

doi 10.18699/vjgb-26-23

## Изменчивость органельных геномов в коллекции раннеспелых сортов сои

В.В. Александрович<sup>1</sup> , М.Г. Синявская , О.П. Шатарнов<sup>1</sup>, О.Г. Давыденко<sup>2</sup><sup>1</sup> Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь<sup>2</sup> ООО «Соя-Север Ко», пос. Колодищи, Минская область, Республика Беларусь valeria.alexandrovich@gmail.com

**Аннотация.** Изменчивость геномов клеточных органелл – хлоропластов и митохондрий – является немаловажной компонентой общей изменчивости генома растений. Получено большое количество данных о сравнительных особенностях организации последовательностей органельных ДНК для различных групп растений. В настоящей работе представлены новые оригинальные данные об изменчивости геномов митохондрий и хлоропластов у сои (*Glycine max* (L.) Merr.), важной хозяйственной и пищевой культуры, широко возделываемой на территории Центральной Европы, в том числе и в Республике Беларусь. Рабочей гипотезой нашего исследования изначально стало предположение: возможно, особенности изменчивости последовательности или структуры ДНК органелл сои определяют способность одних сортов выступать в роли лучших материнских родителей, а других – быть лучшими отцовскими формами. Получены новые полные нуклеотидные последовательности хлоропластного и митохондриального геномов 46 образцов культурной сои с применением метода секвенирования нового поколения (NGS) на платформе Illumina. Выполнено комплексное биоинформатическое сравнительное исследование внутривидовой изменчивости геномов органелл у 46 сортов сои разнообразного географического происхождения. Выявлены полиморфные локусы геномов. Данные об изменчивости ДНК верифицированы секвенированием по Сэнгеру. Спектр изменчивости органельных ДНК, исследованных методом полногеномного секвенирования сортов сои, представлен тремя гаплотипами хлоропластной ДНК (С1–С3) и пятью гаплотипами митохондриальной ДНК (М1–М5). Обнаружен сравнительно низкий уровень внутривидовой изменчивости геномов органелл у *G. max*. Хлоропластный геном сои обладал меньшим уровнем изменчивости последовательности, чем митохондриальный. Разработан набор ДНК-маркеров к полиморфным локусам геномов органелл, позволяющий дифференцировать сорта сои на плазматипы. Методом ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру дополнительно изучено 90 образцов сои из коллекции. Низкий уровень внутривидовой изменчивости геномов органелл у *G. max* подтвержден на расширенной группе образцов. Большая часть коллекции была представлена тремя плазматипами – С1/М1, С2/М2 и С1/М3. 46 полных последовательностей хлоропластной ДНК помещено в NCBI GenBank. Гипотеза влияния ДНК органелл на комбинационную способность различных сортов в настоящее время не подтверждена. Требуется более детальное изучение механизмов ядерно-цитоплазматического взаимодействия, поиск ядерных маркеров, влияющих на экспрессию цитоплазматических генов.

**Ключевые слова:** соя; *Glycine max*; генетическая изменчивость; органеллы; хлоропласты; митохондрии; NGS

**Для цитирования:** Александрович В.В., Синявская М.Г., Шатарнов О.П., Давыденко О.Г. Изменчивость органельных геномов в коллекции раннеспелых сортов сои. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(2):205-211. doi 10.18699/vjgb-26-23

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках ГПНИ «Биотехнологии 2», 2021–2025 гг., подпрограмма «Геномика, эпигеномика, биоинформатика», задание 2.1.3.

## Variability of organelle genomes in a collection of early maturing soybean varieties

V.V. Aleksandrovich<sup>1</sup> , M.G. Siniuskaya , A.P. Shatarnov<sup>1</sup>, O.G. Davydenko<sup>2</sup><sup>1</sup> The Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus<sup>2</sup> Soya-North Co Ltd, Kolodishchi, Minsk oblast, Belarus valeria.alexandrovich@gmail.com

**Abstract.** Variability of the genomes of cellular organelles (chloroplast and mitochondria) is an important component of the overall variability of the plant genome. A large amount of data has already been obtained on the comparative characteristics of the organization of organelle DNA sequences for different groups of plants. This paper presents new original data on the variability of mitochondrial and chloroplast genomes in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), a crop of great economic importance widely cultivated in Central Europe, including the Republic of Belarus. Initially, we supposed that the peculiarities of soybean organelle DNA sequence or organization promote certain soybean cultivars to be the best maternal and others, alternatively, the best paternal forms. As a result of the study, new complete nucleotide sequences of chloroplast and mitochondrial genomes of 46 soybean samples were obtained by the next generation

sequencing method (NGS) on the Illumina platform. A comprehensive bioinformatic comparative study of intraspecific organelle genome variability in 46 soybean varieties of diverse geographical origin was conducted. Polymorphic loci of genomes were discovered. Data on DNA variability were verified by Sanger sequencing. The spectrum of organelle DNA variability of cultivated soybean was represented by three chloroplast DNA haplotypes (C1–C3) and five mitochondrial DNA haplotypes (M1–M5). A comparatively low level of intraspecific variability of organelle genomes in *G. max* was revealed. The soybean chloroplast genome had a lower level of sequence variability than the mitochondrial genome. A set of DNA markers for polymorphic loci of organelle genomes was developed, allowing the differentiation of varieties of the studied group into plasmatypes. Additionally, 90 soybean samples from the collection were studied using PCR followed by Sanger sequencing. The low level of intraspecific variability of organelle genomes in *G. max* was confirmed on the extended group of samples. The majority of cultivars were represented by three plasmatypes – C1/M1, C2/M2 and C1/M3. 46 complete chloroplast DNA sequences have been deposited in NCBI GenBank. The hypothesis that organelle DNA influences the combining ability of different varieties has not yet been confirmed. A more detailed study of the mechanisms of nuclear-cytoplasmic interaction is required, as well as a search for nuclear markers that affect the expression of organelle genes.

**Key words:** soybean; *Glycine max*; genetic variability; organelles; chloroplasts; mitochondria; NGS

**For citation:** Aleksandrovich V.V., Siniauskaya M.G., Shatarnov A.P., Davydenko O.G. Variability of organelle genomes in a collection of early maturing soybean varieties. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(2): 205-211. doi 10.18699/vjgb-26-23

## Введение

Изучение особенностей организации и функционирования геномов клеточных органелл – одна из значимых областей современной генетики растений. За последние десятилетия множество исследований было посвящено данной теме с целью решения вопросов систематики, филогении, изучения ядерно-цитоплазматической коадаптации и взаимодействия геномов (Gualberto, Newton, 2017; Johnston, 2019; Tsunewaki et al., 2019). Геномы органелл важнейших сельскохозяйственных культур активно исследуются в мире (Siniauskaya et al., 2020; Hu et al., 2022; Yue et al., 2023).

Соя культурная (*Glycine max* (L.) Merr.) выращивается в условиях Беларуси уже не один год. В 1980-х годах зародилась отечественная школа генетики и селекции этой культуры на базе лаборатории нехромосомной наследственности Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси. Основное направление селекции сои в Беларуси – создание раннеспелых и ультра-раннеспелых сортов с достаточно высокими урожайностью и содержанием белка в зерне.

Подбор исходного материала для гибридизации – ключевое звено в селекции любой культуры. Известно, что сорта могут различаться по сортообразующей способности (продукции новых гибридов и сортов). Поэтому необходимы анализ родословных и поиск таких сортов. На основании изучения родословных гибридов, сортов, создаваемых другими исследователями, а также собственных данных, нами выделены сорта сои, являющиеся наиболее перспективными материнскими или отцовскими родителями, которые наиболее часто используются в скрещивании. Учитывая строго материнское наследование органелл у сои, можно предположить, что наблюдаемая дифференциация сортов по способности давать успешные новые комбинации генов у гибридов определяется ядерно-цитоплазматическими взаимодействиями, возможно, особенностями организации и экспрессии органелльных геномов.

Наличие коллекций исходного селекционного материала растений с широким варьированием по ряду хозяйственно

ценных признаков – необходимая предпосылка создания новых, перспективных сортов. Изучение фенотипической, генетической изменчивости коллекций является одним из базовых основополагающих направлений современной селекции, в том числе и маркер-ассоциированной.

Первые молекулярно-генетические исследования по изучению изменчивости органелльных геномов культурной и дикой сои проводились в 1980-х годах методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Классической в то время была классификация линий культурной и дикорастущей сои на три гаплотипа хлоропластной ДНК (хпДНК) и пять гаплотипов митохондриальной (мтДНК) (Shoemaker et al., 1986). Метод ПДРФ использовался для оценки разнообразия органелльных геномов линий дикорастущей сои (*Glycine soja*) (Abe et al., 1999), сортов сои, возделываемых на территории Китая (Shimamoto et al., 1998).

Возможность более детального изучения разнообразия геномов органелл растений, в том числе и сои, другим методом – по изменчивости длины микросателлитных повторов (SSR) в хпДНК – показана W. Powell с коллегами (1995). Применение такого подхода позволило расширить представления об изменчивости хпДНК сои, получить качественно новые данные. Так, в работе (Xu et al., 2002) путем исследования шести хлоропластных микросателлитов выделено 52 гаплотипа *G. soja* и 8 гаплотипов культурной сои, при этом 75 % линий *G. max* относилось к одному самому распространенному гаплотипу.

Работы по изучению изменчивости генома хлоропластов сои были начаты в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси в 2000-х годах. ПЦР-ПДРФ исследование коллекции имеющихся в то время в лаборатории нехромосомной наследственности 60 сортов позволило обнаружить три плазматипа среди них, в зависимости от отсутствия либо присутствия в хпДНК сайтов узнавания рестриктаз *EcoRI* и *ClaI*. Большинство сортов (из более 60 изученных) имели дополнительный *ClaI* сайт, три линии – дополнительный сайт *EcoRI*, хпДНК двух линий не имела сайтов рестрикции *ClaI* и *EcoRI* (Синявская и др., 2004).

Исследованы также микросателлитные повторы хпДНК; проведена оценка разнообразия коллекций образцов сои различного происхождения (Aksyonova et al., 2007).

Результаты ряда авторских коллективов по анализу молекулярного разнообразия оргanelльных геномов неизменно демонстрировали, что дикорастущая соя обладает более высоким уровнем цитоплазматической изменчивости, чем ее культурный сородич, – большинство сортов *G. max* было отнесено к одному либо двум основным гаплотипам (Shimamoto, 2001; Xu et al., 2002). Сорты китайской селекции были более генетически разнообразны, чем сорта, выращиваемые на территории Северной Америки и Европы (Yue et al., 2023). Низкий уровень полиморфизма оргanelльных геномов у сои может объясняться многими факторами: однородительским наследованием оргanelл у сои по материнской линии, что исключает возможность рекомбинации геномов от двух родителей; особенностями размножения культурной сои, например строгим самоопылением.

Изучение особенностей структуры геномов оргanelл позволяет получить информацию, которую можно применить для рассмотрения и предположения о возможных микроэволюционных изменениях внутри рода *Glycine*. Общепринятой считается теория монофилетического происхождения культурной сои от предковой формы *G. soja*. Данная гипотеза выдвинута на основе исследования ядерных маркеров, полногеномного секвенирования и панелей ядерных SNP (Jeong et al., 2019). Однако в нескольких работах (Xu et al., 2002; Fang et al., 2016) была предложена теория повторяющихся процессов доместикиции сои. На происхождение современных культурных сортов от нескольких изначальных материнских линий указывают особенности геномов хлоропластов и митохондрий, в частности, у большинства сортов геномы оргanelл относятся к одному из двух основных плазматипов. С. Fang с коллегами (2016) разделяют все гаплотипы хпДНК на две группы и предполагают, что в процессе доместикиции сои было задействовано несколько материнских линий дикорастущей сои, что дало начало двум группам плазматипов у современных сортов.

Развитие методов секвенирования нового поколения (NGS) позволило получить принципиально новую информацию об организации оргanelльных геномов растений, в том числе и сои, их последовательностях и изменчивости. Y. Yue с коллегами (2023) провели анализ данных NGS более 2000 линий сои из общедоступных баз данных и обнаружили, что 69.2 % всех культивируемых сортов сои относится к одному плазматипу – СТ1/МТ1, 18.1 % – к плазматипу СТ2/МТ2, что соотносится с данными более ранних исследований.

Полногеномное секвенирование (платформа Illumina) было ранее успешно применено нами для изучения и оценки разнообразия хп- и мтДНК ячменя (род *Hordeum*) (Sinauskaya et al., 2020); разработан подход к анализу результатов полногеномного секвенирования оргanelльной ДНК. В настоящем исследовании нами поставлена цель – методом NGS (Illumina) получить новые данные по полногеномным последовательностям оргanelльных ДНК, оце-

нить их уровень изменчивости, взяв в качестве выборки образцы из коллекции раннеспелых и ультрараннеспелых сортов лаборатории нехромосомной наследственности Института генетики и цитологии НАН Беларуси.

## Материалы и методы

**Выделение ДНК.** Материалом исследования служили образцы оргanelльной и тотальной ДНК 46 раннеспелых сортов сои из коллекции Института генетики и цитологии, включая сорта белорусской селекции (полный список приведен в Приложении)<sup>1</sup>. Выбранные сорта являлись хорошими материнскими или отцовскими формами по многолетним данным (неопубликованные данные).

Для выделения оргanelл по модифицированной методике S.O. Triboush с коллегами (1998) использовали первые молодые листья 7–10-дневных проростков сои. Изолированные оргanelлы подвергали лизису; оргanelльную ДНК очищали фенол-хлороформом (стандартный протокол). Качество препарата оргanelльной ДНК проверяли методом ПДРФ с последующим анализом в 0.8 % агарозном геле по методике S.O. Triboush с коллегами (1998).

Выделение тотальной ДНК проводили методом фенол-хлороформной экстракции из листьев растений, проращиваемых в теплицах, либо из первых листьев 7-дневных этиолированных проростков сои (стандартный протокол).

**Проведение NGS.** ДНК оргanelл исследована методом парноконцевого секвенирования на приборе Illumina MiSeq с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle) (Illumina Inc., США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для приготовления ДНК-библиотеки применяли наборы Illumina DNA Prep (M) Tagmentation (24 samples, IPB) и Nextera XT Index Kit v2 Set A (96 indexes, 384 samples) (Illumina Inc., США) в соответствии с рекомендациями производителя.

**Анализ данных NGS.** Данные полногеномного секвенирования обработаны согласно разработанному ранее алгоритму (Ермакович и др., 2020), который включал в себя: выравнивание прочтений на референсные последовательности хлоропластного и митохондриального геномов, конвертацию в файлы формата bam и их сортировку, генерацию VCF-файлов и их фильтрацию. Файлы выравнивания прочтений (bam) визуализировались с помощью Unipro Ugene и IGV. В качестве референсных геномов использованы сборки хлоропластного генома сорта Bragg (идентификационный номер GenBank MW357264) и митохондриального генома сорта Aiganhuang (NC020455).

**Верификация данных NGS.** Для выявленных после анализа данных полногеномного секвенирования полиморфных локусов оргanelльных геномов был сконструирован набор праймеров для верификации сайтов изменчивости секвенированием по Сэнгеру.

Полиморфные участки ДНК амплифицировали отдельно в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 30–40 нг ДНК образца, 7.5 мкл 2x смеси реагентов ArtMix (ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь), по 1 мкл соответствующих праймеров (5 пмоль/мкл) (ОДО «ПраймТех»,

<sup>1</sup> Приложение см. по адресу:

<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx14.pdf>

Республика Беларусь). ПЦР проводили на амплификаторе C1000 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) по следующему протоколу: 5 мин при 95 °C, затем 30 циклов, каждый из которых включал денатурацию при 95 °C в течение 30 с, отжиг праймеров в течение 30 с и элонгацию при 72 °C в течение 25–80 с, после чего следовала финальная элонгация при 72 °C в течение 5 мин. Продукт ПЦР идентифицировали в 1.5 % агарозном геле.

Секвенирование по Сэнгеру исследуемых образцов проведено на генетическом анализаторе 3500 Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific Inc., США) с применением набора BrilliantDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (NimaGen B.V., Нидерланды) согласно рекомендациям производителя. Результаты секвенирования анализировали с помощью программ Chromas и FinchTV путем сопоставления полученных последовательностей ДНК с референсным геномом *G. max* (сорта Bragg и Aiganhuang) из NCBI GenBank.

**Филогенетический анализ** выполняли путем создания presence/absence матрицы на основании наличия либо отсутствия отличий в хп- и мтДНК с использованием программы Mesquite (<http://www.mesquiteproject.org>), расчета матрицы дистанций и построения дендрограммы в программе phylip (Felsenstein, 1989) на основе алгоритма neighbor-joining. Визуализацию дендрограмм осуществляли в онлайн сервисе Iroki (Moore, 2020).

**Сборка хлоропластных геномов.** Полные нуклеотидные последовательности хпДНК всех 46 сортов, взятых для исследования, получены путем ручного редактирования референсной последовательности хлоропластного генома Bragg с учетом обнаруженных отличий.

## Результаты и обсуждение

Проведено NGS геномов хлоропластов и митохондрий 46 сортов культурной сои для изучения их внутривидовой изменчивости. Полученные после NGS прочтения были обработаны и выровнены на референсные последовательности хлоропластного генома сорта Bragg и митохондриального генома сорта Aiganhuang для получения VCF-файлов, содержащих информацию об отличиях хп и мт геномов изученных сортов от референса. В результате сравнительного анализа VCF-файлов идентифицированы полиморфные локусы хлоропластной и митохондриальной ДНК.

### Изменчивость генома хлоропластов

В хпДНК обнаружено девять полиморфных сайтов. Межсортовая изменчивость хпДНК сои была представлена пятью однонуклеотидными заменами (SNP) и четырьмя районами микросателлитных повторов. Четыре из пяти идентифицированных SNP находились в кодирующих областях генов *atpB*, *rps4*, *accD* и *rps3*; все они являлись синонимичными. Практически все найденные SNP и повторы располагались в большом однокопийном регионе (LSC) и только один SNP – в малом однокопийном регионе (SSC).

В ряде работ по поиску межвидовой, межродовой изменчивости геномов хлоропластов других культур определены «горячие точки» изменчивости хпДНК, такие как

*ccsA-ndhD*, *trnH-psbA*, *ndhG-ndhI*, *rps18-rpl20*, *rps15-ycf1*, *psbZ-trnG-trnS*, *trnK-rps16*, *trnD-trnY*, *trnW-trnP*, *rpl33-rps18*, *petG-trnW*, *atpB-rbcL* и *rpl32-trnL* (Iram et al., 2019; Mehmood et al., 2020). Нами не обнаружены отличия в данных районах, кроме SSR-локуса в межгенной последовательности *atpB-rbcL*, по-видимому, по причине таксономического сходства исследуемых сортов сои.

Из четырех обнаруженных нами полиморфных микросателлитных локусов хпДНК SSR-локус в позиции 6967 (T<sub>11</sub>–T<sub>10</sub>) соответствует ранее описанному локусу *gmcp4* (Xu et al., 2002). Остальные микросателлиты – впервые описанные и могут быть использованы для выявления генетической изменчивости хлоропластного генома у сои.

Однонуклеотидная замена в позиции 82035 в кодирующей последовательности гена *rps3* затрагивает сайт рестрикции *Clal* и описана ранее как полиморфный локус, по которому сорта сои дифференцируются на два типа методом ПДРФ (Kanazawa et al., 1998). Этот же SNP в гене *rps3* включен Y. Yue с коллегами в число репрезентативных (позиция 82028 в пластидном геноме Zhonghuang 13). Данная замена, по классификации Y. Yue с коллегами, разделяет все сорта на две группы: первая группа (1848 линий) характеризуется наличием альтернативного аллеля по локусу 82028 (гаплотипы СТ1, СТ4, СТ7, СТ22, СТ28, СТ33 и СТ44), вторая группа имеет референсный аллель (остальные 732 линии) (Yue et al., 2023).

В результате проведенного нами исследования получены нуклеотидные последовательности хлоропластных геномов 46 сортов сои, которые опубликованы в NCBI GenBank под идентификационными номерами OQ148707–OQ148730, OR834463–OR834484.

### Изменчивость генома митохондрий

Сравнительный анализ последовательностей митохондриального генома, полученных на основании полногеномного секвенирования для 46 сортов сои, позволил обнаружить 15 полиморфных локусов: 3 SNP в некодирующих областях (межгенных районах), 8 полиморфных SSR-локусов, 3 инделя (INDEL – вставка/делеция) и 1 инверсия. Только 2 точки из 15 находились в предполагаемых кодирующих областях: одна мутация в микросателлитном повторе *orf110c* (позиция 294 729 п. н. в референсном геноме сорта Aiganhuang), инверсия – в *orf160b* (позиция 205 470).

Нами выявлена изменчивость в межгенных районах *atp6-1-trnK*, *rps3-orf114a*, *orf100c-orf136b*, *trnD-orf114b*, *orf151-orf261*, *atp9-trnM*, в интроне *nad4* митохондриального генома. Аналогичные данные получены Y. Yue с коллегами в 2023 г., при этом полиморфные позиции были отнесены к числу репрезентативных (маркерных). Это позиции 451199, 284000, 312950, 489992, 256743, 295084 и 484505 п. н. в мтДНК сорта Zhonghuang 13 соответственно вышеуказанным районам. Данные полиморфные локусы позволяют дифференцировать гаплотипы MT1 и MT2 по классификации Y. Yue с коллегами (2023).

Для подтверждения обнаруженных отличий в хп и мт геномной ДНК был сконструирован набор праймеров к сайтам изменчивости геномов и проведено изучение секвенированием по Сэнгеру данных полиморфных локу-

сов у 46 образцов. Праймеры разработаны для изучения наиболее важных маркерных точек изменчивости геномов, по которым происходила дифференциация отдельных гаплотипов хп- и мтДНК сортов сои: позиции 6967, 75657 и 116598 хлоропластного, 100092, 197000, 205470, 248977 митохондриального геномов. Также разработаны комбинации праймеров для исследования наиболее спорных либо трудно интерпретируемых при анализе bam и VCF-файлов районов генома: SSR-локус 51525 хпДНК, индели в позициях 158807 и 321983 мтДНК. Все найденные между сортами различия были подтверждены.

### Генетическое разнообразие оргanelьных геномов сои

В соответствии с изменчивостью хлоропластного генома исследованные сорта были разделены на три гаплотипа: 40 сортов (87 %) отнесены к гаплотипу I; 4 сорта (Китросса, Любаша, Оресса и Воронежская 31) – к гаплотипу II; сорта Легенда и Щара – к гаплотипу III. Обнаруженные гаплотипы были обозначены нами как C1–C3.

На основании 16 полиморфных локусов митохондриальной ДНК выделено пять гаплотипов, обозначенных нами как M1–M5. 10 инделей и 4 SNP имеются у сортов Любаша, Китросса, Оресса и Воронежская 31 (гаплотип M2), 1 индель – у родственных сортов Василиса, Амазонка, McCall, Птичь и Сахара (гаплотип M3). Также сорта Optimus (M5) и Злата (M4) отличаются от других сортов инверсией и одним инделем соответственно. Большинство сортов (76 %) отнесено к гаплотипу M1. В табл. 1 и 2 представлены выявленные в оргanelьных геномах отличия и их распределение между различными гаплотипами хп- и мтДНК.

Исходя из полученных нами данных исследование любого из сортов изученной коллекции сои по микроса-

**Таблица 1.** Полиморфные локусы хлоропластной ДНК сои и выявленные на их основе гаплотипы

№ п/п	Полиморфная точка хпДНК (относительно MW357264.1)	Гаплотип		
		C1	C2	C3
1	6967 ( <i>rbcl-atpB</i> )	(T) <sub>11</sub>	(T) <sub>11</sub>	(T) <sub>10</sub>
2	8408 ( <i>atpB</i> )	G	A	G
3	15507 ( <i>rps4</i> )	T	A	T
4	38504 (интрон <i>rpoC1</i> )	(A) <sub>4</sub>	(A) <sub>5</sub>	(A) <sub>4</sub>
5	51525 ( <i>atpA-trnR</i> )	(A) <sub>19</sub>	(A) <sub>13</sub>	(A) <sub>19</sub>
6	57873 ( <i>accD</i> )	C	A	C
7	75657 (интрон <i>petD</i> )	(T) <sub>14</sub>	(T) <sub>15</sub>	(T) <sub>14</sub>
8	82035 ( <i>rps3</i> )	G	T	G
9	116598 (интрон <i>ndhA</i> )	T	A	T

теллитным повторам № 1 и 5 позволяет различать типы хпДНК C1, C2 и C3. Их можно рекомендовать для использования в работах по изучению генетического разнообразия в различных коллекциях сои по геному хлоропластов без привлечения иных хпДНК-маркеров.

Дополнительно для 90 сортов из коллекции проведено секвенирование по Сэнгеру с помощью праймеров, дифференцирующих соответствующие гаплотипы хп- и мтДНК. Согласно обобщенным результатам полногеномного секвенирования и секвенирования по Сэнгеру среди изученных сортов нашей коллекции (так называемого северного экотипа) идентифицируется шесть плазматипов оргanelьной ДНК: C1/M1, C2/M2, C1/M3, C1/M4, C1/M5 и C3/M1. 65.4 % сортов сои (89 из 136 изученных) отно-

**Таблица 2.** Полиморфные локусы митохондриальной ДНК сои и выявленные на их основе гаплотипы

№ п/п	Полиморфная точка мтДНК (относительно NC020455.1)	Гаплотип				
		M1	M2	M3	M4	M5
1	66782 ( <i>atp6-1-trnK</i> )	(GCTTC) <sub>2</sub>	GCTTC	(GCTTC) <sub>2</sub>	(GCTTC) <sub>2</sub>	(GCTTC) <sub>2</sub>
2	238088 ( <i>orf151-orf261</i> )	(GCTTC) <sub>2</sub>	GCTTC	(GCTTC) <sub>2</sub>	(GCTTC) <sub>2</sub>	(GCTTC) <sub>2</sub>
3	294604 ( <i>orf105b-orf110c</i> )	(GCTTC) <sub>2</sub>	GCTTC	(GCTTC) <sub>2</sub>	(GCTTC) <sub>2</sub>	(GCTTC) <sub>2</sub>
4	321983 ( <i>rps3-orf114a</i> )	(TATAA) <sub>3</sub>	(TATAA) <sub>2</sub>	(TATAA) <sub>3</sub>	(TATAA) <sub>3</sub>	(TATAA) <sub>3</sub>
5	350927 ( <i>orf100c-orf136b</i> )	T	TATAAA	T	T	T
6	100092 (интрон <i>nad4</i> )	GCTCG	(GCTCG) <sub>2</sub>	GCTCG	GCTCG	GCTCG
7	105562 ( <i>trnD-orf114b</i> )	G	T	G	G	G
8	197000 ( <i>orf113-orf160b</i> )	ACCTT	TA	ACCTT	ACCTT	ACCTT
9	221263 ( <i>trnfM-3-orf151</i> )	C	A	C	C	C
10	238213 ( <i>orf151-orf261</i> )	TG TAGT	(TG TAGT) <sub>2</sub>	TG TAGT	TG TAGT	TG TAGT
11	294729 ( <i>orf110c</i> )	TG TAGT	(TG TAGT) <sub>2</sub>	TG TAGT	TG TAGT	TG TAGT
12	333070 ( <i>atp9-trnM</i> )	A	T	A	A	A
13	248977 ( <i>ccmFn-rps4</i> )	T	TTCAC	T	TTCAC	T
14	158807 ( <i>nad4L-1-nad6</i> )	TGCCTA	TGCCTA	(TGCCTA) <sub>2</sub>	TGCCTA	TGCCTA
15	205470 ( <i>orf160b</i> )	GA	GA	GA	GA	TC

**Таблица 3.** Дифференциация сортов сои на плазматипы согласно результатам NGS и секвенирования по Сэнгеру

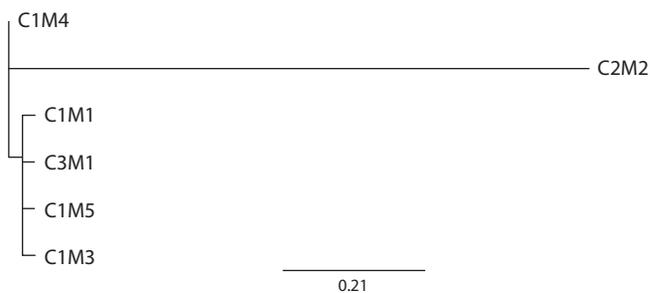
Плазматип	Сорта сои
C1/M1	Припять, Соер 6, Соер 7, Снежок, Антрацит, Аннушка, Мезенка, Ясельда, Adoc, Venus, Gallard, Виля, Устя, Maple Donovan, Лира, Виктория, Самер 1, Самер 2 и др.
C2/M2	Оресса, Китросса, Любаша, Лотаро, Хэ Нун 95, Dornburger Stamm, Славянка, Волма, Воронежская 31, Violetta, Добрынь, Олвия, Раница, Рось, Селекта 101, Селена, Памелла Саатбай, Цзинь Юань, Хава, Иней
C1/M3	Сахара, Амазонка, Василиса, УСХИ-6, Tundra, McCall, Птичь, Viola, AC Colombe, HM 648, Анилин, Барбаро, Белгородская 6, ЕС Композитор, ЕС Сенатор, ЕС Профессор, Люмария, ОАК Купер, РЖТ Руслана, Сиберия, Угра, Суедина, Glasier
C1/M4	Злата, Шарм, Вилана
C1/M5	Optimus
C3/M1	Легенда, Щара

сится к гаплотипу C1/M1. 20 (14.7 %) и 23 (16.9 %) сорта имеют плазматипы C2/M2 и C1/M3 соответственно. Три из 136 сортов (2.2 %) относятся к плазматипу C1/M4. Плазматипы C1/M5 и C3/M1 являются наиболее редкими и включают один (0.7 %) и два (1.4 %) сорта соответственно (табл. 3).

По результатам филогенетического анализа обнаруженные плазматипы распределяются на две клады, одну из которых составляют плазматипы C1/M1, C1/M3, C1/M4, C1/M5 и C3/M1, наиболее схожие между собой по последовательности оргanelльных геномов. Гаплотип C2/M2 составляет вторую кладу и имеет наибольшее количество отличий от гаплотипа C1/M1 – 8 полиморфизмов хпДНК и 13 полиморфизмов мтДНК (см. рисунок).

Учитывая, что преобладающее большинство исследованных нами сортов сои имеет плазматип C1/M1, можно считать его основным в коллекции. Плазматипы C1/M3, C1/M4, C1/M5 и C3/M1 – вероятнее всего, производные от него, так как они отличаются от C1/M1 всего одной полиморфной позицией в хлоропластном (C3) либо митохондриальном геномах (M2–M5).

Идентифицированные нами плазматипы C1/M1 и C2/M2 соотносятся с обнаруженными Y. Yue с коллегами в 2023 г. плазматипами ST1/MT1 и ST2/MT2. Согласно их исследованию, данные плазматипы наиболее распространены среди сортов культурной сои – 69.2 и 18.1 % соответственно (Yue et al., 2023). В нашем исследовании мы подтвердили, что плазматип ST1/MT1 (C1/M1 по нашей классификации) – преобладающий и среди сортов белорусской селекции, а также обнаружили редкие отличия, не описанные другими исследователями ранее. В соответствии с этим мы выделили пять дополнительных к основному плазматипов, из которых C1/M3 является более распространенным, чем C2/M2 в нашей коллекции сортов. Это, предположительно, объясняется географо-экологически-



Дендрограмма филогенетических отношений в исследуемой коллекции сортов сои.

ми особенностями Беларуси, подбором сортов, которые по ряду других признаков наиболее эффективно можно возделывать в Беларуси.

К сожалению, основополагающая гипотеза нашего исследования о возможных особенностях геномов оргanelл, по которым различаются лучшие материнские и отцовские формы сои, пока не подтверждается, так как и те, и другие сорта имеют сходные гаплотипы хп- и мтДНК. Для выяснения этого вопроса требуется более глубокое изучение тонких механизмов взаимодействия ядра и цитоплазмы.

### Заключение

Сравнительный анализ данных NGS у 46 сортов сои раннеспелой группы позволил выявить полиморфные локусы хлоропластной и митохондриальной ДНК, оценить внутривидовое разнообразие ДНК оргanelл сортов сои разнообразного географического происхождения.

Обнаружено девять отличий в хлоропластном и 15 отличий в митохондриальном геномах культурной сои. Весь спектр изменчивости оргanelльных ДНК сои представлен тремя плазматипами хлоропластной ДНК, пятью плазматипами митохондриальной ДНК. Комбинация изменчивости по обоим оргanelльным геномам позволила выделить шесть плазматипов оргanelльных ДНК и дифференцировать сорта коллекции в соответствии с ними. С помощью разработанных на основании анализа NGS данных ДНК-маркеров к полиморфным локусам геномов оргanelл проведено изучение изменчивости плазмона у 90 сортов из коллекции лаборатории, отличающихся широким спектром происхождения и чувствительностью к длине дня. 46 полных последовательностей хлоропластной ДНК сои помещено в NCBI GenBank под идентификационными номерами OQ148707–OQ148730, OR834463–OR834484.

Полученные нами результаты и анализ родословных сортов подтверждают данные других исследователей о том, что гаплотипы C1 и M1 – основные среди сортов, возделываемых на территории Северной Америки, Европы и стран СНГ. Плазматип C1/M1 с наибольшей частотой обнаружен и в коллекции исследованных нами образцов сои. Гаплотипы C2 хпДНК и M2 мтДНК являются характерными для современных сортов сои китайской селекции. Интересно, что плазматип C2/M2 достаточно часто встречался в нашей коллекции у ряда образцов, имеющих исконно китайские материнские формы в своей родословной.

Выделение шести плазматипов служит показателем низкого уровня генетического разнообразия в изученной коллекции сортов сои. Исследованная нами группа раннеспелых и ультрараннеспелых сортов представляет собой эволюционно молодую и весьма узкую группу сортов (это сорта северного экотипа). С учетом направленной селекции данных сортов на нейтральность к фотопериодизму низкий уровень генетического разнообразия вполне ожидаем в настолько ограниченной группе линий сои (Rosenzweig et al., 2003).

Выявление источников цитоплазматической изменчивости, сортов с отличными от большинства гаплотипами хпДНК и мтДНК и интрогрессия нового генетического материала в селекционный процесс необходимы для плодотворного развития селекции новых сортов сои для северных широт.

## Список литературы / References

- Ермакович А.Е., Синаевская М.Г., Панкратов В.С., Левданский О.Д., Голоенко И.М., Шимкевич А.М., Луханина Н.В., Давыденко О.Г. Оценка изменчивости хлоропластных и митохондриальных геномов ячменя методом NGS-анализа оргanelльных смесей. Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук. 2020;65(3):358-364. doi 10.29235/1029-8940-2020-65-3-358-364
- [Yermakovich A.E., Siniuskaya M.G., Pankratov V.S., Liaudanski A.D., Halayenka I.M., Shymkevich A.M., Lukhanina N.V., Davydenko O.G. Barley chloroplast and mitochondrial genomes diversity evaluation by NGS of the organelle DNA mixtures. *Vestsi Natsyyanal'nai Akademii Navuk Belarusi. Seriya Biyolagichnykh Navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series*. 2020;65(3):358-364. doi 10.29235/1029-8940-2020-65-3-358-364 (in Russian)]
- Синаевская М.Г., Вигуро А.В., Розенцвейг В.Е., Голоенко Д.В. Изменчивость хлоропластного генома у сои. В: Международная научная конференция «Молекулярная генетика, геномика и биотехнология» (Минск, Беларусь, 24-26 ноября 2004 г.). Минск, 2004;346-347
- [Siniuskaya M.G., Viguero A.V., Rosenzweig V.E., Goloenko D.V. The variability of chloroplast genome of soybean. In: International Scientific Conference on Molecular Genetics, Genomics and Biotechnology (November 24-26, 2004, Minsk, Belarus). Minsk, 2004; 346-347 (in Russian)]
- Abe J., Hasegawa A., Fukushi H., Mikami T., Ohara M., Shimamoto Y. Introgression between wild and cultivated soybeans of Japan revealed by RFLP analysis for chloroplast DNAs. *Econ Bot*. 1999; 53:285-291. doi 10.1007/BF02866640
- Aksyonova E.A., Rosenzweig V.E., Goloenko D.V., Davydenko O.G. The analysis of belarusian soybean cultivars diversity using nuclear and chloroplast SSR markers. In: Computational Phylogenetics and Molecular Systematics "CPMS 2007". Moscow, 2007
- Fang C., Ma Y., Yuan L., Wang Z., Yang R., Zhou Z., Liu T., Tian Z. Chloroplast DNA underwent independent selection from nuclear genes during soybean domestication and improvement. *J Genet Genomics*. 2016;43(4):217-221. doi 10.1016/j.jgg.2016.01.005
- Felsenstein J. PHYLIP: Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*. 1989;5:164-166.
- Gualberto J., Newton K. Plant mitochondrial genomes: dynamics and mechanisms of mutation. *Annu Rev Plant Biol*. 2017;68:224-252. doi 10.1146/annurev-arplant-043015-112232
- Hu Y., Sun Y., Zhu Q., Fan L., Li J. Poaceae chloroplast genome sequencing: great leap forward in recent ten years. *Curr Genomics*. 2022;23(6):369-384. doi 10.2174/1389202924666221201140603
- Iram S., Hayat M.Q., Tahir M., Gul A., Abdullah, Ahmed I. Chloroplast genome sequence of *Artemisia scoparia*: comparative analyses and screening of mutational hotspots. *Plants*. 2019;8(11):476. doi 10.3390/plants8110476
- Jeong S.C., Moon J.K., Park S.K., Kim M.S., Lee K., Lee S.R., Jeong N., Choi M.S., Kim N., Kang S.T., Park E. Genetic diversity patterns and domestication origin of soybean. *Theor Appl Genet*. 2019;132(4):1179-1193. doi 10.1007/s00122-018-3271-7
- Johnston I.G. Tension and resolution: dynamic, evolving populations of organelle genomes within plant cells. *Mol Plant*. 2019;12(6):764-783. doi 10.1016/j.molp.2018.11.002
- Kanazawa A., Tozuka A., Shimamoto Y. Sequence variation of chloroplast DNA that involves *EcoRI* and *ClaI* restriction site polymorphisms in soybean. *Genes Genet Syst*. 1998;73(2):111-119. doi 10.1266/ggs.73.111
- Mehmood F., Shahzadi I., Waseem S., Mirza B., Ahmed I., Waheed M.T. Chloroplast genome of *Hibiscus rosa-sinensis* (Malvaceae): comparative analyses and identification of mutational hotspots. *Genomics*. 2020;112(1):581-591. doi 10.1016/j.ygeno.2019.04.010
- Moore R.M., Harrison A.O., McAllister S.M., Polson S.W., Wommack K.E. Iroki: automatic customization and visualization of phylogenetic trees. *PeerJ*. 2020;8:e8584. doi 10.7717/peerj.8584
- Powell W., Morgante M., Andre C., McNicol J.W., Machray G.C., Doyle J.J., Tingey S.V., Rafalski J.A. Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. *Curr Biol*. 1995;5(9):1023-1029. doi 10.1016/s0960-9822(95)00206-5
- Rosenzweig V.E., Goloenko D.V., Davydenko O.G., Shablinskaya O.V., Swiecicki W. Breeding strategies for early soybeans in Belarus. *Plant Breeding*. 2003;122(5):456-458. doi 10.1046/j.1439-0523.2003.00874.x
- Shimamoto Y. Polymorphism and phylogeny of soybean based on chloroplast and mitochondrial DNA analysis. *Jpn Agric Res Q*. 2001; 35(2):79-84. doi 10.6090/jarq.35.79
- Shimamoto Y., Fukushi H., Abe J., Kanazawa A., Gai J., Gao Z., Xu D. RFLPs of chloroplast and mitochondrial DNA in wild soybean, *Glycine soja*, growing in China. *Genet Resour Crop Evol*. 1998;45: 433-439. doi 10.1023/A:1008693603526
- Shoemaker R.C., Hatfield P.M., Palmer R.G., Atherly A.G. Chloroplast DNA variation in the genus *Glycine* subgenus *Soja*. *J Hered*. 1986;77(1):26-30. doi 10.1093/oxfordjournals.jhered.a110161
- Siniuskaya M.G., Makarevich A.M., Goloenko I.M., Pankratov V.S., Liaudanski A.D., Danilenko N.G., Lukhanina N.V., Shimkevich A.M., Davydenko O.G. The study of organelle DNA variability in alloplasmic barley lines in the NGS era. *Vavilov J Genet Breed*. 2020;24(1):12-19. doi 10.18699/VJ19.589
- Triboush S.O., Danilenko N.G., Davydenko O.G. A method for isolation of chloroplast DNA and mitochondrial DNA from sunflower. *Plant Mol Biol Rep*. 1998;16:183-189. doi 10.1023/A:1007487806583
- Tsunewaki K., Mori N., Takumi S. Experimental evolutionary studies on the genetic autonomy of the cytoplasmic genome "plasmon" in the *Triticum* (wheat)-*Aegilops* complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116(8):3082-3090. doi 10.1073/pnas.1817037116
- Xu D., Abe J., Gai J., Shimamoto Y. Diversity of chloroplast DNA SSRs in wild and cultivated soybeans: evidence for multiple origins of cultivated soybean. *Theor Appl Genet*. 2002;105:645-653. doi 10.1007/s00122-002-0972-7
- Yue Y., Li J., Sun X., Li Z., Jiang B. Polymorphism analysis of the chloroplast and mitochondrial genomes in soybean. *BMC Plant Biol*. 2023;23(1):15. doi 10.1186/s12870-022-04028-3

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 18.06.2025. После доработки 20.09.2025. Принята к публикации 24.09.2025.