

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ПАСПОРТИЗАЦИЯ ГИБРИДОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ

А.А. НАЛБАНДЯН, Т.П. ФЕДУЛОВА, И.В. ЧЕРЕПУХИНА,
Т.С. РУДЕНКО, Т.Н. БАГМУТОВА

(Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара
имени А.Л. Мазлумова)

Разработка методики молекулярно-генетической идентификации и паспортизации гибридов сахарной свеклы с использованием ДНК-маркеров является актуальным направлением исследований в селекции культуры. Объектом исследований являлись растения перспективных отечественных гибридов сахарной свеклы. В статье представлены результаты по разработке методики молекулярно-генетической идентификации и паспортизации гибридов сахарной свеклы с использованием микросателлитных маркеров. Материалами для исследований служили проростки 8 перспективных гибридов сахарной свеклы отечественной селекции. Целевые фрагменты амплифицировали с локус-специфичными (микросателлитными) праймерами: Unigene16898, Unigene17623B, Unigene26753, Unigene17923, Unigene27833, FDSB1001, FDSB1033, FDSB502–2, FDSB502–3, SB09, SB04, SB15, мечеными флуоресцентными красителями FAM, R6G, TAMRA и ROX. Полученные ампликоны идентифицировали методом высокоразрешающего капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе Нанофор 05 («Синтол», Россия). Приведены результаты подбора 12 микросателлитных локусов, пригодных для генетической паспортизации гибридов сахарной свеклы. Все подобранные праймеры к микросателлитным локусам генома сахарной свеклы характеризовались высоким показателем полиморфизма. По результатам фрагментного анализа установлен размер полученных ПЦР-ампликонов у растений изучаемых гибридов. На основе полученных молекулярных данных составлены генетические формулы и паспорта, позволяющие идентифицировать и паспортизировать генотипы культуры. Построена дендрограмма генетического родства изученных гибридов сахарной свеклы на основе рассчитанных генетических расстояний. Разработка методики молекулярно-генетической идентификации и паспортизации гибридов сахарной свеклы с использованием ДНК-маркеров является актуальным направлением исследований в селекции культуры. Это имеет важное практическое значение в селекции, семеноводстве и госсортоиспытании сахарной свеклы как при создании новых гибридов, так и при их регистрации.

Ключевые слова: сахарная свекла, генотипирование, микросателлитный анализ, генетические паспорта, фрагментный анализ.

Введение

Сахарная свекла является важнейшей стратегической перекрестно опыляемой культурой с двухлетним циклом развития, возделываемой для производства сахара, обладающая признаками самонесовместимости, ЦМС, полиплоидии, апомиксиса и др. Данная культура имеет ограниченное количество морфологических маркеров, поэтому идентификация и паспортизация селекционных материалов и гибридов сахарной свеклы являются весьма актуальной проблемой. В связи с этим важнейшим направлением в селекции сахарной свеклы является проведение генотипирования исходного селекционного материала и гибридов по полиморфным микросателлитным маркерам.

SSR-маркирование (Simple Sequence Repeats) – эффективный инструмент для анализа родственных связей, оценки генетического разнообразия, оценки отличимости, однородности, стабильности (ООС), защиты авторских прав селекционеров, составления генетических паспортов. Анализ полиморфизма микросателлитных локусов в геноме сахарной свеклы является наиболее перспективным, так как SSR-маркеры позволяют получать стабильно воспроизводимый ДНК-профиль (праймеры комплементарны консервативным участкам генома) и кодоминантны, что дает возможность использовать их для отслеживания наследования геномов родительских линий в пробных и коммерческих гибридах [8, 27].

В последнее время опубликован целый ряд работ по применению метода микросателлитного анализа в селекционных программах по сахарной свекле как за рубежом [14, 28], так и в России [3, 6, 9]. Вместе с тем в настоящее время отсутствует эффективная и удобная методика использования ДНК-маркеров для создания генетических паспортов родительских форм и гибридов культуры. Для разработки данной методики, позволяющей получать уникальные, стабильные ДНК-профили, требуется более подробное изучение полиморфных микросателлитных профилей на большой выборке родительских компонентов и гибридов сахарной свеклы.

Эффективность растениеводства в большой степени обусловлена потенциалом использования современных сортов и гибридов, который реализуется с учетом факторов сортовой принадлежности и генетической чистоты. В соответствии с задачами «Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации» от 2016 г. и «Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий» на 2019–2027 гг. в области агроиндустрии предусмотрено ускоренное внедрение современных молекулярно-генетических методов в селекционные программы.

Сорта и гибриды растений относятся к объектам интеллектуальной собственности и охраняются патентами, если являются оригинальными, не имеют аналогов и успешно проходят испытания на отличимость, однородность и стабильность (ООС-тест). Традиционные методы сортовой идентификации на основе морфологических признаков и биохимических дескрипторов значительно уступают современным подходам, основанным на молекулярных ДНК-маркерах, по точности, разрешающей способности и воспроизводимости результатов анализа [1].

Система ДНК-идентификации в настоящее время успешно применяется на практике и для ряда других сельскохозяйственных культур (сои, подсолнечника, пшеницы и др.). Не исключено, что в ближайшее время она будет принята и одобрена Международным союзом по защите новых сортов растений (UPOV) в качестве обязательного элемента тестирования при регистрации нового селекционного достижения. Молекулярные методы оценки генетического разнообразия, так называемый ДНК-фингерпринтинг, предполагают изучение полиморфизма с разработкой надежного способа записи спектров ДНК, полученных в результате полимеразной цепной реакции (ПЦР). На их основе для каждого сорта/гибрида можно составить генетический паспорт, который позволит определить уникальность сорта, гибрида, провести анализ однородности семенного и посадочного материала. Генетическая паспортизация сортов, линий и гибридов может значительно повысить эффективность регистрации и авторской защиты селекционных достижений. Для ДНК-идентификации необходимо предварительное создание эталонных генетических паспортов районированных сортов и гибридов. Путем сравнения с ними тестируемого образца можно установить подлинность сорта, гибридность, наличие примесей и т.д.

Внедрение методов ДНК-фингерпринтинга в практику требует комплексного научного подхода, включающего в себя выбор оптимальной системы молекулярного маркирования и создание эффективных технологий генотипирования с учетом особенностей

растений конкретного вида [15, 25]. В ФГБНУ «ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова» в настоящее время разрабатывается методика идентификации и паспортизации гибридов сахарной свеклы на основе микросателлитных маркеров [19]. На текущий момент такой методики определения сортовой принадлежности сахарной свеклы в РФ не существует.

Разработка методов генетической идентификации родительских форм и гибридов сахарной свеклы расширяет возможности регистрации, экспертизы и защиты прав в селекции и семеноводстве. Особенно актуальными методы генотипирования становятся при идентификации материала, размножаемого и сохраняемого *in vitro*, где морфологические сортовые признаки могут быть неярко выражены [23]. Однако в условиях Российской Федерации требуются расширение исследований по геномному анализу сельскохозяйственных культур, совершенствование и унификация методов ДНК-идентификации и методик маркирования, разработка единых требований к уровню информативности маркеров, принципов и методик оценки посевного и посадочного материала и коллекций *in vitro* [4, 13, 18].

Правообладатель нового сорта может легко утратить свою интеллектуальную собственность, пренебрегая ее защитой, в то время как ДНК-паспорт полностью исключает данный факт. Период создания гибрида может сократиться в несколько раз, поскольку идентификация родительских форм и гибридного материала, а также анализ результатов скрещивания на генетическом уровне проводятся в предельно короткий срок по сравнению с традиционными методами. Генетическая идентификация также решит ряд проблем в семеноводстве – в частности, в оценке соответствия партий стандарту и контролю качества семенных материалов.

Молекулярные маркеры широко применяются в филогенетическом анализе, в поиске функционально значимых генов, в маркерной селекции, паспортизации селекционных достижений, определении генетической чистоты линий и гибридов различных культур и, в частности, сахарной свеклы. Современные технологии молекулярных маркеров позволяют идентифицировать генетическое разнообразие среди сортов, гибридов, проводить картирование хромосом и характеристику генов [5, 22, 25]. Так, зарубежными авторами проведена оценка биоразнообразия видов сахарной свеклы и их диких родственников и установлена связь экологических данных с новыми генетическими подходами. В данной работе авторы использовали EcoTILLING как молекулярный инструмент для оценки полиморфизмов ДНК в диких популяциях *Beta* и выявления генов-кандидатов, связанных с засухой и солеустойчивостью. Рассмотрены вопросы, связанные с секвенированием следующего поколения (NGS) технологии как новым молекулярным инструментом для оценки адаптивных генетических вариаций на диких родственниках сахарной свеклы [17, 26]. Молекулярный и генетический полиморфизм сортов сахарной свеклы и гибридов при выборе материала для оценки устойчивости к абиотическим факторам на молекулярном уровне также был изучен с использованием RAPD- и SSR-анализа [2].

Кластерный анализ с использованием ДНК-маркеров показывает, что термостойкие генотипы сахарной свеклы Ялтушковский МС 72, Украинский МС 70, Украинский МС 72 и Катюша генетически отдалены и, следовательно, могут быть использованы для создания гетерозисных гибридов. Генетическое разнообразие и поток генов между дикими, культивируемыми и сорняковыми формами *Beta vulgaris* L. были оценены с помощью RFLP и микросателлитных маркеров. Модели разнообразия были конгруэнтны для обоих типов маркеров. Генетическое разнообразие дикой свеклы оказалось высоким по своему аллельному числу и по наблюдаемой гетерозиготности, тогда как генофонд культивируемой свеклы был более узким [10, 11].

Таким образом, разработка методики молекулярно-генетической идентификации и паспортизации гибридов сахарной свеклы с использованием микросателлитных маркеров является актуальным и перспективным направлением исследований.

Цель исследований: разработка методики молекулярно-генетической идентификации и паспортизации гибридов сахарной свеклы с использованием микросателлитных маркеров.

Материал и методы исследований

В качестве материалов для проведения микросателлитного анализа использованы по 3 проростка 8 перспективных гибридов сахарной свеклы отечественной селекции (РМС-137, РМС-500, РМС-501, РМС-503 и Рамоза (ФГБНУ «ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова»), Львовский МС 17 и Смена (Львовская ООС), Буря (ООО «СоюзСемСвёкла»).

Выделение геномной ДНК из растительной ткани осуществлялось наборами «ДНК-Экстран-3» по протоколу производителя (ООО «Синтол», Россия). Качество полученных препаратов ДНК оценивали путем электрофореза в 1%-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Концентрацию ДНК измеряли с использованием набора для анализа ДНК HS Qubit (Thermo Fisher Scientific, США) на флуориметре Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Затем 5 нг ДНК использовали для реакции амплификации. Целевые фрагменты амплифицировали с локус-специфичными (микросателлитными) праймерами: Unigene16898, Unigene17623B, Unigene26753, Unigene17923, Unigene27833 (Fugate et al., 2014), FDSB1001, FDSB1033 (McGrath et al., 2007), FDSB502–2, FDSB502–3 (Шалаева и др.), SB09, SB04, SB15 (Richards et al., 2004), мечеными флуоресцентными красителями FAM, R6G, TAMRA и ROX. ПЦР-амплификацию проводили с помощью коммерческого набора GenPak PCR Core (Галарт-Диагностикум, Россия) по протоколу производителя в 20 мкл реакционной смеси на термоциклере CFX-96 («Bio-Rad», США).

Условия реакции были следующими: +95°C – 5 мин; 30 циклов: +94°C – 30 с, N°C – 30 с, +72°C – 30 с; +72°C – 5 мин, где N – температура отжига праймеров. Для проведения ПЦР олигонуклеотиды были выделены в 3 группы в зависимости от их температуры отжига. Праймеры к микросателлитным локусам генома сахарной свеклы синтезированы в ООО «Синтол» (Россия). Сиквенс и температура отжига праймеров к микросателлитным локусам представлены в таблице 1.

Полученные ампликоны идентифицировали методом высокоразрешающего капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе Нанофор 05 («Синтол», Россия), модуль управления FA 450 PDMA 6 50, набор красителей Syntol-СК-5. Общий объем реакции 11 мкл: деионизованный формамид Hi-Di («ThermoFisher Scientific», США) – 9,5 мкл; размерный стандарт СД-450 («Синтол», Россия) – 0,5 мкл; ПЦР-продукт – 1 мкл. Размер полученных ПЦР-продуктов определяли с помощью программного обеспечения «ДНК Фрагментный анализ» (ИАП РАН, Россия). В качестве размерного стандарта использован маркер молекулярного веса СД450, канал LIZ (ООО «Синтол»). Молекулярно-генетические экспериментальные исследования проведены в трех биологических повторностях. Рассчитана мера информационного полиморфизма (polymorphism information content – PIC), которая определяется способностью маркера выявлять полиморфизм в популяции в зависимости от числа обнаруживаемых аллелей и распределения их частот [7, 20]. PIC выявляет дискриминационную способность маркера, фактически зависит от числа устанавливаемых аллелей и распределения их частот и тем самым эквивалентна генному разнообразию. PIC рассчитывается 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.

Характеристика используемых SSR-праймеров

№	Название	Последовательность 5'.....3'	T _m , C°	Мотив	Источник литературы
1	Unigene16898	F: AGAACTTAGATTGTGACCTGCT R: GATGGGAAGAGAGAGATTAGTG	55	(CAA) _n	(Fugate, 2014)
2	Unigene17623B	F: ATTACACCTCAATCTTCCAGC R: AATATTGGCAATCTACCAGC	55	(CAA) _n	(Fugate, 2014)
3	Unigene26753	F: GAGATACAAATTCACCCATC R: GTAGAGGAAGTAAAAGCACCA	55	(CAA) _n	(Fugate, 2014)
4	Unigene17923	F: AACCTTACTCCCTCTGATTTCT R: GGAGATACAACCTTACAAGAGCC	55	(CTT) _n	(Fugate, 2014)
5	Unigene27833	F: GAGTCATCAACACCAAACTACA R: ATTAGCCAAGAAAATCACCC	55	(ATA)	(Fugate, 2014)
6	FDSB1001	F: ACTTCAACCACTATCACAAAGTGAG R: ATCTTATGCTGCCATGACCA	58	(AG) _n	(Шилов, 2023)
7	FDSB1033	F: GCTGAGATGATGTTTGTAGGGC R: TTCAAATCGCCATCTCCCAG	58	(AG) _n	(Шилов, 2023)
8	FDSB502–2	F: ACAATGGCGAATCGCTTTTGGGG R: CGTACTCATCTTCATCGTCTTCTTC	60	(GAT) _n	(Шилов, 2023)
9	FDSB502–3	F: GAAGAAGACGATGAAGATGAGTACG R: GAATCAACCTTGCCGACATATCC	60	(AAG) _n	(Шилов, 2023)
10	SB09	F: TGCATAAAACCCCAACAAT R: AGGGCAACTTTGTTTTGTGG	55	(CAA) _n (CAT) _n	(Richards, 2004)
11	SB04	F: ACCGATCACCAATTCACCAT R: GTTTTGTTTTGGGCGAAATG	58	(AAC) _n	(Richards, 2004)
12	SB15	F: CACCCAGCCTATCTCTCGAC R: GTGGTGGGCAGTTTTAGGAA	58	(CT) _n (GAC) _n	(Richards, 2004)

РIS выявляет дискриминационную способность маркера, фактически зависит от числа устанавливаемых аллелей и распределения их частот и тем самым эквивалентна генному разнообразию [7]. Расчет генетических расстояний между генотипами сахарной свеклы и проведение кластерного анализа осуществляли в программе *PAST*.

Результаты и их обсуждение

В настоящее время в мировой и отечественной практике для передачи гибридов сельскохозяйственных культур на ГСИ принята оценка их на ООС (отличимость,

однородность и стабильность) по основным 27 биоморфологическим признакам. Исходя из этого нами проведено тестирование 8 гибридов сахарной свеклы по данным критериям. На примере гибрида Смена (рис. 1) представлена оценка растений по основным биоморфологическим параметрам (табл. 2).

На основании анализа данных литературы и собственных исследований для генотипирования образцов сахарной свеклы были выбраны 12 микросателлитных локусов. Отбор производили по следующим критериям: число аллелей в локусе не менее двух; расположение локусов на разных хромосомах, что должно обеспечивать независимое наследование ДНК-маркеров. В результате проведенного ПЦР-анализа 8 отечественных гибридов сахарной свеклы с 12 парами микросателлитных праймеров были выявлены их генетическое разнообразие и полиморфизм. С использованием SSR-маркеров для каждого генотипа получены индивидуальные ДНК-паттерны. Все подобранные праймеры к микросателлитным локусам генома сахарной свеклы характеризовались высоким показателем полиморфизма. Результаты фрагментного анализа растений перспективных гибридов сахарной свеклы представлены на примере гибрида Смена (рис. 2).

Максимальное число обнаруженных аллелей на SSR локус составило 13. Наибольшая величина информационного полиморфизма (PIC) установлена для локуса Unigene 17923 (PIC = 0,96) (табл. 3). Диапазон длин и PIC выявленных аллелей микросателлитных локусов варьирует в следующих пределах: Unigene16898–55–439 п.н. (PIC = 0,95); Unigene17623–123–221 п.н. (PIC = 0,91); Unigene26753–244–510 п.н. (PIC = 0,94); Unigene17923–171–428 п.н. (PIC = 0,96); Unigene27833–96–280 п.н. (PIC = 0,94); FDSB1001–109–352 п.н. (PIC = 0,91); FDSB1033–117–234 п.н. (PIC=0,95); FDSB502–2–103–305 п.н. (PIC=0,90); FDSB502–3–108–542 п.н. (PIC=0,95); SB09–119–546 п.н. (PIC=0,93); SB04–111–376 п.н. (PIC=0,94); SB15–66–172 п.н. (PIC = 0,94).

Каждое из проанализированных растений изучаемых гибридов сахарной свеклы характеризуется определенным набором или сочетанием аллелей, то есть сортоспецифичными аллельными вариантами. Это распределение служит эталоном при сравнении и идентификации растений неизвестных гибридов со стандартом. Путем сравнения распределения полиморфных ДНК разной длины среди исследуемых и эталонных образцов определяют сортовую принадлежность.



Рис. 1. Корнеплоды сахарной свеклы гибрида Смена

Оценка гибрида сахарной свеклы Смена на отличимость, однородность, стабильностьГибрид СменаФактическое число растений 120

№	Признак	Степень выраженности	Результат
1	Соплодие: число семян	односемянное	1
2	Соплодие: число ростков из 1 семени	одноростковое	1
3	Плоидность	диплоидность	2
4	Проросток, процент проростков с антоциановой окраской гипокотыля	60–79%	4
5	Семядоли: размер	среднего размера	5
6	Лист: положение	полупрямостоячий	3
7	Лист: длина (черешок с пластинкой)	средней длины	5
8	Черешок: длина	средней длины	5
9	Черешок: ширина	средней ширины	5
10	Листовая пластинка: длина	средней длины	5
11	Лист: длина черешка (относительно длины пластинки)	средней длины	5
12	Листовая пластинка: ширина	средней ширины	5
13	Листовая пластинка: отношение ширины к длине	среднее	5
14	Листовая пластинка: интенсивность зеленой окраски	средняя	3
15	Черешок: окраска	светло-зеленый	1
16	Черешок: окраска основания	бело-зеленое	1
17	Листовая пластинка: волнистость края	слабая	3
18	Листовая пластинка: гляцевитость	средняя	5
19	Листовая пластинка: морщинистость	слабая	3
20	Листовая пластинка: форма вершины	тупая	1
21	Листовая пластинка: наличие антоциановой окраски	отсутствует	1
22	Растение: высота	средней высоты	5
23	Корнеплод: форма	ширококонический	3
24	Корнеплод: длина	средней длины	5
25	Корнеплод: ширина	средний	5
26	Корнеплод: погруженность в почву	средняя	7
27	Корнеплод: размер головки	среднего размера	5



Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР-продуктов микросателлитного локуса Sb04, меченого красителем ROX, у гибрида сахарной свеклы Смена селекции ЛОСС

Составленные на основе SSR-маркеров молекулярно-генетические формулы 8 перспективных гибридов сахарной свеклы приведены в таблице 4, где латинскими буквами обозначены маркеры: **A** – Unigene 16898; **B** – Unigene 17623; **C** – Unigene 26753; **D** – Unigene 17923; **E** – Unigene 27833; **F** – FDSB1001; **G** – FDSB1033; **H** – FDSB502–2; **I** – FDSB502–3; **J** – Sb09; **K** – Sb04; **L** – Sb15. Цифровой индекс (табл. 4) указывает размер выявленных аллелей (в парах нуклеотидов).

Анализируя результаты молекулярно-генетического исследования современных гибридов сахарной свеклы отечественной селекции по 12 микросателлитным маркерам, необходимо отметить, что практически по всем изученным локусам у всех генотипов выявлен значительный полиморфизм. Так, по SSR локусу FDSB1033 минимальное количество аллельных вариантов (3) выявлено у гибридов РМС 500 и Буря, а максимальное – 11 у Рамозы и 10 у Смены. По локусу FDSB502–2 наименьшее количество ПЦР-продуктов (3) установлено у гибридов РМС 137 и Буря, а максимальное (5) – у гибридов РМС 503, Львовский МС 17, Смена, РМС 501.

Незначительным количеством аллельных состояний характеризуется локус Sb 09 – от 2 у гибрида Буря до 5 у гибрида РМС 500.

По локусу Sb 04 минимальное количество ПЦР-ампликонов (1) выявлено у растений сахарной свеклы гибрида Львовский МС 17, а максимальное (6) – у гибридов РМС 137, РМС 500 и Буря. По локусу Sb 15 установлен довольно значительный полиморфизм ($PI = 0,94$). Наименьшее количество установленных аллельных состояний (4) установлено у растений гибрида РМС 137, а максимальное (9) – у гибрида РМС 501. По локусу FDSB502–3 у всех изученных гибридов выявлено наименьшее количество ДНК-фрагментов: от 2 (Львовский МС 17) до 7 у гибрида РМС 503.

Весьмавысоким полиморфизмом характеризуется локус Unigene 17923: у изученных генотипов обнаружено от 6 ампликонов у гибрида РМС 137 до 13 – у РМС 500. По локусу Unigene 16898 наименьшее количество (3) ДНК-фрагментов установлено у гибрида Буря, максимальное (10) – у гибрида РМС 500, 7 – у гибридов РМС 503, Львовский МС 17, Смена. При использовании праймеров к SSR-локусу Unigene 17623 наименьшее количество аллельных вариантов (4) обнаружено у образцов Рамоза и РМС 500, а наибольшее (8) – у РМС 137. По локусу Unigene 27833 минимальное количество ДНК-фрагментов (5) выявлено у растений гибрида РМС 503 и Буря, а максимальное (9) – у Смены. Локус FDSB1001 характеризуется достаточным уровнем полиморфизма: минимальное количество ПЦР-продуктов (1) установлено у гибрида Рамоза, по 2 ампликона – у растений гибридов РМС 503, Львовский МС 17, Смена, Буря. При использовании праймеров к локусу Unigene 26753 минимальное количество ПЦР-продуктов (3) отмечено у гибрида РМС 501, а максимальное (8) – у растений гибрида РМС 137. Максимальное количество ДНК-фрагментов выявлено у гибрида РМС 137 практически по всем изученным SSR-локусам. Вместе с тем следует отметить, что все выявленные ДНК-ампликоны обладают разной молекулярной массой. Это позволяет использовать данные праймеры для идентификации и паспортизации исследованных гибридных растений сахарной свеклы.

Генетический полиморфизм гибридов сахарной свеклы по SSR-маркерам

№	Праймеры	РМС137	РМС503	Львовская МС17	Смена	Рамоза	РМС500	РМС501	Буря	РІС
1	Unigene 16898	251–281 п.н.	255–286 п.н.	252–280 п.н.	56–281 п.н.	56–281 п.н.	55–289 п.н.	55–413 п.н.	253–439 п.н.	0,95
2	Unigene 17623	140–166 п.н.	140–159 п.н.	140–165 п.н.	123–160 п.н.	123–159 п.н.	141–159 п.н.	141–165 п.н.	147–221 п.н.	0,91
3	Unigene 26753	244–509 п.н.	252–290 п.н.	268–509 п.н.	266–509 п.н.	274–509 п.н.	272–510 п.н.	288–508 п.н.	273–507 п.н.	0,94
4	Unigene 17923	171–261 п.н.	172–230 п.н.	172–210 п.н.	172–210 п.н.	172–210 п.н.	171–428 п.н.	173–210 п.н.	172–209 п.н.	0,96
5	Unigene 27833	186–280 п.н.	97–209 п.н.	97–208 п.н.	97–208 п.н.	96–208 п.н.	97–254 п.н.	97–208 п.н.	105–207 п.н.	0,94
6	FDSB1001	158–352 п.н.	170–314 п.н.	155–314 п.н.	163–314 п.н.	314 п.н.	109–332 п.н.	159–314 п.н.	313, 331 п.н.	0,91
7	FDSB1033	146–194 п.н.	183–187 п.н.	161–196 п.н.	160–234 п.н.	162–209 п.н.	164–220 п.н.	162–196 п.н.	117–192 п.н.	0,95
8	FDSB502–2	110–118 п.н.	103–305 п.н.	103–154 п.н.	108–305 п.н.	104–118 п.н.	108–118 п.н.	103–118 п.н.	105–155 п.н.	0,90
9	FDSB502–3	209–542 п.н.	216–271 п.н.	272–281 п.н.	230 п.н.	292–462 п.н.	214–297 п.н.	215–232 п.н.	108–159 п.н.	0,95
10	SB09	120–172 п.н.	119–192 п.н.	126–469 п.н.	126–417 п.н.	120–129 п.н.	124–270 п.н.	126–537 п.н.	125–546 п.н.	0,93
11	SB04	111–186 п.н.	158–187 п.н.	171 п.н.	182–187 п.н.	177–210 п.н.	168–188 п.н.	177–376 п.н.	160–186 п.н.	0,94
12	SB15	134–149 п.н.	66–172 п.н.	137–171 п.н.	138–165 п.н.	138–172 п.н.	138–165 п.н.	130–171 п.н.	130–164 п.н.	0,94

Составленные молекулярно-генетические формулы служат основой генетического паспорта, где вместе с информацией об оригинаторе, происхождении гибридов, основных биоморфологических признаках приведены данные по составу выявленных аллелей микросателлитных локусов. На основе идентифицированных ДНК-фрагментов составлены генетические паспорта гибридов сахарной свеклы (табл. 5), позволяющие эффективно идентифицировать и паспортизировать их, вычислены генетические расстояния между исследованными образцами (табл. 6) и методом кластерного анализа, построена дендрограмма предполагаемых филогенетических взаимоотношений (рис. 3).

На представленной дендрограмме гибриды Льговской селекции (Льговский МС 17 и Смена) вошли в отдельный кластер, так как они созданы на основе близкородственных МС-форм и сростноплодных опылителей и имеют незначительное генетическое расстояние между собой ($D = 8,46$). На небольшом расстоянии от этой подгруппы находится гибрид Рамонской селекции Рамоза ($D = 8,89-8,54$). Довольно значительные генетические дистанции ($D = 9,64-11,18$) отмечены для гибрида РМС – 500 практически со всеми изученными гибридными образцами. Данный гибрид не вошел ни в один кластер и находится отдельно на дендрограмме, что свидетельствует о его генетическом отличии от других генотипов сахарной свеклы. Гибрид РМС 137 также показывает довольно значительную генетическую удаленность от остальных изученных гибридных образцов ($D = 9,84-11,18$).

Таблица 4

Молекулярно-генетические формулы изученных гибридов

Гибрид	Молекулярно-генетические формулы
РМС 137	A _{251/257/268/272/275/281} B _{140/148/150/155/159/160/162/166} C _{244/250/280/281/288/289/295/509} D _{171/175/178/182/189/261} E _{186/192/199/203/208/280} F _{158/213/304/314/320/321/333/352} G _{146/164/171/177/190/194} H _{110/112/118} I _{209/228/232/450/542} J _{120/127/129/172} K _{111/161/164/173/174/186} L _{134/135/145/149}
РМС 503	A _{255/263/264/271/272/281/286} B _{140/149/150/155/159} C _{252/253/289/290} D _{172/173/174/180/182/195/197/204/209/230} E _{97/105/201/203/209} F _{170/314} G _{183/187} H _{103/112/114/118/305} I _{216/220/232/253/254/262/271} J _{119/125/192} K _{158/177/187} L _{66/138/139/149/164/165/172}
Льговский МС 17	A _{252/254/263/266/271/274/280} B _{140/152/155/159/162/165} C _{268/286/289/304/509} D _{172/174/180/182/195/197/204/209/210} E _{97/185/191/195/202/208} F _{155/314} G _{161/164/170/176/185/192/196} H _{103/112/114/119/154} I _{272/281} J _{126/183/469} K ₁₇₁ L _{140/142/149/151/156/164/171}
Смена	A _{56/254/256/263/273/274/281} B _{123/139/148/150/155/159} C _{266/286/289/304/509} D _{171/172/176/179/182/189/206/210} E _{97/105/185/186/192/196/198/203/208} F _{163/314} G _{160/164/169/170/176/185/191/192/203/234} H _{108/109/114/118/305} I ₂₃₀ J _{126/128/258/275} K _{182/184/187} L _{138/140/149/158}
Рамоза	A _{56/254/262/272/273/281} B _{123/150/151/159} C _{274/289/304/509} D _{172/175/180/182/195/199/210} E _{96/105/191/195/201/205/208} F ₃₁₄ G _{162/164/170/176/184/185/190/192/196/199/209} H _{104/110/114/118} I _{292/396/462} J _{120/128/129} K _{177/186/187/209/210} L _{138/142/145/150/164/171/172}
РМС 500	A _{55/218/255/257/263/266/273/281/282/289} B _{141/149/155/159} C _{272/282/286/289/296/304/319/419/478/508/510} D _{171/203/272/275/295/296/307/309/344/347/379/402/428} E _{97/99/105/192/201/202/208/254} F _{109/132/313/332} G _{164/209/234} H _{108/110/114/118} I _{214/296/297} J _{124/126/128/254/270} K _{168/171/177/181/184/188} L _{138/140/149/158/165}
РМС 501	A _{55/255/256/263/265/271/272/286/413} B _{141/149/150/159/165} C _{288/303/508} D _{173/176/182/189/207/209} E _{97/105/185/191/195/198/202/208} F _{159/215/305/314} G _{162/163/170/177/183/190/193/196} H _{103/107/109/113/118} I _{215/226/232} J _{132/149/159/537} K _{177/376} L _{130/144/145/152/153/159/160/165/167}
Буря	A _{253/269/439} B _{147/150/158/159/165/221} C _{273/285/288/507} D _{172/173/181/182/188/189/197/199/209} E _{105/197/199/204/207} F _{313/331} G _{117/129/192} H _{105/112/155} I _{108/132/159} J _{129/546} K _{160/168/178/179/185/186} L _{130/144/149/153/158/164}

Таблица 5

**Генетический паспорт перспективных гибридов сахарной свеклы
отечественной селекции по SSR-маркеру Unigene 16896**

Гибрид	п.н.	55	56	218	251	252	253	254	255	256	257	262	263	264	265	266
		РМС 137	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
РМС 500	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
РМС 501	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1
РМС 503	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
Рамоза	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Львовский МС 17	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
Смена	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0
Буря	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Гибрид	п.н.	268	269	271	272	273	274	275	276	280	281	282	286	289	413	439
РМС 137	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
РМС 500	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
РМС 501	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
РМС 503	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Рамоза	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Львовский МС 17	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
Смена	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
Буря	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1

Матрица генетических расстояний (по Эвклиду) гибридов сахарной свеклы

Гибрид	РМС 137	РМС 500	РМС 501	РМС 503	Рамоза	Львовский МС 17	Смена	Буря
РМС 137	0,00	10,10	10,30	10,00	9,85	11,18	10,49	9,85
РМС 500	10,10	0,00	9,38	9,38	9,22	10,25	9,38	9,64
РМС 501	10,30	9,38	0,00	8,49	8,89	10,15	9,70	9,75
РМС 503	10,00	9,38	8,49	0,00	8,54	9,64	9,80	9,85
Рамоза	9,85	9,22	8,89	8,54	0,00	10,20	9,64	9,70
Львовский МС 17	11,18	10,25	10,15	9,64	10,19	0,00	10,63	10,77
Смена	10,49	9,38	9,70	9,80	9,64	10,63	0,00	9,85
Буря	9,85	9,64	9,75	9,85	9,70	10,77	9,85	0,00

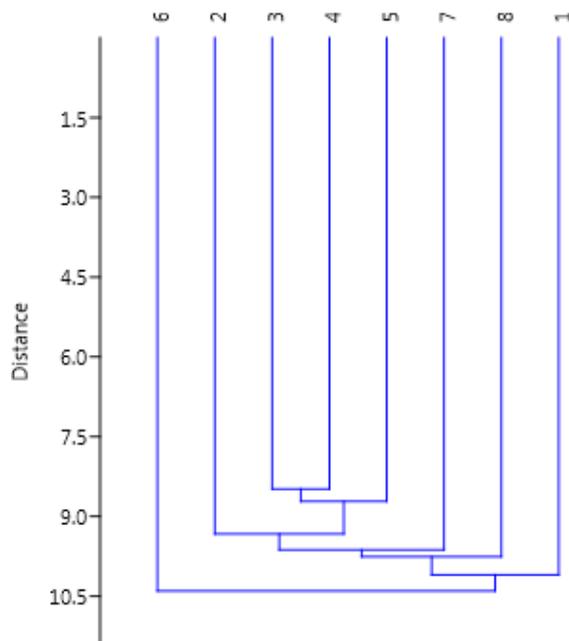


Рис. 3. Генетические взаимоотношения гибридов сахарной свеклы:
 1 – РМС 137; 2 – РМС 503; 3 – Львовский МС 17; 4 – Смена;
 5 – Рамоза; 6 – РМС 500; 7 – РМС 501; 8 – Буря

Созданные по результатам микросателлитного анализа молекулярно-генетические паспорта могут быть использованы при регистрации гибридов сахарной свеклы в Госкомиссии РФ по охране и испытанию селекционных достижений. Практическая значимость генетического паспорта заключается в том, что можно идентифицировать растение лишь по небольшому фрагменту ткани. Данные можно использовать при защите авторских прав селекционеров по районированным гибридам или при проведении судебной экспертизы по поводу фальсификации семенного материала. Разрабатываемая методика позволит устанавливать генетическую чистоту партий семян, изучать генетическое разнообразие исходного материала для создания новых гибридов, исключать возможность незаконного присвоения прав на селекционные достижения, а также поможет вытеснить с рынка контрафактные семена. Генетический паспорт на селекционное достижение будет включать в себя оценку на ООС по биоморфологическим признакам, аллельный состав по ДНК-маркерам, с помощью которых можно идентифицировать гибриды сахарной свеклы.

В настоящее время общепринятые технологии идентификации генотипов культуры отсутствуют, поэтому ученые ВНИИСС проводят исследования по разработке методики генотипирования образцов сахарной свеклы. Любой гибрид может быть идентифицирован по уникальному профилю ДНК (ДНК-фингерпринт), полученному с помощью микросателлитных маркеров. Для реализации поставленной цели необходимы наиболее точные, с высокой разрешающей способностью, методы детекции ДНК. Одной из таких технологий является фрагментный анализ ДНК методом капиллярного гель-электрофореза для максимально точного определения размеров ДНК-маркеров.

Задача по паспортизации сельскохозяйственных культур была поставлена перед научным сообществом правительством Российской Федерации с вступлением в силу изменений в Федеральный закон от 30 декабря 2021 г. № 454 «О семеноводстве». Методика, разработанная учеными ВНИИСС, будет апробирована в селекцентре, а затем, при удачной воспроизводимости результатов, внедрена в организации, которые в рамках своей компетенции будут создавать генетические паспорта растений сахарной свеклы. Повышение эффективности идентификации гибридов сахарной свеклы возможно только при использовании комбинации ДНК-маркеров и биоморфологических параметров.

Для получения более достоверных результатов генетического анализа целесообразно проводить также идентификацию родительских форм гибридов сахарной свеклы (МС-формы, закрепителя стерильности Оуэн типа (О-тип), сростноплодного опылителя). Поскольку гибридные растения очень гетерозиготны, в своем геноме они имеют генетический материал четырех родительских компонентов, вследствие чего отдельные растения показывают разный ДНК-профиль – в частности, по SSR-маркерам. Родительские же формы – это инбредные линии или материалы от сибсовых скрещиваний, отличающиеся своей однородностью.

Выводы

1. Установлена молекулярно-генетическая структура 8 перспективных гибридов сахарной свеклы по 12 микросателлитным (SSR)-маркерам, позволившая провести их идентификацию и паспортизацию. Все отобранные праймеры к микросателлитным локусам генома сахарной свеклы характеризовались высоким показателем полиморфизма.

2. Наибольший уровень полиморфного обеспечения (PIC) установлен для локусов, определенных с использованием пары праймеров: Unigene 17923 (PIC = 0,96).

Диапазон длин и PIC выявленных аллелей микросателлитных локусов следующий: Unigene16898–56–439 п.н. (PIC = 0,95); Unigene17623–123–221 п.н. (PIC = 0,91); Unigene26753–244–510 п.н. (PIC = 0,94); Unigene17923–171–428 п.н. (PIC = 0,96); Unigene27833–96–280 п.н. (PIC = 0,94); FDSB1001–109–352 п.н. (PIC = 0,91); FDSB1033–117–234 п.н. (PIC=0,95); FDSB502–2–103–305 п.н. (PIC=0,90); FDSB502–3–108–542 п.н. (PIC=0,95); SB09–119–546 п.н. (PIC=0,93); SB04–111–376 п.н. (PIC=0,94); SB15–66–172 п.н. (PIC = 0,94). Данные праймеры рекомендуются для генотипирования селекционно-ценных образцов и гибридов сахарной свеклы.

3. На основе идентифицированных ДНК-фрагментов составлены генетические паспорта гибридов сахарной свеклы, позволяющие эффективно идентифицировать и паспортизировать их, вычислены генетические расстояния (Эвклидовы) между исследованными образцами и построена дендрограмма предполагаемых филогенетических взаимоотношений.

4. Довольно значительные генетические дистанции ($D = 9,64-11,18$) отмечены для гибрида РМС-500 практически со всеми изученными гибридными образцами. Гибрид РМС-137 также показывает довольно значительную генетическую удаленность от остальных изученных гибридных образцов ($D = 9,84-11,18$). Это свидетельствует об их генетическом отличии от других изученных генотипов сахарной свеклы.

Работа осуществлена при финансовой поддержке Министерства сельского хозяйства РФ в рамках выполнения поисковых исследований FGNU-2023–0001 «Разработка методики молекулярно-генетической идентификации и паспортизации гибридов сахарной свеклы с использованием микросателлитных маркеров».

Библиографический список

1. Клименко И.А., Козлов Н.Н., Костенко С.И., Шамустакимова А.О., Мавлютов Ю.М. Идентификация и паспортизация сортов кормовых трав (клевера лугового, люцерны изменчивой, посевной и хмелевидной) на основе ДНК-маркеров: Методические рекомендации. – М.: Угреша Т, – 2020. – 35 с.

2. Кляченко О.Л., Присяжнюк Л.М. Изучение аллельного состояния микросателлитных локусов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Живые и биокосные системы. – 2014. – № 8. – URL: <https://jbks.ru/archive/issue-8/article-5>. DOI: 10.18522/2308-9709-2014-8-5.

3. Налбандян А.А., Федулова Т.П., Хуссейн А.С., Черепухина И.В. Дифференциация сортообразцов сахарной свеклы по SSR-маркерам для создания перспективных гибридов // Российская сельскохозяйственная наука. – 2020. – № 4. – С. 18–21.

4. Сатина Т.Г., Анискина Ю.В., Карпачев В.В., Шилов И.А., Харченко П.Н. Генетический анализ однородности сортов и гибридов рапса и контроль наследования гибридами генетического материала родительских форм // Доклады РАСХН. – 2010. – № 6. – С. 15–18.

5. Федулова Т.П., Федорин Д.Н. Использование ПЦР-анализа для выявления генетического полиморфизма сортоотипов свеклы корнеплодной *Beta Vulgaris* L. // Научные ведомости. Серия «Естественные науки». – 2012. – № 3 (122). – С. 94–99.

6. Федулова Т.П., Федорин Д.Н., Налбандян А.А., Богомолов А.М. Использование ДНК-маркеров в современных программах селекции сахарной свеклы // Сахар. – 2019. – № 5. – С. 50–53.

7. Чесноков Ю.В., Артемьева А.М. Оценка меры информационного полиморфизма генетического разнообразия // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – № 50 (5). – С. 571–578.

8. 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). – С. 483–493.
9. Шилов И.А., Анискина Ю.В., Шалаева Т.В. Создание современных гибридов сахарной свеклы с применением микросателлитного анализа // Сахар. – 2020. – № 8. – С. 32–36.
10. Celik I. Genome-wide Development and Physical Mapping of SSR Markers in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) // Journal of the Institute of Science and Technology. – 2023. – Vol. 13, № 1. – Pp. 112–119.
11. Dohm J.C., Minoche A.E., Holtgrawe D., Capella-Gutierrez S., Zakrzewski F. et al. The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet (*Beta vulgaris*) // Nature. – 2014. – Vol. 505. – Pp. 546–549.
12. Fugate K., Fajardo D., Schlautman B., Ferrareze J.P., Bolton M.D., Campbell L., Wiesman E., Zalapa J. Generation and Characterization of a Sugar Beet Transcriptome and Transcript-Based SSR Markers // The Plant Genome. – 2014. – № 7 (2). – Pp. 1–13.
13. Galewski P., McGrath J.M. Genetic diversity among cultivated beets (*Beta vulgaris*) assessed via population-based whole genome sequences // BMC Genomics. – 2020. – Vol. 21. – Pp. 1–14.
14. Laurent V., Devaux P., Thiel T., Viard F., Mielordt S., Touzet P., Quillet M.C. Comparative effectiveness of sugar beet microsatellite markers isolated from genomic libraries and GenBank ESTs to map the sugar beet genome // Theoretical and Applied Genetics. – 2007. – Vol. 115, № 6. – Pp. 793–805.
15. Liuhuizi D., Zhi P., Zedong W. Construction of SSR Fingerprint and Analysis of Genetic Diversity of Sugar Beet Varieties // J. Crops. – 2021. – Vol. 37, № 5. – Pp. 72–78.
16. McGrath J.M., Trebbi D., Fenwick A., Panella L., Schulz B., Laurent V., Barnes S., Murray S.C. An open-source first-generation molecular genetic map from a sugar beet 1/2 table beet cross and its extension to physical mapping // The Plant Genome. – 2007. – Vol. 1. – Pp. 27–44.
17. Monteiro F., Frese L., Castro S., Duarte M., Paulo O., Loureiro J., Romeiras M. Genetic and Genomic Tools to Assist Sugar Beet Improvement: The Value of the Crop Wild Relatives // Front Plant Sci. – 2018. – Vol. 9, Art. 74. DOI: 10.3389/fpls.2018.00074.
18. Nadeem M., Nawaz M., Shahid M. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing // Biotechnology & Biotechnological Equipment. – 2018. – Vol. 32, № 2. – Pp. 261–285.
19. Nalbandyan A.A., Fedulova T.P., Kryukova T.I., Cherepukhina I.V., Kulikova N.V. Polymorphic Microsatellite Markers to Study Sugar Beet's (*Beta vulgaris* L.) Genetic Diversity // Russian Agricultural Sciences. – 2023. – Vol. 49. – Pp. 1–7.
20. Nei M., Roychoudhury A.K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance // Genetics. – 1974. – Vol. 76. – Pp. 379–390.
21. Richards Ch., Brownson M., Mitchell Sh., Kresovich S., Panella L. Polymorphic microsatellite markers for inferring diversity in wild and domesticated sugar beet (*Beta vulgaris*) // Molecular Ecology Notes. – 2004. – Vol. 4. – Pp. 243–245.
22. 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. – Vol. 7. – Pp. 253–266.

23. Smulders M., Esselink G., Danny G., Riek J., Vosman B. Characterisation of sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) varieties using microsatellite markers // BMC Genetics. – 2010. – Vol. 11 (41). DOI: 10.1186/1471-2156-11-41.
24. Spadoni A., Sion S., Gadaleta S., Savoia M., Piarulli L., Fanelli V., Rienzo V., Taranto F., Miazzi M., Montemurro C., Sabetta W. A Simple and Rapid Method for Genomic DNA Extraction and Microsatellite Analysis in Tree Plants // J. Agr. Sci. Tech. – 2019. – Vol. 21, № 5. – Pp. 1215–1226.
25. 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. – Vol. 38. – Pp. 777–783.
26. Taheri S., Abdullah L., Yusop M., Hanafi M., Sahebi M., Azizi P., Shamshiri R. Mining and Development of Novel SSR Markers Using Next Generation Sequencing (NGS) Data in Plants // Molecules. – 2018. – Vol. 23. – P. 399.
27. Taški-Ajdković K., Nagl N., Zorić M. Estimation of genetic diversity and relationship in sugar beet pollinators based on SSR markers // Electronic Journal of Biotechnology. – 2017. – Vol. 27. – Pp. 1–7.
28. Wang L., Zhang Z., Han P., Liang Y., Zhang H. Association analysis of agronomic traits and construction of genetic networks by resequencing of 306 sugar beet (*Beta vulgaris* L.) lines // Scientific Reports. – 2023. – Vol. 13. – Pp. 15422.

MOLECULAR GENETIC IDENTIFICATION AND CERTIFICATION OF SUGAR BEET HYBRIDS USING MICROSATELLITE MARKERS

A.A. NALBANDYAN, T.P. FEDULOVA, I.V. CHEREPUKHINA,
T.S. RUDENKO, T.N. BAGMUTOVA

(The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet of Russian Agricultural Academy)

The development of molecular genetic identification and certification of sugar beet hybrids using DNA markers is a current research direction in plant breeding. The subject of the study were plants of promising domestic sugar beet hybrids. The article presents the results of the development of the methodology of molecular genetic identification and certification of sugar beet hybrids using microsatellite markers. Seedlings of eight prospective domestic sugar beet hybrids were used as test material. Target fragments were amplified using locus-specific (microsatellite) primers (Unigene16898, Unigene17623B, Unigene26753, Unigene17923, Unigene27833, FDSB1001, FDSB1033, FDSB502–2, FDSB502–3, SB09, SB04, and SB15) labeled with fluorescent dyes (FAM, R6G, TAM-RA and ROX). The obtained amplicons were identified by the method of high-resolution capillary electrophoresis using the genetic analyzer Nanofor 05 (Synthol, Russia). The results of selection of 12 microsatellite loci suitable for genetic certification of sugar beet hybrids are presented. All primers selected for microsatellite loci of sugar beet genome are characterized by a high level of polymorphism. From the results of fragment analysis, the size of the obtained PCR amplicons in plants of the studied hybrids was determined. On the basis of the obtained molecular data, genetic formulas and passports for identification and certification of plant genotypes were prepared. Based on the calculated genetic distances, a dendrogram of genetic relationships of the studied sugar beet hybrids was constructed. The development of methods for molecular genetic identification and certification of sugar beet hybrids using DNA markers is a current research direction in plant breeding. It is of great practical importance in sugar beet breeding, seed production and state variety testing, both in the development of new hybrids and in their registration.

Keywords: sugar beet, genotyping, microsatellite analysis, genetic passports, fragment analysis.

The work was carried out with the financial support of the Ministry of Agriculture within the framework of the research FGNU-2023–0001 – Development of a Methodology for Molecular Genetic Identification and Certification of Sugar Beet Hybrids Using Microsatellite Markers.

References

1. Klimenko I.A., Kozlov N.N., Kostenko S.I., Shamustakimova A.O., Mavlyutov Yu.M. Identification and certification of forage grass varieties (meadow clover, variable alfalfa, common alfalfa and hop grass) based on DNA markers: guidelines. Moscow, Russia, 2020:35. (in Russ.)
2. Klyachenko O.L., Prisyazhnyuk L.M. Study of the allelic state of microsatellite loci of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Live and Bio-abiotic Systems*. 2014;8:5. (In Russ.) <https://doi.org/10.18522/2308-9709-2014-8-5>
3. Nalbandyan A.A., Fedulova T.P., Hussein A.S., Cherepukhina I.V. et al. Differentiation of sugar beet cultivars by SSR marker to create promising hybrids. *Rossiiskaiaselskokhoziaistvennaia nauka*. 2020;4:18–21. (In Russ.) <https://doi.org/10.31857/S2500262720040043>
4. Satina T.G., Aniskina Yu.V., Karpachev V.V., Shilov I.A., Kharchenko P.N. microsatellite analysis of rapeseed varieties and hybrids uniformity and inheritance of parental genetic material in hybrids. *Doklady RASKhN*. 2010;6:15–18. (In Russ.)
5. Fedulova T.P., Fedorin D.N. Using PCR analysis to identify genetic polymorphism of root beet varieties *Beta Vulgaris* L. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya Estestvennye nauki*. 2012;3(122):18:94–99. (In Russ.)
6. Fedulova T.P., Fedorin D.N., Nalbandyan A.A., Bogovolov M.A. DNA markers in modern sugar beet breeding programs. *Sakhar*. 2019;5:50–53. (In Russ.)
7. Chesnokov. Yu.V., Artemyeva A.M. Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. *Agricultural Biology*. 2015;50(5):571–578. (In Russ.)
8. Shalaeva T.V., Aniskina Yu.V., Kolobova O.S. et al. Investigation of the sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) microsatellite loci structure to develop a technology for genetic analysis of sugar beet lines and hybrids. *Agricultural Biology*. 2023;58(3):483–493. (In Russ.)
9. Shilov I.A., Aniskina Yu.V., Shalaeva T.V. et al. Creation of modern sugar beet hybrids using microsatellite analysis. *Sakhar*. 2020;8:32–36. (In Russ.)
10. Celik I. Genome-wide Development and Physical Mapping of SSR Markers in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of the Institute of Science and Technology*. 2023;13(1):112–119.
11. Dohm J.C., Minoche A.E., Holtgrawe D., Capella-Gutierrez S., Zakrzewski F. et al. The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet (*Beta vulgaris*). *Nature*. 2014;505:546–549.
12. Fugate K., Fajardo D., Schlautman B., Ferrareze J.P. et al. Generation and Characterization of a Sugar Beet Transcriptome and Transcript-Based SSR Markers. *The Plant Genome*. 2014;7(2):1–13.
13. Galewski P., McGrath J.M. Genetic diversity among cultivated beets (*Beta vulgaris*) assessed via population-based whole genome sequences. *BMC Genomics*. 2020;21:1–14.
14. Laurent V., Devaux P., Thiel T., Viard F. et al. Comparative effectiveness of sugar beet microsatellite markers isolated from genomic libraries and GenBank ESTs to map the sugar beet genome. *Theoretical and Applied Genetics*. 2007;115(6):793–805.

15. Liuhuizi D., Zhi P., Zedong W. Construction of SSR Fingerprint and Analysis of Genetic Diversity of Sugar Beet Varieties. *J. Crops*. 2021;37(5):72–78.
16. McGrath J.M., Trebbi D., Fenwick A., Panella L. et al. An open-source first-generation molecular genetic map from a sugar beet ½ table beet cross and its extension to physical mapping. *The Plant Genome*. 2007;1:27–44.
17. Monteiro F., Frese L., Castro S., Duarte M. et al. Genetic and Genomic Tools to Assist Sugar Beet Improvement: The Value of the Crop Wild Relatives. *Front. Plant Sci.* 2018;9(74).
18. Nadeem M., Nawaz M., Shahid M. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & biotechnological equipment*. 2018;32(2):261–285.
19. Nalbandyan A.A., Cherepukhina I.V., Kulikova N.V. Polymorphic Microsatellite Markers to Study Sugar Beet's (*Beta vulgaris* L.) Genetic Diversity. *Russian Agricultural Sciences*. 2023;49:1–7.
20. Nei M., Roychoudhury A.K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*. 1974;76:379–390.
21. Richards Ch., Brownson M., Mitchell Sh., Kresovich S., Panella L. Polymorphic microsatellite markers for inferring diversity in wild and domesticated sugar beet (*Beta vulgaris*). *Molecular Ecology Notes*. 2004;4:243–245.
22. Sandhu Surinder K., Sarao Navraj K., Meenakhsi G., Uppal S. et al. 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;7:253–266.
23. Smulders M., Esselink G., Danny G., Riek J., Vosman B. Characterisation of sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) varieties using microsatellite markers. *BMC Genetics*. 2010;11(41).
24. Spadoni A., Sion S., Gadaleta S., Savoia M. et al. A Simple and Rapid Method for Genomic DNA Extraction and Microsatellite Analysis in Tree Plants. *J. Agr. Sci. Tech*. 2019;21(5):1215–1226.
25. 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;38:777–783.
26. Taheri S., Abdullah L., Yusop M., Hanafi M. et al. Mining and Development of Novel SSR Markers Using Next Generation Sequencing (NGS) Data in Plants. *Molecules*. 2018;23:399.
27. Taški-Ajduković K., Nagl N., Zorić M. Estimation of genetic diversity and relationship in sugar beet pollinators based on SSR markers. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2017;27:1–7.
28. Wang L., Zhang Z., Han P., Liang Y., Zhang H. Association analysis of agronomic traits and construction of genetic networks by resequencing of 306 sugar beet (*Beta vulgaris* L.) lines. *Scientific Reports*. 2023;13:15422.

Сведения об авторах

Налбандян Арпине Артаваздовна, канд. биол. наук, заведующий лабораторией маркер-ориентированной селекции, Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова; 396030, Российская Федерация, Воронежская область, Рамонский район, п. ВНИИСС, 86; e-mail: arpnal@rambler.ru; тел.: (951) 871–27–60

Федулова Татьяна Петровна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории маркер-ориентированной селекции, Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова; 396030, Российская Федерация, Воронежская область, Рамонский район, п. ВНИИСС, д. 86; e-mail: biotechnologiya@mail.ru; тел.: (473) 405–33–27

Черепухина Ирина Вячеславовна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории маркер-ориентированной селекции, Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова; 396030, Российская Федерация, Воронежская область, Рамонский район, п. ВНИИСС, 86; e-mail: irenius@list.ru; тел.: (473) 405–33–27

Руденко Татьяна Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории маркер-ориентированной селекции, Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова; 396030, Российская Федерация, Воронежская область, Рамонский район, п. ВНИИСС, 86; e-mail: ipigun6292@gmail.com; тел.: (473) 405–33–27

Багмутова Татьяна Николаевна, младший научный сотрудник лаборатории маркер-ориентированной селекции, Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова; 396030, Российская Федерация, Воронежская область, Рамонский район, п. ВНИИСС, 86; e-mail: berdnikowa.tat2012@yandex.ru; тел.: (473) 405–33–27

Information about the authors

Arpine A. Nalbandyan, CSc (Bio), Head of the Laboratory of Marker Assisted Selection, The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet of Russian Agricultural Academy (86, VNIISS village, Ramonsky district, Voronezh region, 396030, Russia; phone: (951) 871–27–60; e-mail: arpna@rambler.ru)

Tatyana P. Fedulova, DSc (Bio), Leading Research Associate at the Laboratory of Marker Assisted Selection, The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet of Russian Agricultural Academy (86, VNIISS village, Ramonsky district, Voronezh region, 396030, Russia; phone: +7 (47340) 5–33–27; e-mail: biotechnologiya@mail.ru)

Irina V. Cherepukhina, CSc (Bio), Senior Research Associate at the Laboratory of Marker Assisted Selection, The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet of Russian Agricultural Academy (86, VNIISS village, Ramonsky district, Voronezh region, 396030, Russia; phone: +7 (47340) 5–33–27; e-mail: irenius@list.ru)

Tatyana S. Rudenko, Junior Research Associate at the Laboratory of Marker Assisted Selection, The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet of Russian Agricultural Academy (86, VNIISS village, Ramonsky district, Voronezh region, 396030, Russia; phone: +7 (47340) 5–33–27; e-mail: ipigun6292@gmail.com)

Tatyana N. Bagmutova, Junior Research Associate at the Laboratory of Marker Assisted Selection, The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet of Russian Agricultural Academy (86, VNIISS village, Ramonsky district, Voronezh region, 396030, Russia; phone: +7 (47340) 5–33–27; e-mail: berdnikowa.tat2012@yandex.ru)