Міністерство освіти і науки України
Департамент науки і освіти Харківської обласної державної адміністрації
Комунальний заклад «Харківська обласна Мала академія наук Харківської обласної ради»

Відділення екології та аграрних наук
Секція: Селекція та генетика

ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ЯИСТОТИ СОРТІВ СОЇ ЗА ПОЛІМОРФІЗМОМ SSR-ЛОКУСІВ

Роботу виконала:
Нікуліна Марія Євгенівна,
учениця 9 класу комунального закладу «Харківський ліцей №170 Харківської міської ради»

Наукові керівники:
Чернишенко Галина Євгенівна, завідувач випробувальної лабораторії ТОВ «Агроген Ново», кандидат біологічних наук

Скобля Євген Васильович,
учитель біології та хімії комунального закладу «Харківський ліцей №170 Харківської міської ради»

Харків – 2024

ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ЯИСТОТИ СОРТІВ СОЇ ЗА ПОЛІМОРФІЗМОМ SSR-ЛОКУСІВ

Нікуліна Марія Євгенівна; комунальний заклад «Харківський ліцей №170 Харківської міської ради»; 9 клас; м. Харків;

Чернишенко Галина Євгенівна, завідувач випробувальної лабораторії ТОВ «Агроген Ново», кандидат біологічних наук;

Скобля Євген Васильович, вчитель хімії та біології комунального закладу «Харківський ліцей №170 Харківської міської ради»

В Україні актуальним є розробка та валідація методики з визначенням генетичної чистоти сільськогоподарських культур , зокрема сої (*Glycine max*), за молекулярно-генетичними маркерами.

В роботі вивчали генетичне різноманіття дев'яти сортів сої за мікросателітними (SSR) маркерами, запропонованими в стандарті *NY/T 2595-2014* (Китай) для визначення генетичної чистоти сортів сої .

Оцінено дивергенцію сортів за SSR-локусами. Показано високу роздільну здатність мікросателітних маркерів для диференціації сортів сої.

Створено генетичні паспорти дев’яти сортів сої.

Проведено успішну валідацію методики мультиплексної ПЛР, яка дозволяє скоротити часові та фінансові витрати під час проведення досліджень.

Обговорюються можливості методики оцінки поліморфізму SSR-локусів для визначення генетичної чистоти сортів сої у випробувальних лабораторіях та вирішення селекційних задач.

Ключові слова: Соя культурна, Glycine max, ДНК-маркери, SSR-локуси, генетична чистота, фальсифікація насіння.

ЗМІСТ

ВСТУП…….. 5

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ……... 8

1.1. Морфологічні ознаки. ВОС-тест…….. 8

1.2. Запасні білки…….. 9

1.3. ДНК-маркери……. 10

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ……. 12

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ……. 16

3.1. Різноманітність сортів сої за поліморфізмом SSR-локусів…… 16

3.2. Дивергенція сортів сої за поліморфізмом SSR-локусів……. 19

3.3. Паспортизація сортів сої……... 21

3.4. Мультиплексна ПЛР…….. 22

ВИСНОВКИ……. 25

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ…… 26

ДОДАТКИ…… 31

ВСТУП

Соя – одна з найпоширеніших сільськогосподарських культур, яка широко використовується завдяки особливому хімічному складу білка та жиру. Високий вміст білка і надзвичайно цінна його збалансованість за амінокислотним складом, роблять сою чудовим замінником продуктів тваринного походження у харчуванні людини [1-3].

Соя – цінна кормова культура, її можна згодовувати тваринам у вигляді макухи, соєвого шроту, молока, білкових концентратів, зеленого корму, сіна, силосу тощо. Соя належить до стратегічних культур. Вона є основою в забезпеченні білком і олією продуктів харчування [12].

Наразі Україна є найбільшим виробником цієї культури в Європі та посідає сьоме місце в світі за обсягами експорту [12].

У реєстрі сортів насіння 2023 року зареєстровано 300 класичних сортів сої зарубіжної та вітчизняної селекції [4]. Вирощування генетично модифікованих сортів сої в Україні наразі заборонено.

На жаль, на ринку насіння має місце недобросовісна конкуренція, яка породжує таке ганебне явище як підробка (контрафакт/фальсифікація). Недобросовісні реалізатори використовують назви відомих торгових компаній або суб'єктів насінництва та розсадництва, під видом яких на ринку реалізується насіння, яке має сумнівне походження, відмінне від оригінального. Зазвичай для такого роду підробок використовують товарне зерно або некондиційне насіння, фарба, мішки та копії папірців зовні схожі на сертифікати, що засвідчують сортові та посівні якості насіння.

Щоб не стати жертвою фальсифікованого насіння на етапі вибору насіння, важливо знати сортову або генетичну чистоту насіння. Це дуже важливий показник, який допоможе зорієнтуватися аграріям у виборі насіннєвого матеріалу тієї чи іншої торгової марки й уникнути небажаних наслідків.

Генетична чистота насіння – це відповідність певної його партії офіційному зразку. Визначити цю відповідність за морфологічними ознаками можливо під час проведення ВОС – тесту, але цей процес є довготривалим, потребує високої кваліфікації співробітників та часто – суб'єктивний, тоді як метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) дозволяє проводити аналіз типовості на будь - якому етапі розвитку рослини та за короткий час.

У зарубіжних країнах питання генетичної чистоти насіння регулюється низкою нормативно-правових документів, які враховують сучасні технології в генетиці та селекції рослин. Так, у 2015 році Міжнародною організацією стандартизації (ISO) видано два стандарти щодо визначення типовості кукурудзи та соняшника за допомогою ДНК-маркерів [20, 21]. У 2014 році у Китаї видано стандарт щодо визначення генетичної чистоти сої за допомогою SSR маркерів [18].

Актуальність. В Україні типовість насіння більшості сільськогосподарських культур нормується за морфологічними ознаками у ДСТУ 2240-93 [10]. Затверджених нормативних документів щодо визначення типовості сільськогосподарських культур за допомогою ДНК-маркерів, у тому числі сої, в Україні відсутні.

Отже, актуальним є розробка та валідація методики визначення генетичної чистоти сортів сої за допомогою ДНК-маркерів.

Мета роботи: визначення генетичного різноманіття SSR-локусів в сортах сої, які зареєстровано в Україні.

Для реалізації поставленої мети були сформульовані такі **завдання**:

1. Визначити різноманіття дев'яти сортів сої за SSR-маркерами, запропонованими в стандарті
2. Дослідити дивергенцію між сортами сої за допомогою методів багатомірної статистики.
3. Створити генетичні паспорти досліджених сортів сої.

4. Здійснити валідацію методики з визначення генетичної чистоти сортів сої методом ПЛР, вивчити можливість проведення мультиплексної ПЛР.

Особистий внесок автора. Робота виконана автором особисто у випробувальній лабораторії ТОВ «АГРОГЕН НОВО». Експериментальні дослідження проводилися автором особисто за участю лаборантів ТОВ «АГРОГЕН НОВО» Бучковської А.А. та Удод Ю.О. Аналіз літературних джерел, інтерпретація та узагальнення результатів здійснено самостійно з консультацією наукового керівника Чернишенко Г.Є.

РОЗДІЛ 1
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1. Методи визначення сортової та генетичної чистоти сортів сої

1.1. Морфологічні ознаки. ВОС-тест

Під терміном сортова або генетична чистота розуміють ступінь приналежності насіння сільськогосподарських рослин до певного сорту.

Стандартизованим в Україні методом визначення сортової чистоти більшості сільськогосподарських культур, в тому числі і сортів сої культурної (*Glycine max (L.) Merr.*) є експертиза на відмінність, однорідність та стабільність (*ВОС-тест*), що здійснюється в процесі реєстрації нового сорту [6, 7, 15].

Для сортів сої ВОС-тест здійснюють за 30 морфологічними ознаками: гіпокотіль (наявність антоціанового забарвлення); рослина (завивання стебла, тип росту, форма куща, опушення, забарвлення опушення, висота); стебло (кількість вузлів, фасціація, товщина); листок (пухир частість, форма, форма верхівки, інтенсивність зеленого забарвлення, розмір); квітка (забарвлення); біб (забарвлення, довжина, ширина, форма); насінина (маса 1000 насінин, форма, основне забарвлення оболонки, забарвлення рубчика, форма рубчика, вічко на рубчику, малюнок смужки біля рубчика, забарвлення сім'ядолей); зразок (тривалість періоду сходи-цвітіння, сходи-повна стиглість); рослина (опадання листя після достигання) [12].

Триває ВОС-тест два вегетаційні цикли, за необхідності експертизу продовжують ще й на третій. Дослідження виконують за умов, що забезпечують задовільний ріст, розвиток рослин і достатнє виявлення характерних ознак сорту. Кожне дослідження має включати щонайменше 300 рослин, розділених на два повторення.

Державні вимоги щодо сортової чистоти сортів сої за морфологічними надано в стандарті ДСТУ 2240-93 [8]. Вимоги диференціюються залежно від

категорії насіння. Так, для добазового насіння сортова чистота сортів сої має становити не менше 99,7%, базового насіння – не менше 99,5%, сертифікованого насіння першої генерації – не менше 98,0%, сертифікованого насіння наступних генерацій – не менше 97,2% [8].

Незважаючи на те, що морфологічні ознаки є референтними дескрипторами при оцінці сортової чистоти сої в Україні, ця маркерна система має низку обмежень. Так, прояв більшості кількісних морфологічних ознак залежить від погодних умов певного вегетаційного періоду, деякі морфологічні ознаки характеризуються низьким рівнем поліморфізму, що не дозволяє диференціювати зразки [24]. Крім того, методика оцінки морфологічних ознак потребує значних витрат часу, наявності посівних площ та не може бути реалізована за короткий проміжок часу при виникненні спірних ситуацій щодо генетичної чистоти сортів сої.

В таких умовах актуальним є використання молекулярних маркерів, які не залежать від умов навколишнього середовища, але при цьому виявляють поліморфізм у сортах сої.

1.2. Запасні білки

Класичним молекулярним методом визначення генетичної чистоти насіння сільськогосподарських культур є електрофорез запасних білків. Цей метод відзначається простотою, інформативністю та відносною дешевизною. Запасні білки інтенсивно синтезуються під час розвитку насіння і їх гетерогенний склад визначається генотипом, що залишається стійким упродовж кількох поколінь без залежності від умов вирощування культури [11].

В декількох наукових дослідження повідомляється про рівень поліморфізму запасних білків сої 40-50 % [16]. Так, Aziza S. El-Kholy (2013) показали ефективність методу запасних білків для ідентифікації 11 зразків

сої [16]. Walaa A. Rayan і Samira A. Osman (2019) отримали унікальні профілі запасних білків в 6 сортах сої [23].

Інші автори зазначають про незначний рівень поліморфізму в сортах сої, наявність ідентичних електрофоретичних профілів у різних сортів, що потребує додаткових методів аналізування, наприклад проведення 2D електрофорезу або залучення ДНК-маркерів [25].

В деяких роботах повідомляється про кращу роздільну здатність білкових маркерів для вивчення генетичної віддаленості між різними видами сої [25].

Таким чином, використання білкових маркерів ускладняються їх незначним поліморфізмом у деяких сортах сої звичайної. Крім того, аналіз білків дозволяє досліджувати поліморфізм тільки тих послідовностей геному, що експресуються. Причому, якщо взяти до уваги, що кодуючі послідовності складають приблизно тільки 1 % геному вищих еукаріот, то від дослідника зникає основна частина геному. Разом з тим, цей тип маркерів може з успіхом використовуватися для вивчення філогенетичних взаємозв'язків між різними видами сої.

Більш перспективним є використання маркерних систем поліморфних нуклеотидних послідовностей ДНК, які дозволяють тестувати генетичний поліморфізм безпосередньо на рівні генів, а не на рівні продуктів генів, як у випадку використання методу білкового поліморфізму

1.3. ДНК-маркери

ДНК-маркери дозволяють вирішити проблему насичення геному маркерами і маркувати практично всі ділянки ДНК, у тому числі й ті, що не транслюються. Крім того, молекулярні маркери дають можливість використовувати для аналізу будь-які тканини і органи незалежно від стадії

розвитку організму і мають цілу низку переваг порівняно з іншими типами маркерів [15].

На сьогодні розроблено значну кількість ДНК-маркерів, серед яких RFLP, RAPD, ISSR, AFLP, STMS, EST, SCAR, SSR, SNP та інші [15].

Мікросателітні послідовності ДНК (Simple Sequence Repeats, SSR) є найбільш доступними, простими, зручними маркерами, придатними перш за все для ідентифікації генотипів. Мікросателіти являють собою тандемно повторювальні ди- , три- , тетра і пентануклеотиди. Їх перевага полягає в тому, що спадковість їхніх ознак є кодомінантною, що дозволяє відрізняти гомозиготні та гетерозиготні рослини.

Разом з тим, значення мікросателітної ДНК у геномі багато в чому не визначено. Так, відомо, що більшість мікросателітної ДНК міститься в некодуючих ділянках гетерохроматину. Тандемні повтори часто локалізуються в передцентромерних зонах хромосом і беруть участь в утворенні веретена ділення. Крім того, деякі тринуклеотидні повтори виявлено в транскриптах, які можуть транслюватися в білки. Обговорюються також інші функції сателітної ДНК: активні пули рекомбінації, контролюючі елементи транскрипції суміжних генів та інші

У серії наукових робіт вітчизняних [5, 9, 13] та зарубіжних [17, 18, 19] авторів показано значний рівень поліморфізму SSR-локусів в сортах сої, що дозволяє ідентифікувати окремі генотипи.

Є відомості щодо зчеплення деяких SSR-локусів з господарсько-цінними ознаками, зокрема генам стійкості до вірусу мозаїки сої [13], генами фотоперіодичної чутливості (Е-генами) [5].

Протягом останніх десятиліть вченими було розроблено тисячі мікросателітних маркерів для сої, більше ніж 2000 SSR-локусів було включено до загальної інтегрованої генетичної карти сої [1].

В 2014 році в Китаї затверджено стандарт щодо визначення генетичної чистоти сортів сої за поліморфізмом 36 SSR-локусів [18]. Разом з цим,

досліджень щодо оцінки придатності цієї методики для визначення генетичної чистоти сортів сої в Україні не проводилося.

Таким чином, представляє інтерес вивчення рівня різноманіття та диференційної здатності SSR- маркерів, запропонованих в стандарті NY/T 2595-2014 Identification of soybean varieties. SSR marker method [18].

РОЗДІЛ 2
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Рослинний матеріал

В роботі використані 9 сорти сої, які передавались на аналіз посівних якостей у випробувальну лабораторію ТОВ «АГРОГЕН НОВО» протягом 2022-2023 рр. (табл. 2.1)

Таблиця 2.1

Сорти сої, використані у дослідженні

Назва сорту	Оригінатор	Країна походження
Кенді	Кен-Гро Дженетікс Інк.	Канада
Абеліна	SAATBAU (ПробстдорферЗаатцухт)	Австрія
Командор	EURALIS SEMENCES (ЕвралисСеманс	Франція
Юнка	СевітаДженетікс	Канада
Ультра	ASGROW &Monsanto	США
Пруденс	HURON COMMODITIES INC.	Канада
Ментор	EURALIS SEMENCES (ЕвралисСеманс	Франція
Господиня	Інститут рослинництва імені В. Я. Юр'єва НААН	Україна
Райдуга	Інститут рослинництва імені В. Я. Юр'єва НААН	Україна

SSR-маркери

В роботі оцінювали мінливість 9 мікросателітних (SSR) локусів, що показані в стандарті *NY/T 2595-2014* як найбільш поліморфні в сортах сої [20] (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

SSR-маркери, використані у дослідженні

№	Локус	Локалізація локусу ()	Передбачуваний розмір продуктів ампліфікації, пн (згідно з NY/T 2595-2014)	Послідовність праймерів (прямий /зворотній)	Температура гібридизації (Tm), ^{0}C
1	Satt197	Gm 11/B1	133-202	CACTGCTTTTCCCCTCTCT/ AAGATACCCCCAACATTATTTGTAA	55
2	Satt429	Gm 8/A2	243-275	GCGACCATCATCTAATCACAATCTACTA/ TCCCCATCATTTATCGAAAATAATAATT	55
3	Sat112	Gm 15/E	310-345	TGTGACAGTATACCGACATAATA/ CTACAAATAACATGAAATATAAGAAATA	55
4	Sat380	Gm 16/J	122-135	GCGAGTAACGGTCTTCTAACAAGGAAAG/ GCGTGCCCTTACTCTCAAAAAAAAA	60
5	Sat239	Gm 20/I	172-193	GCGCCAAAAAATGAATCACAAT/ GCGAACACAATCAACATCCTTGAAC	60
6	Sat588	Gm 09/K	114-169	GCTGCATATCCACTCTCATTGACT/ GAGCCAAAACCAAAGTGAAGAAC	60
7	Satt300	Gm 05/A1	238-262	GCGCCCACACAACCTTTAATCTT/ GCGGCGACTGTTAACGTGTC	60
8	Sat373	Gm 19/L	210-276	TCCGCGAGATAAATTCGTAAAAT/ GGCCAGATACCCAAGTTGTACTTGT	60
9	Satt514	Gm 17/D2	192-245	GCGCCAACAAATCAAGTCAAGTAGAAAT/ GCGGTCATCTAATTAATCCCTTTTTGAA	60

Виділення ДНК

ДНК виділяли з суміші відрізків зародкових корінців 30 насінин сої сорбентним методом за допомогою спін-колонок (додаток А).

Суміш корінців обережно переносили в мікропробірку типу епендорф, гомогенізували лізуючим реагентом. Після чого інкубували пробірки в ультразвуковій бані протягом 10 хвил. Отриману суспензію струшували на вортексі та центрифугували протягом 2хвил при 13 тис. об. в центрифузі EppendorfMinispin (додаток Б). Верхню фазу супернатанту обережно

відбирали і переносили на спін-колонки. Центрифунували колонки 2 хвил. при 13 тис. об.

Додавали 200 мкл сольового розчину і центрифунували колонки 2 хвил при 13 тис. об. Повторювали процедуру промивання ще двічі. Після чого зливали вміст підстаканників і осушували фільтр колонок шляхом центрифугування протягом 5 хвил. при 13 тис. об.

Встановлювали колонки у пробірки типу епендорф об'ємом 1,5 мл додавали 50мкл води miliQ. Центрифугували пробірки 2 хвил. при 13 тис. об. Спін-колонки видаляли, а отриманий препарат ДНК використовували для постановки ПЛР.

Полімеразна ланцюгова реакція

Поліморфізм мікросателітних локусів вивчали методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Ампліфікацію ДНК проводили в пробірках з ліофілізованим набором реактивів для ПЛР (Bioneer, Південна Корея) в ампліфікаторі «Терцик». Кінцевий об'єм реакційної суміші склав 20 мкл і містив 20 нг ДНК і 1 мкМ кожного праймеру.

Для ампліфікації SSR локусів використовували програму, запропоновану в стандарті [20] . Ампліфікацію проводили з начальною денатурацією – 5хвил при 94°С, з наступними 35 циклами в такому режимі: денатурація – 45сек. при 94°С , гібридизація праймерів при Tm (табл. 2)– 45сек. , елонгація - 45 сек. при 72°С, кінцева елонгація – 7хвил. при 72°С (додаток В).

Продукти ампліфікації розділяли методом електрофореза в 2 % агарозному гелі з бромистим етидієм в боратному буфері з низькою іонною силою [16].

Електрофорез продуктів ампліфікації проводили в горизонтальному приладі HoeferSuperSub100 (США) (Додаток Г). Використовували маркери молекулярної ваги Ncombi (Ізоген). Отримані гелі документували шляхом фотографування.

Статистичний аналіз результатів

Визначення кількості і розмірів продуктів ампліфікації проводили за допомогою демо-версії програми Totallab 120 (http://www.totallab.com).

За значеннями частот алелів визначали кількість рідких, загальних і частих алельних варіантів. Рідкими вважали алельні варіанти, які зустрічалися в дослідженій вибірці сортозразків сої з частотою ≤ 1%, загальними – з частотою 1-20 %. Продукти ампліфікації, що були представлені більше ніж у 20 % вивчених сортів нута, приймали за часті алелі.

Поліморфізм SSR-маркерів в сортах сої оцінювали за допомогою індексу генетичного різноманіття Nei (H_e) (або теоретичною гетерозиготністю), який розраховувализа формулою:

$He = 1 - \sum p_i^2$, де

p_i- частота алелю в окремій популяції.

Індекс різноманіття Nei розраховували за допомогою надбудови MicrosatelliteToolsfor Excel (http://animalgenomics.ucd.ie/sdepark/ms-toolkit).

Для оцінки дивергенції між окремими сортами сої розраховували генетичні відстані Nei та Li в програмі PHYLIP за формулою:

$D_{ij} = 1 - S_{ij} = \frac{2a}{2a+b+c}$, де

a – кількість спільних градацій ознаки у двох об’єктів, що порівнюються (тип 1,1);

b – кількість однієї градації, що характерна лише для першого об’єкту (тип 1,0);

c - кількість однієї градації, що характерна лише для другого об’єкту (тип 0,1).

На основі матриць відстаней між популяціями сортів нуту та між окремими зразками будували дендрограми методом найближчих сусідів в програмі PHYLIP.

РОЗДІЛ 3
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Різноманітність сортів сої за поліморфізмом SSR-локусів

Під час ампліфікації 9 мікросателітних локусів у сортах сої виявлено 26 алельних варіантів. Усі локуси виявляли поліморфізм. Максимальну кількість алельних варіантів (5) виявлено в сортах сої з використанням маркера Satt373, мінімальну – 2 за маркерами Satt380, Satt239 і Satt514 (табл. 3.1; рис. 3.1; рис. 3.2).

Таблиця 3.1

Алельні варіанти та індекс генетичного різноманіття Nei (D), розрахований за поліморфізмом SSR-маркерів у сортах сої

Локус	Продукти ампліфікації, пн	Частота алелів, %	Індекс генетичного різноманіття Nei
Satt197	169	11	0,52
	175	22	
	183	67	
Satt429	206	11	0,71
	220	11	
	231	44	
	245	33	
Satt112	317	11	0,63
	321	44	
	326	44	
Satt380	134	22	0,37
	142	78	
Satt239	178	56	0,52
	190	44	
Satt588	230	11	0,60
	234	33	
	245	56	
Satt300	145	56	0,52
	175	44	
Satt373	224	33	0,80
	250	22	
	260	17	
	271	22	
	297	6	
Satt514	198	44	0,52
	240	56	

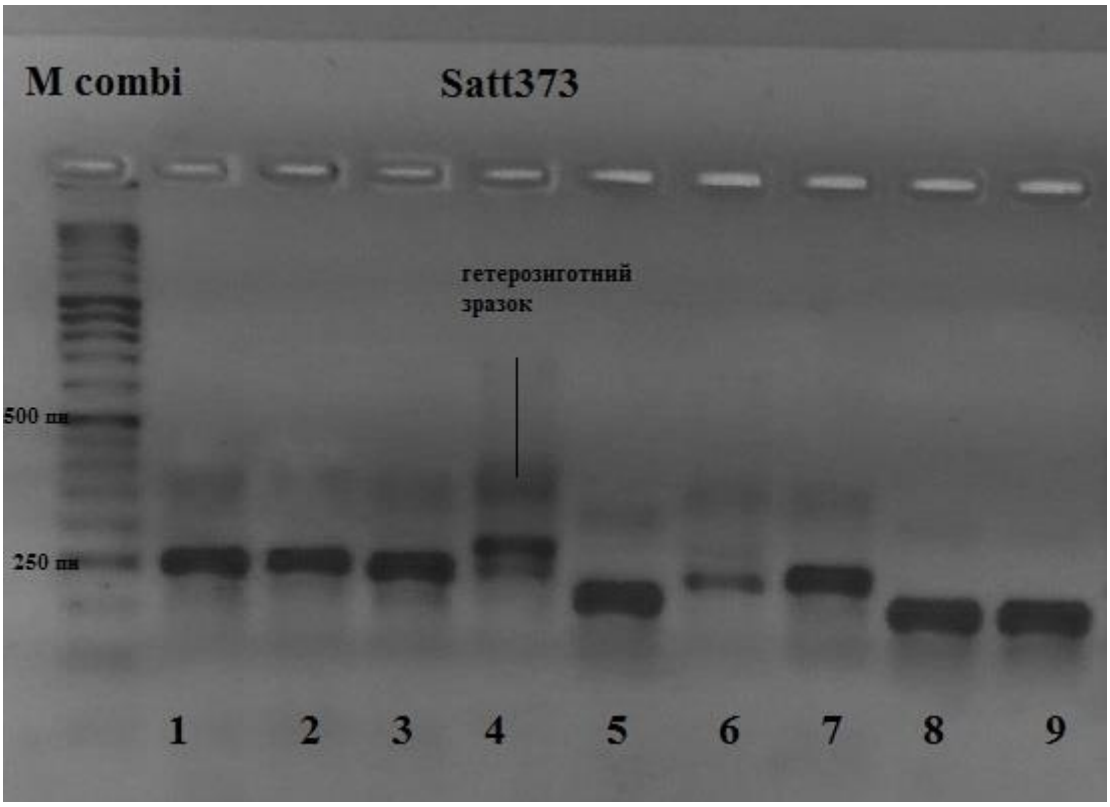


Рис. 3.1. Електрофореграма продуктів ампліфікації найбільш поліморфного SSR-маркера Satt373 у сортах сої *(M combi – маркер, 1 – Кенді, 2- Абеліна , 3-Командор, 4-Юнка, 5-Ультра, 6-Пруденс, 7-Ментор, 8-Господиня, 9-Райдуга)*

Середня кількість алельних варіантів на один локус складала 2,89±1,05. Розміри продуктів ампліфікації, визначені відносно маркера молекулярної ваги Mcombi, варіювали від 134 до 326 пн за різними SSR-маркерами (табл. 3). Подібні розміри продуктів ампліфікації виявлені іншими авторами [20] під час вивчення цих же SSR-маркерів у зразках сої.

Більшість алельних варіантів вивчених мікросателітних локусів зустрічалася у вибірці сортів сої з частотою більше 20 % (часті алелі) і 1-20 % (загальні алелі) (табл. 3.1).

Крім того, було виявлено 1 рідкісний для вивченої вибірки сортів сої алельний варіант за локусом Satt373-297 пн, який зустрічався лише у зразка сорту Юнка (рис. 3.1).

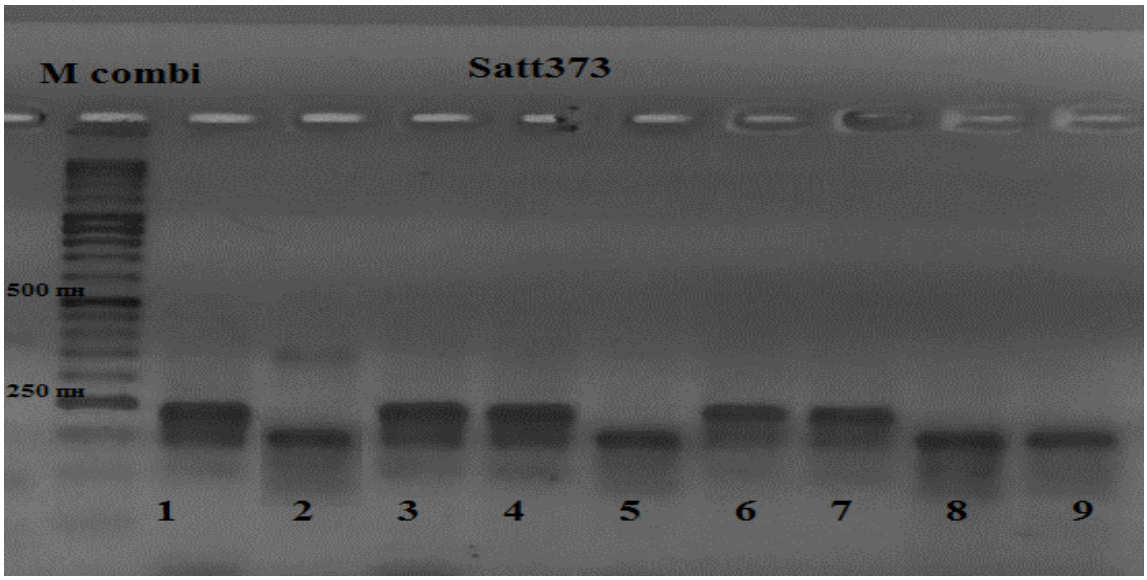


Рис. 3.2. Електрофореграма продуктів ампліфікації одного з найменш поліморфних SSR-маркерів Satt514 у сортах сої *(M combi – маркер, 1 – Кенді, 2- Абеліна , 3-Командор, 4-Юнка, 5-Ультра, 6-Пруденс, 7-Ментор, 8-Господиня, 9-Райдуга)*

Незважаючи на те, що соя є облігатним самозапилювачем [1-3], серед досліджених зразків виявлено один гетерогенний сорт Юнка, у якому ампліфікувалося два ДНК-продукти в локусі Satt373 під час аналізу ДНК суміші насіння (рис. 3.1). У цьому зразку необхідно провести понасінний аналіз, щоб з'ясувати природу гетерогенності. Але це не входило до задач даного дослідження. Рівень гетерозиготності в загальній вибірці зразків сої за всіма мікросателітними локусами становив 1,2 %.

Для характеристики різноманіття SSR-локусів у зразках сої розраховували індекс генетичного різноманіття Nei (D) (табл. 3.1).

Найбільш поліморфними за індексом Nei в сортах сої виявились локуси Satt373 і Satt429 (D= 0,80 і 0,72 відповідно). Високими значення індекса Nei характеризувались також такі маркери як Satt112 і Satt588 (D= 0,63 і 0,60 відповідно).

Найменшим рівнем мінливості за значенням індексу різноманіття виявився SSR-локус Satt380 (D= 0,37).

Загальний рівень поліморфізму в досліджених сортах сої становив 0,57±0,04.

3.2. Дивергенція сортів сої за поліморфізмом SSR-локусів

Для визначення диференціації між сортами сої, селекція яких велась у певній країні, розраховували генетичні відстані Nei та Li. Для просторової візуалізації дивергенції сортів сої здійснювали кластерний аналіз методом приєднання найближчого сусіда (NJ), за результатами якого будували дендрограму.

Мінімальну генетичну відстань (0,004274) виявлено між сортами української селекції Господиня і Райдуга (табл 4). Такі результати можуть пояснюватися тим, що ці сорти мають спільну генетичну основу. Це є логічним, оскільки дані сорти зареєстровано одним оригінатором, Інститутом рослинництва імені В.Я. Юр'єва (м. Харків).

Максимальну генетичну відстань за поліморфізмом SSR-локусів виявлено між сортами Ультра і Юнка. Сорт Ультра не зареєстровано в Реєстрі сортів України, ймовірно він є генетично модифікованим (дані Інтернету). Сорт Юнка єдиний у вибірці сорт, зареєстрований оригінатором Севіта Дженетікс. Отже, очевидно, для створення цих сортів використувався вихідний матеріал, що не має спільного походження.

Таблиця 3.4

Генетичні відстані Nei та Li між сортами сої за поліморфізмом SSR-локусів

Генетичні відстані	Кенді	Абеліна	Командор	Юнка	Ультра	Пруденс	Ментор	Господиня	Райдуга
Кенді	0,00000	0,010246	0,019794	0,010246	0,019794	0,010246	0,019794	0,019794	0,019794
Абеліна	0,010246	0,000000	0,027728	0,019794	0,014349	0,006976	0,014349	0,019794	0,019794
Командор	0,019794	0,027728	0,00000	0,01217	0,014349	0,019794	0,014349	0,041894	0,027728
Юнка	0,010246	0,019794	0,01217	0,00000	0,041894	0,014349	0,014349	0,019794	0,041894
Ультра	0,019794	0,014349	0,014349	**0,041894**	0,00000	0,019794	0,019794	0,014349	0,006976
Пруденс	0,010246	0,006976	0,019794	0,014349	0,019794	0,00000	0,006976	0,027728	0,027728
Ментор	0,019794	0,014349	0,014349	0,014349	0,019794	0,006976	0,00000	0,019794	0,019794
Господиня	0,019794	0,019794	0,041894	0,019794	0,014349	0,027728	0,019794	0,00000	0,004274
Райдуга	0,019794	0,019794	0,027728	0,041894	0,006976	0,027728	0,019794	**0,004274**	0,00000

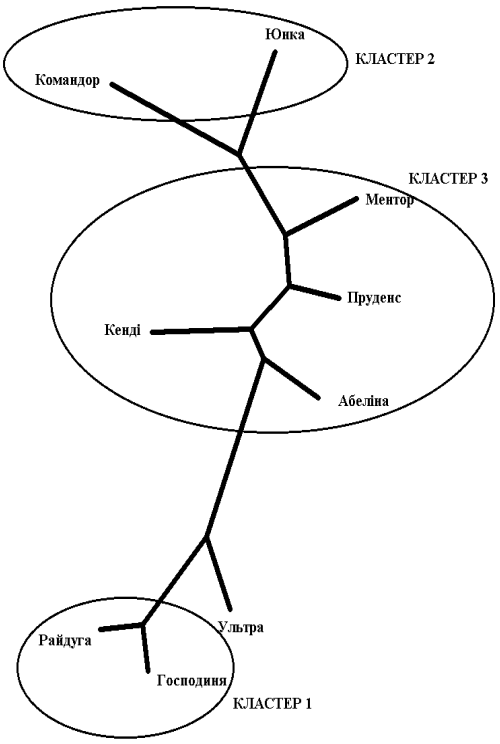


Рис. 3.3. Дивергенція сортів сої за поліморфізмом SSR-локусів

У результаті кластеризації зразків сої за поліморфізмом SSR-локусів можливо умовно виділити три групи зразків. До кластеру 1 увійшли сорти української селекції Райдуга і Господиня, які просторово знаходяться на найбільш віддалено від представників кластеру 2, сортів Командор (Франція) та Юнка (Канада). Кластер 3 утворився за рахунок близького розташування сортів сої Кенді (Канада), Ментор (Франція), Пруденс (Канада), Абеліна (Австрія). При цьому, кластер 3 тяжів до кластеру 2.

Сорт Ультра використовувався як зовнішня група при здійсненні кластерізації, оскільки він не зареєстрований в Реєстрі сортів України та ймовірно є генетично модифікованим. Але за розташуванням на дендрограммі Ультра тяжів до представників кластеру 1.

Таким чином, при вивченні дивергенції сортів сої за поліморфізмом SSR-локусів, виявлено, що генетичні відстані між всіма сортами більше 0. Це дає змогу диференціювати сорти один від одного, оцінити їх генетичну

віддаленість при визначенні генетичної чистоти насіння, плануванні схрещувань та веденні селекційного процесу, реєстрації сортів.

3.3. Паспортизація сортів сої

Для ефективного використання отриманих даних для оцінки генетичної чистоти сортів сої, ведення селекційного процесу тощо необхідна проста та зручна система їх структурування. На сьогодні широко розповсюдженим методом опису та ідентифікації рослин за різними типами маркерів є створення генетичних паспортів [10]. Генетичний паспорт являє собою формулу, у якій в літерно-числовій формі закодовано маркерні ознаки та градації їх прояву.

Для створення генетичних паспортів сортів сої автор використав принцип, запропонований в Селекційно-генетичному інституті НААНУ під керівництвом доктора біологічних наук, професора, академіка НААНУ Сиволапа Ю.М. (табл. 3.5, 3.6) Алгоритм запису генетичного паспорта за цим підходом полягає в такому: маркеру надається код у вигляді великої літери латинського алфавіту, а градація прояву маркера (морфологічний дескриптор, розмір продукту ампліфікації ДНК-маркера) записується в числовій формі з нижнім індексом [10].

Таблиця 3.5

Умовні позначення SSR-локусів в паспортах сортів сої

SSR-локуси	**Умовні позначення маркера у паспорті**
Satt197	A
Satt429	B
Sat112	C
Sat380	D
Sat239	E
Sat588	F
Satt300	G
Sat373	H
Satt514	I

Таблиця 3.6

Паспорти сортів сої за поліморфізмом SSR-локусів

Паспорт зразка	**Найменування зразка**
$A_{183}B_{231}C_{317}D_{142}E_{190}F_{245}G_{145}H_{271}I_{240}$	Кенді
$A_{183}B_{220}C_{321}D_{142}E_{178}F_{245}G_{145}H_{271}I_{198}$	Абеліна
$A_{183}B_{231}C_{326}D_{134}E_{178}F_{230}G_{175}H_{260}I_{240}$	Командор
$A_{183}B_{231}C_{321}D_{134}E_{190}F_{234}G_{145}H_{297/260}I_{240}$	Юнка
$A_{169}B_{231}C_{326}D_{142}E_{178}F_{245}G_{175}H_{224}I_{198}$	Ультра
$A_{183}B_{206}C_{321}D_{142}E_{178}F_{245}G_{145}H_{250}I_{240}$	Пруденс
$A_{183}B_{245}C_{321}D_{142}E_{178}F_{234}G_{175}H_{250}I_{240}$	Ментор
$A_{175}B_{245}C_{326}D_{142}E_{190}F_{234}G_{145}H_{224}I_{198}$	Господиня
$A_{175}B_{245}C_{326}D_{142}E_{190}F_{245}G_{175}H_{224}I_{198}$	Райдуга

3.4. Мультиплексна ПЛР

Результати, отримані в ході даного дослідження, показали значну роздільну здатність SSR-маркерів , запропонованих в стандарті NY/T 2595-2014, для диференціації сортів сої.

Разом з тим, для удосконалення та здешевлення методики з визначення генетичної чистоти сортів сої , актуальним є об'єднання декількох SSR -маркерів в мультиплекси.

Основними умовами для об'єднання маркерів в мультиплекси є відсутність перекриття розмірів продуктів ампліфікації та близька температура гібридизації праймерів.

Отже, після аналізування отриманого масиву даних за цими критеріями, 7 SSR-маркерів об'єднано в 3 мультиплекси. Мультиплекс 1 - Satt197, Satt429, Satt112 ; мультиплекс 2 - Satt 380, Satt 239; мультиплекс 3 - Satt588, Satt300.

Маркери Satt373 і Satt514 не було додано до мультиплексів через перекриття розмірів продуктів ампліфікації.

Ампліфікацію ДНК проводили в пробірках з ліофілізованим набором реактивів для ПЛР (Bioneer, Південна Корея) в ампліфікаторі «Терцик». Кінцевий об'єм реакційної суміші склав 20 мкл і містив 20 нг ДНК і 0,5 мкМ кожного праймеру.

Для валідації методики мультиплексної ПЛР було використано 3 сорти сої – Кенді, Юнка, Райдуга.

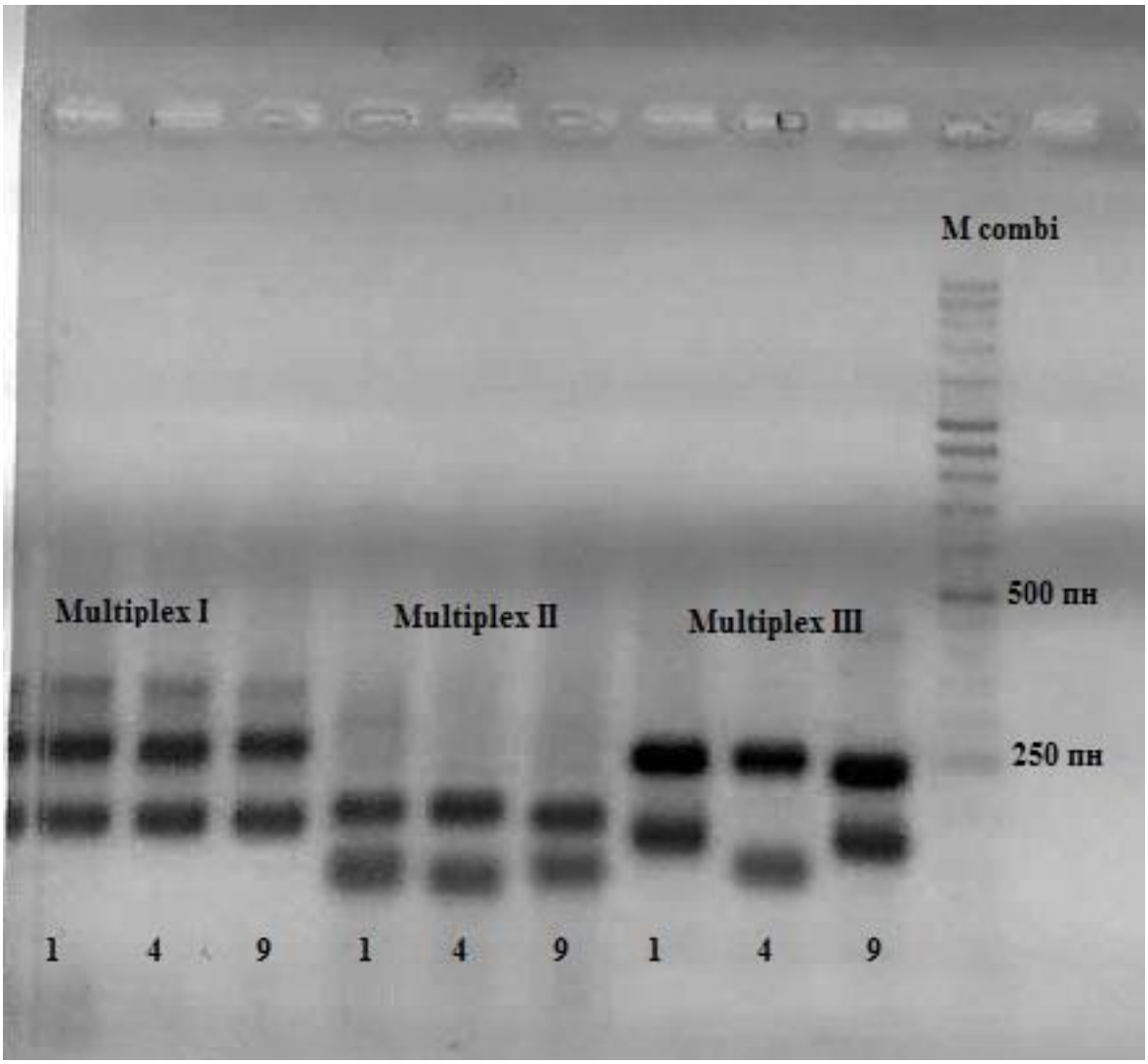


Рис. 3.4. Мультиплексна ПЛР SSR-локусів в сортах сої
(1 –Кенді, 4 – Юнка, 9 - Райдуга)

За результатами мультиплексної ПЛР, отримано чітку електрофореграму (рис. 3.4). Виявлено усі очікувані маркери в кожному сформованому мультиплексі без перекриття продуктів ампліфікації. Розміри продуктів ампліфікації відповідають попередньо визначеними в ході класичної ПЛР.

Отже, отримані результати дозволяють розробити протокол одночасного виявлення 2-3- SSR-маркерів в сортах сої, що значно скорочує витрати часу і коштів.

ВИСНОВКИ

У представленому дослідженні наведено теоретичне узагальнення і практичне вирішення важливого науково-прикладного завдання з визначення генетичної чистоти сортів сої за поліморфізмом SSR-локусів.

1. Вперше в Україні визначено рівень генетичного різноманіття дев'яти SSR-локусів, запропонованих в стандарті NY/T 2595-2014, в дев'яти сортах сої. Загальний рівень поліморфізму становить 0,57±0,04.
2. Показано значну роздільну здатність SSR-локусів в сортах сої. За вивченими SSR-локусами не виявлено ідентичних сортів, значення генетичних відстаней між усіма сортами були вище 0. Найбільш генетично спорідненими виявилися українські сорти Райдуга та Господиня, найбільш віддаленими – сорти Юнка (Канада) і Ультра (США).
3. Оцінено дивергенцію сортів сої за поліморфізмом SSR-локусів методами філогенетичного аналізу. Встановлено, що українські сорти Райдуга та Господиня є більш генетично віддаленими від усіх інших вивчених сортів сої. Європейські та північно-американські сорти сої об'єднувалися в 2 групи без закономірностей згідно з географічним походженням.
4. Створено генетичні паспорти 9 сортів сої за принципом, запропонованим в Селекційно-генетичному інституті НААНУ під керівництвом доктора біологічних наук, професора, академіка НААНУ Сиволапа Ю.М. з проведенням валідації методики мультиплексної ПЛР. Показано, що 7 з 9 вивчених SSR-маркерів можна об'єднати в три мультиплекса, що дозволяє скоротити часові і фінансові витрати при проведенні аналізу з визначення генетичної чистоти сортів сої.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бабич А. О. Соя для здоров'я і життя на планеті Земля / А. О. Бабич. - К.: Аграрна наука, 1998. - 272 с.

2. Бабич А. О. Сучасне виробництво і використання сої: научное издание / Анатолій Олександрович Бабич. - К.: Урожай, 1993. - 432 с.

3. Бабич А.О. Світові земельні, продовольчі і кормові ресурси/ К.: Аграрна наука, 1996. Т.200.

4. Державний реєстр сортів рослин придатних для поширення в Україні URL: https://minagro.gov.ua/file-storage/reyestr-sortiv-roslin.

5. Жарікова Д.О. Поліморфізм за локусами, асоційованими з генами Е, в українських сортах та лініях сої (Glycine max. (L.) Merr.). – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису. Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика. – Міністерство освіти і науки України, Одеський національний університет імені І.І.Мечникова. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2021.

6. Методика визначення відповідності сортів сої культурної (Glycine max (L.) Merr.) критеріям відмінності, однорідності та стабільності. URL:https://minagro.gov.ua/storage/app/sites/1/uploaded-files/viznachennya-vidpovidnosti-sortiv-soi-kulturnoi-glucine-max-l-merr-kriteriyam-vidminnosti-odnoridnosti-ta-stabilnosti.pdf.

7. Методичні вимоги у сфері насінництва щодо збереження сортових та посівних якостей насіння сої. Наказ Міністерства аграрної політики та продовольства України від 26 січня 2023 року № 75. URL: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0266-23#Text

8. Насіння сільськогосподарських культур. Сортові та посівні якості. Технічні умови: ДСТУ 2240-93 [Чинний від 1994-07-01]. – К.: Держстандарт України, 1994. – 73 с.

9. Присяжнюк Л.М. Використання SSR-маркерів для диференціації нових сортів сої (Glycine max (L.) Merr.) Plant Varieties Studying and Protection. 2017. Т. 13, № 3. С. 269-276.

10. Сиволап Ю. М. Исследование внутривидового полиморфизма и идентификация генотипов ячменя (Hordeum vulgare L.) / Ю. М. Сиволап, Р. Н. Календарь // Цитология и генетика. – 1998. – Т. 32, № 6. – С. 35–41.

11. Сірант Л. В., Дикун М. О., Завальна Г. В. Запасні білки як універсальні маркери ідентифікації генотипів сільськогосподарських рослин. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2015. Том 17. С. 333-335.

12. Соя (Glycine max (L.) Merr.) / В. В. Кириченко, С. С. Рябуха, Л. Н. Кобизєва, О. О. Посилаєва, П. В. Чернишенко : монографія / НААН, Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва . – Х., 2016. – 400 с.

13. Шерепітко Д .В, Злацька А.В. Дослідження поліморфізму сортів сої (*Glycine max* (L.) Marril), придатних до поширення в Україні, за SSR-маркерами зчепленими з локусом Rsv4, що зумовлює стійкість до вірусу мозаїки сої. Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. 2009. Т. 6 С. 195-199.

14. Brody J. R. Sodium boric acid: a Tris–free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis . BioTechniques. 2004. Vol. 36. P. 214–216.

15. Dubey S**.** A Review of Purity Test of Soybean**.** International Journal of Science and Research**.** IJSR.

16. El-Kholy A. S. Evaluation of Genetic Variation among Soybean (Glycine max L.) Cultivars using SDS-PAGE and RAPD Markers Egypt. J. Bot. 3rd international con 17-18 April, 2013. Helwan univ., p. 33-48.

17. Hudcovicova M., Kraic J. Utilisation of SSRs for Characterisation of the Soybean (Glycine max (L.) Merr.) Genetic Resources Czech J. Genet. Plant Breed. 2003. 39, (4). P. 120–126.

18. Identification of soybean varieties. SSR marker method. NY/T 2595-2014. Chinese standard. 15 p.

19. Meesang, N.; Ranamukhaarachchi, S.L.; Petersen, M.J.; Andersen, S.B. Soybean cultivar identification and genetic purity analysis using microsatellite DNA markers Seed Science and Technology.2001. 29(3) P. 637-645.

20. Molecular biomarker analysis – SSR analysis of maize. ISO/TR 17623:2015.International standard. 2015. 10 p.

21. Molecular biomarker analysis – SSR analysis of sunflower. ISO/TR 17622:2015. International standard. – 2015. – 11 p.

22. Natarajan S. S., Luthria D., Bae H., Lakshman D., Mitra A. J. Journal of Agriciltural and food chemistry Transgenic soybeans and soybean protein analysis: An overview,. Agric. Food Chem. 2013. 61(48).P. 11736-43

23. Rayan W. A., and Osman S. A. Phylogenetic relationships of some Egyptian soybean cultivars (Glycine max L.) using SCoT marker and protein pattern. Bulletin of the National Research Centre. 2019. 43(161). P.1-10.

24. Sendekie Y**.** Seed Genetic Purity for Quality Seed Production. Review. International Journal of Scientific Engineering and Science**.** 2020. V. 4(10). P. 1-7.

25. Sofalian O., Bandarian P., Assgh Yyu Tar Bil Derg A. Identification of Seed Storage Protein Polymorphism in Some Soybean (Glycine max Merril) Genotypes Using SDS-PAGE Technique. YYU J AGR SCI. 2015. 25(2). P. 127-133.

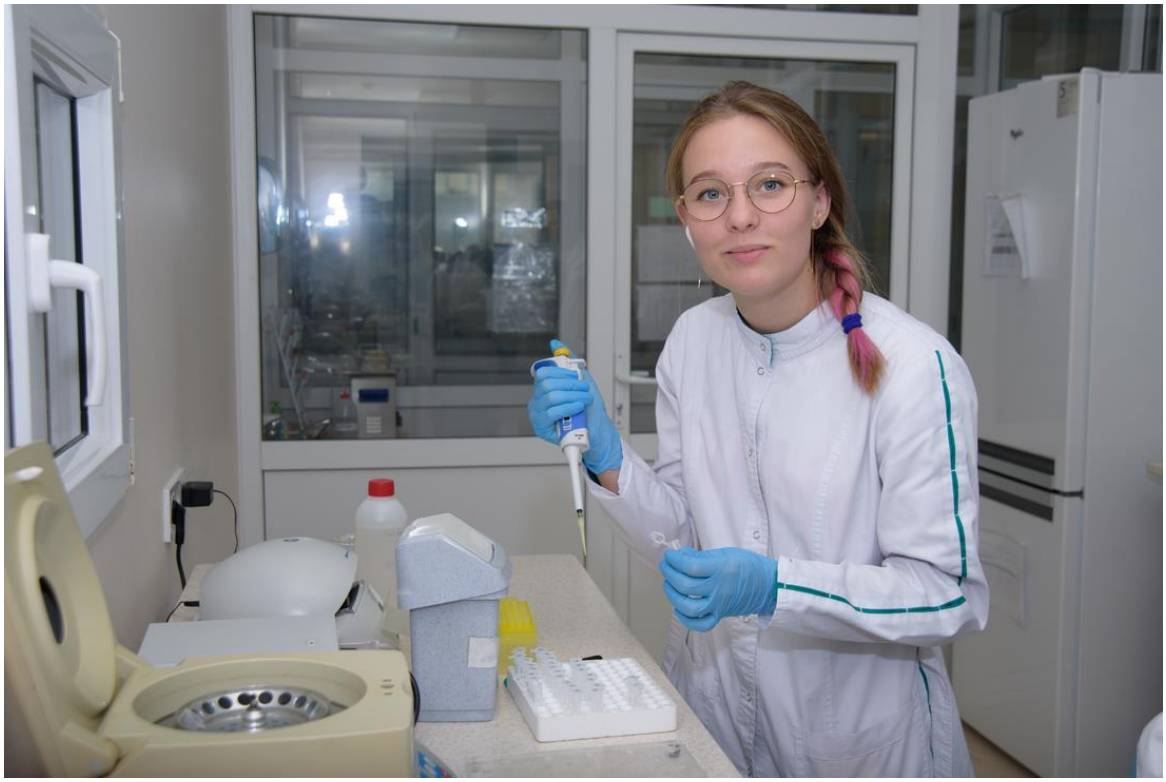
ДОДАТКИ

Додаток А

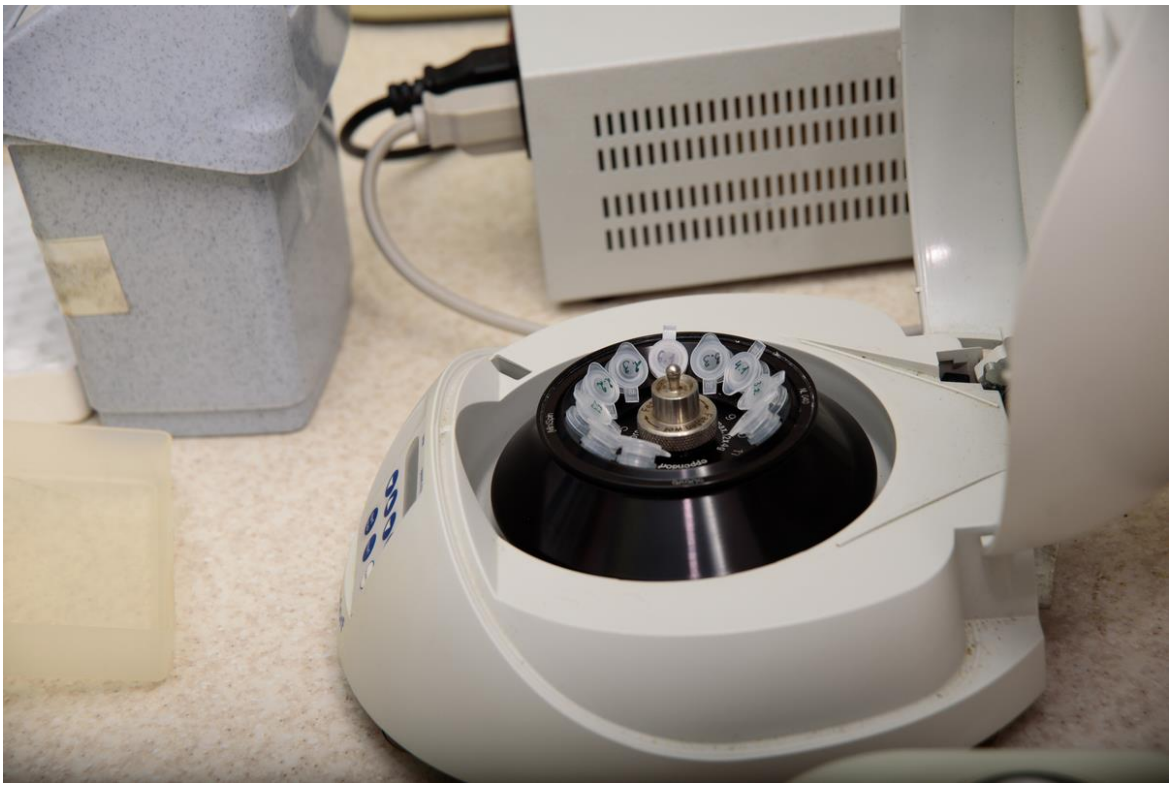
Підготовка зразків

Підготовка зразків

Додаток Б



Виділення ДНК



Виділення ДНК

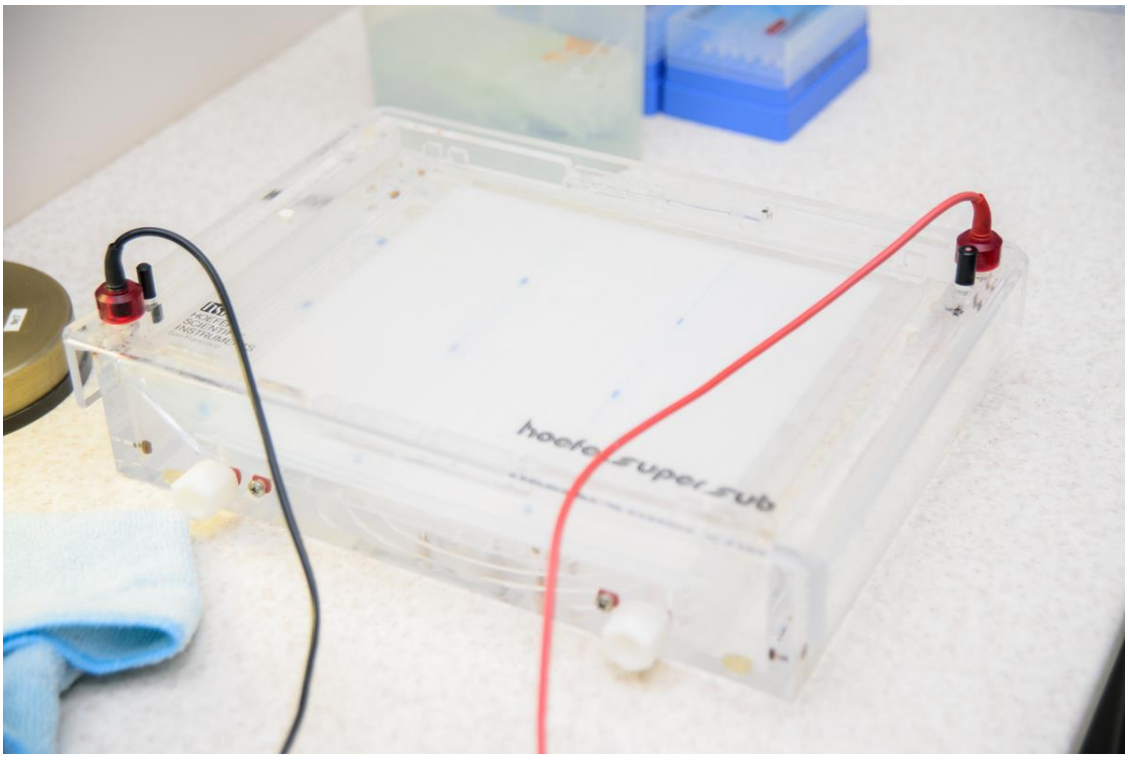
Додаток В

Ампліфікація

Ампліфікація

Додаток Г

Електрофорез



Електрофорез