

**С. А. Рамазанова,**  
научный сотрудник

**С. З. Гучегль,**  
кандидат биологических наук

**Т. А. Челюстникова,**  
старший научный сотрудник

**Т. С. Антонова,**  
доктор биологических наук

ГНУ ВНИИ масличных культур

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ СОРТОВ СОИ РОССИЙСКОЙ СЕЛЕКЦИИ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ (SSR) ЛОКУСОВ ДНК

УДК 633.853.52:631.522

**Введение.** В настоящее время для маркирования генома сельскохозяйственных культур разработаны и широко применяются различные типы молекулярных маркеров. Они позволяют провести идентификацию и регистрацию генотипов, определить степень генетической чистоты линий и уровень гибридности партий семян, выявить филогенетические отношения между видами [1].

Наиболее перспективными молекулярными маркерами являются полиморфные фрагменты ДНК и, в частности, её микросателлитные повторы. С их помощью уже идентифицированы и паспортизированы разные сельскохозяйственные культуры. По данным многих авторов, высокий уровень полиморфизма у сои удалось выявить только по микросателлитным локусам [3, 4].

Работа по исследованию полиморфизма микросателлитных последовательностей ДНК у сортов сои селекции ВНИИМК ранее не проводилась. До настоящего времени сорта идентифицируют только по морфологическим признакам.

Целью наших исследований было выявить полиморфные SSR-локусы ДНК у сортов сои селекции ВНИИМК. И на их основе создать систему микросателлитных маркеров для дифференциации и паспортизации сортов сои отечественной селекции.

**Материалы и методы.** В работе использованы 34 генотипа сои (*G. max*), из них 27 сортов и форм сои селекции ВНИИМК и 7 сортов других российских селекционных центров. Растения сои выращивали в поле или камере искусственного климата.

Для выделения ДНК использовали небольшие фрагменты зеленых листьев с 5-10 растений. Выделение проводили по модифицированному методу Sanghai-Marooof [5]. Концентрацию ДНК в полученном препарате определяли по интенсивности свечения пробы объемом 10 мкл в ультрафиолетовом свете в 1 % агарозном геле с содержанием бромистого этидия.

Полимеразную цепную реакцию в объеме реакционной смеси 25 мкл, содержащей: 67 мМ трис-НСl, рН 8,8; 16,6 мМ сульфата аммония; 1,5-3 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,01 % Tween 20; по 0,2 мМ дезоксирибонуклеозидфосфатов; по 10 пМ праймеров; 10 нг матричной ДНК и 1 единицу рекомбинантной термостабильной ДНК полимеразы (Москва, ГОСНИИГЕНЕТИКА). Амплификацию осуществляли в приборе «Терцик» (ДНК-технология, Россия) при следующих температурных режимах: начальная денатурация при 96 °С в течение 2 мин, затем 32 цикла при температурно-временном режиме: денатурация при 94 °С – 30 сек, отжиг праймера при 45-60 °С в зависимости от праймера – 40 сек, элонгация при 70 °С – 1 мин, заключительный цикл, финальная элонгация при 70 °С – 2 мин.

Электрофорез продуктов амплификации проводили в агарозном геле (2 % агароза, 1х ТАЕ-буфер) с использованием камеры для горизонтального электрофореза (SE.1, ДНК-технология, Россия) в течение 1,5-2 часов при силе тока 50 мА и напряжении 90-100 В. Документирование результатов электрофореза обеспечивалось при помощи трансиллюминатора и видеосистемы (ДНК-технология, Россия) с программным обеспечением Gel Imager-2.

Для каждого локуса был вычислен индекс полиморфного информационного содержания (PIC) и эффективное число аллелей [1,6]. Вычисления проводили по формулам:

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ji}^2 \quad (1),$$

где P – частота j паттерна для локуса i и суммирование распространяется на n паттернов.

$$n_e = 1 / \sum_{j=1}^n P_{ji}^2 \quad (2),$$

где n<sub>e</sub> – эффективное число аллелей.

**Результаты и обсуждение.** Для исследования были выбраны 9 пар праймеров, фланкирующих микросателлитные повторы ДНК. Их нуклеотидные последовательности приведены в работах зарубежных авторов [3, 4].

Результаты амплификации ДНК 34 исследуемых образцов сои показали, что из 9 изученных SSR-локусов 8 явились полиаллельными, а один – *Soygy2* – оказался мономорфным. Всего было выявлено 26 аллелей. Число аллелей на locus варьировало от 1 до 5. Среднее число аллелей на locus составило 2,9. Среднее эффективное число аллелей на locus составило 2,26 (табл. 1).

*Таблица 1 – Характеристика исследованных микросателлитных локусов*

Локус	Повтор	Молекулярный вес (п.н)	Количество аллелей	Эффективное число аллелей	PIC*
Satt1	(att) <sub>24</sub>	141-150	4	3,13	0,68
Satt 2	(aat) <sub>18</sub>	140-152	2	1,49	0,33
Satt5	(taa) <sub>21</sub>	157-177	4	2,87	0,65
Satt9	(aat) <sub>12</sub>	142-221	5	4,18	0,76
Soypr 1	(tat) <sub>20</sub>	163-188	2	2,08	0,52
Soygy 2	(at) <sub>9</sub> (att) <sub>6</sub>	167-175	1	-	0
Sat 1	(at) <sub>17</sub>	188-235	4	2,93	0,66
Sat 36	(at) <sub>19</sub>	115-185	2	1,06	0,06
Soyhsp176	(at) <sub>15</sub>	118-135	2	1,56	0,36
Среднее	-	-	2,9	2,26	0,57

- PIC – индекс полиморфного информационного содержания

Важным показателем информативности микросателлитных локусов является индекс полиморфного информационного содержания (PIC). Это показатель, характеризующий дискриминационную силу локуса не только по количеству выявленных аллелей, но и по относительным частотам их встречаемости. PIC приближается к единице, если locus имеет много аллелей с приблизительно равной частотой встречаемости, и равен 0, если locus мономорфный [1].

Для изученных нами локусов PIC варьировал от 0 для *Soygy2* до 0,76 для *Satt9* (см. табл. 1). По locus *Soygy2* в этой выборке сортов не обнаружено полиморфных аллелей, поэтому PIC равен нулю. Очень низкий индекс (0,06) у локуса *Sat36* обусловлен тем, что только сорт *Фора* отличается от остальных (табл. 2). У локусов *Satt 2* и *Soyhsp176* PIC не очень высокий – 0,33 и 0,36 соответственно, но все же достаточный для использования их в целях идентификации и паспортизации сортов российской селекции. Остальные 5 локусов *Satt1*, *Satt5*, *Satt9*, *Soypr 1*, *Sat 1* имеют PIC более 0,5, что говорит о целесообразности их использования для дифференциации изученной группы генотипов.

Среднее значение индекса полиморфности для использованной в данном исследовании маркерной системы равно 0,57. Это выше, чем в аналогичных исследованиях, выполненных, например, одесскими учеными на кукурузе. В их исследованиях среднее

значение индекса полиморфности маркерной системы варьировало от 0,53 до 0,56 в разных группах генотипов. При этом с помощью такой системы ими были дифференцированы 80 линий и гибридов кукурузы из разных областей Украины [2]. Для микросателлитных локусов ДНК сои подобные данные в литературе не приводятся.

В таблице 2 показаны результаты ПЦР-анализа сортов и форм сои селекции ВНИИМК и других российских селекционных центров. Аллели SSR-локусов были представлены на фореграммах фрагментами ДНК разного молекулярного веса (длины пар нуклеотидов). Нумерацию аллелей по каждому locus проводили следующим образом: фрагмент ДНК с максимальным значением молекулярного веса обозначали цифрой 1 и далее по мере уменьшения молекулярного веса цифрами 2, 3, 4 и 5. Ранее аллели обозначались нами строчными буквами латинского алфавита [7]. У сортов сои *Вилана* (ВНИИМК), *Лада* (ВНИИМК), *СП 1422-1461* (ВНИИМК), *Приморская* (Благовещенск) было обнаружено по 2 фракции ДНК разного размера. В таблице 2 они обозначены двумя цифрами через запятую.

Для каждого генотипа сои получен определенный набор аллелей микросателлитных локусов, на основании которого были составлены молекулярно-генетические паспорта этих генотипов или так называемые «генетические формулы генотипов». Большими буквами латинского алфавита обозначен код локуса, а цифрой – его аллельное состояние (табл. 3).

Несмотря на достаточный дискриминационный потенциал изученной системы, нам не удалось различить два генотипа селекции ВНИИМК – *Вилана RP* и *Ника*. Для них были получены идентичные наборы аллелей, представленные формулой  $A_2B_2C_2D_1E_2G_1H_2I_3$ . *Вилана RP* – это реплоид (форма с возвратной кратно пониженной плоидностью), полученный из сорта *Вилана*. Начиная с поколения  $C_2$ , среди тетраплоидов обнаруживаются диплоидные формы, из которых одни не отличаются от исходного сорта, а другие имеют разные отличия по морфологическим, биохимическим и другим признакам. Это является следствием структурных изменений хромосом, возникших при их мультивалентной конъюгации и неравном кроссинговере [8]. Сорт *Ника* и исходный для реплоида сорт *Вилана* отличаются друг от друга по трем микросателлитным locusам и происходят от скрещивания разных генотипов. Вероятно, полученные идентичные наборы аллелей генотипов *Вилана RP* и *Ника* свидетельствуют не об их общем происхождении, а о приобретенном сходстве в ходе мутационных событий. При увеличении количества анализируемых микросателлитных локусов, возможно, будут обнаружены различия между ними.

Для остальных 32 образцов сои получены уникальные наборы аллелей. Сорта отличаются между собой по одному и более locusам. К примеру, сорта *Лань* и *Лакта*, *Валента*, *Рента* и *РВБ* отличаются

Таблица 2 – Полиморфизм микросателлитных локусов ДНК сортов и других генотипов сои селекции ВНИИМК

Сорт	Локусы							
	Satt1	Satt2	Satt5	Satt9	Soypr1	Sat1	Sat36	Soyhsp176
Лань	2	2	2	1	1	1	2	3
Ли́ра	1	1	1	3	2	1	2	2
Фора	2	1	2	2	1	4	1	3
Валента	3	2	2	4	1	2	2	3
Дельта	3	2	2	5	1	1	2	3
Парма	3	1	1	4	2	2	2	2
Рента	3	2	2	2	1	2	2	3
РВБ	3	2	2	3	1	2	2	3
РВФ	2	2	2	3	1	2	2	3
Веста	2	1	3	3	1	1	2	3
Вилана	3,4	2	2	1	1	2	2	3
Вилана тетраплоид*	1	2	4	5	1	2	2	3
Вилана RP*	2	2	2	1	2	1	2	3
Лакта	2	2	2	2	1	1	2	3
Ника	2	2	2	1	2	1	2	3
Дива	2	2	1	5	1	1	2	3
Диана	2	1	2	2	2	2	2	3
Памела	3	1	2	3	1	4	2	3
Д-6	1	2	1	3	2	1	2	2
Д-4	1	2	1	3	2	2	2	2
Альба	2	2	2	3	2	4	2	3
Трембита	3	2	4	3	2	3	2	2
Лиана	3	2	4	2	2	2	2	2
Лада	3	2	3,2	4	2	2	2	2
Б-2	2	2	3	1	1	1	2	3
СП-1422-1461*	2	2	2	2,4	1	4	2	3
Дуар (ВНИИМК, Армавир)	4	2	3	1	1	2	2	3
Селекта 301 (Краснодар)	4	2	2	1	1	1	2	3
Кубанская 4958 (КОС ВИР)	4	2	3	5	1	4	2	2
Ланцетная (Орел)	2	2	1	2	2	2	2	3
К-10641 (ВИР)	3	2	1	4	2	3	2	3
Куба (КОС ВИР)	2	2	3	1	2	1	2	3
Сибниисхоз 6 (Омск)	1	2	3	1	2	1	2	3
Приморская 56 (Приморский край)	1	1	4	3,5	1	2	2	3

\* Тетраплоидная и реплоидные формы

Таблица 3 – Формулы сортов сои

Сорт	Формула*	Сорт	Формула
Лань	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>1</sub> E <sub>1</sub> G <sub>1</sub> H <sub>2</sub> I <sub>3</sub>	Памела	A <sub>3</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub> D <sub>3</sub> E <sub>1</sub> G <sub>4</sub> H <sub>2</sub> I <sub>3</sub>
Ли́ра	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> D <sub>3</sub> E <sub>2</sub> G <sub>1</sub> H <sub>2</sub> I <sub>2</sub>	Д-6	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub> D <sub>3</sub> E <sub>2</sub> G <sub>1</sub> H <sub>2</sub> I <sub>2</sub>
Фора	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>2</sub> E <sub>1</sub> G <sub>4</sub> H <sub>1</sub> I <sub>3</sub>	Д-4	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub> D <sub>3</sub> E <sub>2</sub> G <sub>2</sub> H <sub>2</sub> I <sub>2</sub>
Валента	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>4</sub> E <sub>1</sub> G <sub>2</sub> H <sub>2</sub> I <sub>3</sub>	Альба	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>3</sub> E <sub>2</sub> G <sub>4</sub> H <sub>2</sub> I <sub>3</sub>
Дельта	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>5</sub> E <sub>1</sub> G <sub>1</sub> H <sub>2</sub> I <sub>3</sub>	Трембита	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>4</sub> D <sub>3</sub> E <sub>2</sub> G <sub>3</sub> H <sub>2</sub> I <sub>2</sub>
Парма	A <sub>3</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> D <sub>2</sub> E <sub>2</sub> G <sub>2</sub> H <sub>2</sub> I <sub>2</sub>	Лиана	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>4</sub> D <sub>2</sub> E <sub>2</sub> G <sub>2</sub> H <sub>2</sub> I <sub>2</sub>
Рента	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>2</sub> E <sub>1</sub> G <sub>2</sub> H <sub>2</sub> I <sub>3</sub>	Лада	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub> C <sub>2</sub> D <sub>4</sub> E <sub>2</sub> G <sub>2</sub> H <sub>2</sub> I <sub>2</sub>
РВБ	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>3</sub> E <sub>1</sub> G <sub>2</sub> H <sub>2</sub> I <sub>3</sub>	Б-2	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub> D <sub>1</sub> E <sub>1</sub> G <sub>1</sub> H <sub>2</sub> I <sub>3</sub>
РВФ	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>2</sub> E <sub>1</sub> G <sub>2</sub> H <sub>2</sub> I <sub>3</sub>	СП-1422-1461	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>2</sub> D <sub>4</sub> E <sub>1</sub> G <sub>4</sub> H <sub>2</sub> I <sub>3</sub>
Веста	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>3</sub> D <sub>3</sub> E <sub>1</sub> G <sub>1</sub> H <sub>2</sub> I <sub>3</sub>	Селекта	A <sub>4</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>1</sub> E <sub>1</sub> G <sub>1</sub> H <sub>2</sub> I <sub>3</sub>
Вилана	A <sub>3</sub> A <sub>4</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>1</sub> E <sub>1</sub> G <sub>2</sub> H <sub>2</sub> I <sub>3</sub>	Дуар (ВНИИМК, Армавир)	A <sub>4</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub> D <sub>1</sub> E <sub>1</sub> G <sub>2</sub> H <sub>2</sub> I <sub>3</sub>
Вилана (тетраплоид)	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>4</sub> D <sub>5</sub> E <sub>1</sub> G <sub>2</sub> H <sub>2</sub> I <sub>3</sub>	Кубанская (ВНИИМК, Армавир)	A <sub>4</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub> D <sub>3</sub> E <sub>1</sub> G <sub>4</sub> H <sub>2</sub> I <sub>2</sub>
Вилана RP (реплоид)	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>1</sub> E <sub>2</sub> G <sub>1</sub> H <sub>2</sub> I <sub>3</sub>	Ланцетная (Орел)	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub> D <sub>2</sub> E <sub>2</sub> G <sub>2</sub> H <sub>2</sub> I <sub>3</sub>
Лакта	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>2</sub> E <sub>1</sub> G <sub>1</sub> H <sub>2</sub> I <sub>3</sub>	К-10641 (ВИР)	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub> D <sub>2</sub> E <sub>2</sub> G <sub>3</sub> H <sub>2</sub> I <sub>3</sub>
Ника	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>1</sub> E <sub>2</sub> G <sub>1</sub> H <sub>2</sub> I <sub>3</sub>	Куба (ВИР)	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub> D <sub>1</sub> E <sub>2</sub> G <sub>1</sub> H <sub>2</sub> I <sub>3</sub>
Дива	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub> D <sub>3</sub> E <sub>1</sub> G <sub>1</sub> H <sub>2</sub> I <sub>3</sub>	Сибниисхоз 6 (Омск)	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub> D <sub>1</sub> E <sub>2</sub> G <sub>1</sub> H <sub>2</sub> I <sub>3</sub>
Диана	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub> D <sub>2</sub> E <sub>3</sub> G <sub>2</sub> H <sub>2</sub> I <sub>3</sub>	Приморская 56 (Благовещенск)	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>4</sub> D <sub>3</sub> D <sub>5</sub> E <sub>1</sub> G <sub>2</sub> H <sub>2</sub> I <sub>3</sub>

\* код локуса A-Satt1; B-Satt2; C-Satt5; D-Satt9; E-Soypr1; G-Sat1; H-Sat36; I-Soyhsp176.

друг от друга по одному локусу Satt9. У остальных сортов есть отличия по 2 и более локусам. Линии Д-6 и Д-4, являются сестринскими и поэтому очень похожи, но все же их можно различить по локусу Satt1 (см. табл.2).

Если сравнивать сорта селекции ВНИИМК и других российских селекционеров, то только два сорта Куба (ВИР) и Б-2 (ВНИИМК) различаются минимум

по двум локусам Soypr1 и Satt1. У остальных обнаружены различия по большему количеству локусов.

Таким образом, в результате проведенных исследований для дифференциации сортов сои отечественной селекции предложена маркерная система из 8 микросателлитных локусов ДНК. На ее основе составлены формулы сортов, созданных в разных селекционных центрах.

Показана идентичность двух генотипов – сорта сои Ника селекции ВНИИМК и реплоидной формы Вилана RP – по профилям ДНК. Предложенные формулы рекомендуем использовать при паспортизации и регистрации сортов сои в Российской Федерации.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края, грант № 06-04-96757 и № 08-04-99058-р\_ОФИ.

### Литература

1. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях // Научно-методическое руководство / Под. ред. Сиволапа Ю. М. – Киев: Аграрна наука, 1998. – 156 с.
2. Кожухова Н. Э. Идентификация и регистрация генотипов кукурузы при помощи молекулярных маркеров / Н. Э. Кожухова, Ю. М. Сиволап // Генетика. – 2004. – Т. 40. – № 1. – С. 59-66.
3. Maughan P. Microsatellite and amplified sequence length polymorphism in cultivated and wild soybean / P. Maughan, M. Saghai-Marooof, G. Buss // Genome. – 1995. – Vol. 38. – P. 715-723
4. Rongven J. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification / J. Rongven, M. Ak-kaya, A. Bhagwat et al. // Theor. Appl. Genet. – 1995. – Vol. 90. – P. 43-48.
5. Saghai-Marooof M. A. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics / M. A. Saghai-Marooof, K. M. Soliman, R. A. Jorgensen, R. W. Allard // PNAS USA. – 1984. – 81. – P. 8014-8018.
6. Pejic I. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs / I. Pejic, P. Ajmorne-Marsan, M. Morgante et al. // Theor. Appl. Genet. – 1998. – Vol.97. – P.1248-1255.
7. Рамазанова С. А. Использование анализа микросателлитных последовательностей ДНК в решении проблем селекции сортов сои / С. А. Рамазанова, С. З. Гучетль, Т. А. Челюстникова // Сборник материалов 4-й междунар. конф. молодых ученых и специалистов, ВНИИМК. – Краснодар, 2007. – С. 233-242.
8. Зеленцов С. В. Использование полиплоидной рекомбинации генома в увеличении полиморфизма у сои / С. В. Зеленцов // Доклады РАСХН. – 2002. – № 3. – С. 3-5.