

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
МАСЛИЧНЫХ КУЛЬТУР ИМЕНИ В.С. ПУСТОВОЙТА»
(ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК)

На правах рукописи

Савиченко Виолетта Георгиевна

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ
ИДЕНТИФИКАЦИИ СОРТОВ СОИ (*GLYCINE MAX* (L.) MERR.) НА ОСНОВЕ
МУЛЬТИПЛЕКСНОГО МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА

Специальность: 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Рамазанова Светлана Алексеевна,
кандидат биологических наук

Краснодар – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1 Соя как сельскохозяйственная культура стратегического значения.....	10
1.2 Традиционная идентификация сортов: принципы и ограничения	13
1.3 Сравнительная характеристика ДНК-маркеров. Обоснование выбора типа маркеров для исследования	17
1.4 Особенности SSR-маркеров, обеспечивающие их пригодность для идентификации.....	21
1.5 Методические аспекты микросателлитного анализа	25
1.6 Использование SSR-маркеров для молекулярно-генетической идентификации и изучения генетического разнообразия	33
1.7 Современное состояние и проблемы внедрения ДНК-паспортизации в РФ.	38
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	43
2.1 Материалы исследования.....	43
2.2 Методы исследования	44
2.2.1 Выделение ДНК, измерение концентрации и оценка качества полученных растворов	44
2.2.2 Схема разработки мультиплексных систем SSR-маркеров	46
2.2.3 Проведение ПЦР.....	48
2.2.4 Разделение ПЦР-продуктов и их детекция.....	50
2.2.5 Секвенирование фрагментов ДНК SSR-маркеров.....	52
2.2.6 Статистическая обработка и биоинформатический анализ данных	53
ГЛАВА 3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ МЕТОДИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ SSR-АНАЛИЗА ГЕНОТИПОВ СОИ.....	57
3.1 Сравнительная оценка эффективности выделения ДНК из разных частей растений сои	57

3.2 Сравнительная оценка способов разделения и детекции фрагментов ДНК SSR-маркеров	64
ГЛАВА 4 ПОДБОР ИНФОРМАТИВНЫХ SSR-МАРКЕРОВ ДЛЯ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОТИПОВ СОИ	69
4.1 Поиск SSR-локусов сои и <i>in silico</i> проверка специфичности праймеров	69
4.2 Оптимизация температуры отжига праймеров.....	70
4.3 Оценка информативности и специфичности SSR-маркеров.....	73
ГЛАВА 5 РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНЫХ СИСТЕМ SSR-МАРКЕРОВ ДЛЯ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОТИПОВ СОИ.....	78
5.1 Разработка праймеров для формирования мультиплексных систем.....	78
5.2 Формирование мультиплексных систем SSR-маркеров и оптимизация условий их применения.....	82
5.3 Анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК	91
5.4 Формирование панелей аллелей SSR-маркеров	94
ГЛАВА 6 МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОТИПОВ СОИ	98
6.1 Формирование ДНК-профилей сортов сои с помощью разработанных мультиплексных систем SSR-маркеров	98
6.2 Анализ генетической структуры и дифференциации сортов сои.....	103
6.3 Идентификация сортов сои по ДНК-профилям с помощью алгоритма классификации Random Forest.....	112
6.4 Идентификация гибридов F ₁ сои с помощью разработанных мультиплексных систем SSR-маркеров	119
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	125
ПРЕДЛОЖЕНИЯ ДЛЯ СЕЛЕКЦИОННОЙ ПРАКТИКИ	127
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	128
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	130
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	158
Приложение А. Характеристика материала, используемого в исследовании...	159
Приложение Б. Характеристика микросателлитных маркеров	162

Приложение В. Нуклеотидные последовательности SSR-локусов	166
Приложение Г. ДНК-профили сортов сои	174
Приложение Д. Копии патента и свидетельств	177

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы. Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) является одной из важнейших сельскохозяйственных культур. Расширение ее сортимента определяет необходимость внедрения надежного инструмента подтверждения сортовой принадлежности, контроля генетической однородности семенного материала, выявления фальсификации на рынке семян, а также защиты прав селекционеров. В настоящее время в качестве такого инструмента рассматривается молекулярно-генетическая (ДНК) паспортизация и идентификация.

Актуальность ДНК-паспортизации и идентификации сортов возрастает в связи с совершенствованием нормативного регулирования семеноводства («О семеноводстве» № 454-ФЗ). Однако утвержденная методика, регламентирующая проведение ДНК-паспортизации сортов сои, на сегодняшний день отсутствует.

Целесообразность использования микросателлитных (SSR) маркеров для идентификации сортов и гибридов сельскохозяйственных культур, в том числе и сои, была показана в работах отечественных и зарубежных исследователей. Данный тип ДНК-маркеров сочетает высокий уровень полиморфизма, кодоминантный тип наследования и относительную простоту проведения анализа. При этом объединение нескольких SSR-маркеров в мультиплексные системы, обеспечивающие одновременную амплификацию их фрагментов, в сочетании с высокоразрешающими методами разделения и детекции позволяет повысить пропускную способность, точность и воспроизводимость генотипирования, что имеет особое значение при проведении массовых анализов.

Вместе с тем остаются нерешенными вопросы формирования оптимального набора SSR-маркеров, обладающего достаточной дискриминационной способностью, и стандартизации условий получения результатов генотипирования, обеспечивающих информативность и воспроизводимость ДНК-профилей. Недостаточно изучен внутрисортовой полиморфизм сои и его влияние на межсортовую дифференциацию. Кроме того, идентификация сортов предполагает

сравнение их ДНК-профилей, поэтому при увеличении объема анализируемых данных возникает необходимость автоматизации этой процедуры. Перспективным для этих целей является применение методов машинного обучения. Решение указанных вопросов требует комплексного подхода к молекулярно-генетической идентификации сортов данной культуры.

Цель исследования – изучение внутри- и межсортового SSR-полиморфизма сои для молекулярно-генетической идентификации сортов с использованием машинного обучения.

Задачи исследования:

1. Разработать мультиплексные системы SSR-маркеров, оптимизировать и стандартизировать условия их применения для получения воспроизводимых результатов генотипирования сои.

2. Изучить внутрисортовую генетическую структуру сортов сои на основе ДНК-профилей, сформированных с помощью мультиплексных систем SSR-маркеров.

3. Оценить межсортовую дифференциацию сои с учетом внутрисортового генетического SSR-полиморфизма.

4. Изучить возможность применения машинного обучения для сопоставления ДНК-профилей сортов сои и частичной автоматизации процесса их идентификации.

5. Оценить эффективность использования мультиплексных систем SSR-маркеров для контроля прохождения гибридизации сои.

Научная новизна исследования. Впервые при изучении внутрисортовой генетической структуры исследованного набора сортов сои установлено, что сорта представлены различным числом биотипов с неодинаковой частотой встречаемости, выявлены специфичные и общие биотипы для разных сортов сои.

Впервые установлено, что межсортовая дифференциация сои определяется биотипным составом выборок индивидуальных растений, при этом наличие общих биотипов ограничивает идентификацию сорта по единичному растению, а специфичные биотипы имеют дифференцирующее значение.

Впервые показана возможность применения алгоритма машинного обучения Random Forest для частичной автоматизации сопоставления ДНК-профилей при молекулярно-генетической идентификации сортов сои и установлено, что результат идентификации зависит от представленности биотипов в обучающей выборке.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты исследования вносят вклад в понимание внутрисортовой генетической структуры сои и ее влияния на дифференциацию сортов. Полученные данные расширяют представления о сорте сои как объекте молекулярно-генетической идентификации и формируют теоретическую основу его характеристики по совокупности ДНК-профилей индивидуальных растений.

Разработанные мультиплексные системы в оптимизированных условиях позволяют проводить воспроизводимый анализ 11 SSR-маркеров в каждой, сокращая продолжительность исследования по сравнению с моноплексным. Получаемые ДНК-профили могут использоваться для идентификации сортов и гибридов сои, выявления и отбора биотипов, а в сочетании с моделью машинного обучения для частично автоматизированного определения сортовой принадлежности семенного материала. Результаты исследования также могут применяться при формировании генетических паспортов новых сортов сои и в качестве дополнительного инструмента для оценки их отличимости, однородности и стабильности.

Методология и методы исследования. Теоретическая часть исследования основана на систематическом анализе отечественной и зарубежной литературы. Экспериментальная часть основана на применении методов молекулярно-генетического, биоинформатического и статистического анализа, подробно изложенных в главе «Материалы и методы исследования» диссертации.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработанные мультиплексные системы SSR-маркеров обеспечивают получение воспроизводимых ДНК-профилей растений сои.

2. Сорт сои представляет собой совокупность различающихся SSR-профилями биотипов.

3. Межсортовая дифференциация сои определяется составом и частотой встречаемости биотипов.

4. Алгоритм Random Forest обеспечивает частичную автоматизацию молекулярно-генетической идентификации сортов сои.

Степень достоверности и апробации результатов исследования. Достоверность результатов подтверждается достаточным объемом экспериментальных данных, полученных в ходе лабораторных исследований при использовании современных подходов молекулярно-генетического анализа. Обработка результатов проводилась с использованием программных средств (MS Excel и языка программирования R). Основные результаты диссертационной работы представлены на 9 конференциях всероссийского и международного уровней: «Актуальные вопросы биологии, селекции, технологии возделывания и переработки сельскохозяйственных культур» (Краснодар, 2021); «Научное обеспечение устойчивого развития агропромышленного комплекса в условиях аридизации климата», посвященной 35-летию ФГБНУ РосНИИСК «Россорго» (Саратов, 2021); «Актуальные вопросы биологии, селекции, технологии и переработки сельскохозяйственных культур, экологии и экономики в сельском хозяйстве» (Краснодар, 2022; 2023; 2025); «Генетические ресурсы растений для генетических технологий: к 100-летию Пушкинских лабораторий ВИР» (Санкт-Петербург, 2022); «Совершенствование способов управления технологическими процессами в садоводстве и виноградарстве» (Краснодар, 2023); «Рядом с Н.И. Вавиловым – научные школы России по обеспечению продовольственной и экологической безопасности страны» (Москва, 2024); «Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки» (Симферополь, 2026).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 работ, в том числе 5 – статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, патент, две базы данных, методические рекомендации.

Личный вклад автора. Автором самостоятельно осуществлены обзор литературных источников, оптимизация методических условий микросателлитного анализа и разработка мультиплексных систем SSR-маркеров. Массовые анализы по генотипированию выполнены совместно с сотрудниками лаборатории по разработанной автором технологии. Обработка и интерпретация результатов проведены при непосредственном участии автора.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 179 страницах, состоит из введения, основной части, содержащей 24 рисунка, 12 таблиц, заключения, предложений для селекционной практики, списка сокращений, списка литературы, включающей 211 наименований, в том числе 78 – на иностранном языке, и 5 приложений.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Соя как сельскохозяйственная культура стратегического значения

Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) является ценной, стратегически значимой культурой мирового масштаба. Возделывание сои ведется одновременно в двух основных направлениях – белковом и масличном. Благодаря биохимическому составу семян, обуславливающему ее многоцелевое использование в различных отраслях промышленности, культура получила широкое распространение в мировом производстве (Рудаков, Рудакова, 2020; Синеговский, 2023; Li et al., 2023; Yao et al., 2023).

В мировом потреблении белковой пищи соя занимает первое место, по данным SoyStats на ее долю приходится 69 % (<http://soystats.com>). По содержанию белка она превосходит другие бобовые и, тем более, зерновые культуры. Аминокислотный состав соевого белка наиболее приближен к белкам животного происхождения и включает в себя 8 из 9 незаменимых для человека аминокислот: лизин, треонин, валин, изолейцин, лейцин, фенилаланин, триптофан и метионин. Их высокое содержание определяют биологическую ценность соевого белка. Продукты переработки сои, богатые белком, используют в производстве различных видов пищевой продукции, в том числе как альтернативу продуктам животного происхождения – молочных и мясных аналогов (Петибская, 2012; Рудаков, Рудакова, 2020).

Еще одним продуктом переработки сои является масло. Несмотря на то, что по содержанию масла (около 20 %) соя не превышает другие масличные культуры, она является лидером в мировом производстве масличных культур – ее доля составляет 59 %. А в мировом потреблении растительных масел культура занимает второе место после пальмового – на их долю приходится 28 и 35 % соответственно (SoyStats, <http://soystats.com>).

Соевое масло сбалансировано по соотношению жирных кислот. В его составе над насыщенными жирными кислотами преобладают ненасыщенные. По данным В. С. Петибской (2012) общее содержание пальмитиновой и стеариновой кислот

около 15 %, тогда как олеиновой, линолевой и линоленовой – 87 %. Соевое масло используют непосредственно в пищу или в качестве сырья для производства масложировой продукции: соусы, маргарины и т.д., в различных отраслях технической промышленности: при производстве лаков и красок, биопластиков, биотоплива, а также косметических и медицинских средств. Жмых и шрот, остающиеся после переработки сои, являются ценным сырьем в кормопроизводстве (Векленко, Дадашев, 2024).

Помимо белка и масла соя содержит такие вещества как токоферолы, фосфолипиды, витамины группы В, макро- и микроэлементы. Все это определяет высокую пищевую ценность и делает сою ценным компонентом в питании человека и животных. Содержащиеся в семенах сои ингибиторы протеиназ, в частности ингибиторы трипсина, оказывающие угнетающее воздействие на пищеварительную систему при их избытке в организме, успешно инактивируются при правильной обработке сырья. Кроме того, одним из способов уменьшения содержания этих веществ является селекция (Петибская, 2012; Рудаков, Рудакова, 2020; Вологирова, 2024).

Возможность многоцелевого использования сои привела к росту ее производства и расширению площадей, занимаемых под культурой. Это стало возможным благодаря селекции, направленной на создание высокопродуктивных сортов, устойчивых к различным биотическим (болезни, вредители) и абиотическим (почвенная и воздушная засуха, повышенная или пониженная температура воздуха, длина дня) факторам, что не только обеспечило получение стабильных урожаев сои, но и способствовало продвижению культуры в новые нетрадиционные для нее регионы возделывания (Зеленцов, 2020).

За период с 2014 по 2024 гг. мировые площади посевов сои увеличились на 25,6 млн га, а ее производство выросло на 91,4 млн т. В 2025 году под культурой было занято 143,7 млн га посевных площадей. При этом мировыми лидерами по производству сои являются Бразилия, США, Аргентина (они же основные экспортеры), а также Китай и Индия (FAOSTAT, <https://www.fao.org/faostat/ru>;

Foreign Agricultural ... , <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>; SoyStats, <http://soystats.com>).

Увеличение посевных площадей наблюдается и в Российской Федерации – за тот же период (2014–2024 гг.) площади, занимаемые соей, выросли на 2,2 млн га (FAOSTAT, <https://www.fao.org/faostat/ru>). По данным Росстата в 2025 году посевные площади сои в РФ составили около 4,8 млн га, основные из них сосредоточены в Амурской (917,3 тыс. га) и Курской (419,5 тыс. га) областях (Федеральная служба ... , https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/29_cx-2025_predv_2v.xlsx). При этом доля высева сортов отечественных оригинаторов в этих регионах составила 61 и 41 % соответственно.

В целом по состоянию на 2025 г. доля высева сортов сои отечественной селекции варьировала от 23 % в Северо-Западном ФО до 86 % в Сибирском ФО (Селекция и семеноводство ... , https://ruseed.ru/upload/medialibrary/bc6/2x6n33adajx7mghjrdbbubp2yb29duv3/RUSEED_Поле_РФ_итоги_2025_.pdf). В рамках реализации Доктрины продовольственной безопасности РФ с целью сокращения зависимости от иностранных оригинаторов уровень самообеспеченности страны семенами сои отечественной селекции к 2030 году должен составлять 75 % (Распоряжение Правительства РФ № 4133-р), в 2025 году этот показатель достиг 65 % (Селекция и семеноводство ... , 2025).

В настоящее время в Государственном реестре селекционных достижений зарегистрировано 377 сортов сои (<https://gossortrf.ru/registry/gosudarstvennyy-reestr-selektionnykh-dostizheniy-dopushchennykh-k-ispolzovaniyu-tom-1-sorta-rasteni>). В научно-исследовательских учреждениях и селекционных центрах РФ активно ведется работа по созданию новых конкурентноспособных сортов сои и семеноводству оригинальных и элитных семян для обеспечения сельхозпроизводителей высококачественным семенным материалом.

В связи с постоянно расширяемым сортиментом культуры требуются надежные и воспроизводимые методы сортовой идентификации. Это необходимо для сохранения и распространения сортов, контроля за ввозом семян на территорию РФ, их вывозом, исключения фальсификата на рынке, соблюдения

правовой защиты оригинаторов (Синеговский, 2022; Смолянинова и др., 2024; Лысенкова и др., 2026).

С принятием Федерального закона «О семеноводстве» вводится понятие генетического паспорта. «Генетический паспорт – документ, созданный на основе молекулярно-генетического анализа семян сорта или гибрида сельскохозяйственного растения» (Федеральный закон № 454-ФЗ). Согласно последним изменениям (от 28.12.2025) оформление генетического паспорта будет осуществляться с 1 сентября 2027 г. на каждый представленный к испытаниям сорт или гибрид сои и других культур из утвержденного Правительством перечня (Распоряжение Правительства ... , 2022). Однако на сегодняшний день методики, по которым будут проводить паспортизацию и идентификацию, не утверждены.

1.2 Традиционная идентификация сортов: принципы и ограничения

Под идентификацией подразумевается определение сортовой принадлежности анализируемого образца к известному сорту или установление отличимости (уникальности) образца от других известных сортов.

Сортовую идентификацию сельскохозяйственных культур, в том числе и сои, традиционно проводят по визуальной оценке морфологических признаков. Так, растения сои разных сортов различают по следующим признакам: окраска гипокотилия, опушения стебля, венчика, размер и форма бокового листочка (сложного листа), окраска бобов и частей семени, тип роста, высота растения и т.д. (Методика проведения ... , <https://gossortrf.ru/publication/metodiki-ispytaniy-na-oos.php>).

Кроме перечисленных морфологических признаков сорта сои отличаются наступлением и продолжительностью фенологических фаз и, соответственно, сроками созревания, устойчивостью к болезням, вредителям, различным абиотическим факторам, биохимическим составом семян и т.д. В зависимости от цели, будь то изучение и оценка сортов в селекционном процессе, регистрация нового сорта или определение сортовой принадлежности неизвестного образца

семян или растений, идентификацию проводят по конкретным признакам (характеристикам) или комплексно.

Морфологические признаки растений сои легли в основу оценки сортов на отличимость, однородность и стабильность (ООС), проводимую Госсорткомиссией РФ при испытаниях нового сорта с целью установления его уникальности по методике, разработанной в соответствии со стандартами и рекомендациями UPOV (<https://www.upov.int/edocs/tgdocs/en/tg080.pdf>). Испытания также включают наблюдение за фенологическими фазами развития растений. Методика испытаний сои на ООС включает 20 признаков. Эти испытания проводятся в течении двух лет (двух вегетационных периодов) в полевых условиях. Отличимость сорта устанавливают в случае его четкого отличия от других зарегистрированных сортов хотя бы по одному из анализируемых признаков, однородность – по частоте типичных растений (допускается до 4 нетипичных растений при их общем количестве 300), стабильность – признаки воспроизводимы, т.е. остаются неизменными после многократного размножения.

Несмотря на широкое применение данного подхода к сортовой идентификации сельскохозяйственных растений, имеется ряд ограничений. Для установления уникальности сорта анализируемых признаков может быть недостаточно. Два сорта, имеющих разное происхождение, могут иметь сходную морфологию. Еще более трудноотличимы близкородственные сорта (Дубина и др., 2016; Антонова и др., 2020).

Кроме того, визуальная оценка признаков, имеющих слабую или промежуточную степень выраженности, например, интенсивность окраски гипокотилия или пузырчатость листа, зависит от субъективного восприятия конкретного специалиста, проводящего испытания. При оценке таких признаков существует вероятность возникновения ошибок, которые могут привести к неправильной идентификации сорта (Чесноков и др., 2020; Li et al., 2026).

Точность идентификации также зависит от изменчивости признаков, а фенотипические признаки, как известно, подвержены изменению под воздействием факторов окружающей среды (погодных условий, агрохимического

состава почвы и т.д.) (Гучетль и др., 2015; Чесноков, 2018; Гориславец и др., 2019; Чесноков и др., 2020; Yuan et al., 2022).

Идентификация сортов, отличающихся устойчивостью к различным биотическим и абиотическим факторам, требует проведения специальных испытаний на провокационных фонах в контролируемых условиях. Эти признаки также зависят от условий окружающей среды, и в случае отсутствия стрессоров не проявляются, а значит не могут быть определены.

Еще одним ограничением традиционных подходов является сложность, а в некоторых случаях и невозможность, идентификации семенного материала, что снижает качество контроля в области семеноводства. Определить принадлежность неизвестной партии семян к одному из зарегистрированных сортов или подтвердить принадлежность образца к конкретному сорту при возникновении спорных вопросов, подозрении на фальсификат невозможно в случае отсутствия каких-либо явно отличительных признаков непосредственно у семян. И поскольку разные морфологические признаки растений проявляются с наступлением определенных стадий развития, потребуется проведение полевых испытаний, т.е. выращивание растений из этих семян для их последующей оценки (Методика проведения ... , 2004).

Идентификация семенного материала может быть проведена с помощью относительно быстрого способа (не требующего полевых испытаний), основанного на применении биохимических маркеров, к которым относят запасные белки, ферменты и т.д. Полиморфизм белков (и других молекул) определяется посредством электрофоретического разделения в крахмальных или полиакриламидных гелях. Этот способ также можно отнести к методам традиционной идентификации, биохимические маркеры используют для паспортизации и идентификации зерновых, масличных культур (Методика проведения ... , 2004; Гучетль и др., 2015; Ториков и др., 2019; Лаврентьева и др., 2023; Мазкират и др., 2023; Чесноков, 2019). Данный способ также используют в испытаниях ООС в качестве дополнительного и необязательного (Методика

проведения ... , <https://gossortrf.ru/publication/metodiki-ispytaniy-na-oos.php>; UPOV Guidelines ... , <https://www.upov.int/edocs/tgdocs/en/tg080.pdf>).

Однако биохимические маркеры также имеют ограничения, которые связаны с воздействием факторов окружающей среды при формировании семян, сложностью проведения экстракции белков и ферментов и их очистки, требующих строгого соблюдения протоколов и использования качественных реагентов. Кроме того, существует сложность в получении специфических электрофоретических спектров и их правильной интерпретации, что сказывается на воспроизводимости результатов анализа и точности идентификации. Но главным недостатком биохимических маркеров остается их невысокая информативность, в особенности у сои, и соответственно низкая способность дифференцировать сорта (Tabe et al., 2002; Chesnokov, Shutov, 2004; Чесноков, 2018; Чесноков и др., 2019; Лаврентьева и др., 2023).

Таким образом, идентификация, основанная на оценке морфологических и биохимических признаков, требует значительных временных и трудовых затрат, при этом воспроизводимость результатов оценки и точность самой идентификации зависит от условий проведения испытаний. Указанные ограничения традиционной идентификации не позволяют надежно отличать сорта. Более эффективным инструментом для идентификации сортов является применение методов молекулярно-генетического анализа. К очевидным преимуществам молекулярно-генетических маркеров, в сравнении с традиционными методами, можно отнести высокую точность, воспроизводимость, независимость от условий окружающей среды, возможность использовать для оценки любую часть растения на любой стадии его развития, высокую скорость анализа (Янковская и др., 2019; Euler et al., 2022; Li et al., 2026). Особенности применения молекулярно-генетических маркеров будут подробнее рассмотрены в следующем разделе.

1.3 Сравнительная характеристика ДНК-маркеров. Обоснование выбора типа маркеров для исследования

Молекулярно-генетические маркеры (ДНК-маркеры) представляют собой участки последовательности ДНК, используемые для выявления полиморфизма между различными генотипами. ДНК-маркеры пришли на смену морфологическим и биохимическим маркерам как наиболее информативные и специфические (Хлесткина, 2013; Чесноков, 2018; Канукова и др., 2019; Глазко и др., 2023).

К настоящему времени опубликовано достаточно много работ о ДНК-маркерах и их применении в молекулярно-генетических исследованиях растительных и других организмов (Календарь, Глазко, 2002; Омашева и др., 2013; Хлесткина, 2013; Канукова и др., 2019; Чесноков и др., 2019; Iqbal et al., 2024). Понятие ДНК-маркеры объединяет довольно обширную группу, насчитывающую несколько десятков различных типов. В основном, молекулярно-генетические маркеры классифицируются учеными в зависимости от способов их анализа на маркеры, определяемые методами блот-гибридизации; полимеразной цепной реакции (ПЦР); ДНК-чипирования. Классификация и сравнительная характеристика наиболее распространенных по применяемости ДНК-маркеров, позаимствованная из работы А. С. Сухаревой и Б. Р. Кулуева (2018), представлена на рисунке 1. Данная классификация также отражает эволюцию ДНК-маркеров, развивающихся вместе с методами молекулярной генетики.

Классификация	Монолокусные маркеры	Мультилокусные маркеры
Методы, основанные на блот-гибридизации	RFLP – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов	Минисателлиты
Методы, основанные на ПЦР	SSR – простые повторяющиеся последовательности (микросателлиты) STS – нуклеотидные последовательности, характеризующие локус SCAR – нуклеотидная последовательность, характеризующая амплифицированную область SSCP – конформационный полиморфизм одноцепочечной ДНК CAPS – расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности	RAPD – случайно амплифицированная полиморфная ДНК ISSR – межмикросателлитный полиморфизм IRAP – полиморфизм амплифицированных последовательностей между ретротранспозонами AFLP – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов SSAP – полиморфизм специфично амплифицированных последовательностей
Методы, основанные на применении ДНК-чипов	SNP – однонуклеотидный полиморфизм	DarT – ДНК-чиповая технология для изучения генетического разнообразия
Тип наследования	Кодоминантный тип	Доминантный тип
Область применения у растений	- картирование генов, QTL (локусов количественных признаков), хромосом и геномов - маркирование генов, хромосом и геномов - сравнительная генетика и геномика - отбор с помощью ДНК-маркеров в селекции - геномная селекция (только SNP-маркеры) - молекулярная паспортизация сортов/пород - диагностика заболеваний - экологический мониторинг - исследование генетического разнообразия - филогенетические исследования - популяционная генетика	- составление молекулярных карт хромосом и геномов (только AFLP-и DarT-маркеры) - картирование генов и QTL (только AFLP-и DarT-маркеры) - геномная селекция (DarT-маркеры) - молекулярная паспортизация сортов/пород - экологический мониторинг - исследование генетического разнообразия - филогенетические исследования - популяционная генетика

Рисунок 1 – Классификация и сравнительная характеристика ДНК-маркеров (Сухарева, Кулуев, 2018)

Выбор типа маркера должен исходить от конкретных задач исследования, в зависимости от которых к ДНК-маркерам выдвигаются различные требования. В целом, авторы сходятся в представлении «идеального» ДНК-маркера. Основываясь на обзоре научных публикаций (Kumar et al., 2009; Омашева и др., 2013; Клименко и др., 2019; Alves et al., 2024), для ДНК-маркеров, применяемых с целью идентификации, паспортизации, оценки генетического разнообразия, можно выделить следующие характеристики:

- 1) широкое распространение в геноме;
- 2) высокий уровень полиморфизма (информативности);
- 3) кодоминантный тип наследования;
- 4) простота проведения анализа и интерпретации результатов;
- 5) высокая воспроизводимость результатов анализа;
- 6) высокая пропускная способность анализа;
- 7) возможность автоматизации процессов анализа.

Для общего понимания вопроса о целесообразности использования различных типов ДНК-маркеров для молекулярно-генетической паспортизации и идентификации сортов кратко рассмотрим их основные характеристики, опираясь на представленную выше классификацию (рисунок 1).

ДНК-маркеры, основанные на методах блот-гибридизации, в частности RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) или ПДРФ в русскоязычной литературе, появились первыми в молекулярно-генетических исследованиях и были применены для построения первых генетических карт (основанных именно на полиморфизме ДНК). Особенности применения данного типа ДНК-маркеров (относительно высокая стоимость, связанная с использованием радиоактивно меченных зондов, продолжительность – из-за проведения блот-гибридизации, невозможность автоматизации, необходимость для анализа большого количества высококачественной ДНК) ограничили их использование на современном этапе исследований (Омашева и др., 2013; Хлесткина, 2013; Сухарева, Кулуев, 2018).

ДНК-маркеры, анализ которых основан на полимеразной цепной реакции, представляют самую обширную группу (что видно из представленной классификации). Распространенность данного класса ДНК-маркеров связана с их относительно невысокой стоимостью, скоростью анализа, простотой и доступностью применения (Гориславец и др., 2019; Глазко и др., 2023). Генотипирование с их помощью включает, как правило, три основных этапа: выделение ДНК, проведение ПЦР и детекция ПЦР-продуктов. Такой анализ доступен для проведения в большинстве научных и коммерческих лабораторий, имеющих стандартный набор оборудования (центрифуги, амплификаторы, камеры

для электрофореза и другие сопутствующие приборы). Кроме того, некоторые этапы анализа ДНК-маркеров могут быть частично автоматизированы. Это с одной стороны приведет к некоторому повышению стоимости генотипирования, но с другой – к снижению трудовых затрат, что особенно важно при проведении массовых анализов.

Из представленных в данной группе ДНК-маркеров (ПЦР-маркеров), наибольшее практическое применение именно для идентификации и изучения генетического разнообразия сельскохозяйственных культур получили: SSR (Simple Sequence Repeat) (Янковская и др., 2019; Рамазанова, Коломыцева, 2020; Jeevan et al. 2022; Должикова и др., 2023; Клименко и др., 2023; Налбандян и др., 2024), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Пат. № 2671678 Рос. Федерация; Кирьянова и др., 2020; Потехин, 2022), ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) (Vasilyeva et al., 2020; Потехин, 2022; Печенкина и др., 2023), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Баташова и др., 2008; Снигирь и др., 2013; Шлявас и др., 2019). При этом в большинстве современных исследований предпочтение отдается SSR-маркерам. Это связано с их высоким уровнем полиморфизма, специфичностью, хорошей воспроизводимостью и относительной простотой проведения и технологической доступностью анализа. Также стоит отметить, что из перечисленных ДНК-маркеров только SSR имеют кодоминантный тип наследования, что обеспечивает возможность дифференциации гомо- и гетерозиготных состояний локусов. Остальные же маркеры (RAPD, ISSR, AFLP) относятся преимущественно к доминантным маркерным системам, т.е. выявляют только наличие или отсутствие фрагмента, что снижает их информативность (Чесноков, Артемьева, 2015; Гориславец и др., 2019; Kumar et al., 2020).

ДНК-маркеры, основанные на технологиях микрочипирования (SNP-array – Single Nucleotide Polymorphism, DArT – Diversity Array Technology), представляют иной уровень геномного анализа. Технологии SNP позволяют выявлять однонуклеотидные замены по всему геному с высокой точностью и воспроизводимостью, с их помощью одновременно могут анализироваться тысячи локусов (Iqbal et al., 2024; Li et al., 2026). Это обеспечивает высокое разрешение

при изучении генетической структуры популяций, ассоциативного картирования и реализации программ геномной селекции сельскохозяйственных культур: кукурузы (Сатарова и др., 2014), хлопчатника (Cai et al., 2017), табака (Lu et al., 2013), пшеницы (Charmet, Storlie, 2012).

В фундаментальных исследованиях SNP-маркеры нередко превосходят микросателлиты по масштабируемости. Однако применение технологий SNP в целях паспортизации и идентификации сортов не всегда является оптимальным. Отдельные SNP локусы, как правило, биаллельны, что снижает их индивидуальную дискриминационную способность по сравнению с многоаллельными SSR-маркерами. Для получения сопоставимых результатов требуется анализ значительно большего количества SNP, что увеличивает объем получаемых данных и повышает требования к их биоинформатической обработке (Yuan et al., 2022). Кроме того, широкое внедрение технологий SNP в лабораторную практику ограничено необходимостью использования специализированного дорогостоящего оборудования и реагентов, программного обеспечения и квалифицированных кадров (Сухарева, Кулуев, 2018).

Возвращаясь к вопросу об «идеальном» ДНК-маркере, наибольший интерес для сортовой паспортизации и идентификации представляют SSR-маркеры, поскольку потенциально обладают (при соблюдении определенных условий) всеми перечисленными характеристиками «идеального» маркера. Поэтому именно они были выбраны для диссертационного исследования. Более подробно данный тип маркеров в контексте применения для дифференциации генотипов будет описан в следующем разделе.

1.4 Особенности SSR-маркеров, обеспечивающие их пригодность для идентификации

SSR-маркеры, также называемые в литературе STR (Short Tandem Repeats), SSLP (Simple Sequence Length Polymorphisms) или микросателлитами, получили широкое практическое применение в исследованиях по молекулярно-генетической идентификации. В статье Т. В. Галинской и соавторов (2019) микросателлитам

дается следующее определение: «Микросателлит – участок ДНК, в котором последовательно повторяется фрагмент длиной от 2 до 9 нуклеотидов». При этом в некоторых других работах длину повторяющегося фрагмента (мотива) указывают до 6 (Tang et al., 2008; Thakur et al., 2021), 10 (Tautz, 1989; Vieira et al., 2016) и более нуклеотидов (Hisano et al., 2007).

Рассмотрим особенности SSR-маркеров с учетом, представленных в разделе 1.3, характеристик «идеального» маркера (уровень полиморфизма, распространение в геноме, тип наследования).

Полиморфизм. Высокий полиморфизм SSR-маркеров объясняется эволюционной нестабильностью микросателлитных локусов. Эта нестабильность обусловлена ошибками, возникающими из-за «проскальзывания» (от англ. replication slippage) ДНК-полимеразы при репликации ДНК (Ellegren, 2004; Орлов, 2019; Alves et al., 2024). В микросателлитных участках нуклеотидных последовательностей мутации возникают гораздо чаще, чем в других областях генома, затрагивая при этом целые мотивы (единица микросателлитного повтора), а не отдельные нуклеотиды, и тем самым увеличивают или уменьшают количество повторов (Tautz, 1989; Vieira et al., 2016; Галинская и др., 2019).

Отдельно стоит отметить, что микросателлиты могут находиться как в некодирующих областях генома, так и в экспрессирующих последовательностях (называемых EST-SSR – Expressed Sequence Tag). EST-SSR подвержены влиянию селекционного отбора, они более консервативны и с высокой вероятностью будут переноситься между видами (Zhang et al., 2013). Однако из-за этого полиморфизм EST-SSR снижен. SSR из некодирующих последовательностей более полиморфны, в них чаще происходят мутации.

Аллели микросателлитных маркеров отличаются количеством повторов, и, соответственно, размером амплифицируемых фрагментов ДНК (Галинская и др., 2019; Alves et al., 2024). Один и тот же SSR-маркер может давать большое разнообразие аллельных вариантов. «Различные организмы, экотипы, формы и виды имеют разное количество таких повторяющихся элементов ДНК в данном локусе» (Зими́на и др., 2014). Это является преимуществом для дифференциации

генотипов и идентификации сортов. И поскольку частота возникновения мутаций в микросателлитах с короткими мотивами выше (Ellegren, 2004), также будет повышен уровень полиморфизма таких маркеров.

Распространение в геноме. Микросателлиты широко распространены в геномах всех высших организмов, в том числе и растений. Их распределение варьируется в зависимости от вида, размера генома, а также типа (ди-, три-, тетрануклеотидные и т.д.) и количества повторов (Vieira et al., 2016). В исследовании (Mun et al., 2006), сравнивая геномы 5 различных видов, авторы пришли к выводу, что частота SSR в некодирующих областях выше, чем EST-SSR в 1,3–2,8 раз. При этом SSR с размером 12–19 п.н. встречаются во всех проанализированных геномах с приблизительно одинаковой частотой, а с размером 20 и более п.н. – до 2,5 раз чаще в геноме сои. Авторы связывают это с большим размером генома сои и повышенной встречаемостью в нем ди- и тринуклеотидных микросателлитов.

На различных картирующих популяциях сои на основе SSR-маркеров учеными были разработаны генетические карты сцепления (Cregan et al., 1999; Song et al., 2004; Hwang et al., 2009). Интегрированная генетическая карта, составленная Song и соавторами (2004) на 5 популяциях сои, содержала 1849 маркеров, 1015 из которых SSR. В своих исследованиях авторы также указывают на то, что SSR, полученные на геномных последовательностях (некодирующих) являются большим источником полиморфизма, чем EST-SSR.

В работе (Hwang et al., 2009) было картировано 1810 маркеров на 20 группах сцепления сои, распределенных в диапазоне от 70 до 114 SSR на группу. Для большей части маркеров на 23 сортах и линиях сои также был изучен полиморфизм – среднее количество выявленных аллелей на локус составило 2,8. Разработанные генетические карты представляют интерес для многих теоретических и прикладных задач в исследовании: генетической структуры, QTL (Quantitative Trait Loci), выявления генов, ассоциированных с селекционно-ценными признаками и т.д.

С появлением референсного генома сои *G. max*, созданного благодаря полногеномному секвенированию образцов сорта Williams 82, проведенного в 2010 г. (Schmutz et al.), значительно расширились возможности *in silico* поиска микросателлитных локусов по всему геному. В настоящее время для систематизации данных и удобства их использования разработаны специализированные ресурсы, например, для сои – SoyBase (<https://www.soybase.org/>), содержащие генетические и геномные данные. Это позволяет создавать панели SSR-маркеров с равномерным покрытием, учитывать их положение в кодирующих или некодирующих областях.

Тип наследования. Как было сказано выше, микросателлиты имеют кодоминантный тип наследования, что повышает дифференцирующую способность SSR-маркеров в определении гетерозиготных аллельных состояний. Это особенно актуально для осуществления контроля передачи генетической информации и идентификации гибридных растений (Сатина и др., 2010; Дубина и др., 2016а; Дубина и др., 2016б; Анискина и др., 2020; Налбандян и др., 2024).

Известно, что искусственная гибридизация сои трудоемкий процесс, сложность которого связана как с самой процедурой проведения (из-за очень малых размеров цветков закрытого типа), так и с довольно низкой завязываемостью бобов (Кочегура и др., 2016). «Одной из проблем межсортовой гибридизации сои является определение истинно гибридных растений и элиминация «ложных» гибридов в самом начале селекционного процесса» (Мазкират и др., 2023). Кодоминантность SSR-маркеров делает их эффективным инструментом для подтверждения гибридности растений сои (Пат. № 2398883 Рос. Федерация; Мазкират и др., 2023; Климушина и др., 2025а). При условии, что генотипы родительских форм отличаются друг от друга аллелями микросателлитного локуса, в «истинном» гибриде будут обнаружены оба аллельных варианта (по одному от каждого родителя). Обнаружение аллелей только материнской формы будет указывать на то, что такое растение произошло в результате самоопыления и соответственно не является гибридным. Поэтому в

первую очередь для возможности подтверждения гибридности растений сои необходимо выявить отличия между родительскими формами.

1.5 Методические аспекты микросателлитного анализа

На точность, воспроизводимость, а также пропускную способность и стоимость выполнения микросателлитного анализа влияют условия его проведения. Как и большинство ДНК-маркеров, определяемых с помощью ПЦР, анализ микросателлитов включает 3 основных последовательно идущих этапа: выделение ДНК, проведение ПЦР и детекцию результатов ПЦР.

Выделение ДНК. Растительные клетки содержат большое количество различных веществ, препятствующих эффективному экстрагированию ДНК (полисахариды, фенолы, белки, липиды и т.д.). Эти вещества осаждаются вместе с ДНК и в последующем при анализе могут ингибировать ПЦР (Рябушкина и др., 2018; Балановский и др., 2019; Беленикин и др., 2018; Галактионова и др., 2023). В настоящее время разработано множество методов и их модификаций для экстракции ДНК из растительных организмов. Выбор метода основывается на типе растительного материала (листья, семена, корни, проростки и т.д.) и цели, для которых предполагается использовать выделенную ДНК (рутинная ПЦР, создание геномных библиотек, секвенирование) (Tamari, Hinkley, 2016; Рябушкина и др., 2018; Марамохин и др., 2019).

Проанализировав исследования авторов, связанные с микросателлитным анализом, можно сказать о том, что большинство из них получают ДНК из листьев вегетирующих растений, предпочтительно молодых, или первых настоящих листьев с проростков растений (Абугалиева и др., 2013; Зимина и др., 2014; Супрун и др., 2017; Žulj Mihaljević et al., 2020). Это связано с наличием большого количества растительного материала, легкостью измельчения тканей, высоким содержанием клеток, что обеспечивает больший выход нуклеиновой кислоты. Кроме того, в молодых листьях в меньшем количестве содержатся белки, полисахариды и т.д. по сравнению со зрелыми листьями (Рябушкина и др., 2018; Галактионова и др., 2023).

Также довольно часто для выделения ДНК используют целые семена или их части, в сухом или предварительно обработанном виде (Определение сортовой ... , 2017; Рамазанова, Коломыцева, 2020; Тимкин, Пензин, 2023). Выделение ДНК непосредственно из семян более удобный и быстрый способ, поскольку не требует их проращивания и ожидания до стадий появления листьев. Однако семена содержат большое количество ингибирующих веществ, особенно семена масличных культур, таких как соя, подсолнечник, рыжик, рапс. Часто для удаления этих веществ требуются дополнительные процедуры очистки (Рябушкина и др., 2018; Гучетль и др., 2021; Логинова и др., 2024; Головатская и др., 2025).

Из многообразия существующих модификаций методов выделения ДНК наиболее распространены:

- метод на основе ЦТАБ – цетилтриметиламмония бромида и его различные модификации – используют для получения ДНК высокой концентрации и чистоты (Doyle, Doyle, 1990; Aboul-Maaty, Oraby, 2019). Процедура выделения довольно длительная и трудоемкая, что ограничивает применение метода при анализе большого количества образцов. Однако некоторые современные модификации способствуют увеличению производительности метода (Пат. № 2833968 Рос. Федерация). Выделение с помощью ЦТАБ включает применение токсичных реагентов, особенно при модификациях с хлороформом, меркаптоэтоналом и т.д. и требует особых мер по соблюдению безопасности (Галактионова и др., 2023; Логинова и др., 2024; Сейтаджиева и др., 2024);

- метод на основе SDS (додецилсульфат натрия) также как и методы на основе ЦТАБ трудоемок, включает использование хлороформа и других токсичных реагентов. Эффективность выделения ДНК ниже по сравнению с методом ЦТАБ. SDS может приводить к денатурации содержащихся в образце белков и затруднять выделение ДНК (Пат. № 2833968 Рос. Федерация; Попова и др., 2021);

- методы с сорбцией на силикатных мембранах, магнитных частицах – как правило, менее трудоемки. Существует множество готовых коммерческих наборов реагентов отечественных и зарубежных производителей, также возможна

автоматизация процедур выделения и очистки ДНК, что дает преимущество при проведении массовых анализов, например, при идентификации сортов (Логинова и др., 2024; Головатская и др., 2025). Однако данные методы могут быть менее эффективны при выделении из растительных тканей, содержащих ингибирующие вещества в большом количестве.

Идентификация с помощью микросателлитных маркеров, в отличие от других задач (например, секвенирование), предполагает проведение классической ПЦР, не требующей больших количеств ДНК. Для успешного прохождения ПЦР и получения достоверных воспроизводимых результатов микросателлитного анализа, особенно при проведении мультиплексных ПЦР, препараты ДНК не должны быть загрязнены ингибирующими веществами. Поскольку содержание таких веществ отличается между видами растений и типом растительной ткани, не существует универсального метода, часто требуется оптимизация протоколов для молекулярно-генетического анализа конкретной сельскохозяйственной культуры (Tamari, Hinkley, 2016; Рябушкина и др., 2018; Aboul-Maaty, Oraby, 2019; Галактионова и др., 2023).

Молекулярно-генетическая паспортизация и идентификация сортов предполагает анализ большого количества образцов, поэтому при выборе метода выделения ДНК необходимо учитывать не только качество получаемых растворов, но и трудоемкость процесса, а также время его проведения. Несмотря на относительно высокую стоимость оборудования (автоматические гомогенизаторы, станции для дозирования реагентов, выделения и очистки нуклеиновых кислот), возможность автоматизации хотя бы части процессов позволит увеличить пропускную способность анализа, и в конечном итоге затраты будут оправданы.

Полимеразная цепная реакция. ПЦР является основой микросателлитного анализа, от эффективности и специфичности которой во многом зависит точность и воспроизводимость результатов. Принцип ПЦР основан на многократной ферментативной репликации определенного участка ДНК в условиях *in vitro* с помощью термостабильной ДНК-полимеразы, праймеров (синтетических одноцепочечных последовательностей, комплементарных фланкирующим

областям ДНК), смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов (ДНТФ) и других компонентов, необходимых для успешного прохождения реакции (Borah, 2011; Кулуев и др, 2018; Гарафутдинов и др., 2019).

Для накопления только целевого продукта, то есть определенного участка ДНК (в данном случае микросателлитного повтора и фланкирующих его областей), необходимо использовать праймеры, которые строго специфично связываются с матрицей ДНК и не образуют димеров и других вторичных структур. В этой связи при подборе праймеров важное значение имеют: их положение на комплементарных последовательностях в геноме, длина (обычно около 18–25 п.н.), нуклеотидный состав (оптимальным считается GC 40–60 %) и его последовательность, температуры плавления и отжига (близкие по значению между парой праймеров, с максимальной разницей до 3–5 °C) (Borah, 2011; Галинская и др., 2019; Гарафутдинов и др., 2019). Поэтому необходим тщательный отбор праймеров для исследования. Иногда к одним и тем же известным микросателлитным локусам разработано несколько разных пар праймеров, и только одна из этих пар может соответствовать критериям, необходимым для конкретной задачи. При этом некоторые праймеры можно исключить еще на этапе предварительного отбора до проведения лабораторных исследований с помощью *in silico* подходов, что значительно упрощает и ускоряет процесс. Методы *in silico* включают применение специализированных программ для оценки праймеров по заданным критериям (например, Primer-BLAST, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), используя общедоступные базы генетических данных (Чемерис и др., 2016; Самарина и др., 2024; Гучетль и др., 2025).

Специфичность ПЦР зависит не только от самих праймеров, но и от условий проведения амплификации с ними. Одним из важных параметров специфичности ПЦР является температура отжига праймеров. Необходим подбор оптимальных значений, поскольку «В случае применения заниженной температуры возрастает вероятность возникновения ложно-позитивной ПЦР, а при завышенной может иметь место плохая наработка целевых ампликонов, вплоть до их неоявления, что

грозит возникновением ложно-негативной ПЦР» (Гарафутдинов и др., 2019). Кроме того, для повышения эффективности ПЦР (большого выхода ПЦР-продукта) может понадобиться оптимизация компонентов реакционной смеси: концентраций праймеров, ионов Mg^{2+} и т.д. Поэтому часто требуется подбор условий для конкретной пары праймеров, даже в случае, если эти же последовательности уже использовались другими исследователями.

Правильно подобранные последовательности праймеров в сочетании с оптимальными для них условиями амплификации обеспечивают высокую специфичность и эффективность ПЦР (Чемерис и др., 2016; Зубов и др., 2024). Однако при работе с большим количеством образцов с применением нескольких SSR-маркеров амплификация и последующий анализ каждого по-отдельности (моноплексные ПЦР) требует значительного расхода реагентов и времени. Поэтому целесообразно использовать мультиплексные ПЦР-системы. «Основной принцип мультиплексной ПЦР заключается в использовании в одной реакционной смеси с единичным образцом сразу нескольких пар праймеров, позволяющих путем наработки соответствующих ампликонов детектировать разные мишени, преимущественно отличающегося размера» (Зубов и др., 2024).

Однако к разработке мультиплексных наборов SSR-маркеров предъявляются еще более высокие требования по оптимизации условий по сравнению с моноплексной ПЦР. Помимо прочего при подборе праймеров необходимо учитывать их возможное взаимодействие друг с другом, оптимальные соотношения их концентраций, использовать ДНК-полимеразы с «горячим стартом». При проведении мультиплексных ПЦР необходимо строгое соблюдение разработанных протоколов, поскольку даже незначительные отклонения могут привести к снижению специфичности и эффективности результатов амплификации одного или сразу нескольких SSR-маркеров (Borah, 2011; Гарафутдинов и др., 2019; Самарина и др., 2024).

Детекция фрагментов ДНК. После прохождения полимеразной цепной реакции необходимо визуализировать полученные ампликоны. В случае, если все

предыдущие этапы проходили в оптимальных условиях, детекция ПЦР-продуктов становится решающим фактором в правильной идентификации сортов.

ПЦР-продукты разделяют методом электрофореза в различных вариациях, но все они основаны на движении отрицательно заряженных молекул (какой и является ДНК) в геле от катодного электрода к анодному. При этом гель, в котором проходит электрофорез, выполняет функцию молекулярного сита: короткие фрагменты ДНК легче продвигаются через поры и движутся быстрее, длинные фрагменты – медленнее (Кулибаба, Ляшенко, 2017; Кутлунина, Ермошин, 2017).

Визуализацию проводят, как правило, с помощью трансиллюминаторов в лучах УФ или на экранах белого света. Это зависит от применяемого для визуализации типа красителя: SYBR Green I, EtBr, нитрат серебра и т.д. Размеры амплифицированных фрагментов определяют с помощью специализированных программ (например, Image Lab, Bio-Rad), сравнивая с маркером молекулярного веса. Однако из-за искривления электрофоретического фронта и других факторов, искажающих положение фрагментов, точность определения размеров может быть значительно снижена (Mesarogu et al., 2012; Martin, 2020; Шилов и др., 2023).

На разрешающую способность электрофоретического разделения влияет несколько факторов: тип и концентрация геля, состав электрофорезного буфера, параметры электрофореза (напряжение, сила тока, температура), продолжительность проведения (Кутлунина, Ермошин, 2017). Разрешающая способность методов электрофореза может быть несколько увеличена путем повышения концентрации геля и (или) продолжительности проведения электрофореза. Например, в работе (Deo et al., 2020) электрофорез проводят в 3%-ном агарозном геле в течение одного часа, в другой работе (Бондаренко и др., 2025) используют 2%-ный агарозный гель, тогда как продолжительность электрофореза составляет два часа.

Агарозные гели получили широкое распространение из-за простоты приготовления и проведения электрофореза (Yılmaz et al., 2012). Они имеют невысокую разрешающую способность, часто недостаточную для разделения близких по размеру фрагментов. Так, фрагменты ДНК, отличающихся на один ди-

или тринуклеотидный микросателлитный повтор могут быть ошибочно определены как одинаковые (Шилов и др, 2023; Гучетль и др., 2025).

В сравнении с агарозным большую разрешающую способность имеют полиакриламидный гель (ПААГ). ПААГ наиболее часто используют при проведении микросателлитного анализа. Электрофорез в ПААГ проводят в двух основных режимах: в нативных и денатурирующих условиях. В первом случае образцы сохраняют структуру двухцепочечной ДНК. Различие в подвижности молекул ДНК в геле обусловлено не только размером, но и их пространственной конфигурацией. Это может отразиться на результатах электрофореза при визуализации – положение одинаковых по размеру фрагментов на электрофореграмме будет отличаться. Во втором случае пробы денатурируют, так же сам гель включает денатурирующие агенты (например, мочевины), что способствует диссоциации ДНК до одноцепочечной. Эта особенность метода повышает его разрешающую способность и позволяет разделять фрагменты, отличающиеся друг от друга на 1 п.н. ПААГ в денатурирующих условиях позволяет проводить микросателлитный анализ более точно (Albright, Slatko, 2000; Кутлунина, Ермошин, 2017; Green, Sambrook, 2020).

Метод электрофореза в ПААГ, особенно в денатурирующих условиях, довольно трудоемкий, что связано с особенностями приготовления геля и предварительной подготовки проб, контролем над условиями прохождения электрофореза (температура буфера, параметры напряжения). Кроме того, акриламид, входящий в состав ПААГ токсичен и требует соблюдения мер безопасности (Mesapogu et al., 2012; Martin, 2020).

Более современным, высокоточным и высокопроизводительным является капиллярный электрофорез, выполняемый на генетических анализаторах таких как ABI Prism 3130/3500, Нанофор 05, Locus и другие. Принципиальное отличие от вышеописанных методов в том, что фрагменты ДНК движутся в отдельных капиллярах. По достижению ими окна детекции и возбуждении лазером флуоресцентно-меченные фрагменты начинают флуоресцировать. Сигнал флуоресценции регистрируется камерой. Высокая точность определения размеров

фрагментов ДНК, разделенных данным методом, обусловлена тем, что маркер молекулярного веса вносится в каждый образец, и ошибки, возникающие из-за электрофоретического искривления (как в других методах), исключаются (Заруцкий и др., 2018; Flores-Rentería, Krohn, 2013; Бочарова и др., 2020; DNA Fragment ... , <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4474504.pdf>).

Капиллярный электрофорез отличается высокой пропускной способностью. В зависимости от прибора и количества капилляров последовательно проводится анализ каждых 8 или 16 образцов в рамках 96-луночного планшета (или двух планшетов), снижается риск ошибок, связанных с контаминацией проб при внесении образцов как в агарозных и полиакриламидных гелях. Использование различных флуоресцентных красителей для маркеров с фрагментами одинакового размера позволяет смешивать образцы и анализировать их одновременно. Кроме того, только данным методом можно детектировать продукты мультиплексных ПЦР, содержащих от 4 и более маркеров (даже имеющих одинаковые размеры). Разделение продуктов мультиплексной ПЦР другими методами ограничено отсутствием возможности одновременной детекции фрагментов одинакового или близкого размера, но могут быть детектированы значительно отличающиеся размером фрагменты (от 50 и более п.н.) (Flores-Rentería, Krohn, 2013; Галинская и др., 2019; Зубов и др., 2024).

Несмотря на очевидные преимущества, проведение капиллярного электрофореза требует дорогостоящего специализированного оборудования и реагентов, что ограничивает широкое распространение метода среди лабораторий. Поэтому многие исследователи продолжают использовать методы разделения в агарозных и полиакриламидных гелях, показывая, что для детекции ПЦР-продуктов микросателлитных маркеров разрешающей способности данных методов электрофореза достаточно (Ghosh et al., 2014; Бондаренко и др., 2025). Поэтому в диссертационном исследовании было уделено внимание этому вопросу (раздел 3.2).

1.6 Использование SSR-маркеров для молекулярно-генетической идентификации и изучения генетического разнообразия

Как уже было отмечено, SSR-маркеры широко применяют для паспортизации, идентификации и оценки генетического разнообразия различных сельскохозяйственных культур, например таких как рапс (Сатина и др., 2010б), рис (Супрун и др., 2017), горох (Гайнуллина и др., 2020), виноград (Ильницкая и др., 2022), сорго (Teklewold et al., 2025) и другие. При этом в последние годы заметен переход к более современным подходам генотипирования с применением генетических анализаторов. Например, в своих исследованиях В. З. Богдан и его соавторы (2022) проводили генотипирование 9 сортов льна-долгунца с помощью 11 высокополиморфных SSR-маркеров и капиллярного электрофореза. Результаты работы позволили отличить все анализируемые сорта, для каждого был составлен ДНК-паспорт. В другом исследовании Т. А. Базанов с соавторами (2025), используя аналогичный методический подход, создали генетические паспорта 24 линий льна-долгунца на основе двух наборов SSR-маркеров, один из которых был предложен предыдущими авторами (Богдан и др., 2022). При этом отмечена более высокая дискриминационная способность данного набора по сравнению с другим, используемым в исследовании.

Помимо применения высокопроизводительного капиллярного электрофореза в некоторых опубликованных работах сообщается о создании и успешном применении мультиплексных систем SSR-маркеров. Так, И. А. Шилов и его соавторы (Шилов и др., 2023) разработали мультиплексный набор из 7 маркеров для генотипирования подсолнечника, с помощью которого были идентифицированы 27 линий и гибридов, установлена генетическая однородность линий и подтверждена гетерозиготность гибридов. В исследовании других авторов (Головатская, Гучетль, 2024) для подсолнечника были разработаны 4 мультиплексных набора по 4–5 высокополиморфных SSR-маркеров в каждом и апробированы на 28 линиях, подтверждая их уникальность.

В своей статье О. С. Колобова с соавторами (2017) сообщают о результатах успешной идентификации 67 сортов и сортообразцов картофеля с помощью мультиплексной системы SSR-маркеров. Десять высокополиморфных SSR-маркеров со значением индекса полиморфного содержания (PIC) от 0,645 до 0,801 позволили получить уникальные ДНК-профили для паспортизации этих сортов. При этом другими авторами (Антонова и др., 2020) для идентификации 77 образцов картофеля было применено 10 SSR-маркеров в моноплексных ПЦР, часть из этих маркеров встречалась в работе предыдущих авторов (Колобова и др., 2017), а ПЦР-продукты разделяли в ПААГ в денатурирующих условиях. В процессе работы авторы исключили два маркера, и в конечном итоге для успешной идентификации 75 образцов (за исключением 2 соматоклональных сортов) потребовалось всего 8 SSR-маркеров.

Как видно из представленного обзора, у авторов нет единого мнения о количестве SSR-маркеров, необходимом для однозначной идентификации сортов и гибридов, причем не только между разными культурами, но и внутри одной.

Что касается сои, то ее ДНК-идентификацией и изучением генетического разнообразия с помощью SSR-маркеров занимаются как отечественные, так и зарубежные ученые. С. И. Лаврентьева с соавторами (2023) изучили полиморфизм 6 сортов культурной и 2 форм дикорастущей сои с использованием 11 SSR-маркеров. В исследовании (Рамазанова, Коломыцева, 2020) с помощью 13 микросателлитных маркеров установили отличимость 23 сортов сои. В работе (Ghosh et al., 2014) было изучено генетическое родство 32 сортов сои с помощью 10 SSR-маркеров. М. Hudcovicova и J. Kraic (2003) изучили 67 генотипов сои разного происхождения с помощью 18 SSR-маркеров, и показали, что для идентификации всех генотипов было достаточно 6 самых полиморфных маркеров. D. Appiah-Kubi с соавторами (2014) была проведена оценка генетического разнообразия 36 сортов сои с использованием 20 SSR-маркеров и морфологических признаков, по результатам кластеризации ученые установили соответствие распределения сортов с их происхождением. В работе (Gupta, Manjaya, 2017) с использованием 45 SSR-маркеров была оценена коллекция из 90 сортов, авторы

отмечают, что для дифференциации всех анализируемых сортов было достаточно набора из 8 микросателлитных маркеров. Другими учеными (Tripathi et al., 2023) было проведено генотипирование 106 образцов сои индийского происхождения с помощью 39 SSR-маркеров. В приведенных публикациях авторы используют разное количество SSR-маркеров в моноплексных ПЦР, детекцию продуктов амплификации проводят методами электрофореза в агарозном или полиакриламидном гелях различной концентрации.

В исследовании генетического разнообразия 97 сортов и селекционных линий сои (Žulj Mihaljević et al., 2020) применили 42 SSR-маркера в моноплексных ПЦР с разделением ПЦР-продуктов методом капиллярного электрофореза. Авторы отмечают, что дифференциация близкородственных сортов была затруднена, но все же им удалось отличить все сорта, при этом для их однозначной идентификации потребовалось 27 самых полиморфных маркеров.

Для сои также были разработаны мультиплексные наборы микросателлитных маркеров (Deo et al., 2020). Из 49 SSR-маркеров авторами было выбрано 20 наиболее подходящих, и на их основе составлено 22 мультиплексных набора, включающих от 2 до 5 маркеров в каждом. В данной работе включение большего количества маркеров в один мультиплекс ограничивается диапазонами размеров фрагментов, поскольку их детектируют в 3%-ом агарозном геле. Авторы предлагают использовать данные наборы для сортовой идентификации сои и других задач. Однако, несмотря на сокращение постановок ПЦР, при проведении анализа большого количества образцов одновременно, интерпретация результатов мультиплексных ПЦР в агарозном геле усложняется не только перечисленными ранее факторами, влияющими на точность определения размеров фрагментов, но и их количеством.

В другом исследовании (Li et al., 2024) для генотипирования сои использовали 20 мультиплексных систем, включающих по 3–4 маркера (всего 78), а разделение ПЦР-продуктов осуществляли с помощью капиллярного электрофореза. Для идентификации сортов использование такого большого общего количества SSR-маркеров, но малого в составе мультиплексных ПЦР, может быть

нецелесообразным из-за высокой стоимости анализа большого количества образцов. Авторами была проанализирована глобальная коллекция *Glycine soja*, состоящая из 2050 образцов, и *G. max* – 192 образца. В своей статье авторы отмечают высокий полиморфизм микросателлитов в геномах дикорастущих форм сои и меньший – в культурной, что говорит о снижении генетического разнообразия культурной сои.

В целом, при использовании праймеров, модифицированных разными флуоресцентными красителями для амплификации фрагментов ДНК, имеющих сходные размеры, и одинаковыми красителями для ампликонов с различными диапазонами размеров, возможно мультиплексирование 20 и более маркеров в одной ПЦР и капиллярной инъекции (Flores-Rentería, Krohn, 2013).

Для идентификации сортов и линий сои в 2025 г. был запатентован способ, предполагающий использование двух мультиплексных систем, включающих в совокупности 15 SSR-маркеров, с последующим разделением ПЦР-продуктов методом капиллярного электрофореза (Пат. № 2839697 Рос. Федерация). Авторы провели идентификацию 40 сортов сои, используя для выделения ДНК пробы, состоящие из 30 семян для каждого сорта. По результатам анализа для каждого образца были получены аллельные профили, используемые в дальнейшем для дифференциации сортов.

Во всех представленных исследованиях микросателлитный анализ сои проводят по различным наборам маркеров, разработанных в основном Р. Cregan (1999) и Q. J. Song (2004). Данные о полиморфизме одних и тех же SSR-маркеров, перекликающихся в представленных выше публикациях, разнятся, что связано с разнообразием исследуемого материала. Это показывает необходимость тщательного отбора ДНК-маркеров для исследования.

Анализ литературных источников показал, что большая часть исследований посвящена идентификации сои с целью отличимости сортов и оценки их генетического разнообразия, что особенно важно для сохранения и эффективного использования генетических ресурсов культуры. Поскольку генетическое

разнообразие является одним из ключевых факторов, определяющих успех селекционного процесса (Li et al., 2023).

Во многих исследованиях, посвященных ДНК-идентификации сои, практически не рассматривается вопрос о возможной генетической неоднородности исследуемого материала, если это не было одной из изначально поставленных целей. При этом в публикациях обычно приводится информация о различных подходах к получению образцов ДНК при выделении: из небольшого количества индивидуальных растений; из смеси ДНК (объединенной пробы), полученной путем смешивания ДНК индивидуальных растений или при экстракции ДНК сразу из нескольких растений. Большинство авторов не упоминается об однородности или неоднородности полученных проб. Можно предположить, что в таком случае весь анализируемый материал является генетически однородным.

Однако известно, что сорта, включая не только перекрестно-, но и самоопыляющиеся виды растений, могут иметь генетическую неоднородность, иначе обозначаемую в литературе как внутрисортной полиморфизм (Ramazanova et al., 2021; Асеева и др., 2024; Dannon et al., 2026). Причинами внутрисортной полиморфизма могут являться переопыление, спонтанные мутации, неоконченный процесс гомозиготизации (особенно актуально для новых сортов), а также механическое загрязнение в процессе семеноводства сорта (Рогожина и др., 2015; Зеленцов, Мошненко, 2019; Сатина и др., 2010а; Челюстникова, Гучетль, 2023).

С практической точки зрения внутрисортной полиморфизм может являться ценным источником генетического разнообразия, пригодным для использования в аналитической селекции — методе выведения новых сортов на основе гетерогенности, уже существующих (Рогожина и др., 2015; Лукомец и др., 2021; Yao et al., 2023). Однако с точки зрения молекулярно-генетического анализа наличие внутрисортной полиморфизма может повлиять на точность идентификации сорта. Этот вопрос требует отдельного изучения.

Для учета внутрисортной полиморфизма при молекулярно-генетической характеристике сортов может потребоваться увеличение объема анализируемого

материала, поскольку возникает необходимость анализа выборки индивидуальных образцов. При этом каждый образец будет характеризоваться набором признаков, получаемых при генотипировании. Таким образом, при увеличении количества исследуемых образцов и маркеров возрастает объем и сложность массива данных, что обуславливает применение методов многомерного анализа и машинного обучения для их обработки.

Методы машинного обучения уже применялись для анализа молекулярно-генетических данных растений. В исследовании коллекции рода *Pisum*, включавшей 20 сортов и 57 дикорастущих образцов, оценивали точность различных методов классификации и кластеризации на основе данных SSR-анализа. Авторы также оценивали относительную информативность отдельных аллелей для дискриминации исследуемого материала (Nasiri et al., 2015). В другой работе (Ibrar et al., 2024) на 109 генотипах подсолнечника применяли методы иерархической кластеризации и К-средних к объединенным данным морфологических, белковых и SSR-маркеров для выявления гетерозисных групп. Для сортовой идентификации по данным ДНК-маркирования в исследовании 45 сортов *Osmanthus fragrans* строили классификационные модели по алгоритму Random Forest (Qiu et al., 2018). В исследовании (Kong et al., 2026) также применяли Random Forest совместно с анализом главных компонент (PCA) для дифференциации 11 сортов и линий *Leymus chinensis* на основе генотипирования по SNP-маркерам. Эти исследования демонстрируют возможность применения методов машинного обучения для классификации генотипов по данным молекулярно-генетического анализа.

1.7 Современное состояние и проблемы внедрения ДНК-паспортизации в РФ

В последнее время молекулярно-генетическая паспортизация (ДНК-паспортизация) приобрела большую актуальность, поскольку является эффективным инструментом для решения задач как научного, так и прикладного характера: изучение и сохранение генетического разнообразия, формирование и поддержание биоресурсных коллекций, правовая защита оригинаторов, подтверждение оригинальности сортов, контроль подлинности и генетической

однородности семенного материала, что особенно важно в современных условиях развития рынка семян.

Вступление в силу нового Федерального закона от 30.12.2021 (в ред. 28.12.2025) «О семеноводстве» (№ 454-ФЗ), а именно необходимость оформления генетического паспорта, способствовало увеличению количества исследований, направленных на разработку подходов к ДНК-паспортизации сельскохозяйственных культур. На сегодняшний день утвержденные общепринятые методики ДНК-паспортизации отсутствуют.

Несмотря на многолетние исследования в области молекулярно-генетической идентификации генотипов, практическое внедрение ДНК-паспортизации сельскохозяйственных культур ограничивается рядом нерешенных проблем методического, организационного и понятийного характера:

1. Отсутствие общепринятых подходов к разработке методик – типу и оптимальному количеству ДНК-маркеров, обеспечивающих четкую дифференциацию сортов. В результате для одной культуры разными исследовательскими группами используются различные наборы ДНК-маркеров, что затрудняет возможность сопоставления данных между лабораториями.

2. Отсутствие унифицированных протоколов проведения анализа ДНК. В каждой лаборатории используются различные методы для выделения ДНК, проведения ПЦР, детекции и анализа данных, что снижает межлабораторную воспроизводимость результатов анализа.

3. Разный уровень технической оснащенности лабораторий ограничивает внедрение единых высокопроизводительных протоколов анализа ДНК и применение методов с высокой разрешающей способностью.

4. Отсутствие общедоступных национальных и межлабораторных баз данных, содержащих стандартизированную информацию о генетической характеристике сортов, необходимых для возможности сравнения результатов, получаемых в разных организациях.

5. Неоднозначность понятийного аппарата в области генетической паспортизации, прежде всего, ключевых определений генетического паспорта и его

связи со стандартным образцом семян. Это затрудняет разработку арбитражных процедур и формирование унифицированных требований к ДНК-паспортизации. Например, в работе Е. К. Хлесткиной и соавторов (2025) генетическому паспорту предлагается дать более точное определение «Генетический паспорт – документ, отражающий индивидуальные генетические особенности селекционного достижения, которые позволяют отличить его генотип от генотипа других селекционных достижений данной сельскохозяйственной культуры».

6. Неопределенность формата представления генетического паспорта. Несмотря на то, что форма генетического паспорта утверждена (Приказ Министерства ... , <https://faolex.fao.org/docs/pdf/rus222976.pdf>), нет единого мнения о представлении генетической информации, в разных работах используют: электрофоретические спектры, молекулярно-генетические формулы, бинарные матрицы, таблицы с размерами фрагментов и т.д. (Янковская и др., 2019; Богдан и др., 2022; Иваний и др., 2024).

7. Вопросы хранения и поддержания эталонного генетического материала. Формирование генетического паспорта предполагает наличие стандартного образца семян или иного материала для обеспечения последующей верификации результатов. Необходима разработка регламентов процедур хранения, обновления и использования таких образцов для создания устойчивой системы ДНК-паспортизации.

Также стоит отметить, что ДНК-паспортизация сорта фактически закрепляет его генетическую характеристику, поэтому ошибки, допущенные при формировании генетического паспорта, могут привести к правовым и экономическим последствиям – до приостановки оборота семян сортов (Хлесткина и др., 2022). Поэтому обеспечение точности и воспроизводимости результатов генотипирования имеет принципиальное значение для ДНК-паспортизации.

Вместе с тем, значительная сложность состоит в унификации методик ДНК-паспортизации сортов и гибридов самоопыляющихся, перекрестноопыляющихся и вегетативно-размножающихся культур. Эти культуры значительно отличаются степенью внутрисортного полиморфизма, что требует учета их биологических

особенностей при разработке генетических паспортов. Это касается не только выбора системы применяемых ДНК-маркеров, но и количества анализируемых растений. Поэтому необходимы исследования по разработке методик, адаптированных под каждую конкретную культуру. В связи с этим учеными разных НИИ активно ведутся исследования по идентификации и паспортизации сортов и гибридов сельскохозяйственных культур (Гавриленко, Чухина, 2020; Гавриленко и др., 2022; Самарина и др., 2024; Гучетль и др., 2025; Климущина и др., 2025 б).

Для сои в ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК ранее был разработан метод идентификации сортов сои, основанный на использовании 9 SSR-маркеров (Пат. № 2388828 Рос. Федерация), который впоследствии был расширен до 13 маркеров (Рамазанова, Коломыцева, 2020). Созданная система микросателлитных маркеров успешно применялась для идентификации новых сортов сои, выведенных во ВНИИМК (Зеленцов и др., 2019; Зеленцов и др., 2020). Однако с увеличением количества анализируемых образцов было установлено, что имеющегося набора маркеров для идентификации всех сортов недостаточно (Савиченко, Рамазанова, 2021а).

Позднее аналогичные исследования были начаты и в ФГБНУ ФНЦ ВНИИ сои (Бондаренко и др., 2022; Бондаренко, 2024). Авторы подбирали наборы микросателлитных маркеров и оптимизировали условия проведения ПЦР-анализа не только для идентификации сортов культурной, но и форм дикорастущей сои.

Тем не менее, существующие наборы SSR-маркеров в сочетании с описанными в публикациях условиями проведения анализа обладают рядом факторов, ограничивающих их широкое внедрение в практику: недостаточная информативность отдельных SSR-маркеров, ограниченная разрешающая способность применяемых методов, отсутствие возможности для мультиплексного анализа, сложности с однозначностью интерпретации данных, а также низкая пропускная способность, недостаточная для проведения массовых анализов.

Среди отечественных разработок по сортовой идентификации сои стоит отметить способ, опубликованный в 2025 г. (Пат. № 2839697 Рос. Федерация).

Данная работа отражает общую тенденцию перехода от генотипирования методами с ограниченной пропускной и разрешающей способностью к мультиплексным форматам анализа с применением капиллярного электрофореза. Вместе с тем остается открытым вопрос об информативности получаемых профилей, определяемой количеством и характеристиками используемых ДНК-маркеров, а также о точности и воспроизводимости результатов при практическом применении.

В целом анализ литературных источников показал, что, несмотря на многочисленные исследования в области молекулярно-генетической идентификации, сохраняются проблемы, связанные с информативностью маркерных систем, воспроизводимостью результатов генотипирования и недостаточной изученностью внутрисортовой генетической структуры. Это подчеркивает необходимость комплексного подхода к идентификации, охватывающего вопросы как совершенствования методических аспектов генотипирования, так и оценки внутрисортовой генетической неоднородности и ее влияния на надежность идентификации сортов сои.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все опыты диссертационной работы проведены в лаборатории молекулярно-генетических исследований отдела биологических исследований ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК в 2020–2025 гг.

2.1 Материалы исследования

Всего в исследование было включено 85 сортов сои разного происхождения, в том числе:

- 42 сорта селекции ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК, РФ – Баргузин, Барс, Вектор, Восточка, Вига, Вилана, Вилана бета, Вита, ВНИИМК 3895, ВНИИМК 9186, Грея, Дельта, Дуар, Дуниза, Елисей, Забава, Зара, Иней, Ирбис, Кихара, Кора, Краса, Кубанская 4958, Кубань, Липчанка, Лира, Любава, Мамонт, Олимпия, Парус, Пума, Рента, Рысь, Саяна, Своя, Себур, Селена, Славия, Титан, Триада, Чара, Ягуар;
- 10 сортов селекции ООО «Соевый комплекс», РФ – Аванта, Бара, СК Ава, СК Аврора, СК Алекса, СК Артика, СК Дока, СК Оптима, СК Уника, СК Элана;
- 2 сорта селекции ФГБНУ ФНЦ ВНИИ сои, РФ – Лидия, Даурия;
- 3 сорта селекции ФГБНУ Омского АНЦ, РФ – Омская 4, Сибириада, СибНИИСХОЗ-6;
- 2 сорта селекции ФГБОУ ВО Дальневосточного ГАУ, РФ – Грибская 30, Росинка;
- 2 сорта селекции ООО «Эконива-семена» – ЭН Аргента, ЭН Авиор;
- 12 сортов селекции других учреждений РФ: Алтом (ФГБНУ ФАНЦА), Белор (ФГБНУ ФНЦ зернобобовых и крупяных культур, ФГБОУ ВО Белгородский ГАУ), Бинго (АО «Щелково Агрохим»), Брянская 11 (ФГБОУ ВО Брянский ГАУ), Венера (ФГБНУ ФНЦ агробιοтехнологий Дальнего Востока), ВНИИОЗ-85 (ФГБНУ ФНЦ ВНИИГиМ), Локус (ФГБУН ХФИЦ ДВО РАН), Лучезарная (ФГБНУ Воронежский ФАНЦ), Окская (ФГБНУ ФНАЦ ВИМ), Северная 4 (Амурская СХ ОС), СибНИИК-315 (ФГБУН СФНЦА РАН), Соер-3 (ФГБНУ ФАНЦ Юго-Востока);

- 3 сорта из США – Williams 82, Lee, Ходсон;
- 5 сортов селекции Semences prograin INC., Канада – Аляска, Амадеус, Максус, Опус, Сибيريا;
- 1 сорт селекции SeCan, Канада – Прескотт;
- 2 сорта селекции Украины – Альтаир (Селекционно-генетический институт), Витязь 50 (УкрНИИОЗ);
- 1 сорт селекции ООО «СОЯ-СЕВЕР КО», Беларусь – Ясельда.

Сорта представлены разными выборками индивидуальных растений или смесями из нескольких растений. Подробная информация представлена в приложении А.

Также в исследование было включено 8 гибридных комбинаций, полученных в лаборатории селекции и семеноводства сои ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК (приложение А, группа сортов 14). Для идентификации гибридов поколения F_1 с растений, непосредственно использованных в качестве родительских форм в скрещиваниях (группа сортов 13), предварительно были отобраны образцы листьев.

В качестве положительного контрольного образца (ПКО) в исследовании для сопоставления результатов фрагментного анализа в разных сериях постановок ПЦР выбран сорт сои Лира, как характеризующийся наименьшим внутрисортным полиморфизмом (Савиченко и др., 2024а).

2.2 Методы исследования

2.2.1 Выделение ДНК, измерение концентрации и оценка качества полученных растворов

В работе использовали ДНК, выделенную различными способами из частей зародыша семян или фрагментов примордиальных и тройчатосложных листьев сои. В опыт по подбору оптимального протокола выделения ДНК, с целью использования ее для молекулярно-генетической паспортизации и идентификации, также были включены и другие части растений сои: корни, гипокотили и семядоли (видоизмененные семядольные листья) 7–10 дневных растений. В данном опыте по

каждому типу материала выборка составляла 12 индивидуальных растений сорта сои Пума (ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК), в остальных случаях – как описано в приложении А. Весь растительный материал предварительно измельчали до гомогенного состояния с помощью металлических шариков диаметром 2–4 мм в гомогенизаторе KZ-III-FP (Servicebio, КНР). Количество растительного материала, объемы вносимых реагентов брали исходя из рекомендуемых значений в методических указаниях или инструкциях к наборам реагентов. Далее перечислены способы выделения ДНК, которые применялись в данной диссертационной работе:

1) ручным способом с применением центрифугирования с помощью буфера на основе ЦТАБ из фрагментов настоящих листьев (Doyle, Doyle, 1990), из частей зародыша по методическим рекомендациям (Определение сортовой ... , 2017);

2) ручным способом с применением центрифугирования набором реагентов DiamondDNA Plant (ООО «НПФ Алтайбиотех», РФ) в соответствии с инструкцией производителя;

3) на станции для автоматического выделения и очистки нуклеиновых кислот Auto-Pure 96 (Allsheng, КНР) набором реагентов МагноПрайм ФИТО (ООО «НекстБио», РФ). Параметры температурно-временных режимов для выделения ДНК на станции устанавливались в соответствии с инструкцией производителя к набору реагентов.

Для измерения концентрации и оценки качества выделенной ДНК применяли следующие методы:

1. Спектрофотометрический метод. Оптическую плотность растворов измеряли на микроспектрофотометре Nano-300 (Allsheng, КНР) в диапазоне длин волн 230–280 нм: максимум поглощения для нуклеиновых кислот – 260 нм, белков и фенолов – 280 нм, полисахаридов и других органических соединений – 230 нм. Чистоту образцов оценивали исходя из значений соотношений оптических плотностей A_{260}/A_{280} и A_{260}/A_{230} (Балановский и др., 2019).

2. Флуориметрический метод. Концентрацию двухцепочечной ДНК измеряли на флуориметре Fluo-200 (Allsheng, КНР) с использованием набора QuDye dsDNA BR (Lumiprobe, США) по прилагаемой производителем инструкции.

При разбавлении образцов до концентраций, соответствующих диапазонам измерения флуориметра, в качестве исходной концентрации принимались значения, полученные по результатам измерения на спектрофотометре.

3. Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот. Образцы выделенной ДНК разделяли в 1%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием (EtBr), в течение 30 мин в камере горизонтального электрофореза SE-2 (ООО «НПФ Хеликон», РФ), заполненной 1× SB-буфером (на основе бората натрия), при установленных параметрах тока 90 мА и напряжения 180 В. Визуализацию результатов электрофорезного разделения ДНК осуществляли с помощью гель-документирующей системы GenoSens Touch 2200 (Clinx Science Instruments, КНР) в УФ-свете.

2.2.2 Схема разработки мультиплексных систем SSR-маркеров

1. Поиск микросателлитных локусов по всему геному сои в базе данных SoyBase (<https://www.soybase.org/>) и литературных источниках (Абугалиева и др., 2013; Рамазанова, Коломыцева, 2020).

2. *In silico* проверка последовательностей праймеров, фланкирующих отобранные локусы, на эталонной сборке генома сои Glycine_max_v4.0 (сорт Williams 82) с помощью онлайн инструмента Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) по параметрам: специфичность отжига, температура плавления праймеров, размер ПЦР-продукта.

3. Экспериментальный подбор температуры отжига для отобранных пар праймеров для проведения ПЦР с ними.

4. Оценка информативности и специфичности SSR-маркеров на небольших выборках генотипов сои (20 сортов) по результатам разделения ПЦР-продуктов методами электрофореза. SSR-маркеры анализировались в разные годы исследования, этим обусловлено их изучение на разных генотипах сои (приложение А).

5. Конструирование и отбор новых последовательностей праймеров для выбранных на предыдущем этапе SSR-локусов. Конструирование новых пар

праймеров осуществлялось с помощью Primer-BLAST на основе последовательностей ДНК эталонной сборки генома сои *Glycine_max_v4.0*, представленной в базе данных RefSeq на платформе NCBI, (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000004515.6), содержащих микросателлитный участок и около 200–250 п.н. фланкирующих областей. Параметры для конструирования праймеров: диапазон прямого и обратного праймеров в зависимости от расположения микросателлита во фланкирующей области, размер ПЦР-продукта от 100 до 550 п.н., температура плавления праймеров от 58 до 62 °C (с разницей между парой не более 3 °C). Критерии для отбора праймерных пар *in silico*: амплификация только специфичного продукта, отсутствие копий с высокой степенью идентичности в других хромосомах генома сои (проверка последовательностей в Nucleotide BLAST, https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), отсутствие или минимально возможное образование димеров (проверка с помощью Multiple Primer Analyzer, <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>).

6. Экспериментальная проверка новых пар праймеров на специфичность амплификации в одинаковых температурно-временных условиях. Установление диапазонов размеров фрагментов ДНК для каждого SSR-маркера.

7. Формирование мультиплексных (мультипраймерных) наборов SSR-маркеров с учетом диапазонов размеров фрагментов ДНК.

8. Оптимизация условий амплификации (подбор температурно-временных режимов и концентраций праймеров) и стандартизация условий интерпретации результатов фрагментного анализа (секвенирование по Сэнгеру фрагментов ДНК ПКО, разработка панелей аллельных бинов).

2.2.3 Проведение ПЦР

При подборе оптимальной температуры отжига для каждой пары праймеров ПЦР проводили в реакционных смесях объемом 25 мкл. Реакционная смесь включала: 2,5 мкл 10× ПЦР-буфера-Б (ООО «НПФ Синтол», РФ), 25 мМ MgCl₂ (НПО «СибЭнзим», РФ), 2,5 мМ смеси дНТФ (ЗАО «Евроген», РФ); 0,5 мкл 5 е.а. SynTaq ДНК-полимеразы (ООО «НПФ Синтол», РФ), по 0,1 мкл 100 пкМ/мкл прямого и обратного праймеров, 2 мкл 25 нг/мкл ДНК и деионизированную воду до конечного объема. Амплификацию осуществляли в термоциклере MiniAmp Plus (Applied Biosystems, США) в независимых температурных блоках Veriflex с изменением температуры отжига на 2–4 °С. Полные температурно-временные условия амплификации представлены в протоколе 1 (таблица 1). Далее при оценке информативности каждого SSR-маркера ПЦР осуществлялась по протоколу 1 при экспериментально установленной температуре отжига.

Таблица 1 – Температурно-временные условия амплификации

Протокол	Температура, °С	Продолжительность, сек/мин	Количество циклов
1	2	3	4
1	95	2 мин	1
	95	30 сек	35
	47–64 (в зависимости от пары праймеров)	40 сек	
	70	60 сек	
	70	2 мин	1
	4	до снятия с прибора	-
А	95	90 сек	1
	95	30 сек	10
	64 (- 0,5 с каждым циклом)	40 сек	
	70	60 сек	
	95	30 сек	25
	58	40 сек	
	70	60 сек	
	70	2 мин	1
	4	до снятия с прибора	-

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
Б	95	2 мин	1
	95	5 сек	35
	62	90 сек	
	65	30 мин	1
	4	до снятия с прибора	-

Экспериментальную проверку новых пар праймеров осуществляли отдельно (в моноплексных ПЦР) в реакционных смесях объемом 10 мкл. Состав реакционной смеси был аналогичен описанному выше, с пропорциональным уменьшением объемов вносимых реагентов. Амплификацию проводили по протоколу 1 при одинаковой для все пар праймеров температуре отжига 60 °С (таблица 1).

Мультиплексные ПЦР проводили в условиях, аналогичных моноплексным, за исключением увеличенного числа праймерных пар, вносимых в одну реакционную смесь. При формировании мультиплексных наборов концентрация каждого вносимого праймера составляла 4 пкМ/мкл. Амплификация осуществлялась по протоколу А (таблица 1).

На этапе оптимизации температурно-временных условий мультиплексных ПЦР сравнивали два протокола амплификации (таблица 1, протоколы А и Б). Для оценки их эффективности ПЦР проводили в реакционных смесях, взятых из предварительно приготовленного общего стока, с целью исключения влияния факторов, не связанных с температурным режимом. Амплификацию осуществляли одновременно в разных температурных блоках одного термоциклера GeneExplorer GE-48D (Bioer, КНР).

После установления протокола температурно-временных условий оптимизировали состав реакционной смеси мультиплексной ПЦР. Концентрации праймеров регулировали путем варьирования объема вносимого исходного раствора праймера (100 пкМ/мкл). Например, объем 0,02 мкл соответствует внесению 2 пкМ праймера на одну реакцию. Оптимальные значения устанавливали

по результатам проведения серии мультиплексных ПЦР, отличающихся вносимым количеством праймеров по вариантам, представленным в таблице 2.

Таблица 2 – Подбор концентрации праймеров в реакционной смеси

Прямой (F) и обратный (R) праймеры	Исходная концентрация	Объем каждого вносимого праймера в расчете на 1 реакцию, мкл			
		Вариант 1	Вариант 2	Вариант 3	Вариант 4
Мультиплексная система 1					
Satt507, Satt681, Satt359, Satt149, Satt141, Satt286, Satt442, Satt532, Satt309	100 пкМ/мкл	0,04	0,04	0,02	0,02
Satt263	100 пкМ/мкл	0,04	0,08	0,04	0,04
Satt614				0,08	0,06
Мультиплексная система 2					
Satt596, Satt549, Soyprp1, AW277661, Satt181, Satt168, CSSR531, Satt197, Satt353	100 пкМ/мкл	0,04	0,02	-	-
Satt292, Satt287			0,04	-	-

Итоговые значения концентраций каждой пары праймеров были установлены после окончательного распределения флуорофоров между SSR-маркерами на этапе оптимизации условий мультиплексных ПЦР.

2.2.4 Разделение ПЦР-продуктов и их детекция

В исследовании были применены различные способы разделения ПЦР-продуктов и их детекции:

1. Электрофорез в 2%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, в камере SE-2, содержащей 1× электродный SB-буфер, в течение 30–40 мин при установленных параметрах – 90 мА, 180 В. Детектирование результатов электрофореза осуществлялось с помощью системы GenoSens Touch 2200 в УФ-свете.

2. Электрофорез в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в нативных условиях в камере для вертикального электрофореза VE-20 (ООО «НПФ Хеликон», РФ), содержащей 1× TBE-буфер (трис-борат-ЭДТА), в течение 2–2,5 ч при

установленных параметрах – 45 мА, 230 В. После электрофореза гели окрашивали в растворе бромистого этидия и детектировали как указано в первом способе.

3. Электрофорез в 8%-ном ПААГ в денатурирующих условиях в камере VE-20 в течение 1,5–2,5 ч (в зависимости от ожидаемых размеров фрагментов ДНК), при установленных параметрах тока и напряжения 200 мА, 800 В и постоянной температуре электродного буфера ($1 \times \text{TBE}$) – 50 °С. Предварительная денатурация проб проводилась в термостате Термит (ДНК-Технология, РФ) при 95 °С в течение 5 мин, затем пробы охлаждали до 0 °С в термостате СН-100 (BioSan, Латвия). После проведения электрофореза гели окрашивали нитратом серебра и детектировали с помощью системы GenoSens Touch 2200 на экране белого света.

По результатам всех вышеописанных способов разделения ПЦР-продуктов на полученных электрофореграммах цифрами отмечали выявленные фрагменты ДНК, где 1 – фрагмент с наибольшим молекулярным весом, далее по мере уменьшения веса цифрами 2, 3 и т.д. Несмотря на наличие маркера молекулярного веса, было решено не определять конкретный размер фрагментов, поскольку из-за особенностей проведения электрофореза электрофоретический фронт иногда был искривлен, что негативно влияло на точность определения размеров фрагментов.

4. Фрагментный анализ методом капиллярного электрофореза в денатурирующих условиях. Для фрагментного анализа при постановке ПЦР использовали пару, где 5'-конец прямого (F – Forward) праймера содержал один из четырех флуоресцентных красителей (флуорофоров): FAM, R6G, TAMRA или ROX. После амплификации 1 мкл ПЦР-продукта смешивали с 0,5 мкл размерного стандарта СД-600 и 8,5 мкл деионизированного HiDi-формамида (ООО «НПФ Синтол», РФ), затем проводили денатурацию проб в течение 3 мин при 95 °С и охлаждение до 4 °С в термоциклере. Денатурированные ПЦР-продукты разделяли на генетическом анализаторе Нанофор-05 (ИАП РАН, РФ) в соответствии с заданными производителем модулями управления (параметрами для электрофореза) для сочетания полимера ПДМА-4 или ПДМА-6 (ООО «НПФ Синтол», РФ) и линейки капилляров длиной 36 см (ИАП РАН, РФ). Размер фрагментов ДНК определяли относительно размерного стандарта СД-600 с

помощью компьютерного программного обеспечения GeneMarker версии 3.0.1 (SoftGenetics, США).

2.2.5 Секвенирование фрагментов ДНК SSR-маркеров

Для получения ампликонов с каждой парой праймеров (не имеющих флуоресцентной метки) проводили ПЦР по условиям, описанным в п. 2.2.3 (для реакционной смеси объемом 25 мкл, дополнительно включающей 1× раствор флуоресцентного красителя Eva488 (Lumiprobe, США); амплификация по протоколу Б, таблица 1). Для локуса CSSR531 при проведении ПЦР с целью последующего секвенирования использовали пару праймеров, обеспечивающую амплификацию фрагмента размером 296 п.н. по эталонному геному (F: TCTGTTCTCGGGTCGGATCT; R: GGCCATGCACCTGCTACTTA). При этом в мультиплексных ПЦР применялась другая пара праймеров (актуальная) к данному локусу (глава 5, таблица 7), для которой размер амплифицируемого фрагмента был пересчитан в дальнейшем на основании результатов секвенирования с праймерами, приведенными выше.

В качестве ДНК-матрицы использовали образец ДНК растения сорта Лира, выбранного как положительный контрольный образец (ПКО) в исследовании для сопоставления результатов фрагментного анализа. Для локуса Satt168 ДНК-матрицей служил образец сорта Williams 82 в связи с низким качеством получаемых последовательностей для ПКО. Размер амплифицируемого фрагмента для ПКО по данному локусу определяли на основании полученной последовательности.

ПЦР-продукты разделяли в 1,5%-ном агарозном геле и визуализировали в системе GenoSens Touch 2200. Целевые фрагменты ДНК вырезали из геля с помощью скальпеля. Выделение ДНК из агарозного геля осуществляли с помощью набора ColGen (ООО «НПФ Синтол», РФ) в соответствии с инструкцией производителя.

Реакции секвенирования ДНК по методу Сэнгера осуществляли с использованием набора реагентов GenSeq (ООО «НПФ Синтол», РФ). Очистку

продуктов реакции секвенирования проводили с применением наборов SeqMAG (ООО «НПФ Синтол», РФ) или iX-Pure (NimaGen, Нидерланды) согласно инструкциям производителей.

Разделение продуктов секвенирования выполнялось методом капиллярного электрофореза на приборе Нанофор 05 в соответствии с заданным производителем модулем управления для сиквенсного анализа в полимере ПДМА-6 и линейке капилляров длиной 36 см. Анализ полученных хроматограмм, оценку качества прочтений и формирование последовательностей осуществляли в программе Mutation Surveyor DNA Variant Analysis (SoftGenetics, США).

2.2.6 Статистическая обработка и биоинформатический анализ данных

Сравнительная оценка образцов ДНК. Концентрации ДНК и соотношения A260/A230 и A260/A280, полученные в результате измерений спектрофотометрическим методом, представлены в виде ящика с усами, где «ящик» отражает значения второго и третьего квартилей (межквартильный интервал), а «усы» указывают на максимальные и минимальные значения, не выходящие за пределы 1,5 межквартильных интервала. Для оценки статистической значимости различий между группами использовали непараметрический критерий Данна с поправкой Холма-Бонферрони на множественные сравнения, с помощью функции `dunn_test()` из пакета «rstatix» (<https://CRAN.R-project.org/package=rstatix>). В качестве порогового уровня значимости был выбран более строгий $\alpha = 0,01$.

Оценка информативности маркеров. При оценке информативности SSR-маркеров учитывали показатели: количество выявленных аллелей (N_a), количество эффективных аллелей (N_e), индекс полиморфного информационного содержания (PIC). Расчеты проводили в программе MS Excel.

Расчет эффективного числа аллелей проводили по формуле:

$$N_e = \frac{1}{\sum_{i=1}^k p_i^2} \quad (1)$$

Индекс полиморфного информационного содержания PIC рассчитывали по формуле:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2p_i^2 p_j^2 \quad (2)$$

где p_i – частота i -го аллеля в выборке, p_j – частота j -го аллеля в выборке, k – общее число выявленных аллелей по данному локусу, i, j – индексы аллелей, по которым проводится суммирование (индекс i – от 1 до k , индекс j – от $i + 1$ до k).

Определение структуры SSR-локусов. Для подтверждения соответствия амплифицируемых фрагментов целевым микросателлитным локусам и определения их структуры проводили выравнивание последовательностей, полученных в результате секвенирования, с последовательностями эталонного генома сои. Выравнивание выполняли с использованием инструмента Nucleotide BLAST, режим megablast применяли для последовательностей с высокой степенью сходства, blastn – для менее сходных. По результатам выравнивания в программе Ugene (Okonechnikov et al., 2012) с помощью функции «поиск тандемов» определяли структуру микросателлитного локуса, подсчитывали количество повторяющихся мотивов и на основании сравнения с последовательностью эталонного генома устанавливали размер амплифицируемых фрагментов. Полученные значения использовали для сопоставления с размерами фрагментов, определяемыми по результатам фрагментного анализа.

Формирование панелей аллелей. Для автоматического определения аллелей при интерпретации результатов фрагментного анализа в программе GeneMarker формировали файлы панелей бинов аллелей SSR-маркеров мультиплексных систем. При создании панелей аллели каждого маркера определяли по положению пиков анализируемых образцов на электрофореграмме, а также статтер-пиков, как потенциально выявляемых аллелей при увеличении выборки анализируемых генотипов. Обозначение аллелей задавали с учетом размеров соответствующих фрагментов эталонного генома сои, установленных *in silico* (с помощью Primer-Blast), с шагом 3 пн, что обусловлено тринуклеотидным мотивом используемых SSR-маркеров. Для каждого аллеля устанавливали диапазон обнаружения (бин), ограниченный в пределах $\pm 0,9$ п.н. от определяемого размера для корректного отнесения пиков к соответствующим аллельным вариантам при незначительном варьировании электрофоретической подвижности фрагментов. Данные панели использовали в каждой серии проведения анализа при

интерпретации результатов капиллярного электрофореза, настраивая их положение относительно ПКО, размеры фрагментов (аллели) которого были установлены в результате секвенирования.

Оценка генетического разнообразия сортов. Для 60 сортов сои с выборками 8–47 растений (приложение А, группы сортов 7, 11, 12) на основе данных генотипирования по 22 SSR-маркерам с использованием надстройки для MS Excel GenALEx версии 6.51 рассчитывали показатели: процент полиморфных локусов (P), количество выявленных аллелей (N_a), количество эффективных аллелей (N_e), наблюдаемая (H_o) и ожидаемая (H_e) гетерозиготность.

Классификация растений по биотипам. Растения с идентичными по 22 SSR-маркерам ДНК-профилями относили к одному биотипу. При наличии хотя бы одного отличающегося аллеля растение относили к новому биотипу. Для гетерозиготных локусов учитывали состав аллелей: при сочетании двух аллелей, ранее выявленных у растений сорта в гомозиготном состоянии, растение относили к существующему биотипу (с большей частотой встречаемости), при выявлении нового аллеля – выделяли новый биотип. Для каждого сорта определяли количество биотипов и частоту их встречаемости в анализируемой выборке. Визуализацию полученных данных проводили с помощью пакета «ggplot2» для языка статистического программирования R (Wickham, 2016).

Оценка генетического сходства сортов и растений. На основании частот аллелей 22 SSR-маркеров рассчитывали попарные генетические расстояния Нея между сортами, которые в дальнейшем использовали для иерархической кластеризации по методу невзвешенного попарного среднего (UPGMA). Растения в каждом сорте упорядочивали на основании доли локусов с различающимися генотипами с последующей кластеризацией методом UPGMA. Построение матрицы и дендрограммы осуществляли в программной среде R с помощью пакетов «ggplot2», «ggdendro» и «patchwork».

Классификация растений по сортам. Для классификации растений, проанализированных с помощью 22 микросателлитных маркеров, по сортам использовали алгоритм Random Forest (далее RF) – метод Случайного Леса

(Breiman, 2001), реализованный в пакете «randomForest» для языка программирования R (Liaw, Wiener, 2022).

Модель RF обучали на выборке из 53 сортов сои (приложение А, группы сортов 7, 11). Для сортов сои селекции ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК использовали семена категории ОС (преимущественно по 47 растений на сорт). Также в обучающую выборку входило 16 сортов селекции других оригинаторов с выборками по 23–30 растений.

В процессе обучения модели использовали следующие параметры: число деревьев в ансамбле (Ntree) – 2000, число случайно отбираемых признаков для разделения каждого узла дерева (Mtry) – 9. Оптимальное значение параметра Mtry подбиралось путем тестирования ряда значений параметра. Было выбрано значение, которое обеспечивало наибольшую точность классификации.

При валидации обученной модели RF независимая тестовая выборка включала 7 сортов, отсутствующих в обучении (по 8 семян), а также сорта, участвующие в обучении, но представленные другими семенными партиями (приложение А, группы сортов 8–10, 12).

Для каждого растения предсказанным считался класс, получивший наибольшую долю голосов деревьев в ансамбле. Для исключения принудительного отнесения растений с низкой оценкой предсказаний к одному из сортов обучающей выборки был установлен порог 0,7.

ГЛАВА 3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ МЕТОДИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ SSR-АНАЛИЗА ГЕНОТИПОВ СОИ

Ввиду большого количества анализов при проведении ДНК-паспортизации и идентификации сортов к выбору способов анализа ДНК предъявляются высокие требования: высокая пропускная способность, воспроизводимость и т.д. Поэтому в задачи данного раздела исследования входили сравнительная оценка и выбор оптимальных способов выделения ДНК и детекции фрагментов, как этапов технологии ДНК-идентификации, обеспечивающих быстроту, точность и частичную автоматизацию анализа ДНК генотипов сои.

3.1 Сравнительная оценка эффективности выделения ДНК из разных частей растений сои

Наиболее рациональным технологическим решением для выделения ДНК при массовых анализах является применение автоматических станций, позволяющих экстрагировать ДНК одновременно из 16–96 проб (в зависимости от особенностей прибора), при этом соблюдается единообразие условий и минимизируются ошибки, связанные с человеческим фактором (например, при дозировании реагентов). В настоящем опыте использовались станция Auto-Pure 96 и набор реагентов МагноПрайм ФИТО.

Качество и количество выделенной ДНК зависит от растительного материала, взятого для экстракции (Tamari, Hinkley, 2016). Для классического ПЦР-анализа обычно не требуется большого количества высокоочищенного препарата, в большинстве случаев ДНК выделяют из проростков или листьев вегетирующих растений. Для паспортизации сортов и их идентификации посредством сравнения партий семян удобнее выделять ДНК напрямую из семени, исключая этап проращивания. Однако в семенах сои в большом количестве содержатся белки, масла и другие вещества, затрудняющие экстрагирование ДНК из целого семени. Поэтому для выделения использовали части зародышей семян (зародышевой оси).

Для оценки эффективности данного подхода по сравнению с другими также было осуществлено выделение ДНК из других частей растений сои.

После выделения было проведено измерение концентрации экстрагированных нуклеиновых кислот (НК), а также их чистоты от белков, фенолов, органических соединений по показателям соотношений A_{260}/A_{280} и A_{260}/A_{230} . На рисунке 2 представлены результаты измерений в виде блочных диаграмм с ограничителями «ящик с усами».

Согласно результатам измерений наибольшее количество НК было получено из частей зародышей семян – от 160,84 до 265,83 нг/мкл (рисунок 2 а), и значительно превышало концентрацию НК, выделенных из корней, гипокотилей и примордиальных листьев (таблица 3). При этом статистически значимых различий между значениями концентраций НК, выделенных из частей зародышей и семядольных листьев, не наблюдается. Концентрация НК в образцах, выделенных из корней, гипокотилей и примордиальных листьев была примерно на одном уровне в диапазоне значений от 8,62 до 45,80 нг/мкл.

Значения соотношения A_{260}/A_{280} для большинства анализируемых образцов находились в пределах 1,8–2,2 (рисунок 2 б), что характерно для НК, чистых от белков и фенолов, за исключением некоторых образцов, полученных из корней и гипокотилей (менее 1,8). При этом для ДНК оптимальным считаются значения приблизительно равные 1,8, а значения более 2,0 могут указывать на возможную деградацию ДНК (Балановский и др., 2019; Tiwari et. al., 2017).

Для соотношения A_{260}/A_{230} значения, при которых препарат считается чистым, должны находиться в пределах 1,8–2,2 (Балановский и др., 2019; Tiwari et. al., 2017). Однако у всех анализируемых образцов значения по данному показателю были ниже 1,8 (рисунок 2 в), это указывает на загрязнение органическими соединениями, оставшимися после процедуры выделения. При этом наибольшие значения для соотношения A_{260}/A_{230} были получены в образцах, выделенных из частей зародышей (от 1,47 до 1,72), а самыми загрязненными оказались образцы НК, полученные из корней (0,31–0,72) и гипокотилей (0,41–0,61).

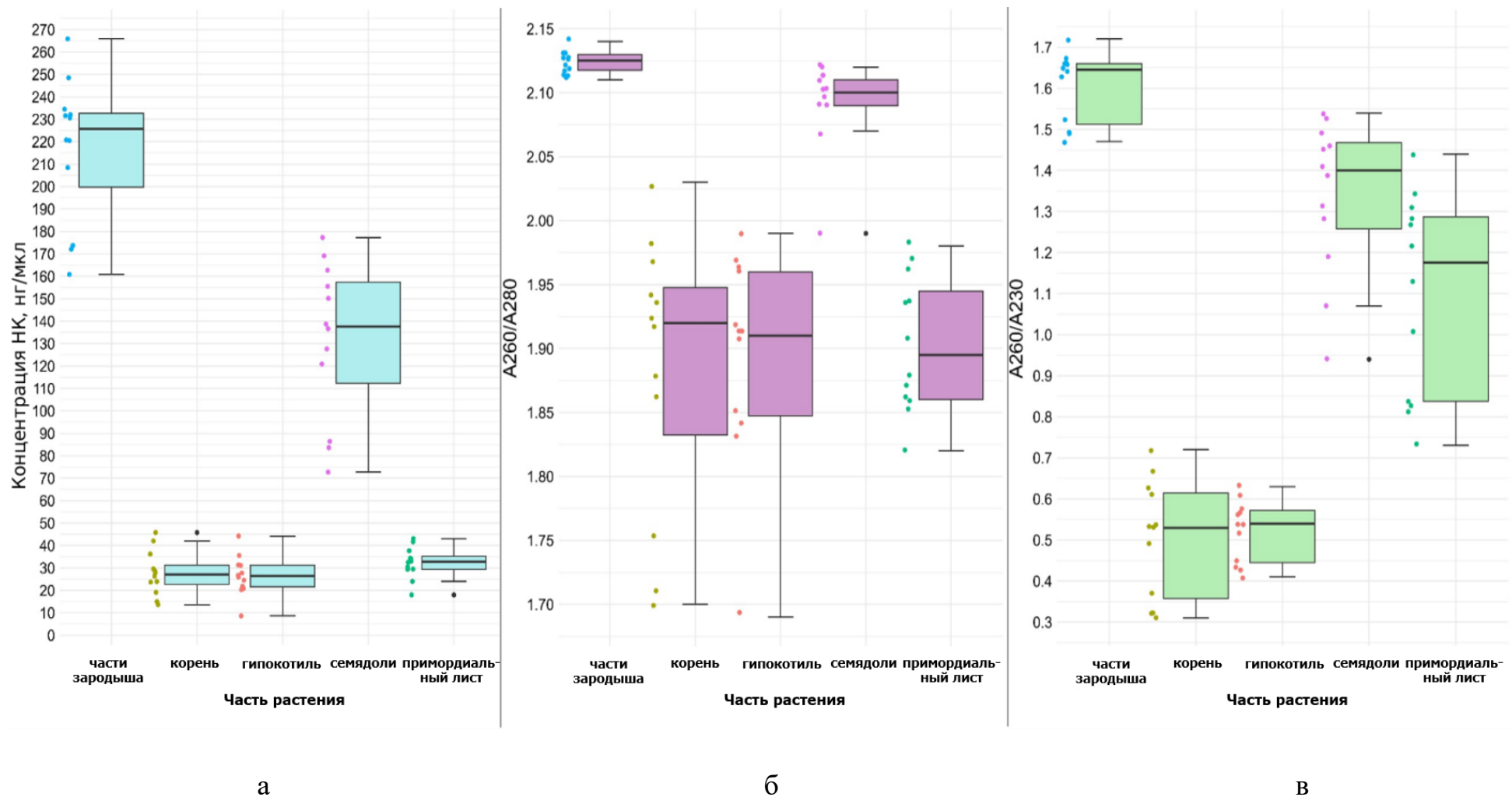


Рисунок 2 – Результаты спектрофотометрических измерений: а – концентрации НК, б – соотношение оптических плотностей A_{260}/A_{280} ; в – соотношение оптических плотностей A_{260}/A_{230}

Таблица 3 – Множественные парные сравнения для значений, полученных в результате измерений спектрофотометрическим методом

Часть растения	Концентрация		A260/A280		A260/A230	
	p.adj	p.adj.signif	p.adj	p.adj.signif	p.adj	p.adj.signif
гипокотиль–корень	$0,92 \times 10^{-1}$	ns	$0,10 \times 10^1$	ns	$0,89 \times 10^{-1}$	ns
гипокотиль–примордиальный лист	$0,88 \times 10^{-1}$	ns	$0,10 \times 10^1$	ns	$0,21 \times 10^{-2}$	*
гипокотиль–части зародыша	$0,76 \times 10^{-7}$	****	$0,78 \times 10^{-6}$	****	$0,10 \times 10^{-7}$	****
гипокотиль–семядоли	$0,97 \times 10^{-4}$	***	$0,27 \times 10^{-3}$	**	$0,63 \times 10^{-4}$	***
корень– примордиальный лист	$0,88 \times 10^{-1}$	ns	$0,10 \times 10^1$	ns	$0,20 \times 10^{-2}$	*
корень–части зародыша	$0,12 \times 10^{-6}$	****	$0,10 \times 10^{-5}$	****	$0,50 \times 10^{-8}$	****
корень–семядоли	$0,13 \times 10^{-3}$	**	$0,28 \times 10^{-3}$	**	$0,40 \times 10^{-4}$	***
примордиальный лист–части зародыша	$0,12 \times 10^{-4}$	***	$0,86 \times 10^{-6}$	****	$0,20 \times 10^{-2}$	*
примордиальный лист–семядоли	$0,29 \times 10^{-2}$	*	$0,27 \times 10^{-3}$	**	$0,52 \times 10^{-1}$	ns
части зародыша–семядоли	$0,47 \times 10^{-1}$	ns	$0,66 \times 10^{-1}$	ns	$0,22 \times 10^{-1}$	ns

Примечание: p.adj – уровень значимости с поправкой на множественные сравнения; p.adj.signif – уровень значимости: ns – не значимо, * – значимо при $p < 0.01$, ** – значимо при $p < 0,001$, *** – значимо при $p < 0,0001$, **** – значимо при $p < 0,00001$

Содержащиеся в выделенных образцах примеси могут влиять на точность спектрофотометрических измерений. Максимум поглощения света при длине волны 260 нм характерен для ДНК, РНК, а также некоторых других соединений, которые могут накладываться друг на друга при измерении и, соответственно, завышать значения концентрации ДНК. Более точным является определение концентрации флуориметрическим методом. В зависимости от набора реагентов флуоресцентные красители селективно связываются с двухцепочечной ДНК (дцДНК), одноцепочечной (оцДНК) или РНК, а находящиеся в растворе примеси не оказывают влияния на измерения. В данном опыте определяли концентрацию двухцепочечной ДНК для образцов, отобранных из каждой группы (части растений) с наибольшей и наименьшей концентрацией по данным спектрофотометрических измерений. Полученные результаты в сравнении со спектрофотометрическими измерениями представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Сравнение концентрации НК, полученных при измерении разными методами

№	Часть растения	Концентрация, нг/мкл	
		НК (по результатам спектрофотометрических измерений)	дцДНК (по результатам флуориметрических измерений)
1	семядоли	177,30	2,93
2		72,74	0,96
3	части зародыша	265,83	4,44
4		160,84	3,26
5	гипокотиль	44,21	0,98
6		8,62	0,24
7	корень	45,80	1,28
8		13,61	0,41
9	примордиальный лист	43,11	4,28
10		17,98	3,19

Количество двухцепочечной ДНК по сравнению с НК во всех анализируемых образцах оказалось экстремально низким – от 0,24 нг/мкл в образце, полученном из гипокотилия, до 4,44 нг/мкл – из зародышей. Можно предположить, что анализируемые образцы в большом количестве содержат фрагментированную

ДНК, деградированную до одноцепочечных фрагментов, или РНК. Несмотря на низкие концентрации по результатам спектрофотометрии, в образцах, выделенных из примордиальных листьев, значения концентрации дцДНК находятся примерно на том же уровне, что у образцов из частей зародыша (таблица 4). Тогда как для образцов, полученных из гипокотилей и корней, количество дцДНК остается низким.

Предположение о наличии деградированной ДНК подтвердилось в результате разделения анализируемых образцов в 1%-ном агарозном геле (рисунок 3).

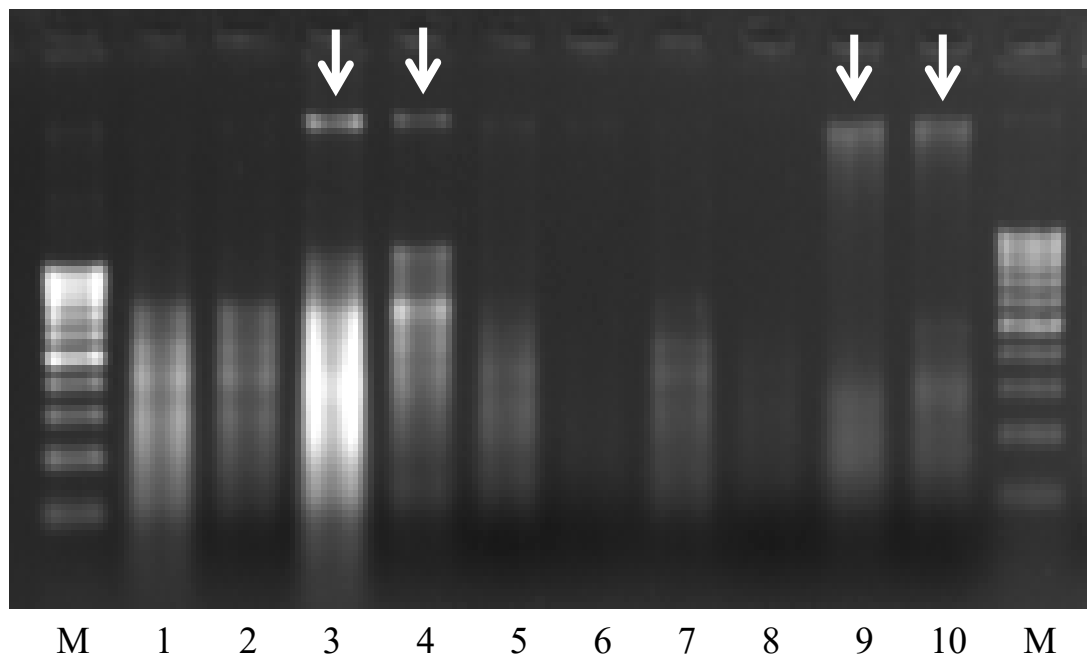


Рисунок 3 – Электрофореграмма разделения ДНК в 1%-ном агарозном геле: 1, 2 – образцы, выделенные из семядолей; 3, 4 – зародышей; 5, 6 – гипокотилей; 7, 8 – корней; 9, 10 – примордиальных листьев; М – маркер молекулярного веса; стрелками указаны высокомолекулярные фрагменты ДНК

На полученной электрофореграмме во всех образцах, кроме 6 и 8, где свечение практически отсутствует, наблюдалось наличие шмеров (от англ. smear) – множества отличающихся размером фрагментов ДНК в виде размытых полос, что свидетельствует о деградации ДНК. Несмотря на наличие шмеров, образцы, выделенные из частей зародышей (образцы 3, 4) и примордиальных листьев (образцы 9, 10) содержат высокомолекулярную ДНК (рисунок 3).

Решающим фактором при выборе способа выделения ДНК, в данном случае – растительного материала для экстракции, остается пригодность выделенных растворов ДНК для ПЦР-анализа. Качество ДНК может повлиять на результат амплификации – наличие органических примесей, оставшихся после выделения, может ингибировать ПЦР (Рябушкина и др., 2012). С образцами (из таблицы 4) были проведены ПЦР с SSR-маркером Satt168. В каждую реакционную смесь вносили приблизительно одинаковое количество ДНК: более концентрированные образцы перед внесением разбавляли деионизированной водой, а менее концентрированные добавляли в большем объеме. ПЦР-продукты разделяли методом капиллярного электрофореза (рисунок 4).

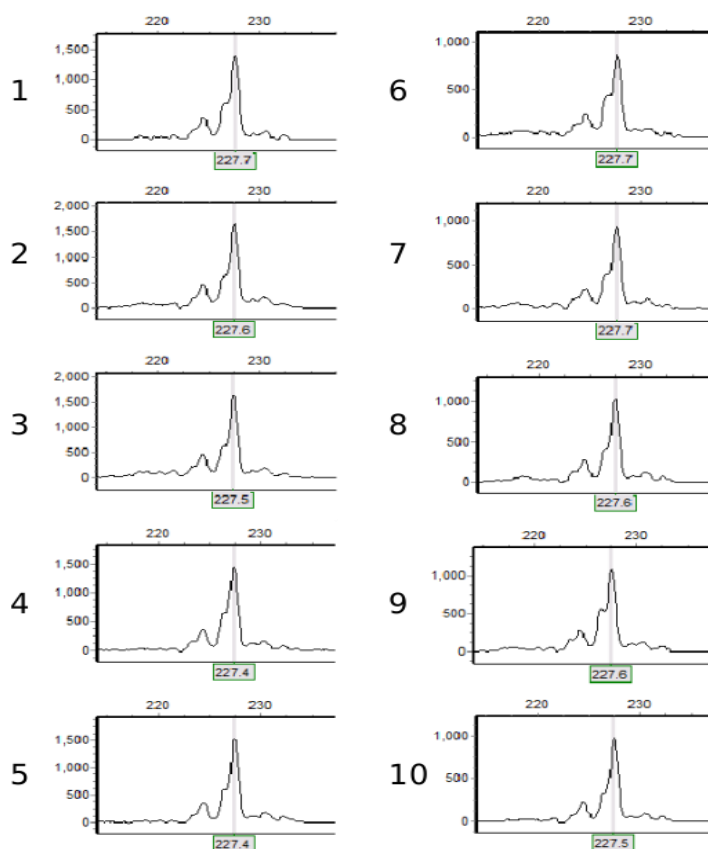


Рисунок 4 – Электрофореграммы разделения ПЦР-продуктов маркера Satt168 в Нанофор 05: 1, 2 – образцы ДНК, выделенные из семядолей; 3, 4 – зародышей; 5, 6 – гипокотилей; 7, 8 – корней; 9, 10 – примордиальных листьев

Несмотря на то, что большинство образцов содержали деградированную ДНК, а также примеси органических соединений (вывод сделан на основании пониженного соотношения A_{260}/A_{230}), это не оказало негативного влияния на амплификацию – для всех анализируемых образцов получены хорошо

визуализируемые фрагменты ДНК одинакового размера (рисунок 4). Для молекулярно-генетической идентификации на основе микросателлитного анализа планируется использовать маркеры, по которым амплифицируются фрагменты размером не более 600 п.н., чтобы обеспечить высокую точность определения их размеров посредством сравнения с размерным стандартом при проведении фрагментного анализа. Это дает возможность использовать в качестве матрицы в ПЦР даже сильно фрагментированную ДНК (Рамазанова и др., 2023б).

Таким образом, ДНК, выделенная из любой части растения сои, пригодна для использования в ПЦР. В целях сокращения времени проведения анализа и повышения качества выделяемой ДНК, наиболее предпочтительным материалом для экстракции являлись части зародыша семени. Это ускоряет этап выделения, поскольку в таком случае исключается проращивание, также данный способ дает наиболее концентрированный препарат ДНК, с удовлетворительным для проведения ПЦР качеством.

3.2 Сравнительная оценка способов разделения и детекции фрагментов ДНК SSR-маркеров

Точность идентификации, основанной на анализе полиморфизма ДНК, зависит не только от качества ДНК и применяемой системы ДНК-маркеров, но и от способа детекции амплифицированных продуктов. А именно от разрешающей способности метода разделения ПЦР-продуктов, точности определения размеров выявляемых фрагментов ДНК и воспроизводимости этих результатов. Немаловажным также является скорость проведения анализа. Из литературного обзора известно, что капиллярный электрофорез имеет большее преимущество по сравнению с другими методами, однако многими исследователями для идентификации по SSR-маркерам используются методы разделения в агарозных и полиакриламидных гелях. Поэтому в данном разделе было проведено сравнение эффективности различных методов разделения и детекции ПЦР-продуктов с целью выявления среди них наиболее подходящего для использования в дальнейшем при паспортизации и идентификации сортов сои.

Для этого были проведены ПЦР с пятью SSR-маркерами (моноплексные ПЦР), одни и те же ПЦР-продукты которых затем были разделены методами электрофореза в агарозном геле, ПААГ в нативном состоянии, ПААГ в денатурирующих условиях и методом капиллярного электрофореза в полимере ПДМА-6 в Нанофор 05 в денатурирующих условиях. В качестве примера на рисунке 5 представлены электрофореграммы разделения четырех фрагментов ДНК SSR-маркера *Soyrpr1*. Для наглядности электрофореграмма капиллярного электрофореза перевернута в соответствии с расположением фрагментов ДНК на остальных электрофореграммах.

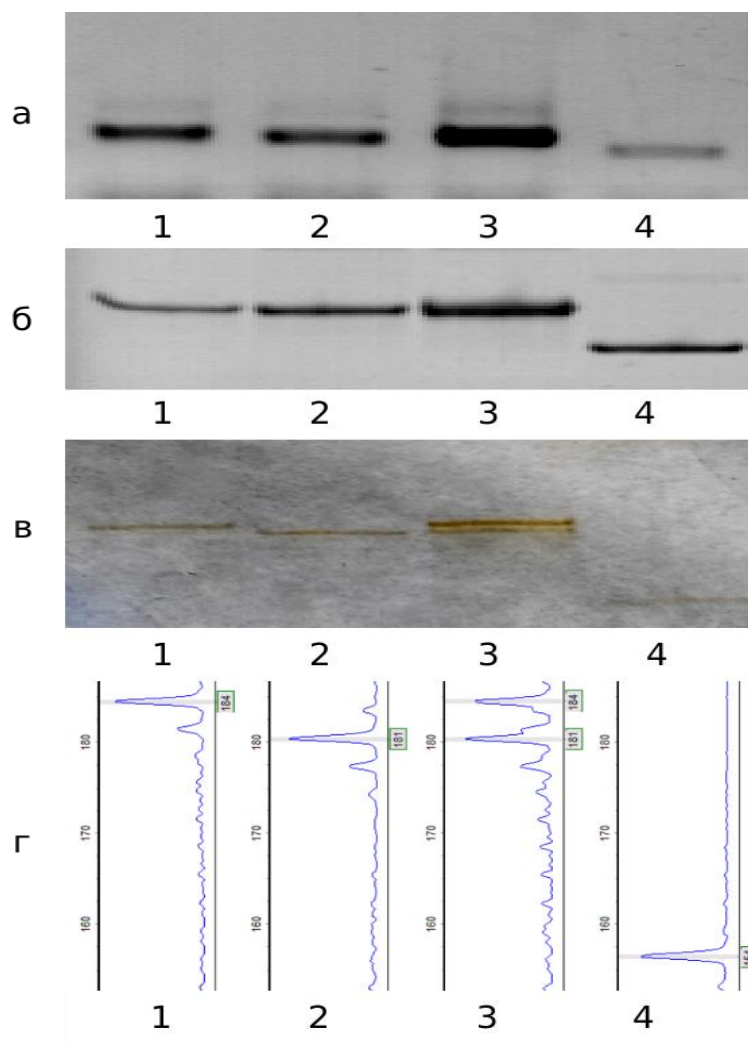


Рисунок 5 – Электрофореграммы разделения ПЦР-продуктов SSR-маркера *Soyrpr1*: а – в агарозном геле; б – нативном ПААГ; в – денатурирующем ПААГ; г – ПДМА-6 (капиллярный электрофорез); 1–4 – фрагменты ДНК

После разделения ПЦР-продуктов в агарозном геле и ПААГ в нативных условиях более отчетливо от других выделяется только фрагмент 4 (рисунок 5 а, б).

Различия между другими тремя фрагментами определить достаточно сложно. Они могут представлять собой как фрагменты, отличающиеся небольшим количеством пар нуклеотидов, так и иметь одинаковый размер, но из-за различных факторов (разная концентрация и качество ДНК, искривление электрофоретического фронта и т.д.) несколько смещаться в геле относительно друг друга, а также отличаться интенсивностью и шириной визуализируемых полос. При такой визуализации точность определения размеров фрагментов ДНК сильно снижена, также ошибочно могут быть определены гомо- или гетерозиготные аллельные состояния анализируемых образцов.

На электрофореграмме денатурирующего ПААГ отчетливо видны различия между всеми фрагментами (рисунок 5 в), а в результате разделения этих же фрагментов капиллярным электрофорезом установлено, что эти различия обусловлены разницей в их размерах. Так фрагменты 1 и 2 отличаются друг от друга на 3 п.н., а фрагменты 1 и 4 – на 30 п.н. (рисунок 5 г). При разделении ПЦР-продуктов этими двумя методами обнаружено, что фрагмент 3 представляет собой два фрагмента разного размера (гетерозигота), которые четко визуализируются в виде двух полос при разделении в денатурирующем ПААГ и двух пиков – в Нанофор 05 (рисунок 5 в, г). Разрешающей способности агарозного и полиакриламидного нативного гелей для их дифференциации оказалось недостаточно. Аналогично вышеописанному были проанализированы электрофореграммы остальных SSR-маркеров. Для сравнения в таблице 5 представлено количество отличающихся фрагментов ДНК пяти используемых в данном опыте SSR-маркеров, выявленных в результате разделения разными методами электрофореза.

Таблица 5 – Выявление фрагментов ДНК при разделении разными методами электрофореза

SSR-маркер	Количество фрагментов ДНК				Размер выявленных фрагментов, п.н.
	в агарозном геле	в нативном ПААГ	в денатурирующем ПААГ	в ПДМА-6	
Soyprp1	2	2	3	3	154, 181, 184
Satt532	1	2	3	4	162, 165, 168, 174
Satt681	3	3	5	5	234, 237, 240, 243, 246
Satt149	3	3	4	4	253, 262, 277, 280
Soyhsp176	2	2	2	3	101, 103, 113

Согласно полученным данным наиболее эффективным для дифференциации фрагментов ДНК был капиллярный электрофорез (ПДМА-6). Только с помощью данного метода была установлена разница между фрагментами SSR-маркера Soyhsp176, отличающимися на 2 п.н. (фрагменты 101 и 103). При разделении ПЦР-продуктов в денатурирующем ПААГ наблюдались различия между фрагментами с разницей в размере на 3 и более п.н., в ПААГ в нативных условиях и в агарозном геле – на 6 и более п.н. При этом фрагменты SSR-маркера Satt532 при разделении в агарозном геле в условиях проведенного опыта не дифференцировались вовсе. Таким образом, разрешающая способность метода разделения и детекции фрагментов ДНК снижается в ряду капиллярный электрофорез – электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях – в ПААГ в нативных условиях – в агарозном геле, что в целом согласуется с данными, описанными в литературных источниках.

Согласно данным, опубликованным в работе (Бондаренко и др., 2025), авторам удалось дифференцировать фрагменты ДНК с разницей в 3 п.н. Это можно объяснить тем, что в приведенной работе продолжительность электрофореза составляла 2 часа, тогда как в настоящем опыте – 40 минут, при одинаковой концентрации агарозного геля (2 %). Это свидетельствует о высокой зависимости

разрешающей способности агарозного гель-электрофореза от конкретных параметров проведения эксперимента. При этом значительное увеличение продолжительности электрофореза нецелесообразно, особенно при большом количестве анализируемых маркеров, поскольку это приведет к снижению пропускной способности анализа.

Несмотря на возможность разделения близких по размеру фрагментов ДНК с использованием и других методов электрофореза, точность определения их размеров подвержена влиянию различных факторов, что снижает воспроизводимость результатов генотипирования и требует использования большего количества контрольных образцов по сравнению с капиллярным электрофорезом. Это ограничивает широкое применение данных методов при массовом генотипировании, которые предполагаются при паспортизации и идентификации сортов. На одних и тех же ПЦР-продуктах показано, что выбор метода электрофоретического разделения влияет на интерпретацию ДНК-фрагментов и, следовательно, на точность идентификации генотипов. В связи с этим для молекулярно-генетической идентификации сортов сои был выбран метод капиллярного электрофореза как наиболее точный для определения размеров фрагментов, воспроизводимый и высокопроизводительный этап технологии (Савиченко, Рамазанова, 2023).

Что касается остальных методов разделения и визуализации ПЦР-продуктов, они могут быть использованы на предварительных этапах исследования, в частности, для первичной проверки маркеров при отборе с целью исключения неспецифичных или тех, по которым фрагменты не амплифицируются, а также при подборе условий амплификации с ними.

ГЛАВА 4 ПОДБОР ИНФОРМАТИВНЫХ SSR-МАРКЕРОВ ДЛЯ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОТИПОВ СОИ

4.1 Поиск SSR-локусов сои и *in silico* проверка специфичности праймеров

С целью разработки технологии молекулярно-генетической идентификации генотипов сои был осуществлен поиск и подбор SSR-маркеров для их дальнейшего изучения. Поиск микросателлитных локусов проведен с учетом их расположения в геноме сои, чтобы в конечном итоге разработанная система микросателлитных маркеров охватывала, по возможности, большую часть генома сои, а сцепленное наследование маркеров исключалось.

В первую очередь, в исследование была включена часть микросателлитных маркеров (Satt141, Satt681, Satt181, Soyprp1 и Soyhsp176), апробированных ранее в ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК для паспортизации сортов сои (Рамазанова, Коломыцева, 2020). В дополнение к ним из базы данных SoyBase с каждой из 20 хромосом генома сои были отобраны локусы, содержащие три- и тетрануклеотидные микросателлитные повторы. Также в исследование включено несколько динуклеотидных микросателлитных локусов из публикации С. И. Абугалиевой и соавторов (2013), показавших высокий уровень полиморфизма: Sat413, Sat374, Sat420 и Sct189. Всего на первом этапе было отобрано 138 микросателлитных локусов.

Далее представленные в SoyBase нуклеотидные последовательности праймеров фланкирующих отобранные локусы, были проверены *in silico* с помощью Primer-BLAST на эталонной сборке генома сои Glycine_max_v4.0 (сорт Williams 82). Для дальнейшего исследования отбирали пары праймеров, обеспечивающие специфичное связывание с ДНК-матрицей, с температурой плавления от 50 до 65 °C, с ожидаемыми амплифицируемыми фрагментами ДНК размерами в диапазоне от 100 до 600 п.н. Маркеры, не отвечающие вышеперечисленным параметрам, из дальнейшей работы исключались. В результате после *in silico* проверки было отобрано 47 SSR-маркеров, характеристика которых представлена в приложение Б.

4.2 Оптимизация температуры отжига праймеров

К отобранным *in silico* SSR-маркерам были синтезированы последовательности фланкирующих праймеров в ООО «НПФ Синтол». Для дальнейшей работы с ними необходимо было подобрать оптимальную температуру отжига (T_a), поскольку от нее зависит специфичность и эффективность прохождения ПЦР. По мнению разных авторов температура отжига может быть ниже температуры плавления (T_m) на 2–10 °С. Существует множество формул и алгоритмов для расчета T_m и T_a , однако в конечном итоге оптимальная температура отжига устанавливается экспериментально для конкретных условий амплификации, поскольку помимо длины, нуклеотидного состава и конкретной последовательности нуклеотидов в праймере на этот показатель также влияет состав и концентрация компонентов реакционной смеси (Гарафутдинов и др., 2019).

Для установления оптимальной температуры отжига с каждым SSR-маркером проводили ПЦР, изменяя в протоколе амплификации значение T_a на 2–4 °С (при меньшей разнице в температуре видимых отличий не было). Далее ПЦР-продукты были разделены в агарозном геле. Оптимальную температуру отжига определяли по полученным электрофореграммам. На рисунке 6 представлены электрофореграммы разделения ПЦР-продуктов трех SSR-маркеров: Satt149, Sat413 и Satt635.

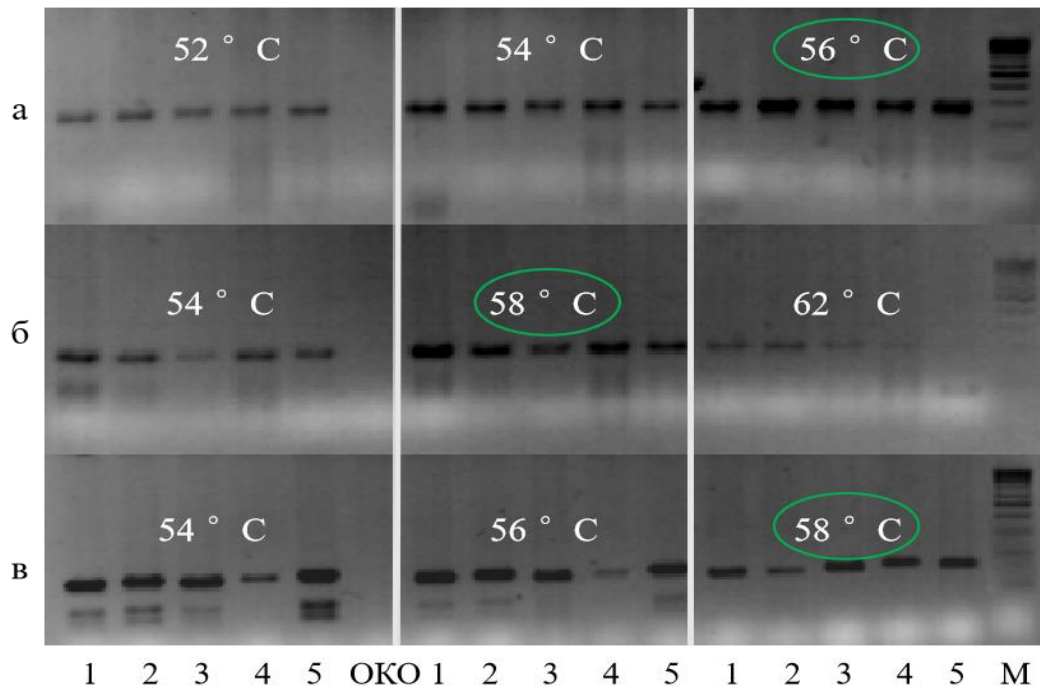


Рисунок 6 – Электрофореграммы разделения ПЦР-продуктов, полученных при разной температуре отжига: а – Satt149; б – Sat413; в – Satt635; 1–5 – образцы ДНК сои, ОКО – отрицательный контрольный образец, М – маркер молекулярного веса 100–1000 п.н.

Оптимальной температурой отжига считалась та, при которой были получены наиболее четко визуализируемые фрагменты ДНК в характерном для каждого конкретного маркера диапазоне размеров, и отсутствовали неспецифичные. Так, для маркера Satt149 оптимальной была выбрана температура 56 °С. При меньших значениях наблюдалось уменьшение интенсивности флуоресценции фрагментов ДНК (рисунок 6 а), что может говорить о снижении эффективности амплификации. По маркеру Sat413 лучший результат амплификации был получен при 58 °С, при повышении или снижении T_a интенсивность флуоресценции снижалась (рисунок 6 б) (Рамазанова и др., 2021). Для маркера Satt635 снижение температуры отжига приводило к образованию неспецифичных продуктов амплификации, при 58 °С такие продукты отсутствовали (рисунок 6 в).

Аналогичным образом была проведена оптимизация температуры отжига для остальных SSR-маркеров, за исключением Satt596, который был включен в исследование позднее. Экспериментально подобранные (оптимальные) значения

температур отжига в сравнении с расчетными представлены на рисунке 7. В качестве расчетных приведены меньшие из пары праймеров значения T_m (приложение Б).

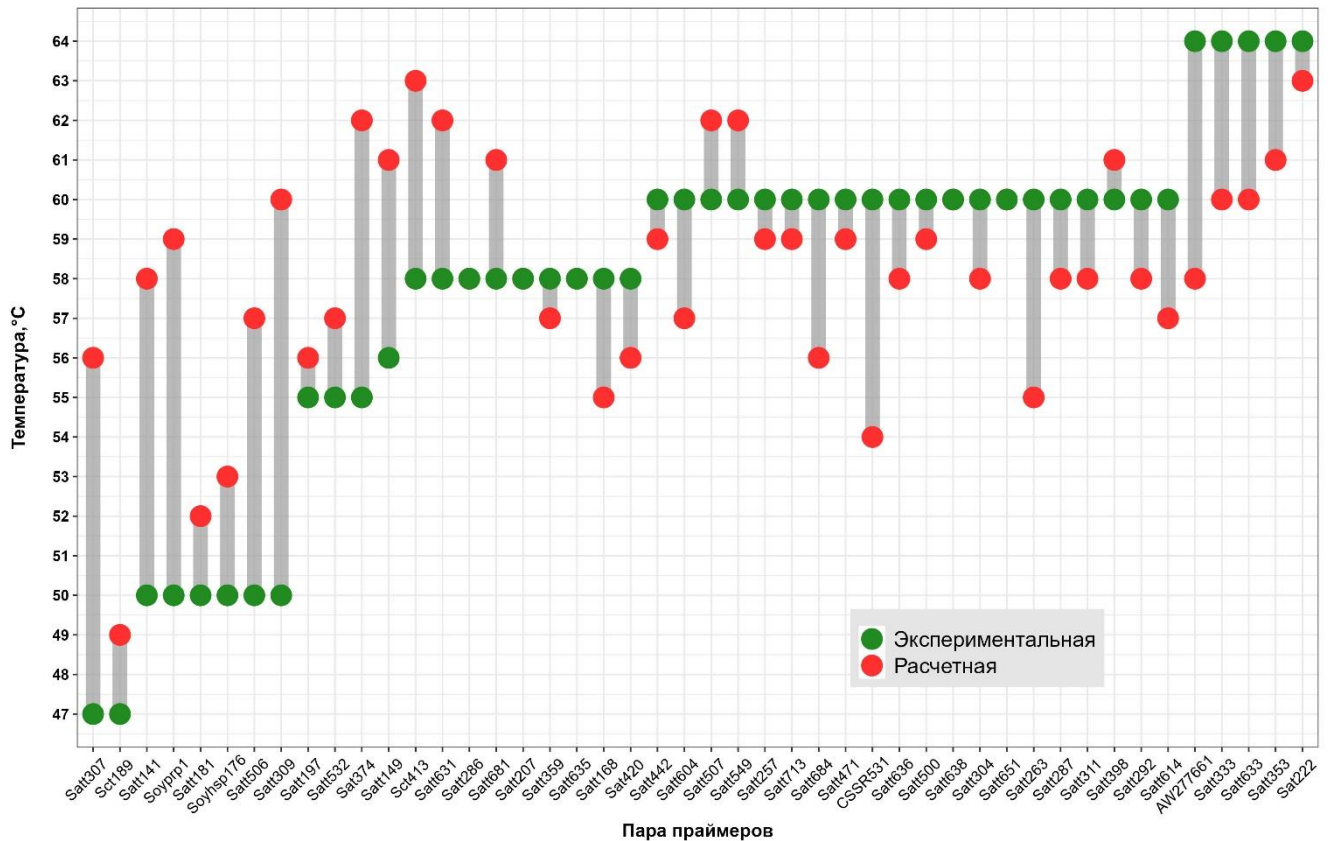


Рисунок 7 – Сравнение значений расчетной и экспериментальной температур отжига изучаемых SSR-маркеров

Значения экспериментальных температур отжига варьировали от 47 до 64 °C и отличались от расчетных как в меньшую, так и в большую сторону для большинства SSR-маркеров (рисунок 7). Исключение составили Satt286, Satt207, Satt635, Satt638 и Satt651, где экспериментальная и расчетная температура имели идентичные значения.

Для объединения нескольких маркеров в одной мультиплексной (мультипраймерной) ПЦР помимо прочего необходимо учитывать, что праймеры должны гибридизоваться при одинаковой (или максимально близкой) температуре. Анализируемые SSR-маркеры можно разделить на группы с температурой отжига: 47, 50, 55–56, 58, 60 и 64 °C. Праймеры из разных температурных групп не могут входить в состав одной мультиплексной реакции, поскольку проведение ПЦР при

более высокой температуре снизит или вовсе исключит амплификацию фрагментов маркеров с низкой T_a , и, наоборот, использование низких температур приведет к появлению неспецифичных продуктов маркеров с высокой T_a (Савиченко и др., 2024б).

4.3 Оценка информативности и специфичности SSR-маркеров

Под информативностью ДНК-маркеров подразумевается их способность выявлять полиморфизм нуклеотидных последовательностей ДНК, на чем и основана ДНК-идентификация. Целью данного раздела являлась предварительная оценка информативности отобранных маркеров на небольших выборках различных генотипов сои, а также определение специфичности амплификации с ними. SSR-маркеры были изучены в разные годы исследования, поэтому их анализировали на разных сортах сои (приложение А, группа сортов 3 и 4). Кроме того, несмотря на то, что наибольшей разрешающей способностью обладает капиллярный электрофорез (раздел 3.2), предварительную оценку SSR-маркеров проводили по результатам разделения ПЦР-продуктов в ПААГ в денатурирующих условиях, поскольку в начале исследования в лаборатории отсутствовала техническая возможность для проведения капиллярного электрофореза.

На полученных в результате такого разделения электрофореграммах было установлено наличие или отсутствие специфичных и неспецифичных продуктов амплификации. Часть SSR-маркеров была исключена из дальнейшего исследования из-за выявления неспецифичных продуктов (Satt631), нестабильной амплификации (Sat374, Satt311 и Satt398) или выявления нулевых аллелей (Satt257 и Satt713). Для остальных маркеров среди всех выявленных фрагментов ДНК определяли количество отличающихся размером аллельных вариантов. Например, по SSR-маркеру Satt168 выявлено 5 отличающихся фрагментов – аллелей (рисунок 8).

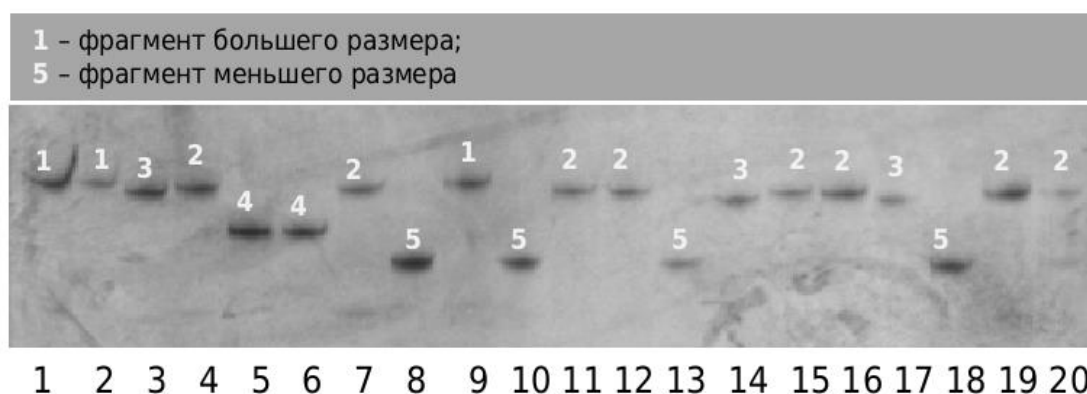


Рисунок 8 – Электрофореграмма разделения ПЦР-продуктов маркера Satt168 в денатурирующем ПААГ. 1–20 – образцы ДНК сортов сои (группа сортов 3, приложение А)

На основании полученных данных о выявленных аллелях для каждого маркера были рассчитаны основные показатели информативности: количество эффективных аллелей, характеризующее их распространенность в анализируемой выборке, и индекс полиморфного информационного содержания, по которому оценивают способность ДНК-маркера различать генотипы. Результаты расчетов представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Основные показатели информативности SSR-маркеров

№	SSR-маркер	Группа сортов	N _a	N _e	PIC
1	2	3	4	5	6
1	Satt532	3	3	2,27	0,56
2	Sat413	3	3	2,13	0,53
3	Satt307	3	3	2,27	0,56
4	Satt286	3	4	2,13	0,53
5	Satt149	3	3	1,89	0,47
6	Satt309	3	3	1,72	0,42
7	Sat420	3	3	1,69	0,41
8	Sct189	3	4	3,23	0,69
9	Satt141	3	6	2,75	0,64
10	Satt681	3	6	4,76	0,79
11	Soyprp1	3	3	2,55	0,61
12	Soyhsp176	3	2	1,22	0,18
13	Satt181	3	3	2,80	0,64
14	Satt168	3	5	4,00	0,71
15	Satt549	4	3	2,38	0,49

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4	5	6
16	AW277661	4	4	2,63	0,54
17	Satt684	4	4	2,78	0,58
18	Satt471	4	2	1,72	0,33
19	CSSR531	4	4	2,40	0,56
20	Satt636	4	4	2,45	0,50
21	Satt207	4	4	2,86	0,56
22	Satt333	4	4	2,17	0,49
23	Satt500	4	3	2,33	0,48
24	Satt633	4	2	2,00	0,38
25	Satt638	4	2	1,35	0,22
26	Satt359	4	3	2,17	0,47
27	Satt635	4	4	3,23	0,63
28	Satt353	4	3	2,22	0,44
29	Satt304	4	2	1,47	0,27
30	Satt651	4	4	2,90	0,66
31	Satt263	4	3	2,78	0,56
32	Satt287	4	4	2,50	0,55
33	Satt222	4	3	2,50	0,53
34	Satt292	4	4	4,00	0,70
35	Satt614	4	5	4,17	0,72
36	Satt507	4	4	3,17	0,69
37	Satt604	4	1	1,00	0,00
38	Satt506	4	1	1,00	0,00
39	Satt197	4	4	2,13	0,53
40	Satt442	4	4	2,61	0,62
41	Satt596	4	7	5,63	0,82
Среднее			3,49	2,54	0,51

Примечание: группа сортов 3, 4 (приложение А); N_a – количество выявленных аллелей; N_e – количество эффективных аллелей; PIC – индекс полиморфного информационного содержания

По анализируемым SSR-маркерам было выявлено от 1 (Satt604, Satt506) до 7 (Satt596) аллелей, со средним значением 3,49. При этом количество эффективных аллелей варьировало от 1,00 до 5,63 в этих же маркерах и в среднем составило 2,54. Индекс полиморфного информационного содержания – от 0 до 0,82, в среднем – 0,51. Большинство анализируемых маркеров характеризуются как высокоинформативные ($PIC > 0,5$) и информативные ($0,25 < PIC < 0,5$) (Botstein, 1980) – 25 и 13 SSR-маркеров соответственно. Дискриминационная сила маркера

возрастает с количеством выявляемых им аллельных вариантов, поскольку это увеличивает вероятность нахождения различий между генотипами (Савиченко и др., 2024б). SSR-маркеры, по которым было выявлено до двух аллелей (Satt604, Satt506, Soyhsp176, Satt638, Satt304, Satt471, Satt633) были исключены из работы.

Для остальных SSR-маркеров были синтезированы флуоресцентно-меченные праймеры, и проведен фрагментный анализ методом капиллярного электрофореза образцов ДНК (группа сортов 4, приложение Б). По результатам фрагментного анализа были уточнены размеры фрагментов ДНК и аллельный состав маркеров. Количество выявленных фрагментов для большинства маркеров соответствовало полученным при разделении в ПААГ. Однако для части SSR-маркеров, по результатам капиллярного электрофореза выявлено меньшее количество аллельных вариантов, чем при анализе в ПААГ, поэтому они были исключены.

У всех SSR-маркеров отмечено наличие характерных для микросателлитов статтеров (от англ. *stutter*) – артефактных продуктов, возникающих из-за «проскальзывания» ДНК-полимеразы во время амплификации и отличающихся по размеру от целевых фрагментов на величину, кратную единице повтора (Hosseinzadeh-Colagar et al., 2016; DNA Fragment ..., <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4474504.pdf>). Для динуклеотидных локусов наблюдалось образование большего количества статтеров с более высокой интенсивностью сигнала по сравнению с тринуклеотидными. Это усложняет интерпретацию результатов анализа, особенно в гетерозиготных образцах с двумя близкими по размеру аллелями (рисунок 9).

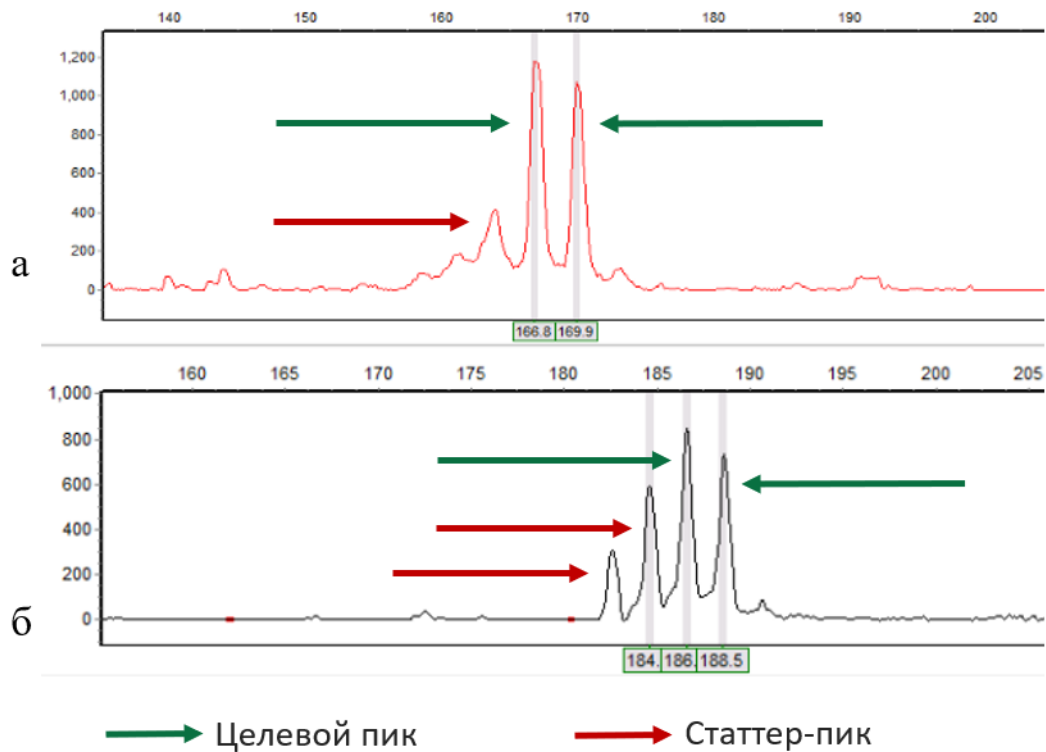


Рисунок 9 – Электрофореграммы разделения ПЦР-продуктов в Нанофор 05: а – тринуклеотидный микросателлит Satt532; б – динуклеотидный Sct189

Так, для гетерозиготного образца по тринуклеотидному SSR-маркеру Satt532 аллели однозначно определяются как 166 и 169 п.н. (рисунок 9 а). Более высокая интенсивность сигнала фрагмента 166 п.н. обусловлена наложением на него статтер-пика фрагмента 169 п.н. В случае динуклеотидного маркера Sct189 (рисунок 9 б) истинными аллельными вариантами являются фрагменты размером 186 и 188 п.н., однако высокий сигнал статтер-пика (184 п.н.) может приводить к его ошибочной интерпретации как целевого. В связи с этим динуклеотидные микросателлитные маркеры Sct189, Sat413 и Sat420 были исключены из дальнейшего исследования как менее пригодные для надежной интерпретации результатов, особенно в условиях мультиплексных ПЦР.

ГЛАВА 5 РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНЫХ СИСТЕМ SSR-МАРКЕРОВ ДЛЯ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОТИПОВ СОИ

Использование для идентификации SSR-маркеров по-отдельности трудоемко и дорого, поскольку в этом случае генотипирование занимает довольно продолжительное время и предполагает высокий расход реагентов и других материалов, особенно при большом количестве анализируемых образцов. При проведении капиллярного электрофореза возможно одновременное детектирование ПЦР-продуктов нескольких маркеров, меченных отличающимися флуоресцентными красителями (флуорофорами), что снижает время и стоимость анализа. Но более эффективно использование мультиплексных ПЦР-систем, то есть проведение ПЦР сразу с несколькими парами праймеров в одной пробирке.

5.1 Разработка праймеров для формирования мультиплексных систем

Разработка мультиплексных систем SSR-маркеров требует решения проблем, связанных с разницей в температуре отжига праймеров (раздел 4.2), образованием неспецифичных продуктов амплификации за счет перекрестного взаимодействия праймеров, возможным образованием димеров, которые влияют на отжиг праймеров и, соответственно, выход ПЦР-продуктов, а также с выбором флуорофоров для последующей детекции ПЦР-продуктов с учетом размера амплифицируемых фрагментов таким образом, чтобы фрагменты разных маркеров не накладывались друг на друга.

Для решения указанных выше проблем к SSR-локусам были сконструированы новые последовательности праймеров. Из сгенерированных в Primer-BLAST пар праймеров выбирали только те, которые дают специфичный, наиболее подходящий по размеру ПЦР-продукт, а также не образующие димеры (по результатам проверки в Multiple Primer Analyzer). Новые последовательности праймеров для 19 SSR-локусов представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Характеристика новых праймеров, фланкирующих SSR-локусы сои

Название	Нуклеотидные последовательности праймеров	T _m , °C	Размер фрагмента, п.н.
Satt141 F	ACACGATCAGGACTCTTTCGT	59	331
Satt141 R	GCCGTCATAAAAAGTCCCTCAGA	61	
Satt549 F	CGCAACAATCACTAGTACGGG	59	314
Satt549 R	CCAGCAGGCCCAAGGTTTAT	60	
AW277661 F	CCCGAAAGAAAGACAGAAAACCC	60	275
AW277661 R	ATATGAAAGTAGGTGACCATGGAGC	60	
Satt681 F	GGACCCTCGTGGAACCTAC	60	333
Satt681 R	ATATTGCATGTAACCAAAGTCCCTCT	60	
Satt286 F	TGGCATGGTATCCTTGCTACATA	59	466
Satt286 R	TCATCTTGTTTGGAGGGAATAGC	59	
CSSR531 F	GTGTGAAATGGCTAACCCGC	60	120
CSSR531 R	GGCCATGCACCTGCTACTT	60	
Soyprp1 F	AGATCGAAGAGGTACGTGCCAA	62	387
Soyprp1 R	ATGGCTGCCAGCTGCATATT	61	
Satt197 F	AAATTGACAACCGAAGAATTACGTG	59	190
Satt197 R	GCCACCTAATCCAATGGGCA	60	
Satt359 F	TGATCATTGACTACTCGAATGTGAT	58	348
Satt359 R	TCTCAAATCCAAGCTGCCGT	60	
Satt353 F	ATACACGCATTGCCTTTCCTG	59	248
Satt353 R	GCTCAAAAGCCTATCTTAACCAAA	58	
Satt181 F	ACTAGCCAAGGGAGAGAGGAG	60	373
Satt181 R	CCCAACAAAAATTTGAACCCCGT	61	
Satt442 F	ACCTGGACTTGTTTGCTCATCA	60	207
Satt442 R	GCGTGTAATTATGCATTCGAGTGTT	61	
Satt149 F	GCTACAGTCACAGTACTTACCCTTT	60	422
Satt149 R	CGAGTTGGAGGCCATAGTCAC	61	
Satt263 F	TGCACCCAATCATGATAGCATTT	59	329
Satt263 R	TGGTCTTAAGAGACCGACCCA	60	
Satt287 F	GCCAATTCCATTGTGTGTCAG	58	390
Satt287 R	GGTTTGTTTCAGTGGTGGGAGA	60	
Satt596 F	CCGTCGATTCCGTACAAGATAG	59	255
Satt596 R	CCCTTCGTCCACCAAATATTCAA	59	
Satt309 F	TCGAGTCCTTCAAATTGGCGT	60	276
Satt309 R	GGCTAGATTCAAGAAACAAAAGGT	58	
Satt292 F	AAGGCTAACTTCTTTGGGTTGAGA	60	321
Satt292 R	GAAGGCCAACATTGAAAAGTCGT	60	
Satt614 F	ACCCAATCATAAGTTTCTCCCT	59	466
Satt614 R	TGAGCTCAACTGAGTCACGTC	60	

Для экспериментальной проверки праймеров новые последовательности были синтезированы с флуорофорами FAM, R6G, TAMRA или ROX на 5'-конце прямых (F) праймеров. Проверка проводилась по трем направлениям. Во-первых, необходимо было оценить способность праймерных пар к специфичному отжигу в идентичных условиях амплификации, то есть получению ПЦР-продуктов ожидаемого размера без образования неспецифичных. Во-вторых, требовалось установить фактические размеры амплифицируемых фрагментов ДНК для каждого SSR-маркера, чтобы использовать эти данные в дальнейшем в качестве контрольных при анализе результатов мультиплексных ПЦР. В-третьих, на основании полученных данных о размерах фрагментов определить их диапазоны, которые впоследствии учитывались при распределении SSR-маркеров в мультиплексные системы. С этой целью каждая пара праймеров тестировалась отдельно (в моноплексных ПЦР) в идентичных условиях при температуре отжига 60 °C. В данном опыте были проанализированы образцы ДНК индивидуальных растений сои, что позволило однозначно интерпретировать результаты амплификации, в частности ее специфичность. Это обусловлено тем, что для микросателлитного локуса диплоидного организма, которым является соя (*G. max*), у индивидуального растения ожидается не более двух аллелей: один будет выявлен у гомозиготного генотипа, два – у гетерозиготного (кодминантный тип наследования). При этом выявление большего количества фрагментов будет свидетельствовать об амплификации неспецифических или паралогичных последовательностей, что связано с палеополиплоидным происхождением генома сои (Schmutz et al., 2010).

Результаты амплификации с новыми праймерами показали их высокую специфичность – получены исключительно целевые фрагменты ДНК, значения размеров которых согласуются с размерами, рассчитанным в Primer-BLAST по эталонной сборке генома сои (таблица 7). Таким образом, разработка новых праймеров обеспечила специфичную амплификацию целевых фрагментов ДНК в идентичных условиях ПЦР, что создало возможность для последующего формирования мультиплексных систем на их основе.

На выборке из 15 анализируемых сортов (Приложение А, группа сортов 5) были установлены фактические размеры выявленных фрагментов ДНК (таблица 8). В данной таблице представлены все SSR-маркеры, вошедшие в мультиплексные системы в дальнейшем (для локусов Satt507, Satt532, Satt168 новые праймеры не создавали).

Таблица 8 – Размеры фрагментов ДНК, соответствующих SSR-маркерам

Сорт	SSR-маркеры (мультиплексной системы 1)										
	Satt507	Satt681	Satt149	Satt532	Satt141	Satt614	Satt442	Satt263	Satt309	Satt359	Satt286
	Размер фрагмента ДНК, п.н.										
Williams 82	211	333	422	168	331	472	207	329	276	348	466
Лира	211	333	407	165	319	433	192	338	261	348	466
Ходсон	208	333	398	165	322	421	192	329	261	354	466
СибНИИК-315	211	333	398	168	319	415	207	308	261	354	466
Оптима	208	333	398	165	319	481	192	308	261	354	466
Уника	211	333	407	162	277	415	207	311	261	372	466
Омская 4	214	333	398	168	322	481	195	314	261	375	460
Сибириада	214	333	398	168	322	433	192	314	261	375	460
Даурия	214	327/ 330	398	165	322	421	195	338	255	375	466
Лидия	214	327	425	165	322	421	192	314	261	372	460
Восточка	208	333	398	165	328	472	204	329	261	354	451
Зара	208	333	398	165	328	472	204	329	261	354	451
Кубань	208	345	422	174	322	454	189	311	261	348	460
Кубанская 4958	208/ 211	333	398	165	322	421/ 433	189	308/ 329	261	354	466
Пума	208	333	398	165	319	454	198	308	261	354	457
Диапазон размеров	208	327	398	162	277	415	189	308	255	348	451
	– 214	– 345	– 425	– 174	– 331	– 481	– 207	– 338	– 276	– 375	– 466

Продолжение таблицы 8

Сорт	SSR-маркеры (мультиплексной системы 2)										
	CSSR531	Satt596	Satt287	Satt197	AW277661	Satt181	Satt168	Satt549	Satt353	Satt292	Soyprp1
	Размер фрагмента ДНК, п.н.										
Williams 82	114	252	390	190	275	361/ 373	199/ 226	314	251	321	387
Лира	111	237	360	202	275	364	199	299	251	336	360
Ходсон	111	255	390	205	257	331	229	299	251	294	390
СибНИИК-315	117	246	360	205	275	364	229	290	251	336	390
Оптима	111	282	390	205	260	331	199	314	251	336	360
Уника	111	246	360	205	275	364	229	314	236	336	360
Омская 4	114	240	360	205	275	331	229	299	251	294	387
Сибириада	114	282	360	205	260	331	229	299	251	339	387
Даурия	114	249	360	205	275	355	229	299	236	321	390
Лидия	114	252	360	199	257	331	199	299	251	294	387
Восточка	114	240	390	205	260	331	211	314	236	264	387
Зара	111	240	390	205	260	331	211	314	236	294	387
Кубань	96	240	360	202	257	331	229	314	236	336	360
Кубанская 4958	111	255	390	205	260	331/ 364	229	314	251	336	360/ 387
Пума	117	246	390	190	275	331	226	299	254	336	390
Диапазон размеров	96–	237	360	190	257	331	199	290	236	264	360
	117	– 282	– 390	– 205	– 275	– 373	– 229	– 314	– 254	– 339	– 390

5.2 Формирование мультиплексных систем SSR-маркеров и оптимизация условий их применения

При объединении SSR-маркеров в составе одной мультиплексной системы важным условием являлось отсутствие перекрывания диапазонов длин фрагментов ДНК (таблица 8) для обеспечения однозначной интерпретации получаемых на электрофореграммах пиков. Формирование мультиплексных систем осуществлялось поэтапно, начиная с двух наборов по 5 SSR-маркеров (Satt309, Satt614, Satt149, Satt141, Satt359 в первом и Satt549, AW277661, Satt263, Satt353,

Satt168 во втором). После успешной амплификации при совместном использовании каждый мультиплексный набор был дополнен новыми SSR-маркерами. В случае отсутствия амплификации по какому-либо из маркеров его исключали из состава одного набора и включали в другой. Так, например, при дополнении второго мультиплексного набора не происходило амплификации по SSR-маркеру Satt263, и он был перенесен в первый. При выявлении по какому-либо из маркеров целевого фрагмента с низкой интенсивностью сигнала (относительно сигналов других маркеров), данный SSR-маркер не исключался, поскольку дальнейшая оптимизация условий амплификации могла бы повысить интенсивность сигнала. Таким образом, в конечном итоге было создано две мультиплексных системы для одновременной совместной амплификации фрагментов ДНК 11 SSR-маркеров (представлены в таблице 8).

В мультиплексных ПЦР со сформированными наборами SSR-маркеров амплифицировались фрагменты ДНК с размерами, соответствующими установленным в моноплексных ПЦР (таблица 8). Однако амплификация была не стабильной – при повторных постановках ПЦР наблюдались вариabельность интенсивности сигнала по некоторым SSR-маркерам, а также появление неспецифичных продуктов.

Для получения стабильных воспроизводимых результатов амплификации по разработанным мультиплексным системам была осуществлена оптимизация условий проведения мультиплексных ПЦР. Выбор оптимальных температурно-временных условий основывался на сравнительном анализе ПЦР-продуктов, полученных при использовании двух отличающихся протоколов амплификации. Первый протокол (протокол *А*), называемый в англоязычной литературе «touchdown», представлял собой 3-стадийную ПЦР со ступенчатым снижением температуры отжига в течение первых 10 циклов, и использовался нами при подборе SSR-маркеров в мультиплексные системы. Второй протокол (протокол *Б*) 2-шаговой ПЦР (от англ. two-step PCR), сочетающий на одной стадии отжиг и элонгацию, был позаимствован из инструкции по применению к набору реагентов

для идентификации личности Gene Profile Human (<https://www.syntol.ru/docs/instructions/HG/Gene%20Profile%20Human%20090924.pdf?v=2>), как обеспечивающий одновременную амплификацию фрагментов 28 SSR-маркеров, с модификациями температуры отжига, элонгации и продолжительности этапов. Подробные температурно-временные условия представлены в таблице 1 (протоколы *A*, *B*).

Сравнительный анализ полученных электрофореграмм показал, что в результате проведения мультиплексных ПЦР по двум протоколам получены ожидаемые фрагменты ДНК для каждого SSR-маркера мультиплексной системы 1. Однако по протоколу *A* по каналам детекции флуоресценции FAM (синий) и R6G (зеленый) наблюдалось появление неспецифичных продуктов, которые отсутствовали при использовании протокола *B*. По SSR-маркерам Satt263 и Satt614 отмечен слабый сигнал по двум протоколам (рисунок 10).

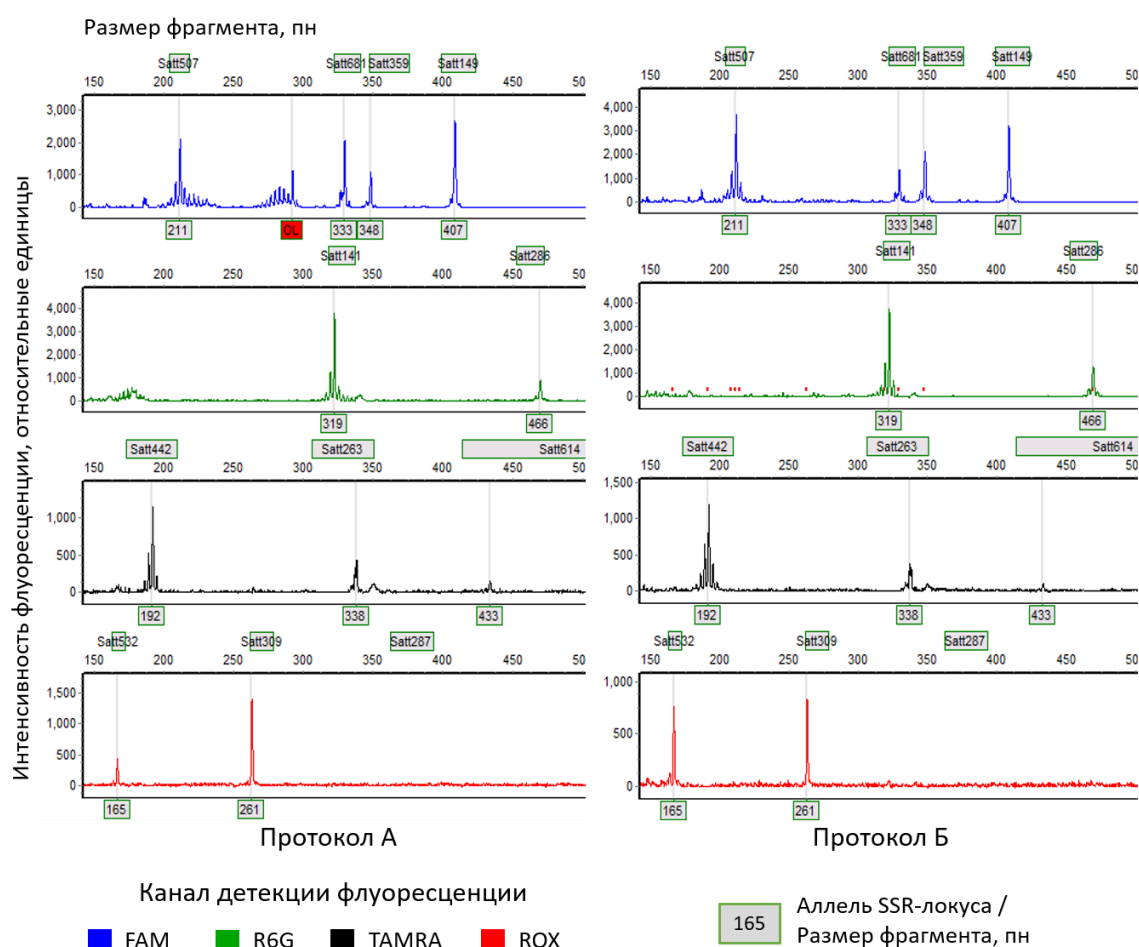


Рисунок 10 – Мультиплексная система 1 при разных протоколах амплификации, ДНК ПКО

Во второй мультиплексной системе при амплификации по протоколу А также отмечалось наличие неспецифичных продуктов по каналам детекции FAM и R6G. По SSR-маркерам Satt549, Satt181, Satt168, CSSR531, Satt197, Satt353, Satt292 и Satt287 интенсивность сигналов была слабой, а для части анализируемых образцов ДНК вообще отсутствовала, как показано на рисунке 11 (протокол А). Проведение мультиплексной ПЦР по протоколу Б обеспечило стабильную амплификацию только целевых фрагментов ДНК по всем SSR-маркерам.

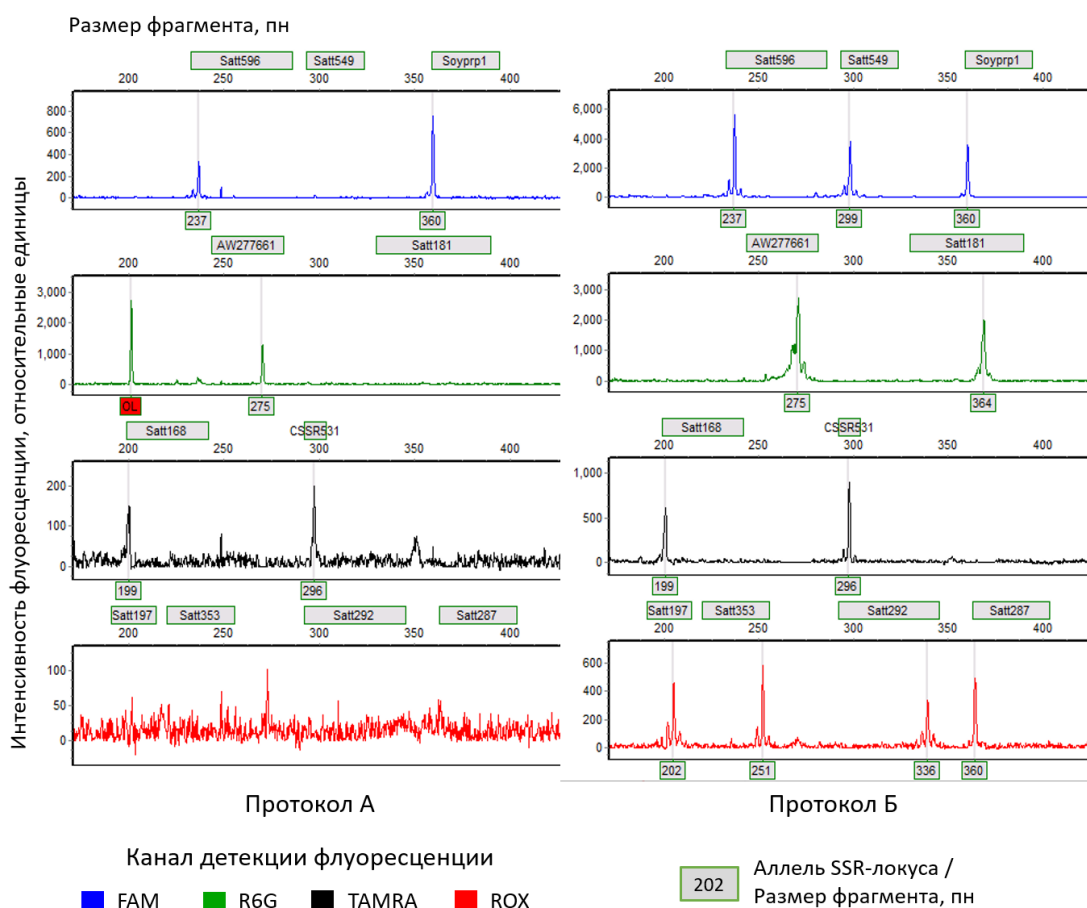


Рисунок 11 – Мультиплексная система 2 при разных протоколах амплификации, ДНК ПКО

В целом, проведенный опыт показал преимущество протокола 2-шаговой ПЦР (протокол Б) для получения стабильных результатов при совместной амплификации фрагментов ДНК соответствующих SSR-маркеров, поэтому данный протокол температурно-временных режимов был выбран в качестве оптимального для разработанных мультиплексных систем.

Как уже было отмечено выше, для отдельных SSR-маркеров сохранялась относительно низкая интенсивность сигнала, что могло вызывать затруднение при интерпретации результатов. На данном этапе исследования все праймеры были добавлены в одинаковой концентрации (по 4 пкМ/мкл). Для повышения интенсивности флуоресценции фрагментов ДНК до относительно одинакового уровня, по крайней мере в пределах одного канала детекции, необходимо было подобрать соотношение концентраций праймеров, участвующих в мультиплексной ПЦР. С этой целью были проведены мультиплексные ПЦР в реакционных смесях, отличающихся вносимым количеством праймеров – увеличенным для SSR-маркеров, характеризующихся низкой интенсивностью сигнала, и неизменным или сниженным – для остальных (раздел 2.2.3, таблица 2). Наиболее информативным критерием при оценке различных вариантов концентраций праймеров являлась относительная интенсивность сигнала (высота пика). На рисунке 12 представлены электрофореграммы по каналу детекции TAMRA, демонстрирующие вариабельность интенсивности сигналов SSR-маркеров при различных соотношениях концентраций праймеров.

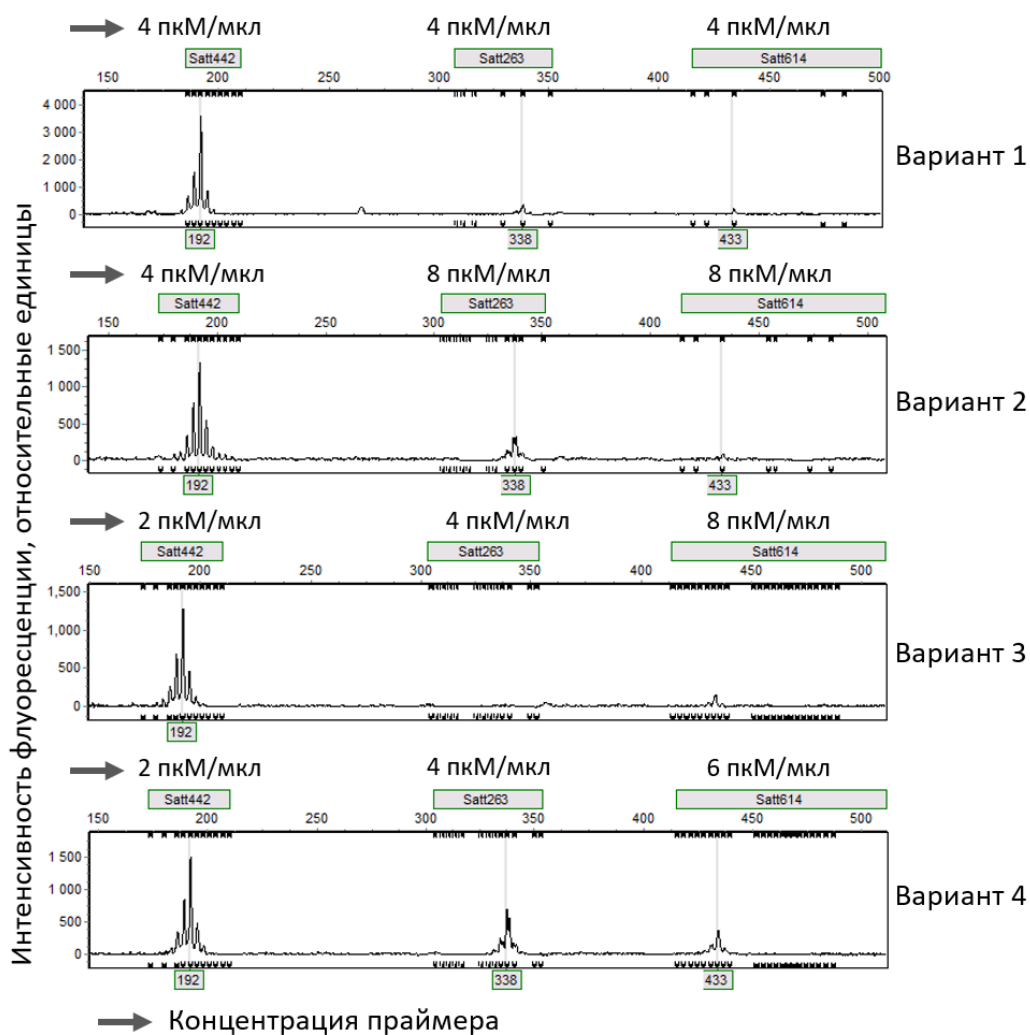


Рисунок 12 – Электрофореграммы разделения ПЦР-продуктов мультиплексной системы 1, ДНК ПКО: Satt442 – маркер с достаточной для интерпретации интенсивностью сигнала; Satt263, Satt614 – маркеры с устойчиво пониженной интенсивностью сигнала

Сопоставление высоты пиков SSR-маркеров показало различия между анализируемыми вариантами. Так, при одинаковой концентрации всех вносимых в реакционную смесь праймеров наблюдался слабый сигнал по SSR-маркерам Satt263 и Satt614 (рисунок 12, вариант 1). При увеличении концентрации этих пар праймеров до 8 пкМ/мкл обнаружено повышение интенсивности сигнала по маркеру Satt263 (высота пика выше относительно предыдущего варианта), однако по SSR-маркеру Satt614 сигнал почти отсутствует (вариант 2). В варианте 3 не происходило амплификации по SSR-маркеру Satt263, при этом несколько выше предыдущего варианта был сигнал Satt614. Лучшим из анализируемых оказался

вариант 4. При таком соотношении концентраций праймеров получены самые высокие пики SSR-маркеров Satt263 и Satt614 относительно других вариантов.

Аналогично вышеописанному для мультиплексной системы 2 выбран второй вариант соотношений концентраций праймеров, обеспечивающий лучший результат амплификации фрагментов маркеров Satt292 и Satt287 (рисунок 13).

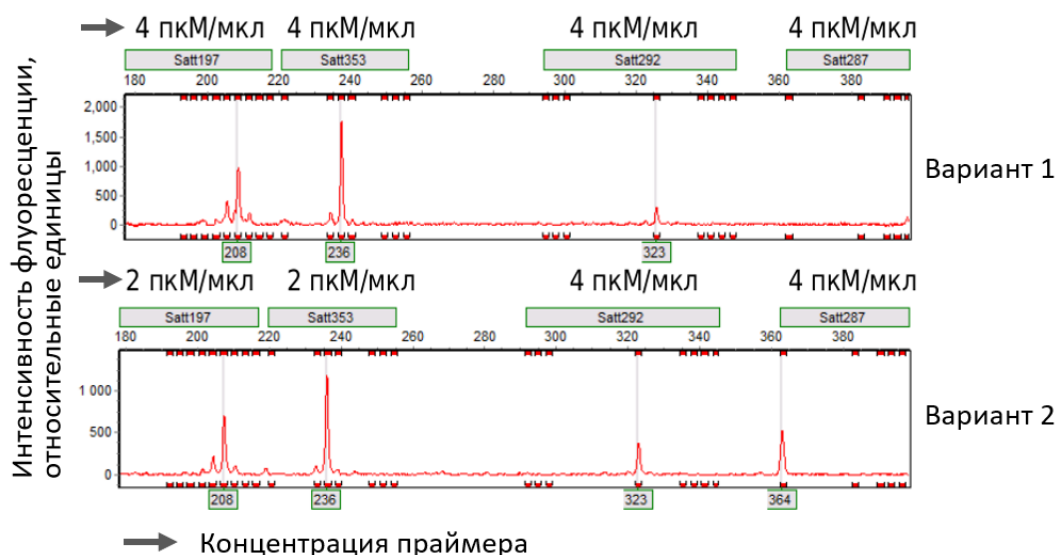


Рисунок 13 – Электрофореграммы разделения ПЦР-продуктов мультиплексной системы 2, ДНК ПКО: Satt197, Satt353 – маркеры с достаточной для интерпретации интенсивностью сигнала; Satt292, Satt287 – маркеры с пониженной интенсивностью сигнала

Таким образом, подбор соотношений концентраций праймеров позволил добиться стабильных результатов амплификации по большинству SSR-маркеров и повысить уровень сигнала для маркеров с пониженной интенсивностью. Однако даже при подобранных условиях высота пиков отдельных маркеров оставалась ниже желаемого уровня, что, вероятно, обусловлено различиями в эффективности амплификации.

Известно, что интенсивность сигнала флуоресценции фрагментов ДНК при прочих равных условиях зависит от флуорофора, которым мечен праймер, и изменяется от большего к меньшему в следующем ряду: FAM, R6G, TAMRA, ROX (Модоров и др., 2024). Следовательно, добиться повышения сигнала для маркеров с низким выходом ПЦР-продукта можно изменением флуорофора на более

интенсивный по уровню флуоресценции. Кроме того, перераспределение флуорофоров решает потенциальную проблему перекрывания диапазонов размеров фрагментов ДНК разных SSR-маркеров. Так, например, в мультиплексной системе 1 у маркеров Satt681 и Satt359, меченных одним флуорофором (FAM), диапазоны размеров отличаются всего на 3 п.н., а в мультиплексной системе 2 довольно близкие диапазоны с разницей в 8 п.н. имеют SSR-маркеры Satt596 и Satt549, также меченные FAM (таблица 8). В случае появления новых аллельных вариантов при расширении выборки анализируемых генотипов сои возможно наложение пиков одного маркера на пики другого и, как следствие, ошибочная интерпретация результатов анализа. В связи с этим флуорофоры между SSR-маркерами были перераспределены, что, в свою очередь, потребовало создания новых последовательностей праймеров к локусу CSSR531 для изменения размеров амплифицируемых с ними фрагментов ДНК (в таблице 7 уже представлены актуальные последовательности).

Перераспределение флуорофоров, как и ожидалось, привело к изменению интенсивности сигналов. Соответственно концентрации праймеров, подобранные выше, требовали корректировки. Поэтому был выполнен заключительный подбор оптимальных соотношений концентраций праймеров по принципу, описанному выше, при этом регулирование концентраций осуществлялось уже для каждой пары праймеров. Итоговые значения концентраций праймеров и распределение между ними флуорофоров указаны в таблице 9.

Таблица 9 – Характеристика разработанных мультиплексных систем SSR-маркеров сои

Флуорофор	SSR-маркер	Концентрация каждого из пары праймеров, пкМ/мкл	Количество выявленных фрагментов ДНК*	Диапазон размеров фрагментов ДНК*
1	2	3	4	5
Мультиплексная система 1				
FAM	Satt507	0,75	5	211–223
	Satt681	1,75	8	330–351
	Satt149	0,50	4	398–425

Продолжение таблицы 9

1	2	3	4	5
R6G	Satt532	0,75	5	162–174
	Satt141	0,75	6	277–331
	Satt614	4,50	17	409–547
TAMRA	Satt442	2,25	10	174–210
	Satt263	4,00	8	308–353
ROX	Satt309	2,00	3	255–276
	Satt359	4,00	5	348–378
	Satt286	4,75	5	451–469
Мультиплексная система 2				
FAM	CSSR531	0,25	4	113–123
	Satt596	0,75	14	240–288
	Satt287	0,75	6	360–399
R6G	Satt197	0,75	9	151–211
	AW277661	0,50	6	257–284
	Satt181	0,75	8	331–385
TAMRA	Satt168	2,75	5	199–232
	Satt549	2,75	6	296–320
ROX	Satt353	1,75	5	218–251
	Satt292	3,00	8	294–339
	Soyprp1	3,25	5	360–393

Примечание: * по результатам генотипирования, описанным в главе 6

Изменение флуорофоров для SSR-маркеров привело к смещению определяемых размеров амплифицируемых фрагментов. Так, например, при сравнении результатов фрагментного анализа ДНК растения сорта Ли́ра, используемого в качестве положительного контрольного образца (ПКО), по одному и тому же SSR-маркеру Satt359, меченному флуорофорами FAM или ROX, различие в определяемых размерах составляло 4 п.н. (Савиченко, 2026). В целом, размер амплифицируемого фрагмента, устанавливаемый по результатам фрагментного анализа, является величиной относительной и может варьировать в зависимости от условий проведения электрофореза, используемого флуорофора, маркера молекулярного веса, нуклеотидного состава фрагмента и т.д. (Delmotte et al., 2001; Pasqualotto et al., 2007). Точный размер может быть установлен в результате секвенирования последовательности ампликона, что стало следующим этапом исследования.

5.3 Анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК

С целью установления точных размеров амплифицируемых фрагментов, а также проверки их соответствия целевым микросателлитным локусам и подтверждения природы выявляемого полиморфизма аллельных вариантов было проведено секвенирование фрагментов ДНК положительного контрольного образца.

Ампликоны, полученные с использованием праймеров 22 SSR-локусов, были секвенированы методом Сэнгера. Полученные нуклеотидные последовательности выравнивали с соответствующими участками эталонной сборки генома сои. На рисунке 14 представлена часть нуклеотидной последовательности ампликона, полученного по маркеру Satt532 (сорт Ли́ра), выравненная на последовательность эталонной сборки генома сои (сорт Williams 82).

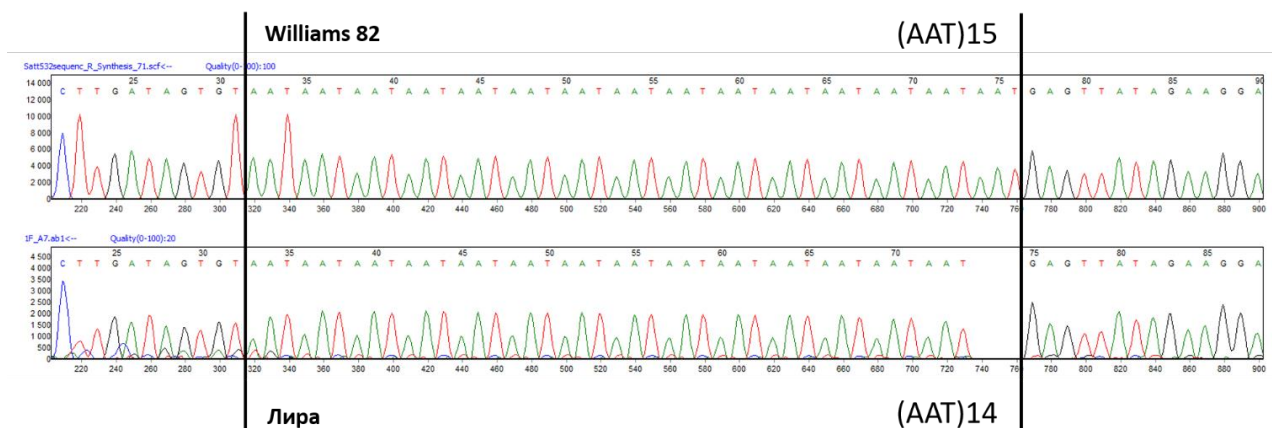


Рисунок 14 – Выравнивание нуклеотидной последовательности ампликона SSR-маркера Satt532 с эталонной сборкой генома сои

При сравнении нуклеотидных последовательностей установлено, что различия между ними обусловлены исключительно количеством повторов микросателлитного мотива. Для Williams 82 в данном локусе характерно наличие 15 повторяющихся мотивов (AAT), для Ли́ры – 14 (рисунок 14). Поскольку отличий во фланкирующих областях данного локуса не обнаружено, размер ампликона ПКО отличается от размера фрагмента эталонного генома (установленного *in silico*) на один мотив, то есть 3 п.н.

Нуклеотидные последовательности фрагментов ДНК остальных SSR-маркеров были проанализированы аналогичным образом. Результаты выравнивая последовательностей ампликонов на эталонную сборку генома сои представлены в приложении В. Для всех изученных последовательностей подтверждено соответствие целевым микросателлитным локусам, что свидетельствует о высокой специфичности используемых пар праймеров. Установлено, что различия между аллельными вариантами обусловлены вариабельностью количества повторяющихся мотивов при сохранении консервативности фланкирующих областей. Это подтверждает, что наблюдаемый полиморфизм имеет типичную для микросателлитных маркеров природу.

Во фланкирующих последовательностях некоторых SSR-локусов (Satt149, Satt141, Satt286, Satt596, Satt181 и Satt549) были обнаружены дополнительные ди- и тринуклеотидные мотивы (приложение В, рисунки В.3, В.5, В.11, В.13, В.17 и В.19), потенциально способные приводить к полиморфизму аллельных вариантов. Теоретически, это допускает возможность ложноположительного результата генотипирования, когда два образца, имеющие одинаковый размер фрагмента, на самом деле могут отличаться. Например, структура локуса Satt149 у одного генотипа в таком случае будет выглядеть как (AAT)₁₆, (TAA)₃, а у другого генотипа – (AAT)₁₇, (TAA)₂. Тем не менее, данным эффектом можно пренебречь, поскольку вклад дополнительных повторов во фланкирующих областях в изменение общей длины фрагмента, как правило, ниже по сравнению с вариабельностью основного микросателлитного мотива. Кроме того, в рамках разработанной системы предполагается использование набора из нескольких независимых SSR-маркеров, что обеспечивает достаточную дискриминационную способность системы в целом и снижает риск ошибочной идентификации.

На основании сравнения секвенированных нуклеотидных последовательностей с эталонным геномом для сорта Лира (ПКО) были установлены количество повторов и точный размер фрагментов ДНК по всем SSR-маркерам (таблица 10). Для SSR-маркеров Satt149, Satt141, Satt286, Satt596, Satt181

и Satt549 представлены только основные мотивы, поскольку, как уже было сказано выше, вклад дополнительных мотивов в полиморфизм не установлен.

Таблица 10 – Сопоставление ампликонов SSR-маркеров ПКО с эталонным геномом сои по данным секвенирования

SSR-маркер	Мотив	Williams 82 ¹		Лира ²	
		Количество повторов	Размер фрагмента, п.н.	Количество повторов	Размер фрагмента, п.н.
Satt507	ATT	22	217	22	217
Satt681	TTA	20	333	20	333
Satt149	AAT	16	422	11	407
Satt532	AAT	15	168	14	165
Satt141	ATA	25	331	21	319
Satt614	TTA	38	466	25	427
Satt442	TAA	35	207	30	192
Satt263	TTA	19	329	22	338
Satt309	ATT	13	276	8	261
Satt359	TAT	15	348	15	348
Satt286	ATT	18	466	18	466
CSSR531	TAA	13	120	12	117
Satt596	AAT	18	255	13	240
Satt287	TTA	18	390	8	360
Satt197	ATT	20	190	24	202
AW277661	TAT	23	275	23	275
Satt181	ATT	19	373	16	364
Satt168	ATA	17	226	8	199
Satt549	TAT	21	314	16	299
Satt353	TTA	17	248	17	248
Satt292	ATA	16	321	21	336
Soyprp1	TAT	20	387	11	360

Примечание: ¹ – эталонный геном сои; ² – положительный контрольный образец (ПКО) в исследовании

Сравнение значений размеров фрагментов ДНК, установленных по результатам секвенирования (таблица 10), и данных фрагментного анализа (таблица 8) показало, что по некоторым маркерам наблюдались расхождения как в большую, так и в меньшую сторону: Satt507, Satt614 и CSSR531 – на 6 п.н., Satt596 и Satt353 – на 3 п.н. Смещение определяемых размеров при фрагментном анализе

от истинных размеров указывает на необходимость стандартизации определения аллельных вариантов для обеспечения воспроизводимости результатов генотипирования.

5.4 Формирование панелей аллелей SSR-маркеров

Как было отмечено выше, определяемые размеры фрагментов ДНК являются относительными. Для паспортизации и идентификации генотипов воспроизводимость определения аллельных вариантов имеет принципиальное значение. В связи с этим для разрабатываемой технологии необходимо было создать инструмент, обеспечивающий стандартизацию определения размеров выявляемых фрагментов.

С этой целью в программе GeneMarker для обеих мультиплексных систем были сформированы панели аллелей микросателлитных локусов, содержащие информацию обо всех выявленных аллельных вариантах с указанием их размеров и диапазонов обнаружения (бинов) (Свидетельство о ... , № 2026623222). На рисунке 15 представлена часть панели для одного из SSR-маркеров мультиплексной системы 1 по каналу детекции флуоресценции FAM, а также показан пример настройки положения панели относительно ПКО для обеспечения правильной интерпретации результатов фрагментного анализа.

При интерпретации результатов фрагментного анализа первоначально проводится проверка соответствия значения, определенного данной панелью для ПКО в текущем анализе, контрольному значению (рисунок 15).

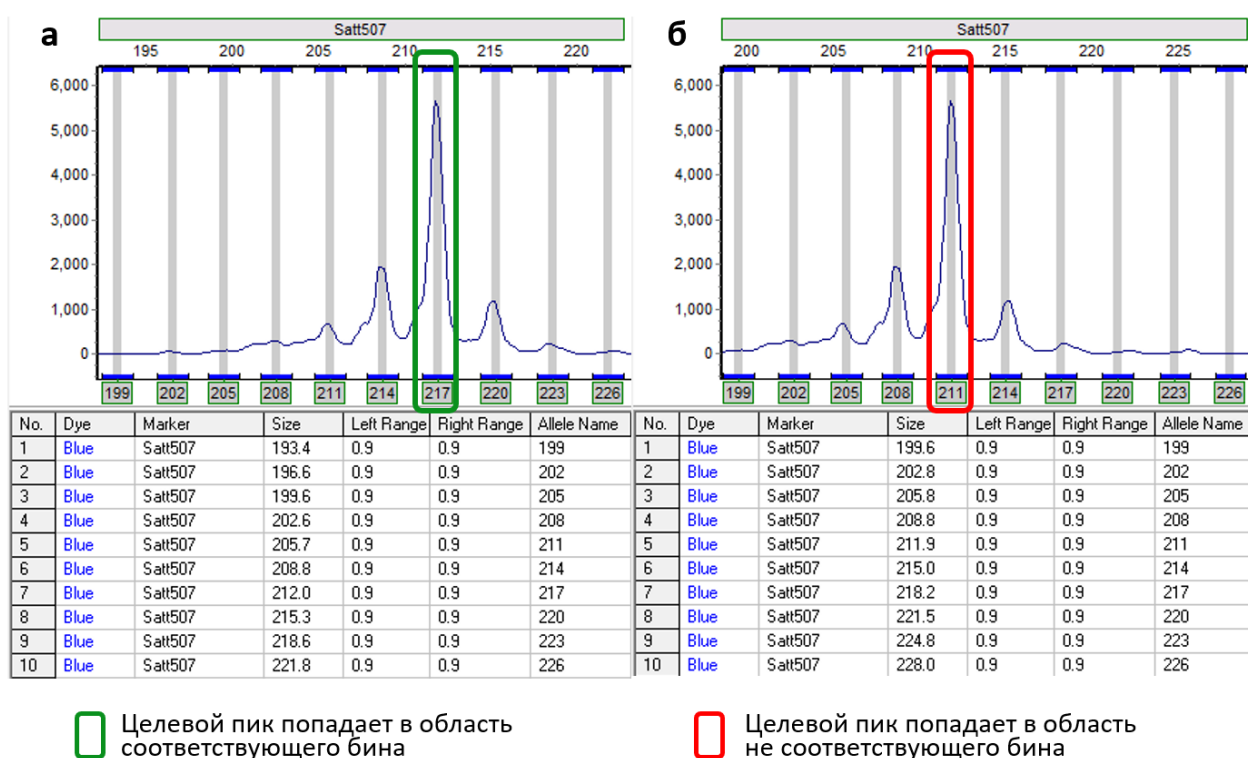


Рисунок 15 – Определение положения панели для маркера Satt507 относительно пика ПКО: а – корректное положение; б – некорректное положение

Согласно данным, установленным в результате секвенирования (таблица 10), по маркеру Satt507 образец сорта Лира (ПКО) имеет фрагмент размером 217 п.н. При корректном положении панели целевой пик ПКО попадает в бин, соответствующий данному значению (217) (рисунок 15 а). В случае несоответствия (рисунок 15 б), что может наблюдаться при изменении условий проведения электрофореза, положение панели корректируется до достижения совпадения значений. Таким образом обеспечивается сопоставимость и воспроизводимость результатов генотипирования между различными сериями анализов. Данный подход позволяет стандартизировать этап интерпретации результатов фрагментного анализа.

В целом, по результатам исследований, представленных в данной главе, были разработаны мультиплексные системы SSR-маркеров для генотипирования сои. На рисунке 16 представлены электрофореграммы разделения ПЦР-продуктов ПКО, полученные при использовании разработанных мультиплексных систем в оптимизированных условиях. Данный рисунок демонстрирует специфичную

амплификацию фрагментов ДНК всех используемых SSR-маркеров и корректную интерпретацию их аллельных вариантов.

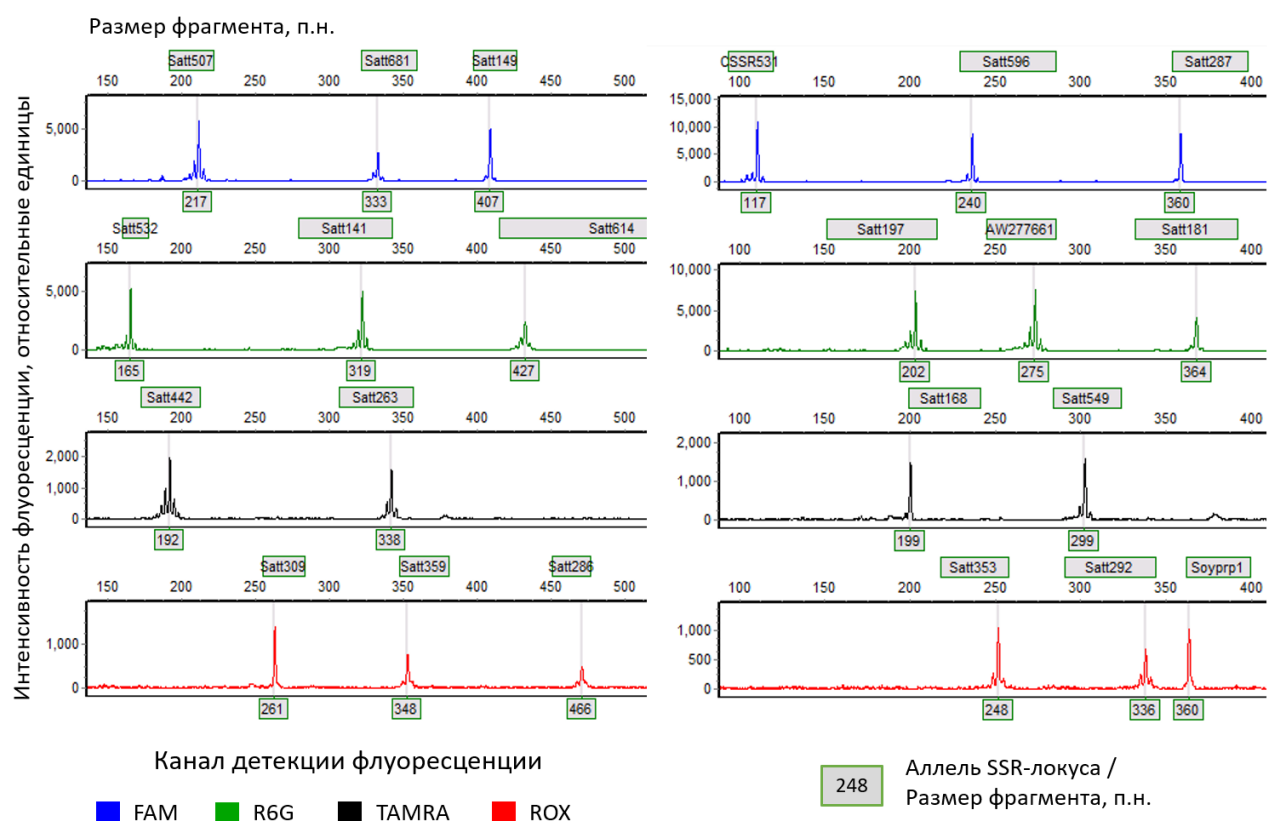


Рисунок 16 – Электрофореграммы разделения ПЦР-продуктов ПКО по SSR-маркерам: а – мультиплексной системы 1; б – мультиплексной системы 2

Таким образом, разработанные мультиплексные системы в сочетании со всеми подобранными условиями для анализа ДНК, представляют собой технологию молекулярно-генетической идентификации сортов сои. Технология включает три основных последовательно выполняемых этапа: выделение ДНК, проведение мультиплексных ПЦР, фрагментный анализ, по завершению которых формируется ДНК-профиль сорта. Все этапы проводятся в формате 96-луночного планшета, что позволяет одновременно анализировать большое количество проб. При этом может быть проведен анализ одного или более сортов в зависимости от количества индивидуальных растений сорта. Например, при использовании 47 растений одновременно проводится анализ 2 сортов (2 оставшиеся лунки используются для положительного и отрицательного контрольных образцов).

По результатам диссертационного исследования изданы методические рекомендации по проведению молекулярно-генетической паспортизации и идентификации сортов сои (Молекулярно-генетическая паспортизация ..., 2026). Разработанная технология также применяется для молекулярно-генетического анализа новых сортов сои селекции ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК, передаваемых на государственное сортоиспытание (Лукомец и др., 2026; Тевченков и др., 2026).

ГЛАВА 6 МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОТИПОВ СОИ

6.1 Формирование ДНК-профилей сортов сои с помощью разработанных мультиплексных систем SSR-маркеров

Для молекулярно-генетической идентификации 60 сортов сои было проведено их генотипирование с помощью разработанной технологии. Как было отмечено в обзоре литературных источников, в большинстве работ по идентификации сортов сои не раскрывается вопрос о внутрисортном полиморфизме и его влиянии на точность идентификации сорта. Однако некоторые сорта сои характеризуются генетической неоднородностью (Ramazanova et al., 2021; Савиченко, Рамазанова, 2021б; Савиченко и др., 2024а). Поэтому для учета возможного внутрисортного полиморфизма были проанализированы выборки индивидуальных растений (приложение А).

В результате генотипирования по 22 SSR-маркерам были определены размеры всех выявленных фрагментов ДНК – аллелей. Набор аллельных данных одного растения в настоящей работе рассматривается как его индивидуальный ДНК-профиль, совокупность профилей всех проанализированных растений сорта – как ДНК-профиль сорта. Для примера ДНК-профили некоторых сортов сои представлены в приложении Г. Следует отметить, что ДНК-профиль сорта не является непосредственно его генетическим паспортом, определение последнего закреплено в законе «О семеноводстве» (454-ФЗ) и включает дополнительные сведения о сорте. Получаемые с помощью разработанной технологии ДНК-профили представляют собой молекулярно-генетическую характеристику сорта и могут быть использованы при формировании генетических паспортов и идентификации сортов сои.

При сравнении индивидуальных ДНК-профилей в каждом из сортов была выявлена генетическая неоднородность, иначе называемая в литературе внутрисортным полиморфизмом. Например, в сорте Триада выявлено одно растение, отличающееся по шести SSR-маркерам (приложение Г, рисунок Г.1,

растение № 30), при этом по трем из них (Satt309, Satt168 и Satt292) данное растение гетерозиготно. Наличие в каждой гетерозиготе аллеля, совпадающего с аллелями остальных растений сорта, может говорить о случайном перекрестном опылении, случаи которого описаны для сои (Зеленцов, Мошненко, 2019). В то же время наличие отличающихся гомозиготных аллелей по остальным SSR-маркерам не объясняется данным фактом и может быть обусловлено механическим загрязнением или возникновением мутаций. При идентификации растения, имеющие отличия, могут быть определены как нетипичные для конкретного сорта в случае их единичного обнаружения при анализе репрезентативной выборки индивидуальных растений. Однако нельзя исключать, что отличающиеся ДНК-профилем растения могут представлять один из редко встречающихся биотипов сорта. При этом даже при отсутствии данного растения, в сорте Триада присутствует неоднородность по SSR-маркерам Satt532 и Satt442.

Наличие внутрисортного полиморфизма затрудняет ДНК-паспортизацию и последующую идентификацию сорта как в проведении самого анализа, так и в представлении данных – ДНК-профиля в генетическом паспорте, который бы показывал информативную молекулярно-генетическую характеристику сорта.

Наиболее распространенный подход в идентификации сортов состоит в анализе смешанных ДНК-профилей всех растений сорта, которые получают двумя способами. Первый способ предполагает анализ образца ДНК, содержащего сразу несколько растений, второй – ДНК каждого растения анализируют отдельно, а затем из полученных аллельных данных собирают смешанный ДНК-профиль. Таким образом, смешанный ДНК-профиль содержит совокупность всех выявленных аллельных вариантов, обычно представленных в виде молекулярно-генетических формул. Описанный подход основывается на идентификации сортов посредством сравнения их смешанных ДНК-профилей. Однако, учитывая гетерогенность сортов сои, вопрос применения такого подхода состоит в том, будет ли один и тот же сорт содержать в смешанном ДНК-профиле все присущие ему аллели в пределах одной и тем более разных партий семян.

Для оценки применимости первого способа данного подхода был проведен эксперимент, моделирующий анализ смешанного образца ДНК. Ранее проанализированные 47 проб ДНК индивидуальных растений сорта Дуар (рисунок Г.2) были смешаны в равном количестве в одну пробу, после чего полученный образец анализировался в тех же условиях мультиплексной ПЦР и капиллярного электрофореза. Полученная электрофореграмма характеризовалась наличием нескольких пиков различной интенсивности по каждому маркеру (рисунок 17).

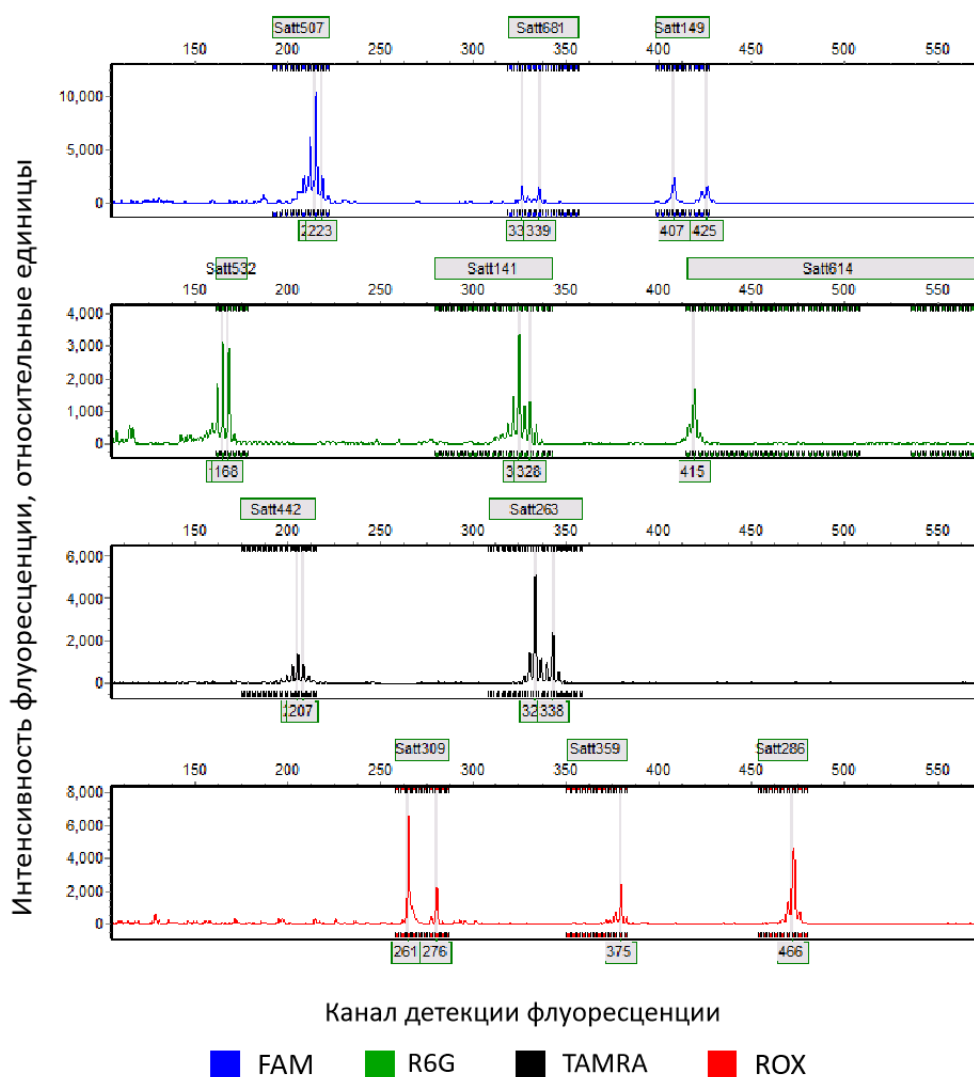


Рисунок 17 – Электрофореграмма разделения ПЦР-продуктов мультиплексной системы 1, смешанная проба ДНК растений сорта Дуар

При отсутствии информации об индивидуальных ДНК-профилях достоверная интерпретация результатов фрагментного анализа затруднена. Наблюдались наложение сигналов фрагментов близкого размера и различия в

высоте пиков, обусловленные неодинаковым вкладом отдельных аллелей в суммарный сигнал. В результате часть аллелей, выявленных при индивидуальном анализе, в смешанном образце либо не детектировалась (по маркеру Satt614 отсутствует фрагмент 472 п.н., по маркеру Satt359 – 348 и 354 п.н.), либо не могла быть однозначно интерпретирована (маркеры Satt507, Satt141, Satt442, Satt263). На рисунке 18 представлен детализированный пример интерпретации результатов фрагментного анализа индивидуальных и смешанной проб ДНК сорта Дуар по одному из маркеров.

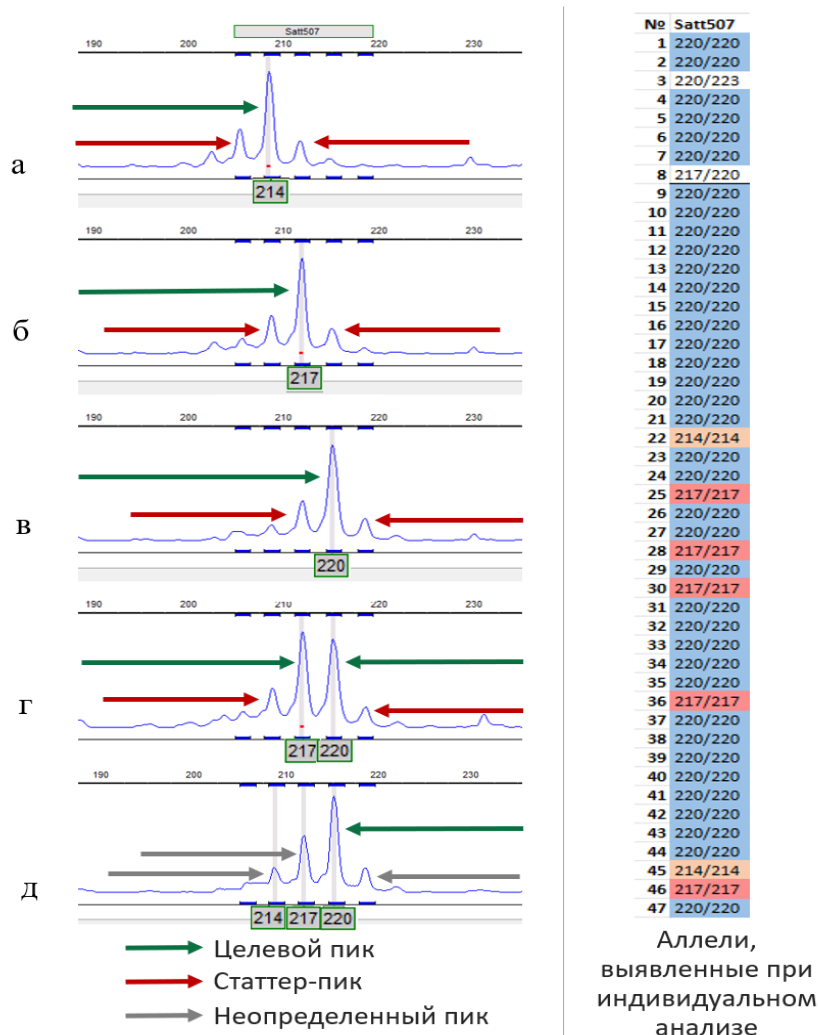


Рисунок 18 – Сравнение результатов фрагментного анализа по SSR-маркеру Satt507: а–г – ДНК индивидуальных растений; д – смешанной пробы ДНК, сорт Дуар

На электрофореграммах индивидуальных растений целевые пики интерпретируются однозначно: в гомозиготных образцах выявляется по одному

пику с высокой интенсивностью сигнала (рисунок 18 а–в), в гетерозиготном – два пика с сопоставимой интенсивностью (рисунок 18 г), при этом статтер-пики хорошо различимы и характеризуются более низкой интенсивностью сигнала. На электрофореграмме смешанной пробы ДНК (рисунок 18 д) отчетливо выделяется только один пик, соответствующий наиболее распространенному аллелю в выборке (220 п.н.), что обуславливает его наибольшую интенсивность сигнала. Пики меньшей интенсивности не идентифицируются однозначно. При отсутствии данных об индивидуальных ДНК-профилях такие сигналы могут быть ошибочно приняты за статтеры и не включены в ДНК-профиль сорта или, наоборот, артефактные пики будут приняты как истинные аллели. В обоих случаях это приведет к искажению ДНК-профиля сорта и, соответственно, к ошибкам идентификации.

Второй способ формирования смешанного ДНК-профиля сорта по результатам генотипирования индивидуальных растений может быть применим для генетически однородных сортов или для сортов с невысоким уровнем внутрисортного полиморфизма, характеризующихся наличием не более двух аллелей по каждому маркеру (например, сорт Триада). Однако в таком случае информация о структуре сорта (состав и соотношение биотипов) утрачивается. Существенно затруднено применение данного подхода для высокополиморфных сортов, у которых по одному маркеру может быть выявлено более двух аллелей (например, Дуар). ДНК-профиль такого сорта в виде перечня всех обнаруженных аллелей будет иметь избыточно развернутую форму, усложняющую его сопоставление с профилями других сортов. Кроме того, отсутствие единого формата представления ДНК-профилей затруднит их последующую статистическую обработку.

Результаты этого эксперимента свидетельствуют об ограниченной информативности смешанного ДНК-профиля, поскольку он не отражает полноту аллельного состава сорта и не позволяет надежно различить редкие аллели и артефактные пики. Кроме того, в смешанном ДНК-профиле невозможно определить биотипы и частоту их встречаемости.

Анализ индивидуальных растений устраняет указанные ограничения. Выборка растений может быть увеличена до уровня, достаточного для выявления состава биотипов и определения их частот. Биотипы с низкой частотой встречаемости могут быть определены как нетипичные и либо исключены из анализа, либо учтены в виде весовых коэффициентов, что невозможно при анализе смесей.

Таким образом, для точной идентификации сортов наиболее надежным подходом является анализ репрезентативной выборки индивидуальных растений и формирование на его основе полного ДНК-профиля сорта. Полученные по результатам генотипирования ДНК-профили сортов сои были сформированы в базу данных и зарегистрированы (Свидетельство о ... , № 2026622727).

6.2 Анализ генетической структуры и дифференциации сортов сои

Генетическая неоднородность анализируемых сортов сои, установленная по результатам генотипирования, обусловила необходимость оценки уровня внутрисортного генетического разнообразия. Для 60 сортов сои (приложение А, группа сортов 7, 11–12) были рассчитаны его основные показатели (таблица 11).

Таблица 11 – Показатели генетического разнообразия сортов сои, средние значения по 22 SSR-маркерам

№	Сорт	n	P, %	N _a	N _e	H _o	H _e
1	2	3	4	5	6	7	8
1	Баргузин	47	86,4	2,136	1,125	0,009	0,099
2	Барс	47	81,8	2,364	1,397	0,023	0,221
3	Вектор	47	86,4	2,182	1,057	0,018	0,053
4	Восточка	47	45,5	1,455	1,024	0,004	0,022
5	Вига	47	59,1	1,773	1,039	0,003	0,037
6	Вилана	47	90,9	2,318	1,373	0,015	0,219
7	Вилана бета	47	86,4	2,545	1,561	0,031	0,276
8	Вита	47	36,4	1,500	1,094	0,007	0,055
9	Грея	47	68,2	1,909	1,071	0,007	0,053
10	Дуар	47	100	2,909	1,934	0,034	0,438
11	Дуниза	47	95,5	2,818	1,140	0,036	0,118
12	Елисей	47	59,1	1,591	1,143	0,001	0,086
13	Забава	47	22,7	1,227	1,013	0,003	0,012

Продолжение таблицы 11

1	2	3	4	5	6	7	8
14	Зара	47	27,3	1,318	1,018	0	0,017
15	Иней	47	59,1	1,773	1,335	0,001	0,180
16	Ирбис	47	40,9	1,409	1,089	0,002	0,055
17	Кора	47	31,8	1,409	1,064	0,001	0,038
18	Лира	47	4,6	1,045	1,011	0	0,009
19	Любава	47	18,2	1,182	1,037	0,001	0,024
20	Мамонт	47	45,5	1,636	1,101	0,010	0,060
21	Олимпия	47	54,6	1,682	1,023	0,011	0,022
22	Парус	47	68,2	1,909	1,057	0,008	0,052
23	Пума	47	40,9	1,409	1,050	0,003	0,035
24	Рысь	47	9,1	1,091	1,090	0,005	0,045
25	Саяна	47	36,4	1,455	1,330	0	0,163
26	Себур	47	68,2	1,773	1,073	0,010	0,062
27	Селена	47	77,3	2,000	1,089	0,005	0,067
28	Славия	47	72,7	2,227	1,098	0,004	0,074
29	Титан	47	31,8	1,318	1,098	0,008	0,052
30	Триада	47	36,4	1,364	1,093	0,003	0,052
31	Чара	47	95,5	2,818	1,221	0,024	0,160
32	Кихара	30	59,1	1,682	1,046	0,011	0,042
33	Краса	30	13,6	1,136	1,009	0	0,009
34	Своя	30	9,1	1,091	1,049	0	0,026
35	СК Артика	30	18,2	1,182	1,051	0,002	0,035
36	Аванта	23	68,2	1,864	1,449	0,059	0,247
37	Бара	23	68,2	1,818	1,079	0,002	0,070
38	Бинго	23	4,6	1,045	1,004	0	0,004
39	Липчанка	23	31,8	1,318	1,164	0,006	0,091
40	Омская 4	23	63,6	1,773	1,199	0,012	0,111
41	Рента	23	81,8	1,955	1,170	0,006	0,126
42	Сибириада	23	40,9	1,455	1,083	0,008	0,061
43	СК Ава	23	27,3	1,273	1,144	0	0,082
44	СК Аврора	23	13,6	1,136	1,051	0,002	0,028
45	СК Алекса	23	31,8	1,364	1,102	0,016	0,058
46	СК Дока	23	40,9	1,500	1,139	0,002	0,098
47	СК Оптима	23	36,4	1,364	1,057	0	0,044
48	СК Уника	23	13,6	1,136	1,126	0,002	0,066
49	СК Элана	23	27,3	1,273	1,016	0,008	0,015
50	Ходсон	23	86,4	2,273	1,336	0,016	0,222
51	Юг-30	23	4,6	1,045	1,009	0	0,007
52	Ягуар	23	68,2	1,727	1,109	0,022	0,080
53	ЭН Аргента	21	18,2	1,182	1,130	0	0,069
54	ЭН Авиор	15	45,5	1,455	1,058	0,006	0,051
55	Прескотт	14	40,9	1,409	1,094	0	0,069
56	Аляска	8	50,0	1,500	1,300	0	0,188
57	Амадеус	8	18,2	1,182	1,106	0	0,062
58	Максус	8	9,1	1,091	1,033	0,006	0,024

Продолжение таблицы 11

1	2	3	4	5	6	7	8
59	Опус	8	81,8	2,136	1,870	0,011	0,408
60	Сибيريا	8	50,0	1,591	1,475	0	0,239
Среднее			47,7	1,625	1,155	0,008	0,091

Примечание: n – объем выборки; P – процент полиморфных локусов; N_a – количество выявленных аллелей; N_e – количество эффективных аллелей; H_o – наблюдаемая гетерозиготность; H_e – ожидаемая гетерозиготность

Полученные результаты свидетельствуют о различиях сортов сои по уровню внутрисортного генетического разнообразия. Наименьшим уровнем обладали сорта Бинго, Лира и Юг-30 – доля полиморфных локусов (P) в них составила 4,6 %, наибольшим – сорт Дуар (100 %), в нем по каждому локусу было обнаружено как минимум два аллеля (приложение Г, рисунок Г.2). Количество выявленных аллелей (N_a) варьировало от 1,045 до 2,909, эффективных (N_e) – от 1,004 до 1,934, со средними значениями 1,625 и 1,155 соответственно. Различия между данными показателями указывают на неравномерное распределение частот аллелей и преобладание отдельных вариантов.

Несмотря на относительно высокую долю полиморфных локусов, значения наблюдаемой гетерозиготности (H_o) оставались низкими и в среднем составляли 0,008, что обусловлено биологическими особенностями сои как самоопыляющейся культуры и преобладанием в сортах гомозиготных генотипов. Среднее значение ожидаемой гетерозиготности (H_e) составило 0,091. Более высокое значение H_e связано с тем, что показатель отражает ожидаемую долю гетерозигот при случайном сочетании обнаруженных аллелей с учетом их частот.

Неравномерное распределение аллелей отражается во внутрисортной структуре, характеризующейся наличием различных биотипов. При классификации по биотипам растения с идентичным ДНК-профилем по 22 SSR-маркерам относили к одному биотипу. Внутрисортная структура анализируемых сортов различалась по количеству и частоте встречаемости биотипов (рисунок 19). Каждый новый цвет в пределах сорта показывает отдельный биотип.

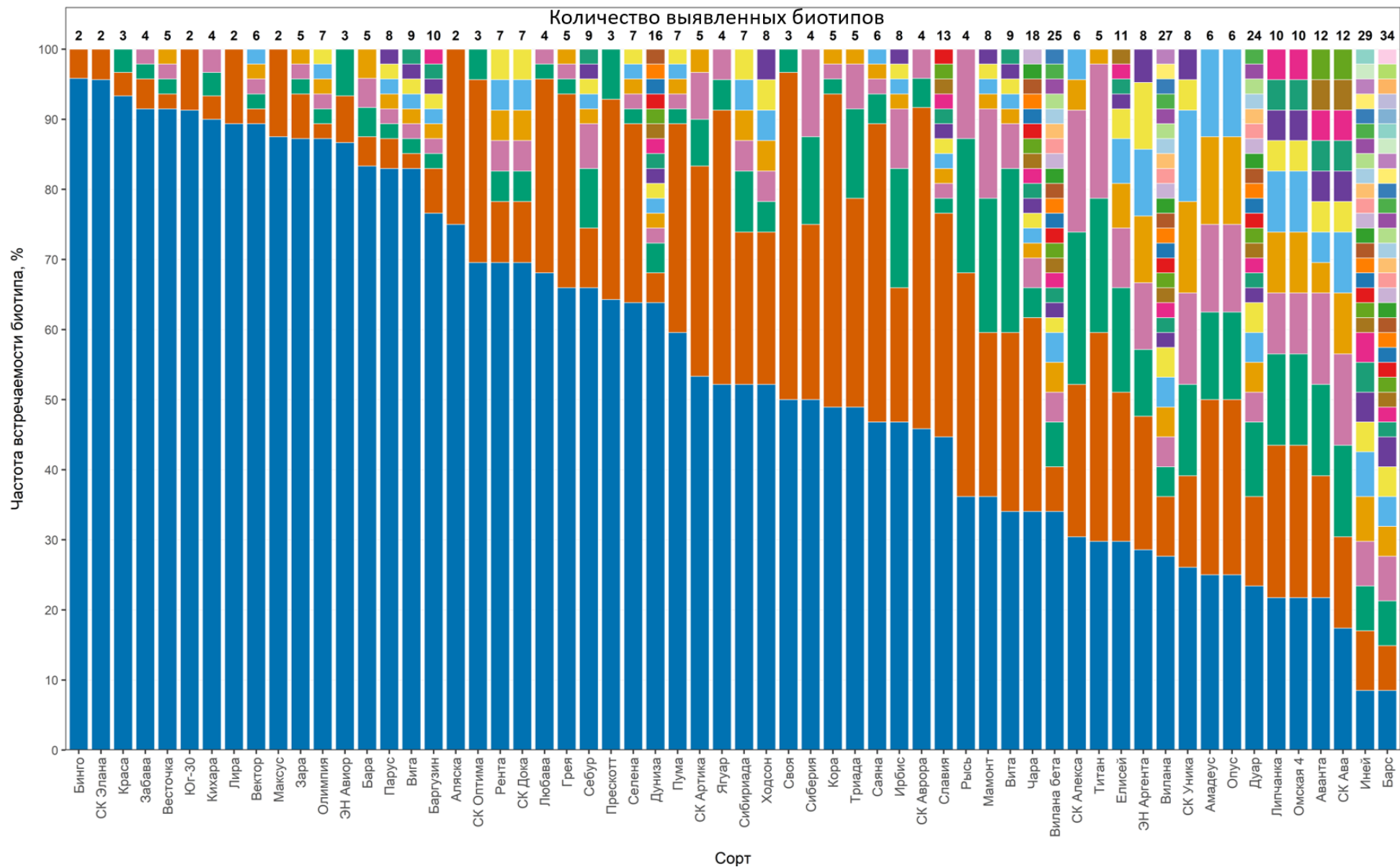


Рисунок 19 – Биотипный состав сортов сои по данным SSR-анализа

Среди 60 сортов было выявлено от 2 до 34 биотипов. При этом количество обнаруженных биотипов следует рассматривать с учетом различного объема выборок индивидуальных растений. Так, выборки сортов Максус и Аляска (по 2 биотипа в сорте) составляли всего 8 растений, не исключено, что при увеличении выборки будут обнаружены новые биотипы. Вместе с тем в таких же малых выборках сортов Сибيريا, Амадеус и Опус обнаружено по 4–6 биотипов.

Соотношение биотипов по сортам различалось. У части из них наблюдалось выраженное преобладание одного биотипа, частота встречаемости которого была более 85 %. К таким относятся 13 сортов: Бинго, СК Элана, Краса, Забава, Весточка, Юг-30, Кихара, Лира, Вектор, Максус, Зара, Олимпия, ЭН Авиор. Помимо основного в данных сортах было выявлено до 6 малочисленных биотипов.

По два основных биотипа с сопоставимой частотой встречаемости обнаружено в сортах: Своя (50 и 47 %), Кора (49 и 45 %), Саяна (47 и 43 %) и СК Аврора (по 46 % каждый), также при наличии других малочисленных биотипов. Сходная внутрисортная структура выявлена у Липчанки и Омской 4, Амадеуса и Опуса, однако данные сорта были представлены разными объемами выборок.

Наиболее не однородными являлись сорта Барс (34 биотипа) и Иней (29), также в эту группу можно отнести сорта Вилана (27), Вилана бета (25) и Дуар (24), при этом у трех последних сортов, несмотря на значительное общее количество выявленных биотипов, один из них встречался с большей частотой.

Таким образом, внутрисортная генетическая структура характеризовалась различной степенью выраженности – от преобладания в сорте одного основного биотипа до большого количества малораспространенных биотипов.

Анализ генетической структуры сортов также показал, что некоторые выявленные биотипы не уникальны. При сравнении ДНК-профилей растений разных сортов установлены случаи полного совпадения аллельного состава по 22 SSR-маркерам, то есть некоторые сорта имели общие биотипы (рисунок 20).

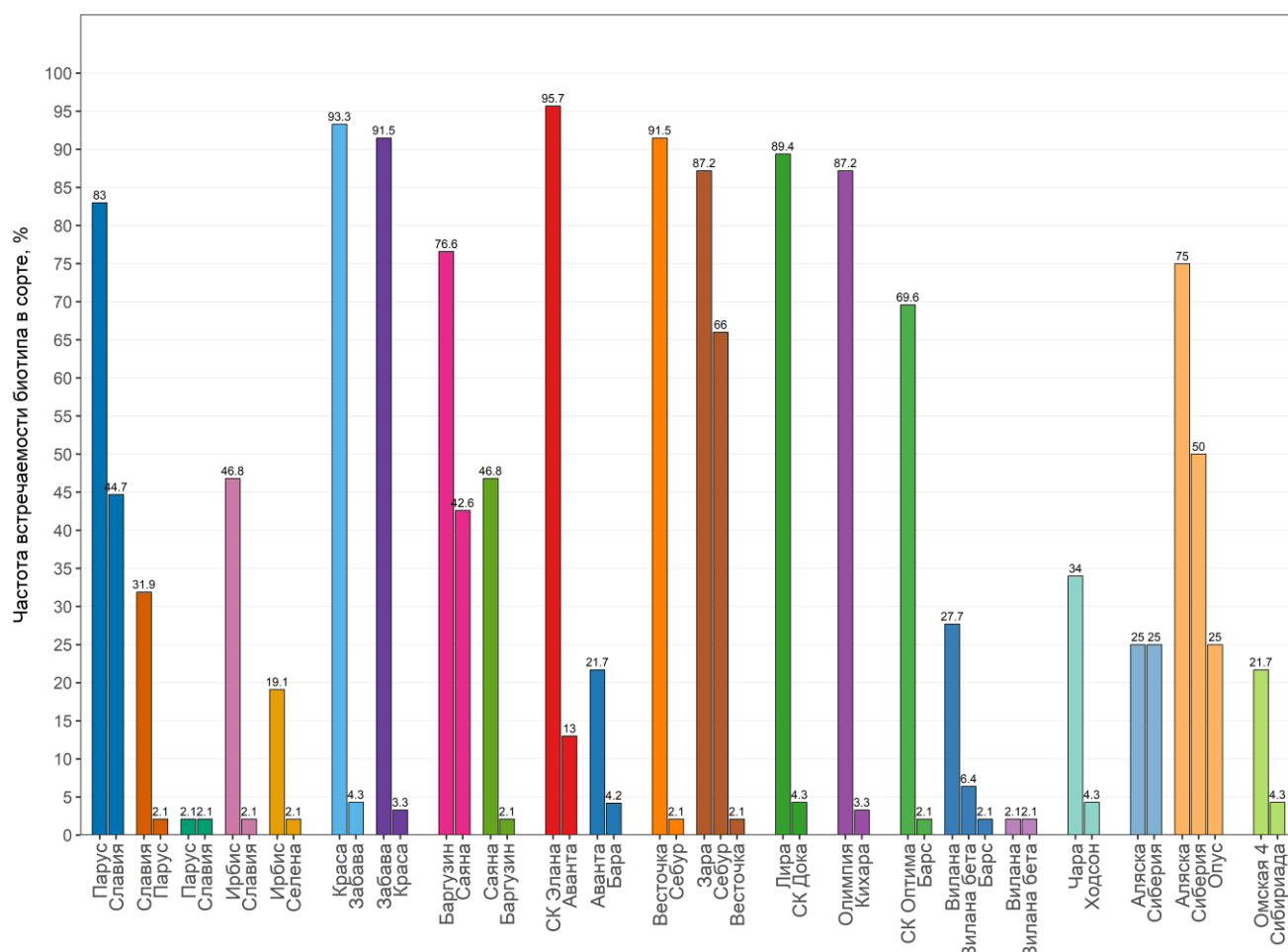


Рисунок 20 – Общие биотипы между сортами сои

Совпадение биотипов между сортами имело разный характер. В некоторых случаях один и тот же биотип представлял значительную долю растений обоих сортов. Так, общий биотип сортов Зара и Себур встречался с частотой 87,2 и 66 % соответственно. Идентификация таких сортов затруднена, но возможна благодаря наличию дополнительных уникальных биотипов, характерных только для одного из сравниваемых сортов, а также различиям во встречаемости общего биотипа.

Также выявлены сорта, имеющие несколько общих биотипов. В парах сортов Краса и Забава, Баргузин и Саяна обнаружено по 2 общих биотипа, а в паре Парус и Славия – 3. Для идентификации таких сортов необходимо учитывать их полную структуру, включая частоту встречаемости общих биотипов и наличие уникальных. Стоит отметить, что сорта, имеющие общие биотипы со средней и высокой частотой встречаемости, преимущественно являются сортами селекции одного учреждения и, вероятно, имеют общее происхождение.

Несколько общих биотипов встречалось с низкой частотой (2,1–4,3 %). В отдельных случаях выявление единичных растений с идентичным ДНК-профилем может быть связано с механическим загрязнением семенного материала.

Частоты встречаемости биотипов в сорте могут изменяться в зависимости от выборки и репродукции семян, однако в целом должны сохраняться в соотношениях, установленных при ДНК-паспортизации, при условии, что для анализа используется репрезентативная выборка, то есть отражающая генеральную совокупность растений сорта. Исключением могут стать случаи, когда сорт возделывается в другом регионе с нехарактерными для него почвенно-климатическими условиями, где по прошествии нескольких поколений возделывания соотношение частот встречаемости биотипов может измениться – преобладающим окажется биотип, имеющий наибольшую экологическую пластичность, тогда как менее устойчивые к условиям среды биотипы могут частично или полностью элиминироваться (Климушина и др., 2025а).

Для сортовой идентификации значение имеет не только количество и частота встречаемости биотипов, но и их аллельный состав. Биотипы могут формироваться как за счет различных сочетаний ограниченного набора аллелей, например, как в сорте Триада (приложение Г, рисунок Г.1), так и за счет наличия дополнительных вариантов аллелей по отдельным локусам. В последнем случае биотипы могут содержать аллели, имеющие значение для дифференциации сортов, которые не будут учитываться при оценке сорта только по преобладающему биотипу.

Для оценки возможности дифференциации сортов была проведена кластеризация методом UPGMA. На рисунке 21 полученная дендрограмма объединена с графическим представлением ДНК-профилей индивидуальных растений каждого сорта по 22-SSR-маркерам для сопоставления генетической близости сортов с различиями в их аллельном составе.

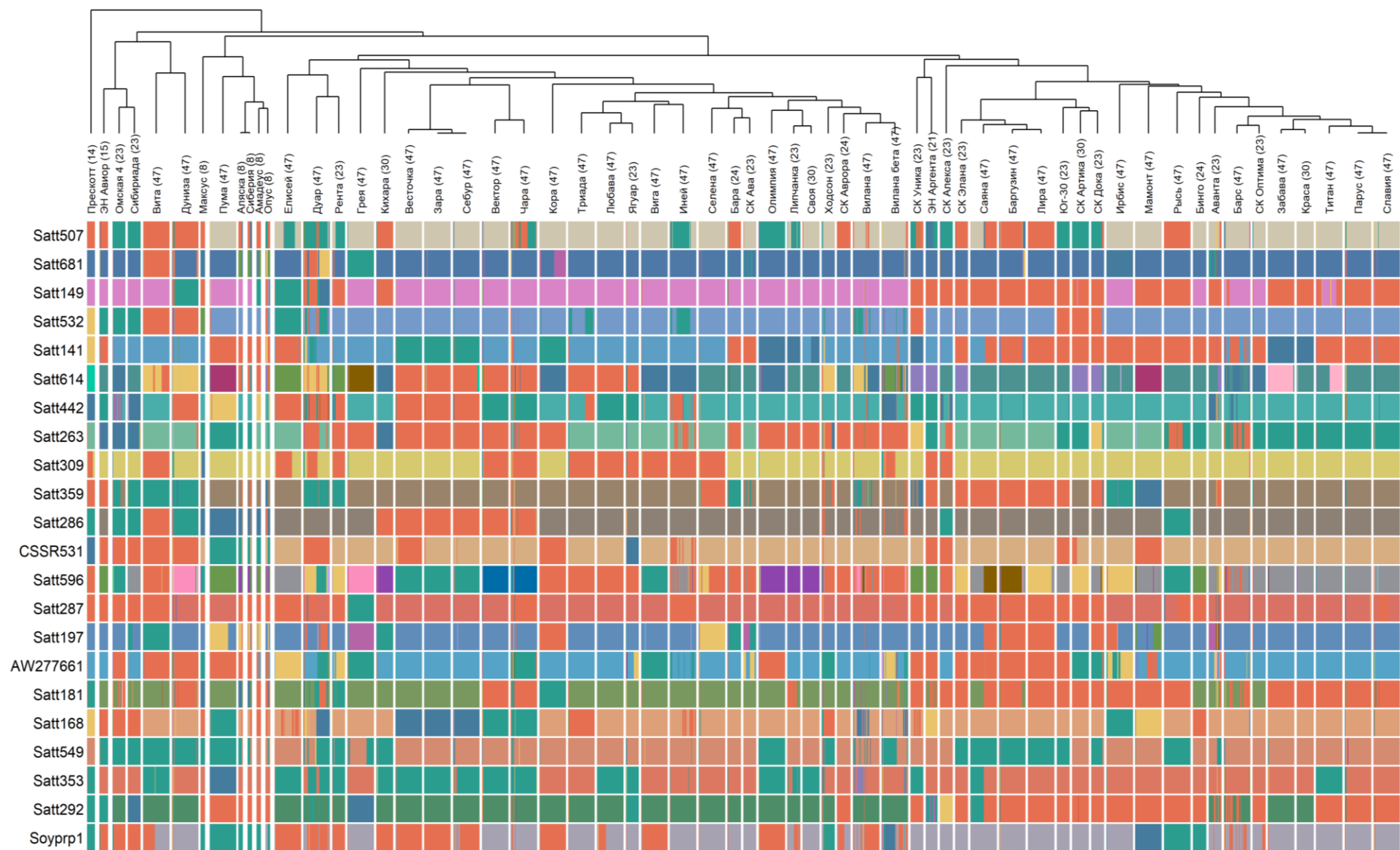


Рисунок 21 – Дендрограмма генетических различий сортов сои с графическим представлением ДНК-профилей индивидуальных растений

По результатам кластеризации было дифференцировано большинство анализируемых сортов сои. Наиболее отдаленное место занимал сорт канадской селекции Прескотт, образовавший отдельную ветвь на дендрограмме и имеющий уникальные или редкие генотипы по маркерам Satt532, Satt141, Satt614 и CSSR531 (рисунок 21). Остальные сорта распределились по нескольким крупным ветвям, внутри которых формировались группы с различной степенью генетического сходства, преимущественно соответствующие их происхождению.

С точки зрения сортовой идентификации наибольший интерес представляют генетически близкие сорта, различия между которыми были выявлены по ограниченному количеству используемых SSR-маркеров. Так, на полученной дендрограмме сорт Восточка занимал близкое положение по отношению к сортам Зара и Себур, при этом ДНК-профили большинства растений Восточки отличались от преобладающих профилей этих сортов по маркеру CSSR531. Исключение составили отдельные растения сорта Себур, относящиеся к другим биотипам с дополнительными отличиями. Аналогично этому основные отличия для большинства растений сортов Баргузин и Ли́ра выявлены по маркеру Satt596, а для сортов Краса и Забава – по Satt614.

Более высокая степень генетического сходства установлена для сортов Зара и Себур. По результатам кластеризации данная пара сортов не дифференцировалась (рисунок 21). Как было отмечено выше, в структуре обоих сортов присутствовал общий биотип с высокой частотой встречаемости (рисунок 20). Однако сопоставление ДНК-профилей индивидуальных растений показывает, различия в их внутрисортовой структуре. Так, у Себура присутствуют малочисленные биотипы, ДНК-профили которых отличаются от Зары по большинству используемых SSR-маркеров.

Аналогичная ситуация наблюдалась для сортов Парус и Славия, в которых ранее было выявлено 3 общих биотипа (рисунок 20). Анализ индивидуальных растений позволил выявить различия, обусловленные наличием отдельных биотипов в структуре сравниваемых сортов.

Поскольку генетические расстояния рассчитываются на основании частот аллелей, вклад наиболее распространенных аллельных вариантов в оценку генетического сходства при кластеризации был выше, тогда как различия, характерные для малочисленных биотипов, имели меньший вклад, что повлияло на положение сорта на дендрограмме. Сопоставление дендрограммы с полными ДНК-профилями сортов позволяет выявить различия и определить аллельные варианты, имеющие значения для дифференциации генетически близких сортов. Полученные результаты дополнительно подтверждают ранее сделанный вывод о необходимости формирования полного ДНК-профиля сорта на основе анализа выборки индивидуальных растений, позволяющего учитывать состав биотипов и аллельное разнообразие сорта в целом.

6.3 Идентификация сортов сои по ДНК-профилям с помощью алгоритма классификации Random Forest

Несмотря на указанные преимущества анализа индивидуальных растений, его использование для идентификации сортов сопряжено с обработкой значительного объема данных генотипирования и необходимостью сопоставления множества ДНК-профилей как внутри, так и между сортами. Дополнительную трудность вызывает неодинаковая степень внутрисортowego полиморфизма сои.

Прямое сравнение ДНК-профилей и перечней выявленных аллелей позволяет характеризовать генетическую структуру сортов, однако с увеличением количества анализируемых растений и сортов становится трудоемким и затрудняет однозначную интерпретацию результатов. Наличие идентичных по (22 SSR-маркерам) биотипов у разных сортов также ограничивает возможность установления сортовой принадлежности по ДНК-профилю единичного растения. В связи с этим актуальным является применение аналитических методов, позволяющих одновременно учитывать совокупность аллельных состояний микросателлитных локусов и внутрисортovou вариабельность индивидуальных генотипов.

Для этой цели могут быть использованы модели машинного обучения, основанные на классификации объектов (растений) по комплексу признаков. В настоящей работе для оценки возможности классификации индивидуальных растений по их сортовой принадлежности применен алгоритм Random Forest (RF) (Breiman, 2001). Выбор данного алгоритма обусловлен особенностями генотипических данных, характеризующихся высокой размерностью, категориальной природой признаков и неоднородностью внутрисортowego полиморфизма. Используемый метод не требует предположений о распределении признаков и устойчив к возможному выпадению аллелей, обеспечивая надежную классификацию сортов (Breiman, 2001; Cutler et. al., 2007).

В качестве обучающей выборки для построения модели RF использовали данные ДНК-профилей 53 сортов сои: 37 сортов селекции ВНИИМК категории ОС (Свидетельство о ... , № 2026622727) с выборками преимущественно по 47 растений и 16 сортов других оригинаторов с выборками по 23–30 растений.

Для анализа распределения правильных и ошибочных классификаций модель была применена к обезличенным ДНК-профилям растений обучающей выборки. Полученная модель RF показала высокую эффективность. При классификации растений обучающей выборки доля правильно отнесенных к соответствующим сортам растений (общая точность модели) составила 92 %, а точность с учетом случайных совпадений (коэффициент Каппа) – 0,918. Средняя ошибка предсказаний для объектов, не использованных в обучении деревьев (Out-of-bag error) составила 7,98 %, что свидетельствует о достаточно высокой классификационной способности модели при применении к новым данным. Полученные результаты предсказаний были визуализированы с помощью пакета ggplot2 с учетом оценки вероятности классов (уверенности в предсказании), отраженных цветом точек. Несмотря на то, что данный подход не является валидацией модели, он позволяет проанализировать структуру ошибочных классификаций и их связь с генетической неоднородностью сортов (рисунок 22).

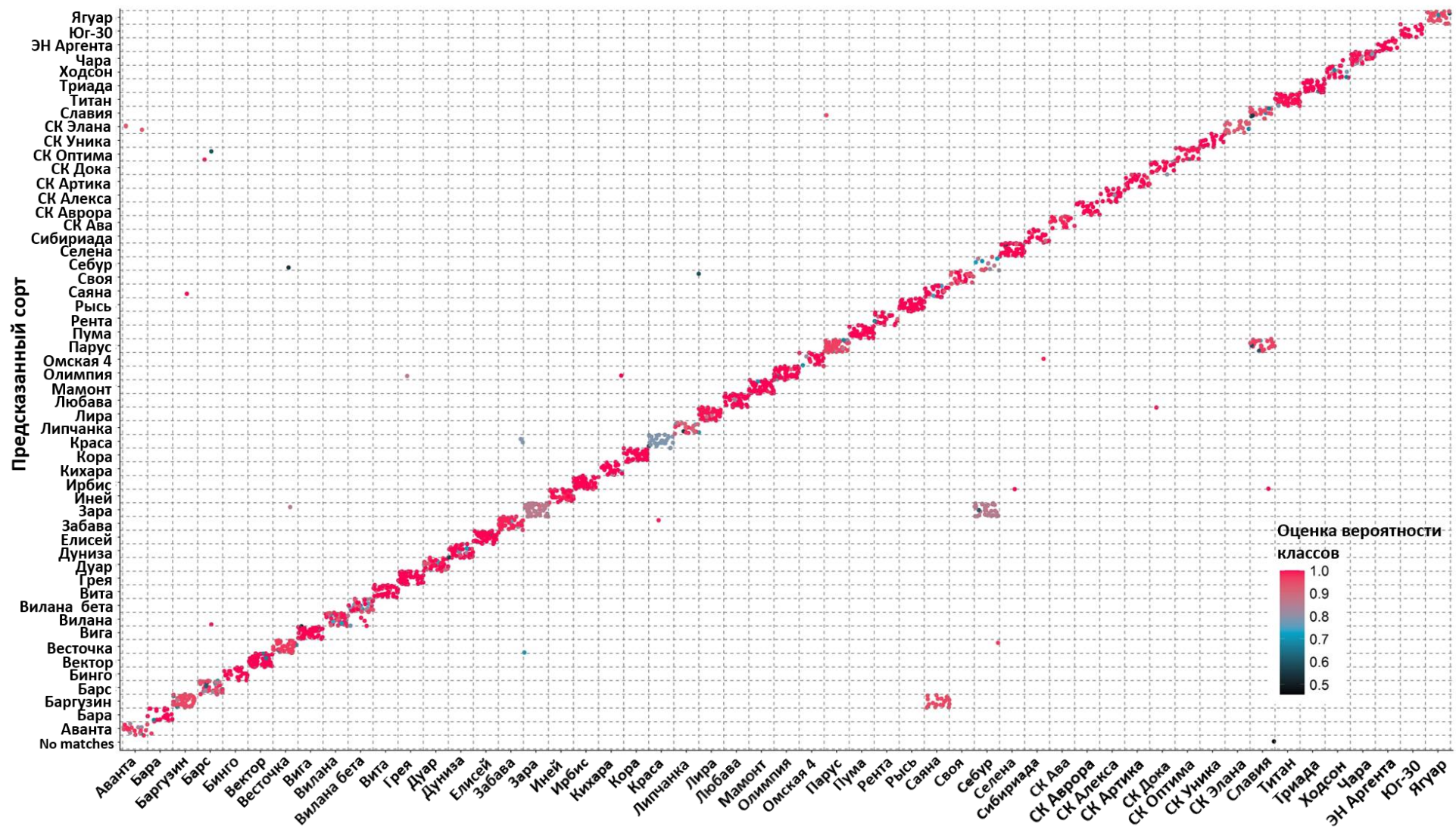


Рисунок 22 – Визуализация результатов классификации растений обучающей выборки по сортам сои

Результаты анализа показали, что, несмотря на генетическую неоднородность, характерную для всех изученных сортов, большинство растений были классифицированы верно в соответствии со своей сортовой принадлежностью. Например, все растения таких неоднородных сортов как Иней, Вилана и Дуар, имеющих в своей структуре 29, 27 и 24 биотипов соответственно (раздел 6.2), отнесены к данным сортам с вероятностью принадлежности выше 0,9 для большинства растений. Растения сортов Барс и Вилана бета, имеющих 34 и 25 биотипов, также отнесены верно по своей сортовой принадлежности, за исключением единичных растений, отнесенных к другим сортам (рисунок 22).

В ряде случаев классификация растений была затруднена из-за наличия в структуре этих сортов полностью идентичных биотипов (по 22 SSR-маркерам). Так, большинство растений сорта Себур моделью было классифицировано как Зара, и только малая часть отнесена к Себуру, что согласуется с результатами, полученными в предыдущем разделе. При этом уникальные биотипы, характерные только для данного сорта, отнесены к Себуру с более низкой оценкой вероятности классов, что обусловлено их низкой представленностью в обучающих данных.

Аналогичные результаты были получены для пар сортов: Саяна и Баргузин, Славия и Парус, что также соответствует результатам предыдущего раздела. Уникальные биотипы Славии и Саяны классифицируются по своей сортовой принадлежности, а общие – отнесены моделью к сортам, имеющим большую частоту встречаемости такого биотипа. Следовательно выявление биотипов, специфичных для одного из сравниваемых сортов повышает возможность их дифференциации. Но, вместе с тем, отсутствие такого биотипа в ограниченной выборке не может быть основанием для исключения сортовой принадлежности неизвестного анализируемого материала.

Также стоит отметить, что единичные растения были классифицированы моделью как принадлежащие к другим сортам. ДНК-профили растений, отнесенных к другому сорту с высокой оценкой вероятности (выражается в доле деревьев ансамбля, «проголосовавших» за определенный сорт), либо полностью совпадали с профилями растений предсказанного сорта, либо были ближе к ним по

аллельному составу, чем к исходному сорту. Растения, классифицированные с низкой оценкой вероятности представляют собой редкие биотипы, отсутствующие или малочисленно представлены в обучающей выборке. Поскольку алгоритм RF формирует предсказание для любых объектов, в том числе не представленных в обучающей выборке, в случае полного несовпадения ДНК-профиля растение все равно будет отнесено к одному из известных модели сортов, но с низкой оценкой вероятности классов. Такие растения могут быть обусловлены наличием в сорте редкого биотипа или механической примесью и требуют сопоставления с результатами анализа остальных растений соответствующей выборки. Только на основании результата классификации отдельного растения установить происхождения нетипичного ДНК-профиля невозможно, при оценке необходимо учитывать соотношение растений, отнесенных к заявленному сорту, другим сортам или оставшихся неидентифицированными, а также наличие общих и специфичных биотипов.

Далее была выполнена независимая валидация модели Random Forest (RF). Для проверки классификационной способности модели новых данных был проведен анализ независимой тестовой выборки. В нее вошли растения сортов, включенных в обучающую выборку, но представленных другими партиями семян, а также растения сортов, отсутствовавших в обучающей выборке. Таким образом, была проведена идентификация неизвестного семенного материала на основании полученных ДНК-профилей с последующей обработкой данных с помощью обученной модели RF. Данный эксперимент также моделирует принцип паспортизации и последующей идентификации сортов сои. В этом случае обучающая выборка будет соответствовать ДНК-профилям сортов, установленным при паспортизации, а анализируемые образцы – материалу, требующему определения сортовой принадлежности. Результаты представлены на рисунке 23.

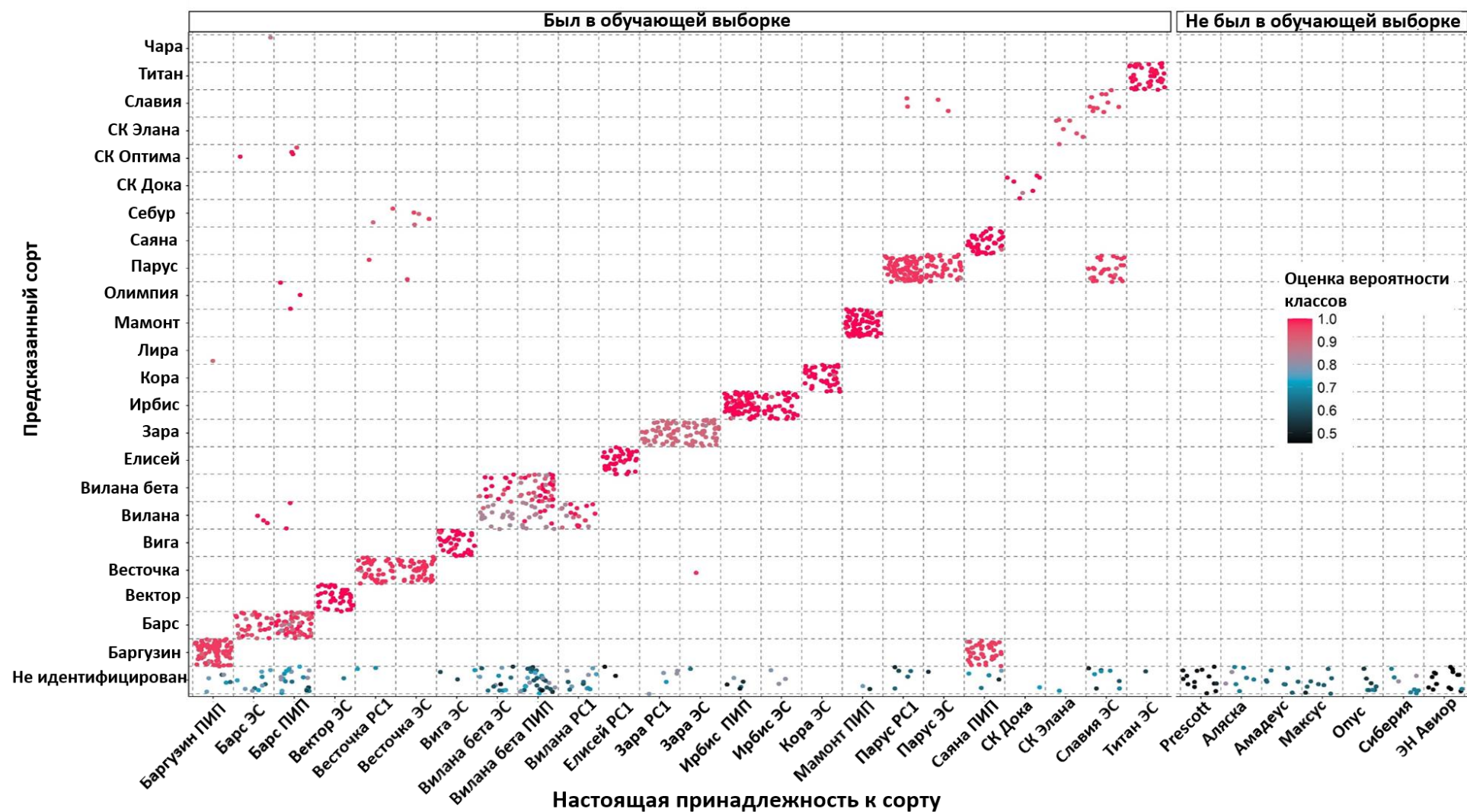


Рисунок 23 – Определение сортовой принадлежности с помощью технологии молекулярно-генетической идентификации сои и модели RF

Большинство растений сортов, представленных в обучающей выборке, были классифицированы верно, за исключением отдельных неидентифицированных растений (с оценкой вероятности классов ниже 0,7) или отнесенных к другим сортам. Наиболее выражено это проявлялось для растений сортов Барс, Вилана бета и Вилана. Это объясняется наличием в данных партиях семян биотипов, мало представленных или не представленных вовсе в обучающей выборке. Однако, несмотря на этот факт, остальные проанализированные растения данных сортов, а также остальных сортов, присутствующих в обучающей выборке, были классифицированы правильно.

Для всех растений сортов, не представленных в обучающей выборке (Прескотт, Аляска, Амадеус, Максус, Опус, Сибيريا и ЭН Авиор), оценки вероятности классов были ниже 0,7, что говорит об отсутствии их ошибочного отнесения к сортам, известным модели.

Применение алгоритма Random Forest позволило частично автоматизировать обработку данных генотипирования и классификацию ДНК-профилей индивидуальных растений по их сортовой принадлежности. Полученные результаты показали возможность использования модели RF для сопоставления индивидуальных ДНК-профилей с базой данных известных сортов. При этом точность классификации отдельных растений зависела от представленности соответствующих биотипов в обучающей выборке и наличия общих биотипов у разных сортов. Таким образом, RF может использоваться как аналитический инструмент при молекулярно-генетической идентификации сортов сои, однако результат классификации отдельного растения не должен рассматриваться как окончательное решение о сортовой принадлежности исследуемого материала. Идентификация сорта должна быть основана на совокупности результатов анализа выборки индивидуальных растений с учетом доли правильно классифицированных, неидентифицированных и нетипичных генотипов, а также состава общих и специфичных биотипов.

6.4 Идентификация гибридов F₁ сои с помощью разработанных мультиплексных систем SSR-маркеров

Идентификация гибридных растений на ранних этапах селекционного процесса повышает его эффективность, позволяя исключить из дальнейшей работы растения, сформировавшиеся в результате самоопыления, или ошибочно отнесенные к гибридам. Как отмечалось ранее, SSR-маркеры характеризуются кодоминантным типом наследования, что позволяет использовать их для подтверждения успешного прохождения искусственной гибридизации сои. С помощью разработанных мультиплексных систем из 22 SSR-маркеров были проанализированы 8 гибридных комбинаций, каждая из которых представлена 1–4 предполагаемыми гибридными растениями поколения F₁, а также растения родительских форм, непосредственно использованные в скрещиваниях (приложение А, группа 13, 14).

На рисунке 24 продемонстрирован принцип идентификации гибридных растений F₁ на примере гибридной комбинации Кубанская 4958/5 × ВНИИМК 9186/4 с помощью части используемых SSR-маркеров.

Как видно из представленных электрофореграмм родительские формы различаются аллелями локусов Satt507, Satt681 и Satt149. Аллели, соответствующие обеим родительским формам, по данным локусам обнаружены у анализируемых растений № 1 и 2. У растения № 3 отсутствуют аллели отцовской формы, а у растения № 4 по локусу Satt507 обнаружен аллель (220 п.н.), не выявленный ни у одного из родителей (рисунок 24).

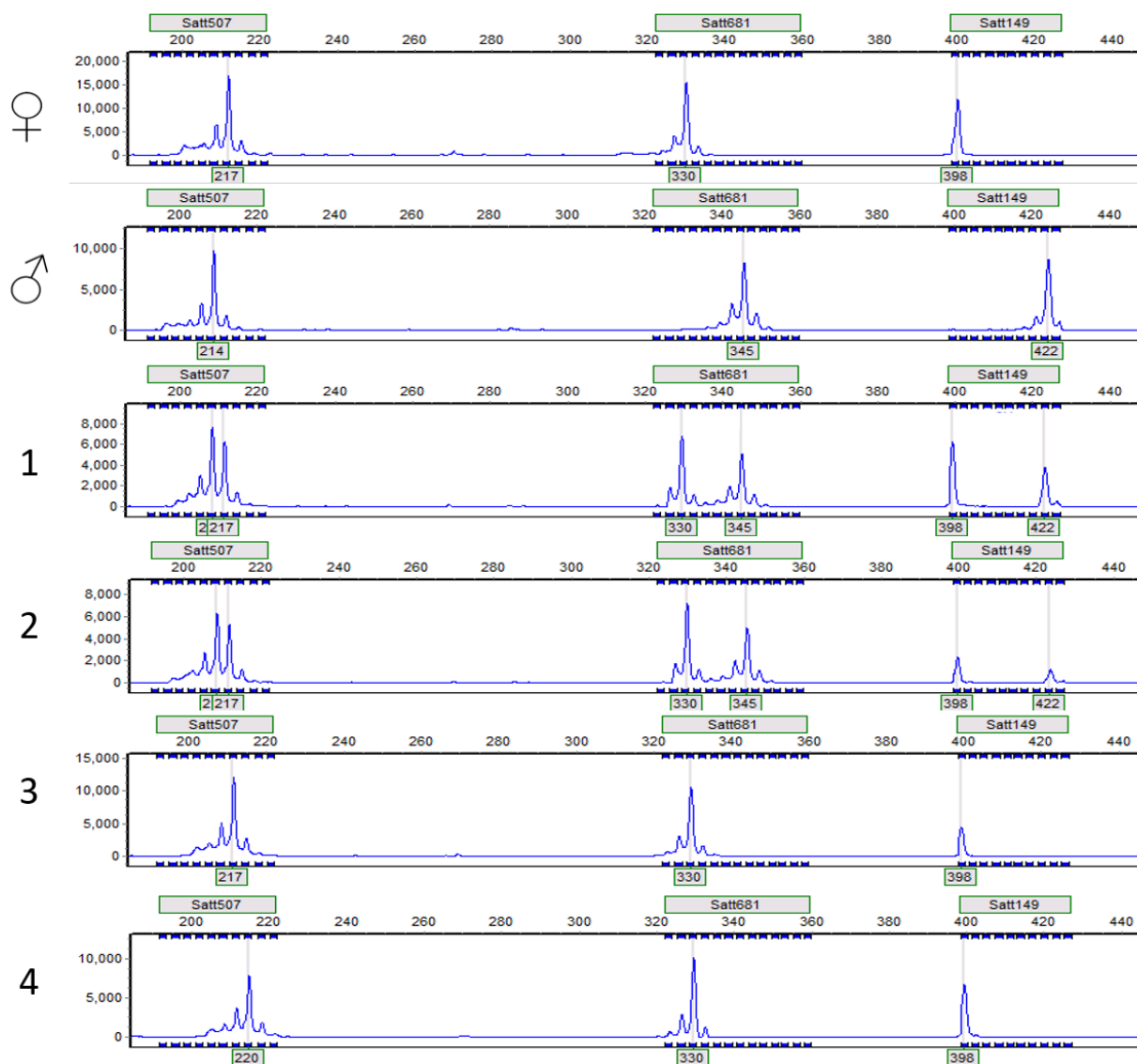


Рисунок 24 – Аллельные состояния SSR-локусов Satt507, Satt681 и Satt149:
 ♀ – Кубанская 4958/5; ♂ – ВНИИМК 9186/4; 1–4 – анализируемые растения
 (предполагаемые гибриды F₁)

В целом, родительские формы данной гибридной комбинации различались по 16 из 22 используемых микросателлитных локусов (таблица 12). Сравнение полученных ДНК-профилей подтвердило гибридное происхождение растений № 1 и 2 – по всем информативным для данной комбинации локусам выявлены оба родительских аллеля, по остальным аллели у родителей и гибридов идентичны. ДНК-профиль растения № 3 полностью соответствует профилю материнской формы при отсутствии аллелей отцовской, что свидетельствует о его происхождении в результате самоопыления растения Кубанская 4958/5. Растение № 4 не соответствует данной комбинации, поскольку по ряду локусов содержит

аллели, отсутствующие у обоих родителей (Satt507, Satt532, Satt141, AW277661, Satt181 и Satt353).

Растение, не соответствующее заявленной комбинации, также обнаружено у Дельта/2 × Славия/3 (растение № 1). Появление таких растений может быть связано с механическим загрязнением семенного материала, данные растения были исключены из числа предполагаемых гибридов.

Сформировавшиеся в результате самоопыления растения также были выявлены в комбинациях Дельта/5 × ВНИИМК 9186/1 (растения № 1 и 2) и Кубанская 4958/12 × Вилана/1 (растение № 2).

Для остальных анализируемых растений было установлено гибридное происхождение наличием аллелей обеих родительских форм по информативным локусам и совпадением аллельного состава по остальным локусам. Таким образом, с помощью разработанных систем SSR-маркеров было идентифицировано 10 гибридных растений, полученных от 8 комбинаций скрещиваний.

Таблица 12 – Проверка гибридных комбинаций сои

Анализируемые растения	Satt507	Satt681	Satt149	Satt532	Satt141	Satt614	Satt442	Satt263	Satt309	Satt359	Satt286	CSSR531	Satt596	Satt287	Satt197	AW277661	Satt181	Satt168	Satt549	Satt353	Satt292	Soyprp1
	Размер фрагмента ДНК, п.н.																					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
♀ Олимпия/11 × ♂ Славия/2																						
♀	220	333	398	165	277	475	192	329	261	354	466	117	255	390	205	275	331	199	299	233	294	387
♂	214	336	407	165	319	427	192	308	261	354	466	117	285	390	205	260	364	199	314	248	336	360
1	214/220	333/336	398/407	165	277/319	427/475	192	308/329	261	354	466	117	255/285	390	205	260/275	331/364	199	299/314	233/248	294/336	360/387
♀ Дельта/2 × ♂ Славия/3																						
♀	214	333	422	165	322	427	192	338	276	354	466	117	258	360	205	260	331	226	314	233	336	387
♂	214	333	407	165	319	427	192	308	261	354	466	117	285	390	205	260	364	199	314	248	336	360
1	217	333	407	165	319	409	192	338	261	348	466	117	240	360	205	275	364	199	299	248	336	360
2	214	333	407/422	165	319/322	427	192	308/338	261/276	354	466	117	258/285	360/390	205	260	331/364	199/226	314	233/248	336	360/387
3	214	333	407/422	165	319/322	427	192	308/338	261/276	354	466	117	258/285	360/390	205	260	331/364	199/226	314	233/248	336	360/387
♀ Дельта/4 × ♂ Вилана/1																						
♀	214	333	398/422	165	322	427	192	338	276	354	466	117	258	360	205	260	331	226	314	233	336	387
♂	217	339	398	162	331	475	192	338	261	348	451	117	240	390	205	260	373	211	314	233	294	387
1	214/217	333/339	398/422	162/165	322/331	427/475	192	338	261/276	348/354	451/466	117	240/258	360/390	205	260	331/373	211/226	314	233	294/336	387
♀ Дельта/5 × ♂ ВНИИМК 9186/1																						
♀	214	333	422	165	322	475	192	329	261/276	354	451	117	285	360	205	260	331/364	226	314	248	336	387
♂	214	345	422	174	322	448	189	311	354	348	457	102	243	360	202	257	331	229	314	233	336	360
1	214	333	422	165	322	475	192	329	276	354	451	117	285	360	205	260	331/364	226	314	248	336	387

Продолжение таблицы 12

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
2	214	333	422	165	322	475	192	329	261/ 276	354	451	117	285	360	205	260	364	226	314	248	336	387
♀ Кубанская 4958/4 × ♂ ВНИИМК9186/1																						
♀	217	333	398	165	277	415	192	329	261	354	466	117	258	390	205	260	331	229	314	248	294	387
♂	214	345	422	174	322	448	189	311	261	348	457	102	243	360	202	257	331	229	314	233	336	360
1	214/ 217	333/ 345	398/ 422	165/ 174	277/ 322	415/ 448	189/ 192	311/ 329	261	348/ 354	457/ 466	102/ 117	243/ 258	360/ 390	202/ 205	257/ 260	331	229	314	233/ 248	294/ 336	360/ 387
♀ Кубанская 4958/2 × ♂ ВНИИМК 9186/2																						
♀	214/ 217	333	398	165	322	475	192	338	261	354	451	120	258	390	205	260	364	199	299	233	294	360
♂	214	345	422	174	322	448	192	311	261	348	457	102	243	360	202	257	331	229	314	233	336	360
1	214	333/ 345	398/ 422	165/ 174	322	448/ 475	192	311/ 338	261	348/ 354	451/ 457	102/ 120	243/ 258	360/ 390	202/ 205	257/ 260	331/ 364	199/ 229	299/ 314	233	294/ 336	360
♀ Кубанская 4958/5 × ♂ ВНИИМК 9186/4																						
♀	217	330	398	162	277	415	189	329	261	348	451	117	258	390	205	257	331	229	299	233	294	387
♂	214	345	422	174	322	454	192	311	261	348	457	102	243	360	202	257	331	229	314	233	336/ 339	360
1	214/ 217	330/ 345	398/ 422	162/ 174	277/ 322	415/ 454	189/ 192	311/ 329	261	348	451/ 457	102/ 117	243/ 258	360/ 390	202/ 205	257	331	229	299/ 314	233	294/ 336	360/ 387
2	214/ 217	330/ 345	398/ 422	162/ 174	277/ 322	415/ 454	189/ 192	311/ 329	261	348	451/ 457	102/ 117	243/ 258	360/ 390	202/ 205	257	331	229	299/ 314	233	294/ 336	360/ 387
3	217	330	398	162	277	415	189	329	261	348	451	117	258	390	205	257	331	229	299	233	294	387
4	220	330	398	162/ 168	331	415	189	329	261	348	451	117	258	390	205	275	331/ 364	229	299	248	294	387
♀ Кубанская 4958/12 × ♂ Вилана/1																						
♀	217	330	398	162	277	415	189	338	261	348	451	117	258	390	205	257	331	229	299	233	294	387
♂	217	339	398	162	331	475	192	338	261	348	451	117	240	390	205	260	373	211	314	233	294	387
1	217	330/ 339	398	162	277/ 331	415/ 475	189/ 192	338	261	348	451	117	240/ 258	390	205	257/ 260	331/ 373	211/ 229	299/ 314	233	294	387
2	217	330	398	162	277	415	189	338	261	348	451	117	258	390	205	257	331	229	299	233	294	387
3	217	330/ 339	398	162	277/ 331	415/ 475	189/ 192	338	261	348	451	117	240/ 258	390	205	257/ 260	331/ 373	211/ 229	299/ 314	233	294	387

Проведенное исследование показало, что для каждой анализируемой комбинации был характерен индивидуальный набор SSR-маркеров, позволяющий различать их родительские формы. При анализе генотипов, не включенных в настоящее исследование, информативным может оказаться другой набор маркеров. В связи с этим необходимость формирования минимального набора маркеров, как предлагается, например, в патенте (Пат. № 2398883 Рос. Федерация), отсутствует. Для идентификации гибридных растений целесообразно применять полный набор маркеров, входящих в состав разработанных мультиплексных систем, без предварительного подбора для каждой конкретной комбинации. При этом маркеры, которые не различают родительские формы, могут служить дополнительным инструментом проверки принадлежности анализируемых растений к конкретной комбинации скрещивания. Так, выявление в предполагаемом гибридном растении аллелей, не соответствующих ни одной из родительских форм, может говорить о постороннем опылении, ошибке при высеве гибридных семян, маркировке образцов и других нарушениях.

Также стоит отметить, что в нескольких комбинациях в качестве родительских форм использовались растения одних и тех же сортов. Однако генотипирование показало различия в их ДНК-профилях как минимум по одному SSR-маркеру, что свидетельствует о наличии генетической неоднородности сортов. Полученные результаты подтверждают необходимость генотипирования непосредственно тех растений, которые использовались в скрещиваниях, для достоверной идентификации гибридов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что надежность молекулярно-генетической идентификации генотипов сои определяется информативностью используемой системы SSR-маркеров, стандартизацией условий получения и интерпретации ДНК-профилей. Выделение ДНК из частей зародыша семени позволяет исключить этап проращивания семян и получить препараты ДНК, пригодные для ПЦР. Капиллярный электрофорез обеспечивает необходимую разрешающую способность при разделении амплифицированных фрагментов. Разработанные две мультиплексные системы позволяют одновременно амплифицировать по 11 SSR-маркеров в каждой. В совокупности эти этапы обеспечивают точность и воспроизводимость результатов генотипирования, а также повышают пропускную способность анализа.

2. Изученные сорта сои характеризуются различной степенью внутрисортowego полиморфизма. Установлена ограниченная информативность смешанного ДНК-профиля, поскольку он не отражает полноту аллельного состава сорта и не позволяет выявлять биотипы и определять их частоту встречаемости. Сорт сои как объект молекулярно-генетической идентификации следует рассматривать как структурированную совокупность генотипических вариантов – биотипов.

3. Межсортová дифференциация сои определяется не только преобладающими ДНК-профилями, но и биотипным составом всей выборки. Наличие общих биотипов у разных сортов ограничивает возможность идентификации по единичному растению, тогда как малочисленные специфичные биотипы могут иметь существенное значение для сортовой идентификации. Поэтому идентификация сорта должна быть основана на сопоставлении выборок индивидуальных растений.

4. Показана возможность частичной автоматизации сопоставления ДНК-профилей при молекулярно-генетической идентификации сортов сои с помощью алгоритма Random Forest (RF). Однако результат классификации отдельного

растения зависит от представленности соответствующего биотипа в обучающей выборке и не является окончательным заключением о сортовой принадлежности исследуемого материала. Идентификация сорта должна быть основана на совокупности результатов анализа выборки индивидуальных растений с учетом соотношения правильно классифицированных, неидентифицированных и нетипичных генотипов, а также состава общих и специфичных биотипов.

5. Ввиду наличия внутрисортного полиморфизма у сои при идентификации гибридов F_1 необходимо анализировать родительские растения, непосредственно использованные в скрещивании. Информативность SSR-маркеров определяется различием в аллельном составе конкретных родительских форм, применение полного набора маркеров из разработанных мультиплексных систем позволяет выявлять истинные и ложные гибриды без предварительного подбора маркеров для каждой отдельной комбинации.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ДЛЯ СЕЛЕКЦИОННОЙ ПРАКТИКИ

1. Внедрить разработанную технологию молекулярно-генетической идентификации сортов сои в практику селекционно-семеноводческих центров и испытательных лабораторий для решения задач сортового контроля (патент на изобретение № 2871306).

2. Использовать алгоритм классификации Random Forest для обеспечения частичной автоматизации процедуры сопоставления ДНК-профилей сортов сои и повышения воспроизводимости результатов идентификации.

3. Применять разработанные системы SSR-маркеров в селекционном процессе для идентификации исходного материала, включая отбор и выявление биотипов, подтверждение гибридности.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дНТФ – дезоксирибонуклеозидтрифосфаты

ОКО – отрицательный контрольный образец

ООС – отличимость, однородность, стабильность

ОС – оригинальные семена

ПААГ – полиакриламидный гель

ПИП – питомник испытания потомств (подкатегория оригинальных семян)

ПКО – положительный контрольный образец

ПЦР – полимеразная цепная реакция

п.н. – пары нуклеотидов

мкл – микролитр

мМ – миллимоль

нг – нанограмм

НИР – научно-исследовательская работа

НК – нуклеиновые кислоты

пкМ – пикомоль

РНК – рибонуклеиновая кислота

РС – репродукционные семена

ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК – Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В. С. Пустовойта»

ЦТАБ (СТАВ) – цетилтриметиламмония бромид

ЭС – элитные семена

H_o – гетерозиготность наблюдаемая

H_e – гетерозиготность ожидаемая

RF – Random Forest, метод Случайного Леса

SSR – Simple Sequence Repeats, простые повторяющиеся последовательности, микросателлиты

PIC – Polymorphic Information Content, индекс полиморфного информационного содержания

N_a – наблюдаемое число аллелей

N_e – эффективное число аллелей

T_a – температура отжига праймеров

T_m – температура плавления праймеров

UPGMA – Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, Метод невзвешенного попарного среднего

UPOV – International Union for the Protection of new Varieties of plants, Международный союз по охране новых сортов растений

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абугалиева, С. И., ДНК-фингерпринтинг сортов сои Казахстана с использованием микросателлитных маркеров / С. И. Абугалиева, Л. А. Волкова, А. А. Нурланова [и др.] // Биотехнология. Теория и практика. – 2013. – № 3. – С. 23–35.
2. Анискина, Ю. В. Мультиплексная система микросателлитного анализа для исследования интрогрессии фрагментов А-, В-, С-геномов у видов рода *Brassica* L. при отдаленной гибридизации / Ю. В. Анискина, Д. А. Родионова, О. Н. Зубко [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2020. – Т. 55. – № 3. – С. 510–522. DOI: 10.15389/agrobiology.2020.3.510rus
3. Антонова, О. Ю. SSR-анализ современных российских сортов картофеля с использованием ДНК номенклатурных стандартов / О. Ю. Антонова, Н. С. Клименко, Д. А. Рыбаков [и др.] // Биотехнология и селекция растений. – 2020. – Т. 3. – № 4. – С. 77–96. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-4-02
4. Асеева, Т. А. Генетическое разнообразие сортов сои селекции Дальневосточного научно-исследовательского института сельского хозяйства / Т. А. Асеева, О. Л. Шепель, С. А. Рамазанова [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2024. – Т. 38. – № 4. – С. 45–50. DOI: 10.53859/02352451_2024_38_4_45
5. Балановский, О. П. Методы измерения концентрации ДНК: совпадение относительных величин и различия абсолютных / О. П. Балановский, Ж. А. Кагазежева, М. В. Олькова // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2019. – № 3. – С. 27–33. DOI: 10.24075/vrgmu.2019.043
6. Базанов, Т. А. Практическое применение SSR-маркеров в селекции льна (*Linum usitatissimum* L.) / Т. А. Базанов, И. В. Ущаповский, Т. А. Рожмина [и др.] // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2025. – Т. 26. – № 6. – С. 1251–1262. DOI: 10.30766/2072-9081.2025.26.6.1251-1262
7. Баташова, М. Е. Идентификация линий озимой пшеницы методом молекулярных маркеров AFLP / М. Е. Баташова, М. М. Онищенко, Н. М. Чекалин

// Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты: материалы междунар. науч. конф., 3-6 дек. 2008 г., Минск. Изд. Центр БГУ, – 2008. – С. 40–43.

8. Беленикин, М. С. Оценка воспроизводимости флуориметрического измерения концентрации ДНК / М. С. Беленикин, А. А. Галахова, Е. В. Балановская [и др.] // Генетика. – 2018. – Т. 54. – № 13. – С. 113–116. DOI: 10.1134/S0016675818130040

9. Богдан, В. З. Генетическая паспортизация новых сортов льна-долгунца белорусской селекции с использованием молекулярных маркеров / В. З. Богдан, В. А. Лемеш, М. В. Богданова [и др.] // Земледелие и растениеводство. – 2022. – № 6. – С. 48–52.

10. Бондаренко, О. Н. Опыт использования системы паспортизации в установлении сортовой принадлежности сои / О. Н. Бондаренко, А. А. Иваний, А. А. Пензин // Вестник Чувашского государственного аграрного университета. – 2025. – № 1 (32). – С. 7–14. DOI: 10.48612/vch/xxxa-gr7g-5kf7

11. Бондаренко, О. Н. Подбор микросателлитных локусов ДНК для создания молекулярно-генетических паспортов диких форм и сортов сои амурской селекции / О. Н. Бондаренко, А. А. Блинова, Л. Е. Иваченко [и др.] // Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. – 2022. – № 2 (222). – С. 37–48. DOI: 10.37102/0869-7698_2022_222_02_3

12. Бондаренко, О. Н. Расширение набора информативных SSR-праймеров для изучения генетического разнообразия сортов сои / О. Н. Бондаренко // Агронаука. – 2024. – Т. 2. – № 2. – С. 69–77. DOI: 10.24412/2949-2211-2024-2-2-69-77

13. Бочарова, Д. В. Изучение влияния напряжения электрического поля на эффективность разделения одноцепочечных фрагментов ДНК при капиллярном гель-электрофорезе в полимерах на основе линейного поли-N, N,-диметилакриламида / Д. В. Бочарова, Я. И. Алексеев, В. Е. Курочкин // Журнал аналитической химии. – 2020. – Т. 75. – № 12. – С. 1148–1152. DOI: 10.31857/S0044450220100035

14. Векленко, В. И. Производство соевого масла в мире и России / В. И. Векленко, Б. А. Дадашев // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2024. – № 2. – С. 192–197.
15. Вологирова, Ж. М. Соевые бобы – уникальная культура / Ж. М. Вологирова. – Нальчик : Ridero, 2024. – 108 с.
16. Гавриленко, Т. А. Номенклатурные стандарты современных российских сортов картофеля, хранящиеся в гербарии ВИР (WIR): новые подходы к регистрации сортового генофонда в генбанках / Т. А. Гавриленко, И. Г. Чухина // Биотехнология и селекция растений. – 2020. – № 3 (3). – С. 6–17. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-3-o2
17. Гавриленко, Т. А. Новые подходы к регистрации и сохранению отечественных сортов ягодных культур в генбанке ВИР на примере малины обыкновенной и смородины черной / Т. А. Гавриленко, С. Е. Дунаева, О. А. Тихонова [и др.] // Биотехнология и селекция растений. – 2022. – № 5 (4). – С. 24–38. DOI: 10.30901/2658-6266-2022-4-o5
18. Галактионова, У. А. Специфические проблемы при выделении геномной ДНК из растений: пути решения / У. А. Галактионова, В. Н. Большаков, М. Ю. Тиходеева [и др.] // Ботанический журнал. – 2023. – Т. 108. – № 6. – С. 603–614. DOI: 10.31857/S0006813623060030
19. Галинская, Т. В. Предубеждения о микросателлитных исследованиях и как им противостоять / Т. В. Галинская, Д. М. Щепетов, С. Н. Лысенков // Генетика. – 2019. – Т. 55. – № 6. – С. 617–632.
20. Гарафутдинов, Р. Р. Разнообразие праймеров для ПЦР и принципы их подбора / Р. Р. Гарафутдинов, А. Х. Баймиев, Г. В. Малеев [и др.] // Биомика. – 2019. – Т. 11. – № 1. – С. 23–70.
21. Гайнуллина, К. П. Оценка генетического разнообразия сортов и линий гороха с помощью SSR-анализа / К. П. Гайнуллина, Б. Р. Кулуев, Ф. А. Давлетов // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2020. – № 181 (3). – С. 70–80. DOI: 10.30901/2227-8834-2020-3-70-80

22. Глазко, В. И. ДНК маркеры и «микросателлитный код» (обзор) / В. И. Глазко, Г. Ю. Косовский, Т. Т. Глазко [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2023. – Т. 58. – № 2. – С. 223–248. DOI: 10.15389/agrobiology.2023.2.223rus

23. Головатская, А. В. Оценка генетического разнообразия линий подсолнечника селекции ВНИИМК на основе мультиплексного микросателлитного анализа / А. В. Головатская, С. З. Гучетль // Аграрная наука. – 2024. – № 11. – С. 117–121. DOI: 10.32634/0869-8155-2024-388-11-117-121

24. Головатская, А. В. Сравнительная оценка эффективности способов выделения ДНК из разного растительного материала подсолнечника с применением готовых наборов для экстракции / А. В. Головатская, С. З. Гучетль, Д. Л. Савиченко // Достижения науки и техники АПК. – 2025. – Т. 39. – № 2. – С. 44–51. DOI: 10.53859/02352451_2025_39_2_44

25. Гориславец, С. М. Генотипирование сортов винограда селекции Института «Магарач» на основе анализа аллельного полиморфизма SSR локусов / С. М. Гориславец, В. А. Володин, Г. Ю. Спотарь [и др.] // "Магарач". Виноградарство и виноделие. – 2019. – Т. 21. – № 4. – С. 289–293. DOI: 10.35547/iM.2019.21.4.002

26. Государственный реестр сортов и гибридов сельскохозяйственных растений, допущенных к использованию [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://gossortrf.ru/registry/gosudarstvennyy-reestr-seleksionnykh-dostizheniy-dopushchennykh-k-ispolzovaniyu-tom-1-sorta-rasteni/> (дата обращения: 02.02.2026).

27. Гучетль, С. З. Исследование качества ДНК для полимеразной цепной реакции, экстрагированной разными способами из подсолнечника / С. З. Гучетль, М. Л. Золотавина, А. А. Григорьян [и др.] // Масличные культуры. – 2021. – № 1 (185). – С. 32–42. DOI: 10.25230/2412–608X–2021–1–185–32–42

28. Гучетль, С. З. Некоторые особенности определения генетической чистоты линий и гибридов подсолнечника методом изоферментного анализа / С. З. Гучетль, Т. А. Челюстникова, Т. С. Антонова // Масличные культуры. Научно-

технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2015. – № 4 (164). – С. 14–19.

29. Гучетль, С. З. Разработка высокоинформативных микросателлитных маркеров для генетического анализа подсолнечника / С. З. Гучетль, А. В. Головатская, Д. Л. Савиченко [и др.] // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2025. – Т. 186. – № 4. – С. 142–154. DOI: 10.30901/2227-8834-2025-4-142-154

30. Должикова, М. А. ДНК-паспортизация сортов смородины красной зарубежной селекции биоресурсной коллекции ВНИИСПК с применением SSR-маркеров / М. А. Должикова, А. В. Пикунова, А. А. Павленко [и др.] // Современное садоводство. – 2023. – № 4. – С. 1–11. DOI: 10.52415/23126701_2023_0401

31. Дубина, Е. В. Разработка методической схемы оценки гибридности семян F1 *Brassica oleracea* L., основанной на полиморфизме микросателлитных ДНК-маркеров / Е. В. Дубина, С. В. Королева, С. В. Гаркуша [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2016а. – Т. 30. – № 8. – С. 49–51.

32. Дубина, Е. В. Использование SSR-маркеров для оценки уровня гибридности семян сладкого перца / Е. В. Дубина, С. В. Королева, С. В. Гаркуша // Достижения науки и техники АПК. – 2016б. – Т. 30. – № 8. – С. 42–44.

33. Заруцкий, И. В. Метод поиска пиков размерного стандарта при фрагментном анализе ДНК / И. В. Заруцкий, В. В. Манойлов, Н. С. Самсонова [и др.] // Журнал технической физики. – 2018. – Т. 88. – Вып. 9. – С. 1407–1412.

34. Зеленцов, С. В. Методические основы селекционного процесса у сои и его улучшающие модификации во ВНИИМК / С. В. Зеленцов // Масличные культуры. – 2020. – № 2 (182). – С. 40–47.

35. Зеленцов, С. В. Нежелательные морфологические признаки цветка в селекции облигатно самоопыляющихся сортов сои / С. В. Зеленцов, Е. В. Мошненко // Масличные культуры. – 2019. – № 3 (179). – С. 40–47.

36. Зеленцов, С. В. Среднеранний теневыносливый сорт сои Вилана бета / С. В. Зеленцов, Е. В. Мошненко, Л. А. Бубнова [и др.] // Масличные культуры. – 2020. – № 1 (181). – С. 140–146. DOI: 10.25230/2412-608X-2020-1-181-140-146

37. Зеленцов, С. В. Среднеранний сорт сои Барс / С. В. Зеленцов, Е. В. Мошненко, Г. М. Саенко [и др.] // Масличные культуры. – 2019. – № 1 (177). – С. 138–142. DOI: 10.25230/2412-608X-2019-1-177-138-142
38. Зими́на, О. В. Мультиплексная полимеразная цепная реакция для генотипирования экотипов *Arabidopsis thaliana* с помощью SSLP-маркеров / О. В. Зими́на, Е. С. Сытник, М. Ф. Парий [и др.] // Biotechnologia acta. – 2014. – Т. 7. – № 4. – С. 80–84.
39. Зубов, В. В. Варианты ПЦР с более чем двумя праймерами. II. Принцип и особенности мультиплексной ПЦР / В. В. Зубов, А. Р. Сахабутдинова, Д. А. Чемерис [и др.] // Биомика. – 2024. – Т. 16. – № 2. – С. 234–243. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2024-14
40. Иваний, А. А. Генотипическая кластеризация 51 сорта культурной и форм дикой сои с использованием SSR-маркеров / А. А. Иваний, А. А. Пензин, О. Н. Бондаренко [и др.] // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. – 2025. – Т. 20. – № 1. – С. 88–101. DOI: 10.22363/2312-797X-2025-20-1-88-101
41. Ильницкая, Е. Т. Генетический полиморфизм аборигенных абхазских сортов винограда / Е. Т. Ильницкая, М. В. Макаркина, И. В. Степанов [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2022. – Т. 25. – № 8. – С. 797–804. DOI: 10.18699/VJ21.092
42. Календарь, Р. Н. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение / Р. Н. Календарь, В. И. Глазко // Физиология и биохимия культурных растений. – 2002. – Т. 34. – № 4. – С. 279–296.
43. Канукова, К. Р. ДНК-маркеры в растениеводстве / К. Р. Канукова, И. Х. Газаев, Л. К. Сабанчиева [и др.] // Известия Кабардино-Балкарского научного центра РАН. – 2019. – № 6 (92). – С. 220–232. DOI: 10.35330/1991-6639-2019-6-92-220-232
44. Кирьянова, О. Ю. Моделирование поиска праймеров в цепи ДНК / О. Ю. Кирьянова, А. В. Чемерис // Сборник трудов ИТНТ-2019, САМАРА, 21-24 мая 2019 года. Том 3. – САМАРА: Новая техника, 2019. – С. 774–778.

45. Кирьянова, О. Ю. Мультиплексный In silico RAPD-анализ ряда родственных растений с отличающимися размерами геномов и перспективы такого подхода для ДНК-паспортизации сортов сельскохозяйственных растений / О. Ю. Кирьянова, Б. Р. Кулуев, А. Р. Кулуев [и др.] // Биомика. – 2020. – Т. 12. – № 2. – С. 194–210. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-10

46. Клименко, И. А. Генетическая паспортизация российских сортов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) на основе SSR- и SRAP-маркеров / И. А. Клименко, А. О. Шамустакимова, В. А. Душкин [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2023. – Т. 58. – № 3. – С. 494–509. DOI: 10.15389/agrobiology.2023.3.494rus

47. Клименко, И. А. Изучение генетического разнообразия кормовых культур с помощью молекулярных ДНК-маркеров / И. А. Клименко, Н. Н. Козлов, А. О. Шамустакимова [и др.] // Адаптивное кормопроизводство. – 2019. – № 4. – С. 89–100.

48. Климущина, М. В. От полиморфизма к практике: SSR-маркеры как инструмент контроля гибридности и внутрисортовой гетерогенности сои / М. В. Климущина, П. Ю. Крупин, М. А. Самарина [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2025а. – Т. 39. – № 7. – С. 48–53. DOI: 10.53859/02352451_2025_39_7_48

49. Климущина, М. В. Разработка набора SSR-маркеров для сортовой идентификации сои / М. В. Климущина, М. А. Самарина, Д. С. Ульянов [и др.] // Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений (PlantGen2025) : Тезисы докладов 8-ой Международной научной конференции, Новосибирск, 02–05 июля 2025 года. – Новосибирск: Федеральный исследовательский центр институт цитологии и генетики СО РАН, 2025б. – С. 111. DOI: 10.18699/PlantGen-2025-111

50. Кочегура, А. В. Эффективность гибридизации сои в условиях юга европейской части России / А. В. Кочегура, М. В. Трунова, А. А. Ткачева // Масличные культуры. – 2016. – № 2 (166). – С. 50–56.

51. Колобова, О. С. Генетическая паспортизация картофеля на основе мультиплексного анализа 10 микросателлитных маркеров / О. С. Колобова,

О. П. Малюченко, Т. В. Шалаева [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – № 21 (1). – С. 124–127. DOI: 10.18699/VJ17.230

52. Кулибаба, Р. А. К вопросу об образовании конформационных химерных молекул в процессе амплификации динуклеотидных tandemных повторов / Р. А. Кулибаба, Ю. В. Ляшенко // Молекулярная и прикладная генетика. – 2017. – Т. 22. – С. 34–42.

53. Кулуев, Б. Р. Методы ПЦР для выявления мультилокусного полиморфизма ДНК у эукариот, основанные на случайном праймировании / Б. Р. Кулуев, А. Х. Баймиев, Г. А. Геращенко [и др.] // Генетика. – 2018. – Т. 54. – № 5. – С. 495–511. – DOI: 10.7868/S0016675818050016

54. Кутлунина, Н. А. Молекулярно-генетические методы в исследовании растений : учеб.-метод. пособие / Н. А. Кутлунина, А. А. Ермошин ; М-во образования и науки Рос. Федерации, Урал. федер. ун-т. – Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2017. – 142 с.

55. Лаврентьева, С. И. Оценка молекулярно-генетического полиморфизма сои Дальневосточного региона / С. И. Лаврентьева, О. Н. Бондаренко, А. А. Блинова [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2023. – Т. 37. – № 6. – С. 12–18. DOI: 10.53859/02352451_2023_37_6_12

56. Лаврентьева, С. И. SSR-генотипирование сортов сои Дальневосточной селекции для выявления степени их генетического родства / С. И. Лаврентьева, П. Д. Тимкин, А. А. Иванов [и др.] // Агронаука. – 2024. – Т. 2. – № 1. – С. 49–60. DOI: 10.24412/2949-2211-2024-2-1-49-60

57. Логинова, Е. Д. Подбор оптимального способа выделения ДНК из рыжика посевного (*Camelina sativa* (L.) Crantz) / Е. Д. Логинова, С. А. Рамазанова, С. З. Гучетль [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2024. – Т. 38. – № 12. – С. 11–17. DOI: 10.53859/02352451_2024_38_12_11

58. Лукомец, В. М. Особенности технологии интенсивно-адаптивной селекции сои для регионов России с нестабильным влагообеспечением на примере нового среднераннего сорта Вектор / В. М. Лукомец, С. В. Зеленцов, М. В. Трунова

[и др.] // Масличные культуры. – 2026. – № 1 (205). – С. 6–18. DOI: 10.25230/2412-608X-2026-1-205-6-18

59. Лукомец, В. М. Теоретическое обоснование возможности отбора перспективных особей в сортовых популяциях самоопылителей на примере сои / В. М. Лукомец, С. В. Зеленцов, Е. В. Мошненко // Масличные культуры. – 2021. – № 2 (186). – С. 31–40. DOI: 10.25230/2412-608X-2021-2-186-31-40

60. Лысенкова, А. А. Методический подход к построению классификационной модели сортов сои по географическому региону селекции с использованием SSR-маркеров / А. А. Лысенкова, Ю. Т. Платов, Р. А. Платова [и др.] // Пищевая промышленность. – 2026. – № 2. – С. 38–45. DOI: 10.52653/PPI.2026.2.2.008

61. Мазкират, Ш. Использование кодоминантных белковых и ДНК маркеров в идентификации F1 гибридного потомства сои / Ш. Мазкират, Д. И. Бабисекова, С. В. Дидоренко [и др.] // Вестник КазНУ. Серия биологическая. – 2023. – Т. 95. – № 2. – С. 84–94. DOI: 10.26577/eb.2023.v95.i2.08

62. Марамохин, Э. В. Проблемы деградации ДНК при создании геномных библиотек на примере *Glycine max* (L.) Merr / Э. В. Марамохин, А. С. Дюкова, С. А. Зонтикова [и др.] // Новости науки в АПК. – 2019. – № 3 (12). – С. 343–347. DOI: 10.25930/2218-855X/088.3.12.2019

63. Методика проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность. Соя (*Glycine max* (L.) Merrill). [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://gossortrf.ru/publication/metodiki-ispytaniy-na-oos.php> (дата обращения: 22.05.2025).

64. Методика проведения лабораторного сортового контроля по группам сельскохозяйственных растений / А. А. Поморцев, А. М. Кудрявцев, В. В. Упельник [и др.] ; Министерство сельского хозяйства Российской Федерации. – Москва : Российский научно-исследовательский институт информации и технико-экономических исследований по инженерно-техническому обеспечению агропромышленного комплекса, 2004. – 96 с.

65. Модоров, М. В. Разработка мультиплексного набора микросателлитных маркеров для генетической идентификации черной смородины (*Ribes nigrum* L.) / М. В. Модоров, О. А. Киселева, М. А. Полежаева, Е. М. Чеботок // Биотехнология и селекция растений. – 2024. – Т. 7. – № 4. – С. 68–81. DOI: 10.30901/2658-6266-2024-4-06

66. Молекулярно-генетическая паспортизация сортов сои: методические рекомендации / В. Г. Савиченко, С. З. Гучетль, С. А. Рамазанова. – Краснодар: ООО «Просвещение-Юг», 2026. – 36 с.

67. Налбандян, А. А. ДНК-маркеры в селекции сахарной свеклы / А. А. Налбандян, Т. П. Федулова, И. В. Черепухина [и др.] // Сахарная свекла. – 2021. – № 2. – С. 10–14. DOI: 10.25802/SB.2021.57.87.001

68. Налбандян, А. А. Молекулярно-генетическая идентификация и паспортизация гибридов сахарной свеклы с использованием микросателлитных маркеров / А. А. Налбандян, Т. П. Федулова, И. В. Черепухина [и др.] // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2024. – № 4. – С. 70–88.

69. Нигматуллина, Н. В. Молекулярные маркеры, применяемые для определения генетического разнообразия и видоидентификации дикорастущих растений / Н. В. Нигматуллина, А. Кулуев, Б. Р. Кулуев // Биомика. – 2018. – Т. 10. – № 3. – С. 290–318.

70. Омашева, М. Е. Молекулярные маркеры. Причины и последствия ошибок генотипирования / М. Е. Омашева, К. П. Аубакирова, Н. А. Рябушкина // Биотехнология. Теория и практика. – 2013. – № 4. – С. 20–28.

71. Определение сортовой принадлежности семян сои на основе микросателлитного анализа: методические рекомендации / В. А. Волков, А. В. Вайман, Е. К. Потокина. – Санкт-Петербург, 2017. – 19 с.

72. Орлов, М.А. Короткие tandemные повторы / М. А. Орлов // Природа. – 2019. – № 12 (1252). – С. 25–31. DOI: 10.7868/S0032874X19120044.

73. Патент № 2388828 С1 Российская Федерация, МПК C12Q 1/68, A01H 1/04. способ идентификации сортов сои на основе микросателлитных (SSR) маркеров : № 2008142788/13 : заявл. 28.10.2008 : опубл. 10.05.2010 / Т. С. Антонова,

С. А. Рамазанова, С. З. Гучетль [и др.] ; заявитель Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта Российской академии сельскохозяйственных наук.

74. Патент № 2398883 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68. Способ выделения гибридных растений сои с использованием микросателлитных (SSR) локусов ДНК : № 2009107476/13 : заявл. 02.03.2009 : опубл. 10.09.2010 / С. А. Рамазанова, С. З. Гучетль, Т. А. Челюстникова [и др.] ; заявитель Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта Российской академии сельскохозяйственных наук.

75. Патент № 2671678 С2 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68. Способ генетической паспортизации селекционных достижений малины на основе RAPD-маркеров : № 2017112958 : заявл. 14.04.2017 : опубл. 06.11.2018 / В. Г. Лебедев, Д. И. Каган, Е. О. Видягина ; заявитель Общество с ограниченной ответственностью "ФИЛАГР" (ООО "ФИЛАГР").

76. Патент № 2833968 С1 Российская Федерация, МПК С12N 15/10. Способ высокопроизводительного выделения ДНК из проростков сои : заявл. 11.04.2024 : опубл. 03.02.2025 / Н. В. Злобнова, Л. А. Назарова ; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии".

77. Патент № 2839697 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68. Способ молекулярно-генетической идентификации сортов и линий сои : заявл. 01.11.2024 : опубл. 12.05.2025 / М. Г. Дивашук, П. Ю. Крупин, Г. И. Карлов [и др.] ; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии".

78. Петибская, В. С. Соя: химический состав и использование / под редакцией В. М. Лукомца. Майкоп: ОАО «Полиграф-ЮГ», 2012. 432 с.

79. Печенкина, В. А. Выявление эффективных праймеров для сортов озимой ржи *Secale cereale* L / В. А. Печенкина, А. И. Вшивкова, И. А. Тарбеев [и др.] //

Аграрный научный журнал. – 2023. – № 6. – С. 46–50. DOI: 10.28983/asj.y2023i6pp46-50

80. Полиданов, М. А. Методика электрофореза в агарозном геле / М. А. Полиданов, И. С. Блохин, А. А. Скороход [и др.] // Modern Science. – 2020. – № 3 (2). – С. 69–72.

81. Попова, А. С. Сравнительный анализ методов ускоренного выделения ДНК из растительного материала / А. С. Попова, А. О. Старухина, В. Г. Зайцев // Научно-агрономический журнал. – 2021. – № 2 (113). – С. 28–33. DOI: 10.34736/FNC.2021.113.2.004

82. Потехин, Г. А. Молекулярно-генетические методы идентификации сельскохозяйственных культур / Г. А. Потехин // Теория и практика современной аграрной науки : Сборник V национальной (всероссийской) научной конференции с международным участием, Новосибирск, 28 февраля 2022 года. – Новосибирск: Издательский центр Новосибирского государственного аграрного университета "Золотой колос", 2022. – С. 180–183.

83. Приказ Министерства сельского хозяйства РФ от 26.10.2023 № 814 «Об утверждении формы генетического паспорта». [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://faolex.fao.org/docs/pdf/rus222976.pdf> (дата обращения: 19.05.2025).

84. Распоряжение Правительства РФ от 23.12.2022 № 4133-р «Об утверждении перечня основных сельскохозяйственных культур и ежегодных плановых значений уровня самообеспечения страны семенами отечественной селекции по каждой из таких культур (до 2030 года), а также перечня основных видов сельскохозяйственных животных и ежегодных плановых значений уровня самообеспечения страны племенной продукцией (материалом) отечественного производства по каждой из таких видов до 2030 года». [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202212240015?ysclid=m18gxсар44861125885> (дата обращения: 19.05.2025).

85. Распоряжение Правительства РФ «О перечне родов и видов сельскохозяйственных растений, производство и выращивание которых

направлено на обеспечение продовольственной безопасности Российской Федерации» от 08.12.2022 (в ред. 03.08.2023) // Собрание законодательства РФ (ч. IV). – 12.12.2022. № 50. ст. 9049. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1300202338?section=status> (дата обращения: 19.05.2025).

86. Рамазанова, С. А. Внутрисортной полиморфизм сортов сои селекции ВНИИМК / С. А. Рамазанова, С. З. Гучетль, Т. А. Челюстникова [и др.] // Масличные культуры. – 2009. – № 2 (141). – С. 96–98.

87. Рамазанова, С. А. Изучение генетического разнообразия сортов сои разного происхождения с использованием микросателлитных локусов / С. А. Рамазанова, В. Г. Савиченко, С. З. Гучетль // Агронаука. – 2023а. – Т. 1. – № 1. – С. 96–103.

88. Рамазанова, С. А. Оптимизация технологии генотипирования сои на основе анализа полиморфизма SSR локусов ДНК / С. А. Рамазанова, А. С. Коломыцева // Масличные культуры. – 2020. – Вып. 1 (181). – С. 42–48. DOI: 10.25230/2412-608X-2020-1-181-42-48

89. Рамазанова, С. А. Оценка эффективности выделения ДНК из разных частей растений сои для создания генетических паспортов / С. А. Рамазанова, В. Г. Савиченко, Д. Л. Савиченко [и др.] // Кормопроизводство. – 2023б. – № 10. – С. 21–24. DOI: 10.25685/krm.2023.10.2023.002

90. Рамазанова, С. А. Поиск новых SSR-локусов ДНК для создания эффективной технологии генотипирования сои / С. А. Рамазанова, В. Г. Савиченко, Э. Г. Устарханова [и др.] // Масличные культуры. – 2021. – № 4 (188). – С. 18–24. DOI: 10.25230/2412-608X-2021-4-188-18-24

91. Рогожина, Т. Г. Использование микросателлитного анализа для выявления биотипов у сортов ярового рапса (*Brassica napus* L.) / Т. Г. Рогожина, Ю. В. Анискина, В. В. Карпачев [и др.] // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2015. – № 2 (162). – С. 27–33.

92. Рудаков, О. Б. Аминокислотный состав соевого белка / О. Б. Рудаков, Л. В. Рудакова // Мясные технологии. – 2020. – № 4 (208). – С. 48–51. DOI: 10.33465/2308-2941-2020-04-48-51.

93. Рыбаков, Д. А. Номенклатурные стандарты и генетические паспорта сортов картофеля селекции Всероссийского научно-исследовательского института картофеля им. А.Г. Лорха / Д. А. Рыбаков, О. Ю. Антонова, И. Г. Чухина [и др.] // Биотехнология и селекция растений. – 2020. – № 3 (4). – С. 5–52. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-4-01

94. Рябушкина, Н. А. Специфика выделения ДНК из растительных организмов / Н. А. Рябушкина, М. Е. Омашева, Н. Н. Галиакпаров // Биотехнология. Теория и практика. – 2012. – № 2. – С. 9–26.

95. Савиченко, В. Г. Генетический полиморфизм сортов сои селекции ВНИИМК / В. Г. Савиченко, Д. Л. Савиченко, С. А. Рамазанова [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2024а. – Т. 38. – № 10. – С. 5–10. DOI: 10.53859/02352451_2024_38_10_5

96. Савиченко, В. Г. Детекция фрагментов ДНК при проведении молекулярно-генетической паспортизации сортов сои / В. Г. Савиченко, С. А. Рамазанова // Актуальные вопросы биологии, селекции, технологии возделывания и переработки сельскохозяйственных культур : Сборник материалов 12-й Международной конференции молодых учёных и специалистов, Краснодар, 01–03 марта 2023 года. – Краснодар: Федеральный научный центр "Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта", 2023. – С. 242–246. DOI: 10.25230/conf12-2023-242-246

97. Савиченко, В. Г. Идентификация сортов сои на основе полиморфизма SSR-маркеров / В. Г. Савиченко // Научные труды Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия. – 2023. – Т. 37. – С. 68–72. DOI: 10.30679/2587-9847-2023-37-68-72

98. Савиченко, В. Г. Идентификация сортов сои селекции ВНИИМК методом микросателлитного анализа / В. Г. Савиченко, С. А. Рамазанова // Актуальные вопросы биологии, селекции, технологии возделывания и переработки

сельскохозяйственных культур : Сборник материалов 11-й Всероссийской конференции молодых учёных и специалистов, Краснодар, 25–26 февраля 2021 года. – Краснодар: Федеральный научный центр "Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта", 2021а. – С. 97–101. DOI: 10.25230/conf11-2021-97-101

99. Савиченко, В. Г. Определение внутрисортного полиморфизма сортов сои по микросателлитным (SSR) локусам / В. Г. Савиченко, С. А. Рамазанова // Научное обеспечение устойчивого развития агропромышленного комплекса в условиях аридизации климата. Сборник материалов международной научно-практической конференции, посвященной 35-летию ФГБНУ РосНИИСК «Россорго». Саратов, 2021б. – С. 232–238.

100. Савиченко, В. Г. Поиск информативных SSR-маркеров для паспортизации сортов сои / В. Г. Савиченко, С. А. Рамазанова, С. З. Гучетль // Масличные культуры. – 2024б. – № 2 (198). – С. 10–15. DOI: 10.25230/2412-608X-2024-2-198-10-15

101. Савиченко, В. Г. Разработка мультиплексных систем SSR-маркеров сои (*Glycine max* (L.) Merr.) для паспортизации и идентификации сортов / В. Г. Савиченко // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2026. – Т. 187. – № 2. – С. – 193–206. DOI: 10.30901/2227-8834-2026-2-013

102. Самарина, М. А. Отбор молекулярных маркеров для генетической паспортизации *Triticum aestivum* / М. А. Самарина, Д. С. Ульянов, Т. Д. Мохов [и др.] // Зерновое хозяйство России. 2024. – Т. 16. – № 4. – С. 33–40. DOI: 10.31367/2079-8725-2024-93-4-33-40

103. Сатарова, Т. Н. SNP-анализ в паспортизации и идентификации линий кукурузы / Т. Н. Сатарова, Б. В. Дзюбецкий, В. Ю. Черчель [и др.] // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин: наук.-практ. журн. – 2014. – № 3 (24). – С. 4–9.

104. Сатина, Т. Г. Генетический анализ однородности сортов и гибридов рапса и контроль наследования гибридами генетического материала родительских форм / Т. Г. Сатина, Ю. В. Анискина, В. В. Карпачев [и др.] // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2010а. – № 6. – С. 15–18.

105. Сатина, Т. Г. Идентификация сортов рапса методом микросателлитного анализа / Т. Г. Сатина, Ю. В. Анискина, В. В. Карпачев [и др.] // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – Некоммерческая организация Редакция журнала "Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук", 20106. – № 1. – С. 11–13.

106. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2026622727 Российская Федерация. База данных ДНК-профилей сортов сои по микросателлитным маркерам : заявл. 25.05.2026 : опубл. 10.06.2026 / В. Г. Савиченко, С. З. Гучетль, С. В. Иванов [и др.] ; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный научный центр "Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта".

107. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2026623478 Российская Федерация. База данных панелей бинов m1 и m2 для определения аллелей микросателлитных локусов ДНК сои : заявл. 07.07.2026 : опубл. 17.07.2026 / В. Г. Савиченко, С. З. Гучетль, С. А. Рамазанова ; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный научный центр "Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта".

108. Селекция и семеноводство. Итоги 2025 года / Ruseed, Журнал Поле.рф. – 2025. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://ruseed.ru/upload/medialibrary/bc6/2x6n33adajx7mghjrdbbubp2yb29duv3/RUSEED_Поле_РФ_итоги_2025_.pdf (дата обращения: 05.02.2026).

109. Сейтаджиева, С. Б. Оптимизация методики выделения ДНК для изучения генетического разнообразия эфиромасличных роз (*Rosa* L.) / С. Б. Сейтаджиева, С. З. Гучетль, С. В. Дидович [и др.] // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2024. – Т. 185. – № 3. – С. 191–198. DOI: 10.30901/2227-8834-2024-3-191-198

110. Синеговский, М. О. Роль правовой защиты новых сортов сои в современных условиях / М. О. Синеговский // Вестник российской

сельскохозяйственной науки. – 2022. – № 3. – С. 9–12. DOI: 10.30850/vrsn/2022/3/9-12

111. Синеговский, М. О. Соя - культура мирового земледелия / М. О. Синеговский // Вестник российской сельскохозяйственной науки. – 2023. – № 5. – С. 22–25. DOI: 10.31857/2500-2082/2023/5/22-25

112. Смолянинова, Н. О. К проблеме импортозамещения семян сои в Российской Федерации / Н. О. Смолянинова, Е. А. Волкова, В. В. Реймер // Агронаука. – 2024. – Т. 2. – № 3. – С. 59–64. DOI: 10.24412/2949-2211-2024-2-3-59-64

113. Снигирь, Е. А. AFLP-анализ сортового полиморфизма *Capsicum annuum* L / Е. А. Снигирь, О. Н. Пышная, Е. З. Кочиева, Н. Н. Рыжова // Сельскохозяйственная биология. – 2013. – № 1. – С. 53–60.

114. Супрун, И. И. ДНК-паспортизация современных российских сортов риса с применением SSR-маркеров / И. И. Супрун, В. С. Ковалев, С. В. Токмаков [и др.] // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2017. – № 131. – С. 772–782.

115. Сухарева, А. С. ДНК-маркеры для генетического анализа сортов культурных растений / А. С. Сухарева, Б. Р. Кулуев // Биомика. – 2018. – Т. 10. – № 1. – С. 069-084.

116. Тевченков, А. А. Селекция сои на расширение эколого-географической адаптивности на примере выведения сорта Титан / А. А. Тевченков, С. В. Зеленцов, М. В. Трунова [и др.] // Масличные культуры. – 2026. – № 2 (206). – С. 50–60. DOI: 10.25230/2412-608X-2026-2-206-50-60

117. Тимкин, П. Д. Модификация СТАВ-метода на модели семян сои сорта «Лидия» / П. Д. Тимкин, А. А. Пензин // Симбиоз-Россия 2022 : сборник статей XIII Международной конференции ученых-биологов, Пермь, 24–25 октября 2022 года. – Пермь: Пермский государственный национальный исследовательский университет, 2023. – С. 484–487. DOI: 10.17072/simbioz-2022-492-495

118. Ториков, В. Е. Использование электрофоретических методов для идентификации сортов зерновых культур / В. Е. Ториков, Н. С. Шпилев,

Ф. И. Клименков // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2019. – № 2 (172). – С. 5–12.

119. Федеральная служба государственной статистики (Росстат). [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/29_cx-2025_predv_2v.xlsx (Дата обращения: 05.02.2026).

120. Федеральный закон от 30.12.2021 (в ред. 28.12.2025) № 454-ФЗ «О семеноводстве». [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://base.garant.ru/403332751/> (дата обращения 05.02.2026).

121. Хлесткина, Е. К. Генетические паспорта: наука – экономике / Е. К. Хлесткина, Т. А. Гавриленко, И. Г. Чухина [и др.] // Биотехнология и селекция растений. – 2025. – Т. 8. – № 2. – С. 63–79. DOI: 10.30901/2658-6266-2025-2-05

122. Хлесткина, Е. К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции / Е. К. Хлесткина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17. – № 4/2. – С. 1044–1054.

123. Хлесткина, Е. К. Об итогах V Вавиловской международной конференции (21–25 ноября 2022 г. Санкт-Петербург) / Е. К. Хлесткина, И. Г. Лоскутов, Г.А. Баталова [и др.] // Об итогах V Вавиловской международной конференции (21-25 ноября 2022 г. Санкт-Петербург). – 2022. – Т. 5. – № 4. – С. 79–89. DOI: 10.30901/2658-6266-2022-4-06

124. Челюстникова, Т. А. Структура сорта масличного льна Ы 117 на основе полиморфных микросателлитных локусов / Т. А. Челюстникова, С. З. Гучетль // Масличные культуры. – 2023. – № 2 (194). – С. 13–19.

125. Чемерис, Д. А. Дизайн праймеров для полимеразной цепной реакции (краткий обзор компьютерных программ и баз данных) / Д. А. Чемерис, О. Ю. Кирьянова, И. М. Губайдуллин [и др.] // Биомика. – 2016. – Т. 8. – № 3. – С. 215–238.

126. Чесноков, Ю. В. Биохимические маркеры в генетических исследованиях культурных растений: применимость и ограничения / Ю. В. Чесноков //

Сельскохозяйственная биология. – 2019. – Т. 54. – № 5. – С. 863–874. DOI: 10.15389/agrobiology.2019.5.863rus

127. Чесноков, Ю. В. Генетические маркеры: сравнительная классификация молекулярных маркеров / Ю. В. Чесноков // Овощи России. – 2018. – № 3 (41). – С. 11–15.

128. Чесноков, Ю. В. Молекулярные маркеры в популяционной генетике и селекции культурных растений / Ю. В. Чесноков, Н. В. Кочерина, В. М. Косолапов. – Москва : Угрешская типография, 2019. – 200 с. DOI: 10.33814/monography_1614

129. Чесноков, Ю. В. Морфологические генетические маркеры у растений / Ю. В. Чесноков, В. М. Косолапов, И. В. Савченко // Генетика. – 2020. – Т. 56. – № 12. – С. 1366–1377. DOI:10.31857/S0016675820120048

130. Чесноков, Ю. В. Оценка меры информационного полиморфизма генетического разнообразия / Ю. В. Чесноков, А. М. Артемьева // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50. – № 5. – С. 571–578. DOI: 10.15389/agrobiology.2015.5.571rus

131. Шилов, И. А. Генетическая идентификация линий и гибридов подсолнечника *Helianthus annuus* L. на основе мультиплексного микросателлитного анализа / И. А. Шилов, Н. С. Велишаева, Ю. В. Анискина [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2023. – Т. 37. – № 1. – С. 10–15. DOI: 10.53859/02352451_2023_37_1_10

132. Шлявас, А. В. Генетическое разнообразие местных и стародавних сортов яблони (*Malus × domestica* Borkh.) из коллекции ВИР по данным AFLP-анализа / А. В. Шлявас, А. А. Трифонова, Л. В. Дедова [и др.] // Генетика. – 2019. – Т. 55, № 11. – С. 1288–1297. DOI: 10.1134/S0016675819110146

133. Янковская, А. А. Молекулярное маркирование и генетическая паспортизация: использование в селекции, биотехнологии и идентификации садовых культур / А. А. Янковская, И. В. Князева, М. Т. Упадышев // Садоводство и виноградарство. – 2019. – № 5. – С. 5–11. DOI: 10.31676/0235-2591-2019-5-11

134. Aboul-Maaty, N. A. F. Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method / N. A. F. Aboul-Maaty,

H. A. S. Oraby // Bulletin of the National Research Centre. – 2019. – V. 43. – № 1. – P. 1–10.

135. Albright, L. M. Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis / L. M. Albright, B. E. Slatko // Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry. – 2000. – № 1. – P. A. 3B. 1-A. 3B. 5. DOI: 10.1002/0471142700.nca03bs00

136. Alves, S. I. A. What are microsatellites and how to choose the best tool: a user-friendly review of SSR and 74 SSR mining tools / S. I. A. Alves, C. W. D. Dantas, D. B. Macedo [et al.] // Frontiers in Genetics. – 2024. – № 15. – P. 1474611. DOI: 10.3389/fgene.2024.1474611

137. Appiah-Kubi, D. Diversity studies on soybean accessions from three countries / D. Appiah-Kubi, J. Y. Asibuo, M. D. Quain [et al.] // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2014. – V. 3. – № 2. – P. 198–206. DOI: 10.1016/j.bcab.2013.11.008

138. Borah, P. Primer designing for PCR / P. Borah // Science Vision. – 2011. – V. 11. – № 3. – P. 134–136.

139. Botstein, D. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms / D. Botstein, R. L. White, M. Skolnick [et al.] // American journal of human genetics. – 1980. – V. 32. – № 3. – P. 314.

140. Breiman, L. Random Forests / L. Breiman // Machine Learning. – 2001. – V. 45. – P. 5–32. DOI: 10.1023/A:1010933404324

141. Cai, C. High-density 80K SNP array is a powerful tool for genotyping *G. hirsutum* accessions and genome analysis / C. Cai, G. Zhu, T. Zhang [et al.] // BMC Genomics. – 2017. – V. 18. – P. 654. DOI: 10.1186/s12864-017-4062-2

142. Charmet, G. Implementation of genome-wide selection in wheat / G. Charmet, E. Storlie // Russian Journal of Genetics: Applied Research. – 2012. – V. 2. – № 4. – P. 298–303. DOI: 10.1134/S207905971204003X

143. Chesnokov, Y. V. 11S seed storage globulins: are they reliable as molecular markers? / Y. V. Chesnokov, A. D. Shutov // Recent Res. Devel. Genet. Breeding. – 2004. – V. 1. – P. 181–194.

144. Cregan, P. B. An integrated genetic linkage map of the soybean genome / P. B. Cregan, T. Jarvik, A. L. Bush [et al.] // Crop Science. – 1999. – V. 39. – № 5. – P. 1464–1490.
145. Cutler, D. R. Random forests for classification in ecology / D. R. Cutler, T. C. Edwards, K. H. Beard [et al.] // Ecology. – 2007. – V. 88. – № 11. – P. 2783–2792. DOI: 10.1890/07-0539.1
146. Dannon, A. E. Adaptability of soybeans varieties to Guinean Congolese and Soudano-Guinean agroecological zones in Benin and seeds purity assessment in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) using microsatellites markers / A. E. Dannon, M. Gbeto, Y. Madode [et al.] // Journal of Crop Science and Biotechnology. – 2026. – P. 1–18. DOI: 10.1007/s12892-026-00349-z
147. Delmotte, F. Microsatellite allele sizing: difference between automated capillary electrophoresis and manual technique / F. Delmotte, N. Leterme, J. C. Simon // Biotechniques. – 2001. – V. 31. – № 4. – P. 810–814.
148. Deo, S. Development of multiplex microsatellite marker sets in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] / S. Deo, A. James, S. K. Singh [et al.] // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. – 2020. – V. 9. – № 10. – P. 2272–2280.
149. DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4474504.pdf> (дата обращения: 29.05.2025).
150. Doyle, J. J. Isolation of plant DNA from fresh tissue / J. J. Doyle, J. L. Doyle // Focus. – 1990. – V. 12. – P. 13–15.
151. Ellegren, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution / H. Ellegren // Nature reviews genetics. – 2004. – V. 5. – № 6. – P. 435–445. DOI: 10.1038/nrg1348
152. Euler, M. Because error has a price: A systematic review of the applications of DNA fingerprinting for crop varietal identification / M. Euler, V. V. Krishna, M. Jaleta [et al.] // Outlook on Agriculture. – 2022. – V. 51. – № 4. – P. 384–393. DOI: 10.1177/00307270221124008

153. FAOSTAT [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.fao.org/faostat/ru/#compare> (дата обращения: 05.02.2026).

154. Flores-Rentería, L. Scoring microsatellite loci / L. Flores-Rentería, A. Krohn // *Microsatellites: Methods and protocols*. – 2013. – P. 319–336. DOI:10.1007/978-1-62703-389-3_21

155. Foreign Agricultural Service/USDA. Global Market Analysis [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf> (дата обращения: 05.02.2026).

156. Gene Profile Human. Инструкция по применению. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.syntol.ru/docs/instructions/HG/Gene%20Profile%20Human%20090924.pdf?v=2> (дата обращения: 16.01.2025).

157. Genome assembly *Glycine_max_v4.0*. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000004515.6 (дата обращения: 15.12.2024).

158. Ghosh, J. An assessment of genetic relatedness between soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] cultivars using SSR markers / J. Ghosh, P. D. Ghosh, P. R. Choudhury // *American Journal of Plant Sciences*. – 2014. – Т. 5. – № 20. – P. 3089–3096. DOI:10.4236/ajps.2014.520325

159. Green, M. R. Polyacrylamide Gel Electrophoresis / M. R. Green, J. Sambrook // *Cold Spring Harb Protoc*. – 2020. – V. 12. DOI: 10.1101/pdb.prot100412

160. Gupta, S. K. Genetic diversity and population structure of Indian soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] revealed by simple sequence repeat markers / S. K. Gupta, J. G. Manjaya // *Journal of Crop Science and Biotechnology*. – 2017. – V. 20. – P. 221–231. DOI: 10.1007/s12892-017-0023-0

161. Hisano, H. Characterization of the soybean genome using EST-derived microsatellite markers / H. Hisano, S. Sato, S. Isobe [et al.] // *DNA research*. – 2007. – V. 14. – № 6. – P. 271–281. DOI: 10.1093/dnares/dsm025

162. Hosseinzadeh-Colagar, A. Microsatellite (SSR) amplification by PCR usually led to polymorphic bands: Evidence which shows replication slippage occurs in extend or nascent DNA strands / A. Hosseinzadeh-Colagar, M. J. Haghghatnia, Z. Amiri [et al.] // Molecular biology research communications. – 2016. – V. 5. – № 3. – P. 167.

163. Hudcovicova, M. Utilization of SSRs for the characterization of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genetic resources / M. Hudcovicova, J. Kraic // Czech J. Genet. Plant Breed. – 2003. – V. 39. – P. 120–126.

164. Hwang, T. Y. High-density integrated linkage map based on SSR markers in soybean / T. Y. Hwang, T. Sayama, M. Takahashi [et al.] // DNA research. – 2009. – V. 16. – № 4. – P. 213–225. DOI: 10.1093/dnares/dsp010

165. Ibrar, D. Application of machine learning for identification of heterotic groups in sunflower through combined approach of phenotyping, genotyping and protein profiling / D. Ibrar, S. Khan, M. Raza [et al.] // Scientific Reports. – 2024. – 14. – P. 7333. DOI: 10.1038/s41598-024-58049-z

166. Iqbal, A. F. A review of comparison and applications of DNA markers for plant genetic analysis / A. F. Iqbal, M. H. Sultan, M. Faizan [et al.] // Journal of Medicinal Plants Studies. – 2024. – T. 12. – № 4. – P. 10–14. DOI: 10.22271/plants.2024.v12.i4a.1686

167. Jeevan, K. S. Molecular characterization and genetic diversity studies of Indian soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivars using SSR markers / K. S. Jeevan, C. Susmita, K. V. Sripathy [et al.] // Molecular Biology Reports. – 2022. – V. 49. – № 3. – P. 2129–2140. DOI:10.1007/s11033-021-07030-4

168. Kassambara, A. rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://CRAN.R-project.org/package=rstatix> (дата обращения: 05.03.2025).

169. Koltun, A. Microsatellite markers in maize: challenges and guidelines for implementing multiplex SSR analyses / A. Koltun, P. A. Silva, I. Y. Torres [et al.] // Crop Breeding and Applied Biotechnology. – 2024. – № 1. – P. e46392411. DOI: 10.1590/1984-70332024v24n1a01

170. Kong, C. A PCA-random forest pipeline for high-resolution SNP-based cultivar discrimination in *Leymus chinensis* / C. Kong, S. Hu, L. Tian [et al.] // BMC Plant Biol. – 2026. – V. 26. – P. 464. DOI: 10.1186/s12870-026-08282-7
171. Kumar, P. Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology / P. Kumar, V. K. Gupta, A. K. Misra [et al.] // Plant Omics Journal. – 2009. – V. 2. – P. 141–162.
172. Kumar, S. Development of genomic microsatellite markers in cluster bean using next-generation DNA sequencing and their utility in diversity analysis / S. Kumar, A. S. Palve, S. K. Patel [et al.] // Current Plant Biology. – 2020. – V. 21. – P. 100134. DOI: 10.1016/j.cpb.2019.100134
173. Li, D. The elite variations in germplasms for soybean breeding / D. Li, Z. Zhang, X. Gao [et al.] // Molecular Breeding. – 2023. – V. 43. – № 5. – P. 37. DOI:10.1007/s11032-023-01378-0
174. Li, F. Assessing genetic diversity and geographical differentiation in a global collection of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) and assigning a mini-core collection / F. Li, T. Sayama, Y. Yokota [et al.] // DNA Research. – 2024. – V. 31. – № 2. – P. dsae009. DOI: 10.1093/dnares/dsae015
175. Li, X. Advances and challenges in plant molecular marker technologies and their applications in the artificial intelligence empowered era / X. Li, Z. Hu, W. Yu [et al.] // Frontiers in Plant Science. – 2026. – № 16. – P. 1757949. DOI: 10.3389/fpls.2025.1757949
176. Liaw, A. randomForest: Breiman and Cutler's Random Forests for Classification and Regression / A. Liaw, M. Wiener. [Электронный ресурс]. – Версия 4.7-1.1. – 2022. – Режим доступа: <https://CRAN.R-project.org/package=randomForest> (дата обращения: 04.06.2025).
177. Lu, X. P. Diversity arrays technology (DArT) for studying the genetic polymorphism of flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum*) / X. P. Lu, B. G. Xiao, Y. P. Li [et al.] // Journal of Zhejiang University SCIENCE B. – 2013. – V. 14. – № 7. – P. 570–577. DOI: 10.1631/jzus.B1200227
178. Martin, R. Gel electrophoresis: nucleic acids / R. Martin. – Garland Science, 2020.

179. Mesapogu, S. Agarose gel electrophoresis and polyacrylamide gel electrophoresis: Methods and Principles / S. Mesapogu, C. M. Jillepalli, D. K. Arora // Analyzing Microbes: Manual of Molecular Biology Techniques. – Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2012. – P. 73–91.

180. Multiple Primer Analyzer [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html> (дата обращения: 15.12.2024).

181. Mun, J. H. Distribution of microsatellites in the genome of *Medicago truncatula*: a resource of genetic markers that integrate genetic and physical maps / J. H. Mun, D. J. Kim, H. K. Choi [et al.] // Genetics. – 2006. – № 172 (4). – P. 2541–2555. DOI: 10.1534/genetics.105.054791

182. Nasiri, J. Precision assessment of some supervised and unsupervised algorithms for genotype discrimination in the genus *Pisum* using SSR molecular data / J. Nasiri, M. R. Naghavi, A. H. Kayvanjoo [et al.] // Journal of Theoretical Biology. – 2015. – V. 368. – P. 122–32. DOI: 10.1016/j.jtbi.2015.01.001

183. Nucleotide BLAST [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch (дата обращения: 08.12.2021).

184. Okonechnikov, K. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov [et al.] // Bioinformatics. – 2012. – V. 28. – № 8. – P. 1166–1167. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts091

185. Pasqualotto, A. C. A cautionary tale: lack of consistency in allele sizes between two laboratories for a published multilocus microsatellite typing system / A. C. Pasqualotto, D. W. Denning, M. J. Anderson // Journal of clinical microbiology. – 2007. – V. 45. – № 2. – P. 522–528.

186. Qiu, S. A method of *Osmanthus fragrans* cultivars identification based on random forest algorithm and SRAP molecular markers / S. Qiu, B. Shen, T. Li [et al.] // Scientia Silvae Sinicae. – 2018. – V. 54 (1). – P. 32–45. DOI: 10.11707/j.1001-7488.20180104

187. Primer-BLAST [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (дата обращения: 08.12.2021).
188. Ramazanova, S. A. Genetic analysis of the homogeneity of soybean varieties by microsatellite loci / S. A. Ramazanova, V. G. Savichenko, S. Z. Guchetl // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing Ltd, 2021. – V. 699. – P. 012007. DOI: 10.1088/1755-1315/699/1/012007
189. Savichenko, V. Fragment analysis of microsatellite DNA loci for genotyping soybean varieties / V. Savichenko, S. Ramazanova, S. Guchetl // International Scientific and Practical Conference "Current Issues of Biology, Breeding, Technology and Processing of Agricultural Crops" (CIBTA2022). Conference Proceedings (To the 110th anniversary of V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops). United States, 2023. – V. 2777. – № 1. – P. 020028-1-020028-6. DOI: 10.1063/5.0140280
190. Schmutz, J. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean / J. Schmutz, S. B. Cannon, J. Schlueter [et al.] // Nature. – 2010. – V. 463. – № 7278. – P.178–183. DOI: 10.1038/nature08670
191. Song, Q. J. A new integrated genetic linkage map of the soybean / Q. J. Song, L. F. Marek, R. C. Shoemaker [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2004. – V. 109. – P. 122–128.
192. SoyBase [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.soybase.org/> (дата обращения: 10.09.2021).
193. SoyStats [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://soystats.com/> (дата обращения: 05.02.2026).
194. Tabe, L. Plasticity of seed protein composition in response to nitrogen and sulfur availability / L. Tabe, N. Hagan, T. J. V. Higgins // Current Opinion in Plant Biology. – 2002. – V. 5. – №. 3. – P. 212–217.
195. Tamari, F. Extraction of DNA from plant tissue: review and protocols / F. Tamari, C. S. Hinkley // Sample preparation techniques for soil, plant, and animal samples. – 2016. – P. 245–263.

196. Tautz, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers / D. Tautz // *Nucleic Acids Res.* – 1989. – V. 25. – № 17 (16). – P. 6463–6471. DOI: 10.1093/nar/17.16.6463
197. Tang, J. Large-scale identification of polymorphic microsatellites using an in silico approach / J. Tang, S. J. Baldwin, J. M. Jacobs [et al.] // *BMC bioinformatics.* – 2008. – V. 9. – P. 1–13.
198. Teklewold, T. H. Genetic diversity and population structure of Ethiopian Sweet Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] germplasms using SSR markers / T. H. Teklewold, T. G. Bogale, D. G. Tseganeh [et al.] // *PloS one.* – 2025. – T. 20. – № 3. – P. e0316549.
199. Thakur, J. Sequence, chromatin and evolution of satellite DNA / J. Thakur, J. Packiaraj, S. Henikoff // *International journal of molecular sciences.* – 2021. – V. 22. – №. 9. – P. 4309.
200. Tiwari, S. Modified protocol for plant genomic DNA isolation / S. Tiwari, R. S. Tomar, M. K. Tripathi [et al.] // *Indian Research Journal of Genetics and Biotechnology.* – 2017. – № 9 (4). – P. 478–485.
201. Tripathi, M. K. Identification of Indian soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) genotypes for drought tolerance and genetic diversity analysis using SSR markers / M. K. Tripathi, N. Tripathi, S. Tiwari [et al.] // *Scientist.* – 2023. – V. 3. – № 3. – P. 31–46. DOI: 10.5281/zenodo.7697640
202. UPOV Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability for Soybean [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.upov.int/edocs/tgdocs/en/tg080.pdf> (дата обращения: 22.05.2025).
203. Vasilyeva, O. Y. Identifying the rose varieties and natural forms using ISSR-markers / O. Y. Vasilyeva, O. V. Dorogina, S. S. Yudanov [et al.] // *In BIO Web of Conferences.* – EDP Sciences, 2020. – V. 24. – P. 00091.
204. Vieira, M. L. C. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful / M. L. C. Vieira, L. Santini, A. L. Diniz [et al.] // *Genetics and molecular biology.* – 2016. – V. 39. – P. 312–328.

205. Wickham, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis / H. Wickham // New York: Springer-Verlag. – 2016. – 260 c.
206. Yao, X. Genetic diversity in early maturity Chinese and European elite soybeans: A comparative analysis / X. Yao, J. Xu, Z. Liu [et al.] // Euphytica. – 2023. – V. 219. – № 1. – P. 17.
207. Yılmaz, M. Principles of nucleic acid separation by agarose gel electrophoresis / M. Yılmaz, C. Ozic, İ. Gök // Gel Electrophoresis—Principles and Basics. – 2012. – V. 4. – P. 33.
208. Yuan, X. Effective identification of varieties by nucleotide polymorphisms and its application for essentially derived variety identification in rice / X. Yuan, Z. Li, L. Xiong [et al.] // BMC Bioinformatics. – 2022. – № 10. – P. 23–30. DOI: 10.1186/s12859-022-04562-9
209. Zatybekov, A. Genetic diversity analysis of soybean collection using simple sequence repeat markers / A. Zatybekov, M. Moldir Yermagambetova, Y. Genievskaya [et al.] // Plants. – 2023. – № 12. – P. 3445. DOI: 10.3390/plants12193445
210. Zhang, G. W. Determination of the genetic diversity of vegetable soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] using EST-SSR markers / G. W. Zhang, S. C. Xu, W. H. Mao [et al.] // Journal of Zhejiang University Science B. – 2013. – V. 14. – № 4. – P. 279–288.
211. Žulj Mihaljević, M. Genetic diversity of European commercial soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] germplasm revealed by SSR markers / M. Žulj Mihaljević, H. Šarčević, A. Lovrić [et al.] // Genetic resources and crop evolution. – 2020. – V. 67. – P. 1587–1600. DOI: 10.1007/s10722-020-00934-3

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А. Характеристика материала, используемого в исследовании

Таблица А.1 – Характеристика материала, используемого в исследовании

Группа сортов	Сорта	Выборка	Категория	Цель использования
1	2	3	4	5
1	Пума	5 типов растит. материала (по 12 индивидуальных растений каждого)	-	оценка эффективности выделения ДНК из разных частей растений сои
2	Зара, Весточка, Пума, Саяна, Триада	индивидуальные растения: по 1 шт.	-	подбор температуры отжига праймеров
3	Лидия, Белор, Даурия, Соер-3, Северная 4, СибНИИК 315, Окская, Ясельда, Витязь 50, СибНИИСХОЗ 6, Алтом, ВНИИОЗ-85, Лучезарная, Росинка, Венера (Приморская 915), Т-25, Альтаир, Брянская 11, Локус, Грибская-30	смеси растений: по 10–15 шт.	-	первичная оценка информативности и специфичности SSR-маркеров ¹
4	Williams 82, Lee, Кубанская 4958, СК Уника, Зара, Весточка, Кубань, СК Дока, ВНИИМК 3895, СК Элана, Витязь 50, Сибириада, Локус, Дельта, Ходсон, Т-25, Пума, Саяна, Триада, ВНИИМК 9186	смеси растений: по 10–15 шт.	-	первичная оценка информативности и специфичности SSR-маркеров ²
5	Williams 82, Ходсон, СибНИИК 315, Кубанская 4958, Кубань, СК Уника, СК Дока, СК Оптима, Зара, Весточка, Пума, Лидия, Лира, Сибириада, Омская 4	индивидуальные растения: по 1 шт.	-	разработка мультиплексных систем и оптимизация условий применения

Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5
6	Ли́ра	индивидуальные растения: по 1 шт.	ОС	ПКО в мультиплексных реакциях и фрагментном анализе
7	Баргузин, Барс, Восточка, Вектор, Вилана, Вилана бета, Вига, Вита, Грея, Дуар, Дуниза, Елисей, Забава, Зара, Иней, Ирбис, Кора, Ли́ра, Любава, Мамонт, Олимпия, Парус, Пума, Рысь, Саяна, Себур, Селена, Славия, Титан, Триада, Чара; Краса, Кихара, Своя; Липчанка, Рента, Ягуар	индивидуальные растения: по 47; 30; 23 шт.	ОС	анализ внутри- и межсортового полиморфизма, обучение модели RF
8	Баргузин, Саяна, Ирбис, Мамонт, Барс, Вилана бета	индивидуальные растения: по 93 шт.	ПИП	валидация модели RF на независимых выборках
9	Барс, Вектор, Восточка, Вига, Вилана бета, Зара, Ирбис, Кора, Парус, Славия, Титан	индивидуальные растения: по 47 шт.	ЭС	валидация модели RF на независимых выборках
10	Восточка, Вилана, Елисей, Зара; Парус	индивидуальные растения: по 47; 93 шт.	РС1	валидация модели RF на независимых выборках
11	Ходсон, Аванта, Бара, Бинго, СК Ава, СК Аврора, СК Алекса, СК Оптима, СК Уника, СК Элана, СК Дока, Сибириада, Омская 4, ЭН Аргента, Юг-30; СК Артика	индивидуальные растения: по 23 шт.; 30 шт.	не известно	анализ внутри- и межсортового полиморфизма, обучение модели RF

Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5
12	Аляска, Амадеус, Максус, Опус, Сибيريا; Прескотт, ЭН Авиор	индивидуальные растения: по 8 шт.; 14–15 шт.	не известно	анализ внутри- и межсортового полиморфизма, валидация модели RF на независимых выборках
13	Родительские формы: Олимпия/11*, Дельта/2, 4, Кубанская 4958/2, 4, 5, 12; Славия/2, 3 Вилана/1, ВНИИМК 9186/1, 2, 4	индивидуальные растения	материнские и отцовские формы в гибридных комбинациях	молекулярно- генетическая идентификация гибридов
14	Гибридные комбинации: ♀ Олимпия/11 × ♂ Славия/2; ♀ Дельта/2 × ♂ Славия/3; ♀ Дельта/4 × ♂ Вилана/1; ♀ Дельта/5 × ♂ ВНИИМК 9186/1; ♀ Кубанская 4958/4 × ♂ ВНИИМК 9186/1; ♀ Кубанская 4958/2 × ♂ ВНИИМК 9186/2; ♀ Кубанская 4958/5 × ♂ ВНИИМК 9186/4; ♀ Кубанская 4958/12 × ♂ Вилана/1	1 шт.; 3 шт.; 1 шт.; 2 шт.; 1 шт.; 1 шт.; 4 шт.; 3 шт.	предполагаемый гибрид поколения F ₁	

Примечание: 1, 2 – сорта распределены по разным группам, поскольку SSR-маркеры изучались в разные годы исследования; * – номер растения, участвовавшего в скрещивании

Приложение Б. Характеристика микросателлитных маркеров

Таблица Б.1 – Характеристика микросателлитных маркеров, отобранных для исследования

№	Локус	Локализация ^{1, 2}	Мотив ¹	Нуклеотидные последовательности фланкирующих праймеров ¹	T _m , °C ²	Размер фрагмента, п.н. ²
1	2	3	4	5	6	7
1	Satt532	1	(ATT)15	F: GCGCCAATATTATCATGCTTTATGT R: GCGTGTA AAAAATCTTTGAATCTTGA	F: 58,7 R: 57,2	168
2	Sat413	1	(AT)35	F: GCGCTCCCTTCTTTTCCACTGAATTGA R: GCGTTTTCTCTCGGTTTCTCTCTTCTTATTA	F: 65,8 R: 63,4	200
3	Satt507	1	(ATT)22	F: GCGCTCAGCCTTGTTAAATCACTT R: GCGCTACTCTCGTGTCTGTTAGTTA	F: 62,4 R: 62,5	217
4	Satt141	2	(ATA)25	F: CGGTGGTGGTGTGCATAATAA R: CCGTCATAAAAAGTCCCTCAGAAT	F: 58,6 R: 58,8	200
5	Satt604	2	(AAT)11	F: GTGGCTCACAATCAACGTGAGCATCAGA R: CTGTGCCACTTATGATTTGGTAA	F: 67,3 R: 57,1	150
6	Satt506	2	(TAT)14	F: GCGAATTGGCATAACATAGTACC R: GCGTGAATTCGCCTAAGTTTAT	F: 57,3 R: 57,5	288
7	Satt631	3	(ATT)16	F: GGTAGATCCAGGAGCTTGAGTCAG R: GCGCATCTCACTGCACTTGATTTT	F: 62,0 R: 62,9	152
8	Satt549	3	(TAT)21	F: GCGGCAAACTTTGGAGTATTGCAA R: GCGCGCAACAATCACTAGTACG	F: 63,5 R: 62,7	244
9	Satt257	3	(ATA)10	F: GCGACTTTCTTTTCAATTTCACTCC R: GCGCAATTGTCACCAACACAT	F: 59,6 R: 60,6	251
10	Satt713	4	(TTAT)3	F: GCGAAACGTATTAATTATGTGTCTTTCTTTA R: GCGGTTTGCAGTGTGATATTACAATG	F: 59,9 R: 61,6	254
11	AW277661	4	(TAT)23	F: GCGCATGGAGCATCATCTTCATA R: GCGAGAAAACCCAATCTTTATATCAATA	F: 61,4 R: 58,5	250
12	Sat374	5	(AT)23	F: GCGTTGAAACCGTTATAAACCAACTCA R: GCGCTTTATTGGCAATACTTTTAACTCACAT	F: 62,8 R: 63,6	302
13	Satt684	5	(ATA)17	F: GGGCTTCATTTTAGATGGAGTC R: TGGAGCTCATATTCGTCACAAAG	F: 56,8 R: 58,8	188

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
14	Satt471	5	(TAT)18	F: GCGCCCAAACTATCTAGTAATTCTT R: GGGCTATCAAATTGACTAAAGCCAAA	F: 59,7 R: 60,4	241
15	Satt307	6	(ATT)12	F: GCGCTGGCCTTTAGAAC R: GCGTTGTAGGAAATTTGAGTAGTAAG	F: 56,0 R: 58,6	162
16	Satt286	6	(ATT)17	F: GCGGCGTTAATTTATGCCGGA R: GCGTTTGGTCTAGAATAGTTCTCA	F: 62,9 R: 58,6	217
17	Satt681	6	(TTA)20	F: GCGGTGCACTTGTCAATCTGTT R: GCGGTGAGGCATATGTCAGTC	F: 62,2 R: 61,1	243
18	CSSR531	7	(TAA)13	F: ACCCGTTGACCCATATTATAG R: GAGGGGAAGGTTGATCTAAC	F: 54,6 R: 54,8	245
19	Satt636	7	(ATT)22	F: GTCATGACTCATGAGTCACGTAAT R: CCAAGACCCCCAATTTTATGTCT	F: 58,7 R: 60,8	172
20	Satt207	8	(ATA)24	F: GCGTTTTTCTCATTTTGATTCCTAAAC R: GCGATTGTGATTGTAGTCCCTAAA	F: 58,8 R: 59,1	239
21	Satt333	8	(TAT)22	F: GCGAATGGTTTTTGCTGGAAAGTA R: GCGCAACGACATTTTCACGAAGTT	F: 60,8 R: 63,5	191
22	Soyprp1	9	(TAT)20	F: CGAAGAGCTACGTGCCAAATT R: GTTAGAAAACCTCCGCCACAC	F: 59,3 R: 59,5	184
23	Satt500	10	(TAA)21	F: GCGAACGACCATGATAATCACA R: GCGCTCATTGAAAGCATTGTTATA	F: 59,1 R: 59,3	308
24	Satt633	10	(TAA)12	F: GGGACACTATCGGCCTAGAAAGTT R: GGGTGATAAAGTTCCCCCTCTAAG	F: 62,0 R: 60,1	131
25	Satt638	11	(ATA)13	F: GCGGATCCTATGAGCCTATCTGTATTT R: GCGGCAAGCATTATACTATTTATACGG	F: 62,3 R: 60,7	174
26	Satt359	11	(TAT)15	F: GCGAGAAAATAATCCTGCTCAAG R: GCGTTTAAGTCCAATAACAAAGATAAC	F: 58,1 R: 57,9	178
27	Satt197	11	(ATT)20	F: CACTGCTTTTTCCCCTCTCT R: AAGATACCCCCAACATTATTTGTAA	F: 57,4 R: 56,5	173
28	Satt635	12	(ATA)7	F: GCGGTGTATTAAAATTGTCCATGT R: GCGCTGTCCTAATTTAAATGAGAAAAC	F: 58,4 R: 60,0	172
29	Satt353	12	(TTA)17	F: CATAACGCATTGCCTTTCCTGAA R: GCGAATGGGAATGCCTTCTTATTCTA	F: 62,1 R: 61,5	170

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
30	Satt181	12	(ATT)18	F: TGGCTAGCAGATTGACA R: GGAGCATAGCTGTTAGGA	F: 52,3 R: 52,9	215
31	Satt442	12	(TAA)35	F: CCTGGACTTGTTTGCTCATCAA R: GCGGTTCAAGGCTTCAAGTAGTCAC	F: 59,1 R: 64,2	260
32	Soyhsp176	13	(AT)9	F: TTTTGTTTAAGTTACTGTACTGT R: GCTAGTCTTCTACAACCTTCTA	F: 53,0 R: 54,4	115
33	Satt149	13	(ATT)17	F: TTGCACATTCTTTTTGGTAAACAGTCATAA R: GTTGGAGGCCATAGTCACATTAATCCTTAGA	F: 61,2 R: 62,7	274
34	Satt304	14	(TAA)30	F: GGGTAGTGACGTATTTTCATGGTC R: GCGTAAAAACATTCGTTGACTACATAA	F: 58,9 R: 59,3	225
35	Satt168	14	(ATA)17	F: CGCTTGCCCCAAAAATTAATAGTA R: CCATTCTCCAACCTCAATCTTATAT	F: 55,9 R: 56,5	226
36	Satt651	15	(ATA)10	F: GCGTGCTGTCTTTATACGAAGTACACTA R: GCGTGGCAATAAATATTCTCACTGAA	F: 63,0 R: 60,5	169
37	Satt263	15	(TTA)19	F: CACCCAATCATGATAGCATTTTAT R: CTCATGGAATTGTCTTTCAGTTTC	F: 55,6 R: 56,5	222
38	Satt287	16	(ATA)18	F: GGGGTGAATGAATGTCAAGATGA R: GCGCGAGGTATCAACACAATTACT	F: 58,7 R: 61,7	228
39	Satt596	16	(AAT)19	-	-	-
40	Sat222	17	(TTCT)3	F: GCGGTCATGTGTCCCATTTAATTTAATCAA R: GCGATGTGCCTCAAAAACATAACATCAATAA	F: 63,1 R: 63,3	168
41	Satt311	17	(AAT)13	F: GGGGGAACCACAAAAATCTTAATC R: GTTGAAGCTCAGGCTGTGATGAAT	F: 58,3 R: 61,6	181
42	Satt309	18	(ATT)13	F: GCGCCTTCAAATTGGCGTCTT R: GCGCCTTAAATAAAACCCGAAACT	F: 62,7 R: 60,6	147
43	Satt398	19	(ATTA)3	F: GTAAGGGCGGGTATCAACAGTGCT R: GGTAACCGCGGACTCAGTTAAAC	F: 64,8 R: 61,7	184
44	Sat420	20	(AT)19	F: GCGGATGGAGCCAACA R: GCGTGTAGCCCTAGAAAGTT	F: 56,6 R: 57,6	186
45	Sct189	20	(TC)17	F: CTTTTCTTGGCAATGAT R: AAAATCGCAAAACCTTAGT	F: 49,1 R: 50,8	165

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
46	Satt292	20	(ATA)16	F: GCGGAATTAGAACTCCAGTAAAGA R: GCGAGGCCAACATTGAAAAGT	F: 58,6 R: 60,0	236
47	Satt614	20	(TTA)38	F: CTCCCCTTTAACCTTTCCTTTATTAG R: CGCGGTAGGAATTAATTGTAGATAGGAT	F: 57,5 R: 60,8	309

Примечание: 1 – данные взяты из Soybase.org (<https://www.soybase.org>); 2 – данные получены в результате использования инструмента Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>); F (forward) – прямой праймер; R (reverse) – обратный праймер

- Query – нуклеотидная последовательность микросателлитного локуса, представленная в эталонной сборке генома сои;
- Sbjct – нуклеотидная последовательность микросателлитного локуса, полученная в результате секвенирования амплифицированного фрагмента ДНК;
- цветом выделены области микросателлита: зеленым – основная, оранжевым – дополнительная, потенциально возможно приводящая к полиморфизму локусов

Score		Expect	Identities	Gaps	Strand
320 bits(354)		1e-92	177/177(100%)	0/177(0%)	Plus/Plus
Query	11	TTGTTAAATCACTTATCCG	attattattattattattattattattattattattattat		70
Sbjct	1	TTGTTAAATCACTTATCCG	ATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTAT		60
Query	71	tattattattattattattattattattatattaatacta	AGGGGTCTCTCTAGATATT		130
Sbjct	61	TATTATTATTATTATTATTATTATTATTAATAA	ACTAGGGGTCTCTCTAGATATT		120
Query	131	Ttaaataaaaaataaaaggaaaacatttagaagttaaaataaaaaataagaccaat			187
Sbjct	121	TAAATAAAAAATAAAAGGAAAAACATTTAGAAGTAAAAATAAAAAATAAGACC AAT			177

Рисунок В.1 – Нуклеотидные последовательности ампликонов SSR-локуса Satt507

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
544 bits(602)	1e-159	301/301(100%)	0/301(0%)	Plus/Plus
Query 17	CTACCTAGTTTGTGTGAGGCATATGTCAGTCCAAGTAGATT	ttattattattattattat	76	
Sbjct 1	CTACCTAGTTTGTGTGAGGCATATGTCAGTCCAAGTAGATT	TATTATTATTATTATTAT	60	
Query 77	tattattattattattattattattattattattattattattacttgaatttaattttcata	136		
Sbjct 61	TATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTACTTGAATTAAATTTTCATA	120		
Query 137	caatatcaatgtatttttaattaaattCTTATATTGACTATTTGTAAGTTTATTTAAAGG	196		
Sbjct 121	CAATATCAATGTATTTTAAATTAATTCCTATATTGACTATTTGTAAGTTTATTTAAAGG	180		
Query 197	TTGAAGCTTCTCTAACTTACATATAAAGTTAATCTCATTAGCTTATTGTTAACAGATTG	256		
Sbjct 181	TTGAAGCTTCTCTAACTTACATATAAAGTTAATCTCATTAGCTTATTGTTAACAGATTG	240		
Query 257	ACAAGTGCCTAATTTTCAAGATTAAAATGGAAGTAAAAATGTCAAATCTAGAGGGACT	316		
Sbjct 241	ACAAGTGCCTAATTTTCAAGATTAAAATGGAAGTAAAAATGTCAAATCTAGAGGGACT	300		
Query 317	T 317			
Sbjct 301	T 301			

Рисунок В.2 – Нуклеотидные последовательности ампликонов SSR-локуса Satt681

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
614 bits(332)	2e-180	370/385(96%)	15/385(3%)	Plus/Plus
Query 13	CATAGTCACATTAATCTTAGAATTGAACGAAAGTAGAAATAAATCATTTGAAACtaataa	72		
Sbjct 1	CATAGTCACATTAATCTTAGAATTGAACGAAAGTAGAAATAAATCATTTGAAACTAATAA	60		
Query 73	tcagcactcatataagtttaaaattcaaaagaatatgtgataaaaataataataataata	132		
Sbjct 61	TCAGCACTCATATAAGTTTAAATTCAAAAGAATATGTGATAAA-----A	105		
Query 133	ataataataataataataataataataataaAATGACAGTAAATAGTTAATTTTAAA	192		
Sbjct 106	ATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAAATGACAGTAAATAGTTAATTTTAAA	165		
Query 193	AACCTTAGTGTGTTGACATTTATTTAATTTATTTTACATTTaaaaaaATTAGGATTATTATG	252		
Sbjct 166	AACCTTAGTGTGTTGACATTTATTTAATTTATTTTACATTTAAAAAAATTAGGATTATTATG	225		
Query 253	ACTGTTTACCAAAAAGAATGTGCAACTaaagtaataatattaataataaaatgacattaa	312		
Sbjct 226	ACTGTTTACCAAAAAGAATGTGCAACTAAAGTAATAATATTAATAATAAAATGACATTAA	285		
Query 313	atagtttaatttttaaaaaCTTAGCATTTGACATTTTCATGAATTCATTTAAGATTTTATAGGA	372		
Sbjct 286	ATAGTTAATTTTAAAAACTTAGCATTTGACATTTTCATGAATTCATTTAAGATTTTATAGGA	345		
Query 373	TTAATATGACTGTTTACTAAAAATA	397		
Sbjct 346	TTAATATGACTGTTTACTAAAAATA	370		

Рисунок В.3 – Нуклеотидные последовательности ампликонов SSR-локуса Satt149

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
240 bits(265)	2e-68	138/141(98%)	3/141(2%)	Plus/Plus
Query 3	GTGTAAAAATCTTTGAATCTTGATAGTGtaataataataataataataataataata	62		
Sbjct 1	GTGTAAAAATCTTTGAATCTTGATAGTGATAATAATAATAATAATAATAATAATA	60		
Query 63	ataataataataatGAGTTATAGAAGGAAGTAAGAAATCTGCaaaaagagaagaaaaga	122		
Sbjct 61	ATAATAATAAT---GAGTTATAGAAGGAAGTAAGAAATCTGCAAAAAGAGAAGAAAAGA	117		
Query 123	gtaaaaaataaatagaaaaat	143		
Sbjct 118	GTAAAAAATAAATAGAAAAAT	138		

Рисунок В.4 – Нуклеотидные последовательности ампликонов SSR-локуса Satt532

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
456 bits(505)	5e-133	267/279(96%)	12/279(4%)	Plus/Plus
Query 30	TTTTATTGATTAGTACGGTACTGTCTACCATATAGATATACTATTCTTTTACAAACACTA	89		
Sbjct 1	TTTTATTGATTAGTACGGTACTGTCTACCATATAGATATACTATTCTTTTACAAACACTA	60		
Query 90	AGTGATAAGTGGAAATTATTTAGTTTGTGTTGTGTAGTGCgGTGGTGGTGcataat	149		
Sbjct 61	AGTGATAAGTGGAAATTATTTAGTTTGTGTTGTGTAGTGCgGTGGTGGTGTG-----	115		
Query 150	aataataataataataataataataataataataataataataataataataataat	209		
Sbjct 116	-----ATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAAT	168		
Query 210	aataataataatGGTGAGAGAATGAAGTAGGATTACTTATTGTTGGAATAGTGAGGTTAG	269		
Sbjct 169	AATAATAATAATGGTGAGAGAATGAAGTAGGATTACTTATTGTTGGAATAGTGAGGTTAG	228		
Query 270	tttttttACATTACTaaaaaaGTGTTTTTTACGACAAT	308		
Sbjct 229	TTTTTTTACATTACTAAAAAAGTGTTTTTTACGACAAT	267		

Рисунок В.5 – Нуклеотидные последовательности ампликонов SSR-локуса Satt141

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
563 bits(624)	3e-165	355/395(90%)	39/395(9%)	Plus/Plus
Query 25	TAACCTTTCCTTTATTAGGTCCTTTTAGTCCAATTGATGGATCATTCTTTTATGGCTTC	84		
Sbjct 1	TAACCTTTCCTTTATTAGGTCCTTTTAGTCCAATTGATGGATCATTCTTTTATGGCTTC	60		
Query 85	TTTCTCTTTTAGAGACTTTTCTTATATCTAAAATTGGTGTATGTTGCTTTTGGTTttat	144		
Sbjct 61	TTTCTCTTTTAGAGACTTTTCTTATATCTAAAATTGGTGTATGTTGCTTTTGGTTTAT	120		
Query 145	tattattattattattattattattattattattattattattattattattattattattattattatt	204		
Sbjct 121	TATTATTAT-----TATTATTATTAT	141		
Query 205	tattattattattattattattattattattattattattattattattattattattattattattatt	264		
Sbjct 142	TATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATT	201		
Query 265	taaaataaaatatataaaattattataaatctttaatCCTATCTACAATTAATTCCTACCGA	324		
Sbjct 202	TAAATAAAATATATAAATTATTATAAATCTTAATCCTATCAACAATTAATTCCTACCGA	261		
Query 325	TaaaaaaaaTACACTCTACACAATCTAATTTTTGCATCATTTTTGTGAATTGAACGTGG	384		
Sbjct 262	TAAAAAAAAATACACTCTACACAATCTAATTTTTGCATCATTTTTGTGAATTGAACGTGG	321		
Query 385	AAATTAATGTTTGCATCATGTCAAAGCACACTGA	419		
Sbjct 322	AAATTAATGTTTGCATCATGTCAAAGCACACTGA	356		

Рисунок В.6 – Нуклеотидные последовательности ампликонов SSR-локуса Satt614

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
224 bits(247)	2e-63	141/156(90%)	15/156(9%)	Plus/Plus
Query 26	GATTATATCTCAATTTTCTTtaataataataataataataataataataataataataataat	85		
Sbjct 1	GATTATATCTCAATTTTCTTAAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAAT	60		
Query 86	aataataataataataataataataataataataataataataataataataataataataataat	145		
Sbjct 61	AATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA-----	110		
Query 146	aataaCTATGCACCGAAAAACAATATAATGATTACA	181		
Sbjct 111	-----CTATGCACCGAAAAACAATATAATGATTACA	141		

Рисунок В.7 – Нуклеотидные последовательности ампликонов SSR-локуса Satt442

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
519 bits(575)	6e-152	299/308(97%)	9/308(2%)	Plus/Plus
Query 1	TGCACCAATCATGATAGCATTATTCATTGACTTTATTCCTTAATACTGCAACCATAAA	60		
Sbjct 1	TGCACCAATCATGATAGCATTATTCATTGACTTTATTCCTTAATACTGCAACCATAAA	60		
Query 61	ATAAAATTCAAATGGCAAACCTttattattattattattattattattattattattattattatt	120		
Sbjct 61	ATAAAATTCAAATGGCAAACCTTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATT	120		
Query 121	tattattattattattattattatt-----TCTTTTCTCTCAAGTAATCTTTTGAATAA	171		
Sbjct 121	TATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTCTTTTCTCTCAAGTAATCTTTTGAATAA	180		
Query 172	AAGATATGGTCACAATATATTTTCATTATGGAACTGAAAGACAAATCCATGAGTCACGTT	231		
Sbjct 181	AAGATATGGTCACAATATATTTTCATTATGGAACTGAAAGACAAATCCATGAGTCACGTT	240		
Query 232	TGCTTTCATCAAAATGCAAACACACTTATGCAAGCCACAGAGCGTCAAATTGCTTTCTAA	291		
Sbjct 241	TGCTTTCATCAAAATGCAAACACACTTATGCAAGCCACAGAGCGTCAAATTGCTTTCTAA	300		
Query 292	TAAACGTA	299		
Sbjct 301	TAAACGTA	308		

Рисунок В.8 – Нуклеотидные последовательности ампликонов SSR-локуса Satt263

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
353 bits(191)	2e-102	229/244(94%)	15/244(6%)	Plus/Plus
Query 27	GCATGCTTAAACCTAAATTTTGTCTAATAAAAAATGAGTAAATGACGAATTTAATCTTTA	86		
Sbjct 1	GCATGCTTAAACCTAAATTTTGTCTAATAAAAAATGAGTAAATGACGAATTTAATCTTTA	60		
Query 87	AATTTGTATCTATATGTCATTTTAGTTTCTGAACTaaaaaaCCTTAAATAAAACCCGA	146		
Sbjct 61	AATTTGTATCTATATGTCATTTTAGTTTCTGAACTAAAAAACCTTAAATAAAACCCGA	120		
Query 147	AACTAATTAGTTTTCTCATTTTCTTCCTAAACTTtattattattattattattattat	206		
Sbjct 121	AACTAATTAGTTTTCTCATTTTCTTCCTAAACTT-----TTATTATTAT	165		
Query 207	tattattattattatGACTTAAGTACTGGGAACCAAAACGAGAAAAAGACGCCAATTTG	266		
Sbjct 166	TATTATTATTATTATGACTTAAGTACTGGGAACCAAAACGAGAAAAAGACGCCAATTTG	225		
Query 267	AAGG 270			
Sbjct 226	AAGG 229			

Рисунок В.9 – Нуклеотидные последовательности ампликонов SSR-локуса Satt309

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
594 bits(658)	1e-174	329/329(100%)	0/329(0%)	Plus/Plus
Query 9	GACTACTCGAATGTGATTCAATTAATTTTATTTTCATCCTGATTGCAAAATTTGTATCAAA	68		
Sbjct 1	GACTACTCGAATGTGATTCAATTAATTTTATTTTCATCCTGATTGCAAAATTTGTATCAAA	60		
Query 69	CCATTTGAATGTGAAAAAATTATATATTTTAGTATCCAAATCAAAATCTATATTTTTTA	128		
Sbjct 61	CCATTTGAATGTGAAAAAATTATATATTTTAGTATCCAAATCAAAATCTATATTTTTTA	120		
Query 129	ATTCCTTAAATCTTTAAATATTTTAAGTCCAATAACAAAGATAACTTTCCTACTattca	188		
Sbjct 121	ATTCCTTAAATCTTTAAATATTTTAAGTCCAATAACAAAGATAACTTTCCTACTATTCA	180		
Query 189	ttaattctattattattattattattattattattattattattattattattatttcgattta	248		
Sbjct 181	TTAATTCTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTTCGATTTA	240		
Query 249	ctggtattttatttaACAGTGTAATACCAAAGTAATTAATCTCCACTCCAGACACCTTGAG	308		
Sbjct 241	CTGGTATTTATTTAACAGTGTAATACCAAAGTAATTAATCTCCACTCCAGACACCTTGAG	300		
Query 309	CAGGATTATTTTCTGTTTTGACGGCAGCT 337			
Sbjct 301	CAGGATTATTTTCTGTTTTGACGGCAGCT 329			

Рисунок В.10 – Нуклеотидные последовательности ампликонов SSR-локуса Satt359

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
745 bits(825)	0.0	414/415(99%)	0/415(0%)	Plus/Plus
Query 28	ACA	tattattattttgaaataaatgttgaattattattattattattattattattctcttta		87
Sbjct 1	ACAT	TATTATTATTGAAATAAATGTTGAATTATTATTATTATTATTATTATTATCTTTTA		60
Query 88	gttttttagtttttaatta	AAAAAAGAAAAAATGGTTGACAGATGTAAGATAACATCAT		147
Sbjct 61	GTTTTTAGTTTTTAA	TAAAAAAGAAAAAATGGTTGACAGATGTAAGATAACATCAT		120
Query 148	GTCTGAAGAGTTATTGTTTATAATAGTTTGATACATAATAGTTTTCAAACATATTTGGT			207
Sbjct 121	GTCTGAAGAGTTATTGTTTATAATAGTTTGATACATAATAGTTTTCAAACATATTTGGT			180
Query 208	CTAGAATAGTTCTCAA	AATTAGTTAAAAGATAAAACGGCTCAAAAAATTGTATACACGAA		267
Sbjct 181	CTAGAATAGTTCTCAA	AATTAGTTAAAAGATAAAACGGCTCAAAAAATTGTATCCACGAA		240
Query 268	AGATGGAATATTCTTTTATTAATAATGTAA	attattattattattattattattattattatt		327
Sbjct 241	AGATGGAATATTCTTTTATTAATAATGTAA	ATTATTATTATTATTATTATTATTATTATT		300
Query 328	tattattattattattattattatt	CCTGTTTACGTGTAACACTGTAATATCTATGCCAT		387
Sbjct 301	TATTATTATTATTATTATTATTATT	CCTGTTTACGTGTAACACTGTAATATCTATGCCAT		360
Query 388	AAAAATTTCCGGCATAAATTAACGC	ACTACTTTAGATTTTCATGGATAAATTAAT		442
Sbjct 361	AAAAATTTCCGGCATAAATTAACGC	ACTACTTTAGATTTTCATGGATAAATTAAT		415

Рисунок В.11 – Нуклеотидные последовательности ампликонов SSR-локуса Satt286

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
476 bits(527)	5e-139	269/272(99%)	3/272(1%)	Plus/Plus
Query 21	GAGGCTGGCTCCATT	CGGGTCGGGTAGAAGA	ACCTGCCCCGGAAGAC	TTTGGGTTTGAG 80
Sbjct 1	GAGGCTGGCTCCATT	CGGGTCGGGTAGAAGA	ACCTGCCCCGGAAGAC	TTTGGGTTTGAG 60
Query 81	CACCGTGACTTTCT	GGGTGGCGAGGCTTT	GCACGAGTTGAATGG	CTACCATCTGATGA 140
Sbjct 61	CACCGTGACTTTCT	GGGTGGCGAGGCTTT	GCACGAGTTGAATGG	CTACCATCTGATGA 120
Query 141	GGGGAAGGTTGATCT	AACGGAGGTGCTGAG	GGCTCTCGTGTGAAAT	GGCTAACCCGCTCTA 200
Sbjct 121	GGGGAAGGTTGATCT	AACGGAGGTGCTGAG	GGCTCTCGTGTGAAAT	GGCTAACCCGCTCTA 180
Query 201	TGTTAAAGTTCGCCCT	AGGCGTGGATTAAGTACT	taataataataataataataataata	260
Sbjct 181	TGTTAAAGTTCGCCCT	AGGCGTGGATTAAGTACT	---TAATAATAATAATAATAATAATA	237
Query 261	ataataataataaat	GTTAAGTAGCAGGTGCAT	292	
Sbjct 238	ATAATAATAATAAT	GTTAAGTAGCAGGTGCAT	269	

Рисунок В.12 – Нуклеотидные последовательности ампликонов
SSR-локуса CSSR531

Score		Expect	Identities	Gaps	Strand
355 bits(192)		5e-103	230/245(94%)	15/245(6%)	Plus/Plus
Query	10	CCGTACAAGATAGTAATCATACGAGTGTAAGGTTTCCTAT	AGAGAGAGAGACATGAATAC	69	
Sbjct	1	CCGTACAAGATAGTAATCATACGAGTGTAAGGTTTCCTAT	AGAGAGAGAGACATGAATAC	60	
Query	70	TAAGGGGGATTATTTAATTAAAAAGAGGATTGTTTTAAATAGGta	taataataataataa	129	
Sbjct	61	TAAGGGGGATTATTTAATTAAAAAGAGGATTGTTTTAAATAGGTA	-----	106	
Query	130	taataataataataataataataataataataataataa	aaGCAAGGAGAAAGAGATG	189	
Sbjct	107	-AATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA	AAGCAAGGAGAAAGAGATG	165	
Query	190	TTAAAAATGGTGGAAGGAAAAAGATAACCCATAAAAGGAACATTGTAATATTTGGTGGAC		249	
Sbjct	166	TTAAAAATGGTGGAAGGAAAAAGATAACCCATAAAAGGAACATTGTAATATTTGGTGGAC		225	
Query	250	GAAGG	254		
Sbjct	226	GAAGG	230		

Рисунок В.13 – Нуклеотидные последовательности ампликонов
SSR-локуса Satt596

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	530 bits(587)	4e-155	326/356(92%)	30/356(8%)	Plus/Plus
Query	23	TTGAATAATTTACAAAATATTTTATGTTAAATCTCATTATCTGTCA TTGTATACCAAAA			82
Sbjct	1	TTGAATAATTTACAAAATATTTTATGTTAAATCTCATTATCTGTCA TTGTATACCAAAA			60
Query	83	A ACTAATACATTGAGCTAGGACTGCCTAACCCGTCAATTTATTAATGGGGTG AATGAATG			142
Sbjct	61	A ACTAATACATTGAGCTAGGACTGCCTAACCCGTCAATTTATTAATGGGGTG AATGAATG			120
Query	143	T CAAGATGATGAGGCTTTGAAATAAAGCCTCTTTACTTTtattattattattattattat			202
Sbjct	121	T CAAGATGATGAGGCTTTGAAATAAAGCCTCTTTACTTTT-----			161
Query	203	tattattattattattattattattattattattCACACTAATTTTCAC TGTAGGACTATA			262
Sbjct	162	-----TTATTATTATTATTATTATTCACACTAATTTTCAC TGTAGGACTATA			210
Query	263	ATTCCTGTGtaaaaaataaaccttttcataataaatattacatacataataataattata			322
Sbjct	211	ATTCCTGTGTA AAAAAATAACCTTTTCATAATAAATATTACATACATAATATAATTATA			270
Query	323	aaaatatataaaagtaatgtg ttgatacctcg ttaaaaaataaatCAATCTGACACAC			378
Sbjct	271	AAAAATATAAAAGTAATTGTGTTGATACCTCGTTAAAAATAAATCAAT CTGACACAC			326

Рисунок В.14 – Нуклеотидные последовательности ампликонов
SSR-локуса Satt287

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
220 bits(243)	2e-62	136/148(92%)	12/148(8%)	Plus/Plus
Query 11	CCGAAGAATTACGTG	attattattattattattattattattattattattattattattattattattattatt	70	
Sbjct 1	CCGAAGAATTACGTG	ATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATT	60	
Query 71	attattattattattatt-----	CCAGTTAGTGTTCGTTTGTTTACCAAAAATC	118	
Sbjct 61	ATTATTATTATTATTATTATTATTATT	CCAGTTAGTGTTCGTTTGTTTACCAAAAATC	120	
Query 119	GTATTATAGAGAGAGGGGAAAAAGCAGT	146		
Sbjct 121	GTATTATAGAGAGAGGGGAAAAAGCAGT	148		

Рисунок В.15 – Нуклеотидные последовательности ампликонов
SSR-локуса Satt197

Score		Expect	Identities	Gaps	Strand
352 bits(390)		3e-102	195/195(100%)	0/195(0%)	Plus/Plus
Query	27	TCATCTTCATATGTGTCCATGATCATTTTGATGGGTGCAATTTTCTTGTTCAGTTTTGA			86
Sbjct	1	TCATCTTCATATGTGTCCATGATCATTTTGATGGGTGCAATTTTCTTGTTCAGTTTTGA			60
Query	87	TCCTGTtttttGTGGAGTTtatattattattattattattattattattattattattatt			146
Sbjct	61	TCCTGTtttttGTGGAGTTTATATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATT			120
Query	147	attattattattattattattattattattattattatttaCAAGTGCTAGTATGTTGATCTCATTC			206
Sbjct	121	ATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTACAAAGTGCTAGTATGTTGATCTCATTC			180
Query	207	TTGGTAGTTAGATCG	221		
Sbjct	181	TTGGTAGTTAGATCG	195		

Рисунок В.16 – Нуклеотидные последовательности ампликонов
SSR-локуса AW277661

Score		Expect	Identities	Gaps	Strand
340 bits(376)		1e-98	188/188(100%)	0/188(0%)	Plus/Plus
Query	31		ATGTGGTTGGAGGGTGGGaaaaaaaaaGAGACAATACC		90
Sbjct	1		ATGTGGTTGGAGGGTGGGAAAAAAAAAGAGACAATACC		60
Query	91		aataataataataataataataataataaGAGAAAAATACATCAATACTAAGAAGTTA		150
Sbjct	61		AATAATAATAATAATAATAATAATAATAAGAGAAAAATACATCAATACTAAGAAGTTA		120
Query	151		TTAATTTAAATGATACTGAATTTAATATCCTTAAAGTAAGTTCTCAAAAGAGATATAAGAT		210
Sbjct	121		TTAATTTAAATGATACTGAATTTAATATCCTTAAAGTAAGTTCTCAAAAGAGATATAAGAT		180
Query	211	TGAGGTTG	218		
Sbjct	181	TGAGGTTG	188		

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	394 bits(213)	1e-114	251/266(94%)	15/266(5%)	Plus/Plus
Query	4	AACAATCACTAGTACGGGTAAAATAAAATATCATTCTTAATAAATAAAAAACATCTCTTACT	63		
Sbjct	1	AACAATCACTAGTACGGGTAAAATAAAATATCATTCTTAATAAATAAAAAACATCTCTTACT	60		
Query	64	ATATTTTCCTTTTTCTTAATTAACATGCAAattattattattattattattattattat	123		
Sbjct	61	ATATTTTCCTTTTTCTTAATTAACATGCAA-----TATTATTATTATTAT	105		
Query	124	tattattattattattattattattattattattattattattatttctaatagtttattatatatTTTTTcctt	183		
Sbjct	106	TATTATTATTATTATTATTATTATTATTATCTAATAGTTATTATATATTTTTTCTTT	165		
Query	184	caatttcctattttattttaAAAcaaaaaaTTATTTGCAATACTCCAAGTTTTGCTCTAA	243		
Sbjct	166	CAATTTCATTTTATTATAAACAAAAAATTATTTGCAATACTCCAAGTTTTGCTCTAA	225		
Query	244	GAGGAAGAATACAAAAAACATTGAAGA	269		
Sbjct	226	GAGGAAGAATACAAAAAACATTGAAGA	251		

Рисунок В.19 – Нуклеотидные последовательности ампликонов
SSR-локуса Satt549

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
411 bits(222)	9e-120	222/222(100%)	0/222(0%)	Plus/Plus
Query 4	CACGCATTGCCTTCTCCTGAATAATTTGATTATCACCTTAAGAATCTCAACCGATTACACTA	63		
Sbjct 1	CACGCATTGCCTTCTCCTGAATAATTTGATTATCACCTTAAGAATCTCAACCGATTACACTA	60		
Query 64	TTCATTACTTCAATGTTCTTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATT	123		
Sbjct 61	TTCATTACTTCAATGTTCTTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATT	120		
Query 124	attattattatAAATAGCTTTAGAATAAGAAGGCATTCCCATTAACCTAGGTTTGGTTAA	183		
Sbjct 121	ATTATTATTATAAATAGCTTTAGAATAAGAAGGCATTCCCATTAACCTAGGTTTGGTTAA	180		
Query 184	TTTCAGCTACCTAGACTAGGAATTGATAAGGGTATTTGTGAT	225		
Sbjct 181	TTTCAGCTACCTAGACTAGGAATTGATAAGGGTATTTGTGAT	222		

Рисунок В.20 – Нуклеотидные последовательности ампликонов
SSR-локуса Satt353

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
457 bits(247)	2e-133	285/300(95%)	15/300(5%)	Plus/Plus
Query 14	TTGGGTTGAGAAATGATGATTTTGAGATTTCTCCTGTAGAATATTTTTAAGAATATTTT	73		
Sbjct 1	TTGGGTTGAGAAATGATGATTTTGAGATTTCTCCTGTAGAATATTTTTAAGAATATTTT	60		
Query 74	AAAAAATGAGATAAATGAATTAGAACTCCAGTAAAGaaaaaaTGT-----	119		
Sbjct 61	AAAAAATGAGATAAATGAATTAGAACTCCAGTAAAGAAAAAATGTATAATAATAATAAT	120		
Query 120	-ataataataataataataataataataataataataataataataattttgggtcaa	178		
Sbjct 121	AATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATTTGGTCAA	180		
Query 179	aagaacaatatagtaaattttaacaacaaaaatataaaatttGGCTACATTATTTTCT	238		
Sbjct 181	AAGAAACAAATATAGTAAATTTAACAAACAAAAATATAAAATTTGGCTACATTATTTTCT	240		
Query 239	TCTTTAAGTAATGTTTTATACTCGAACAACAATGGAAGACTTGATAAAACACTTCCATTA	298		
Sbjct 241	TCTTTAAGTAATGTTTTATACTCGAACAACAATGGAAGACTTGATAAAACACTTCCATTA	300		

Рисунок В.21 – Нуклеотидные последовательности ампликонов
SSR-локуса Satt292

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
530 bits(587)	4e-155	323/350(92%)	27/350(7%)	Plus/Plus
Query 16	GTGCCAAattacatcaatttactacaactattactactatttattattattattattatt	75		
Sbjct 1	GTGCCAAATTACATCAATTTACTACAACATTACTACTATTATTATTATTATTATTATT	60		
Query 76	attattattattattattattattattattattattattattattattattattattatt	135		
Sbjct 61	ATTAT-----TATTATTATAAACCTGGTGTCTATTATT	93		
Query 136	TTATGTACTTGTTCCTCATCAATATATATTGTGTGGGCGGAGTTTCTAACAGATGT	195		
Sbjct 94	TTATGTACTTGTTCCTCATCAATATATATTGTGTGGGCGGAGTTTCTAACAGATGT	153		
Query 196	TTGAAAATAAATAATCTTATCAAGTATACTATGAGTAGTCAAGAGAATCAAACTAGATC	255		
Sbjct 154	TTGAAAATAAATAATCTTATCAAGTATACTATGAGTAGTCAAGAGAATCAAACTAGATC	213		
Query 256	ATGGAAATTACCAAAGCAATTTAGCATGAAAGCCTCGGGTGTTTCGAGGTTTCTAATCTAA	315		
Sbjct 214	ATGGAAATTACCAAAGCAATTTAGCATGAAAGCCTCGGGTGTTTCGAGGTTTCTAATCTAA	273		
Query 316	CAAAATGTTCTGATTTCAATTTAGCCAACCTGAATTTTGTAGCCAAATAT	365		
Sbjct 274	CAAAATGTTCTGATTTCAATTTAGCCAACCTGAATTTTGTAGCCAAATAT	323		

Рисунок В.22 – Нуклеотидные последовательности ампликонов
SSR-локуса Souprp1

Приложение Г. ДНК-профили сортов сои

Для всех рисунков, представленных в приложении Г, применимы следующие обозначения:

- по горизонтали (№ 1–47) ДНК-профили индивидуальных растений сорта;
- по вертикали (Satt507–Soyprp1) SSR-маркеры;
- ячейки одинакового цвета внутри одного столбца (SSR-маркера) обозначают идентичные по размеру фрагменты ДНК (аллели), ячейки разного цвета – отличающиеся аллели;
- ячейки белого цвета обозначают гетерозиготы;
- числовые значения внутри ячейки представляют собой размеры фрагментов ДНК (п.н.), установленные по результатам фрагментного анализа.

Приложение Д. Копии патента и свидетельств



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации базы данных

№ 2026622727

**База данных ДНК-профилей сортов сои по
микросателлитным маркерам**

Правообладатель: **Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Федеральный научный центр
«Всероссийский научно-исследовательский институт
масличных культур имени В.С. Пустовойта» (RU)**

Авторы: **Савиченко Виолетта Георгиевна (RU), Гучетль
Саида Заурбиевна (RU), Иванов Сергей Владимирович
(RU), Рамазанова Светлана Алексеевна (RU)**

Заявка № **2026622451**

Дата поступления **25 мая 2026 г.**

Дата государственной регистрации
в Реестре баз данных **10 июня 2026 г.**



*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

документ подписан электронной подписью
Сертификат 58a570a1f7-ak1305310416818a75129500
Владелец **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 04.07.2025 по 28.11.2026

Ю.С. Зубов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации базы данных

№ 2026623478

База данных панелей бинов m1 и m2 для определения аллелей микросателлитных локусов ДНК сои

Правообладатель: *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный научный центр "Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта" (RU)*

Авторы: *Савиченко Виолетта Георгиевна (RU), Гучетль Саида Заурбиевна (RU), Рамазанова Светлана Алексеевна (RU)*



Заявка № 2026623222

Дата поступления 07 июля 2026 г.

Дата государственной регистрации

в Реестре баз данных 17 июля 2026 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

документ подписан электронной подписью
Сертификат 00a5703e4f1a133253164b8818e75129506
Владельцем **Зубов Юрий Сергеевич**
Диск выдан с 24.07.2025 по 28.11.2026

Ю.С. Зубов