

УДК 633.34:575.162

Н. Е. ВОЛКОВА¹, д. б. н., с. н. с., гол. наук. співроб.,

О. Ф. БРИК^{1,2}, к. б. н., наук. співроб.,

А. М. ВЕНГЕР¹, мол. наук. співроб.

¹СГІ–НЦНС, Одеса

^{1,2}The Institute for Prevention and Occupational Medicine of the German Social Accident Insurance

natavolki@ukr.net

ІДЕНТИФІКАЦІЯ СОРТІВ СОЇ КУЛЬТУРНОЇ (*Glycine max* (L.) Merr) ТА АНАЛІЗ ГЕНІВ, ЩО КОДУЮТЬ СУБОДИНИЦІ ГЛІЦИНІНУ

Досліджено поліморфізм різних регіонів ядерного геному сої культурної за молекулярними маркерами для диференціації, ідентифікації та паспортизації сортів. Проведено кластерний аналіз сортів сої різного еколого-географічного походження. Визначено алельний склад генів, що кодують субодиниці гліциніну, сортів та зразків світової, в т. ч. української селекції.

Ключові слова: соя культурна, геном, молекулярні маркери, паспортизація, запасні білки, гліцинін.

Вступ. Соя культурна (*Glycine max* (L.) Merr) — важлива сільсько-господарська рослина, яка широко використовується в продовольчому, кормовому та технічному напрямках і має велике агротехнічне значення як азотфіксуюча культура [1]. Вона є однією з найбільш вивчених у генетичному відношенні рослиною. Оприлюднені в 2010 р. результати секвенування геному *G. max* [2] та ресеквенування геному *G. soja* [3] відкрили нові можливості функціонально характеризувати анотовані гени. Системний підхід (геноміка, транскриптоміка, протеоміка, метаболоміка, біоінформатика) до характеристики цих генів дозволяє визначити процеси, що контролюють такі складні ознаки, як врожайність, вміст олії, склад білка, відповіді на абіотичні й біотичні стреси та ін. [4, 5]. Для збереження та аналізу інформації з «оміків» сої є електронний ресурс «SoyBase and the Soybean Breeder's Toolbox» (<http://soybase.org/>).

У дослідженнях геному сої нині широко використовують різні типи молекулярних маркерів, які розроблено на основі поліморфізму довільно ампліфікованої ДНК (Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD), довжини ампліфікованих послідовностей ДНК (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP), повторів простих послідовностей (Simple Sequence Repeats, SSR), міжмікросателітного поліморфізму (Inter Simple Sequence Repeats, ISSR), однонуклеотидного поліморфізму (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) та ін. Уперше в Україні молекулярно-генетичні до-

слідження поліморфізму сої культурної з застосуванням молекулярних маркерів проведено в СГІ–НЦНС [6–8].

Прикладом впровадження молекулярних маркерів у такому важливому напрямі селекції сої, як поліпшення якості зерна (високий вміст білка, оптимізація його складу, низький вміст антипоживних речовин, покращені смакові властивості, певні технологічні показники), є ідентифікація генів, що кодують запасні білки, та створення системи генспецифічних маркерів. Один з двох основних запасних білків насіння сої — гліцинін (11S глобулін) є гексамером з шести субодиниць, розподілених на групи: група I (G1, G2, G3 або $A_{1a}B_2$, A_2B_{1a} , $A_{1b}B_{1b}$), що кодується генами *Gy1*, *Gy2*, *Gy3*; група IIa (G4 або $A_5A_4B_3$), що кодується геном *Gy4*; група IIb (G5 або A_3B_4), що кодується геном *Gy5*. Ідентифіковано та картовано два додаткових гліцинінових гени, а саме псевдоген *gy6* і функціональний ген *Gy7*, який кодує шосту субодиницю гліцинину G7. Для кожної субодиниці існує понад 84 % гомології в межах групи і 45–49 % між групами [9, 10].

Мета роботи: дослідження різних регіонів ядерного геному сої культурної за молекулярними маркерами для ідентифікації сортів та визначення генів, що кодують запасні білки насіння.

Матеріал і методи. Для дослідження генетичного різноманіття використовували 150 селекційних форм і сортів сої культурної, з яких 32 сорти з різних еколого-географічних зон: американського походження — Провар, Анока, Капітал, Магна, Амсой, А-100, Блекхок, Ада; далекосхідного походження — Грибовська місцева, Амурська 42, Амурська 111, Амурська 57, Амурська 51, Амурська 321, Амурська 154, Амурська 347; китайського походження — К 2601, Харбінська, К 2441, Ларедо, К 766, К 2408, Тзи-ті 4, К 2406; європейського походження — Ронест 104, Маусерова біла, Ронест 1, Дунайка, К 3–382, KZ-26, TSZ 14, Попельсдорфер (насіння люб'язно надано відділом селекції, генетики та насінництва бобових культур СГІ–НЦНС). Для визначення аельного стану генів, що кодують запасні білки насіння, досліджували сорти сої культурної Сяйво, Одеська 150, Донька, Аркадія, Форватер, ВІР5048, Медея, Дельта, Валюта, зразки F_6 -гібридів Медея х ВІР 5048 та Дельта х Валюта, насіння яких люб'язно надано відділом селекції, генетики та насінництва бобових культур СГІ–НЦНС, а також сорти Williams 82, Lai wa dou, Harovinton, насіння яких отримано з National Plant Germplasm System (США).

Екстракція ДНК з проростків, постановка полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), гель-електрофорез в агарозних і поліакриламідних гелях здійснювали за загальноприйнятими методиками. В ПЛР використовували дев'ять довільних та сім ISSR-праймерів, вісім пар праймерів до мікросателітних локусів, шість пар праймерів до генів *Gy1*, *Gy2*, *Gy3*, *Gy4*, *Gy5* [11, 12].

Кластерний аналіз даних молекулярно-генетичного аналізу проводили за програмою TREES 4.0 (у вільному доступі) незваженим парногру-

повим методом з арифметичним усередненням (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA).

Результати. Дослідження внутривидового поліморфізму сої культурної. Для вивчення генетичної спорідненості 150 селекційних форм сої досліджено «анонімні» регіони геному за допомогою ПЛР з довільними праймерами та подальшого кластерного аналізу. Генотипи розподілено на групи за рівнем генетичної спорідненості. У більшості випадків розподіл відповідав даним родоводів. Дібрані пари генотипів з найбільшими і найменшими генетичними дистанціями для залучення в селекційні програми.

При дослідженні 32 сортів сої різного еколого-географічного походження за різними регіонами геному («анонімні» регіони, ділянки між простими повторами, мікросателітні локуси) розподіл на дендрограмі співпадав з даними щодо їхнього походження.

Ідентифікація генотипів сої. Застосуванням ПЛР-аналізу восьми мікросателітних локусів досліджено 32 сорти сої, першим етапом якого стала перевірка на генетичну чистоту. В подальшому вивченні використовували генотипи, гомозиготні за всіма локусами. Виявлено 25 продуктів ампліфікації, що дозволило диференціювати всі досліджені сорти.

При дослідженні SSR-локусу SOYHSP176 (Low MW Heat shock protein gene) у сортів з Китаю, Європи і Далекого Сходу виявлено алель розміром 109 п. н., у сорту американського походження виявляли також алель розміром 119 п. н. Для локусу SOYHSP179 (Heat shock protein gene, Gmhsp17.9-D) характерні два алеля — 92 і 212 п. н., причому останній спостерігали тільки у сортів китайської та європейської селекції. Розподіл алелів локусу SOYSC514 (Lipoxygenase gene) був таким: далекосхідні сорти мали тільки алель розміром 187 п. н., а в сортів європейської селекції виявлено алель 209 п. н., що не зустрічається у інших сортів сої. Для найваріабельнішого у даній вибірці сортів сої локусу SAT 1 детектовано п'ять алелів: 221, 241, 255, 267, 273 п. н. Алель довжиною 273 п. н. зустрічається тільки у далекосхідних сортів, крім того, у сортів цього походження не виявлено алель 241 п. н., який характерний для китайських сортів сої. У сортів американської і європейської селекції детектовано алель розміром 267 п. н., проте в американських сортів, крім цього, зустрічається алель 255 п. н., а в європейських — 241 п. н. У китайських і далекосхідних сортів за локусом SATT 1 характерний один тип алеля: 147 п. н. (тільки один китайський сорт мав алель 117 п. н.), тоді як сорти з Європи мають усі три типи алелів даного локусу (117, 147, 155 п. н.). Розподіл алелів SSR-локусів у генотипів різних еколого-географічних зон дозволив припустити можливе адаптаційне значення окремих алелів.

Розроблено принцип диференціації, ідентифікації та паспортизації генотипів сої. Відображення специфічності генотипу можливо проводити у вигляді літеро-числової генетичної формули, в якій фіксуються досліджений локус / ген та розмір алелів (у п. н.), характерних для даного

генотипу. За даними аналізу поліморфізму восьми мікросателітних локусів складено формули генотипів.

ДНК-типування зразків сої за Gy-генами. Маркери генів *Gy1*, *Gy2*, *Gy3*, *Gy5* є домінант-рецесивними (наявність / відсутність фрагментів ампліфікації розмірами 801, 1211, 1037 та 864 п. н. відповідно) [12]. Відсутність ген-специфічної ампліфікації показує, що інделі або варіації послідовностей цих генів призводять до відсутності певних субодиниць.

Для тестування гена *Gy4* можливо використовувати дві системи. 1) З використанням біфазної трьохпраймерної техніки ПЛР (Temperature-Switch Polymerase Chain Reaction, TS-PCR) можливо детектувати нормальний та мутантний A_4 -алель (фрагменти ампліфікації 504 та 266 п. н.) [12]. 2) Класична ПЛР з трьома парами праймерів — локус-специфічні (продукт ампліфікації 307 п. н.) та алеле-специфічні (продукти ампліфікації розмірами 771 п. н. для мутантного та 324 п. н. для нормального алелів). Дані маркери кодомінантні (наявність фрагментів певної довжини) [11].

Сорти Harovinton, Lai wa dou та Williams 82 використано як позитивні контролю певного стану *Gy*-генів. Для Williams 82 характерний «дикий» алель гена *Gy4*, для Lai wa dou — мутантний алель гена *Gy4*, для Harovinton — повний комплект субодиниць гліциніна.

За результатами ПЛР-аналізу для сорту Harovinton виявлено продукти ампліфікації очікуваних розмірів: *Gy1*–801 п. н., *Gy2*–1211 п. н., *Gy3*–1037 п. н., *Gy4*–307 п. н., *Gy5*–864 п. н. [12]. Для сорту Williams 82 виявлено наявність продукту ампліфікації регіонів гена *Gy4* очікуваного розміру 324 п. н., характерного для «дикого» алеля, та відсутність продукту ампліфікації 771 п. н. Для сорту Lai wa dou виявлений продукт ампліфікації регіонів гена *Gy4* очікуваного розміру 771 п. н., характерний для мутантного алеля; продукт розміром 324 п. н. був відсутній [11].

Оскільки для сортів Harovinton, Lai wa dou та Williams 82, які використано як позитивні контролю певного стану *Gy*-генів, отримано очікувані результати, проведено ДНК-типування зразків сої за геном *Gy4*. У всіх сортів та гібридних зразків встановлено відсутній фрагмент ампліфікації розміром 771 п. н. Наявність 324 п. н.-фрагменту виявлено у сортів Сяйво, Одеська 150, Донька, Аркадія, Форватер, VIP 5048, Медея, Дельта, Валюта та у зразків F_6 Дельта х Валюта та Медея х VIP5048. Отже, для сортів сої, які використовуються в СГП–НЦНС, характерний «дикий» алель гена *Gy4*.

Фрагмент ампліфікації гена *Gy4* розміром 324 п. н. — асоційований з наявністю, а фрагмент 771 п. н. свідчить про відсутність A_4 -пептиду субодиниці групи IIa. Саме насіння сортів сої без A_4 -пептиду придатне для виготовлення гіпоалергенних харчових продуктів.

Поєднання добору за допомогою маркерів з підходами традиційної селекції значно підвищить ефективність та результативність селекційних програм з поліпшення якості зерна сої.

Висновки. Групування сортів та зразків сої культурної за даними молекулярно-генетичних та кластерних аналізів відповідає їхнім родоводам та еколого-географічному походженню. Розроблено принцип реєстрації генотипу сої за ДНК-типунням мікросателітних локусів. Аналізом поліморфізму гена *Gy4*, який кодує G4 ($A_4A_5B_3$) субодиницю гліциніна, виявлено присутність алеля «дикого» типу у сортах і зразках сої СГІ–НЦНС.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Soybean. Molecular aspects of breeding / Edit. A. Sudaric // InTech Europe, Croatia, 2011. — 514 p.
2. Schmutz J. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean / J. Schmutz, S. Cannon, J. Schlueter [et al.] / J. Schmutz // Nature. — 2010. — Vol. 463. — P. 178–183.
3. Kim M. Whole-genome sequencing and intensive analysis of the undomesticated soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) genome / M. Kim, S. Lee., K. Van [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2010. — Vol. 107 (51). — P. 22032–22037.
4. Guo Y. Soybean Omics and Biotechnology in China / Y. Guo, X. Wang, W. He [et al.] // Plant Omics J. — 2011. — Vol. 4 (6). — P. 318–328.
5. Qiu L. A platform for soybean molecular breeding: the utilization of core collections for food security / L. Qiu, L. Xing, Y. Guo [et al.] // Plant Mol. Biol. — 2013. — Vol. 83. — P. 41–50.
6. Сиволап Ю. М. Исследование молекулярно-генетического полиморфизма сои (*Glycine max* L.) с помощью ПЦР-анализа / Ю. М. Сиволап, А. Ф. Брик, В. И. Сичкарь // Цитология и генетика. — 1998. — Т. 32, № 4. — С. 89–96.
7. Брик А. Ф. Молекулярно-генетическая идентификация и паспортизация сортов сои / А. Ф. Брик, Ю. М. Сиволап // Генетика. — 2001. — Т. 37, № 9. — С. 1265–1273.
8. Брик А. Ф. Молекулярно-генетический полиморфизм сои детектированный ПП-ПЦР, SSRP и ISSR / А. Ф. Брик, Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика. — 2001. — Т. 35, № 5. — С. 3–10.
9. Beilinson V. Genomic organization of glycinin genes in soybean / V. Beilinson, Z. Chen, R. Shoemaker [et al.] // Theor. Appl. Genet. — 2002. — Vol. 104. — P. 1132–1140.
10. Li C. Molecular evolution of glycinin and b-conglycinin gene families in soybean (*Glycine max* L. Merr.) / C. Li, Y. Zhang // Heredity. — 2011. — Vol. 106. — P. 633–641.
11. Rayhan M. Identification of *Gy4* nulls and development of multiplex PCR-based co-dominant marker for *Gy4* and α' subunit of β -conglycinin in soybean / M. Rayhan, K. Van, D. Kim [et al.] // Gen. Genom. — 2011. — Vol. 33. — P. 383–390.
12. Jegadeesan S. Molecular analysis of glycinin genes in soybean mutants for development of gene-specific markers / S. Jegadeesan, K. Yu, L. Woodrow [et al.] // Theor. Appl. Genet. — 2012. — Vol. 124. — P. 365–372.

Надійшла 06.04.2015.

UDC 633.34:575.162

Volkova N. E., Brik O. F., Venger A. M. Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

IDENTIFICATION OF SOYBEAN VARIETIES (*Glycine max* (L.) Merr) AND ANALYSIS OF GENES ENCODING SUBUNIT GLYCININS

Soybean genome's different regions investigations by three types of molecular markers allowed to cluster the samples according to their pedigrees and eco-geographical origin. The principle of soybean genotypes registration based on the results of microsatellite loci DNA typing was developed. Polymorphism of gene *Gy4*, encoding G4 (A₄A₅B₃) glycinin subunit, was analyzed and established the presence of allele «wild» type varieties and soybean samples.

УДК 633.34:575.162

Волкова Н. Э., Брик А. Ф., Венгер А. Н.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ СОРТОВ СОИ КУЛЬТУРНОЙ (*Glycine max* (L.) Merr) И АНАЛИЗ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ СУБЪЕДИНИЦЫ ГЛИЦИНИНА

Исследование различных участков генома сои с помощью трех типов молекулярных маркеров позволило кластеризовать образцы соответственно их родословных и эколого-географическому происхождению. Разработан принцип регистрации генотипа сои по результатам ДНК-типирования микросателлитных локусов. Исследован полиморфизм гена *Gy4*, кодирующего G4 (A₄A₅B₃) субъединицу глицинина, и установлено наличие аллеля «дикого» типа в сортах и образцах сои СГІ–НЦНС.