

УДК 631.523:635.116

ТЕХНОЛОГИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛИНИЙ И ГИБРИДОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ НА ОСНОВЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА

© 2024 г. Т. В. Шалаева^{1, *}, Ю. В. Анискина¹, О. С. Колобова¹, Н. С. Велишаева¹,
А. В. Логвинов², В. Н. Мищенко², П. Н. Харченко¹, И. А. Шилов¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, 127550 Россия

²Первомайская селекционно-опытная станция сахарной свеклы, Краснодарский край, п. Гулькевичи, 352193 Россия

*e-mail: shalaeva.tv@mail.ru

Поступила в редакцию 16.02.2024 г.

После доработки 10.04.2024 г.

Принята к публикации 17.04.2024 г.

Разработана технология генотипирования сахарной свеклы (*Beta vulgaris*) по 10 микросателлитным локусам: FDSB1001, FDSB1033, SB04, SB09, SB15, Unigene16898, Unigene17623B, Unigene17923, Unigene26753, Unigene27833. Технология может быть использована для эффективной, точной и быстрой идентификации линий и гибридов сахарной свеклы. Предлагаемый подход включает мультиплексную ПЦР по всем локусам в одной пробирке с последующим электрофоретическим анализом полученных фрагментов ДНК в одном капилляре генетического анализатора. Одним из ключевых элементов технологии, определяющим точность и воспроизводимость анализа, является применение на стадии электрофореза дополнительного стандарта длин – аллельной лестницы, состоящей из фрагментов ДНК анализируемых микросателлитных локусов. К преимуществам предлагаемой технологии следует отнести возможность стандартизации и автоматизации метода в формате 96-луночного планшета, что позволяет наладить процесс массового анализа. В результате исследования впервые получены ДНК-профили 6 современных гибридов сахарной свеклы (Азимут, Визит, Корвет, Рубин, Фрегат, Успех) и их линий-компонентов. Разработанная технология может быть эффективно использована для генетической идентификации линий сахарной свеклы, оценки однородности растительного материала, а также для контроля качества гибридизации на всех стадиях селекционного процесса и может стать надежным лабораторным инструментом для сопровождения промышленного семеноводства этой культуры.

Ключевые слова: *Beta vulgaris*, сахарная свекла, генотипирование, мультиплексный микросателлитный анализ, ДНК-профиль

DOI: 10.56304/S023427582403013X

Сахарная свекла – важная техническая культура, на долю которой приходится примерно 40% мирового производства сахара. В недалеком прошлом основными показателями результативности селекционного процесса были нецветушность и выход сахара с единицы сырья и площади посева. В настоящее время к числу важнейших хозяйственно ценных требований также относятся повышение технологической пригодности сырья, получение семян с высокими посевными и физическими свойствами, толерантность к гербицидам, устойчивость к болезням, вредителям, факторам внешней среды, а главное – рентабельность производства в области семеноводства и возделывания коммерческих посевов сахарной свеклы [1].

Современная селекция сахарной свеклы ведется на основе многокомпонентных гибридов.

Стоит отметить, что создание гибридов сахарной свеклы включает, как минимум, два этапа: получение промежуточного гибрида путем скрещивания линии с цитоплазматической мужской стерильностью (МС-линия) с линией О-типа и последующее скрещивание полученного гибрида с линией-опылителем. Применение молекулярно-генетического анализа в дополнение к оценке по фенотипическим признакам позволяет повысить достоверность идентификации растительных образцов на всех этапах селекционного процесса, что ускоряет отбор перспективных генотипов. При широкомасштабном промышленном семеноводстве также важно производить мониторинг выращивания как родительских линий, так и финального гибрида с помощью лабораторных методов анализа [2].

Эффективность использования генетической идентификации растений на основе микросателлитного анализа была показана в многочисленных работах отечественных и зарубежных авторов на разных культурах [3–7]. Микросателлитные локусы представляют собой короткие, tandemно повторяющиеся последовательности ДНК. Они равномерно распределены по геному, кодоминантно наследуются и подходят для детекции в автоматическом режиме. Использование микросателлитного анализа растительных образцов сельскохозяйственных культур позволяет получать уникальные характеристики каждого генотипа – ДНК-профиль.

Для создания удобной и рентабельной технологии микросателлитного анализа, позволяющей получать уникальные и стабильные ДНК-профили, помимо подробного изучения геномных микросателлитных профилей на большой выборке верифицированного материала сахарной свеклы также требуется разработка методики проведения массовых анализов. Несмотря на то, что опубликован целый ряд работ по анализу микросателлитов генома сахарной свеклы как за рубежом [8–12], так и в России [13, 14], предложенные ранее методики получения генетических профилей растений по каждому локусу отдельно являются трудоемкими и дорогостоящими для селекционной и хозяйственной практики. Они требуют большого числа постановок амплификации и электрофоретического анализа. При этом интерпретация результатов нередко затруднена из-за низкого разрешения электрофореза, что может приводить к неверному определению длин анализируемых фрагментов ДНК. Для рентабельной и надежной идентификации линий и гибридов необходимо создание мультиплексной системы, позволяющей получить генетический профиль сразу по нескольким локусам. Такая технология должна быть адаптированной для работы на автоматическом оборудовании и для капиллярного электрофореза высокого разрешения.

Целью нашего исследования была разработка технологии мультиплексного микросателлитного анализа с последующей детекцией на автоматическом генетическом анализаторе, позволяющей проводить анализ генома сахарной свеклы по нескольким микросателлитным локусам в одной пробирке, что открывает возможности для рентабельного массового скрининга. Технология предназначена для сопровождения селекции и промышленного семеноводства гибридов, где требуется отслеживать чистоту родительских линий и качество гибридизации на всех этапах процесса.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Материал исследования

Исследование проводили на 110 образцах сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.), включающих 6 МС-линий, 4 линии О-типа, 6 линий-опылителя и 6 гибридов отечественной селекции: Азимут, Визит, Корвет, Рубин, Фрегат, Успех (предоставлены ФГБНУ “Первомайская селекционно-опытная станция сахарной свеклы”, п. Гулькевичи, Краснодарский край). Для получения достоверных результатов использовали растительный материал пяти разных растений каждого образца, отобранных совместно с селекционерами по фенотипическим характеристикам.

Выделение геномной ДНК

Геномную ДНК выделяли из зеленых листьев растения методом экстракции с использованием буфера СТАВ (cetyl trimethylammonium bromid; NeoFroxx, Германия) с дополнительной очисткой хлороформом [15]. ДНК в полученных препаратах выявляли методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием. Определяли качество и измеряли количество выделенной ДНК на планшетном спектрофотометре SPECTROstar Nano (BMG LABTECH GmbH, Германия).

Амплификация фрагментов ДНК микросателлитных локусов

Амплификацию целевых фрагментов ДНК проводили с локуспецифичными праймерами: FDSB1001, FDSB1033 [10], SB04, SB09, SB15 [11], Unigene16898, Unigene17623B, Unigene17923, Unigene26753, Unigene27833 [9], – мечеными флуоресцентными красителями FAM, R6G, TAMRA и ROX. ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл следующего состава: 67 мМ трис-НCl, pH 8.8, 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄ (AppliChem, США), 2.5 мМ MgCl₂ (AppliChem), 5 U/мкл Taq-ДНК-полимеразы (ООО “ДНК-Технология”, Россия), 25 мМ dNTPs (ООО “Медиген”, Россия), 10 пмоль каждого праймера (ООО “Синтол”, Россия) и 100 пкмоль геномной ДНК. Амплификацию проводили в термоциклере T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США) по программе: 5 мин при 95°C; 30 циклов [30 с при 94°C, 30 с при 53°C, 30 с при 72°C] и 5 мин при 72°C.

Фрагментный анализ

Длины ПЦР-продуктов определяли методом высокоразрешающего капиллярного электрофореза в денатурирующих условиях на генетическом анализаторе ABI PRISM 3130XL (Applied Biosystems, США). Для анализа 1 мкл ПЦР-продукта

смешивали с 0.5 мкл маркера молекулярной массы GeneScan™ 600 LIZ (Applied Biosystems) или DSMO-100 Orange-500 DNA Size Standard (Nimagen, Нидерланды) и 9 мкл формамида Super DI (MCLab, США) и проводили денатурацию фрагментов в течение 5 мин при 95°C. Полученные данные по электрофоретической подвижности фрагментов ДНК обрабатывали с помощью программного обеспечения GeneMapper ID-X (Applied Biosystems), устанавливали их длины и получали генетические профили исследуемых образцов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение полиморфизма микросателлитных локусов генома сахарной свеклы проводили на растительном материале рабочей коллекции ФГБНУ “Первомайская селекционно-опытная станция сахарной свеклы”.

Для надежного различения и идентификации растений определяющее значение имеет подбор наиболее информативных микросателлитных локусов. С этой целью на основании анализа данных литературы первоначально выбрали 40 микросателлитных локусов. Отбор проводили по следующим критериям: число аллелей в локусе не менее трех; расположение локусов на разных хромосомах, что должно обеспечивать независимое наследование ДНК-маркеров; размер фрагмента ДНК от 100 до 400 п.н. для надежного определения длин ПЦР-фрагментов.

Полиморфизм отобранных локусов исследован нами ранее на выборке образцов сахарной свеклы [13]. Мономорфные, трудно амплифицируемые или дающие неоднозначные и нестабильные результаты локусы были исключены из исследования. В результате было выбрано 10 микросателлитных локусов: FDSB1001, FDSB1033, Unigene27833, Unigene26753, Unigene16898, Unigene17623B, Unigene17923, SB04, SB09, SB15, – которые характеризовались высоким уровнем полиморфизма (число выявляемых аллелей на каждый локус – от 3 до 11). С их использованием были получены уникальные ДНК-профили для каждого образца сахарной свеклы.

Для получения достоверных результатов генетического анализа необходимо, чтобы полиморфизм длин микросателлитных локусов был обусловлен только наличием микросателлитных повторов, а вне области повторов в амплифицируемом фрагменте отсутствовали дополнительные inserции или делеции. На следующем этапе работы было проведено изучение первичной структуры использующихся в анализе 10 микросателлитных локусов.

Аллельные варианты каждого из этих 10 локусов ранее были индивидуально амплифицированы и клонированы в плазмидный вектор pAL2-T

(ЗАО “Евроген”, Россия). Полученные трансформанты *Escherichia coli*, несущие вставки целевых фрагментов ДНК в векторе, отбирали и их плазмидную ДНК секвенировали, в результате чего были определены нуклеотидные последовательности каждого аллельного варианта соответствующего локуса [16]. Результаты секвенирования аллельных вариантов микросателлитных локусов: FDSB1001, FDSB1033, Unigene27833, Unigene26753, Unigene16898, Unigene17623B, Unigene17923, SB04, SB09, SB15, – подтвердили, что полиморфизм длин этих локусов обусловлен исключительно числом tandemных повторов в амплифицируемом фрагменте ДНК.

В представленной работе нами предложена методика мультиплексного микросателлитного анализа в формате 96-луночного планшета с последующей детекцией ПЦР-продуктов с использованием капиллярного электрофореза. Это позволяет исследовать образец ДНК одновременно по всем 10 микросателлитным локусам, что необходимо для проведения массовых анализов. Данный подход позволяет значительно сократить материальные и временные затраты на проведение генетического анализа линий и гибридов сахарной свеклы. В процессе разработки системы оптимизированы условия проведения одновременного ПЦР-анализа нескольких микросателлитных локусов: были оптимизированы праймеры, меченные флуоресцентными красителями FAM, R6G, TAMRA, ROX, и условия одновременной амплификации всех пар праймеров. Праймеры были мечены флуоресцентными красителями таким образом, чтобы диапазоны длин фрагментов микросателлитных локусов, детектируемых по одному каналу, не перекрывались. В табл. 1 приведены характеристики использованных праймеров и указано число аллелей в каждом локусе, выявленное нами ранее по результатам анализа расширенной коллекции образцов сахарной свеклы [13].

Ключевая проблема при создании технологии генетической идентификации линий и гибридов сахарной свеклы методом мультиплексного микросателлитного анализа заключается в получении стабильных и воспроизводимых ДНК-профилей для каждого образца.

В рамках лабораторного мониторинга процесса семеноводства родительских линий в период с 2018 г. по 2023 г. мы совместно с селекционерами ФГБНУ “Первомайская селекционно-опытная станция сахарной свеклы” ежегодно отбирали линии-компоненты гибридов: Азимут, Визит, Корвет, Рубин, Успех и Фрегат.

При исследовании ряда линий сахарной свеклы, выращенных в разные годы, было выявлено, что у одного и того же образца общая структура ДНК-профиля (число ПЦР-фрагментов в каждом локусе) воспроизводилась, но при этом наблюда-

Таблица 1. Характеристика микросателлитных локусов генома сахарной свеклы в составе мультиплекса
Table 1. Multiplex PCR system for analysis of sugar beet microsatellite loci

№	Микросателлитный локус		Аллель		Последовательность праймера (5' → 3')	Флуоресцентный краситель
	название	хромосомная локализация	длина, п.н.	число		
1	SB09	II	126–132	3	F: TGCATAAAACCCCAACAAT R: AGGGCAACTTTGTTTTGTGG	FAM
2	FDSB1033	IX	165–229	8	F: GCTGAGATGATGTTTGTAGGGC R: TTCAAATCGCCATCTCCAG	FAM
3	Unigene26753	I	283–304	7	F: GAGAAACAAATTCACCCATC R: GTAGTGGAAAGTAAAAGCACCA	FAM
4	SB15	V	145–175	7	F: CACCCAGCCTATCTCTCGAC R: GTGGTGGGCAGTTTTAGGAA	R6G
5	Unigene27833	I	190–217	7	F: GAGTCATCAACACCAAACCTACA R: ATTAGCCAAGAAAATCACCC	R6G
6	Unigene16898	VIII	273–291	4	F: AGAACTTAGATTGTGACCTGCT R: GATGGGAAGAGAGAGATTAGTG	R6G
7	FDSB1001	IX	310–348	6	F: ACTTCAACCACTATCACAAAGTGAG R: ATCTTATGCTGCCATGACCA	R6G
8	Uni-gene17623B	VII	147–179	11	F: ATTAGACCTCAATCTTCCAGC R: AATAATGGCAATCTACCAGC	TAMRA
9	Unigene17923	IV	190–226	11	F: AACCTTACTCCCTCTGATTTCT R: GGAGATACAACCTACAAGAGCC	TAMRA
10	SB04	V	181–203	7	F: ACCGATCACCAATTCACCAT R: GTTTTGTTTTGGGCGAAATG	ROX

лись различия цифровых характеристик аллелей по каждому локусу на несколько нуклеотидов. Поскольку программное обеспечение генетического анализатора определяет длины исследуемых фрагментов ДНК относительно стандарта длины (маркера молекулярной массы), такие различия в оцифровке генотипов могут возникать вследствие возможных изменений условий проведения капиллярного электрофореза (используемого полимера, спектральной калибровки прибора и др.), а также используемого размерного стандарта (маркера молекулярной массы).

Для иллюстрации вышесказанного в качестве примера приведены ДНК-профили линии OT4936 (рис. 1). Цифровые характеристики аллелей образцов этой линии, полученные с использованием разных стандартов длин, незначительно отличаются между собой. Например, определяемый размер аллеля локуса SB09 в случае использования стандарта длины LIZ-600 – 136 п.н. (рис. 1a), в случае использования DSMO-100 Orange-500 DNA Size Standard – 132 п.н. (рис. 1b), при этом реальная длина этого фрагмента ДНК, определенная методом прямого секвенирования, – 137 п.н. (рис. 1c). Подобные различия наблюдаются и по другим локусам (рис. 1).

Для воспроизводимого определения реальной длины получаемых ПЦР-фрагментов, независимо от условий электрофореза и используемых маркеров молекулярной массы, нами был создан дополнительный стандарт длин – аллельная лестница, состоящая из фрагментов ДНК всех используемых микросателлитных локусов того же размера и нуклеотидного состава, что и в анализируемых образцах. Все фрагменты этого стандарта длин были мечены теми же флуоресцентными красителями, что и анализируемые ПЦР-фрагменты каждого локуса. При каждом анализе образцов аллельную лестницу необходимо вносить в отдельную лунку 96-луночного планшета генетического анализатора с добавлением стандарта длины – маркера молекулярной массы. Аналогичное решение проблемы корректной оцифровки ДНК-профилей нами было предложено и реализовано при создании технологии генетической идентификации сортов винограда [17].

На рис. 2 в качестве примера анализа образцов сахарной свеклы с использованием созданной аллельной лестницы приведены уникальные ДНК-профили линий Op21695 и С/К МС (12173 × OT4936), различающиеся по 10 микросателлитным локусам генома сахарной свеклы:

(a)

Локус	SB09	FDSB1033	Unigene26753	SB15	Unigene27833	Unigene16898	FDSB1001	Unigenel7623B	Unigenel7923	SB04
Размер, п.н.	136	177	288	154	211	285	315	171	214	214

(b)

Локус	SB09	FDSB1033	Unigene26753	SB15	Unigene27833	Unigene 6898	FDSB1001	Unigenel7623B	Unigenel7923	SB04
Размер, п.н.	132	175	283	151	208	282	313	167	205	187

(c)

Локус	SB09	FDSB1033	Unigene26753	SB15	Unigene27833	Unigene 6898	FDSB1001	Unigenel7623B	Unigenel7923	SB04
Размер, п.н.	137	175	288	146	206	285	310	164	213	187

Рис. 1. ДНК-профили линии OT4936 по 10 микросателлитным локусам генома сахарной свеклы: FDSB1001, FDSB1033, SB04, SB09, SB15, Unigene16898, Unigene17623B, Unigene17923, Unigene26753, Unigene27833, – полученные с использованием стандартов длин LIZ-600 (a), DSMO-100 (b). Реальные длины амплифицированных фрагментов ДНК, определенные методом прямого секвенирования (c).

Fig. 1. DNA profiles of OT4936 line of sugar beet genome at 10 microsatellite loci, FDSB1001, FDSB1033, SB04, SB09, SB15, Unigene16898, Unigene17623B, Unigene17923, Unigene26753 and Unigene27833, using the Size Standards LIZ-600 (a) and DSMO-100 (b). The real size of each PCR product confirmed by sequencing is indicated (c).

FDSB1001, FDSB1033, SB04, SB09, SB15, Unigene16898, Unigene17623B, Unigene17923, Unigene26753, Unigene27833. Программное обеспечение GeneMapper ID-X (Applied Biosystems) автоматически присваивает каждому аллелю цифровую характеристику в парах нуклеотидов (указана в рамке под каждым пиком) путем сопоставления длины анализируемых ПЦР-продуктов с интервалами Bin (отмечены серым цветом) каждого фрагмента аллельной лестницы. Если анализируемый ДНК-фрагмент не попадает в существующие интервалы Bin, его размер определяется относительно маркера молекулярной массы. В таких случаях для точного определения длины нового аллеля, не входящего в существующую аллельную лестницу, этот фрагмент ДНК необходимо секвенировать и затем добавить в аллельную лестницу по данному локусу.

Созданная технология генетической идентификации линий и гибридов сахарной свеклы, включающая мультиплексную ПЦР 10 микросателлитных локусов с последующей детекцией и оцифровкой ПЦР-фрагментов с использованием аллельной лестницы, апробирована в анализе 6 современных гибридов сахарной свеклы селекции ФГБНУ «Первомайская селекционно-опытная станция сахарной свеклы и их линий-компонентов» (табл. 2). ДНК-профили всех этих образцов сахарной свеклы получены впервые.

Анализ уникальных цифровых характеристик генотипов позволяет в каждом случае подтвердить происхождение гибрида: по всем микросателлитным локусам можно отследить передачу генетического материала от родительских линий в гибрид. Создание промышленных гибридов сахарной свеклы включает, как минимум, два этапа: получение промежуточного гибрида путем скрещивания ли-

нии с цитоплазматической мужской стерильностью (МС-линия) с линией О-типа и последующее скрещивание полученного гибрида с линией-опылителем. Поэтому в финальном гибриде могут встречаться все варианты аллелей, присутствующие в исходных родительских линиях. В случае, когда родительская линия гетерозиготна по какому-то из локусов, в финальном гибриде содержится только один из этих аллелей. В качестве примера рассмотрим наследование аллелей от линий-компонентов в гибрид Визит (см. табл. 2): по локусу SB09 наследуются аллели 131 и 134 п.н., по локусу FDSB1033 – аллели 175 и 197 п.н, по локусу Unigene26753 – аллели 288 и 303 п.н., по локусу SB15 – аллели 146 и 166 п.н., Unigene27833 – аллель 206 п.н., по локусу Unigene16898 – аллели 276 п.н. и 285 п.н., по локусу FDSB1001 – аллель 310 п.н., по локусу Unigene17623B – аллель 164 п.н., по локусу Unigene17923 – аллели 198 п.н. и 222 п.н., по локусу SB04 – аллели 187 и 193 п.н. Аналогичное наследование аллелей родительских линий можно проследить и для других гибридов (табл. 2).

Созданная технология микросателлитного анализа может быть эффективно использована для генетической идентификации линий сахарной свеклы, оценки однородности растительного материала, а также для контроля качества гибридизации на всех стадиях процесса селекции. Предложенная в данной работе система мультиплексной ПЦР микросателлитных локусов с последующей детекцией полученных фрагментов ДНК с использованием аллельной лестницы – один из ключевых элементов предлагаемой нами технологии генотипирования сахарной свеклы, который позволяет существенно повысить точность анализа и получать стабильно воспроизводимые цифровые ДНК-профили. Эта технология генетической идентифика-

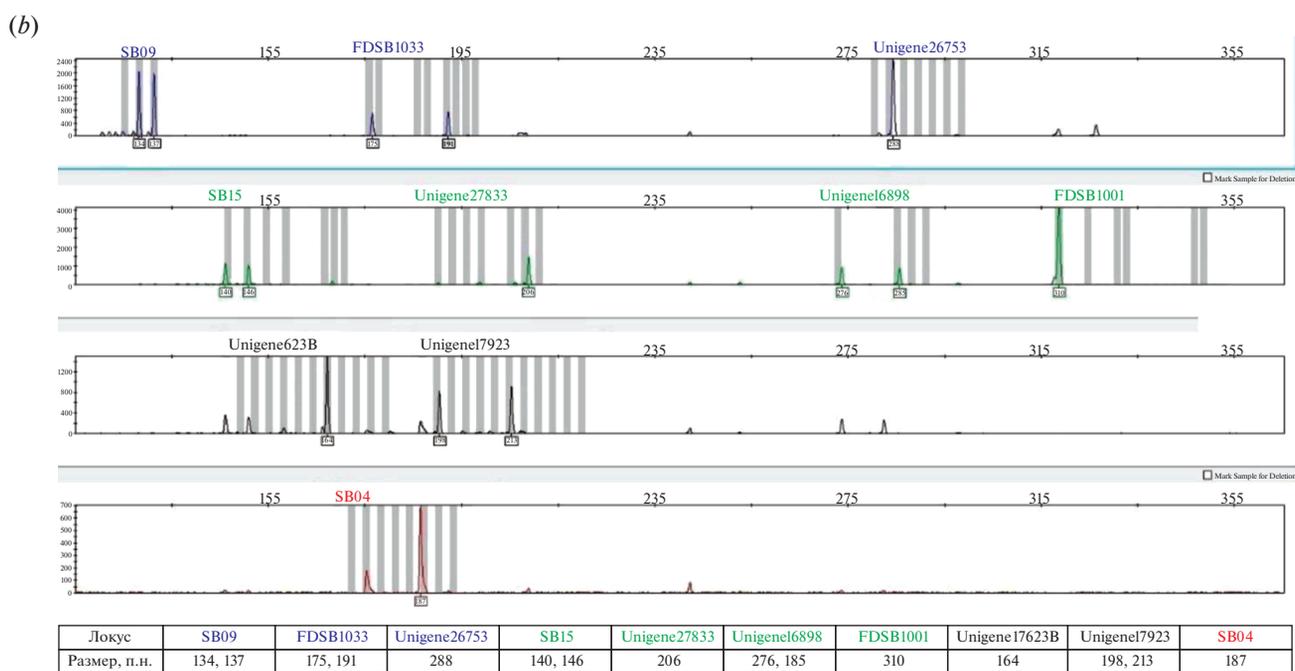
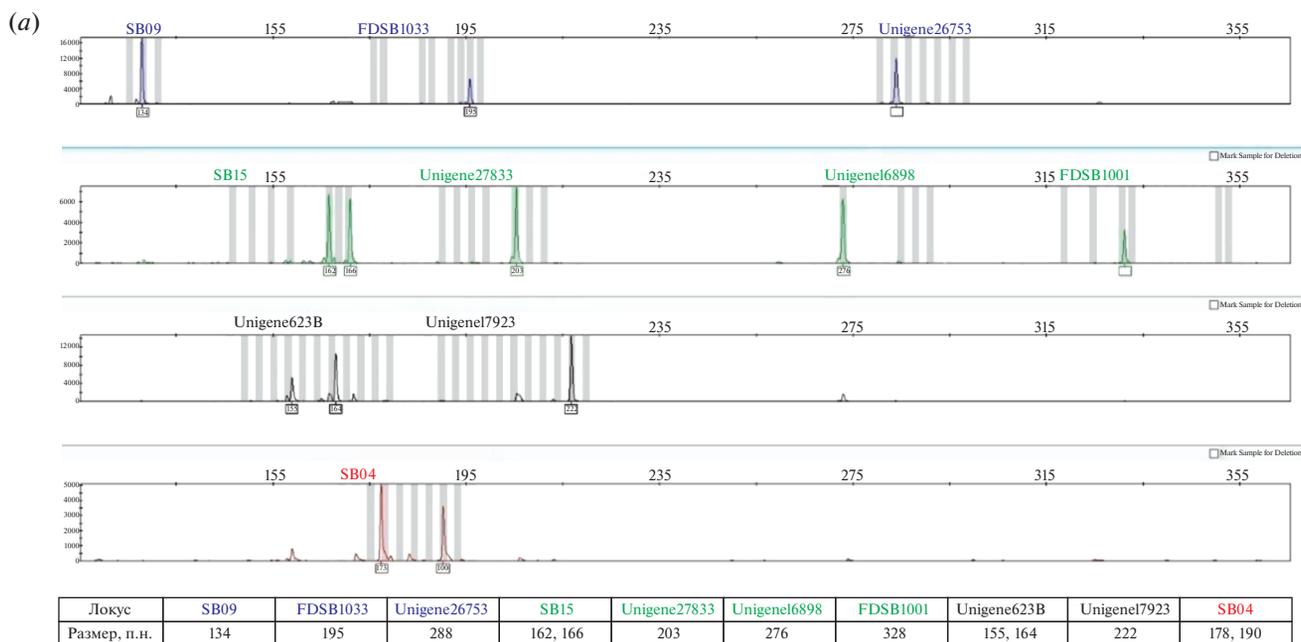


Рис. 2. ДНК-профиль линии Оп21695 (a) и линии C/К MC (12173 × OT4936) (b) по 10 микросателлитным локусам генома сахарной свеклы: FDSB1001, FDSB1033, SB04, SB09, SB15, Unigene16898, Unigene17623B, Unigene17923, Unigene26753 и Unigene27833.

Fig. 2. DNA profiles of Оп21695 (a) and C/К MC (12173 × OT4936) (b) lines of sugar beet genome at 10 microsatellite loci: FDSB1001, FDSB1033, SB04, SB09, SB15, Unigene16898, Unigene17623B, Unigene17923, Unigene26753, and Unigene27833.

Таблица 2. Генетические профили перспективных гибридов сахарной свеклы и их линий-компонентов
Table 2. DNA profiles of selected sugar beet hybrids and their component lines

Образец	Длина аллелей, п.н.									
	SB09	FDSB1033	Unigene26753	SBI5	Unigene27833	Unigene16898	FDSB1001	Unigene17623B	Unigene17923	SB04
Азимут F1	134, 137	195, 195	284, 288	166, 166	203, 206	276, 276	310, 328	164, 164	204, 222	184, 190
МС (27038 × ОТ4936)	131, 137	195, 195	284, 288	140, 166	206, 206	276, 285	310, 310	164, 164	204, 213	184, 184
ОТ4936	137, 137	175, 175	288, 288	146, 146	206, 206	285, 285	310, 310	164, 164	213, 213	187, 187
Оп21695	134, 134	195, 195	288, 288	162, 166	203, 203	276, 276	328, 328	155, 164	222, 222	178, 190
Визит F1	131, 134	175, 197	288, 303	146, 166	206, 206	276, 285	310, 310	164, 164	198, 222	187, 193
МС (11329 × ОТ11301)	131, 134	175, 197	294, 303	140, 146	206, 206	276, 276	310, 310	164, 164	222, 222	187, 187
ОТ11301	131, 131	175, 175	294, 303	140, 162	206, 206	276, 285	310, 310	164, 164	204, 204	187, 190
Оп (19957 × 8949)	134, 134	175, 175	288, 288	166, 166	206, 206	285, 285	310, 310	164, 164	198, 198	184, 193
Корвет F1	131, 134	175, 195	288, 303	140, 140	203, 206	285, 291	310, 310	155, 164	204, 222	187, 190
МС А1	131, 134	175, 195	294, 303	140, 162	203, 206	285, 285	310, 310	164, 164	204, 222	187, 187
ОТ1301	134, 134	175, 175	294, 303	140, 140	206, 206	276, 276	310, 310	164, 164	204, 222	187, 187
Оп5121 П99/96 отб-1/13-1/17J3	137, 137	195, 195	288, 288	140, 146	206, 206	291, 291	310, 310	155, 164	222, 222	190, 190
Успех F1	134, 134	175, 175	284, 303	140, 140	194, 206	276, 276	318, 328	164, 164	222, 222	187, 190
МС (12171 × ОТ12127)	131, 134	175, 191	284, 284	140, 140	206, 206	276, 276	328, 328	164, 164	198, 222	190, 190
ОТ12127 №1/08	131, 131	175, 195	284, 303	140, 140	206, 206	276, 276	328, 328	146, 164	198, 198	187, 187
Оп10632	134, 134	175, 175	303, 303	140, 140	194, 194	276, 276	318, 318	164, 164	222, 222	187, 187
Рубин F1	134, 137	175, 197	284, 288	140, 146	206, 206	276, 285	310, 310	164, 170	213, 222	178, 187
МС (4935 × 4936)	137, 137	175, 175	288, 288	146, 146	206, 206	285, 285	310, 310	146, 146	198, 213	187, 187
ОТ4936	137, 137	175, 175	288, 288	146, 146	206, 206	285, 285	310, 310	164, 164	164, 164	187, 187
Оп (5121 × 5137)	134, 134	175, 197	284, 294	140, 140	206, 206	276, 276	310, 310	164, 170	204, 222	178, 178
Фрегат F1	134, 137	175, 195	288, 288	140, 140	206, 206	276, 285	310, 328	164, 164	198, 222	187, 193
С/К МС (12173 × ОТ4936) (F1)	134, 137	175, 191	288, 288	140, 146	206, 206	276, 285	310, 310	164, 164	198, 213	187, 187
ОТ4936	137, 137	175, 175	288, 288	146, 146	206, 206	285, 285	310, 310	164, 164	164, 164	187, 187
Оп (5121 × 5136)	134, 134	175, 195	288, 294	140, 140	206, 206	276, 276	328, 328	164, 170	204, 222	193, 193

ции линий и гибридов сахарной свеклы может стать надежным лабораторным инструментом для сопровождения селекционного процесса и промышленного семеноводства этой важной технической культуры.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено в рамках государственного задания “Разработка технологий генотипирования сельскохозяйственных культур для ускорения и сопровождения селекционного процесса” (№ 431-2022-0002).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Суслов В.И., Логвинов В.А., Мищенко В.Н., Стрельникова А.В., Логвинов А.В., Суслов А.В., Фильмонов Н.Л. Производственное испытание гибридов сахарной свеклы. *Сахарная свёкла*, 2010, 7, 14–18.
2. Балков И.Я., Каракотов С.Д., Логвинов А.В., Логвинов В.А., Мищенко В.Н. Эволюция сахарной свеклы: от огородных форм до современных рентабельных гибридов. Щелково, АО “Щёлково Агротех”, 2017, 384 с.
3. Meng C.Y., Wei X.C., Zhao Y.Y., Yuan Y.X., Yang S.J., Wang Z.Y., Zhang X.W., Sun J.W., Yang L., Yao Q.J., Zhang Q. Genetic diversity analysis of Capsicum genus by SSR markers. *Mol. Plant Breed.*, 2017, 8(8), 70–78. <https://doi.org/10.5376/mpb.2017.08.0008>
4. Bassil N., Bidani A., Nyberg A., Hummer K., Rowland L.J. Microsatellite markers confirm identity of blueberry (*Vaccinium* spp.) plants in the USDA-ARS National Clonal Germplasm Repository collection. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 2020, 67, 393–409. <https://doi.org/10.1007/s10722-019-00873-8>
5. Testolin R., Messina R., Cipriani G., De Mori G. SSR-based DNA fingerprinting of fruit crops. *Crop Sci.*, 2022, 63(2), 390–459. <https://doi.org/10.1002/csc2.20896>
6. Колобова О.С., Малюченко О.П., Шалаева Т.В., Шанина Е.П., Шилов И.А., Алексеев Я.И., Велишаева Н.С. Генетическая паспортизация картофеля на основе мультиплексного анализа 10 микросателлитных маркеров. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 2017, 21(1), 124–127. <https://doi.org/10.18699/VJ17.230>
7. Шилов И.А., Велишаева Н.С., Анискина Ю.В., Колобова О.С., Шалаева Т.В., Борисенко О.М., Демуринов Я.Н., Фролов С.С. Генетическая идентификация линий и гибридов подсолнечника *Helianthus annuus* L. на основе мультиплексного микросателлитного анализа. *Достижения науки и техники АПК*, 2023, 37(1), 10–15. https://doi.org/10.53859/02352451_2023_37_1_10
8. Smulders M., Esselink D., Everaert I., De Riek J., Vosman B. Characterisation of sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) varieties using microsatellite markers. *BMC Genet.*, 2010, 11, 41. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-41>
9. Fugate K.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. *Plant Genome*, 2014, 7(2), 1–13. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2013.11.0038>
10. McGrath J.M., Trebbi D., Fenwick A., Panella L., Schulz B., Laurent V., Barnes S., Mu S.C. An open-source first-generation molecular genetic map from a sugar beet × table beet cross and its extension to physical mapping. *Crop Sci.*, 2007, S1, S27–S44. <https://doi.org/10.2135/cropsci2006-05-0339tpg>
11. Richards C.M., Brownson M., Mitchell S.E., Kresovich S., Panella L. Polymorphic microsatellite markers for inferring diversity in wild and domesticated sugar beet (*Beta vulgaris*). *Mol. Ecol. Notes*, 2004, 4(5), 243–245. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00630.x>
12. Srivastava S., Pathak A. D., Kumar R., Joshi B.B. Genetic diversity of sugar beet genotypes evaluated by microsatellite DNA markers. *J. Environ. Biol.*, 2017, 38, 777–783. <https://doi.org/10.22438/jeb/38/5/MS-141>
13. Шилов И.А., Анискина Ю.В., Шалаева Т.В., Колобова О.С., Велишаева Н.С., Мищенко В.Н., Логвинов А.В. Создание современных гибридов сахарной свеклы с применением микросателлитного анализа. *Saxar*, 2020, 8, 27–31. <https://doi.org/10.24411/2413-5518-2020-10804>
14. Налбандян А.А., Хуссейн А.С., Федуллова Т.П., Черепухина И.В., Крюкова Т.И., Руденко Т.С. Перспективы использования SSR-маркеров для генотипирования сахарной свёклы. *Saxar*, 2019, 11, 36–39.
15. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 1987, 19, 11–15.
16. Шалаева Т.В., Анискина Ю.В., Колобова О.С., Велишаева Н.С., Логвинов А.В., Мищенко В.Н., Шилов И.А. Исследование микросателлитных локусов генома сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) для создания технологии генетического анализа линий и гибридов. *Сельскохозяйственная биология*, 2023, 58(3), 483–493. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2023.3.483rus>
17. Секридова А.В., Шилов И.А., Кислин Е.Н., Малюченко О.П., Харченко П.Н. Технология генетической идентификации сортов и диких форм винограда на основе мультилокусного микросателлитного анализа. *Биотехнология*, 2021, 37(3), 85–95. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-3-85-95>

Multiplex Microsatellite Analysis Technology for Genetic Identification of Sugar Beet Lines and Hybrids

T. V. Shalaeva^{a, #}, J. V. Aniskina^a, O. S. Kolobova^a, N. S. Velishaeva^a,
A. V. Logvinov^b, V. N. Mischenko^b, P. N. Kharchenko^a, and I. A. Shilov^a

^aAll-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, 127550 Russia

^bPervomayskaya Selection and Experimental Station, Gulkevichi, Krasnodarskiy kray, 352193 Russia

[#]e-mail: shalaeva.tv@mail.ru

Abstract—The technology for sugar beet (*Beta vulgaris*) genotyping by 10 microsatellite loci (FDSB1001, FDSB1033, SB04, SB09, SB15, Unigene16898, Unigene17623B, Unigene17923, Unigene26753, Unigene27833) has been developed. The technology can be used for efficient, accurate and rapid identification of sugar beet lines and hybrids. The proposed approach includes multiplex PCR for all loci in a single tube followed by electrophoretic analysis of the obtained DNA fragments in a single capillary of a genetic analyzer. One of the key elements of the technology, which determines the accuracy and reproducibility of the analysis, is the use of an additional length standard at the electrophoresis stage — an allelic ladder consisting of DNA fragments of the analyzed microsatellite loci. The advantages of the proposed technology include the possibility to standardize and automate the method in a 96-well plate format, which allows organizing the process of mass analysis. As a result, DNA profiles of six modern sugar beet hybrids (Azimuth, Visit, Corvette, Rubin, Fregat, Uspek) and their component lines were obtained for the first time. The developed technology can be effectively used for genetic identification of sugar beet lines, assessment of plant material uniformity, as well as for monitoring the quality of hybridization at all stages of the breeding process, and become a reliable laboratory tool to support industrial seed production of this crop.

Keywords: *Beta vulgaris*, sugar beet, genotyping, multiplex microsatellite analysis, DNA profile

Свидетельство о регистрации средства массовой информации

ПИ № ФС77-75946 от 13 июня 2019 г., выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Подписано к печати 15.01.2024 г. Дата выхода в свет 22.01.2024 г. Формат 60 × 88¹/₈ Усл. печ. л. 14.76 Уч.-изд. л. 15.0

Тираж 117 экз.

Зак. 6832

Цена договорная

Учредители: Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

Издатель: НИЦ "Курчатовский институт", 123182, Россия, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1

Исполнитель по контракту № 35-3-23-44-139 от 03.08.2023 г. ООО "СИС",

129164, г. Москва, Ракетный б-р, д. 16, пом. XXXI, пом. 23

Отпечатано в типографии «Book Jet» (ИП Коняхин А.В.),

390005, г. Рязань, ул. Пушкина, 18, тел. (4912) 466-151

16+