

## ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ СОРТООБРАЗЦОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ ПО SSR-МАРКЕРАМ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ГИБРИДОВ

А.А. Налбандян, А.С. Хуссейн, кандидаты биологических наук,  
Т.П. Федулова, доктор биологических наук, И.В. Черепухина, кандидат биологических наук,  
Т.И. Крюкова, кандидат сельскохозяйственных наук,  
Т.С. Руденко, Н.Р. Михеева, А.В. Моисеенко

Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова,  
396030, Воронежская область, Рамонский район, п. ВНИСС, 86  
E-mail: arpnal@rambler.ru

*Целью исследований было проведение молекулярно-генетической паспортизации исходного материала сахарной свеклы: на стерильной основе, сростноцветковых опылителей и их гибридного потомства. Использованы праймеры к микросателлитным локусам генома: Unigene 24552, Unigene 2305, Unigene 17623, Unigene 14805, Unigene 62524. Установлено, что диапазон длин полученных ДНК-фрагментов составляет от 100 до 3000 пар нуклеотидов. Наибольший уровень полиморфного обеспечения (PIC) выявлен для локусов Unigene 17623 (PIC = 0,88), Unigene 2305 (PIC = 0,84), Unigene 14805 (PIC = 0,85), что дало возможность дифференцировать селекционный материал сахарной свеклы. Данные праймеры позволили амплифицировать до 11 полиморфных полос на генотип. Проведена молекулярно-генетическая паспортизация 26 генотипов селекционно-ценных образцов этой культуры по 5-ти SSR-маркерам для дальнейшего использования в маркер-ориентированной селекции. Рассчитаны генетические расстояния между MC-формами и сростноплодными опылителями, которые варьировали от 2,236 до 4,796. Родительские образцы, находящиеся на значительном генетическом удалении друг от друга, предложены для использования при создании гетерозисных гибридов.*

## DIFFERENTIATION OF SUGAR BEET CULTIVARS BY SSR MARKERS TO CREATE PROMISING HYBRIDS

Nalbandyan A.A., Hussein A.S., Fedulova T.P., Cherepukhina I.V.,  
Kryukova T.I., Rudenko T.S., Mikheeva N.R., Moiseenko A.V.

A. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar,  
396030, Voronezhskaya oblast, Ramonskiy rayon, p. VNISS, 86  
E-mail: arpnal@rambler.ru

*The goal of this work was to conduct the molecular genetic fingerprinting of sugar beet initial breeding materials (male sterile lines, fertile pollinators and there Hybrids). Primers for microsatellite loci of the unique genes 24552, 2305, 17623, 14805, 62524 were used. Length ranges of the obtained fragments were determined from 100 to 3000bp and up to 11 polymorphic bands per genotype were amplified. Polymorphic Information Content Value (PIC) was found for the loci of Unigene 17623 (PIC = 0.88), Unigene 2305 (PIC = 0.84), Unigene 14805 (PIC = 0.85), which made it possible to differentiate the breeding material of sugar beets. A molecular genetic assessment of 26 genotypes of breeding-valuable sugar beet cultivars was carried out using five SSR markers, which allowed their identification and certification for further use in marker-oriented breeding selection. The genetic distances between male sterile forms and fertile pollinators were calculated and it was varied from 2, 236 to 4,796. Parent samples located at a considerable genetic distance from each other, are recommended for use in creating Heterosis Hybrids.*

**Ключевые слова:** сахарная свекла, ПЦР-анализ, ДНК-ампликон, SSR-маркеры, генетические расстояния

**Key words:** sugar beet, PCR analysis, SS-markers, genetic distance, breeding

Одним из методических подходов для оптимизации селекции служит применение молекулярных маркеров. В последнее время их используют для оценки генетического разнообразия, так как они потенциально не ограничены во времени и не подвержены воздействию окружающей среды. Наиболее широкое применение в селекции сельскохозяйственных культур нашло молекулярное маркирование. Это позволило сократить время создания новых гибридов, более эффективно вести отбор и изучать изменчивость исходных материалов, определять отдаленность скрещиваемых компонентов [1-3]. Сахарная свекла – генетически «бедная» культура, поэтому необходимо создать отечественную базу данных перспективных генотипов свеклы корнеплодной, используемых в селекции. Их идентификация в значительной степени экономит человеческие и временные ресурсы, а молекулярная паспортизация позволит защитить авторские права селекционеров, контролировать однородность посевного материала.

Молекулярные маркеры широко используют в селекционных программах во многих странах мира [4, 5]. Так, О.М. Щербиной с группой авторов [6] оценено аллельное многообразие в микросателлитных локусах у ДН линий сахарной свеклы, что позволило вследствие установленной изменчивости микросателлитных локусов дифференцировать все изученные линии. Эффективность использования 12 RAPD и 12 ISSR локусов выявлена при оценке генетического разнообразия 42 образцов свеклы [7]. Высокие значения индекса генетического разнообразия для обоих типов маркеров показали, что эти методы одинаково эффективны при определении генетической изменчивости образцов сахарной свеклы. Сербские ученые использовали 26 полиморфных SSR-праймеров для изучения генетического разнообразия 140 образцов сахарной свеклы происхождения из США [8]. Профилирование генотипов этой культуры по агрономическим, технологическим качествам, кормовым признакам и анализ их генетического разнообра-

зия осуществлены с использованием 14 полиморфных SSR-маркеров [9]. С. Broccanello [10] с коллегами проведено сравнение точности, чувствительности и стоимости методов генотипирования (TagMan, rhAmp SNP, KASP). Правильное понимание компромисса между различными подходами к генотипированию важно, чтобы селекционеры принимали оптимальные решения для эффективного улучшения продуктивности культуры. I. Simko et al. [11] исследовали DArT, SNP и SSR-маркерные системы для оценки генотипического разнообразия и кластеризации разновидностей сахарной свеклы в популяции и обнаружили эффективность SSRs в разных типах анализов. Генетическое разнообразие 13 генотипов сахарной свеклы изучено индийскими учеными с использованием 14 микросателлитных праймеров [12]. Праймеры SB-11, SB-09, SB-GCC1, SB-CAA1 и SB-04 были наиболее информативными и генерировали индекс полиморфизма на уровне 0,833-0,851.

В связи с этим выявление специфических ДНК-маркеров для генотипирования, установления генетического полиморфизма генотипов сахарной свеклы, подбора родительских пар для скрещивания – актуальное направление исследований. Целью настоящей работы было проведение молекулярно-генетического маркирования исходного родительского материала сахарной свеклы и отбор перспективных форм для гибридизации.

**Методика.** Материалом для молекулярно-генетических исследований служили проростки мужско-стерильных (МС) линий сахарной свеклы, сростноцветковые опылители и гибриды, предоставленные селекционерами Всероссийского НИИ сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова В.П. Ошевневым и Н.П. Грибановой.

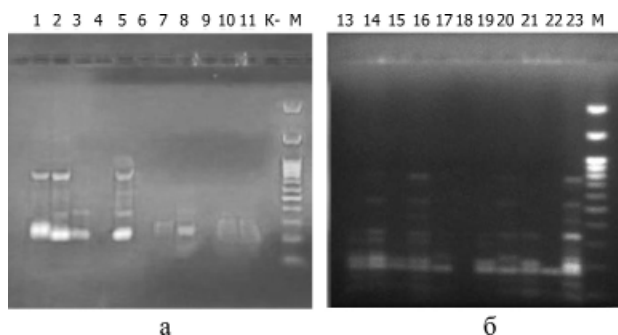
Экстракцию тотальной ДНК из растительного материала проводили ацетатным методом [13, 14], полимеразно-цепную реакцию – на амплификаторе «Genius» (Великобритания). Для изучения генетической изменчивости селекционного материала использовали олигонуклеотидные последовательности к микросателлитным локусам генома Unigene 24552, Unigene 2305, Unigene 17623, Unigene 14805, Unigene 62524 с соответствующими названиями [15] (табл. 1).

На основе полученных молекулярных данных был рассчитан индекс информационного полиморфизма (*polymorphism information content* — PIC) [16, 17]. Расчет генетических расстояний между генотипами сахарной свеклы и проведение кластерного анализа осуществляли в программе *SPSS Statistics*.

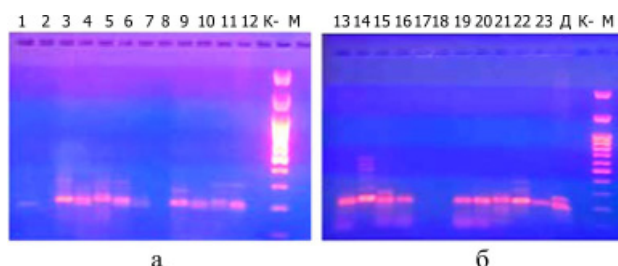
**Результаты и обсуждение.** На основе транскриптома сахарной свеклы, полученного от экспрессии генов листовой и корневой ткани, американские ученые создали 43 пары SSR-маркеров для Unigene, которые выявляли полиморфизм и эффективно различали генетическое разнообразие среди генотипов культуры [10]. Данные локусы охарактеризованы как связанные с различными метаболическими процессами и вносящие потенциальный вклад в защитные механизмы растений. С учетом этих данных мы использовали 5 полиморфных Unigene-маркеров для тестирования 26 перспективных генотипов лаборатории селекции сахарной свеклы на стерильной основе. В результате ПЦР-анализа исходных родительских линий сахарной свеклы (МС-форм, сростноплодных опылителей) и их гибридов выявлены генетическое разнообразие и высокий полиморфизм. Диапазон длин полученных ДНК-фрагментов составляет от 100 до 3000 пар нуклеотидов (п. н.) Каждый праймер обеспечил стабильную амплификацию полиморфных фрагментов ДНК. Наибольший уровень полиморфного

**Табл. 1. Нуклеотидная последовательность праймеров для SSR-локусов**

SSR-локус	Сиквенс	T° отжига, °C
Unigene 26753	F: GAGATACAAATTCACCCATC R: GTAGAGGAAGTAAAAGCACCA	56-56,5
Unigene 24552	F: AACAACTCACTCATCCTTCTTC R: ATGAAAGCAAACGACTAGCAG	56-56,5
Unigene 2305	F: TACTTAAACCCTACGAACTCCA R: TACAGCTGTGATTGTCAGAAGA	56-56,5
Unigene 17623	F: ATTACACCTCAATCTTCCAGC R: AATATTGGCAATCTACCAGC	56-56,5
Unigene 14805	F: ACATGTCAACTCTCAACAATCC R: TCACTAGGAGAAACCTTC	56-56,5
Unigene 62524	F: GAGAATCATTCACCTTGCAC R: GGGACATGCTTAGTTTTGTTAG	56-56,5



**Рис. 1. ДНК-ампликоны, полученные с праймерами к SSR-локусу Unigene 24552; а: 1 – 18084 F, 2 – On 18085, 3 – MC-17070, 4 – 18082 F, 5 – On 18094, 6 – 18093 F, 7 – MC 16058, 8 – 18103 F, 9 – On 18105, 10 – 18104 F, 11 – MC-18002, К-(ПЦР-смесь без ДНК), М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™ (ThermoScientific, США); б: 12 – F, 18106, 13 – On 18108, 14 – MC 18039, 15 – F, 18107, 16 – MC 18017, 17 – F, 18073, 18 – On 18111, 19 – MC 18007, 20 – F, 18074, 21 – MC 18053, 22 – F, 18109, 23 – F, 18110, М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™ (ThermoScientific, США).**



**Рис. 2. Результаты ДНК-амплификации, полученные с праймерами к SSR-локусу Unigene 2305; а: 1 – 18084 F, 2 – On 18085, 3 – MC-17070, 4 – 18082 F, 5 – On 18094, 6 – 18093 F, 7 – MC 16058, 8 – 18103 F, 9 – On 18105, 10 – 18104 F, 11 – MC-18002, 12 – F, 18106, К-(ПЦР-смесь без ДНК), М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™ (ThermoScientific, США); б: 13 – On 18108, 14 – MC 18039, 15 – F, 18107, 16 – MC 18017, 17 – F, 18073, 18 – On 18111, 19 – MC 18007, 20 – F, 18074, 21 – MC 18053, 22 – F, 18109, 23 – F, 18110, Д – дикая свекла Beta corolliflora L., К-(ПЦР-смесь без ДНК), М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™ (ThermoScientific, США).**

обеспечения (PIC) установлен для локусов, определенных с использованием праймеров: Unigene 17623 (PIC =0,88), Unigene 2305 (PIC =0,84), Unigene 14805 (PIC =0,85), что дало возможность дифференцировать селекционный материал культуры. Эти праймеры позволили амплифицировать до 11 полиморфных полос на генотип. По SSR-локусу Unigene 17623 выявлено от 2 до 11 ПЦР-продуктов длиной 150-3000 п. н. и всего – 94 ДНК-ампликона. Величина информационного полиморфизма (PIC) составила 0,88.

С использованием SSR-маркера Unigene 24552 в изученных образцах выявлено от 1 до 5 ДНК-ампликонов размером 200-600 п. н. Полиморфизм по данному SSR локусу составил 0,62 (рис. 1).

При использовании праймеров для SSR-маркера Unigene 2305 отмечено формирование от 2 до 8 ДНК-фрагментов длиной 100-750 п. н. (рис. 2). Полиморфизм составил 0,84.

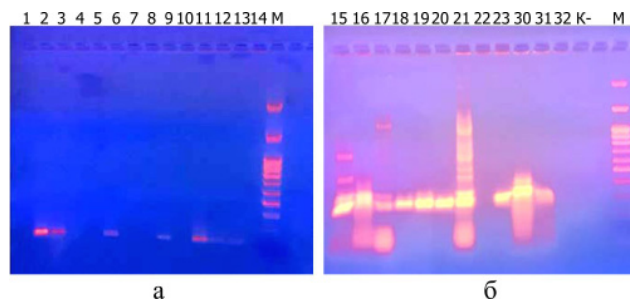
По праймерам для SSR-маркера Unigene 62524 в изученных селекционных образцах выявлено от 1 до 7 ПЦР-продуктов длиной 250-1000 п. н. (рис. 3). Полиморфизм составил 0,78.

При использовании праймеров для SSR-локуса Unigene 14805 обнаружено от 1 до 9 ампликонов длиной 200-1300 п. н. Уровень полиморфизма составил 0,85.

На основе выявленных аллелей изученных микросателлитных локусов рассчитана матрица генетической близости образцов сахарной свеклы 5-ти сростноплодных опылителей и 9-ти МС-форм. Наибольшее генетическое расстояние отмечено для генотипов 1 – ОП 18085 и 12 – МС 18053 ( $D_N=4,796$ ). На основе рассчитанных генетических расстояний Минковского осуществлена дифференциация исходных родительских линий сахарной свеклы методом кластерного анализа (рис. 4).

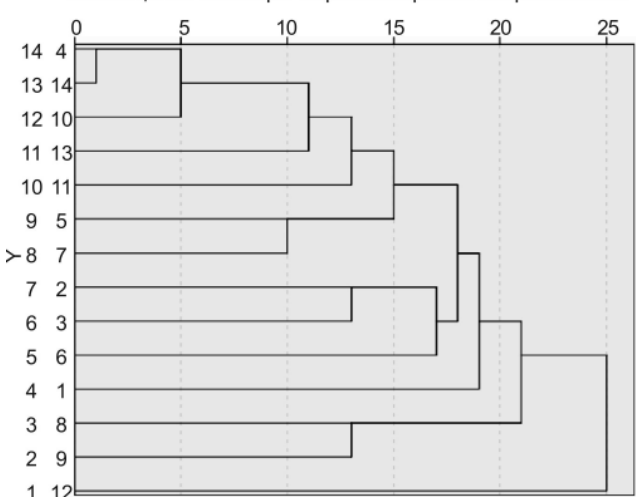
Результаты молекулярного анализа с данными праймерами к микросателлитным локусам генома позволили разграничить изученные генотипы на кластеры в соответствии с алгоритмом *SPSS Statistics*. Образцы, имеющие сходную генетическую структуру по изученным микросателлитным локусам ядерной ДНК, находятся в непосредственной близости друг от друга.

Селекционные образцы, находящиеся на значительном генетическом удалении друг от друга, такие как 1 –



**Рис. 3. Паттерны, полученные с праймерами к SSR-локусу Unigene 62524; а: 1 – 18084 F<sub>p</sub>, 2 – On 18085, 3 – МС-17070, 4 – 18082 F<sub>p</sub>, 5 – On 18094, 6 – 18093 F<sub>p</sub>, 7 – МС 16058, 8 – 18103 F<sub>p</sub>, 9 – On 18105, 10 – 18104 F<sub>p</sub>, 11 – МС-18002, 12 – F<sub>1</sub> 18106, 13 – On 18108, 14 – МС 18039, М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™ (ThermoScientific, США); б: 15 – F<sub>1</sub> 18107, 16 – МС 18017, 17 – F<sub>1</sub> 18073, 18 – On 18111, 19 – МС 18007, 20 – F<sub>1</sub> 18074, 21 – МС 18053, 22 – F<sub>1</sub> 18109, 23 – F<sub>1</sub> 18110, 30 – МС 1(ВИР), 31 – МС 2(ВИР), 32 – П (пустиллодий), К – (ПЦР-смесь без ДНК), М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™ (ThermoScientific, США).**

**Дендрограмма с использованием метода межгрупповых связей Совмещение кластера перешкалированных расстояний**



**Рис. 4. Генетические дистанции исходных генотипов на основе межгрупповых связей; 1 – ОП 18085, 2 – МС 17070, 3 – ОП 18094, 4 – МС 16058, 5 – ОП 18105, 6 – МС 18002, 7 – ОП 18108, 8 – МС 18039, 9 – МС 18017, 10 – ОП 18111, 11 – МС 18007, 12 – МС 18053, 13 – МС 2 (ВИР), 14 – МС 1 (ВИР).**

ОП 18085 и 12 – МС 18053 ( $D_N=4,796$ ); 8 – МС 18039 и 1 – ОП 18085 ( $D_N=4,243$ ); 9 – МС 18017 и 1 – ОП 18085 ( $D_N=4,000$ ); 8 – МС 18039 и 3 – ОП 18094 ( $D_N=4,000$ ); 12 – МС 18053 и 3 – ОП 18094 ( $D_N=4,359$ ); 12 – МС 18053 и 5 – ОП 18105 ( $D_N=4,123$ ); 11 – МС 18007 и 5 – ОП 18105 ( $D_N=4,000$ ), рекомендуется использовать при проведении скрещиваний для создания гетерозисных гибридов. Образцы, объединенные в отдельные кластеры, характеризуются наибольшим родством и не рекомендуются для скрещиваний. Данные о генетической удаленности селекционных образцов могут быть применены для более обоснованного подбора родительских пар при гибридизации. Изученные микросателлитные маркеры рекомендованы для использования при генотипировании селекционного материала. По результатам молекулярного анализа составлены генетические паспорта и своеобразные штрих-коды исследованных родительских форм и гибридов, что позволило идентифицировать их для использования в селекционном процессе (табл. 2).

**Табл. 2. Штрих-код генотипов сахарной свеклы на основе SSR-анализа**

Образец	Unigene 24552	Unigene 2305	Unigene 17623	Unigene 14805	Unigene 62524
F <sub>1</sub> (23)					
On (2)					
MC (3)					
On (5)					
F <sub>2</sub> (6)					
MC (14)					
F <sub>2</sub> (17)					
On (18)					
MC (19)					
F <sub>2</sub> (23)					
On (13)					
F <sub>1</sub> (15)					

Таким образом, установлена молекулярно-генетическая структура 26 генотипов селекционно-ценных номеров сахарной свеклы по 5-ти SSR-маркерам, позволяющая провести их идентификацию и паспортизацию для дальнейшего использования в маркер-ориентированной селекции. Наибольшим уровнем полиморфизма характеризуются праймеры к микросателлитным локусам Unigene 17623 (PIC=0,88), Unigene 14805 (PIC=0,85), Unigene 2305 (PIC=0,84), Unigene 62524 (PIC=0,78), Unigene 24552 (PIC=0,62), которые рекомендуются для использования при генотипировании селекционно-ценных образцов.

Расчитаны генетические расстояния между MS-формами и сростноплодными опылителями, которые варьировали от 2,236 до 4,796. Родительские образцы (рис. 4), находящиеся на значительном генетическом удалении друг от друга, такие как 1 и 12 ( $D_N=4,796$ ); 8 и 1 ( $D_N=4,243$ ); 9 и 1 ( $D_N=4,000$ ); 8 и 3 ( $D_N=4,000$ ); 12 и 3 ( $D_N=4,359$ ); 12 и 5 ( $D_N=4,123$ ); 11 и 5 ( $D_N=4,000$ ) рекомендуются для использования при создании гетерозисных гибридов.

Проведенные молекулярно-генетические исследования имеют большое значение в практической селекции сахарной свеклы, так как позволяют осуществлять генотипирование и дифференциацию исходного материала и целенаправленно подбирать компоненты скрещиваний.

#### Литература

1. Taški-Ajduković K., Nagl N., Ćurčić Ž., Zorić M. Estimation of genetic diversity and relationship in sugar beet pollinators based on SSR markers // *Electronic Journal of Biotechnology*. – 2017. – 27. – P. 1-7.
2. Abbasil Z., Arzani A., Majidi M. Evaluation of Genetic Diversity of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Crossing Parents Using Agro-morphological Traits and Molecular Markers // *J. Agr. Sci. Tech.* – 2014. – V. 16. – P. 1397-1411.
3. He J., Zhao X., Laroche A., Lu Z.-X., Liu H., Li Z. Genotyping-by-sequencing (GBS), a ultimate marker assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding // *Plant Genetics and Genomics*. – 2014. – V. 5. – P. 1-7.
4. Holtgrawe D., Rosleff Th., Vieho P., Schneider J., Schulz B., Borhardt D., Kraft Th., Himmelbauer H., Weisshaar B. Polymorphisms and Their Application for Extending the Genetic Map of Sugar Beet (*Beta vulgaris*) // *PLOS ONE*. – 2014. – V. 9. – P. 1-10.
5. Dohm J.C., Minoche A.E., Holtgrawe D., Capella-Gutierrez S., Zakrzewski F. The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet (*Beta vulgaris*) // *Nature*. – 2014. – 505. – P. 546-549.
6. Щербина О.М., Свирицевская А.М., Кильчевский А.В. Аллельное разнообразие в микросателлитных локусах диплоидных линий материала сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // *V съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров: тезисы докладов*. – М., 21-28 июня 2009, Ч.1. – С. 370.
7. Izzatullayeva V., Akparov Z., Babayeva S., Ojaghi J., Abbasov M. Efficiency of using RAPD and ISSR markers in evaluation of genetic diversity in sugar beet // *Turkish Journal of Biologiy*. – 2014. – V. 38. – P. 429-438
8. Curcic Z., Taski-Ajdukovic K., Nagl N. Relationship between hybrid performance and genetic variation in self-fertile and self-sterile sugar beet pollinators as estimated by SSR markers // *Euphytica*. – 2017. – V. 213(5). – P. 100-108.
9. Sandhu Surinder K., Sarao Navraj K., Meenakshi G., Uppal S., Pritpal S., Satveer K., Jaspreet K. Profiling of sugar beet genotypes for agronomical, sugar quality and forage traits and their genetic diversity analysis using SSR markers // *Electronic Journal of Plant Breeding*. – 2016. – V. 7. – P. 253-266.
10. Broccanello Ch., Chiodi C., Funk A., Mitchell McGrath J., Panella Lee, Stevanato P. Comparison of three PCR-based assays for SNP genotyping in plants // *Plant Methods*. – 2018. – V. 14. – P. 28.
11. Simko I., Eujayl I., van Hintum T.J. Empirical evaluation of DArT, SNP, and SSR marker-systems for genotyping, clustering, and assigning sugar beet hybrid varieties into populations // *Plant Sci.* – 2012. – V. 184. – P. 54-62.
12. Srivastava S., Pathak A.D., Kumar R., Joshi B.B. Genetic diversity of sugar beet genotypes evaluated by microsatellite DNA markers // *Journal of Environmental Biology*. – 2017. – V. 38. – P. 777-783.
13. Mahuku G.S. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 2004. – V. 22. – P. 71-81.
14. Hussein A.S., Nalbandyan A.A., Fedulova T.P., Bogacheva N.N. Efficient and nontoxic DNA isolation method for PCR analysis // *Russian Agricultural Sciences*. – 2014. – V. 40. – P. 177-178.
15. Fugate K., Fajardo D., Schlautman B., Ferrareze J.P., Bolton M.D., Campbell L.G., Wiesman E., Zalapa J. Generation and Characterization of a Sugarbeet Transcriptome and Transcript-Based SSR Markers // *The Plant Genome*. – 2014. – V.7. – № 2. – P. 1-13.
16. Nei M., Roychoudhury A.K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance // *Genetics*. – 1974. – V. 76. – P. 379-390.
17. Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // *PNAS USA*. – 1979. – V. 76. – P. 5269-5273.

Поступила в редакцию 17.02.20  
После доработки 28.02.20  
Принята к публикации 03.03.20