

ЖАРИКОВА Д. О.<sup>1</sup>, АКСЬОНОВА О. А.<sup>2</sup>, ЧЕБОТАР Г. О.<sup>1</sup>, ЧЕБОТАР С. В.<sup>1✉</sup>

<sup>1</sup> Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,

Україна, 65026, м. Одеса, вул. Дворянська, 2, e-mail: s.v.chebotar@onu.edu.ua

<sup>2</sup> Інститут генетики і цитології Національної академії наук Білорусі,

Білорусь, 220072, м. Мінськ, вул. Академічна, 27

✉ s.v.chebotar@onu.edu.ua

## ВИКОРИСТАННЯ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ, ЗЧЕПЛЕНИХ ІЗ ГЕНАМИ *E*, ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА ПАСПОРТИЗАЦІЇ СОРТІВ СОЇ

**Мета.** Дослідити молекулярно-генетичний поліморфізм сортів сої, створених у різних селекційних центрах України, за локусами *Satt100*, *Satt229*, *Satt319*, *Satt354*, *Satt365*, *Sat\_038* та визначити, чи можлива диференціація, ідентифікація та паспортизація сортів на основі МС-аналізу за названими локусами. **Методу.** Виділення ДНК, SSR-ПЛР, електрофорез у 7 % поліакриламідних гелях та на генетичному аналізаторі ABI PRISM® *Genetic Analyzer 3500* (Applied Biosystems), кластерний аналіз UPGMA. **Результати.** Загалом детектовано 28 алелів. Найбільш поліморфним виявився локус *Satt365* – 6 алелів на локус. Нами не детектовано гетерозиготних рослин та гетерогенних сортів сої за локусами, які вивчали. **Висновки.** Всі сорти чітко диференціювалися на дендрограмі, що дозволяє запропонувати індивідуальну генетичну формулу для кожного з сортів та рекомендувати зазначені МС-локуси для використання в паспортизації та реєстрації сортів сої.

**Ключові слова:** соя, молекулярно-генетичний поліморфізм, мікросателітні локуси.

Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) є однією з економічно найважливіших у світі бобових культур. В Україні сою розпочали активно вирощувати з 2007 року, і на сьогодні Україна є лідером в Європі з виробництва сої. У 2017–2018 роках експорт сої склав понад 2,7 млн тонн [1].

Відомо, що геном сої на сьогодні секвенований, його розмір складає близько 978 мега п. о. [2] та охоплює 20 хромосом (20 груп зчеплення) [3]. У 2010 році [4] було ресеквеновано геноми 17 диких видів та 14 видів сої, що культивують. Загалом показано більшу алельну різноманітність у диких видів. Цікаво, що лише 3 % SNP з більш ніж 4 млн детектованих для сої, що культивують, розташовані в кодуючих регіонах, всі інші в некодуючих ділянках [4]. У січні 2019 року опубліковано карту гаплотипів

сої на основі результатів повного секвеновання 1007 зразків [5].

В Україні дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму генома сої розпочато наприкінці минулого століття, і виконувалися вони за використання різних типів ПЛР-маркерів, зокрема таких, як RAPD, ISSR та в подальшому і мікросателітних (SSR).

Мікросателітні локуси, використані в нашому дослідженні, за даними наукової літератури [6], зчеплені з генами, що відповідають за фотоперіодичну чутливість рослин сої. Водночас згідно з пошуковими дослідженнями в базі даних [3], виявилось, що багато *QTL* асоційовані із зазначеними локусами (табл. 1). Таким чином, можливо, ці локуси знаходяться в активних ділянках генома, є високоваріабельними і можуть бути корисними для диференціації сортів сої на молекулярному рівні.

Отож, згідно з [3], використані в роботі мікросателітні маркери пов'язані не тільки з *E* генами фотоперіодичної відповіді сої, а й з низкою агрономічно важливих *QTL*, які відповідають за розміри рослин та їх окремих структур, якість зерна, стійкість до шкідників та хвороб, кількість бобів та врожай насіння.

Метою нашої роботи було дослідити молекулярно-генетичний поліморфізм сортів сої, створених у різних селекційних центрах України, за локусами *Satt100*, *Satt229*, *Satt319*, *Satt354*, *Satt365*, *Sat\_038* та визначити, чи можлива диференціація, ідентифікація та паспортизація сортів на основі МС-аналізу за названими локусами.

### Матеріали і методи

У роботі досліджували дев'ять сортів сої української селекції, придатних до поширення в Україні [7], які були люб'язно надані Національним центром генетичних ресурсів рослин Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва (табл. 2).

Таблиця 1. Локалізація мікросателітних локусів використаних у роботі

МС-локус	Хромо-сома	Група зчеплення/позиція в сМ*	QTL, асоційовані з локусами, що відповідають за ознаки (цит. за [3])
<i>Satt100</i>	6	C2/113,96	Зацвітання, толерантність до затоплення, маса гіпокотіля, форма листа, полягання, висота рослин, число вузлів, гниття насіння, викликане фомопсисом, скоростиглість/пізньостиглість бобів, кількість бобів, кількість бобів на вузол, дробіння, колір насіння; кількість олії, олігосахаридів, білка в насінні, маса та врожай насіння
<i>Satt319</i>	6	C2/113,42	Зацвітання, полягання, кількість вузлів, висота рослин, врожай насіння, гліцетин насіння
<i>Satt229</i>	19	L/93,89	Зацвітання, форма квітки та листа, ширина листа, в'янення стебла (соломи), кількість бобів, твердість насіння, кількість та маса насіння, ізофлавоної й олія насіння
<i>Satt354</i>	20	I/46,22	Довжина та кількість міжвузлів, кількість хлорофілу в листі, кількість бобів, вага кореневих міжвузлів, кількість кальцію в насінні, відношення довжини до товщини насіння; кількість лінолевої кислоти, лізину, олеїнової кислоти, білка в насінні; кількість альфа-, дельта-, гамма- та загального токоферолу в насінні, маса і врожай насіння, відношення ширини насіння до товщини
<i>Satt365</i>	6	C2/111,68	Зацвітання, довжина репродуктивного періоду, відношення довжини репродуктивного до вегетаційного періодів, довжина вегетаційного періоду, загальна тривалість росту, стійкість до кукурдзяного хробака ( <i>Helicoverpa zea</i> ), площа та ширина листа, полягання, висота рослин, R/V фото-термальна чутливість, урожайність насіння, скоростиглість/пізньостиглість бобів; стеарин, гліцин, гліцинін та бета-конглицинин насіння
<i>Sat_038</i>	10	O/112,16	Скоростиглість/пізньостиглість бобів, довжина репродуктивної стадії, висота рослин, гниття насіння, спричинене фомопсисом, стійкість до <i>Heterodera glycines</i>

Примітка. \*Позиції названо згідно GmComposite2003.

Таблиця 2. Сорти сої української селекції, досліджені в роботі

Назва сорту	Рік реєстрації	Оригіатор сорту
Подяка	2011	Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва Національної академії аграрних наук України
Кобза	2015	
Криниця	2017	
Мавка	2013	Приватне підприємство «Наукова селекційно-насінницька фірма «Соевий вік»
Ромашка	2013	Кіровоградський інститут агропромислового виробництва Української академії аграрних наук; Кіровоградська державна сільськогосподарська дослідна станція Національної академії аграрних наук України
Гєба	2016	Товариство з обмеженою відповідальністю «Науково-дослідний інститут сої»
Полтава	2009	Товариство з обмеженою відповідальністю «Науково-дослідний інститут сої»; Інститут полівництва та овочівництва, м. Нові Сад; іноземне підприємство «НС СЕМЕ-Україна»
Галина	2009	
Золотиста	2004	Інститут землеробства південного регіону Української академії аграрних наук; Інститут кормів Української академії аграрних наук; Інститут кормів та сільського господарства Поділля Національної академії аграрних наук України

У якості контролів були використані: ізо-лінія Harosoy OT89-5, сорти Вілана, Maple Arrow, Cormoran AC (наданий Харківським національним аграрним університетом ім. В. В. Докучаєва) та сорт Рось.

ДНК виділяли з насіння сої (по 5 насінин на сорт) із використанням набору ДНК NeoPrep100 («Neogen Laboratory», Україна). ПЛП з праймерами до мікросателітних локусів *Satt100*, *Satt229*, *Satt319*, *Satt354*, *Satt365*, *Sat\_038* проводили відповідно до вказівок Molnar зі співавторами [6]. ПЛП проводили на ампліфікаторі BioRad (США, *C1000*, *MJMini*, *MuCyler*) у таких умовах: початкова денатурація 95°C – 5 хв; 35 циклів: денатурація за 95°C – 45 с, відпал праймерів за 50 °C – 60 с, елонгація за 72 °C – 60 с та завершальна елонгація за 72 °C протягом 10 хв, кінцеве зберігання за 12°C. Продукти ПЛП фракціонували в 7 % поліакриламідних гелях та фарбували AgNO<sub>3</sub> відповідно до протоколу Promega [8]. Розмір фрагментів ампліфікацій визначали шляхом порівняння з маркером молекулярної маси *pUC19/MspI* та за допомогою програми «GelAnalyzer 2010a». Уточнення розмірів проводили в 6 % поліакриламідному гелі на генетичному аналізаторі ABI PRISM® *Genetic Analyzer 3500* (Applied Biosystems). Результати оброблялися за допомогою програми GeneMapper® Software Version 4.1. Як стандарт використовували Orange DNA

Size Standard виробництва MCLABs [9].

Для визначення генетичної подібності між досліджуваними сортами сої за алелями названих мікросателітних локусів було побудовано дендрограму методом незваженого парногрупового кластерного аналізу UPGMA [10].

### Результати та обговорення

За допомогою мікросателітного аналізу за використання шести МС-маркерів нами було досліджено 9 сортів сої української селекції та п'ять контрольних сортів/ліній (табл. 3). У дослідженому матеріалі виявили 28 алелів. У середньому детектували 4,7 алелів на кожний МС-локус. *Satt365* виявився найбільш поліморфним локусом, за цим локусом визначено 6 алелів, найменш поліморфними виявилися локуси *Satt100*, *Satt319* та *Sat\_038*, за якими детектовано по 4 алелі відповідно (рис. 1).

Нами не детектовано гетерозиготних рослин та гетерогенних сортів сої за локусами, які вивчали. Водночас, використані в роботі МС-локуси є достатньо поліморфними. Індекс поліморфності (PIC) коливався від 0,650 для локуса *Satt100* до 0,725 для локусів *Satt229* та *Satt319*, що дозволяє рекомендувати їх для використання в диференціації, паспортизації та реєстрації сортів сої, під час перевірки насінневого матеріалу різного походження та для захисту авторських прав.

Таблиця 3. Алельний стан МС-локусів у досліджених сортах сої

Сорти	Мікросателітні локуси, розмір фрагментів п.н.					
	<i>Satt100</i>	<i>Satt229</i>	<i>Satt319</i>	<i>Satt354</i>	<i>Satt365</i>	<i>Sat_038</i>
Подяка	167	212	175	232	307	247
Кобза	141	234	178	230	288	245
Мавка	141	234	182	178	301	245
Геба	131	230	178	249	270	249
Полтава	141	230	182	230	301	249
Ромашка	167	234	175	230	305	245
Галина	141	230	182	178	301	249
Золотиста	141	234	180	178	301	247
Криниця	167	234	180	230	301	245
Контрольні сорти / лінії						
Рось	145	215	178	178	270	243
Вілана	167	234	175	249	301	247
Harosoy OT89-5	167	183	175	216	301	247
Cormoran	131	183	178	178	270	247
Maple Arrow	131	215	178	178	215	247

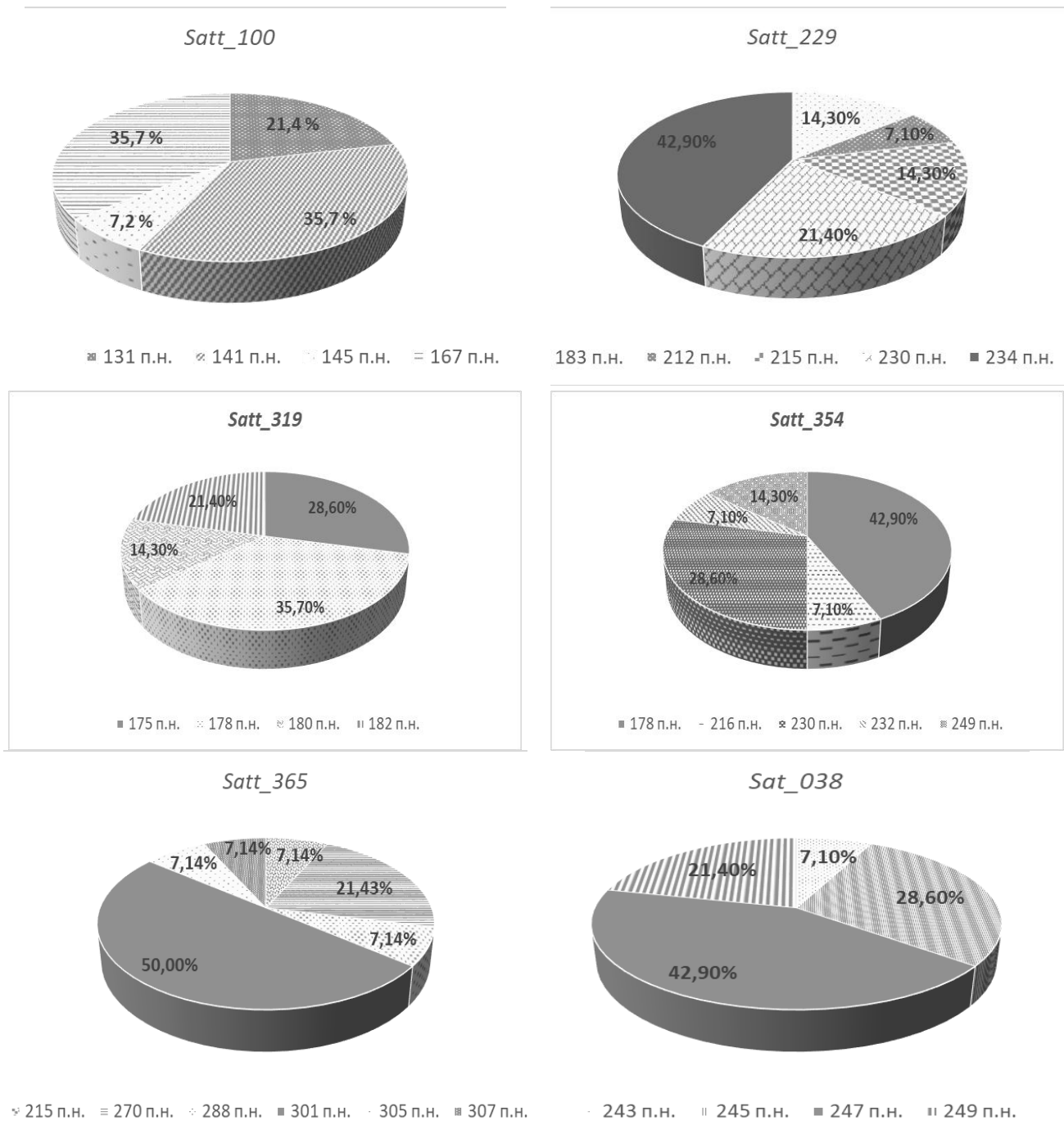


Рис. 1. Діаграми розподілу частот алелів за МС-локусами.

Так, згідно з отриманими нами даними, для кожного з досліджених у роботі сортів та контрольних сортів/ліній можна запропонувати індивідуальну генетичну формулу за шістьма мікросателітними локусами. У якості прикладу можна навести генетичну формулу сорту Подяка: *Satt100*<sub>167</sub>, *Satt229*<sub>212</sub>, *Satt319*<sub>175</sub>, *Satt354*<sub>232</sub>, *Satt365*<sub>307</sub>, *Sat\_038*<sub>247</sub>. Слід зазначити, що задля паспортизації сільськогосподарських культур, зокрема, пшениці, ячменю, кукурудзи, соняш-

ника та ін., рекомендують використовувати від 8 до 15 МС-локусів [11].

Вважаємо за необхідне в цій роботі звернути увагу на методичні аспекти досліджень задля паспортизації. За фракціонування продуктів ампліфікації на різних пристроях для електрофорезу в різних лабораторіях можливі розбіжності у розмірах фрагментів ампліфікації для одного і того ж самого зразка ДНК, тому необхідне використання референсних – контрольних

сортів рослин із визначеними фрагментами ампліфікації. Так, за даними [12], розмір фрагментів ампліфікації для контрольних сортів/ліній Вілана та Harosoy OT89-5 за МС-локусами *Satt100* та *Satt319* складала 168 та 173 п. н., відповідно. Водночас, у нашому дослідженні, проведеному навіть на тому ж самому генетичному аналізаторі ABI PRISM® *Genetic Analyzer 3500* (Applied Biosystems), розмір фрагментів ампліфікації під час порівняння цифрових результатів дещо різнився і становив – 167 і 175 п. н. Проте за наявності продуктів ампліфікації ДНК референсних сортів на електрофорезі стає зрозумілим, що наявні фрагменти ампліфікації відповідають контрольним сортам та маркують домінуючий стан алеля *E7*. Отримати результати більшої точності можна за секвенування фрагментів ампліфікації, проте використання цього методу потребує затрат більшої кількості коштів.

Утім, окрім диференціації та ідентифікації сортового матеріалу, зазначені мікросателітні маркери, згідно з даними наукової літератури (табл. 1) [3], можуть бути корисними в селекційних програмах під час створення матеріалу з певними запрограмованими якостями. Однак

практична цінність такого контролю в українській генетичній плазмі та в еколого-географічних умовах України поки що вивчається.

У роботі розраховували генетичні дистанції з метою визначення генетичної подібності сортів сої та проводили кластерний аналіз (рис. 2).

Дендрограма поділяється на два кластери першого порядку. В основі одного з кластерів першого порядку лежать переважно контрольні сорти/лінії, створені поза межами України, а саме – Рось, Maple Arrow, Cormoran AC та сорт Геба української селекції. До другого кластера першого порядку відносяться всі інші сорти. В свою чергу він розділяється на 2 кластери другого порядку, один з яких в подальшому ще раз розділяється на 2 кластери 3 порядку.

Сорти Полтава та Галина, що створені ТОВ «Науково-дослідний інститут сої» спільно з Інститутом полівництва та овочівництва, м. Нові Сад; іноземного підприємства «НС СЕМЕ-Україна» відносяться до одного підкласу на дендрограмі. Таким чином, використані в роботі мікросателітні локуси дозволяють чітко диференціювати сорти один від одного.

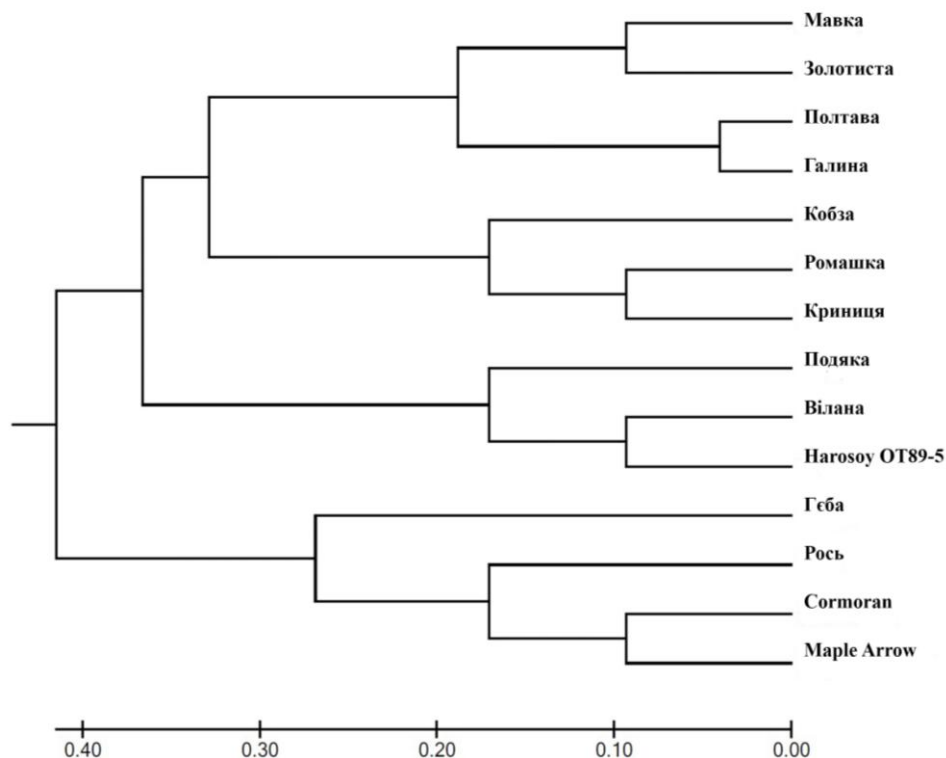


Рис. 2. Дендрограма сортів сої, побудована за генетичними дистанціями, розрахованими під час використання методу UPGMA, за даними аналізу 6 МС-локусів.

## Висновки

У роботі досліджено молекулярно-генетичний поліморфізм сортів сої створених у різних селекційних центрах України, за локусами *Satt100*, *Satt229*, *Satt319*, *Satt354*, *Satt365*, *Sat\_038*.

Використання зазначених МС-локусів дозволяє чітко диференціювати сорти один від одного. Отже, вважаємо, що панелі з 6 МС-

локусів може бути достатньо для диференціації сучасних сортів сої української селекції та створення їх генетичних паспортів.

*Дослідження виконується у рамках проекту, що фінансується МОН №0117U1114 «Поліморфізм локусів фотоперіодичної чутливості сортів пшениці і сої та залежність розвитку рослин від їхнього алейного складу, за даними ПЛР-аналізу».*

## References

1. Superagronom.com. The main site for agronomists. AgroExpedition 2018: Relapse of love for soy. [in Ukrainian] / Superagronom.com. Головний сайт для агрономів. АгроЕкспедиція 2018: Рецидив любові до сої. URL: <https://superagronom.com/blog/372-agroekspeditsiya-2018-retsivid-lyubovi-do-soyi> (дата звернення: 10.04.2019).
2. The Plant Comparative Genomics portal of the Department of Energy's Joint Genome Institute. JGI Phytozome 12. URL: [https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org\\_Gmax](https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Gmax) (дата звернення: 10.04.2019).
3. Grant D., Nelson R.T., Cannon S.B., Shoemaker R.C. SoyBase, the USDA-ARS soybean genetics and genomics database. *Nucl. Acids Res.* 2010. Vol. 38 (suppl 1). D843–D846. doi: 10.1093/nar/gkp798.
4. Lam H.-M., Xu X., Liu X. et al. Resequencing of 31 wild and cultivated soybean genomes identifies patterns of genetic diversity and selection. *Nature Genetics*. 2010. Vol. 42. P. 1053–1059. URL: <https://www.nature.com/articles/ng.715> (дата звернення: 10.04.2019).
5. Torkamaneh D., Laroche J., Valliyodan B. et al. Soybean haplotype map (GmHapMap): A universal resource for soybean translational and functional genomics. bioRxiv 534578. 2019. doi: <https://doi.org/10.1101/534578>.
6. Molnar S.J., Rai S., Charette M., Cober E.R. Simple sequence repeat (SSR) markers linked to *E1*, *E3*, *E4*, and *E7* maturity genes in soybean. *Genome*. 2003. Vol. 46. P. 1024–1036.
7. State register of plant varieties suitable for dissemination in Ukraine in 2017. Kyiv, 2017. 392 p. [in Ukrainian] / Державний реєстр сортів, придатних для поширення в Україні на 2017 рік. К., 2017. 392 с.
8. Promega technical manual. Gene print STR systems. Printed in USA. Revised. Vol. 7. 1999. 52 p.
9. MCLAB's DNA size standard. URL: <http://www.mclab.com/DNA-Size-Standard.html> (дата звернення: 10.04.2019).
10. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 2016. Vol. 33. P. 1870–1874.
11. Balvinska M.S., Volkova N.E., Kolesnik O.O., Solodenko A.Ye., Chebotar S.V. Differentiation, identification, determination of typology and hybridity of agricultural crops for DNA profiling: guidelines. Odesa: PBGI – NCSCI, 2015. 40 p. [in Ukrainian] / Бальвінська М.С., Волкова Н.Е., Колесник О.О., Солоденко А.Є., Чеботар С.В. Диференціація, ідентифікація, визначення типовості та гібридності сільськогосподарських культур за ДНК-профілюванням: методичні рекомендації. Оdesa: СГІ – НЦНС, 2015. 40 с.
12. Rosenzweig V.E., Aksyonova E.A., Milash S.B., Goloenko D.V., Davydenko O.G. Prospects of exploiting of photoperiod sensitivity gene *E7* in early soybean breeding and revealing of its sources with SSR-markers. *Soybean Genetics Newsletter*. 2008. Vol. 35 (online). URL: <http://www.soygenetics.org/articleFiles/> (дата звернення: 10.04.2019).

ZHARIKOVA D. O.<sup>1</sup>, AKSYONOVA E. O.<sup>2</sup>, CHEBOTAR G. O.<sup>1</sup>, CHEBOTAR S. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Odessa I.I. Mechnikov National University,

Ukraine, 65026, Odessa, Dvoryanska str., 2, e-mail: s.v.chebotar@onu.edu.ua

<sup>2</sup> Institute of Genetics and Cytology,

Minsk, 220072, Belarus, Akademichna str., 27

## AGE OF MICROSATELLITE LOCI LINKED WITH *E* GENES, FOR IDENTIFICATION AND CERTIFICATION PASSPORTIZATION OF SOYBEAN VARIETIES

**Aim.** To investigate the molecular genetic polymorphism of soybean varieties created in different breeding centers of Ukraine by the loci *Satt100*, *Satt229*, *Satt319*, *Satt354*, *Satt\_365*, *Sat\_038* and to determine whether differentiation, identification and certification of varieties based on MS-analysis on listed loci can be used. **Methods.** DNA extraction, SSR-PCR, electrophoresis in 7% polyacrylamide gels and on ABI PRISM® *Genetic Analyzer 3500* (Applied Biosystems), cluster analysis UPGMA. **Results.** In general, 28 alleles were detected. The most polymorphic locus was *Satt365* – 6 alleles per locus. We did not detect heterozygous plants and heterogeneous soy varieties for studied loci. **Conclusions.** All varieties have been clearly differentiated on the dendrogram, that allows to offer an individual genetic formula for each of the varieties and recommend these microsatellite markers for use in the certification and registration of soy varieties.

**Keywords:** soybean, molecular genetic polymorphism, microsatellite loci.