

УДК 633.853.52:631.522

DOI 10.30679/2587-9847-2023-37-68-72

ИДЕНТИФИКАЦИЯ СОРТОВ СОИ НА ОСНОВЕ ПОЛИМОРФИЗМА SSR-МАРКЕРОВ

Савиченко В.Г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта» (Краснодар)

Реферат. Идентификация генотипов сельскохозяйственных культур на основе ДНК-маркеров является востребованным инструментом в селекционной практике. В настоящем исследовании была проведена идентификация 50 сортов сои разного происхождения с помощью фрагментного анализа 9 SSR-маркеров. Установлены уникальные профили ДНК большинства анализируемых сортов, которые могут быть использованы для их паспортизации. В рамках исследования не удалось отличить два сорта. Был подтвержден высокий дискриминационный потенциал используемых SSR-маркеров, среднее значение PIC составило 0,59. Однако для различия всех сортов требуется включить в исследование дополнительно высокополиморфные ДНК-маркеры.

Ключевые слова: соя, идентификация, паспортизация, ДНК-маркеры, микросателлиты, SSR, фрагментный анализ

Summary. The identification of genotypes of agricultural crops on the base of DNA-markers is a high-demand method in the breeding. 50 soybean cultivars of the different origin using a fragment analysis of nine SSR-markers were identified in this research. The unique profiles of DNA of the most analyzed cultivars, which can be used for their passportization, were determined. It was failed to distinguish two cultivars in this research. A high discriminating potential of used SSR-markers was confirmed, an average meaning of PIC is equal to 0.59. However, to distinguish all cultivars it is necessary to include additionally highly polymorphic DNA-markers in the research.

Key words: soybean, identification, certification, DNA-markers, microsatellites, SSR, fragment analysis

Введение. В связи с возможностью применения молекулярно-генетических методов на всех этапах селекционного процесса все более актуальной становится идентификация сортов, линий и гибридов сельскохозяйственных культур, основанная на анализе полиморфизма ДНК. Она востребована при изучении генетического разнообразия, подборе родительских форм для селекционных программ, контроле генетической однородности семенного материала, а также для защиты авторских прав селекционеров и исключения фальсификата на рынке семян.

Существует большое разнообразие классов ДНК-маркеров, однако наиболее подходящими для перечисленных выше задач являются микросателлитные или SSR-маркеры, поскольку они имеют высокий уровень полиморфизма, кодоминантный тип наследования и относительную простоту детекции [1]. Точность и высокая воспроизводимость результатов может быть обеспечена применением современных

подходов, например детектированием фрагментов ДНК с помощью фрагментного анализа методом капиллярного электрофореза с флуоресцентной детекцией [2-3].

На ряде сельскохозяйственных культур уже проводится идентификация генотипов с помощью генетических анализаторов методом капиллярного электрофореза [4-6]. Ранее на малой выборке генотипов нами было установлено, что метод фрагментного анализа также наиболее эффективен при идентификации и паспортизации сортов сои [7]. Целью настоящего исследования являлась идентификация сортов сои разного происхождения с помощью фрагментного анализа SSR-маркеров.

Объекты и методы исследований. Объектом исследования служили 50 сортов сои различного происхождения, включая 43 сорта селекции российских оригинаторов, 4 – США, 2 – Украины и 1 – Беларуси, полученные из коллекции образцов сои АОС и ЦЭБ ВНИИМК. ДНК экстрагировали из осевых органов зародышей с помощью набора для выделения DiamondDNA Plant (ООО АВТ, РФ) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию ДНК определяли на микроспектрофотометре Nano-300 (Allsheng, Китай) и доводили до 50 нг/мкл для ПЦР-анализа.

Фрагментный анализ проводили по 9 SSR-маркерам: Satt532, Satt141, Satt307, Satt286, Satt681, Soypr1, Satt149, Satt309 и Soyhsp176. Для постановки ПЦР использовали последовательности праймеров из базы данных Soybase.org, прямые праймеры были модифицированы флуоресцентной меткой (FAM, R6G, TAMRA или ROX) [8]. ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2,5 мкл 10x ПЦР-буфера; 2,5 мМ MgCl₂ (ООО «СибЭнзайм», РФ); 200 мкМ каждого дНТФ («Евроген», РФ); 0,5 мкМ каждого праймера; 0,1 мкл SynTaq ДНК полимеразы (ООО «Синтол», РФ); 50 нг геномной ДНК и деионизированную воду. Амплификацию осуществляли в термоциклере MiniAmp Plus (Thermo Fisher, США) при следующих температурно-временных режимах: начальная денатурация при 96 °С в течение 2 мин, затем 35 циклов при температурно-временном режиме: денатурация при 94 °С – 30 сек, отжиг при 50-60 °С – 40 сек, элонгация при 70 °С – 1 мин, финальная элонгация при 70° С – 2 мин.

Для анализа длин фрагментов 1 мкл ПЦР-продукта смешивали с 0,5 мкл размерного стандарта СД-600 и 8,5 мкл деионизированного формамида (ООО «Синтол», РФ), затем проводили денатурацию фрагментов при 95 °С в течение 5 мин. Разделение ПЦР-продуктов осуществляли методом капиллярного электрофореза в денатурирующих условиях на генетическом анализаторе Нанофор-05 (ИАП РАН, РФ). Размер фрагментов определяли относительно размерного стандарта СД-600 с помощью программного обеспечения GeneMarker software version 3.0.1 (SoftGenetics, State College, США).

Индекс полиморфного информационного содержания (PIC) и эффективное число аллелей (Ne) вычисляли с помощью программного обеспечения Gene-Calc [9].

Расчет матрицы расстояний и построение иерархической кластеризации по методу Варда «ward.d2» проводили в программной среде R версии 4.2.3 при помощи пакета stats. Для построения дендрограммы использовали пакет are для R [10-12].

Обсуждение результатов. Генотипирование 50 сортов сои было выполнено с помощью фрагментного анализа по 9 SSR-маркерам. В результате анализа всего было обнаружено 47 аллельных вариантов. Размеры фрагментов ДНК по всем маркерам варьировали в диапазоне от 101 до 280 п.н. Полученные данные представлены в табл.

Таблица – Основные показатели информативности микросателлитных маркеров ДНК сои

№	SSR-маркер	Размер фрагментов, п.н.	Наблюдаемое число аллелей	Эффективное число аллелей	PIC
1	Satt532	162-174	4	2,67	0,56
2	Satt141	134-200	7	4,90	0,77
3	Satt307	162-192	8	3,38	0,67
4	Satt286	193-214	6	3,28	0,65
5	Satt681	234-259	8	3,92	0,72
6	Soypr1	154-184	4	2,90	0,58
7	Satt149	253-280	4	3,12	0,62
8	Satt309	123-144	3	2,11	0,46
9	Soyhsp176	101-113	3	1,43	0,27
Среднее		-	5,22	3,08	0,59

Минимальное наблюдаемое число аллелей – 3 выявлено в локусах Satt309 и Soyhsp176, а максимальное – 8 у Satt307 и Satt681, что в среднем составило 5,22. При этом эффективное число аллелей варьировало от 1,43 до 4,90 со средним значением 3,08. Полученные значения свидетельствуют о неравномерном распределении аллелей по всем анализируемым микросателлитным маркерам.

Среднее значение индекса полиморфного информационного содержания (PIC) составило 0,59, что характеризует исследуемые маркеры как систему с высоким дискриминационным потенциалом. Большинство маркеров оказались высокополиморфными (со значением PIC > 0,5): Satt141, Satt681, Satt307, Satt286, Satt149, Soypr1, Satt532. Маркеры Satt309 и Soyhsp176 обладали меньшим уровнем полиморфизма ($0,5 > \text{PIC} > 0,25$), но также были информативны.

В результате молекулярно-генетической идентификации с помощью 9 SSR маркеров для большинства анализируемых сортов были определены уникальные профили ДНК, которые могут быть использованы для их паспортизации. Тем не менее не удалось отличить сорта Сибириада и Омская 4, они имели идентичный набор аллелей. Поэтому необходимо провести дополнительное исследование с большим количеством высокополиморфных ДНК-маркеров.

На основе полиморфизма SSR-маркеров был проведен кластерный анализ по методу Варда. Полученная дендрограмма представлена на рис.

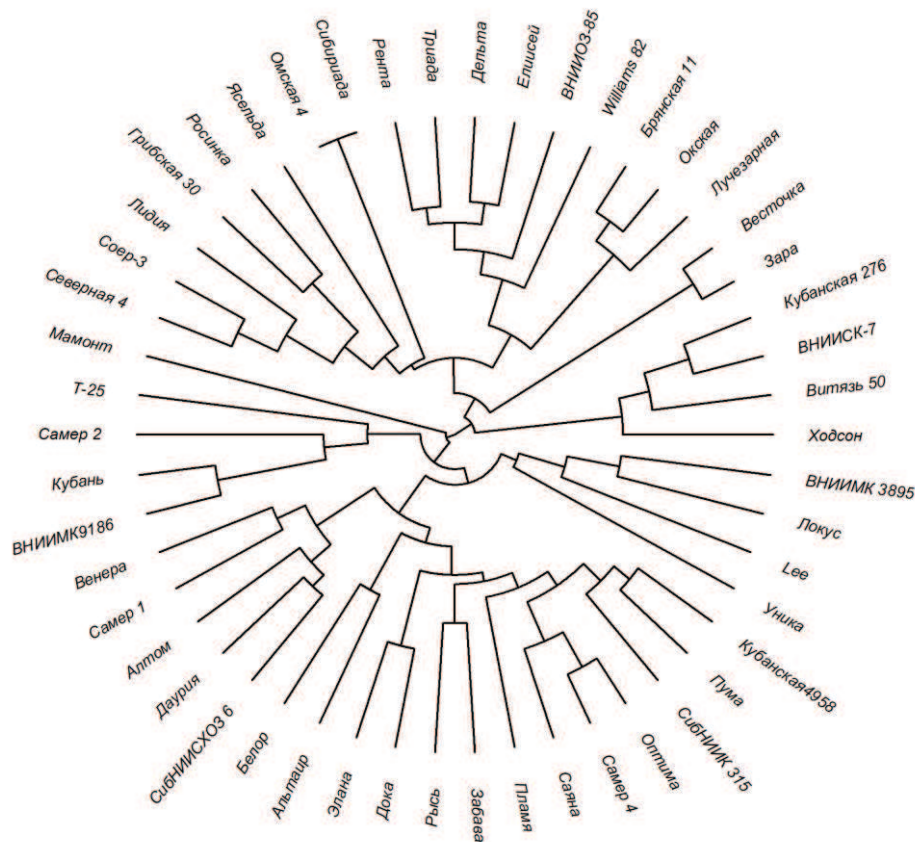


Рис. Дендрограмма генетического сходства 50 сортов сои на основе анализа полиморфизма SSR маркеров

Результаты кластеризации наглядно отразили гетерогенность анализируемых образцов. Все сорта были разделены на три основных кластера. Первый кластер представлен только одним сортом Мамонт, при генотипировании которого были обнаружены уникальные аллели по двум из девяти маркеров – *Soyrp1* и *Satt307*. Остальные сорта были распределены в два других крупных кластера. Наибольшее генетическое сходство отмечается у сортов Восточка и Зара, при этом наблюдается их отдаленность от остальных сортов. Не различимы в данном исследовании – Сибиряда и Омская 4.

Выводы. В результате проведенного исследования были идентифицированы 50 сортов сои на основе полиморфизма 9 SSR-маркеров. Определены размеры фрагментов ДНК всех аллельных вариантов с длиной от 103 до 280 п.н. В ходе исследования была подтверждена высокая дискриминационная способность используемых SSR-маркеров со средним значением индекса полиморфного информационного содержания 0,59.

Для большинства анализируемых сортов были установлены уникальные аллельные наборы, позволяющие их паспортизировать. Два сорта (Сибиряда и Омская 4) были идентичны, требуется дополнительно включить в исследование высокополиморфные ДНК-маркеры, позволяющие их различить. Гетерогенность сортов сои была визуализирована в виде дендрограммы генетического сходства. Анализируемые сорта сформировали три основных кластера, при этом Мамонт сформировал отдельный кластер.

Литература

1. Канукова К.Р., Газаев И.Х., Сабанчиева Л.К., Боготова З.И., Аппаев С.П. ДНК-маркеры в растениеводстве // Известия Кабардино-Балкарского научного центра РАН. 2019. № 6 (92). С. 220-232. DOI: 10.35330/1991-6639-2019-6-92-220-232
2. Chandra A, Grisham MP, Pan YB. Allelic divergence and cultivar-specific SSR alleles revealed by capillary electrophoresis using fluorescence-labeled SSR markers in sugarcane // Genome. 2014. Vol. 57(6). P. 363-372.
3. Liang C., Wan T., Xu S., Li B., Li X., Feng Y., Cai Y. Molecular identification and genetic analysis of cherry cultivars using capillary electrophoresis with fluorescence-labeled SSR markers // 3 Biotech. 2018. № 8(1). 16. DOI: 10.1007/s13205-017-1036-7
4. Базанов Т.А., Ущатовский И.В., Лемеш В.А., Богданова М.В., Лагуновская Е.В. Генетический полиморфизм современных сортов льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) российской селекции с использованием SSR-маркеров // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2019. № 180(4). С. 81-87. DOI: 10.30901/2227-8834-2019-4-81-87
5. Шилов И.А., Велишаева Н.С., Анискина Ю.В., Колобова О.С., Шалаева Т.В., Борисенко О.М., Демури 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. Т. 37. № 1. С. 10-15. DOI: 10.53859/02352451_2023_37_1_10
6. Ильницкая Е.Т., Макаркина М.В., Степанов И.В., Супрун И.И., Токмаков С.В., Айба В.Ш., Авидзба М.А., Котляр В.К. Генетический полиморфизм аборигенных абхазских сортов винограда // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021. № 25 (8). С. 797-804. DOI 10.18699/VJ21.092
7. Савиченко В.Г., Рамазанова С.А. Детекция фрагментов ДНК при проведении молекулярно-генетической паспортизации сортов сои // В сборнике: Актуальные вопросы биологии, селекции, технологии возделывания и переработки сельскохозяйственных культур. Сборник материалов 12-й Международной конференции молодых учёных и специалистов. Краснодар. 2023. С. 242-246. DOI 10.25230/conf12-2023-242-246.
8. SoyBase. Integrating Genetics and Genomics to Advance Soybean Research [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://soybase.org/> (дата обращения: 21.01.2022).
9. Binkowski J., Miks S. Gene-Calc [компьютерное программное обеспечение]. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://gene-calc.pl/pic> (дата обращения: 06.07.2023).
10. Murtagh F., Legendre P. Ward's Hierarchical Agglomerative Clustering Method: Which Algorithms Implement Ward's Criterion? // Journal of Classification. 2014. Vol 31. P. 274-295. DOI: 10.1007/s00357-014-9161-z
11. Программная среда R для статистических вычислений и графики [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.r-project.org/> (дата обращения: 11.07.2023).
12. Paradis E., Schliep K. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R // Bioinformatics. 2019. Vol. 3 (35). P. 526-528. DOI:10.1093/bioinformatics/bty633