

# Використання SSR-маркерів для диференціації нових сортів сої (*Glycine max* (L.) Merr.)

Л. М. Присяжнюк\*, С. І. Мельник, Ю. В. Шитікова,  
І. О. Сігалова, А. П. Іваницька

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

**Мета.** Дослідити молекулярно-генетичний поліморфізм нових сортів сої за допомогою SSR-маркерів (simple sequence repeat) щодо можливості застосування його для експертизи сортів рослин на відмінність, однорідність та стабільність. **Методи.** Молекулярно-генетичний аналіз нуклеїнових кислот, кластерний аналіз. **Результати.** Наведено результати досліджень молекулярно-генетичного поліморфізму 25 сортів сої за мікросателітними маркерами з використанням полімеразної ланцюгової реакції. Аналіз продуктів ампліфікації свідчить, що за всіма досліджуваними SSR-маркерами внутрішньосортний поліморфізм спостерігався в сорту 'Алінда', за локусами Satt 228 та Satt 726 – у сорту 'Арніка', за локусами Satt 063 та Satt 726 – у сорту 'Фуріо', який було враховано в подальших дослідженнях деяких генотипів. Під час оцінки поліморфізму досліджуваних сортів визначено, що частоти ідентифікованих алелів були в межах від 0,02 до 0,1 залежно від мікросателітного локусу. За допомогою кластерного аналізу визначено генетичні дистанції між сортами. Відстань між більшістю сортів, зокрема в 59 випадках, становила 3,61, 3,16 та 2,83, ці значення генетичних дистанцій були найпоширенішими в досліджуваній вибірці сортів. **Висновки.** Аналіз молекулярно-генетичного поліморфізму свідчить, що серед 25 досліджуваних сортів найбільш поліморфними були 10, що необхідно враховувати під час їх подальшої ідентифікації. Визначено, що ідентифіковані алелі рівномірно представлені у вибірці досліджуваних сортів сої, про що свідчить високий індекс поліморфності локусу (0,83–0,94). Під час оцінки генетичних дистанцій між сортами було встановлено, що найбільш схожими за локусами виявилися сорти, генетичні дистанції між якими становили 2,00, відмінними – 3,87. Таким чином, маркерна система, яка складається з чотирьох мікросателітних локусів – Satt 063, Satt 114, Satt 228 та Satt 726, є ефективною для визначення відмінності між досліджуваними сортами сої.

**Ключові слова:** молекулярно-генетичний поліморфізм, маркерна система, генетичні дистанції, мікросателітні локуси.

## Вступ

Щороку в усьому світі в селекційній програмі гібридизації сої (*Glycine max* (L.) Merr.) залучають тисячі ліній та сотні елітних сортів [1–5]. У процесі селекції нові й поліпшені сорти можуть бути посилені новими джерелами генетичних ресурсів. Тому критерії добору селекційного матеріалу та сортів за умови їх реєстрації потрібно розглядати не лише за агрономічною цінністю, а й з позиції їхнього генетичного різноманіття [6–8]. Сортове різноманіття сортів зазвичай оцінюють за маркерними морфологічними ознаками. Соя, порівняно з багатьма видами сільськогосподарських рослин, має

відносно низький рівень генетичної варіабельності [9–11]. Тому розроблення підходів до диференціації та ідентифікації сортів цієї культури є актуальним для генетико-селекційних досліджень і захисту авторських прав.

Добору ефективної системи диференціації присвячено багато робіт учених науково-дослідних установ в Україні та за кордоном, за результатами яких у сої виявлено високий рівень поліморфізму за мікросателітними локусами (SSR) [12–15]. Такий підхід забезпечує підвищення ефективності експертизи сортів, оскільки результати цієї експертизи тісно пов'язані з проблемами об'єктивної оцінки сортового матеріалу [16–18].

**Мета досліджень** – дослідити молекулярно-генетичний поліморфізм нових сортів сої за допомогою SSR-маркерів (simple sequence repeat) щодо можливості застосування його для експертизи сортів рослин на відмінність, однорідність та стабільність.

## Матеріали та методика досліджень

Матеріалом для дослідження були 25 сортів сої культурної української та іноземної селекції: 'Абеліна', 'Алінда', 'Арніка', 'Бер-

Larysa Prysiazhniuk  
<http://orcid.org/0000-0003-4388-0485>  
Serhii Melnyk  
<http://orcid.org/0000-0002-5514-5819>  
Yuliia Shytikova  
<http://orcid.org/0000-0002-1403-694X>  
Iryna Sihalova  
<http://orcid.org/0000-0001-7736-6121>  
Alla Ivanitskaya  
<http://orcid.org/0000-0003-3987-4728>

кана, 'ДХ 530', 'Кано', 'Гебо', 'Міленіум', 'ДХ 618', 'Монарх', 'ОАЦ Каліпсо', 'ОАЦ Лейкв'ю', 'ОАЦ Медок', 'Перлина', 'Норанда', 'Фуріо', 'Карра', 'Аляска', 'ПР 1309004', 'Аріса', 'Нордіка', 'Амадеус', 'Сг Айдер', 'Сг ср Пікор', 'Асука'. Вибірка для досліджень включала по 30 генотипів кожного сорту. Для виділення ДНК з насінини застосували катіонний детергент ЦТАБ (цетилтриметиламоній бромід), дворазове очищення сумішшю хлороформ-ізоаміловий спирт та розчином етанолу [19–20].

Молекулярно-генетичний поліморфізм сортів сої досліджували за допомогою ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції) зі специфічними праймерами за чотирма мікросателітними локусами (МС-локуси) – Satt 114, Satt 228, Satt 726, Satt 063 (табл. 1), які були обрані на основі аналізу їхнього індексу поліморфності у дослідженнях минулих років [12].

ПЛР проводили на ампліфікаторі TC-Y CreaCon (USA). Реакційна суміш містила 100 нг сумарної рослинної ДНК, сольовий буфер (10 mM Tris-HCl, pH 9,0; 50 mM KCl; 0,01% Triton X-100), 1,5–2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; по 200 мкМ дезоксинуклеотидтрифосфатів (дНТФ), по 0,2–0,5 мкМ кожного з праймерів та одну одиницю Taq-полімерази. Загальний об'єм суміші становив 20 мкл.

Для кожної пари праймерів застосовували такі температурно-часові параметри ПЛР: крок 1 (початкова денатурація) 94 °C – 2–3 хв; крок 2 (напрацювання специфічних продуктів реакції): денатурація 93 °C – 30 с; гібридизація праймерів 50–55 °C – 60 с; елонгація 72 °C – 60 с; кількість циклів – 35; крок 3 (кінцева елонгація) 72 °C – 3 хв.

Продукти реакції ампліфікації візуалізували методом електрофорезу в 2% агарозному гелі у 0,5 × ТБЕ (трис-боратний буферний розчин) за загальноприйнятою методикою з бромистим етидієм [19]. Електрофорез проводили протягом 1,5 год за напруженості електричного поля 5 В/см.

Результати електрофоретичного розподілу продуктів ПЛР визначали в ультрафіолетовому світлі та фіксували за допомогою системи документування гелів, що складається з транслюмінатора та відеосистеми з цифровою камерою. Розмір отриманих ампліконів визначали відносно маркера молекулярної маси з використанням комп'ютерної програми TotalLab v2.01.

Для характеристики генетичної структури досліджуваних сортів сої розраховували частоти детектованих алелів за кожною парою праймерів. З метою оцінки ступеня ідентифікованої мінливості в популяції та здатності маркера визначати різницю між генотипами розраховували PIC (polymorphism information content) – індекс поліморфності локусу за формулою:

$$PIC = 1 - \sum_i p_{li}^2$$

де  $p_{li}$  – частота  $i$ -того алеля для  $l$  локусу [20].

Здатність маркерної системи з чотирьох мікросателітних локусів диференціювати досліджені сорти оцінювали на основі кластерного аналізу з використанням програми STATISTICA 12. Сорти групували за допомогою незваженого методу середніх зв'язків [21–23].

### Результати досліджень

Для дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму сортів сої проаналізовано чотири мікросателітні локуси Satt 726, Satt 063, Satt 114 і Satt 228.

Вибірка в межах кожного дослідженого сорту складалася з тридцяти індивідуальних зразків ДНК, які об'єднували в суміші, по шість у кожній, що становило п'ять сумішей ДНК для кожного сорту, та проводили ПЛР.

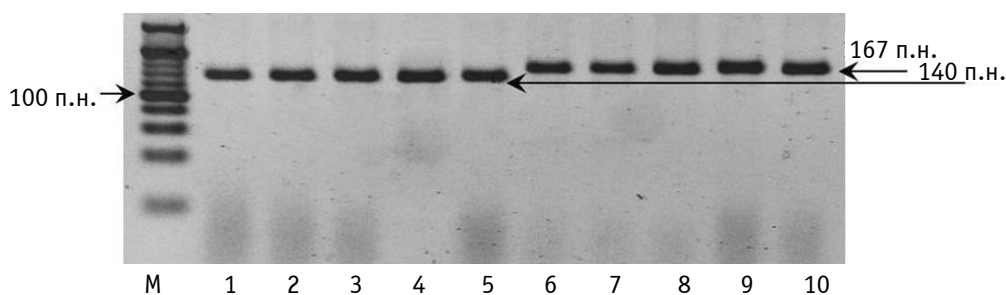
На рисунку 1 представлено отримані неполіморфні алелі для сортів сої 'ОАЦ Медок' та 'ОАЦ Каліпсо' за локусом Satt 063, тобто генотипи в суміші, в яких не виявлено поліморфізму за локусом Satt 063, мають у своєму складі алель одного розміру.

Таблиця 1

#### Характеристика праймерів SSR-локусів сої

Назва праймера	Нуклеотидна послідовність праймерів 5' ..... 3'	CG-склад, %	Температура гібридизації, °C	Очікуваний розмір ампліконів, п. н.
Satt 726 – F*	<i>gcgTTTTAgTATggATAATgTTTT</i>	21,7	50	170–280
Satt 726 – R**	<i>gcgAAgggAcAAgAgTgAT</i>	52,6		
Satt 063 – F	<i>AAATgATTAACAAATgTTATgAT</i>	17,4	50	95–210
Satt 063 – R	<i>ACTTgcATcAgTTAATAcAA</i>	28,6		
Satt 114 – F	<i>gggTTATccTccccAATA</i>	50,0	55	75–130
Satt 114 – R	<i>ATATgggATgATAAggTgAAA</i>	33,3		
Satt 228 – F	<i>TcATAcgtAAAgAgATggTAAAAcT</i>	32,0	50	200–270
Satt 228 – R	<i>cATTATAAgAAAcgtTgcTAAAgAg</i>	32,0		

\*F – прямиий праймер; \*\*R – зворотний праймер.

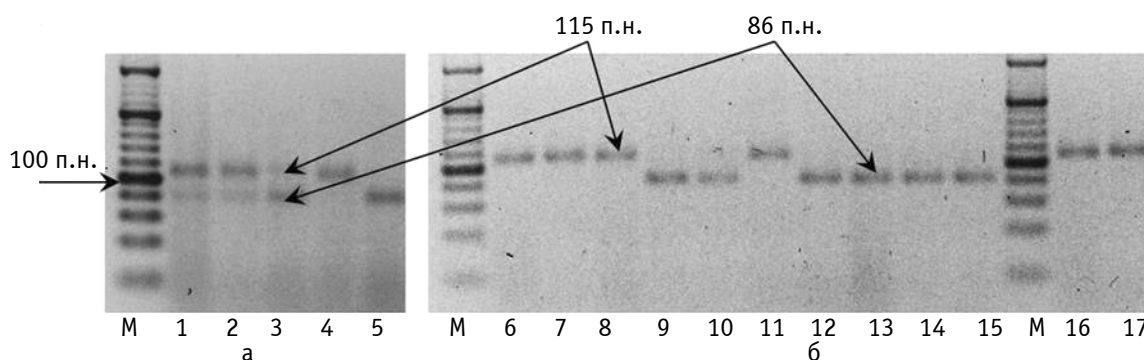


**Рис. 1. Електрофоретичний розподіл алелей МС-локуса Satt 063 для сортів сої 'ОАЦ Медок' та 'ОАЦ Каліпсо' у суміші ДНК шести генотипів:**

М – маркер молекулярної маси *Thermo Scientific O'RangeRuler 20 bp DNA Ladder*;  
1–5 – продукти ампліфікації ДНК суміші шести генотипів сорту сої 'ОАЦ Медок';  
6–10 – продукти ампліфікації ДНК суміші шести генотипів сорту сої 'ОАЦ Каліпсо'

У разі виявлення поліморфізму всередині суміші для встановлення алельного стану локусу проводили ПЛР кожного зразка, що входив до її складу. Електрофоретичні спектри алелей, ідентифікованих для сорту сої 'ПР1309004' за МС-локусом Satt 114 наведено на рисунку 2а.

За результатами аналізу деяких генотипів сорту 'ПР1309004' отримано електрофоретичний розподіл, який відображає алельний склад МС-локусів генотипів, що входять до суміші під номерами 1 та 2. Результати аналізу індивідуальних зразків сорту 'ПР1309004' за МС-локусом Satt 114 наведено на рисунку 2б.



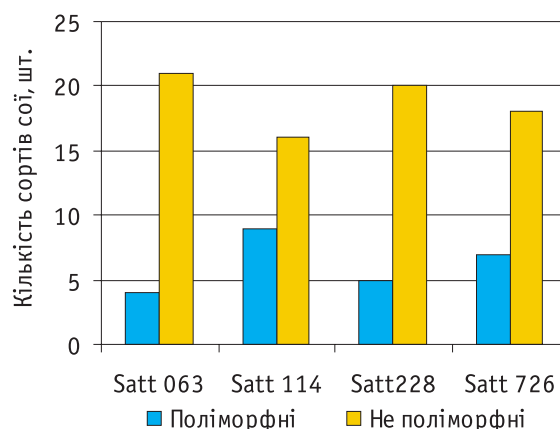
**Рис. 2. Електрофоретичний розподіл алелей МС-локуса Satt 114 для сорту сої 'ПР1309004':**

а) у суміші ДНК шести генотипів; б) окремих генотипів.  
М – маркер молекулярної маси *Thermo Scientific O'RangeRuler 20 bp DNA Ladder*;  
1–17 – продукти ампліфікації ДНК сорту сої 'ПР1309004'

Аналіз свідчить, що з 25 досліджуваних сортів поліморфними виявилися від 4 (за локусом Satt 063) до 9 (за локусом Satt 114) сортів. Найбільший рівень поліморфізму встановлено для локусів Satt 114 та Satt 726 – 9 та 7 сортів відповідно мали по два і більше алелей за цими маркерами (рис. 3).

Згідно з отриманими даними у певних сортів сої спостерігався внутрішньосортний поліморфізм: за всіма досліджуваними МС-локусами у сорту 'Алінда', за локусами Satt 228, Satt 726 – у сорту 'Арніка', за локусами Satt 063 та Satt 726 – у сорту 'Фуріо'. Таким чином, у разі застосування оцінки поліморфізму для створення молекулярно-генетичних формул сортів сої або встановлення їхньої автентичності потрібно враховувати внутрішньосортний поліморфізм.

Внаслідок проведених досліджень отримано алелі специфічних розмірів у межах кожного МС-локусу (табл. 2).



**Рис. 3. Розподіл сортів сої за МС-локусами відповідно до кількості поліморфних сортів**

Таблиця 2

**Алелі, ідентифіковані у сортів сої за МС-локусами**

Назва локусу	Кількість алелей, шт.	Розмір алелей, п. н.	PIC
Satt 114	10	77; 82; 86; 92; 96; 100; 110; 115; 123; 126	0,83
Satt 228	18	207; 218; 221; 223; 226; 233; 234; 236; 237; 240; 247; 248; 251; 255; 263; 265; 267; 269	0,94
Satt 726	17	188; 200; 205; 209; 215; 220; 225; 229; 233; 240; 245; 250; 255; 258; 268; 270; 275	0,91
Satt 063	15	105; 108; 112; 127; 130; 133; 140; 145; 150; 154; 156; 162; 167; 180; 200	0,90

Найбільшу кількість алелей – 18 – виявлено серед досліджуваних сортів у Satt 228, їхній розмір становив від 207 до 269 п. н., найменшу – 10 алелей – у МС-локусу Satt 114, розмір яких варіював від 77 до 126 п. н.

Частота ідентифікованих алелей була в межах від 0,02 до 0,1 залежно від досліджуваного локусу (рис. 4).

Частота алелей, ідентифікованих за локусами Satt 228 та Satt 063, становила від 0,02 до 0,14, проте більшість виявлених алелів мали частоту 0,04. Для МС-локусу Satt 063 частота варіювала в межах 0,02–0,16. Найбільше коливання значень частоти алелей виявлено за локусом Satt 114 – від 0,02 до 0,26.

Отже, отримані високі значення індексу поліморфності локусу (табл. 2), які були в межах від 0,83 до 0,94 (що в середньому становить 0,89), свідчать про те, що ідентифіко-

вані алелі рівномірно представлені у цій вибірці досліджуваних сортів сої.

Для диференціації сортів на основі результатів ПЛР аналізу за чотирма мікросателітними маркерами проводили кластерний аналіз, який відображає генетичні дистанції між сортами (рис. 5).

За даними аналізу генетичних дистанцій між досліджуваними сортами сої, найбільша відстань спостерігалася між сортами ‘Аляска’ та ‘Алінда’ – 3,87. У міру збільшення спорідненості сортів їхні генетичні відстані зменшуються. Для досліджень найспорідненішими виявились сорти зі значенням 2,00: ‘ДХ 530’ та ‘Абеліна’, ‘ОАЦ Лейкв’ю’ та ‘Монарх’, ‘Сг Ср Пікор’ та ‘Гебо’. Між більшістю досліджуваних сортів, зокрема в 59 їхніх парах, відстань становила 3,61, 3,16 та 2,83, ці значення генетичних дистанцій виявились найпоширенішими в досліджуваній вибірці сортів. Варто звернути увагу, що сорти ‘Карра’ та ‘Амадеус’, які утворюють прилеглий до сортів ‘Гебо’ та ‘Сг Ср Пікор’ кластер, між собою перебувають на однаковому рівні близькості.

Враховуючи те, що абсолютно однаковими вважають об’єкти з цифровим виразом генетичних дистанцій «нуль», або ж які є максимально близькими до нуля, а абсолютно різними – з найбільшим значенням, можна зробити висновок, що за отриманими розрахунками сорти є досить віддаленими та відмінними між собою.

Результати ієрархічної класифікації у вигляді філогенетичного дерева наведено на рисунку 6.

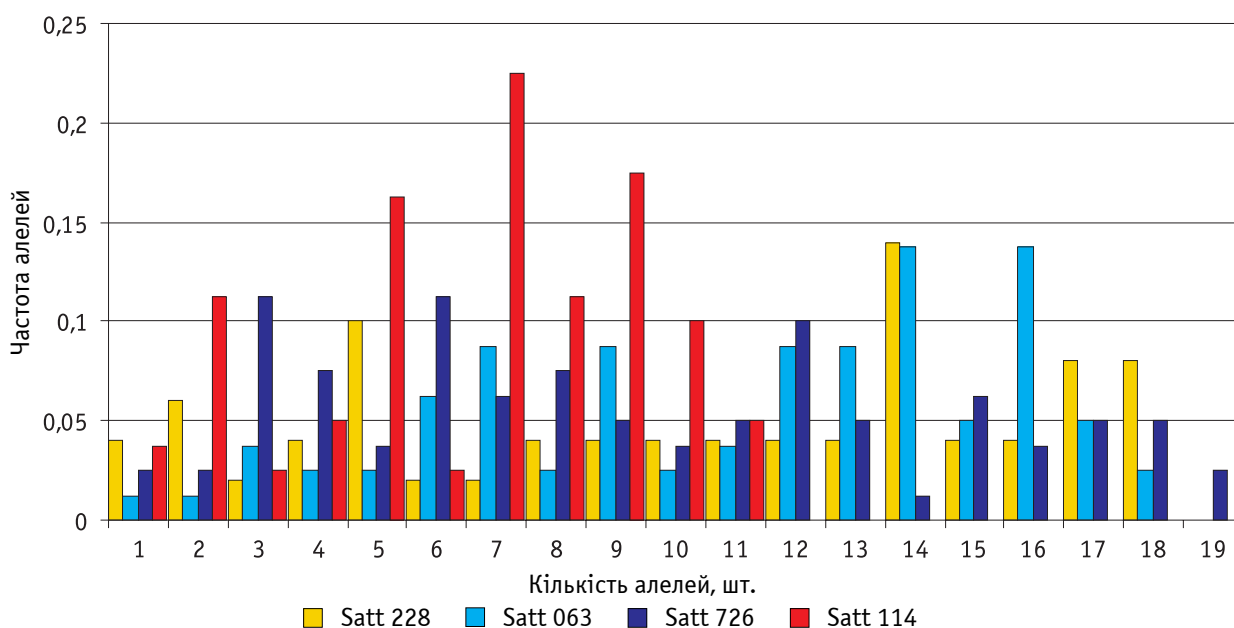


Рис. 4. Розподіл частоти алелей за МС-локусами сої

	'Алінда	'Арніка	'Беркана	'ДХ 530	'Кано	'Гебо	'Міленіум	'ДХ 618	'Монарх	'ОАЦ Каліпсо	'ОАЦ Лейкв'ю	'ОАЦ Медок
'Абеліна'	3,16	3,16	3,00	2,00	2,65	2,83	3,16	2,83	2,45	2,65	2,45	2,45
'Алінда'		3,16	3,61	3,46	3,61	3,16	3,46	3,46	3,46	3,61	3,46	3,16
'Арніка'			3,00	3,46	3,32	3,16	3,16	2,83	2,83	3,32	2,83	2,83
'Беркана'				3,32	2,83	2,65	3,32	2,24	3,00	3,16	3,00	2,65
'ДХ 530'					3,00	3,16	3,46	3,16	2,83	2,65	2,83	3,16
'Кано'						2,65	3,00	2,65	3,00	2,45	3,00	3,00
'Гебо'							3,16	2,45	2,83	3,00	2,83	2,83
'Міленіум'								3,16	3,16	3,32	2,83	3,16
'ДХ 618'									2,83	3,00	2,83	2,45
'Монарх'										3,00	2,00	2,83
'ОАЦ Каліпсо'											3,00	3,00
'ОАЦ Лейкв'ю'												2,83
'ОАЦ Медок'												
'Перлина'												
'Норанда'												
'Фуріо'												
'Карра'												
'Аляска'												
'ПР 1309004'												
'Аріса'												
'Нордіка'												
'Амадеус'												
'Сг Айдер'												
'Сг ср Пікор'												

	'Перлина	'Норанда	'Фуріо	'Карра	'Аляска	'ПР 1309004	'Аріса	'Нордіка	'Амадеус	'Сг Айдер	'Сг ср Пікор	'Асука
'Абеліна'	2,65	2,83	2,83	2,83	3,32	2,65	3,00	3,00	2,83	2,83	2,83	2,83
'Алінда'	3,61	3,74	3,74	3,46	3,87	3,61	3,61	3,61	3,46	3,46	3,46	3,46
'Арніка'	3,32	3,46	3,46	3,16	3,32	3,61	3,32	3,32	3,16	3,16	2,83	3,46
'Беркана'	3,16	3,32	3,32	2,65	3,46	3,16	3,16	2,83	2,65	3,00	2,65	3,00
'ДХ 530'	3,00	3,16	3,16	3,16	3,32	3,32	3,00	3,32	3,16	3,16	3,16	3,16
'Кано'	3,16	3,32	3,32	2,65	3,16	3,16	3,16	2,83	3,00	2,65	2,65	2,65
'Гебо'	3,00	3,16	2,83	2,45	3,32	3,32	3,00	2,65	2,45	2,83	2,00	2,83
'Міленіум'	3,32	3,16	3,46	3,16	3,61	3,61	3,00	3,32	3,16	2,83	3,16	3,46
'ДХ 618'	3,00	3,16	3,16	2,45	3,32	3,32	3,00	2,24	2,83	2,83	2,45	2,83
'Монарх'	2,65	2,83	2,83	2,83	3,32	3,00	3,00	3,00	2,83	2,83	2,83	2,83
'ОАЦ Каліпсо'	3,16	3,00	3,32	3,00	2,83	3,16	2,83	3,16	3,00	2,65	3,00	3,00
'ОАЦ Лейкв'ю'	2,65	2,45	2,83	2,83	3,32	3,00	3,00	3,00	2,83	2,45	2,83	2,83
'ОАЦ Медок'	3,00	3,16	3,16	2,83	2,65	3,00	2,65	3,00	2,45	2,45	2,83	3,16
'Перлина'		3,00	3,00	3,00	3,46	3,16	3,16	3,16	3,00	3,00	3,00	3,00
'Норанда'			3,16	2,83	3,61	3,32	3,00	3,32	3,16	3,16	3,16	2,83
'Фуріо'				2,83	3,61	3,32	3,32	3,32	2,45	3,16	2,83	3,16
'Карра'					3,32	3,32	3,00	2,65	2,45	2,83	2,45	2,83
'Аляска'						3,16	2,45	3,46	3,00	2,65	3,00	3,61
'ПР 1309004'							3,46	3,16	3,32	3,00	3,32	3,32
'Аріса'								3,16	2,65	2,65	3,00	3,32
'Нордіка'									3,00	3,00	2,65	3,00
'Амадеус'										2,45	2,45	3,16
'Сг Айдер'											2,83	2,83
'Сг ср Пікор'												2,83

Рис. 5. Генетичні дистанції між досліджуваними сортами сої на основі аналізу МС-локусів

На основі отриманої дендрограми визначено 9 кластерів за мікросателітними маркерами Satt 063, Satt 114, Satt 228 та Satt 726, які сформовані сортами 'Абеліна' та 'ДХ 530', 'Монарх' і 'ОАЦ Лейкв'ю', 'Беркана' та 'ДХ 618', 'Гебо' та 'Сг Ср Пікор', 'Кано' та 'ОАЦ Каліпсо', 'ОАЦ Медок' і 'Сг Айдер', 'Аляска'

та 'Аріса', 'Алінда' та 'Арніка', 'Карра' та 'Амадеус'.

За аналізом дендрограми встановлено, що менш спорідненими за досліджуваними МС-локусами були сорти 'Алінда' та 'Арніка'. Більший рівень близькості виявили сорти 'Кано' та 'ОАЦ Каліпсо', 'ОАЦ Медок' і 'Сг Айдер', 'Аляс-

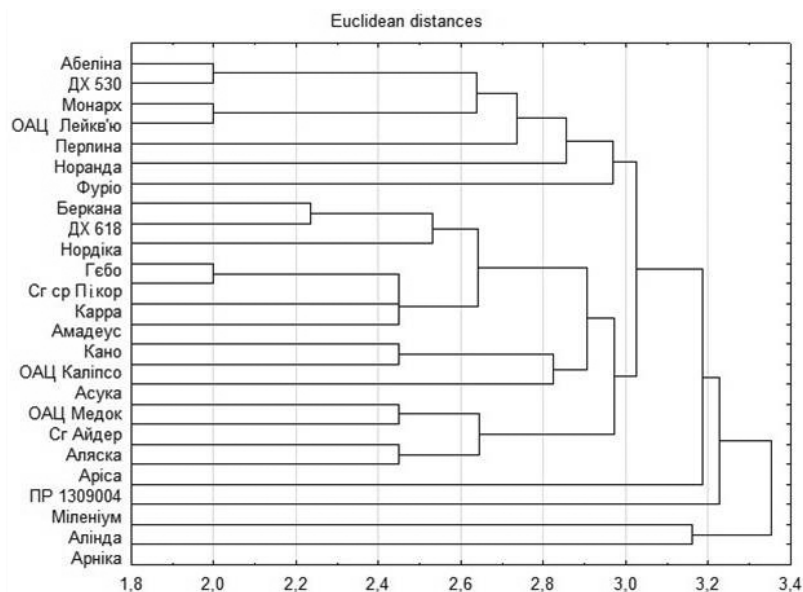


Рис. 6. Розподіл сортів сої за ступенем спорідненості на основі аналізу МС-локусів

ка' та 'Аріса', які перебувають на одному рівні. Сорти сої, які відрізняються за генетичними маркерами Satt 063, Satt 114, Satt 228 та Satt 726, розміщуються в різних блоках кластерів та є найбільш віддаленими один від одного.

Для диференціації 25 досліджених сортів сої можна рекомендувати використання мікросателітних локусів Satt 114, Satt 228, Satt 726 та Satt 063.

### Висновки

Внаслідок дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму нових сортів сої за мікросателітними маркерами встановлено, що з 25 досліджуваних сортів найбільш поліморфними виявились сорти 'Алінда', 'Арніка', 'Астер', 'Беркана', 'КСБ 939', 'ОАЦ Аватар', 'Норанда', 'Фуріо', 'Аляска', 'ПР 1309004' за локусом Satt 726 та сорти 'Алінда', 'ДХ 530', 'Кано', 'Міленіум', 'Перлина', 'Норанда', 'ПР 1309004', 'Нордіка' та 'Асука' – за локусом Satt 114. Тому необхідно враховувати внутрішньосортовий поліморфізм під час ідентифікації тих сортів, в яких наявні кілька алелів одного локуса.

Визначено, що ідентифіковані алелі МС-локусів досить рівномірно представлені у вибірці сортів, про що свідчить високий індекс поліморфності локусу (0,83–0,94). Внаслідок кластерного аналізу отримано 9 кластерів, що об'єднують подібні сорти. Згідно з оцінкою генетичних дистанцій досліджуваних сортів сої було визначено, що найбільш подібними за локусами Satt 063, Satt 114, Satt 228 та Satt 726 виявились сорти, генетичні дистанції між якими становили 2,00: 'ДХ 530' та 'Абеліна', 'ОАЦ Лейкв'ю' та 'Монарх', 'Сг Ср Пікор' і 'Гебо'. Результати цих досліджень були вико-

ристані для створення бази даних молекулярно-генетичного поліморфізму досліджених сортів сої з метою їх ідентифікації.

### Використана література

- Hudcovicová M., Kraic J. Utilisation of SSRs for characterisation of the Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genetic resources. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 2003. Vol. 39, No. 4. P. 120–126.
- Tasma I. M., Warsun A., Asadi A. Development and Characterization of F2 Population for Molecular Mapping of Aluminum-Toxicity Tolerant QTL in Soybean. *J. AgroBiogen.* 2008. Vol. 4, No. 1. P. 1–8. doi: 10.21082/jbio.v4n1.2008.p1-8
- Li Y., Sun S., Zhong C. et al. Genetic mapping and development of co-segregating markers of *RpsQ*, which provides resistance to *Phytophthora sojae* in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 2017. Vol. 130, Iss. 6. P. 1223–1233. doi: 10.1007/s00122-017-2883-7.
- Рамазанова С. А. Идентификация сортов сои (*Glycine max* L.) с использованием микросателлитных локусов ДНК. *Масличные культуры. Науч.-техн. бюл. ВНИИМК.* 2016. Вып. 2. С. 63–67.
- Абугалиева С. И. Генетическое разнообразие сои (*Glycine max* (L.) Merrill). *Биотехнология. Теория и практика.* 2013. № 4. С. 13–19. doi: 10.11134/btp.4.2013.2.
- Jun T.-H., Michel A. P., Mian M. A. Development of soybean aphid genomic SSR markers using next generation sequencing. *Genome.* 2011. Vol. 54, Iss. 5. P. 360–367. doi: 10.1139/g11-002
- Mulato B. M., Müller M., Zucchi M. I. et al. Genetic diversity in soybean germplasm identified by SSR and EST-SSR markers. *Pesq. Agropec. Bras.* 2010. Vol. 45, No. 3. P. 276–283. doi: 10.1590/S0100-204X2010000300007
- Tasma I. M., Satyawati D., Warsun A. et al. Phylogenetic and Maturity Analyses of Sixty Soybean Genotypes Used for DNA Marker Development of Early Maturity Quantitative Trait Loci in Soybean. *J. AgroBiogen.* 2011. Vol. 7, No. 1. P. 37–46. doi: 10.21082/jbio.v7n1.2011.p37-46
- Dong D., Fu X., Yuan F. et al. Genetic diversity and population structure of vegetable soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) in China as revealed by SSR markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2014. Vol. 61, Iss. 1. P. 173–183. doi: 10.1007/s10722-013-0024-y
- Гончаров Ю. О., Деркач К. В., Абраїмова О. Є. та ін. Інформативність SSR-маркерів при дослідженні генетичного поліморфізму ліній кукурудзи. *Фактори експериментальної еволюції організмів* : зб. наук. пр. Київ, 2016. Т. 19. С. 112–116.

11. Gavioli E. A. Molecular Markers: Assisted Selection in Soybeans. *Soybean – Genetics and Novel Techniques for Yield Enhancement* / D. Krezhova (ed.). Rijeka, Croatia : InTech, 2011. Vol. 9. P. 155–180. doi: 10.5772/18934
12. Волкова Н. Е., Брик О. Ф., Венгер А. М. Ідентифікація сортів сої культурної (*Glycine max* (L.) Merr) та аналіз генів, що кодують субодиниці гліциніну. *Збірник наук. праць СГІ–НЦНС*. 2015. Вип. 25. С. 114–119.
13. Присяжнюк Л. М., Коровко І. І., Король Л. В., Шитікова Ю. В. Диференціація сортів сої на основі молекулярно-генетичного поліморфізму. *Роль наукових досліджень в забезпеченні процесів інноваційного розвитку аграрного виробництва України* : матер. Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених і спеціалістів (м. Дніпро, 25 травня 2016 р.). Вінниця : Нілан-ЛТД, 2016. С. 32–33.
14. Волкова Н. Е. Молекулярні маркери в генетиці, селекції та насінництві бобових культур (огляд). *Збірник наук. праць СГІ–НЦНС*. 2015. Вип. 26. С. 99–106.
15. Волкова Н. Е. Молекулярні маркери для експертизи сортів на відмінність, однорідність і стабільність у системі UPOV. *Збірник наук. праць СГІ–НЦНС*. 2014. Вип. 23. С. 50–56.
16. Valliyodan B., Ye H., Song L. et al. Genetic diversity and genomic strategies for improving drought and waterlogging tolerance in soybeans. *J. Exp. Bot.* 2017. Vol. 68, Iss. 8. P. 1835–1849. doi: 10.1093/jxb/erw433
17. Akond M., Liu S., Schoener L. et al. SNP-Based Genetic Linkage Map of Soybean Using the SoySNP6K Illumina Infinium BeadChip Genotyping. *J. Plant Genome Sci.* 2013. Vol. 1, No. 3. P. 80–89. doi: 10.5147/jpgs.2013.0090
18. Tantasawat P., Trongchuen J., Prajongjai T. et al. SSR analysis of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genetic relationship and variety identification in Thailand. *AJCS*. 2011. Vol. 5, Iss. 3. P. 283–290.
19. Методика проведення кваліфікаційної експертизи сортів рослин на придатність до поширення в Україні. Методи визначення показників якості продукції рослинництва / за ред. С. О. Ткачик. Вінниця : Нілан-ЛТД, 2015. 160 с.
20. Роїк М. В., Сиволап Ю. М., Петюх Г. П. та ін. Визначення молекулярно-генетичного поліморфізму роду *Beta* L. за допомогою полімеразної ланцюгової реакції : метод. рекомендації : ПоліграфКонсалтинг, 2007. 27 с.
21. Ермантраут Е. Р., Присяжнюк О. І., Шевченко І. Л. Статистичний аналіз агрономічних дослідних даних в пакеті Statistica 6.0. Київ : ПоліграфКонсалтинг, 2007. 55 с.
22. Everitt B. S., Landau S., Leese M., Stahl D. Cluster Analysis. (5<sup>th</sup> ed.). Chichester : Wiley, 2011. 346 p. doi: 10.1002/9780470977811
23. Дроздов В. И. Инструкция по использованию пакета Statistica 6.0. Курск : Изд-во ЮЗГУ, 2010. 74 с.
6. Jun, T.-H., Michel, A. P., & Mian, M. A. (2011). Development of soybean aphid genomic SSR markers using next generation sequencing. *Genome*, 54(5), 360–367. doi: 10.1139/g11-002
7. Mulato, B. M., Müller, M., Zucchi, M. I., Quecini, V., & Pinheiro, J. B. (2010). Genetic diversity in soybean germplasm identified by SSR and EST-SSR markers. *Pesq. Agropec. Bras.* 2010. Vol. 45, No. 3. P. 276–283. doi: 10.1590/S0100-204X2010000300007
8. Tasma, I. M., Satyawan, D., Warsun, A., Yunus, M., & Santosa, B. (2011). Phylogenetic and Maturity Analyses of Sixty Soybean Genotypes Used for DNA Marker Development of Early Maturity Quantitative Trait Loci in Soybean. *J. AgroBiogen*. 7(1), 37–46. doi: 10.21082/jbio.v7n1.2011.p37-46
9. Dong, D., Fu, X., Yuan, F., Chen, P., Zhu, S., Li, B., ... Zhu, D. (2014). Genetic diversity and population structure of vegetable soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) in China as revealed by SSR markers. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 61(1), 173–183. doi: 10.1007/s10722-013-0024-y
10. Honcharov, Yu. O., Derkach, K. V., Abraimova O. Ye., Satarova, T. M., Veselianska, K. V., Halatsan, S. V., ... Tyshkovska, T. O. (2016). Informativity of SSR-markers in the investigations of maize lines genetic polymorphisms. *Fakt. eksp. evol. org.* [Factors in experimental evolution of organisms], 19, 112–116. [in Ukrainian]
11. Gavioli, E. A. (2011). Molecular Markers: Assisted Selection in Soybeans. In D. Krezhova (Ed.), *Soybean – Genetics and Novel Techniques for Yield Enhancement* (Vol. 9. pp. 155–180). Rijeka, Croatia : InTech. doi: 10.5772/18934
12. Volkova, N. E., Bryk, O. F., & Venher, A. M. (2015). Identification of soybean varieties (*Glycine max* (L.) Merr) and analysis of genes encoding subunit glycinins. *Zbirnyk naukovykh prats SHI–NTsNS* [Collected scientific articles of PBGI–NCSCI], 25, 114–119. [in Ukrainian]
13. Prysiazhniuk, L. M., Korovko, I. I., Korol, L. V., & Shytikova Yu. V. Differentiation of soybean varieties based on molecular genetic polymorphism. In *Rol naukovykh doslidzhen v zabezpechenni protsesiv innovatsiinoho rozvytku ahrarnoho vyrobnytstva Ukrainy: materialy Vseukrainskoi naukovo-praktychnoi konferentsii molodykh vchenykh i spetsialistiv* [The role of scientific research in ensuring the processes of innovative development of agrarian production of Ukraine: Proc. of the All-Ukrainian applied research conference of young scientists and specialists] (pp. 32–33). May 25, 2016, Dnipro, Ukraine. [in Ukrainian]
14. Volkova, N. E. (2015). Molecular markers in genetics, breeding and seed production of legumes (review). *Zbirnyk naukovykh prats SHI–NTsNS* [Collected scientific articles of PBGI–NCSCI], 26, 99–106. [in Ukrainian]
15. Volkova, N. E. (2014). Molecular markers for the examination of varieties for distinctness, uniformity and stability used in UPOV. *Zbirnyk naukovykh prats SHI–NTsNS* [Collected scientific articles of PBGI–NCSCI], 23, 50–56. [in Ukrainian]
16. Valliyodan, B., Ye, H., Song, L., Murphy, M., Shannon, J., & Nguyen, H. (2017). Genetic diversity and genomic strategies for improving drought and waterlogging tolerance in soybeans. *J. Exp. Bot.*, 68(8), 1835–1849. doi: 10.1093/jxb/erw433
17. Akond, M., Liu, S., Schoener, L., Anderson, J. A., Kantartzi, S. K., Meksem, K., ... Kassem, M. A. (2013). SNP-Based Genetic Linkage Map of Soybean Using the SoySNP6K Illumina Infinium BeadChip Genotyping. *J. Plant Genome Sci.*, 1(3), 80–89. doi: 10.5147/jpgs.2013.0090.
18. Tantasawat, P., Trongchuen, J., Prajongjai, T., Jenweerawat, S., & Chaowiset, W. (2011). SSR analysis of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genetic relationship and variety identification in Thailand. *AJCS*, 5(3), 283–290.
19. Tkachyk, S. O. (Ed.). (2015). *Metodyka provedennia kvalifikatsiinoi ekspertyzy sortiv roslin na prydatnist do poshyrennia v Ukraini. Metody vyznachennia pokaznykiv yakosti produktsii roslynyntstva* [Regulations on the procedure and the conduct of qualification tests for suitability of crop varieties for dissemination in Ukraine. Methods of determining quality indices of crop products]. Vinnytsia: Nilan-LTD. [in Ukrainian]
20. Roik, M. V., Syvolap, Yu. M., Petiukh, H. P., Shaiuk, L. V., Babiaz, A. I., & Bilous, N. V. (2007). *Vyznachennia molekuliarno-*

## References

1. Hudcovicová, M., & Kraic, J. (2003). Utilisation of SSRs for characterisation of the soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genetic resources. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 39(4), 120–126.
2. Tasma, I. M., Warsun, A., & Asadi, A. (2008). Development and Characterization of F2 Population for Molecular Mapping of Aluminum-Toxicity Tolerant QTL in Soybean. *J. AgroBiogen*, 4(1), 1–8. doi: 10.21082/jbio.v4n1.2008.p1-8
3. Li, Y., Sun, S., Zhong, C., Wang, X., Wu, X., & Zhu, Z. (2017). Genetic mapping and development of co-segregating markers of *RpsQ*, which provides resistance to *Phytophthora sojae* in soybean. *Theor. Appl. Genet.*, 130(6), 1223–1233. doi: 10.1007/s00122-017-2883-7
4. Ramazanov, S. A. (2016). Identification of soybean (*Glycine max* L.) cultivars using microsatellite DNA loci. *Maslichnye kul'tury. Nauchno-tekhnicheskii byulleten' VNIIMK* [Oil Crops. Scientific and technical bulletin of All-Russia Research Institute of Oil Crops], 2, 63–67. [in Russian]
5. Abugalieva, S. I. (2013). Genetic diversity of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Biotehnologiya. Teoriya i praktika* [Biotechnology. Theory and Practice], 4, 13–19. doi: 10.11134/btp.4.2013.2. [in Russian]

- henetychnoho polimorfizmu rodu *Beta L.* za dopomohoiu polimeraznoi lantsiuhovoi reaktsii [Detection of molecular genetic polymorphism of the genus *Beta L.* using PCR-analysis]. Kyiv: PolihrafKonsal'tynh. [in Ukrainian]
21. Ermantraut, E. R., Prysiashniuk, O. I., & Shevchenko, I. L. (2007). *Statystychnyi analiz ahronomichnykh doslidnykh danykh v paketi Statistica 6.0* [Statistical analysis of agromonic study data using the Statistica 6.0 software suite]. Kyiv: PolihrafKonsal'tynh. [in Ukrainian]
22. Everitt, B., Landau, S., Leese, M., & Stahl, D. (2011). *Clusteranalysis*. (5<sup>th</sup> ed.) Chichester: Wiley. doi: 10.1002/9780470977811
23. Drozdov, V. I. (2010). *Instruktsiya po ispolzovaniyu paketa Statistica 6.0* [Manual for using the Statistica 6.0]. Kursk: Izdatel'stvo YuZGU. [in Russian]

УДК 602.6: 633.34

**Присяжнюк Л. М.\*, Мельник С. И., Шитикова Ю. В., Сигалова И. А., Иваницкая А. П.** Использование SSR-маркеров для дифференциации новых сортов сои (*Glycine max* (L.) Merr.) // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. 2017. Т. 13, № 3. С. 269–279. <http://dx.doi.org/10.21498/2518-1017.13.3.2017.110709>

Український інститут експертизи сортів рослин, ул. Генерала Родимцева, 15, г. Київ, 03041, Україна, \*e-mail: prysiazhniuk\_l@ukr.net

**Цель.** Исследовать молекулярно-генетический полиморфизм новых сортов сои с помощью SSR-маркеров в отношении возможности применить его для экспертизы сортов на отличие, однородность и стабильность. **Методы.** Молекулярно-генетический анализ нуклеиновых кислот, кластерный анализ. **Результаты.** Приведены результаты исследований молекулярно-генетического полиморфизма 25 сортов сои по микросателлитным маркерам с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). Анализ продуктов амплификации показал, что по всем исследуемым SSR-маркерам внутрисортной полиморфизм наблюдался у сорта 'Алинда', по локусам Satt 228 и Satt 726 – у сорта 'Арника', по локусам Satt 063 и Satt 726 – у сорта 'Фурио', который учитывался в последующих исследованиях некоторых генотипов. При оценке полиморфизма исследуемых сортов определено, что частоты идентифицированных аллелей составляли от 0,02 до 0,1 в зависимости от микросателлитного локуса. С помощью кластерного анализа определены генетические дистанции между сортами. Расстояние между большинством сортов, в частности в 59 случаях,

составляло 3,61, 3,16 и 2,83, эти значения генетических дистанций были самыми распространенными в исследуемой выборке сортов. **Выводы.** Анализ молекулярно-генетического полиморфизма свидетельствует, что из 25 исследуемых сортов наиболее полиморфными оказались 10, что необходимо учитывать при их дальнейшей идентификации. Определено, что идентифицированные аллели равномерно представлены в выборке исследуемых сортов сои, о чем свидетельствует высокий индекс полиморфности локуса (0,83–0,94). В результате оценки генетических дистанций между сортами было установлено, что наиболее похожими по локусам оказались сорта, генетические дистанции между которыми составляли 2,00, различными – 3,87. Таким образом, маркерная система, которая состоит из четырех микросателлитных локусов Satt 063, Satt 114, Satt 228 и Satt 726, является эффективной для определения разницы между исследуемыми сортами сои.

**Ключевые слова:** молекулярно-генетический полиморфизм, маркерная система, генетические дистанции, микросателлитные локусы.

UDC 602.6:633.34

**Prysiashniuk, L. M.\*, Melnyk, S. I., Shytikova, Yu. V., Sihalova, I. O., & Ivanytska, A. P.** (2017). Application of SSR markers to differentiate new varieties of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Plant Varieties Studying and Protection*, 13(3), 269–279. <http://dx.doi.org/10.21498/2518-1017.13.3.2017.110709>

Ukrainian Institute for Plant Variety Examination, 15 Henera Rodymytseva Str., Kyiv, 03041, Ukraine, \*e-mail: prysiazhniuk\_l@ukr.net

**Purpose.** To study the molecular genetic polymorphism in new soybean varieties using SSR-markers as for the possibility to apply it for examination of varieties for difference, uniformity and stability. **Methods.** Molecular genetic analysis of nucleic acids, cluster analysis. **Results.** The results of study of molecular genetic polymorphism in 25 varieties of soybean through microsatellite markers using polymerase chain reaction were presented. Analysis of the amplification products has showed that for all the studied SSR-markers intra-species polymorphism was observed in the 'Alinda' variety, for the loci Satt 228 and Satt 726 – in the 'Arnica' variety, for the loci Satt 063 and Satt 726 – in the 'Furio' variety, which was taken into account in further studies of some genotypes. When assessing polymorphism in the studied varieties, it was determined that the frequencies of the identified alleles were ranging from 0,02 to 0,1 that depended on the microsatellite locus. Using cluster analysis, genetic distances were determined between varieties. The distance between many varieties, par-

ticularly in 59 cases, was 3.61, 3.16 and 2.83, these values of genetic distances prevailed in the studied sample of varieties. **Conclusions.** Analysis of molecular genetic polymorphism showed that 10 varieties were the most polymorphic among 25 studied ones, that should be taken into account in their further identification. It was determined that the identified alleles were evenly represented in the sample of studied soybean varieties, as evidenced by a high polymorphic index of the locus (0.83–0.94). According to the evaluation of genetic distances between varieties, it was found that the varieties were the most similar by loci when the genetic distances between them were 2.00, and the varieties were the most different when the distances were 3.87. Thus, the marker system, which consists of four microsatellite loci such as Satt 063, Satt 114, Satt 228 and Satt 726, is effective for defining the difference between studied soybean varieties.

**Keywords:** molecular genetic polymorphism, marker system, genetic distances, microsatellite loci.

Надійшла / Received 26.06.2017  
Погоджено до друку / Accepted 17.08.2017