

# Микросателлитные маркеры в селекции сахарной свёклы

**А.А. НАЛБАНДЯН**, канд. биол. наук (e-mail: arpnal@rambler.ru)

**Т.П. ФЕДУЛОВА**, д-р биол. наук

**Н.Р. МИХЕЕВА**, мл. научн. сотрудник

**А.В. КОРНИЕНКО**, д-р с/х. наук

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова»

## Введение

В настоящее время ДНК-технологии становятся важным инструментом селекции растений и находят всё более широкое применение в мире для изучения генетического разнообразия популяций, подвидов, видов. Эти же методы могут стать основой генетической паспортизации сортов, линий и гибридов различных культурных растений [1]. Сейчас в целях ускорения селекционного процесса растений в качестве наиболее значимых направлений рассматриваются так называемые маркер-опосредованная селекция (Marker-Assisted Selection, MAS) и геномная селекция GS (Genomic Selection) [2], в основе которых также лежит исследование ДНК-маркеров. Одной из важнейших задач селекции сахарной свёклы является оценка генетического разнообразия, благодаря которой снижаются трудоёмкость и затраты на определение родительских линий для гибридизации. Чтобы повысить эффективность создания линий и гибридов, необходима разработка технологии генетического анализа на основе молекулярных маркеров, позволяющей проводить достоверную оценку их подлинности и однородности на всех этапах селекционного процесса [3]. Эффективным методом изучения генетического разнообразия является использование микросателлитных маркеров, так как они равномерно распределены в геноме растений, характеризуются специфичным

расположением на хромосоме, высокой вариабельностью, точностью воспроизведения результатов и кодоминантным типом наследования, что позволяет выявлять гомозиготное или гетерозиготное состояние локусов. Выявлением полиморфизма длин SSR-локусов устанавливается индивидуальная характеристика каждого отдельного генотипа – ДНК-профиль [4].

Исследования генетического разнообразия важны для выбора родителей с высокой комбинационной способностью, которые при скрещивании увеличивают шансы получения превосходящих генотипов. Так, голландскими учёными было использовано более 20 полиморфных SSR-праймеров при изучении генетического разнообразия более 100 образцов сахарной свёклы [5].

Целью данного исследования является проведение идентификации селекционного материала *Beta vulgaris* L. с помощью анализа полиморфизма длин микросателлитных фрагментов и отбор перспективных линий в целях создания высокопродуктивных гибридов.

## Материалы и методы

Исследование проводили на 10 селекционных линиях сахарной свёклы (*Beta vulgaris* L.), в состав которых входили МС-линии и линии О-типа. Для эксперимента использовали листовую аппарат сахарной свёклы, выращенный в течение двух недель. ДНК выделяли с применением стандартного протокола экстракции 7,5 М аце-

татом аммония [6]. Качество образца оценивали электрофорезом в 1%-ном агарозном геле в ТВЕ-буфере (0,1 М трис; 0,1 М борная кислота; 0,05 М ЭДТА; pH 8,0–8,2) и определяли концентрацию ДНК с использованием набора HS QubitR (Thermo Fisher Scientific, США). Классическая полимеразно-цепная реакция была проведена на амплификаторе Genius (Великобритания). В работе были использованы следующие 9 локус-специфичных праймеров: Unigene 27833, Unigene 24552, Unigene 2305, Unigene 17623, Unigene 14805, Unigene 22373, Unigene 7492, Unigene 16898, Unigene 18963 [7].

## Результаты исследований и их обсуждение

В результате молекулярно-генетических исследований нами было проведено генотипирование 10 селекционно-ценных образцов лаборатории исходного материала по SSR-маркерам. Всего в изученных генотипах выявлено 107 ДНК-ампликонов. На основе полученных данных рассчитан PIC (показатель информационного полиморфизма) каждого маркера. Чем выше PIC, тем «ценнее» маркер, так как он отражает способность маркера устанавливать полиморфизм в популяции в зависимости от числа обнаруживаемых аллелей и распределения их частот. Величина PIC была рассчитана по следующей формуле:

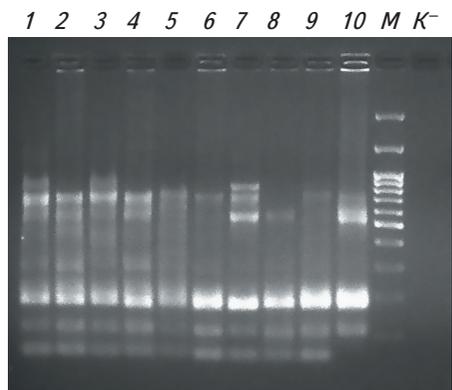
$$PIC_j = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2,$$

где  $i$  –  $i$ -й аллель  $j$ -го маркера,  $n$  – число аллелей  $j$ -го маркера,  $P$  – частота аллелей [8].

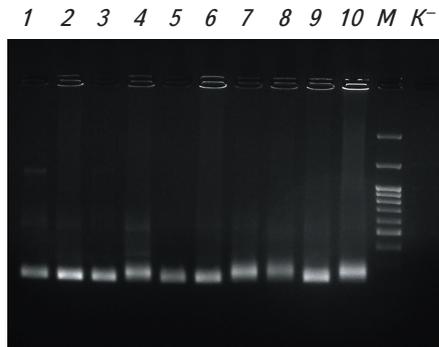
Так, по локусу Unigene 22373 обнаружено от 1 до 7 ПЦР-продуктов длиной от 100 до 800 п. н. (рис. 1). По данному SSR-локусу установлено всего 30 ампликонов. Этот микросателлитный локус оказался высокополиморфным, PIC 0,76.

По праймерам для SSR-маркера Unigene 7492 в изученных селекционных образцах выявлено от 1 до 3 ПЦР-продуктов длиной 250–1300 п. н. (рис. 2). Полиморфизм составляет 0,44.

По праймерам для SSR-маркера Unigene 16898 в изученных селекционных образцах выявлено от 1 до 6 ПЦР-продуктов длиной 200–800 п. н. (рис. 3). Общее количество идентифицированных ПЦР-фрагментов составило 16. Полиморфизм составляет 0,73, что свидетельствует о возможности использования данного маркера в целях генотипирования.



*Рис. 1. Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов, полученных с праймерами к SSR-локусу Unigene 22373*  
 Обозначения: 1 – РФ О-тип 09001 2Б; 2 – РФ О-тип 017009; 3 – РФ О-тип 09001; 4 – МС 09001 2Б (раст. 2); 5 – МС017010 (раст. 2); 6 – МС709 017004 (раст. 1); 7 – МС 09001 2Б (раст. 1); 8 – МС 09001 2Б (раст. 3); 9 – МС017010 (раст. 1); 10 – МС709 017004 (раст. 2).  
 М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™ (ThermoScientific, США), К – контроль, без ДНК



*Рис. 2. Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов, полученных с праймерами к SSR-локусу Unigene 7492*  
 Обозначения: 1 – РФ О-тип 09001 2Б; 2 – РФ О-тип 017009; 3 – РФ О-тип 09001; 4 – МС 09001 2Б (раст. 2); 5 – МС017010 (раст. 2); 6 – МС709 017004 (раст. 1); 7 – МС 09001 2Б (раст. 1); 8 – МС 09001 2Б (раст. 3); 9 – МС017010 (раст. 1); 10 – МС709 017004 (раст. 2).  
 М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™ (ThermoScientific, США), К – контроль, без ДНК

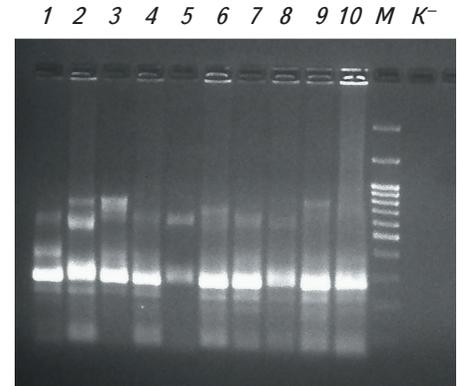
Так, ампликоны длиной 200 п. н. выявлены у № 6, 7; фрагмент 250 п. н. отмечен у № 1, 2, 4, 6, 7, 9. ПЦР-продукт длиной 300 п. н. установлен у всех образцов. У № 1 обнаружен дополнительный ампликон 400 п. н. ДНК-фрагмент длиной 600 п. н. выявлен у № 2 и 5, а 800 п. н. – у № 2, 3, и 9.

Амплификация с Unigene 24552 в изученных селекционных образцах выявила от 1 до 3 ПЦР-продуктов длиной 150–600 п. н. (рис. 4). Общее количество идентифицированных ПЦР-фрагментов составило 20. Полиморфизм составляет 0,62, что свидетельствует о возможности использования и данного маркера при паспортизации.

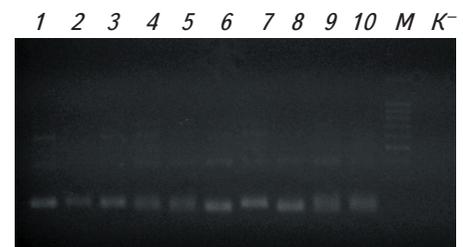
По результатам молекулярного анализа составлены мультилокусные генетические паспорта и штрих-коды исследованных материалов, что позволило идентифицировать их для применения в селекционном процессе (табл. 1, 2) [9].

**Заключение**

Итак, на основе проведенных ПЦР-анализов возможно создание электронных генетических паспортов и штрих-кодов изучаемых селекционных материалов сахар-



*Рис. 3. Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов, полученных с праймерами к SSR-локусу Unigene 16898*  
 Обозначения: 1 – РФ О-тип 09001 2Б; 2 – РФ О-тип 017009; 3 – РФ О-тип 09001; 4 – МС 09001 2Б (раст. 2); 5 – МС017010 (раст. 2); 6 – МС709 017004 (раст. 1); 7 – МС 09001 2Б (раст. 1); 8 – МС 09001 2Б (раст. 3); 9 – МС017010 (раст. 1); 10 – МС709 017004 (раст. 2).  
 М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™ (ThermoScientific, США), К – (контроль, без ДНК)



*Рис. 4. Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов, полученных с праймерами к SSR-локусу Unigene 24552*  
 Обозначения: 1 – РФ О-тип 09001 2Б; 2 – РФ О-тип 017009; 3 – РФ О-тип 09001; 4 – МС 09001 2Б (раст. 2); 5 – МС017010 (раст. 2); 6 – МС709 017004 (раст. 1); 7 – МС 09001 2Б (раст. 1); 8 – МС 09001 2Б (раст. 3); 9 – МС017010 (раст. 1); 10 – МС709 017004 (раст. 2).  
 М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™ (ThermoScientific, США), К – контроль, без ДНК

ной свёклы по микросателлитным маркерам.

Таким образом, применение технологии генотипирования ДНК на основе SSR-анализа позволяет отбирать для гибридизации генетически однородный материал и контролировать селекционную работу, что имеет большое значение в практической селекции сахарной свёклы.

Список литературы

1. Сухарева, А.С. ДНК-маркеры для генетического анализа сортов культурных растений / А.С. Сухарева, Б.Р. Кулуев // Биомика. – 2018. – Т. 10. – № 1. – С. 69–84.

2. Kordrostami M. Molecular Markers in Plants: Concepts and Applications / M. Kordrostami, M. Rahimi. – ResearchGate: Review Article. – Published On-line. – 2015.

3. Шилов, И.А. Создание современных гибридов сахарной свёклы с применением микросателлитного анализа / И.А. Шилов [и др.] // Сахар. – № 8. – 2020. – С. 32–36.

4. Smulders, M. Characterisation of sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) varieties using microsatellite markers / M. Smulders [et al.] // BMC Genetics. – 2010. – V. 11:41.

5. Spadoni, A. A Simple and Rapid Method for Genomic DNA Extraction and Microsatellite Analysis in Tree Plants / A. Spadoni [et al.] // J. Agr. Sci.

Tech. – 2019. – V. 21(5). – P. 1215–1226.

6. Hussein, A.S. Efficient and nontoxic DNA isolation method for PCR analysis / A.S. Hussein, A.A. Nalbandyan, T.P. Fedulova, N.N. Bogacheva // Russian Agricultural Sciences. – 2014. – V. 40. – Is. 3. – P. 177–178.

7. Fugate, K. Generation and Characterization of a Sugarbeet Transcriptome and Transcript-Based SSR Markers / K. Fugate [et al.] // The Plant Genome. – 2014. – V. 7. – № 2. – P. 1–13.

8. Nei, M. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance / M. Nei, A.K. Roychoudhury // Genetics. – 1974. – V. 76. – P. 379–390.

9. Анискина, Ю.В. Исследование генетического разнообразия сорго с использованием технологии мультиплексного микросателлитного анализа. Биотехнология и селекция растений / Ю.В. Анискина [и др.] – 2019. – Т. 2 (3). – С. 20–29.

Таблица 1. Молекулярно-генетические паспорта

	1.150	1.250	2.200	2.250	2.300	2.400	2.600	2.800	3.150	3.400	3.600	4.100	4.200	4.300	4.500	4.600	4.700	4.800	5.300	6.250	6.500	6.1300
1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
2	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0
3	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0
4	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0
5	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
6	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
7	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0
8	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
9	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
10	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0

Обозначения

По горизонтали – SSR-праймеры (Unigenes) с размерами идентифицированных ДНК-фрагментов: 1 – 14805; 2 – 16898; 3 – 24552; 4 – 22373; 5 – 18963; 6 – 7492. По вертикали – селекционные материалы: 1 – РФ О-тип 09001 2Б; 2 – РФ О-тип 017009; 3 – РФ О-тип 09001; 4 – MC 09001 2Б (раст. 2); 5 – MC017010 (раст. 2); 6 – MC709 017004 (раст. 1); 7 – MC 09001 2Б (раст. 1); 8 – MC 09001 2Б (раст. 3); 9 – MC017010 (раст. 1); 10 – MC709 017004

Таблица 2. Штрих-код 10 генотипов сахарной свёклы на основе SSR-анализа

	Unigene 14805	Unigene 16898	Unigene 24552	Unigene 22373	Unigene 18963	Unigene 7492
О-тип						
О-тип						
О-тип						
МС						
МС						
МС						
МС						
МС						
МС						
МС						

**Аннотация.** В статье рассматриваются вопросы проведения паспортизации селекционного материала сахарной свёклы с использованием SSR локус-специфичных праймеров. Молекулярный анализ 10 селекционных образцов, представленных мужскостерильными формами и опылителями – закрепителями стерильности О-типа, позволил выявить наиболее полиморфные праймеры. Данные праймеры рекомендованы для использования при генотипировании. На основе проведённых исследований составлены мультилокусные молекулярно-генетические паспорта и штрих-коды изученных генотипов. **Ключевые слова:** сахарная свёкла, ПЦР-анализ, микросателлитные локусы, полиморфизм, штрих-код, генотипирование.

**Summary.** In the article, questions of possibility to certificate sugar beet breeding material using SSR-loci-specific primers are considered. The conducted molecular analysis of 10 breeding-valuable samples presented as male-sterile forms and pollinators maintaining O-type sterility has allowed revealing the most polymorphic primers. These primers are recommended to use for genotyping. Based on the carried out investigations, multiloci molecular-genetic passports and bar-codes of the studied genotypes have been made.

**Keywords:** sugar beet, PCR, microsatellite loci, polymorphism, bar-coding, genotyping.