

УДК 602.6:633.34

Присяжнюк Л. М., Шитікова Ю. В., Волчков О. О.

Український інститут експертизи сортів рослин, вул. Генерала Родимцева, 15, м. Київ, 03041, Україна, e-mail: prysiazhniuk_l@ukr.net

ВИВЧЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ СОРТІВ СОЇ ЗА SSR-МАРКЕРАМИ

Соя (*Glycine max* (L.) Merril) є цінною продовольчою і кормовою культурою та посідає провідне місце серед зернобобових культур. Її вирощують більш ніж у сорока країнах світу. Враховуючи стрімке розширення посівних площ та зростання кількості сортів сої вітчизняної та зарубіжної селекції актуальним є розробка ефективних методів аналізу генетичного різноманіття, що дадуть можливість диференціювати сорти та виявляти їх генетичну спорідненість. Найзручнішими для опису генотипів є молекулярно-генетичні маркери, тобто запасні білки, ізоферменти і поліморфні фрагменти ДНК.

На сьогодні розвиток знань про організацію геному, дозволяє використовувати для досліджень поліморфізму клас повторювальної ДНК, яка складає суттєву частину геному еукаріот та локалізована у всіх хромосомах. Дослідження останніх десятиліть свідчать про доцільність використання молекулярних маркерів на основі поліморфізму мікросателітних послідовностей ДНК або SSR (simple sequence repeats) для диференціації та ідентифікації сортів рослин.

Метою було дослідити молекулярно-генетичний поліморфізм сортів сої різного походження для створення маркерної системи з високою диференційною здатністю, придатної для їх ідентифікації та з використанням отриманих даних як додаткового методу визначення відмінності та однорідності сортів.

Матеріалом для дослідження були сорок сортів сої культурної української та іноземної селекції, які проходять державну науково-технічну та кваліфікаційну експертизу сортів рослин з визначення показників придатності до поширення. Тотальну ДНК виділяли з проростків сої за Методикою державної науково-технічної експертизи сортів рослин. Методи визначення показників якості продукції рослинництва (2015 р.), яка передбачає виділення ДНК на основі цетилтриметиламонію броміду (ЦТАБ), який широко використовується в світовій практиці в молекулярно-біологічних дослідженнях. За результатами оцінки концентрації та чистоти отриманої ДНК, які становили в середньому 150–180 мкг/мл та 1,7–1,9 відповідно. Цей метод має суттєві переваги, оскільки дає можливість екстрагувати ДНК з найменшими втратами, досягти високого ступеня її очистки та є досить дешевим.

Молекулярно-генетичний поліморфізм сортів сої досліджували за допомогою методу ПЛР використовуючи пари праймерів до чотирьох мікросателітних локусів (МС-локуси) – Satt 726, Satt 063, Satt 114 та Satt 228. Кінцева концентрація компонентів реакційної суміші розраховувалась на основі даних літературних джерел та підбиралась емпірично. Умови проведення реакції ампліфікації залежали від основних характеристик праймерів, зокрема температура гібридизації становила від 50 до 60 °С для різних праймерів.

Електрофоретичне розділення отриманих продуктів ПЛР проводили в 2 та 3%-му агарозному гелі залежно від розміру очікуваних продуктів ампліфікації. Розмір отриманих фрагментів обраховували відповідно маркеру молекулярної маси із використанням комп'ютерної програми *TotalLab v2.01*. Спроможність маркерної системи диференціювати досліджені сорти та розподіл генотипів відповідно до генетичних дистанцій оцінювали на основі кластерного аналізу. Групування сортів

проводили за допомогою незваженого методу середніх зв'язків. Для характеристики генетичної структури досліджуваних рослинних вибірок сортів сої розраховували частоти детектованих алелів у межах кожного праймера. Для характеристики використаних праймерів та маркерної системи в цілому обрахували індекс поліморфності локусу (Polymorphism Information Content (PIC), який характеризує інформативність праймера.

У результаті реакцій ампліфікацій за чотирма досліджуваними локусами були ідентифіковані 70 алелів. Для всіх SSR-маркерів, які були використані в роботі, отримані алелі очікуваного розміру для кожного з локусів. З них найменша кількість була виявлена для MS-локуса у Satt 114 та становила 11 алелів. Індекс поліморфності локуса склав 0,85. Найбільш поліморфним в наших дослідженнях виявився локус Satt 228, кількість ідентифікованих алелів становила 22 шт., а PIC – 0,94. Отримані дані свідчать, що ідентифіковані алелі рівномірно представлені у досліджуваній вибірці. Це дало змогу отримати високі значення індексу інформативності локусу, які знаходяться у межах від 0,85 до 0,94, а в середньому становив 0,91.

Отже, за результатами дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму 40 сортів сої вітчизняної та зарубіжної селекції для чотирьох MS-локусів встановлено їх якісний та кількісний алельний склад. За даними алельного складу MS-локусів сортів сої побудовано матрицю, в якій відмічали присутність/відсутність алелів – відповідно 1/0. На основі даних матриці провели оцінку генетичної подібності сортів за допомогою кластерного аналізу. В результаті вдалося виділити групи сортів, що найбільш подібні між собою – це сорти, які знаходяться в одному кластері. На основі отриманої дендрограми визначені 13 кластерів за мікросателітними маркерами Satt 063, Satt 114, Satt 228 та Satt 726, які сформовані сортами 'Аляска' та 'ДХ 530', 'Монарх' та 'ОАЦ Лейкв'ю', 'Вікторина' та 'ОАЦ Каліпсо', 'Беркана' та 'ДХ 618', 'Гебо' та 'Сг Ср Пікор', 'Карра' та 'Амадеус', 'Кано' та '11/07', 'ОАЦ Медок' та 'Сг Айдер', 'Писанка' та 'Симфонія', 'ОАЦ Брук' та 'Персе', 'Аліка' та 'Прима', 'Алінда' та 'Амандіне', 'Астер' та 'КСБ 939'. Враховуючи філогенетичні відстані між сортами найбільша спорідненість виявилась у пари сортів 'Кано' та соя11/07 та прилеглим до них сортом 'Здобуток'.

Менший рівень близькості показали пари 'Аляска' та 'ДХ530', 'Монарх' та 'ОАЦ Лейкв'ю', 'Гебо' та 'Сг Ср Пікор', до яких прилягає кластер, в який увійшли 'Карра' та 'Амадеус', а також сорти 'Писанка' та 'Симфонія' з прилягаючим до них сортом 'Асука'. Сорти 'Астер' та 'КСБ 939', 'Алінда' та 'Амандіне', які хоча й сформували по одному кластеру, за філогенетичними дистанціями виявлять меншу спорідненість між собою в порівнянні з сортами, що увійшли в інші 11 кластерів.

Сорти сої, які мають відмінності за генетичними маркерами Satt 063, Satt 114, Satt 228 та Satt 726 розташовуються в різних блоках кластерів, та найбільш віддалені один від одного. Так найбільш відмінними між собою є групи сортів 'Аляска' – 'ДХ 530' із близьким до них кластером сформованим сортами 'Монарх' – 'ОАЦ Лейкв'ю' та 'Астер' – 'КСБ 939' з прилеглим до них сортом 'Міленіум'. На основі проведених досліджень, встановлено, що для оцінки сортового різноманіття сої доцільно використовувати аналіз поліморфізму мікросателітних локусів. Для диференціації сорока досліджених сортів сої можна рекомендувати застосування чотирьох мікросателітних локусів: Satt 114, Satt 228, Satt 726 та Satt 063.

Отже, за результатами кластерного аналізу при визначенні поліморфізму сортів сої за чотирма мікросателітними маркерами, можна зробити висновок про можливість використання їх при створенні переліку подібних сортів для кваліфікаційної експертизи з метою застосування при реєстрації сортів сої як один із елементів експертизи системи захисту авторських прав селекціонерів та для перевірки насінневого матеріалу різного походження.