

УДК 631.523:633.854.78

## ПАСПОРТИЗАЦИЯ СОРТОВ СОИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ SSR-ЛОКУСОВ ДНК

**Коломыцева А.С, Рамазанова С.А.**

350038, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17  
ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК  
immunity@vniimk.ru

Соя – основная белково-масличная культура в мире. Для молекулярной паспортизации 7 сортов и одной линии сои селекции ВНИИМК были выбраны 13 пар SSR-праймеров, имеющих максимальное количество аллелей на локус и локализованных в разных хромосомах сои. Результаты амплификации ДНК 8 генотипов сои показали, что все 13 изученных SSR-локусов полиаллельны. Для всех изученных образцов сои селекции ВНИИМК получены уникальные наборы аллелей. Для каждого генотипа на основании полученного набора аллелей микросателлитных локусов были составлены молекулярно-генетические паспорта.

*Ключевые слова:* соя, молекулярно-генетическая паспортизация, SSR, ДНК-маркеры, сорта, локус

**Введение.** Соя (*Glycine max* (L) Merr.) является одной из основных белково-масличных культур в мире. Благодаря своей универсальности она используется для пищевых, кормовых, медицинских и технических целей. Ежегодно площади посевов сои увеличиваются, и создаются новые сорта. В связи с этим большое значение имеет идентификация и паспортизация генотипов сои с использованием молекулярных маркеров.

Наиболее удобными для идентификации генотипов в настоящее время являются молекулярно-генетические маркеры, то есть маркеры на основе макромолекул: запасные белки, изоферменты и полиморфные фрагменты ДНК. Они в меньшей мере подвержены фенотипической изменчивости, чем морфологические маркеры и, в большинстве случаев, имеют кодоминантное наследование. На их основе проводится биохимическая паспортизация многих сельскохозяйственных культур.

По данным многих авторов высокий уровень полиморфизма у сои удалось выявить только по микросателлитным локусам [1-4]. Микросателлиты (SSRs) представляют собой простые, наиболее доступные, удобные и относительно недорогие маркеры, пригодные для идентификации генотипов [6, 7]. Они позволяют дифференцировать особи, отличающиеся друг от друга небольшим количеством генов, что не всегда заметно фенотипически.

Целью нашего исследования была апробация ряда микросателлитных маркеров на их пригодность для паспортизации сортов сои селекции ВНИИМК.

В работе использованы 7 сортов и одна линия сои (*G. max*) селекции ВНИИМК. Для исследования из литературных источников были выбраны 13 пар SSR-праймеров: Satt1, Satt 2, Satt5, Satt9, Soypr1, Sat1, Sat36, Sat43, Soyhsp176, Satt141, Satt681, Satt181, Satt161, имеющих максимальное количество аллелей на локус и локализованных в разных хромосомах сои [1, 2, 20].

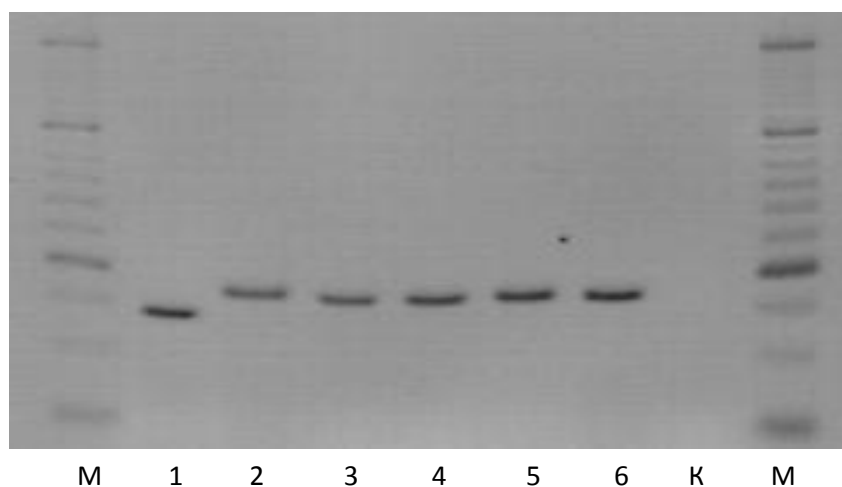
ДНК выделяли из фрагментов зеленых листьев 5-10 растений. Выделение проводили по модифицированному методу [8].

Полимеразную цепную реакцию осуществляли в объеме реакционной смеси 25 мкл, содержащем: 67 мМ трис- HCl, pH8.8; 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 (НПО «СибЭнзим», Россия). Амплификацию проводили в приборе S1000™ (BioRad, США). Подробно температурные режимы для ПЦР опубликованы ранее (9). Концентрацию ДНК определяли по интенсивности окрашивания ее бромистым этидием в 1% агарозном геле.

Электрофорез продуктов амплификации проводили в агарозном геле (2% агароза, 1x SB-буфер). Документирование результатов электрофореза обеспечивалось при помощи системы цифровой документации видеоизображения BIO-PRINT (Vilber Lourmat, Франция).

Результаты амплификации ДНК 8 генотипов сои показали, что все 13 изученных SSR-локусов полиаллельны. Всего в этой группе генотипов было выявлено 26 аллелей. Число аллелей на locus варьировало от 1 до 3, что в среднем составило 2. У локусов Satt1, Satt 2, Sat43, Soyhsp176 и Satt141 было выявлено по 3 аллеля. Аллели SSR-локусов представлены на фореграммах фрагментами ДНК разного молекулярного веса (длины пар нуклеотидов). На рисунке 1 показана фореграмма результатов амплификации ДНК некоторых генотипов по locus Satt141. Нумерацию аллелей по каждому locus проводили следующим образом: фрагмент ДНК с максимальным значением молекулярного веса обозначали цифрой 1 (дорожка) и далее по мере уменьшения молекулярного веса цифрами 2 (дорожка) и 3 (дорожки).



*Рисунок 1* – Фореграмма продуктов амплификации ДНК генотипов сои с праймером Satt141.

Дорожки: 1 – Wassbon, 2 – линия 77, 3 – Баргузин, 4 – Иней, 5 – Вилана, 6 – Гном, К – отрицательный контроль, М – маркер молекулярного веса.

Для всех изученных сортов сои селекции ВНИИМК получены уникальные наборы аллелей. Различия наблюдались по двум и более локусам. К примеру, сорта Вилана и Wassbon отличаются друг от друга по локусам Satt9, Sat1 и Soyhsp176 (табл. 1).

Для каждого сорта на основании полученного набора аллелей микросателлитных локусов были составлены молекулярно-генетические паспорта или, так называемые, «генетические формулы генотипов». Большими буквами латин-

ского алфавита был обозначен код локуса, а нижний индекс – аллельное состояние данного локуса. В качестве примера в таблице 2 представлены молекулярно-генетические формулы изученных сортов сои.

**Таблица 1 – Дифференциация генотипов сои по 13 микросателлитным локусам ДНК**

Генотип	Микросателлитный локус												
	Satt1	Satt2	Satt5	Satt9	Sat43	Soypr1	Sat1	Sat36	Soyhsp176	Satt141	Satt681	Satt181	Satt161
Вита	3*	2	1	-	1	1	1	1	2	3	2	-	4
Барс	2	1	1	-	1	2	1	1	1	3	2	-	3
Баргузин	3	3	1	2	3	2	2	1	2	2	3	2	4
77	4	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2	1
Иней	3	1	2	1	2	2	2	2	2	2	3	2	1
Вилана	3	2	2	1	2	1	2	2	3	2	3	2	4
Гном	3	1	1	2	2	1	3	1	2	2	3	2	3
Wassbon	3	2	2	2	2	1	1	2	2	3	2	2	1

Примечание: \* аллели локуса

**Таблица 2 – Молекулярно-генетические формулы генотипов сои**

Сорт	Формула*	Сорт	Формула*
Вита	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub> E <sub>1</sub> F <sub>1</sub> G <sub>1</sub> H <sub>2</sub> I <sub>1</sub> J <sub>3</sub> K <sub>2</sub> M <sub>4</sub>	Иней	A <sub>3</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub> D <sub>1</sub> E <sub>2</sub> F <sub>2</sub> G <sub>1</sub> H <sub>2</sub> I <sub>2</sub> J <sub>2</sub> K <sub>3</sub> L <sub>2</sub> M <sub>1</sub>
Барс	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> E <sub>2</sub> F <sub>1</sub> G <sub>1</sub> H <sub>1</sub> I <sub>1</sub> J <sub>3</sub> K <sub>2</sub> M <sub>3</sub>	Вилана	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>1</sub> E <sub>1</sub> F <sub>2</sub> G <sub>2</sub> H <sub>3</sub> I <sub>2</sub> J <sub>2</sub> K <sub>3</sub> L <sub>2</sub> M <sub>4</sub>
Баргузин	A <sub>3</sub> B <sub>3</sub> C <sub>1</sub> D <sub>2</sub> E <sub>2</sub> F <sub>2</sub> G <sub>1</sub> H <sub>3</sub> I <sub>3</sub> J <sub>2</sub> K <sub>3</sub> L <sub>2</sub> M <sub>4</sub>	Гном	A <sub>3</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> D <sub>2</sub> E <sub>1</sub> F <sub>3</sub> G <sub>1</sub> H <sub>2</sub> I <sub>2</sub> J <sub>2</sub> K <sub>3</sub> L <sub>2</sub> M <sub>3</sub>
77	A <sub>4</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>1</sub> E <sub>2</sub> F <sub>2</sub> G <sub>2</sub> H <sub>2</sub> I <sub>2</sub> J <sub>1</sub> K <sub>1</sub> L <sub>2</sub> M <sub>1</sub>	Wassbon	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>2</sub> E <sub>1</sub> F <sub>1</sub> G <sub>2</sub> H <sub>2</sub> I <sub>2</sub> J <sub>3</sub> K <sub>3</sub> L <sub>2</sub> M <sub>1</sub>

Примечание: \* код локуса A-Satt1; B-Satt2; C-Satt5; D-Satt9; E-Soypr1; F- Sat1; G-Sat36; H-Soyhsp176, I-Sat43, J-Satt141, K-Satt681, L-Satt181, M-Satt161

**Заключение.** В результате проведенной работы было установлено, что дискриминационный потенциал изученной маркерной системы достаточно высокий для того, чтобы использовать ее для идентификации и паспортизации сортов культурной сои. С использованием системы из 13 SSR-маркеров, были идентифицированы 8 генотипов сои, для каждого из них получены уникальные наборы аллелей. На основании данных об аллельном разнообразии изученных микросателлитных локусов разработаны молекулярно-генетические формулы, которые предложено использовать как соответствующие паспорта для идентификации и сертификации сортов сои.

#### Литература

1. Rongwen J. , Akkaya M.S., Bhagwat A.A. et al. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification // Theor. Appl. Genet. – 1995. – V. 90. – P. 43-48.

2. Maughan P., Saghai-Marooф M., Buss G. Microsatellite and amplified sequence length polymorphism in cultivated and wild soybean // *Genom.* – 1995. – V. 38. – P. 715-723.
3. Abe J., Xu D., Suzuki Y. et al. Soybean germplasm pools in Asia revealed by nuclear SSRs // *Theor. Appl. Genet.* – 2003. – V.106. – №3. – P. 445-453.
4. Diwan N., Cregan P.B. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean // *Theor. Appl. Genet.* – 1997. – V.95. – №5-6. – P. 723-733.
5. Yamanaka N., Okabe A., Adachi T. et al. Characteristics and genetic diversity of soybean genetic resources in Northeast China. – [Электронный ресурс]: JIRCAS Research Highlights, 2003. – Режим доступа: <http://www.jircas.affrc.go.jp/DB/guide-eng.html>.
6. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях / Научно-методическое руководство; под. ред. Сиволапа Ю.М. – Киев: Аграрна наука, 1998. – 156 с.
7. Сулимова Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения – [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.labsgi.by.ru>
8. Saghai-Marooф M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A. et al. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics // *PNAS USA.* – 1984. – 81. – P. 8014-8018.
9. Рамазанова С.А., Гучетль С.З., Челюстникова Т.А. и др. Полиморфизм микросателлитных локусов ДНК сортов сои селекции ВНИИМК // Сб. докл. междунаучно-практ. конф. «Современные проблемы научного обеспечения производства подсолнечника» посвященной 120-летию со дня рождения академика В.С. Пустовойта» ВНИИМК, Краснодар, Россия, 19-22 июля 2006. – С. 234-239.
10. Gregan P.B., Jarvik T., Bush A.L. et al. An indegrated genetic linkage map of soybean // *Crop Science.* – 1999. – Vol.39 – P. 1464-1490.

## **CERTIFICATION OF SOYBEAN VARIETIES USING SSR-LOCI OF DNA**

**Kolomytseva A.S., Ramazanova S.A.**

Soybean is the main protein and oil crop in the world. We chose 13 pairs of SSR-primers having the highest quantity of alleles per locus and located in the different soybean chromosomes to do molecular certification of seven varieties and one line of soybean of VNIIMK's breeding. The results of DNA amplification of eight soybean genotypes showed the all studied 13 SSR-loci are polyallelic. We obtained the unique sets of alleles for all studied soybean varieties of VNIIMK's breeding. We made the molecular-genetic passports for each genotype basing on the obtained sets of alleles in microsatellite loci.

*Keywords:* soybean, molecular-genetic certification, SSR, DNA markers, varieties, locus