

УДК 577.21:633.33

ДНК-ФИНГЕРПРИНТИНГ СОРТОВ СОИ КАЗАХСТАНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ SSR-МАРКЕРОВ

С.И. Аbugалиева, Л.А. Волкова, А.А. Нурланова, А.С. Жанпейсова, Е.К. Туруспеков

Институт биологии и биотехнологии растений КН МОН РК, г. Алматы, Казахстан
absaule@yahoo.com

Соя является важной зернобобовой культурой в мире, в том числе в Казахстане. Селекции и семеноводству этой культуры последние годы придается особое внимание вследствие ее высокого экономического значения. Изучение генетического разнообразия и характеристика сортового генофонда Казахстана проводилась в основном только с использованием морфологических и биохимических маркеров. Однако развитие методов молекулярного маркирования позволяет использовать ДНК-маркеры, в том числе микросателлитные маркеры, как надежные дескрипторы для различения сортов, паспортизации, генетического картирования, молекулярной селекции и др. Целью данной работы было изучение генетического разнообразия 15 сортов и 22 перспективных линий сои казахстанской селекции с использованием 50 SSR-маркеров. Проведена сравнительная оценка полиморфизма коллекции сои, состоящей из 15 сортов и 22 перспективных линий сои казахстанской селекции и 10 зарубежных сортов на основе использования 50 полиморфных микросателлитных (SSR) маркеров, локализованных во всех 20 хромосомах генома сои. В целом, при изучении 37 генотипов сои было выявлено 167 аллелей, со средним значением 3,44. Средний индекс разнообразия анализируемой коллекции сои Казахстана по Шаннону составил 1.110 и варьировал от 0.349 до 1.562. Среднее значение PIC, индекса информативности маркеров, при анализе 37 сортов и линий сои Казахстана составило 0.613, варьировавшее от 0.198 у Satt102 до 0.782 у Satt181. Установлены генетические расстояния между казахстанскими сортами, которое варьировало от 0,10 до 1,83. На основе подсчета генетических расстояний между сортами построена дендрограмма по методу UPGMA, отражающая филогенетические различия анализируемых сортов сои Казахстана и зарубежных сортов. Кластерный анализ дифференцировал сорта сои Казахстана, США и Японии на три кластера соответственно их географическому происхождению. Разработан генетический паспорт для каждого коммерческого сорта сои Казахстана на основе использования SSR-профилей.

Ключевые слова: соя, *Glycine max*, генетическое разнообразие, микросателлиты, SSR-маркеры, индекс информативности маркеров (PIC).

ВВЕДЕНИЕ

Соя (*Glycine max* (L.) Merrill) является самой важной зернобобовой культурой в мире, в том числе в Казахстане [1]. На территории республики соя возделывается на площади около 85 тыс. гектар. Постоянное возрастание значения сои в мировой экономике обусловлено комплексом ценных свойств культуры и ее многоцелевым использованием. Семена культурной сои содержат обычно 38-42% белка с варьированием этого показателя от 30 до 50%; 18-25% масла (при этом не содержат холестерина); 10-25% углеводов, а также различные микро- и макроэлементы.

В настоящее время в мире существуют банки генетических ресурсов растений, в том числе сохраняющие ГРП зернобобовых культур. Одним из таких учреждений, держателей больших коллекций, в особенности дикорастущих сородичей, является Институт растениеводства им. Н.И. Вавилова (г. Санкт-Петербург, Россия) [2]. В Институте растениеводства им. В.Я. Юрьева в лаборатории генетических ресурсов зернобобовых и крупяных культур сформированы коллекции 5 наиболее востребованных культур: горох (2127 образцов – на 1.01.2009 г.), соя (1938), фасоль (1948), нут (1579) и чечевица (877 образцов) [3]. В Казахстане пока отсутствует Национальный генбанк, вследствие генетические ресурсы сохраняются и изучаются в различных НИУ МСХ РК и МОН РК [4]. При этом селекция, пополнение, изучение и сохранение коллекций сои в течение многих лет успешно осуществляются в КазНИИ земледелия и растениеводства (КазНИИЗиР) и некоторых других учреждениях КАИ МСХ РК [5]. Селекция и семеноводство сои в Казахстане осуществляется более 30 лет [6]. При этом Государственный реестр селекционных достижений Республики Казахстан на протяжении многих лет, наряду с российскими и украинскими сортами, среди «казахстанского содержания» включает только сорта сои селекции КазНИИЗиР [7]. За это время селекционерами этого учреждения (Карягин Ю.Г., Жанысбаев Б., Дидоренко С.) создано более двадцати сортов сои, десять из которых, в

соответствии с данными госреестра 2013 года, официально допущено к использованию на территории страны [7].

Изучение генетического разнообразия и паспортизация ценных сортов и форм важных сельскохозяйственных культур являются обязательными условиями успешного сохранения и использования различных сортов сельскохозяйственных видов растений и проводятся во многих научных центрах мира. В Казахстане эти работы до недавнего времени были основаны, в основном, на использовании морфологических, физиологических и биохимических параметров [8]. В настоящее время, в преддверии вступления страны в ВТО и UPOV (*Union Internationale pour la protection des obtentions vegetales* – Международный союз по охране новых сортов растений), работы по документированию и регистрации сортов, как селекционных достижений, регламентируются Постановлением Правительства Республики Казахстан «Правила проведения сортоиспытания сельскохозяйственных растений» от 28 августа 2008 г. [9], Законом РК от 13 июля 1999 г. «Об охране селекционных достижений» [10], Законом РК «О семеноводстве» (от 8 февраля 2003 г.) [11]. Исследования в этой области обеспечат улучшение охраны селекционных достижений и прав селекционеров, повышение конкурентоспособности сортов важнейших зернобобовых культур и повысит уровень продовольственной безопасности страны.

В настоящее время во многих центрах мира идут интенсивные исследования по поиску и применению эффективных типов ДНК-маркеров с целью их использования для изучения генетического разнообразия, инвентаризации, генотипирования и документирования сортов, генетического картирования и выявления генов, ответственных за полезные признаки, улучшения селекционных программ, защите прав селекционеров [12]. До недавнего времени в этих целях широко использовались морфологические и биохимические маркеры. Для лабораторной оценки сортовой чистоты и сортового соответствия (подлинности) семян сельскохозяйственных растений широко применяются методы, основанные на электрофоретическом анализе полиморфных запасных белков семян [13].

ДНК-маркеры являются более информативными, стабильными и надежными в сравнении с педигри и морфологическими маркерами [14]. Однако такие работы по изучению генетического разнообразия зернобобовых культур (сое, нуту и др.) с использованием ДНК-маркеров в Казахстане либо до сих пор не проводились, либо были единичными [15].

Ранее, в целях генотипирования генетических ресурсов растений, широко использовались неспецифичные типы ДНК-маркеров, такие как RAPD [16], SCAR, ISSR [17], AFLP [18] и др. К сожалению, информативная ценность этих сравнительно дешевых типов ДНК-маркеров является достаточно низкой и неэффективной в силу их неспецифичности и плохой воспроизводимости в различных лабораториях, для них зачастую отсутствует информация по хромосомной локализации, они не являются кодоминантными типами маркеров, что затрудняет их использование в генетических исследованиях.

Одним из наиболее используемых и эффективных типов маркеров являются микросателлитные ДНК-маркеры, или SSR (*Simple Sequence Repeats* – простые повторяющиеся последовательности). Их преимущества над другими типами молекулярных маркеров заключаются в том, что они воспроизводимы, имеют высокий уровень полиморфизма, кодоминантны, могут быть легко детектированы с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и обычно известна информация об их локализации [19].

SSR-маркеры широко используются в изучении генетического разнообразия сои [20], [21]. В ряде работ высокий уровень полиморфизма SSR-локусов был показан как по количеству аллелей на локус, так и по индексу генетического разнообразия [22], [23]. Эти исследования показали, что лишь небольшое количество генотипов внесло вклад в большинство существующих сортов, и что генетическое разнообразие элитного пула сои лимитировано [24].

Целью данного исследования было изучение генетического разнообразия генофонда сои Казахстана с использованием микросателлитных маркеров для дальнейшего использования полученных результатов в селекции, в том числе молекулярной, а также при патентовании и регистрации вновь созданных или интродуцированных сортов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследований служили 15 сортов и 22 перспективные линии сои (*Glycine max* L.Merr.) Казахстана, предоставленные лабораторией масличных культур КазНИИЗиР [5], а также американские (6) и японские (4) сорта. В таблице 1 приведена информация по отечественным сортам сои, включающая год допуска сорта к использованию в Республике Казахстан, происхождение, учреждение-оригинатор и область допуска.

Выделение тотальной ДНК из 7-дневных проростков проводили по стандартной методике DeLaporta с модификациями [25].

Для работы использовано 50 пар праймеров, большинство из которых разработаны и описаны Stepan et al. (1999) [26], представлены в таблице 2. Большинство SSR-праймеров имели мотив АТТ или АТ.

Реакционная среда для SSR-амплификации включала 0,2 мМ каждого dNTP, 250 мкМ каждого праймера, 0,5-1,5 мМ MgCl₂, 1 ед. Taq-полимеразы, 30-50 ng исследуемой ДНК. Для проведения

полимеразной цепной реакции (ПЦР) применяли следующие температурные режимы: начальная денатурация тотальной ДНК при 94°C в течение 1 мин., последующие 30-40 циклов (94°C – 1 мин., 50-62°C – 30-60 сек., 72°C – 1 мин.); заключительная элонгация при 72°C – 7 мин. ПЦР проводили на термоамплификаторе *Veriti (Applied Biosystems)*. Количество циклов и температура отжига зависели от используемых праймеров.

Продукты ПЦР-амплификации разделяли электрофоретически в 6%-ном акриламидном геле в трис-ЭДТА-боратном буфере pH 8,0 и визуализировали с использованием бромистого этидия при помощи геле-документирующей системы *Bio-Rad*.

Таблица 1. Список сортов сои Казахстана, использованных в SSR-анализе

Название сорта (линии)	Год допуска	Происхождение	Учреждение-оригинатор	Область допуска
Алматы	2006	и.о. из Родник x Violeta	КазНИИЗиР	Алматинская, Кызылординская, ЮКО
Вита	2008	и.о. из Wilkin x Evans	КазНИИЗиР	Алматинская, ЮКО
Гибридная 670	нет	и.о.	КазНИИЗиР	Алматинская, Жамбылская
Жалпаксай	2003	и.о. из Erliht Prolific x Evans	КазНИИЗиР; Украинский НИИ орошаемого земледелия	Восточно-Казахстанская
Казахстанская 2309	1992	и.о. из Bayson x Южанка	КазНИИЗиР	Алматинская, Жамбылская
Ласточка	2011	и.о. из местной поп. №122159а	КазНИИЗиР	Алматинская
Мисула 1092	2007	и.о. из Чайка (ВНИИМК) x Merrit (Канада)	КазНИИЗиР; с-з им. Томаровского; Талгарский сельхоз. техникум	ЮКО
Надежда	нет	и.о. из интрод. популяции 142031	КазНИИЗиР	нет
Нина	нет	*	КазНИИЗиР	нет
Радость	2010	К8850 x Гибридная 670	КазНИИЗиР	Алматинская
Риза	нет	*	КазНИИЗиР	*
Эврика 357	1988	Bayson x Merrit (Канада)	КазНИИЗиР; с-з им. Томаровского; Талгарский с/х техникум	Алматинская, Жамбылская
Жанся	2012	и.о. из Dekabig	КазНИИЗиР	Алматинская
КП Карягина	нет	*	КазНИИЗиР	нет
Перизат	2013	*	КазНИИЗиР	нет
Примечание: * - нет данных				

Индекс информативности маркеров PIC (*polymorphism information content*) вычисляли по формуле:

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

В работе также использованы статистические программы, основанные на методах для определения генетических расстояний и генетического разнообразия (PopGene32, UPGMA – *Unweighted Pair-Group Methods*) [27], [28].

Таблица 2. Список праймеров, использованных для микросателлитного анализа сортов и линий коллекции сои

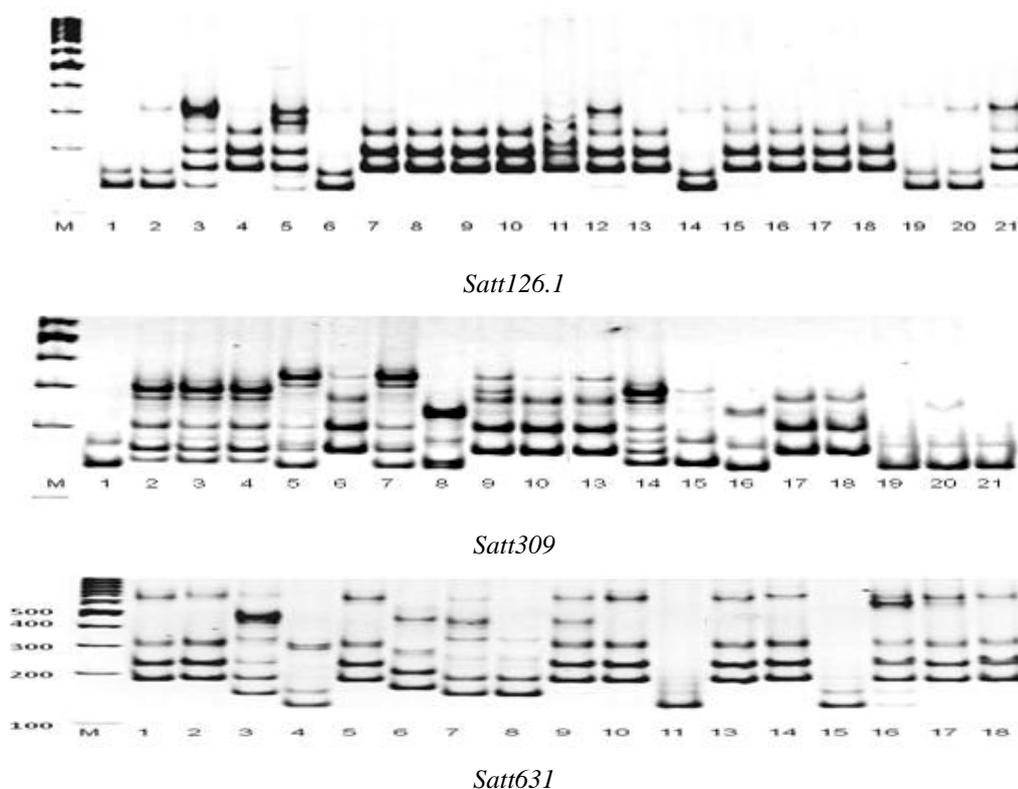
№	Маркер	Хромосома	№ хро- мосомы	Праймер F	Праймер R	Мотив
1	Sat_413	D1a	1	GCGCTCCCTTCTTTTCCACTGAATTGA	GCGTTTCTCTCGGTTTCTCTCTTCTTATTA	'(AT)35
2	Satt321	D1a	1	CACCGTCGTA AAAACTGTGTCGT	GCGTGTCAAAGAGTTT TAGACATC	(ATT)14
3	Satt532	D1a + Q	1	GCGCCAATATTATCATGCTTTATGT	GCGTGTAAAAATCTTTGAATCTTGA	(ATT)15
4	Satt041	D1b	2	TGTTGTGTGGCTTTATTATT	TTAAGGTGGGATATGGTC	(ATT)17
5	Satt005	D1b+W	2	TATCCTAGAGAAGA ACTAAAAA	GTCGATTAGGCTTGAAATA	(ATT)19
6	Satt141	D1b + W	2	CGGTGGTGGTGTGCATAATAA	CCGTCATAAAAAGTCCCTCAGAAT	(ATT)26
7	Satt631	N	3	GGTAGATCCAGGAGCTTGAGTCAG	GCGCATCTCACTGCACTTGATTTT	(ATT)21
8	AW277661	C1	4	GCGCATGGAGCATCATCTTCATA	GCGAGAAAACCAATCTTTATATCAATA	(ATT)23
9	Satt161	C1	4	GGGTATATCAACATATCTTCACSTTTTT	GGGCTGCTTGTTAATGTTTTGTAGA	(ATT)11
10	Satt194	C1	4	GGGCCAACTGATATTTAATTGTAA	'GCGCTTTGTGTTCCGATTTTGAT	(ATT)23
11	AZ536570	A1	5	GCGAATTAAGGCAAAAAGGAAAA	GCGAATTAAGGCAAAAAGGAAAA	(AT)12
12	Sat_374	A1	5	GCGTTGAAACCGTTATAAACCAACTCA	GCGCTTTATTGGCAATACTTTAACTCACAT	(AT)23
13	Sat_263	C2	6	GCGGTTCGATCGTTTCAATTAGTATG	GCGCTGGCAGCCCTTTATTATC	(AT)17(TC)6
14	Satt286	C2	6	GCGGCGTTAATTTATGCCGAAA	GCGTTGGTCTAGAATAGTTCTCA	(ATT)17
15	Satt307	C2	6	GCGCTGGCCTTTAGAAC	GCGTTGTAGGAAATTTGAGTAGTAAG	(ATT)12
16	Satt681	C2	6	GCGGTGCACTTGTCAATCTGTT	GCGGTGAGGCATATGTCAGTC	(ATT)20
17	Sat_003	M	7	TGATTTTTGGTGTAGAACTC	CAAATTGGTTAGCTTACTCCA	(AT)21
18	Satt308	M	7	GCGTTAAGGTTGGCAGGGTGGAAGTG	GCGCAGCTTTATACAAAATCAACAA	(ATT)21
19	AW132402	A2	8	GCGCCTCCCTCCTCTCTTTCTT	GCGTTCCACATATCTATCATTTGTT	(AT)17
20	Satt329	A2	8	GCGGGACGCAAAAATTGGATTTAGT	GCGCCGAATAAACGTTGAGA ACTG	(ATT)23
21	Satt102	K	9	CACCTTGCTTCAAAATTC	AATAAGTGAGAGCATAGAAAATAC	(ATT)11
22	SOYPRP1	K	9	CGTGCCAAATTACATCA	TGATGGGAACAAGTACATAA	(ATT)20
23	BF008905	O	10	GCGTCTGGCTCTTCA	GCGAGCAGTGATGTTGTT	(GCA)9
24	Sat_282	O	10	GCGTCCCGATGATTCTTGGATCTA	GCGCGATTCTTGCCACTGTATTT	(AT)21
25	Satt173	O	10	TGCGCCATTTATTCTTCA	AAGCGAAATCACCTCCTCT	(ATT)18
26	BE806308	B1	11	GCGATTTGACCCCGTTTCATACAT	GCGGCAGAAATCCGCTCTCTTTA	(AT)18
27	Satt197	B1	11	CACTGCTTTTTCCCCTCTCT	AAGATACCCCAACATTATTTGTAA	'(ATT)20
28	Satt509	B1	11	GCGCTACCGTGTGGTGGTGTGCTACCT	GCGCAAGTGGCCAGCTCATCTATT	(ATT)30
29	Satt181	H	12	TGGCTAGCAGATTGACA	GGAGCATAGCTGTTAGGA	(ATT)18

Продолжение таблицы 2

№	Маркер	Хромосома	№ хро- мосомы	Праймер F	Праймер R	Мотив
30	Satt353	H	12	CATACACGCATTGCSTTTCTGAA	GCGAATGGGAATGCSTTCTTATTCTA	(ATT)16
31	BE806387	F	13	GCGACCCCTTTTGTCTTCTT	GCGGAGGCCAGAGATGAA	(CTT)14
32	Satt030	F	13	AAAAAGTGAACCAAGCC	TCTTAAATCTTATGTTGATGC	(ATT)21
33	Satt149	F	13	TTGCACATTCTTTTTGGTAAACAGTCATAA	GTTGGAGGCCATAGTCACATTAATCTTAGA	(ATT)17
34	Satt335	F	13	CAAGCTCAAGCCTCACACAT	TGACCAGAGTCCAAAGTTCATC	(ATT)12
35	AW620774	B2	14	GCGATTTCCCCTCTTACTC	GCGAAAAACCAAGTTC	(CTT)9
36	Satt126	B2	14	GCTTGGTAGCTGTAGGAA	ATAAAACAAATTCGCTGATAT	'(AAT)18
37	BE347343	E	15	GCGCAAGCACTGAATGTCA	GCGTCACTAACACCTATAACA	(GA)18
38	Satt045	E	15	TGGTTTCTACTTTCTATAATTATTT	ATGCCTCTCCCCTCT	(ATT)18
39	Satt263	E	15	CACCCAATCATGATAGCATTTTAT	CTCATGGAATTGTCTTTCAGTTTC	(ATT)19
40	AW310961	J	16	GCGCAACTTTTTAGTAAATATTGCATAA	GCGCATACATCTTTTGGGATTTCT	(ATT)16
41	Sct_001	J	16	TTAAGTTTCCCTCTCTCTCT	CTTGTTCCCTTCGCTCAC	(CT)13
42	Satt002	D2	17	TGTGGGTA AAAATAGATAAAAAT	TCATTTTGAATCGTTGAA	(ATT)25 /
43	Satt031	D2	17	TTCCACTTTGTATCACTTTC	TGACTGTAAAAGAACAGATAAA	(ATT)12
44	Satt012	G	18	GCAATTAGTTTTAAAATGTTTC	AGAATAGAGCCTACATATAATCATA	(ATT)19
45	Satt309	G	18	GCGCCTTCAAATTGGCGTCTT	GCGCCTTAAATAAAACCCGAAACT	(ATT)13
46	Satt610	G	18	'CCCTCCGCAAGCAATAATTAATCT	'GCGGAATGCTTCCATTTTAT	(ATT)12
47	AW508247	L	19	GCGCCAATCCAATCTCAC	GCGAAGCCAATAAATGATAAAAATC	(CTT)10
48	Satt388	L	19	GCGTAACTGGTATTTTTAGAACAAAAGT	GCGTCTGGGACTGGATTTATTGTTTGAA	(ATT)14
49	Sct189	I	20	CTTTCTGGCAATGAT	AAAATCGCAAAACCTTAGT	(CT)17
50	Sat_420	I	20	GCGGATGGAGCCAACA	GCGTGTAGCCCTAGAAAAGTT	(AT)19

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генетическое разнообразие сортов и перспективных линий сои Казахстана изучали с использованием 50 полиморфных микросателлитных (SSR) маркеров, локализованных во всех 20 хромосомах генома сои. В результате микросателлитного анализа были получены электрофоретические профили для каждого сорта по всем 50 SSR-маркерам, примеры некоторых из них приведены на рисунке 1.



М - маркер молекулярных весов (Fermentas, 100 bp), 1-18 – сорта сои: 1 – Алматы; 2 – Вита; 3 - Гибридная 670; 4 – Жалпаксай; 5 - Казахстанская 2309; 6 – Ласточка; 7 – Мисула; 8 – Надежда; 9 – Нина; 10 – Радость; 11 – Риза; 12 – Эврика 357; 13 – Жансая; 14 – КСИ-103-1; 15 – КСИ 2010; 16 – КСИ 234-1; 17 – КСИ 256; 18 - КСИ 107-13

Рис. 1. Электрофореграммы сортов сои Казахстана по SSR-маркерам *Satt126.1*, *Satt309*, *Satt631*

Для всех изученных 50 маркеров было всего идентифицировано 167 аллелей, что в среднем составило 3,4 аллеля на маркер (таблицы 3 и 4). Количество аллелей варьировало от 2 (*Satt002*, *Satt041*, *Satt102*, *Satt126* и *Satt353*) до 5 (*Satt181*) (таблица 4). Количество аллелей на локус коррелировало со степенью полиморфности маркера ($r=0,66^{**}$). При этом количество эффективных аллелей варьировало от 1,25 до 4,58 со средним значением 2,77 (таблица 3).

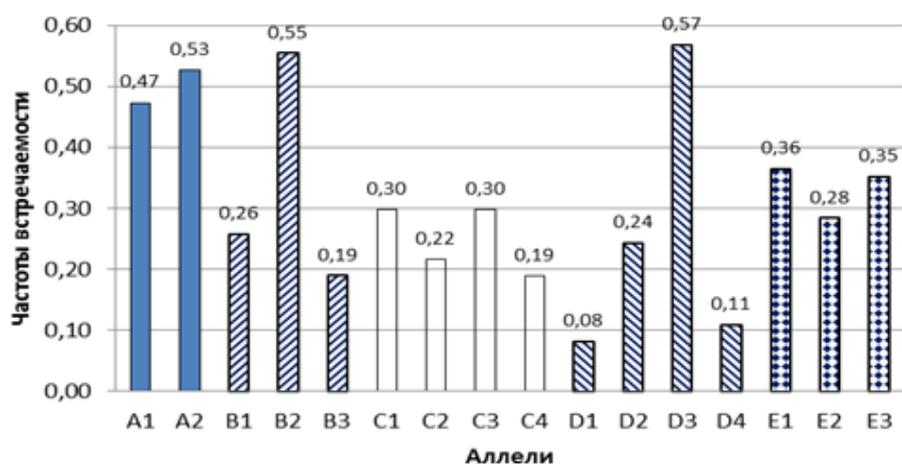
Полиморфизм, выявленный в данном исследовании, соответствует работам других авторов [20], [22]. Priolli et al. (2002), анализируя бразильские сорта сои, обнаружили 8 аллелей (в пределах 150-200 bp) для *Satt005*, по 4 аллеля для *Satt335* (150-175 bp) и *Satt309* (125-175 bp) [24]. При оценке генетического разнообразия и родства 25 генотипов сои из Таиланда, Tantasawat et al. (2011) выявили 5 аллелей (144, 147, 153, 165 и 168 bp) для *Satt005*, 3 аллеля (128, 134 и 149 bp) для *Satt309* и 5 аллелей для *Satt183* [23]. Narvel et al. (12), анализируя интродуцированные и элитные сорта сои, наблюдали 4 аллеля для *Satt183*, 5 аллелей для *Satt309* и 9 для *Satt005* [20].

Для каждого анализируемого SSR-локуса были определены частоты встречаемости аллелей. Только для 22 аллелей из 167 отмечена частота выше 50% (0,5) (таблица 3).

Таблица 3. Ранжирование аллелей по их частоте встречаемости и процентное соотношение для 37 анализированных сортов и линий сои Казахстана

Частота встречаемости (ЧВ) аллелей, %	Количество аллелей	Процент от всего анализированного генетического пула
ЧВ<10	10	6,0
10<ЧВ<25	79	47,3
25<ЧВ<50	56	33,5
ЧВ>50	22	13,2
Итого	167	100

На рисунке 2 в качестве примера приведены частоты встречаемости аллелей локусов *Satt126*, *AW277661*, *Satt161*, *Satt194* и *Satt309*.



A – *Satt126*; B – *AW277661*; C – *Satt161*; D – *Satt194*; E – *Satt309*

Рис. 2. Частоты встречаемости аллелей микросателлитных локусов *Satt126*, *AW277661*, *Satt161*, *Satt194*, *Satt309* у сортов сои селекции КазНИИЗиР

Информационный индекс Шеннона [28] варьировал в пределах 0,349-1,562, среднее значение равнялось 1,110 (таблица 4). Среднее значение PIC, индекса информативности маркеров, при анализе сортов и линий сои составило 0,613, варьировавшее от 0,198 у *Satt102* до 0,782 у *Satt181*. Для коммерческих сортов этот индекс был ниже (0,526). Это может свидетельствовать в пользу того, что, вероятно, при создании изучаемых 22 перспективных линий (возможно, некоторых из них) был использован более разнообразный генетический пул. В целом, полученные данные соответствуют результатам, полученным разными исследователями при изучении полиморфизма азиатской [22],[23], американской [24], европейской сои [29], [30].

Наиболее информативными маркерами (PIC выше, чем 0,740) в наших исследованиях оказались *Satt161*, *Satt681*, *Satt018*, локализованные на хромосомах C1, C2 и H, соответственно.

Таблица 4. Оценка уровня полиморфизма SSR-локусов у 37 сортов и линий сои Казахстана

Маркер	Количество аллелей	ne*	I*	PIC*
AW132402	4	3,28	1,278	0,695
AW277661	2	2,45	0,991	0,591
AW310961	3	2,28	1,078	0,562
AW508247	2	2,22	0,866	0,549
AW620774	2	1,58	0,555	0,368
AZ536570	3	2,73	1,127	0,634
BE347343	2	2,82	1,164	0,646
BE806308	3	2,33	1,145	0,571

BE806387	4	2,83	1,192	0,647
BF008905	3	2,18	0,922	0,541
Sat_003	4	3,13	1,220	0,681
Sat_263	4	2,70	1,166	0,630
Sat_282	3	2,83	1,197	0,647
Sat_374	3	2,99	1,238	0,665
Sat_420	3	3,13	1,246	0,680
Satt002	2	1,72	0,609	0,418
Satt005	4	3,19	1,251	0,687
Satt012	3	1,76	0,735	0,431
Satt030	3	2,44	0,960	0,590
Satt031	3	1,98	0,918	0,495
Satt041	2	1,99	0,928	0,498
Satt045	3	2,76	1,112	0,637
Satt102	2	1,25	0,349	0,198
Satt126	2	1,99	0,692	0,499
Satt141	4	3,65	1,335	0,726
Satt149	4	3,15	1,242	0,682
Satt161	5	3,86	1,367	0,741
Satt173	4	3,07	1,228	0,674
Satt181	5	4,58	1,562	0,782
Satt194	3	2,50	1,110	0,600
Satt197	3	2,12	0,964	0,529
Satt263	4	3,71	1,343	0,731
Satt286	5	3,81	1,431	0,738
Satt307	4	3,12	1,292	0,680
Satt308	4	3,04	1,260	0,671
Satt309	3	2,97	1,093	0,663
Satt321	3	2,70	1,115	0,630
Satt329	3	2,61	1,106	0,617
Satt335	3	1,87	0,734	0,464
Satt353	2	2,11	0,798	0,526
Satt388	4	2,33	1,145	0,571
Satt509	3	2,71	1,175	0,631
Satt532	5	3,81	1,413	0,738
Satt610	3	2,52	1,161	0,603
Satt631	4	3,07	1,252	0,674
Satt681	5	4,52	1,561	0,779
Sct_001	3	2,47	1,021	0,595
Sct_189	4	3,15	1,242	0,682
Sct_413	4	3,13	1,324	0,681
Soypr-p1	4	3,21	1,264	0,688
Mean	3,44	2,77	1,110	0,613
St.Dev.	0,993	0,70	0,248	0,110
Примечание: A – количество аллелей на локус; ne – эффективное количество аллелей; I – информационный индекс Шеннона; PIC – индекс информативности маркеров; St.Dev. – стандартное отклонение				

Генетические расстояния между анализируемыми сортами сои варьировали от 0,10 до 1,83. На основе подсчета генетического расстояния построена дендрограмма по методу UPGMA, отражающая филогенетические различия коммерческих сортов сои Казахстана в сравнении с зарубежными сортами (рисунок 3). Кластерный анализ (UPGMA) показал, что анализируемые генотипы сформировали два основных кластера, которые соответствуют географическому происхождению сортов.

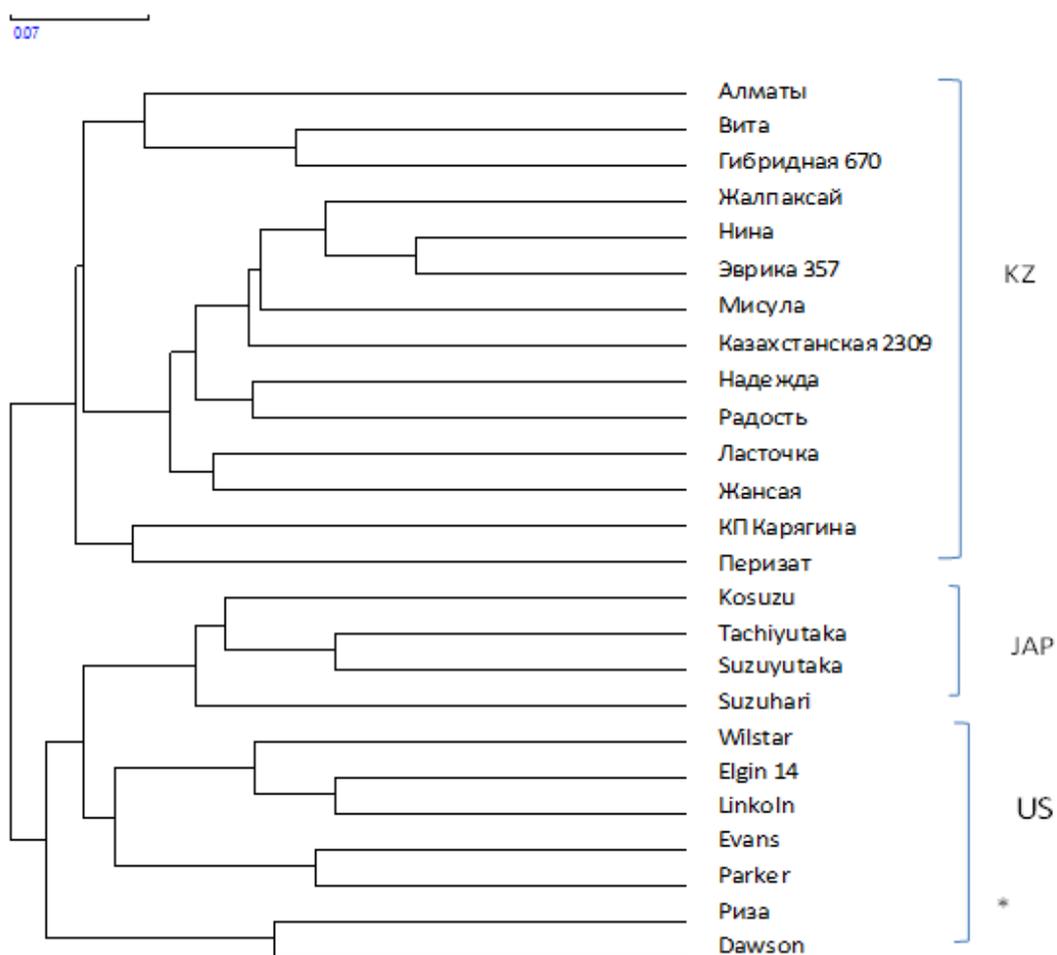
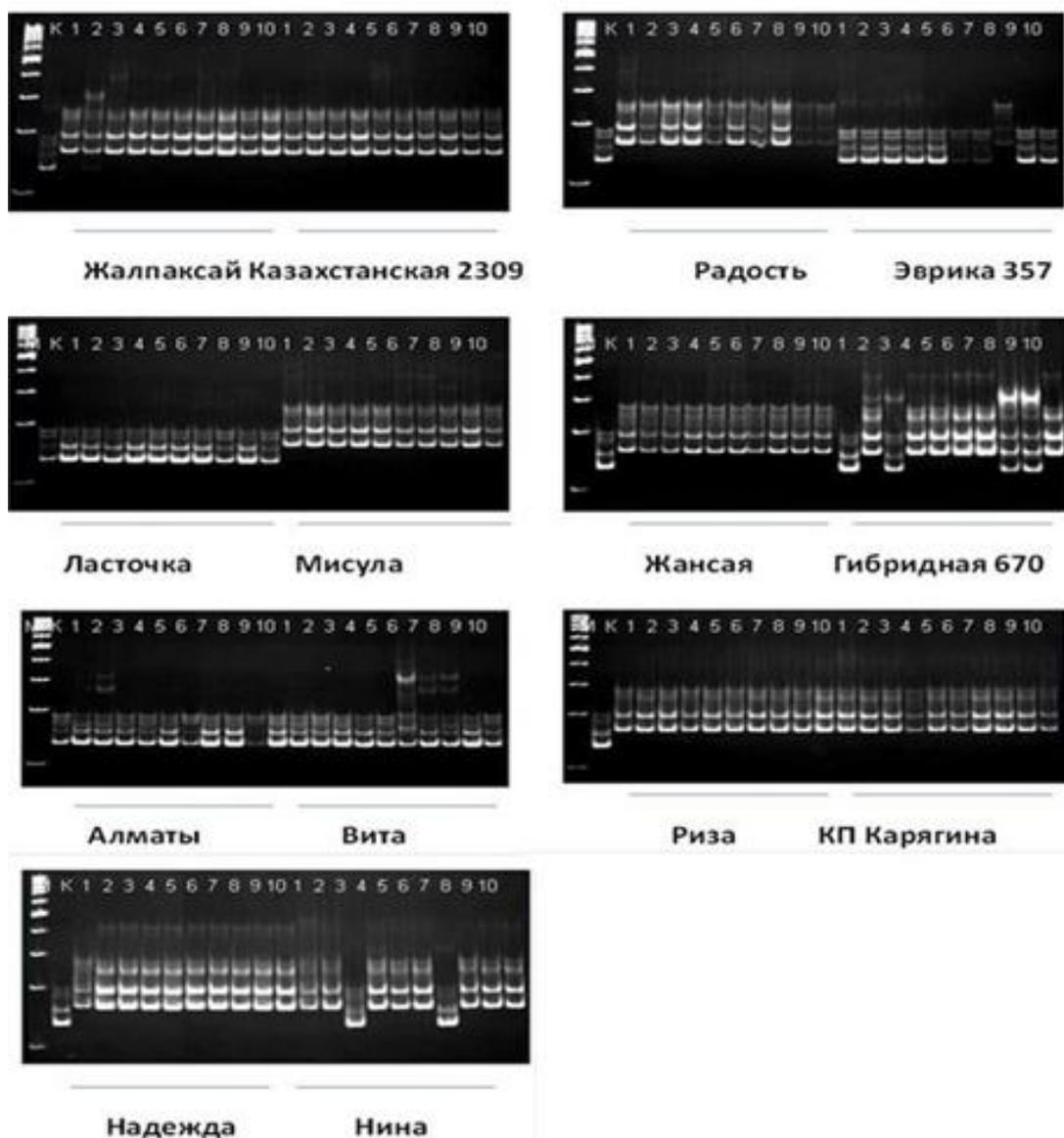


Рис. 3. Филогенетическое древо сортов сои Казахстана на основе использования 50 SSR-маркеров

Поскольку соя является самоопыляющейся культурой, предполагается, что культивируемые сорта генетически однородны. Тем не менее, имеют место исключения. Для проверки предположения о генетической однородности сортов был исследован внутрисортной полиморфизм сортов сои казахстанской селекции. С этой целью был проведен SSR-анализ ДНК, выделенной индивидуально из 16 проростков каждого сорта.

Осуществлено изучение сортовой чистоты коллекции сортов сои Казахстана, состоящей из 10 сортов казахстанской селекции, допущенных к использованию в Республике Казахстан – Алматы, Вита, Жалпаксай, Казахстанская 2309, Ласточка, Мисула, Радость, Эврика, Жансая, а также 5 перспективных сортов, с использованием микросателлитных маркеров *Satt126.1*, *Satt309*, *Satt631* [31]. Выявлены как полная мономорфность, так и полиморфизм изученных сортов по вовлеченным в анализ маркерам. На рисунке 4 представлены результаты такого исследования на примере маркера *Satt126.1*.



M – маркер молекулярных весов (100 bp ladder, Fermentas); K – сорт Алматы

Рис. 4. Определение «чистоты» сортов сои Казахстана с использованием ДНК-маркеров (на примере *Satt126.1*)

В литературе представлено множество работ по изучению внутривидового генетического разнообразия различных культур растений. Некоторые исследования показали, что относительно небольшого количества SSR-маркеров было достаточно для дискриминации генотипов сои. Использование двенадцати SSR-локусов позволило разделить морфологически сходные группы 186 сортов сои с коэффициентом схожести 0,46 [24]. Однако в некоторых других работах для более надежной оценки генетического пула, включающего большое количество генотипов, было привлечено до нескольких сотен локусов [32]. В данной работе коллекция сортов и линий казахстанской селекции была эффективно дифференцирована с использованием 50 микросателлитных ДНК-маркеров. SSR-маркеры с PIC выше 0,5 рекомендуются для паспортизации сортового генофонда, использования в молекулярной селекции, защите прав селекционеров и др. Для каждого сорта сои Казахстана был разработан генетический паспорт на основе использования 20 наиболее информативных и надежных SSR-маркеров, фрагмент представлен в таблице 5.

Таблица 5. Генетический паспорт коммерческих сортов сои Казахстана (*фрагмент*)

Сорт	Аллели SSR-локусов					
	Sat_374	Satt329	Satt197	Satt509	Satt126	Satt194
Алматы	aa	bb	bb	bb	aa	cc
Вита	aa	bb	bb	aa	aa	cc
Гибридная 670	aa	cc	bb	aa	ab	cc
Жалпаксай	aa	cc	bb	aa	bb	cc
Казахстанская 2309	aa	bb	bb	aa	bb	cc
Ласточка	aa	cc	bb	aa	aa	cc
Мисула	aa	bb	bb	aa	bb	cc
Надежда	bb	bb	bb	aa	bb	bb
Нина	bb	cc	bb	aa	bb	cc
Радость	aa	bb	aa	bb	bb	bb
Эврика 357	bb	bb	bb	aa	bb	bb
Жанся	aa	bb	bb	aa	bb	bb

Таким образом, генофонд сои Казахстана был генетически охарактеризован с использованием 50 микросателлитных маркеров. Полученные результаты могут быть использованы для эффективной дискриминации образцов сои из Казахстана, в усилении селекционных программ и охране прав селекционеров и селекционных достижений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В лаборатории молекулярной генетики растений ИББР продолжают исследования по ДНК-генотипированию сортового генофонда важных сельскохозяйственных культур Казахстана, в том числе коммерческих и перспективных сортов пшеницы, ячменя, сои и др.

Так, в данном исследовании проведены скрининг и оценка генетического разнообразия 15 сортов и 22 перспективных линий сои Казахстана на основе использования 50 микросателлитных (SSR) локусов, локализованных во всех 20 хромосомах генома сои. Для всех изученных маркеров было всего идентифицировано 167 аллелей, что в среднем составило 3,4 аллеля на маркер. Среднее значение PIC, индекса информативности маркеров, при анализе 37 сортов и линий сои Казахстана составило 0,613, варьирувавшее от 0,198 у Satt102 до 0,782 у Satt181. На основе подсчета генетического расстояния построена дендрограмма по методу UPGMA, отражающая филогенетические различия сортового генофонда сои Казахстана. Разработан генетический паспорт для каждого сорта сои Казахстана на основе использования SSR профилей.

Работа выполнена в рамках проекта «Изучение генетического разнообразия и паспортизация коммерческих сортов зернобобовых культур» в рамках Межгосударственной Целевой Программы ЕврАзЭС МГ.0591 «Инновационные биотехнологии» на 2012-2014 годы.

Авторы благодарят лабораторию масличных культур КазНИИЗиР (Карягин Ю.Г., Дидоренко С.) за предоставленный для молекулярно-генетического анализа материал сортов и линий сои казахстанской селекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бойко А.Т., Карягин Ю.Г. Соя – высокобелковая культура. – Алматы: ОАО Vita, 2004. – 18 с.
2. Вишнякова М.А., Бурляева М.О., Сеферова И.В., Никшикина М.А. Коллекция сои ВИР – источник исходного материала для современных направлений селекции // Итоги исследований по сое за годы реформирования и направления НИР на 2005-2010. - Краснодар, 2004. - С. 46-53.
3. Кобызева Л.Н., Безуглая О.Н. Видовое разнообразие зерновых бобовых культур в национальном центре генетических ресурсов растений Украины и его значение для селекционной практики // Генетични ресурси рослин. – 2009. – №7. – С. 9-21.
4. Алимгазинова Б.Ш., Есимбекова М.А. Генетические ресурсы растений Казахстана: состояние и перспективы // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2012. - Т.16(№3). – С. 648-654.
5. Каталог допущенных к использованию сортов и гибридов сельскохозяйственных культур селекции Казахского научно-исследовательского института земледелия и растениеводства. - Алматы: Асылкітап, 2010. - С. 98-107.
6. Карягин Ю.Г., Дидоренко С.В. Результаты сравнительного изучения сортов сои отечественной и зарубежной селекции в условиях юго-востока Казахстана // Материалы Международной конференции

«Достижения и перспективы земледелия, селекции и биологии сельскохозяйственных культур». – Алматы, 2010. – С. 133-135.

7. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию в Республике Казахстан. Сорты растений (Официальное издание). – Алматы, 2013.

8. Abugalieva A.I. Classification of common spring wheat varieties according to genetic quality potential (grain hardness and high molecular weight glutenin subunits) // *Russian Agricultural Sciences*. – 2009. – Vol. 35, №2. – P. 73-76.

9. Постановление Правительства Республики Казахстан. Правила проведения сортоиспытания сельскохозяйственных растений: утв. 28 августа 2008 года.

10. Закон Республики Казахстан. Об охране селекционных достижений: утв. 13 июля 1999 года.

11. Закон Республики Казахстан. О семеноводстве: утв. 8 февраля 2003 года.

12. Календарь Р.Н., Глазко В.И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // *Физиология и биохимия растений*. – 2002. – Т. 34, №4. – С. 279-281.

13. Novoselskaya-Dravovich A., Fisenko A., Yankovsky N., Kudryavtsev A., Yang Q., Lu Z., Wang D. Genetic diversity of storage protein genes in common wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars from China and its comparison with genetic diversity of cultivars from other countries // *Genetic Resources and Crop Evolution*. – 2010. – P. 1-11.

14. Конарев А.В. Использование молекулярных маркеров в решении проблем генетических ресурсов растений и селекции // *Аграрная Россия*. – 2006. – №6. – С. 4-21.

15. Абуғалиева С.И., Волкова Л.А., Жидовинова А.В., Ледовской Ю.С., Турусбеков Е.К. Генотипирование сортов сои Казахстана с использованием ISSR-маркеров // *Вестник КазНУ. Серия биологическая*. – 2010. – №3. – С. 8-11.

16. Xu D.H., Gai J.Y. Genetic diversity of wild and cultivated soybeans growing in China revealed by RAPD analysis // *Plant Breeding*. – 2003. – Vol. 122, №6. – P.503-506.

17. Mudibu J., Nkongolo K.K.C., Mehes-Smith M., Kalonji-Mbuyi A. Genetic Analysis of a Soybean Genetic Pool using ISSR Marker: Effect of Gamma Radiation on Genetic Variability // *International Journal of Plant Breeding and Genetics*. – 2011. – Vol. 5. – P. 235-245.

18. Maras M., Šustar-vožic J., Javornik D., Meglič V. The efficiency of AFLP and SSR markers in genetic diversity estimation and gene pool classification of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) // *Acta agriculturae Slovenica*. – 2008. – Vol. 5. – P. 87-96.

19. Varshney R.K., Graner A., Sorrells M.E. Genic microsatellite markers in plants: Features and applications // *TRENDS in Biotechnology*. – 2005. – Vol. 23, №1. – P. 48-55.

20. Narvel J.M., Fehr W.R., Chu W.C., Grant D., Shoemaker R.C. Simple sequence repeat diversity among soybean plant introductions and elite genotypes // *Crop Science*. – 2000. – Vol. 40. – P. 1452-1458.

21. Guo J., Liu Y., Wang Y., Chen J., Li Y., Huang H., Qiu L., Wang Y. Population structure of the wild soybean (*Glycine soja*) in China: implications from microsatellite analyses // *Annals of Botany*. – 2012. – Vol. 110, №4. – P. 777-785.

22. Abe J., Xu D.H., Suzuki D., Kanazawa A., Shimamoto Y. Soybean germplasm pools in Asia revealed by nuclear SSRs // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2003. – Vol. 106. – P. 445-453.

23. Tantasawat P., Trongchuen J., Prajongjai T., Jenweerawat S., Chaowiset W. SSR analysis of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genetic relationship and variety identification in Thailand // *AJCS*. – 2011. – Vol. 5, №3. – P. 283-290.

24. Priolli R.H.G., Mendes-Junior C.T., Sousa S.M.B., Sousa N.E.A. Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers // *Genetics and Molecular Biology*. – 2002. – Vol. 25. – P. 185-193.

25. Delaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA miniprep. Version II // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 1983. – Vol. 4. – P. 19-21.

26. Cregan P.B., Jarvik T., Bush A.L., Shoemaker R.C., Lark K.G., Kahler A.L., Van Toai T.T., Lohnes D.G., Chung J., Specht J.E. An integrated genetic linkage map of soybean // *Crop Science*. – 1999. – Vol. 39. – P. 1464-1490.

27. Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // *American Journal of Human Genetics*. – 1980. – Vol. 32. – P. 314-331.

28. Magurran A.E. *Measuring Biological Diversity*. Malden, 2004. MA: Blackwell Publishing. – 215 p.

29. Ristova D., Šarčević H., Šimon S., Mihajlov L., Pejić I. Genetic Diversity in Southeast European Soybean Germplasm Revealed by SSR markers // *Agriculturae Conspectus Scientificus*. – 2010. – Vol. 75, №1. – P. 21-26.

30. Suradić A., Vratarić M., Sudar R. Genetic improvement of soybean by modern breeding strategies in region of the Eastern Croatia. *World Soybean Research Conference VIII, Beijing, China, 2009*. – P. 54.

31. Волкова Л.А., Ермекбаев К.А., Абуғалиева С.И., Турусбеков Е.К. Генетическое разнообразие сортов сои Казахстана // «Селекция и генетика сельскохозяйственных растений: традиции и перспективы»: тез. докл. междунауч. конф., посвящ. 100-летию Селекционно-генетического института – Национального центра семеноводения и сортоизучения. – Одесса, 2012. – С. 138-139.

32. Li Y.-H., Li W., Zhang C., Yang L., Chang R.-Z., Gaut B.C., Qiu L. Genetic diversity in domesticated soybean (*Glycine max*) and its wild progenitor (*Glycine soja*) for simple sequence repeat and single-nucleotide polymorphism loci // *New Phytologist*. – 2010. – Vol. 188. – P. 242-253.

SSR-МАРКЕРЛЕРІН ПАЙДАЛАНУ АРҚЫЛЫ ҚАЗАҚСТАН СОЯСЫНЫҢ СОРТТАРЫН ДНҚ-ФИНГЕРПРИНТИНГТЕУ

С.И. Әбуғалиева, Л.А. Волкова, А.А. Нұрланова, А.С. Жанпейісова, Е.К. Тұрыспеков

ҚР БҒМ ҒК Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты, Алматы қаласы, Қазақстан

ТҮЙІН

Соя әлемде, соның ішінде Қазақстанда маңызды бұршақты дәнді дақыл болып табылады. Оның экономикалық маңыздылығы жоғары болғандықтан, соңғы жылдары бұл дақылдың селекциясы мен тұқым шарушылығына ерекше

көңіл бөлінеді. Қазақстанның генетикалық алуан түрлілігін зерттеу және сорттық тектік қорын сипаттау негізінен тек морфологиялық және биохимиялық маркерлерді қолдану арқылы ғана жүргізілді.

Алайда, молекулалық маркерлеу әдістерінің дамуы сорттарды айыру, паспорттау, генетикалық картирлеу, молекулалық сұрыптау және басқалары үшін ДНҚ-маркерлерін, соның ішінде микросателлитті маркерлерді сенімді дескрипторлар ретінде пайдалануға мүмкіндік береді. Аталған жұмыстың негізгі мақсаты, сояның қазақстандық селекциясының 15 сорты мен 22 перспективті сорттармақтарының генетикалық алуан түрлілігін 50 SSR маркерлерін қолдану арқылы зерттеу болды. Соя геномының барлық 20 хромосомасында орналасқан, 50 көптірлі микросателлитті (SSR) маркерлерді пайдалану негізінде сояның қазақстандық селекциясының 15 сорты мен 22 перспективті сорттармақтарынан және 10 шетелдік сорттардан тұратын соя коллекциясының көптірлілігін салыстырмалы бағалау жүргізілді. Тұтас алғанда, сояның 37 генотипін зерттеген кезде 167 аллель анықталды, орташа мәні 3,44. Қазақстан соясының зерттелген коллекциясының алуан түрлілігінің орташа индексі Шаннон бойынша 1.110 құрады және 0.349-дан 1.562-ге дейін өзгеріп тұрды. PIC-тің, яғни маркерлердің ақпараттық индексінің орташа мәні, Қазақстан соясының 37 сорттары мен сорттармақтарын талдаған кезде 0.613 құрап, Satt102-де 0.198-ден Satt181-де 0.782-ге дейін өзгеріп тұрды. Сорттар арасындағы генетикалық арақашықтықты есептеу негізінде талданған Қазақстан соясы сорттарының және шетелдік сорттардың филогенетикалық айырмашылығын көрсететін, UPGMA әдісі бойынша дендрограмма жасалды. Кластерлік талдау Қазақстан, АҚШ пен Жапония соясының сорттарын олардың географиялық шығу тегіне сәйкес үш кластерге саралап жіктеді. SSR-профильдерді пайдалану негізінде Қазақстан соясының әрбір коммерциялық сорты үшін генетикалық паспорт жасалды.

Негізгі сөздер: соя, *Glycine max*, генетикалық алуан түрлілік, микросателлиттер, SSR-маркерлер, маркерлердің ақпараттық индексі (PIC).

DNA-FINGERPRINTING OF SOYBEAN VARIETIES IN KAZAKHSTAN USING SSR-MARKERS

S.I. Abugaliyeva, L.A. Volkova, A.A. Nurlanova, A.S. Zhanpeissova, E.K. Turuspekova

Institute for Plants Biology and Biotechnology, the Science Committee, Ministry of Education and Science, Almaty, Kazakhstan
absaule@yahoo.com

ABSTRACT

Soybean is an important agricultural crop in the world, including in Kazakhstan. Due to high economic value of this crop, over the last years the special attention has been given to breeding and seed production. Previously, genetic diversity and description of cultivated germplasm of soybean in Kazakhstan were done basically with use of morphological and biochemical markers. However, development of molecular marker methods allows using of DNA markers, including microsatellites as a reliable tool for cultivar differentiation, passportization, genetic mapping, molecular breeding, and etc. The purpose of this work was to study genetic diversity of 15 cultivars and 22 perspective lines of soybean from Kazakhstan and 10 cultivars from abroad based on use of 50 SSR markers that genetically mapped in all 20 soybean chromosomes. In total, 167 alleles have been identified for 37 genotypes from Kazakhstan with, in average, 3.44 alleles per SSR marker. Average index of diversity by Shannon for the studied collection of soybean from Kazakhstan was 1.110 and varied from 0.349 to 1.562. Average PIC index (polymorphism information content) for 37 cultivars and perspective lines of Kazakhstan was 0.613 and varied from 0.198 for Satt102 to 0.782 for Satt181. The genetic distances, determined for Kazakh cultivars, varied from 0.10 to 1.83. The UPGMA phylogenetic tree was constructed based on the determined genetic distances among the cultivars and reflected differences between local and foreign accessions. The phylogenetic analysis separated cultivars from Kazakhstan, USA, and Japan to three clusters in accordance with their geographic origination. There has been developed genetic passport for each commercial cultivar of Kazakhstan based on use of SSR profiles.

Keywords: soybean, *Glycine max*, genetic diversity, microsatellites, SSR markers, polymorphism information content.