



УДК 633.853.52:631.522
DOI 10.25230/conf11-2021-97-101

ИДЕНТИФИКАЦИЯ СОРТОВ СОИ СЕЛЕКЦИИ ВНИИМК МЕТОДОМ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА

Савиченко В.Г., Рамазанова С.А.
ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК
psld.leta@mail.ru, ramazanov1969@mail.ru

Идентификация селекционного материала и паспортизация сортов имеет большое значение для защиты авторских прав селекционеров. Для этих целей эффективно используются микросателлитные локусы ДНК. Целью исследования являлась идентификация сортов сои селекции ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК с помощью ранее апробированных 12 микросателлитных маркеров. В результате исследований для восьми сортов были получены уникальные наборы аллелей, два сорта имели идентичные аллели. Все генотипы сои были распределены в два крупных кластера. Наиболее близкое генетическое родство наблюдалось между сортами Дуар и Кора (АОС ВНИИМК). Полученные наборы аллелей могут быть использованы для создания молекулярно-генетических паспортов.

Ключевые слова: соя, *Glycine max* (L.) Merr., SSR, микросателлиты, ДНК, идентификация, паспортизация, генетическое разнообразие.

Введение. Соя как богатый источник белка (35–45 %), масла (17–27 %), а также других полезных компонентов (витамины группы В, фосфолипиды, макро- и микроэлементы, токоферолы, фитоэстрогены) представляет собой перспективную сельскохозяйственную культуру. В связи с возможностью многоцелевого использования сои ареал ее возделывания постоянно увеличивается, создаются сорта, адаптированные к новым регионам возделывания [1].

Согласно регламенту, утвержденному Госсорткомиссией РФ по испытанию и охране селекционных достижений, сорта растений, заявленные на выдачу патента, должны обладать отличимостью, однородностью и стабильностью (критерий ООС), поэтому генетическая паспортизация имеет большое значение при создании новых сортов, сертификации и их коммерческом распространении [2].

В настоящее время оценка генетического разнообразия сортов сельскохозяйственных культур и идентификация селекционного материала эффективно проводится с использованием молекулярно-генетических маркеров. Одним из наиболее распространенных и широко используемых для этих целей классов ДНК-маркеров являются микросателлитные последовательности ДНК или SSR-маркеры (Simple Sequence Repeat). Они представляют собой простые повторяющиеся фрагменты ДНК, которые присутствуют и равномерно распределены в геномах всех высших организмов, имеют преимущественно кодоминантный характер наследования, высокий уровень полиморфизма, относительную простоту детекции и высокую воспроизводимость результатов анализа. Полиморфизм микросателлитов был изучен у подсолнечника, ячменя, пшеницы, картофеля, риса и многих других культур, в том числе и сои [3–8].

Целью настоящего исследования являлась идентификация сортов сои селекции ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК с помощью микросателлитных маркеров, апробированных в предыдущих исследованиях.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили 10 сортов сои (*Glycine max* (L.)): Триада, Саяна (ЦЭБ ВНИИМК), Зара, Дуниза, Парус, Кора, Восточка, Дуар (АОС ВНИИМК), Дончанка, Донская 9 (ДОС ВНИИМК).



Экстракцию ДНК осуществляли по модифицированной методике с использованием СТАВ-буфера из 7-дневных проростков или из зародышей семян сои [9]. Концентрацию ДНК определяли по интенсивности ее окрашивания бромистым этидием в 1 % агарозном геле.

Для полимеразной цепной реакции были выбраны 12 пар микросателлитных праймеров, апробированных в предыдущих исследованиях для паспортизации сортов сои Satt1, Satt2, Satt5, Satt9, Soypr1, Soysc514, Sat36, Soyhsp176, Satt681, Satt141, Sat263 и Satt181 [10].

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в объеме реакционной смеси 25 мкл, содержащей: 67 мМ трис-НСl, pH 8,8; 16,6 мМ сульфата аммония; 1,5–3,0 мМ MgCl₂; 0,01 % Tween 20; по 0,2 мМ каждого dNTP; по 10 пМ праймеров; 10 нг матричной ДНК и 1 единицу Taq-полимеразы (НПО «СибЭнзим», Россия). Амплификацию проводили в термоциклере MiniAmp Plus (Thermo Fisher) при следующих температурных режимах: начальная денатурация при 96 °С в течение 2 мин, затем 30-34 цикла при температурно-временном режиме: денатурация при 94 °С – 30 сек, отжиг при 45-60 °С – 40 сек, элонгация при 70 °С – 1 мин, финальная элонгация при 70 °С – 2 мин. Количество циклов и температура отжига зависели от используемых праймеров. Электрофорез продуктов амплификации проводили в полиакриламидном геле (8 % ПААГ, 1×ТВЕ буфер) в течение 3 ч при силе тока 38-45 мА, 230 V. Документирование результатов электрофореза обеспечивалось при помощи системы цифровой документации видеоизображения BIO-PRINT (Vilber Lourmat, Франция).

Для каждого локуса были определены индекс полиморфного информационного содержания (PIC), индекс генетического разнообразия Нея (H) и эффективное число аллелей (n_e). Вычисления проводили с помощью компьютерного программного обеспечения Gene-Calc [11].

Идентификацию и определение размеров аллелей микросателлитных локусов проводили с использованием программы Bio-Capture (Vilber Lourmat, Франция). Кластерный анализ проводили в программе Statistica 6 (StatSoft, США).

Результаты и обсуждение. В ходе генотипирования с использованием ПЦР были получены электрофоретические профили для каждого сорта по всем изученным микросателлитным маркерам. Для примера на рисунке 1 приведена электрофореграмма по SSR-маркеру Satt1.

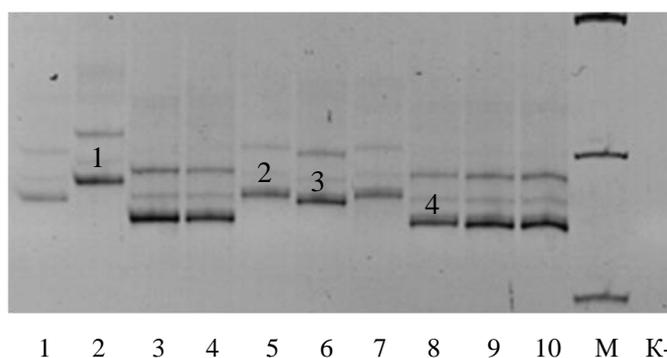


Рисунок 1 – Фореграмма продуктов амплификации ДНК генотипов сои с праймером Satt1: дорожки 1 – Дуниза, 2 – Парус, 3 – Зара, 4 – Восточка, 5 – Донская 9, 6 – Саяна, 7 – Триада, 8 – Дончанка, 9 – Дуар, 10 – Кора, М – маркер молекулярного веса, К – отрицательный контроль

Для 12 изученных SSR локусов всего был выявлен 31 аллель. Количество аллелей варьировало от 1 у локуса Sat263 до 4 у локусов Satt1 и Satt5, что в среднем составило 2,6 аллеля на локус. При этом эффективное число аллелей для изученных генотипов сои варьировало от 1 до 2,57 со средним значением 1,69 (табл. 1).



Таблица 1. Характеристики изученных микросателлитных локусов ДНК сои

Локус	Количество аллелей	Эффективное число аллелей, n_e	Индекс полиморфного информационного содержания, PIC	Индекс генетического разнообразия Нея, H
Satt1	4	2,57	0,61	0,66
Satt2	2	1,37	0,27	0,32
Satt5	4	2,37	0,58	0,64
Satt9	3	1,70	0,41	0,46
Soypr1	2	1,57	0,37	0,48
Soysc514	3	2,15	0,54	0,61
Sat36	2	1,50	0,33	0,42
Soyhsp176	2	1,20	0,16	0,18
Satt681	2	1,20	0,16	0,18
Satt141	3	1,70	0,41	0,46
Sat263	1	1,00	0,00	0,00
Satt 181	3	1,97	0,49	0,58
Среднее	2,6	1,69	0,36	0,42

Индекс полиморфного информационного содержания (PIC), характеризующий информативность микросателлитных локусов, в изученной группе генотипов сои варьировал от 0 до 0,61 со средним значением PIC 0,36. Наибольшее значение PIC было получено по локусу Satt1 – 0,61, при этом значение индекса генетического разнообразия Нея (H) в этом локусе составило 0,66. По данному локусу показал самый высокий уровень полиморфизма в нашем исследовании. Кроме того, к наиболее полиморфным микросателлитным локусам можно отнести локусы Satt5 (PIC 0,58; H 0,64) и Soysc514 (PIC 0,54; H 0,61). По локусу Sat263 в этой группе сортов сои полиморфизма обнаружено не было (PIC 0, H 0).

Для всех изученных генотипов сои по 12 микросателлитным локусам были получены наборы аллелей. Выявленные аллели каждого локуса обозначали цифрами от 1 до 4 – их нумерацию осуществляли следующим образом: фрагмент ДНК с максимальным значением молекулярного веса обозначали цифрой 1 и далее по мере уменьшения молекулярного веса цифрами 2, 3 и 4 (рис. 1; табл. 2).

Таблица 2. Полиморфизм микросателлитных локусов ДНК сортов сои

Генотип	Локус											
	Satt 1	Satt 2	Satt 5	Satt 9	Soypr 1	Soysc 514	Sat 36	Soyhsp 176	Satt 681	Satt 141	Sat 263	Satt 181
Триада	2	3	3	1	2	2	3	3	2	1	1	2
Саяна	3	2	2	2	2	3	3	2	3	1	1	1
Зара	4	2	4	1	1	2	3	3	3	1	1	3
Дуниза	3	3	3	1	2	1,3	3	3	3	1	1	1
Парус	1	2	1	2	2	2	1	3	3	2	1	3
Дончанка	4	2	3	1	2	2	3	3	3	3	1	3
Донская 9	2	2	3	3	2	2	3	3	3	3	1	3
Дуар	4	2	3,4	1	1	1,3	1	3	3	1	1	1
Кора	4	2	4	1	1	3	1	3	3	1	1	1
Весточка	4	2	4	1	1	2	3	3	3	1	1	3

Для восьми изучаемых сортов получены уникальные наборы аллелей. Различия наблюдались по 2 и более локусам. Так сорт Дуар отличается от сорта Кора по локусам Satt5 и Soysc514, а сорта Триада и Саяна имеют различия по 8 из 12 микросателлитных локусов. Однако для двух сортов селекции АОС ВНИИМК Зара и Весточка по данному набору праймеров были получены идентичные наборы аллелей. Сорт сои Зара выведен методом индивидуального отбора из гибридной популяции (Армавирская15×Кировоградская)×(Vabah



×Волна), а сорт Весточка – из гибридной популяции (Вилана×Волна)×(Комсомолка×Висон). Как видно из гибридных комбинаций сорта Зара и Весточка имеют общего родителя, также они сходны морфологически, что может объяснить полученные в нашем исследовании идентичные аллели. Для идентификации этих сортов необходимо провести поиск новых полиморфных SSR-локусов ДНК.

На основании полученных данных об аллельном состоянии была проведена оценка степени генетического родства изученных сортов сои. Для этого был проведен кластерный анализ (метод Варда). Полученная дендрограмма представлена на рисунке 2.

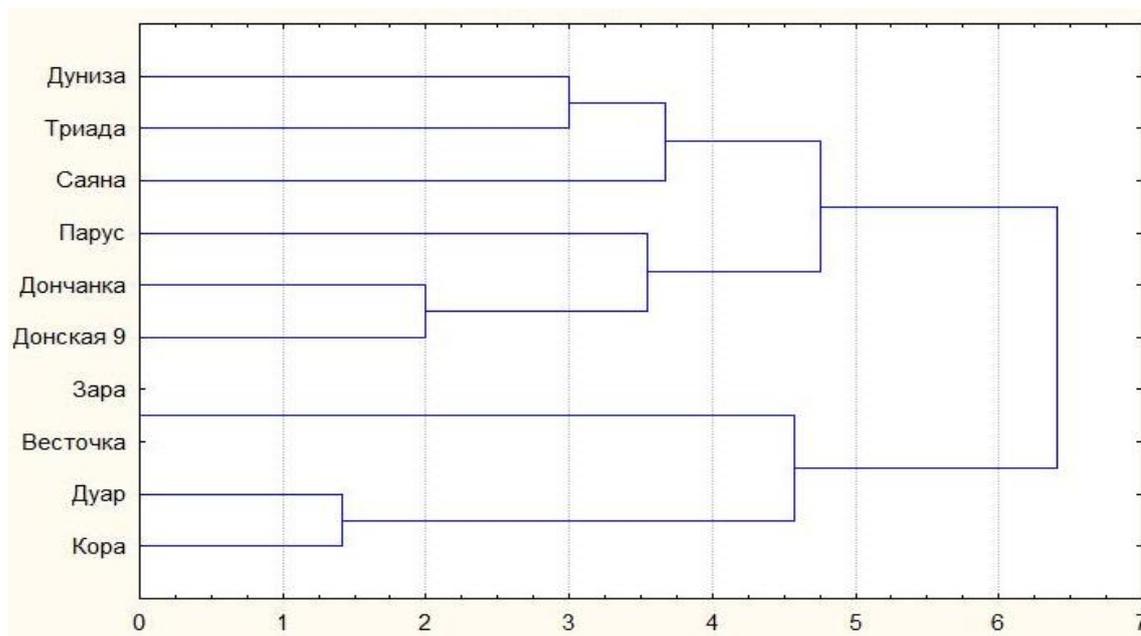


Рисунок 2 – Дендрограмма генетического сходства 10 генотипов сои на основе анализа полиморфизма 12 микросателлитных локусов

Все генотипы сои были распределены в два крупных кластера. Первый кластер включал сорта селекции всех представленных оригинаторов, второй – только сорта селекции АОС ВНИИМК. Максимальный уровень различия между генотипами составил 6,4, минимальный – 1,4. Наиболее близкое генетическое родство наблюдается между сортами Дуар и Кора (АОС ВНИИМК).

Заключение. В результате проведенного исследования были идентифицированы 10 сортов сои с использованием 12 микросателлитных маркеров. Полученные наборы аллелей могут быть использованы для создания молекулярно-генетических паспортов. В целом используемая система маркеров позволяет идентифицировать генотипы сои, однако в наших исследованиях нам не удалось отличить сорт Зара и сорт Весточка используемым набором микросателлитных локусов, поскольку были получены идентичные аллели. Поэтому требуется дальнейший поиск и изучение новых маркеров для создания адаптированной технологии генотипирования сортов сои.

Литература

1. Петибская В.С., Баранов В.Ф., Кочегура А.В., Зеленцов С.В. Соя: качество, использование, производство. – М.: Аграрная наука, 2001. – 64 с.
2. Гражданский кодекс Российской Федерации: Часть первая – четвертая: [Принят Гос. Думой 23 апреля 1994 года, с изменениями и дополнениями по состоянию на 10 апреля 2009 г.] // Собрание законодательства РФ. – 1994. – № 22. Ст. 1438.



3. Сухарева А.С., Кулуев Б.Р. ДНК-маркеры для генетического анализа сортов культурных растений // Биомика. – 2018. – Т. 10. – № 1. – С. 69–84.
4. Гучетль С.З., Челюстникова Т.А., Антонова Т.С., Рамазанова С.А. Микросателлитные локусы как маркеры для идентификации и сертификации линий и гибридов подсолнечника селекции ВНИИМК // Масличные культуры: НТБ ВНИИМК. – 2007. – № 2 (137). – С. 27–32.
5. Сиволап Ю.М., Бальвинская М.С., Родер М. SSRP-анализ молекулярно-генетического полиморфизма сортов ярового ячменя южно-украинской селекции // Доклады Росс. Акад. сельхоз. Наук. – 2001. – № 5. – С. 3–7.
6. Кудрявцев А.М., Мартынов С.П., Броджио М., Буютти М. Оценка полиморфизма по микросателлитным локусам у сортов яровой твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf) и возможность применения SSR-анализа в филогенетических исследованиях // Генетика. – 2004. – Т. 40. – № 10. – С. 1343–1351.
7. Колобова О.С., Малюченко О.П., Шалаева Т.В., Шанина Е.П., Шилов И.А. и др. Генетическая паспортизация картофеля на основе мультиплексного анализа 10 микросателлитных маркеров // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – № 21. – С. 124–127. DOI10.18699/VJ17.230
8. Супрун И.И., Ковалев В.С., Токмаков С.В., Белан К.А. ДНК-паспортизация современных российских сортов риса с применением SSR-маркеров // Науч. журнал КубГАУ – 2017. – Т. 131. – С. 1–11. DOI 10.21515/1990-4665-131-065.
9. Saghai-Marooif M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A., Allard R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics // PNAS USA. – 1984. – 81. – P. 8014–8018.
10. Рамазанова С.А., Коломыцева А.С. Оптимизация технологии генотипирования сои на основе анализа полиморфизма SSR-локусов ДНК // Масличные культуры. – 2020. – № 19 (181). – С. 42–48.
11. Binkowski J., Miks S., Gene-Calc [компьютерное программное обеспечение]. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://gene-calc.pl/plc>.

THE IDENTIFICATION OF SOYBEAN VARIETIES OF THE BREEDING OF V.S. PUSTOVOIT ALL-RUSSIAN RESEARCH INSTITUTE OF OIL CROPS BY MICROSATELLITE ANALYSIS

Savichenko V.G., Ramazanova S.A.

The identification of breeding material and certification of varieties is of great importance for the protection of the copyright of breeders. Microsatellite DNA loci are effectively used for these purposes. The aim of the research was to identify the soybean varieties of the breeding of V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops using the previously tested 12 microsatellite markers. As a result of research, we obtained the unique sets of alleles for eight varieties; two varieties had identical alleles. We divided all soybean genotypes into two large clusters. We observed the closest genetic relation between the varieties Duar and Kora (the Armavir experimental station of V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops). The resulting sets of alleles can be used to develop molecular genetic passports.

Key words: soybean, *Glycine max* (L.) Merr., SSR, microsatellite, DNA, identification, certification, genetic diversity.