консервативный и мало различающийся по последовательностям у разных линий свеклы. Также низкий уровень полиморфизма был показан для участка 8 гена *BvBEL1*, этот участок также исключили из анализа в 2024 году.

В итоге для изучения полиморфизма были использованы гены *BvBEL1*, *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1*. Последовательности праймеров, использованных для секвенирования этих генов в 2024 г, представлены в таблице 1.

### 2.3. Выделение ДНК

Суммарную ДНК выделяли из предоставленных заказчиком в 2024 году листьев 20 линий свеклы с помощью метода с 5М мочевиной (Кутлунина, Ермошин, 2017). Использовали смешанный материал от 5 растений одной линии на каждое выделение.

Растительный материал (0.5 г) растирали пестиком в присутствии жидкого азота, ДНК экстрагировали буфером (0,6 М NaCl, 100 mM TrisHCl (pH 7,5), 40 mM EDTA, 4% саркозил, 1% SDS, 5М мочевины) в течение 10-20 минут, затем проводили очистку смесью фенола с хлороформом (1:1) и разделяли фазы центрифугированием. Водную фазу переносили в чистую микропробирку и осаждали ДНК изопропанолом в течение 30 мин. с последующим центрифугированием. Осадок ДНК дважды промывали холодным 70% этанолом и высушивали под током воздуха в ламинаре, затем растворяли в 100 мкл стерильной дистиллированной воды. Концентрацию выделенной ДНК измеряли с помощью спектрофотометра Nanodrop-2000 (Thermo Scientific) при длине волны 260 нм.

### 2.4. Полимеразная цепная реакция

Реакции ПЦР проводили при следующих условиях: 1) 60 сек. при 94°C – 1 цикл; 2) 60 сек. при 94°C, 30 сек. при 54°C, 40 сек. при 72°C - 30 циклов; 3) 5 мин. при 72°C – 1 цикл.

После прохождения циклов ПЦР проводили электрофорез в 1% агарозном геле, в который добавляли интеркалирующий краситель бромистый этидий (0,1%) для визуализации ДНК в ультрафиолетовом спектре. Для определения примерного размера ПЦР-фрагментов использовали маркер длин ДНК 100+ или 1kb (Евроген).

Целевые фрагменты выделяли из геля с помощью набора реактивов и колонок Cleanup Mini (Евроген) по прилагаемому протоколу. Секвенирование ПЦР-фрагментов генов *BvBEL1*, *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1* было проведено в ресурсном центре СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

### 2.5. Биоинформатические методы

Анализ данных секвенирования ПЦР-фрагментов генов *BvBEL1*, *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1*, а также их выравнивание у разных линий свеклы были проведены с помощью программы UGene.

### 2.6. Статистические методы

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета R v. 4.0.2 (<http://www.rproject.org/>). Сравнение количественных показателей средней массы корнеплода у линий свеклы, различающихся по полиморфизмам последовательностей генов *BvBEL1*, *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1*, проводили с использованием t-критерия Стьюдента (Пузаченко, 2004).

Таблица 1. Последовательности праймеров для секвенирования генов свеклы *BvBEL1*, *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1*.

Наименование праймера	Последовательность праймера (5'-3')	Температура плавления, °C	% пар GC
<i>BvKNOX6 F1</i>	ATTAGAAGGTGTGTAATACCGTAATATG	51.2	32.1
<i>BvKNOX6 R1</i>	GATGAAACAATAGAGTATAATAATTGGA	50.4	25.0
<i>BvKNOX6 F2</i>	GCATACTTTTCTCCCCACTACTTA	50.9	41.7
<i>BvKNOX6 R2</i>	TGTTGTGAAGAGTTGAGTTTGTAG	50.1	37.5
<i>BvLET6 F1</i>	ATGGAGAGTAATGGTAATGGTCATG	53.1	40.0
<i>BvLET6 R1</i>	CACCTTTTGACATCTAACATAGGC	51.8	41.7
<i>BvLET6 F2</i>	ACATGGATTTTATTTGATGGGTTG	53.8	33.3
<i>BvLET6 R3</i>	AAGGTTTGGTTAATTCTTGCTCA	51.9	34.8
<i>BvLET6 F3</i>	TTCTGGAACCTTCGTTTATGATGC	52.9	39.1
<i>BvLET6 R3</i>	AATGATGGAATAAATAAGAGGGATG	51.9	32.0
<i>BvLET6 F4</i>	CGTGGTACAGCGTAATCTAACTT	50.2	43.5
<i>BvLET6 R4</i>	AGCAAAAGAAGTGAGTATATTATTCCT	50.4	29.6
<i>BvBEL1 F1</i>	ATGATGGCAACATACTTTCATGG	53.3	46.6
<i>BvBEL1 R1</i>	CTACTGTTACCTGACTCTGATGCTGT	52.9	46.2
<i>BvBEL1 F2</i>	ACAGCATCAGAGTCAGGTAACAGTAG	52.9	46.2
<i>BvBEL1 R2</i>	CCTCTTCAAGCATGTTGAGCA	54.6	47.9
<i>BvBEL1 F3</i>	TGCTCAACATGCTTGAAGAGG	54.6	47.9
<i>BvBEL1 R3</i>	TTGTCTGTATCTTTGTTCCACCTAT	52.8	57.1
<i>BvBEL1 F4</i>	ATAGGTGGAACAAAGATACAGACAA	52.8	57.1
<i>BvBEL1 R4</i>	GTACGGGTGAAGGAAGTGCTC	52.3	41.7
<i>BvBEL1 F5</i>	GAGCACTTCCTTACCCGTAC	52.3	41.7
<i>BvBEL1 R5</i>	AAGTCTCATATCATCCTCCAAACC	50.5	36.6
<i>BvBEL1 F6</i>	GGTTTGGAGGATGATATGAGACTT	50.5	36.6
<i>BvBEL1 R6</i>	CAAAGATAGATTTAGCGTGACTCTT	53.3	40.9
<i>BvBEL1 F7</i>	AAGACTCACGCTAAATCTATCTTT	53.3	40.9
<i>BvBEL1 R7</i>	TGCTTTCAAAGTATATCAATACTCAC	51.1	30.2
<i>BvBEL1 F9</i>	AGGTATCAAATAGGTTTATCAATGC	50.8	34.8
<i>BvBEL1 R9</i>	CATATCAGAGTTGCTTCTTTGTT	50.8	30.9
<i>BvBEL1 F10</i>	AACAAAGAAGCAACTCTGATATG	50.8	30.9
<i>BvBEL1 R10</i>	TCAAGCAAAATCATGTACGAGC	52.3	40.9
<i>BvFT1 F1</i>	ATGCCTAGAACATCAGCAAGTG	51.3	45.5
<i>BvFT1 R1</i>	TTGTACCTTTTCTTGAAGTCCAA	50.4	34.8
<i>BvFT1 F2</i>	TAGAATGGGTGTTGTTCTTGTTT	50.3	39.1
<i>BvFT1 R2</i>	TGGAGAGGTGGAATTGGAAT	50.8	45.0

### 3. Результаты исследований

#### 3.1. Анализ последовательностей генов *BvBEL1*, *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1* у линий свёклы

За отчетный этап мы получили и секвенировали ПЦР-фрагменты, соответствующие участкам генов *BvBEL1*, *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1*, на матрице 20 линий свеклы, предоставленных заказчиком в 2024 году, и собрали на их основании полноточные последовательности кодирующих частей этих генов.

«Сырые» данные секвенирования генов *BvBEL1*, *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1*, на матрице 20 линий свеклы, предоставленных заказчиком в 2024 году, приведены в документе

<https://drive.google.com/drive/folders/1LGe1n5xG6iBbA2MMi03QzRUYAb1W9LSB>.

Примеры электрофореграмм ПЦР-фрагментов с разных линий свеклы приведены на рисунке 1.

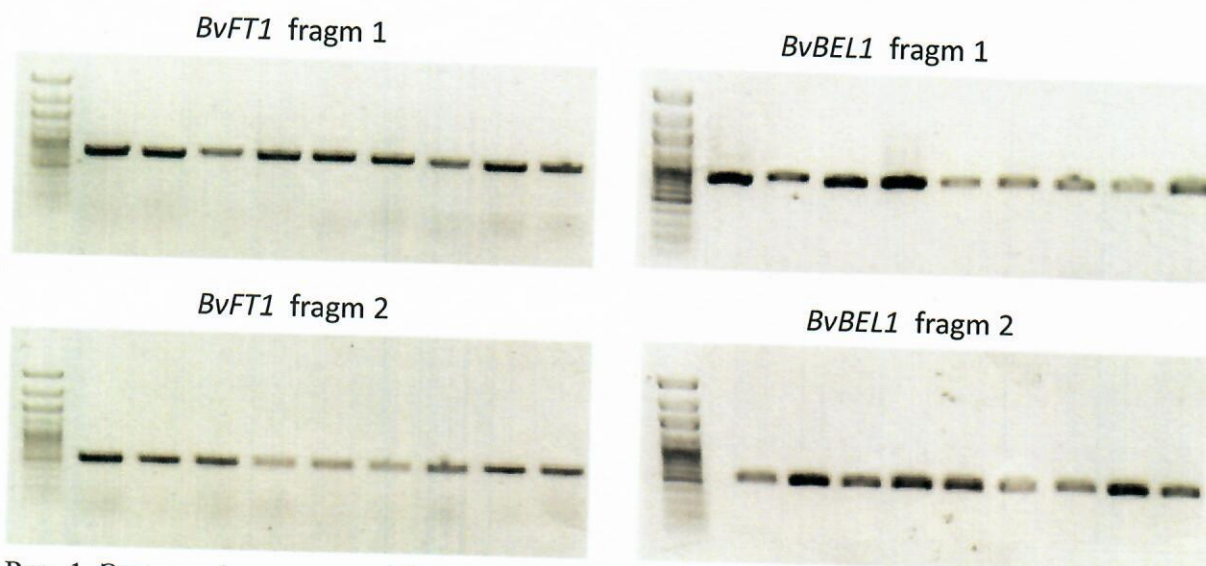


Рис. 1. Электрофореграммы ПЦР-фрагментов с праймерами к участкам генов *BvBEL1* и *BvFT1* для линий свеклы №1-9.

#### 3.2. Анализ распределения полиморфных вариантов участков генов *BvBEL1*, *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1* у линий свеклы с разной средней массой корнеплода

Далее был проведен биоинформатический анализ последовательностей генов *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1*, *BvBEL1* у линий свеклы по данным их секвенирования, полученным нами за отчетные периоды 2023 и 2024 года. Анализ включал в себя данные по последовательностям генов *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1*, *BvBEL1* у 40 линий свеклы, предоставленным заказчиком.

В результате в кодирующих частях генов *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1*, *BvBEL1* у изученных линий свеклы был выявлен ряд различий - однонуклеотидных замен, выпадений и вставок.

Далее мы провели анализ распределения выявленных полиморфизмов последовательностей генов *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1*, *BvBEL1* у 40 линий свеклы, различающихся по средней массе корнеплода (данные о массе корнеплода

предоставлены заказчиком). Наиболее перспективными были следующие восемь наиболее часто встречающихся у линий свеклы полиморфных участков, пригодных для подбора праймеров и дизайна ПЦР-маркеров:

1. Инсерция/ делеция GCAGCATCA в первом экзоне гена *BvBEL1* (1432-1440 нк)
2. Инсерция/ делеция T в первом экзоне гена *BvBEL1* (1372 нк)
3. Замена T→G в первом экзоне гена *BvBEL1* (1651 нк)
4. Инсерция /делеция TAG/TGC в четвертом экзоне гена *BvBEL1* (1675-1677 нк)
5. Вариабельный участок в четвертом экзоне гена *BvFT1* (5663-5680 нк)
6. Вариабельный участок в третьем экзоне гена *BvFT1* (3531-3540 нк)
7. Вариабельный участок в первом экзоне гена *BvLET6* (385-389 нк)
8. Замена T→A во втором экзоне гена *BvLET6* (1098-1112 нк)

Выравнивания последовательностей этих вариабельных участков у разных линий свеклы приведены на рисунках 2 – 4.

Работа по оценке распределения выявленных полиморфизмов у линий свеклы с разной средней массой корнеплода включала в себя следующие этапы, проведенные для каждого кандидатного полиморфного участка:

1). С использованием данных секвенирования генов *BvLET6*, *BvFT1*, *BvBEL1* линии свеклы разбивали на две группы в соответствии с наличием у них одного из двух вариантами последовательности полиморфного участка.

2). Для каждой группы линий данные по массе корнеплода представляли в виде вариационного ряда.

3). Для каждого вариационного ряда были подсчитаны основные статистические параметры: дисперсия, среднее, ошибка среднего

4). Затем было проведено сравнение двух вариационных рядов для каждого из полиморфизмов по T-критерию Стьюдента.

В результате статистически достоверные различия по встречаемости у линий с разной средней массой корнеплода линий были выявлены для шести полиморфизмов (№1, 2, 5, 6, 8). Таким образом, в кодирующей части каждого из генов *BvLET6*, *BvFT1*, *BvBEL1* были выявлены по два полиморфных участка, статистически достоверно связанных со средней массой корнеплода у анализируемых линий свеклы.

Данные по встречаемости вышеназванных полиморфизмов у линий свеклы приведены в таблицах 2 и 3.

К полиморфным участкам, предположительно связанным со средней массой корнеплода, были подобраны праймеры для создания и дальнейшего тестирования ПЦР-маркеров, ассоциированных с признаком «размер корнеплода у свеклы». Тестирование ПЦР-маркеров будет проведено на третьем этапе работы по проекту в 2024 г.

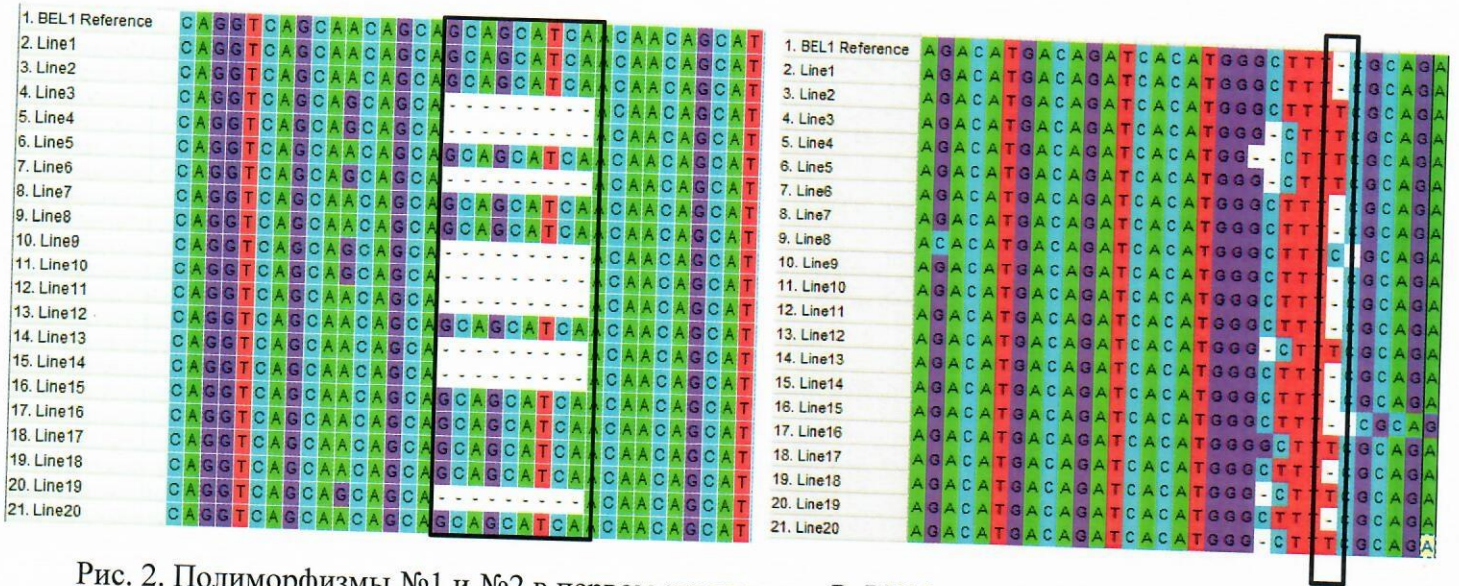


Рис. 2. Полиморфизмы №1 и №2 в первом экзоне гена *BvBEL1*.

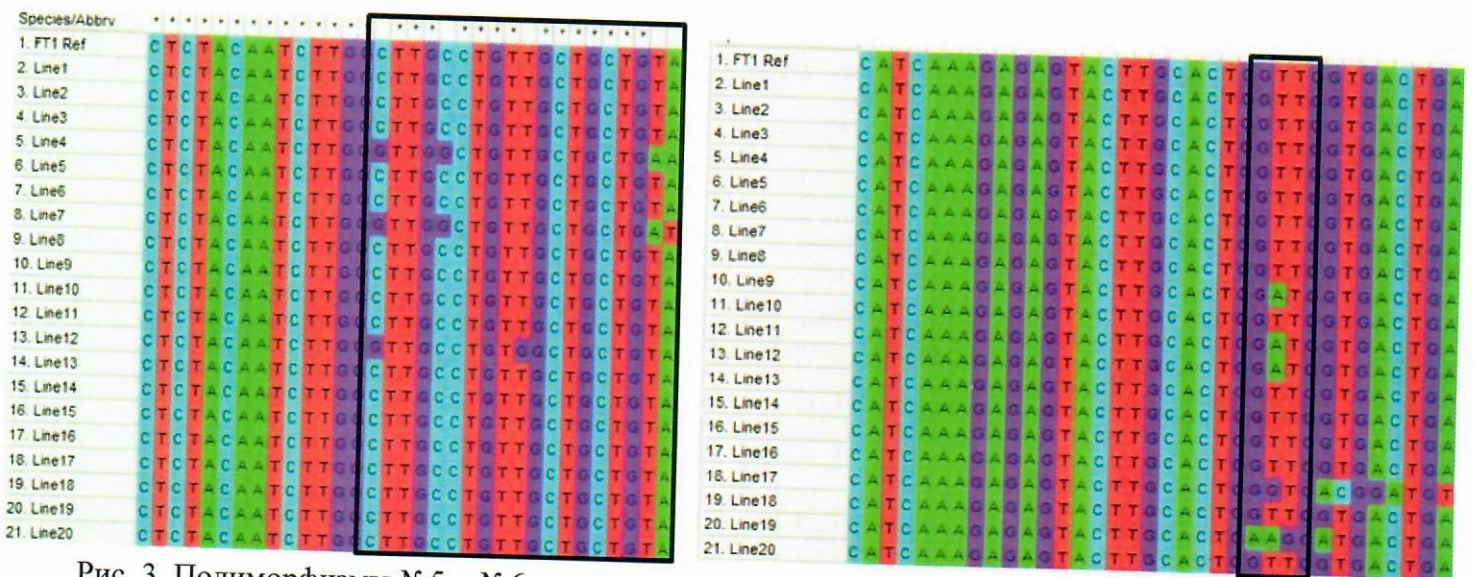


Рис. 3. Полиморфизмы №5 и №6 в четвертом и третьем экзонах гена *BvFT1*.

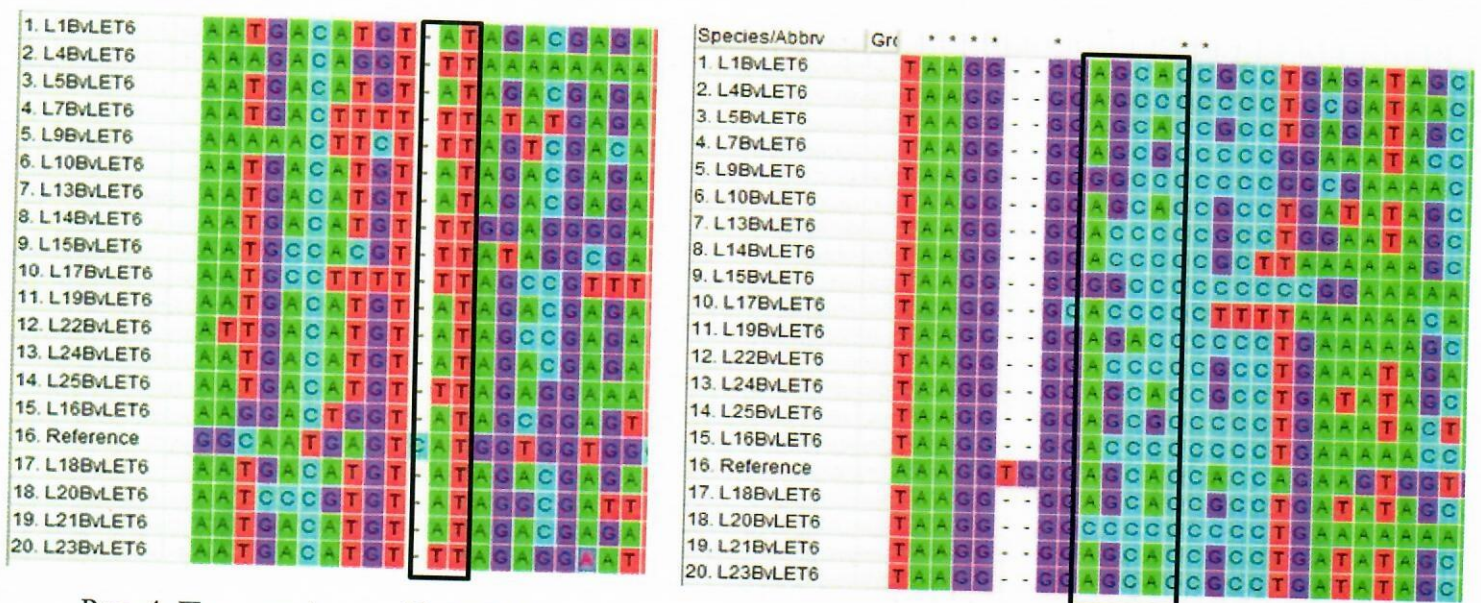


Рис. 4. Полиморфизмы №7 и №8 в первом и втором экзонах гена *BvLET6*.

№ по полиморфизма	Ген	Линии 2024	4	5	7	10	12	18	19	1	2	3	6	8	9	11	13	14	15	16	17	20	Значение T-критерия/различия	
																								0.85
1	<i>BEL1</i>	Средняя масса КП	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
2		Ins/del GCAGCATCA 1432-1440 (1 exon)	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Значимы
3		Ins/del T 1372 (1 exon)	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Значимы
4		T instead of G 1651 (1 exon) TAG/TGC insertion 1675-1677 (1 exon)	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	Не значимы
5	<i>FT</i>	Variable region in exon 4 (G and A insertions in 5663-5680) (exon 4)	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Значимы
6		Variable region in exon 3 3531-3540 (C insertions)	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Значимы
7	<i>LET6</i>	Variable region in exon 1 385-389	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Значимы
8		Variable region in exon 2 (1098-1112)	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Значимы

Таблица 2. Встречаемость восьми кандидатных полиморфизмов у линий свеклы, у которых гены *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1*, *BvBEL1* были секвенированы в 2024 году.



№ пол им ор физ ма	Ген	Линии 2023	16	18	20	21	23	25	1	4	5	7	9	10	13	14	15	17	19	22	24	26	Значение Т- критерия / различия  Значимы		
			0.69	0.66	0.64	0.73	0.67	0.83	0.47	0.56	0.46	0.52	0.48	0.47	0.50	0.54	0.50	0.54	0.50	0.43	0.49	0.60		0.46	0.18
1	<i>BEL1</i>	Средняя масса КП  Ins/del GCAGCATCA 1432-1440 (1 exon)  Ins/del T 1372 (1 exon)  T instead of G 1651 (1 exon)  TAG/TGC insertion 1675- 1677 (1 exon)	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	Значимы		
2			+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Значимы	
3			-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	Не значимы
4			-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	Не значимы
5	<i>FT</i>	Variable region in exon 4 (G and A insertions in 5663-5680) (exon 4)  Variable region in exon 3 3531- 3540	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Значимы		
6			+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Значимы	
7	<i>LET6</i>	Variable region in exon 1 385- 389  Variable region in exon 2 (A instead of T) (1098-1112)	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Значимы		
8			+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Значимы	

Таблица 3. Встречаемость восьми кандидатных полиморфизмов у линий свеклы, у которых гены *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1*, *BvBEL1* были секвенированы в 2024 году.

### 3.3. Работы по получению композитных растений свеклы, содержащих редактируемый ген *BvBEL1* в корнях

Ген *BEL1* относится к числу универсальных регуляторов развития запасующих органов разных видов растений (Natarajan et al., 2019). По нашим данным, полученным за отчетные периоды 2021-2022, экспрессия гена *BvBEL1* свеклы стабильно возрастает при росте запасующего корня. Поскольку ген *BEL1* относится к генам, которые регулируются фотопериодом, его редактирование может быть путем получения растений, рост корнеплода у которых не зависит от длины дня. Кроме того, опыты по влиянию редактирования этого гена на развитие растений

В 2023 году нами была получена генетическая конструкция для редактирования гена *BvBEL1* на основе вектора pHSE401 (Xing et al., 2014). По данным секвенирования полученной конструкции, редактируемый фрагмент в ней приходится на середину первого экзона гена *BvBEL1*, с высокой вероятностью нарушая функцию его белкового продукта.

В 2024 г конструкция для редактирования гена *BvBEL1* была использована для получения композитных растений свеклы. С этой целью конструкция была перенесена в штамм *Agrobacterium rhizogenes*, которым провели трансформацию предоставленных заказчиком асептических проростков двух линий свеклы (всего 24 проростка линии 1 и 35 проростков линии 2). Также эти же линии трансформировали контрольным штаммом, несущим репортерный ген глюконоидазы (*GUS*).

В настоящий момент у трансформированных растений свеклы регенерированы корни, проводится их проверка на наличие целевой вставки методами ПЦР и последующего секвенирования ПЦР-фрагмента. Проверенные растения пересаживаются из стерильной культуры *in vitro* в условия аэропоники и в дальнейшем в грунт (рис. 5).



Рис. 5. Композитные растения свеклы, несущие конструкцию для редактирования гена *BvBEL1* в корнях: условия асептической культуры, адаптация на аэропонной установке, растения в грунте.

### 3.4. Работы по изучению эффектов обработки растений свеклы биопрепаратом «Флавобактерин» на анатомию корня и экспрессию генов

В 2023 году в опытах по обработке растений свеклы биопрепаратами нами было показано стимулирующее влияние биопрепарата «Флавобактерин» на рост растений свеклы и формирование большого диаметра корнеплода. В связи с этим, в 2024 году мы проводим работу по выявлению механизмов такого стимулирующего эффекта, изучая эффект обработки растений свеклы биопрепаратом «Флавобактерин» на анатомию корня и экспрессию генов.

За отчетный период при посеве семян предоставленных заказчиком четырех форм свеклы была проведена инокуляция грунта биопрепаратами 030 («Флавобактерин») и 070 (контрольный универсальный биопрепарат). Оба препарата являются разработками ГНИ ВНИИСХМ и содержат штаммы ризосферных бактерий. В настоящее время растения свеклы (рис. 6) выращиваются в сосудах с инокулированным грунтом в регулируемых условиях климокамеры при температуре 20°C, фотопериоде 16d/8n, освещении 4500 люкс и влажности воздуха 70%.

При достижении стадии 60 дней у растений, выращенных с использованием биопрепаратов 030 («Флавобактерин») и 070, будет проведено изучение анатомии корня и экспрессии генов-регуляторов развития корня. Полученные данные войдут в итоговый отчет по проекту.



Рис. 6. Растения свеклы, обработанные биопрепаратами 030 («Флавобактерин») и 070 в климокамере.

#### 4. Заключение

Итак, на первом этапе работы по проекту было проведено секвенирование генов *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1*, *BvBEL1* у 20 линий свеклы, предоставленных заказчиком в 2024 г. Проведена биоинформатическая обработка данных по последовательностям этих генов у 40 линий свеклы, для которых вышеуказанные гены были секвенированы в 2024 и 2023 году, а также данных по средней массе корнеплода у тех же линий свеклы. В результате в генах *BvLET6*, *BvFT1*, *BvBEL1* были выявлены шесть полиморфных участков, статистически достоверно связанных с размером корнеплода. На их основе будут разработаны и протестированы молекулярные маркеры для признака «размер корнеплода». Проведена трансформация проростков двух предоставленных заказчиком линий свеклы штаммом *Agrobacterium rhizogenes*, содержащим вектор для редактирования гена *BvBEL1*, и контрольным штаммом. Получены композитные растения свеклы, которые в дальнейшем будут генотипированы и фенотипированы. Также была проведена обработка растений четырех линий свеклы двумя биопрепаратами («Флавобактерин» и 070) на диаметр корнеплода и размер листа свеклы. В дальнейшем у этих растений будет проведен анализ анатомии и гистологии корнеплода и экспрессии маркерных генов.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Кутлунина Н.А., Ермошин А.А. Молекулярно-генетические методы в исследовании растений: учебно-методическое пособие. Екатеринбург: Издательство Уральского университета, 2017. 142 с.
2. Пузаченко Ю.Г. Математические методы в экологических и географических исследованиях: учеб. пособие. М.: Академия, 2004. 416 с.
3. Хлексткина Е.Е. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и селекции. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. С. 1044-1054.
4. Fernie A.R, Yan J. De Novo Domestication: An Alternative Route toward New Crops for the Future. *Mol Plant*. 2019 May 6;12(5):615-631.
5. Kuznetsova K.A., Dodueva I.E., Pautov A.A., Krylova E.G., Lutova L.A. Genetic control of storage root development. *Russian Journal of plant physiology*. 2020. V.67, P. 589-605.
6. Lin T., Sharma P., Gonzalez D.H., Viola I.L., Hannapel D.J. The impact of the long-distance transport of a BEL1-Like messenger RNA on development. *Plant Physiol*. 2013. V.161. P.760-772.
7. Natarajan B., Kondhare K.R., Hannapel D.J., Banerjee A.K. Mobile RNAs and proteins: Prospects in storage organ development of tuber and root crops. *Plant Sci*. 2019. V. 284. P. 73-81.
8. Niu X, Fu D. The Roles of BLH Transcription Factors in Plant Development and Environmental Response. *Int J Mol Sci*. 2022 23(7):3731.
9. Teo CJ, Takahashi K, Shimizu K, Shimamoto K, Taoka KI Potato Tuber Induction is Regulated by Interactions Between Components of a Tuberigen Complex. *Plant Cell Physiol*. 2017. V.1;58(2):365-374.
10. Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, Wang XC, Chen QJ. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol*. 2014. V. 29;14:327.