

# ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ДИКИХ РОДИЧЕЙ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ И ПРИКЛАДНЫХ ПРОБЛЕМ

Научная статья  
УДК 633.853.52:631.522  
DOI: 10.30901/2227-8834-2026-2-013



## Разработка мультиплексных систем SSR-маркеров сои (*Glycine max* (L.) Merr.) для паспортизации и идентификации сортов

В. Г. Савиченко

Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта, Краснодар, Россия

Автор, ответственный за переписку: Виолетта Георгиевна Савиченко, violet.savichenko@mail.ru

**Актуальность.** Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) является стратегически значимой сельскохозяйственной культурой, расширение сортового разнообразия которой требует надежных и воспроизводимых методов идентификации и контроля в области семеноводства. Микросателлитные маркеры получили широкое применение для паспортизации и идентификации сортов, однако в целях повышения точности и производительности генотипирования требуется разработка мультиплексных систем на их основе.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на образцах ДНК индивидуальных растений сои 15 сортов разного происхождения. Для 19 из 22 тринуклеотидных SSR-локусов с применением биоинформатических методов сконструированы новые пары праймеров, адаптированные для использования в мультиплексных ПЦР. Для экспериментальной проверки праймеры были модифицированы разными флуорофорами. Разделение ПЦР-продуктов осуществлялось с помощью фрагментного анализа с использованием капиллярного электрофореза. Оптимизация мультиплексных ПЦР включала подбор совместимых маркеров, соотношений концентраций праймеров и температурно-временных условий амплификации.

**Результаты.** Разработаны две мультиплексные системы, включающие 11 информативных SSR-маркеров в каждой. Оптимизация условий мультиплексных ПЦР обеспечила специфичную, стабильную и воспроизводимую амплификацию фрагментов ДНК соответствующих SSR-маркеров. Установлены диапазоны размеров аллельных вариантов и сформированы файлы панелей для корректной интерпретации результатов фрагментного анализа относительно контрольного образца.

**Заключение.** Разработанные мультиплексные системы SSR-маркеров повышают точность и сокращают продолжительность генотипирования, что определяет возможность их последующего применения в генетической паспортизации и идентификации сортов сои.

**Ключевые слова:** ДНК-маркеры, микросателлиты, генетический полиморфизм, генотипирование

**Благодарности:** исследование выполнено в рамках реализации государственного задания Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур имени В.С. Пустовойта № 082-3-2023-0001 «Разработка технологии генетической идентификации и паспортизации сортов сои с использованием системы маркеров микросателлитных локусов ДНК».

Автор благодарит С. А. Рамазанову и С. З. Гучетль за научное руководство.

**Для цитирования:** Савиченко В.Г. Разработка мультиплексных систем SSR-маркеров сои (*Glycine max* (L.) Merr.) для паспортизации и идентификации сортов. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2026;187(2):193-206. DOI: 10.30901/2227-8834-2026-2-013

Прозрачность финансовой деятельности: автор не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Автор благодарит рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы. Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, автору и ее/его месту работы.

# IDENTIFICATION OF THE DIVERSITY OF CULTIVATED PLANTS AND THEIR WILD RELATIVES FOR SOLVING FUNDAMENTAL AND APPLIED PROBLEMS

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2026-2-013

## Development of multiplex SSR marker systems of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) for certification and identification of cultivars

Violetta G. Savichenko

V.S. Pustovoit All-Russia Research Institute of Oil Crops, Krasnodar, Russia

**Corresponding author:** Violetta G. Savichenko, violet.savichenko@mail.ru

**Background.** Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) is a strategically important crop, and expanding its cultivated diversity requires reliable and reproducible methods of identification and control in seed production. Microsatellite markers are widely used for certification and identification of cultivars, but to improve the accuracy and productivity of genotyping, it is necessary to develop multiplex systems on their basis.

**Materials and methods.** DNA samples from individual soybean plants of 15 cultivars of various origin were studied. As a marker base, we used 22 informative microsatellite loci with trinucleotide repeats distributed throughout the soybean genome. Using bioinformatic approaches, we designed new primer pairs for 19 loci, adapted for specific amplification of target DNA fragments under unified conditions of multiplex PCR. For experimental validation, forward primers were labeled with different fluorophores. When distributing fluorophores among SSR markers, we took into account the size ranges of amplified DNA fragments, thus avoiding signal overlap of different markers during the fragment analysis. PCR products were separated by capillary electrophoresis using a genetic analyzer. Optimization of multiplex PCR included stepwise selection of marker combinations, primer concentration ratios, and thermal cycling conditions.

**Results.** Two multiplex systems were developed, each including 11 informative SSR markers. The optimized multiplex PCR conditions ensured specific, stable, and reproducible amplification of DNA fragments corresponding to the loci. Based on the results, panel files were created in fragment analysis software and adjusted versus a positive control, which ensured correct interpretation and comparability of results between analytical runs.

**Conclusion.** The developed multiplex SSR marker systems improve genotyping accuracy and reduce its duration, thereby enabling their application in genetic certification and identification of soybean cultivars.

**Keywords:** DNA markers, microsatellites, genetic polymorphism, genotyping

**Acknowledgments:** the research was carried out within the framework of the state task assigned to the V.S. Pustovoit All-Russia Research Institute of Oil Crops, Project No. 082-3-2023-0001 "Development of a technology for genetic identification and certification of soybean cultivars using a system of DNA microsatellite loci markers".

The author is grateful to S. A. Ramazanova and S. Z. Guchetl for scientific supervision.

**For citation:** Savichenko V.G. Development of multiplex SSR marker systems of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) for certification and identification of cultivars. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2026;187(2):193-206. (In Russ.). DOI: 10.30901/2227-8834-2026-2-013

Financial transparency: the author has no financial interest in the presented materials or methods. The author thanks the reviewers for their contribution to the peer review of this work. The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author or her/his employers.

## Введение

Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) является стратегически значимой культурой в обеспечении продовольственной безопасности страны. В связи с постоянно расширяемым сортиментом сортов сои требуется надежный инструмент для определения оригинальности сортов, защиты интеллектуальных прав селекционеров и контроля подлинности семенного материала. В настоящее время в качестве такого инструмента рассматривается генетическая паспортизация (ДНК-паспортизация), что делает ее особенно актуальной в условиях ужесточения требований в области семеноводства. Несмотря на многочисленные исследования, подтверждающие целесообразность применения ДНК-маркеров для паспортизации и идентификации сельскохозяйственных растений, на сегодняшний день нет стандартизированных методов для их практического применения (Khlestkina et al., 2025).

Микросателлиты, известные также как SSR (Simple Sequence Repeats) – локусы ДНК, содержащие повторяющиеся последовательности (мотивы) длиной от 1 до 10 нуклеотидов. Данные локусы имеют высокий уровень полиморфизма, заключающийся в разнице количества мотивов, что позволяет формировать уникальный ДНК-профиль для разных генотипов. К преимуществам SSR-маркеров также относят кодоминантный тип наследования, воспроизводимость результатов анализа и относительную простоту детекции. Эти характеристики обеспечили широкое распространение микросателлитных маркеров для идентификации различных генотипов (Alves et al., 2024).

Успешное применение SSR-маркеров для ДНК-идентификации сортов сои было продемонстрировано в работах зарубежных (Tripathi et al., 2023; Zatybekov et al., 2023) и отечественных исследователей (Bondarenko et al., 2025). Однако в большинстве из них SSR-анализ проводят в моноплексных ПЦР, где в каждой реакции используется только одна пара праймеров. Разделение продуктов амплификации осуществляют методами электрофореза в агарозных или полиакриламидных гелях различной концентрации. Несмотря на простоту и доступность проведения, такой анализ является довольно трудоемким и продолжительным, особенно при большом количестве используемых ДНК-маркеров и анализируемых образцов. При этом из-за низкой разрешающей способности и специфики проведения данных методов электрофореза точность анализа остается недостаточно высокой, что создает проблемы при идентификации генотипов, отличающихся всего несколькими парами нуклеотидов (Guchetl et al., 2025).

На современном этапе развития молекулярно-генетических методов наблюдается тенденция к переходу на мультиплексные системы ДНК-маркеров, когда в ходе одной полимеразной цепной реакции происходит одновременная амплификация с использованием двух и более пар праймеров (Zubov et al., 2024). Такой подход позволяет значительно сократить трудовые и временные затраты, а в сочетании с капиллярным электрофорезом повысить точность, воспроизводимость и производительность генотипирования. Мультиплексные системы с последующим разделением амплифицированных фрагментов методом капиллярного электрофореза эффективно применяются для идентификации линий, сортов и гибридов сельскохозяйственных культур. Так, например, для паспортизации сортов картофеля была разработана мультиплексная система, включающая 10 SSR-маркеров

(Kolobova et al., 2017). Для подсолнечника разными исследователями созданы мультиплексные наборы из 7 маркеров (Shilov et al., 2023), 4 набора из 4–5 маркеров (Golovatskaya, Guchetl, 2024). Для кукурузы (Koltun et al., 2024) были протестированы 2 набора по 10 SSR-маркеров. Эти примеры показывают высокий интерес к созданию эффективных способов генотипирования, а также применимость мультиплексного подхода для идентификации генотипов различных сельскохозяйственных культур.

Генотипирование сортов сои также проводят с помощью мультиплексных систем ДНК-маркеров. В исследовании (Li et al., 2024) использовали 20 мультиплексных систем, содержащих по 3–4 SSR-маркера. Такое большое общее количество SSR-маркеров, но малое в составе мультиплексных ПЦР для идентификации сортов, может быть избыточным и экономически нецелесообразным из-за высокой стоимости анализа большого числа образцов. Работы в данном направлении ведутся и в РФ – описаны два мультиплексных набора, состоящих из 8 и 7 SSR-маркеров соответственно (Divashuk et al., 2025), что показывает высокий интерес к созданию мультиплексных систем на сое и его актуальность.

В наших предыдущих исследованиях было показано, что сорта сои характеризуются внутрисортным полиморфизмом и представлены совокупностью биотипов с различной частотой встречаемости. При этом некоторые сорта имеют в своей структуре идентичные биотипы, но отличаются друг от друга наличием уникальных (Savichenko et al., 2024b). Этим обусловлена необходимость анализа выборок индивидуальных растений сорта для учета состава биотипов с целью формирования информативных ДНК-профилей сортов при их паспортизации и идентификации. Это повышает требования к производительности и воспроизводимости способов генотипирования и также подтверждает актуальность разработки мультиплексных систем ДНК-маркеров для сокращения времени и стоимости анализа.

Настоящее исследование основано на ранее проведенных нами работах, в которых были отобраны информативные SSR-маркеры, потенциально пригодные для паспортизации и идентификации сортов сои (Ramazanova, Kolomytseva, 2020; Ramazanova et al., 2021; Savichenko et al., 2024a).

*Цель исследования* – разработать мультиплексные системы на основе ранее отобранных SSR-локусов, обеспечивающие возможность их применения при паспортизации и идентификации сортов сои.

## Материалы и методы

Исследования проводили в 2024–2025 гг. в лаборатории молекулярно-генетических исследований Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур имени В.С. Пустовойта (ВНИИМК). Материалом для оценки разрабатываемых мультиплексных систем служили образцы ДНК, выделенные из одного растения (семени) сои каждого из 15 сортов: ‘Williams 82’, ‘Ходсон’ (США); СибНИИК-315 (Сибирский федеральный научный центр агробιοтехнологий РАН, РФ); ‘Оптим’, ‘Уника’ (ООО «Соевый комплекс», РФ); ‘Омская 4’, ‘Сибиряда’ (Омский аграрный научный центр, РФ); ‘Лидия’, ‘Даурия’ (Всероссийский НИИ сои, РФ); ‘Восточка’, ‘Зара’, ‘Кубань’, ‘Кубанская 4958’, ‘Лира’, ‘Пума’ (ВНИИМК, РФ). Сорт ‘Лира’ выбран в качестве положительного контрольного образца (ПКО) для сопоставления результатов меж-

ду сериями анализов, как характеризующийся низким уровнем внутрисортного полиморфизма (Savichenko et al., 2024b).

Выделение ДНК осуществлялось из осевых органов зародыша, предварительно вырезанных из семени с помощью скальпеля и измельченных в гомогенизаторе KZ-III-FP (Servicebio, КНР). Для выделения и очистки ДНК использовали набор реагентов «МагноПрайм ФИТО» («НекстБио», РФ) на автоматической станции Auto-Pure 96 (Allsheng, КНР). Концентрацию выделенной ДНК измеряли на спектрофотометре Micro Spectrophotometer Nano-300 (Allsheng, КНР), при необходимости образцы разбавляли деионизированной водой до требуемой концентрации (25 нг/мкл).

Исходный набор SSR-локусов, распределенных по всему геному сои, формировали на основании данных об их информативности (Ramazanova, Kolomytseva, 2020; Ramazanova et al., 2021; Savichenko et al., 2024a). Критериями включения локусов в набор для дальнейшей работы являлись стабильность амплификации, отсутствие нулевых аллелей и возможность однозначной интерпретации аллельных вариантов. Разработка мультиплексных систем осуществлялась на основе 22 SSR-локусов с три-нуклеотидными мотивами, локализованных на соответствующих хромосомах: 1 – Satt532 и Satt507; 2 – Satt141; 3 – Satt549; 4 – AW277661; 6 – Satt286 и Satt681; 7 – CSSR531; 9 – Soyprp1; 11 – Satt359 и Satt197; 12 – Satt353, Satt181 и Satt442; 13 – Satt149; 14 – Satt168; 15 – Satt263; 16 – Satt287 и Satt596; 18 – Satt309; 20 – Satt292 и Satt614, представленных в базе данных SoyBase (<https://soybase.org>). Конструирование новых последовательностей праймеров осуществлялось с помощью инструмента Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) на основе последовательностей ДНК референсного генома сои сорта 'Williams 82' (сборка Glycine\_max\_v4.0, размещенная в базе данных RefSeq на платформе NCBI, [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF\\_000004515.6/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000004515.6/)), содержащих микросателлитный участок и по 200–250 пн фланкирующих областей. Параметрами для конструирования были: место посадки прямого и обратного праймеров в областях, фланкирующих микросателлит, ожидаемый размер амплифицируемого фрагмента 100–550 пн, температура плавления ( $T_m$ ) праймеров 58–62°C (с максимально допустимой разницей между парой 3°C). Критерии для отбора праймерных пар *in silico*: амплификация только специфичного продукта, отсутствие или минимально возможное образование димеров. Для экспериментальной проверки праймеры были синтезированы с флуорофорами FAM, R6G, TAMRA или ROX на 5'-конце прямых (F) праймеров.

Моноплексные ПЦР проводились в реакционных смесях объемом 10 мкл, содержащих: по 1 мкл 10x ПЦР-буфера-Б,  $MgCl_2$  (25 мМ) и смеси дНТФ (концентрация каждого – 50 мкМ); 0,2 мкл *SynTaq* ДНК-полимеразы (5 е. а./мкл) производства «Синтол» (РФ); по 0,04 мкл прямого и обратного праймера (100 пкМ/мкл); 2 мкл ДНК (25 нг/мкл) и деионизированную воду до конечного объема. Амплификация осуществлялась в термоциклере GeneExplorer GE-48D (Bioer, КНР) по следующим температурно-временным режимам: начальная денатурация при 95°C в течение 90 с; затем 35 циклов: денатурация при 95°C – 30 с, отжиг при 60°C – 40 с, элонгация при 70°C – 60 с; финальная элонгация при 70°C – 2 мин.

Мультиплексные ПЦР проводились в реакционных смесях аналогичного состава, за исключением увеличенного числа праймерных пар. При формировании мульти-

плексных наборов концентрация каждого вносимого праймера составляла 4 пкМ/мкл, что соответствует конечной концентрации в реакции 0,4 пкМ/мкл. Амплификация проводилась по двум разным протоколам температурно-временных режимов. *Протокол А* (touchdown) – начальная денатурация при 95°C в течение 90 с; далее 10 циклов: денатурация при 95°C – 30 с, отжиг при 64°C (с понижением температуры на 0,5°C с каждым циклом) – 40 с, элонгация при 70°C – 60 с; затем 25 циклов: 95°C – 30 с, 58°C – 40 с, 70°C – 60 с; финальная элонгация при 70°C – 2 мин. *Протокол Б* (two-step PCR) – начальная денатурация при 95°C – 2 мин; затем 35 циклов: денатурация при 95°C – 5 с, отжиг-элонгация при 62°C – 90 с; финальная элонгация при 65°C – 30 мин. Для сравнения эффективности амплификации по двум протоколам ПЦР проводили в реакционных смесях, взятых из предварительно приготовленного общего стока, с целью исключения влияния факторов, не связанных с температурно-временными режимами (погрешности дозирования компонентов); амплификация осуществлялась одновременно в разных температурных блоках одного термоцикла GeneExplorer GE-48D. Выбор оптимального протокола основывался на сравнительном анализе получаемых электрофореграмм.

При оптимизации состава реакционной смеси мультиплексной ПЦР концентрации праймеров регулировали путем варьирования объема вносимого исходного раствора праймера (100 пкМ/мкл). Для SSR-маркеров с низкой интенсивностью сигнала концентрацию увеличивали, для остальных оставляли неизменной или снижали. Итоговые концентрации каждой пары праймеров устанавливались после перераспределения флуорофоров с учетом различий в интенсивности их флуоресценции. Критерием для оценки различных вариантов концентраций праймеров являлась относительная интенсивность сигнала.

Разделение продуктов амплификации (ПЦР-продуктов) осуществлялось с помощью фрагментного анализа, выполненного методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе «Нанофор 05» (Институт аналитического приборостроения – ИАП РАН, РФ). Подготовка проб для капиллярного электрофореза включала смешивание 1 мкл ПЦР-продукта мультиплексной реакции (или 1 мкл из предварительно смешанных ПЦР-продуктов моноплексных реакций с праймерами, меченными разными флуорофорами) с 0,5 мкл размерного стандарта СД-600 и 8,5 мкл деионизированного HiDi-формамида («Синтол», РФ), последующую денатурацию при 95°C в течение 3 мин, затем охлаждение до 0°C в термоциклере GeneExplorer GE-48D. Параметры электрофореза устанавливались стандартные для линейки капилляров длиной 36 см (ИАП РАН, РФ) и полимера ПДМА-4 («Синтол», РФ). Размер фрагментов ДНК определяли относительно размерного стандарта СД-600 с помощью компьютерного программного обеспечения GeneMarker версии 3.0.1 (SoftGenetics, США).

Все опыты, включающие проведение ПЦР и фрагментный анализ, проводились в 3-кратной технической повторности, используя при этом одни и те же образцы ДНК, что позволило оценить стабильность и воспроизводимость работы используемых SSR-маркеров.

Дополнительно в GeneMarker формировали файлы панелей аллелей SSR-маркеров. При создании панелей аллели каждого маркера определяли по положению пиков анализируемых образцов на электрофореграмме, а также статтер-пиков, соответствующих потенциаль-

ным аллельным вариантам, возможным при увеличении выборки генотипов. Обозначение аллелей задавали с учетом размеров соответствующих фрагментов референсного генома сои, установленных *in silico* (с помощью Primer-BLAST), с шагом 3 пн, что обусловлено тринуклеотидным мотивом используемых SSR-маркеров.

### Результаты и обсуждение

Совместная амплификация нескольких SSR-маркеров в мультиплексных ПЦП ограничивается рядом факторов, включая различия в температуре отжига праймеров, что было показано в наших предыдущих исследованиях (Ramazanova et al., 2021; Savichenko et al., 2024a), образование неспецифичных продуктов амплификации за счет перекрестного взаимодействия праймеров, формирование праймерных димеров. В связи с чем первоначальным этапом исследования стало устранение перечисленных ограничений несовместимости праймеров. Для решения данной проблемы к 19 из 22 SSR-локусов (за исключением Satt532, Satt507 и Satt168) были сконструированы и отобраны новые последовательности праймеров. С учетом ожидаемых размеров амплифицируемых фрагментов ДНК к праймерам были подобраны флуорофоры таким образом, чтобы при совместном использовании маркеров с близкими значениями размеров фрагментов на электрофореграммах капиллярного электрофореза пики одного маркера не перекрывались пиками другого (табл. 1).

Далее каждую пару праймеров протестировали отдельно в идентичных условиях. Использование для анализа образцов ДНК индивидуальных растений позволило четко интерпретировать специфичность амплификации. Это обусловлено тем, что для одного микросателлитного локуса у индивидуального растения ожидается не более двух аллельных вариантов – один у гомозиготных и два у гетерозиготных генотипов (кодминантный тип наследования). Учитывая палеоплоидное происхождение генома сои (*G. max*), появление большего количества пиков на электрофореграмме может свидетельствовать об амплификации паралогичных или неспецифических последовательностей.

В результате моноплексных ПЦП с использованием новых пар праймеров по всем SSR-маркерам получены только целевые фрагменты ДНК, размеры которых были близки по значениям к ожидаемым (рассчитанным по референсному геному сои). Для локуса Satt141 установлено, что применение пары праймеров, представленной в SoyBase, приводило к амплификации дополнительного продукта размером 134 пн, воспроизводимо наблюдаемого у образцов, имеющих фрагмент 146 пн. Указанный продукт интерпретировался как второй аллель, что приводило к ошибочной идентификации образцов как гетерозиготных по SSR-маркеру Satt141. При использовании новой сконструированной нами пары праймеров дополнительный фрагмент у тех же образцов не выявлялся. При этом остальные аллели SSR-маркера Satt141 сохранились, за исключением изменения их размера, что обу-

**Таблица 1.** Характеристика новых праймеров, фланкирующих SSR-локусы сои

**Table 1.** Characteristics of the new primers flanking SSR loci in soybean

| SSR-локус | Нуклеотидные последовательности праймеров | Tm, °C | Ожидаемый размер фрагмента ДНК, пн | Флуорофор |
|-----------|---|--------|------------------------------------|-----------|
| Satt141   | F: ACACGATCAGGACTCTTTCGT                  | 59     | 331                                | R6G       |
|           | R: GCCGTCATAAAAAGTCCCTCAGA                | 61     |                                    | -         |
| Satt549   | F: CGCAACAATCACTAGTACGGG                  | 59     | 314                                | FAM       |
|           | R: CCAGCAGGCCCAAGGTTTAT                   | 60     |                                    | -         |
| AW277661  | F: CCCGAAAAGAAAGACAGAAAACCC               | 60     | 275                                | R6G       |
|           | R: ATATGAAAGTAGGTGACCATGGAGC              | 60     |                                    | -         |
| Satt681   | F: GGACCTCGTGGAACCTAC                     | 60     | 333                                | FAM       |
|           | R: ATATTGCATGTAACCAAAGTCCCTCT             | 60     |                                    | -         |
| Satt286   | F: TGGCATGGTATCCTTGCTACATA                | 59     | 466                                | R6G       |
|           | R: TCATCTGTGTTGGAGGGAATAGC                | 59     |                                    | -         |
| CSSR531   | F: GTGTGAAATGGCTAACCCGC                   | 60     | 120                                | TAMRA     |
|           | R: GGCCATGCACCTGCTACTT                    | 60     |                                    | -         |
| Soyprp1   | F: AGATCGAAGAGGTACGTGCCAA                 | 62     | 387                                | FAM       |
|           | R: ATGGCTGCCAGCTGCATATT                   | 61     |                                    | -         |
| Satt197   | F: AAATTGACAACCGAAGAATTACGTG              | 59     | 190                                | ROX       |
|           | R: GCCACSTAATCCAATGGGCA                   | 60     |                                    | -         |
| Satt359   | F: TGATCATTGACTACTCGAATGTGAT              | 58     | 348                                | FAM       |
|           | R: TCTCAAATCCAAGCTGCCGT                   | 60     |                                    | -         |

Таблица 1. Окончание

Table 1. The end

| SSR-локус | Нуклеотидные последовательности праймеров | T <sub>m</sub> , °C | Ожидаемый размер фрагмента ДНК, пн | Флуорофор |
|-----------|---|---------------------|------------------------------------|-----------|
| Satt353   | F: ATACACGCATTGCCTTTCCTG                  | 59                  | 248                                | ROX       |
|           | R: GCTCAAAAGCCTATCTTAACCAAA               | 58                  |                                    | -         |
| Satt181   | F: ACTAGCCAAGGGAGAGAGGAG                  | 60                  | 373                                | R6G       |
|           | R: CCCAACAAAAATTTGAACCCCGT                | 61                  |                                    | -         |
| Satt442   | F: ACCTGGACTTGTTTGCTCATCA                 | 60                  | 207                                | TAMRA     |
|           | R: GCGTGTAATTATGCATTCGAGTGTT              | 61                  |                                    | -         |
| Satt149   | F: GCTACAGTCACAGTACTTACCCTTT              | 60                  | 422                                | FAM       |
|           | R: CGAGTTGGAGGCCATAGTCAC                  | 61                  |                                    | -         |
| Satt263   | F: TGCACCCAATCATGATAGCATTT                | 59                  | 329                                | TAMRA     |
|           | R: ATATGGTCTTAAGAGACCGACCCA               | 60                  |                                    | -         |
| Satt287   | F: GCCAATTCATTGTGTGTCAG                   | 58                  | 390                                | ROX       |
|           | R: GGTTTGTTCAGTGGTGGGAGA                  | 60                  |                                    | -         |
| Satt596   | F: CCGTCGATCCGTACAAGATAG                  | 59                  | 255                                | FAM       |
|           | R: CCCTTCGTCCACCAATATTCAA                 | 59                  |                                    | -         |
| Satt309   | F: TCGAGTCCTTCAAATGGCGT                   | 60                  | 276                                | ROX       |
|           | R: GGCTAGATTCAAGAAACAAAAGGT               | 58                  |                                    | -         |
| Satt292   | F: AAGGCTAACTTCTTTGGGTTGAGA               | 60                  | 321                                | ROX       |
|           | R: GAAGGCCAACATTGAAAAGTCGT                | 60                  |                                    | -         |
| Satt614   | F: ACCCAATCATAAGTTTCTCCCCT                | 59                  | 466                                | TAMRA     |
|           | R: TGAGCTCAACTGAGTCACGTC                  | 60                  |                                    | -         |
| Satt532   | F: GCGCCAATATTATCATGCTTTATGT              | 59                  | 168                                | ROX       |
|           | R: GCGTGAAAAATCTTTGAATCTTGA               | 57                  |                                    | -         |
| Satt507   | F: GCGCTCAGCCTTGTTAAATCACTT               | 62                  | 217                                | FAM       |
|           | R: GCGCTACTCTCGTGTGCTTAGTTA               | 62                  |                                    | -         |
| Satt168   | F: CGCTTGCCAAAAATTAATAGTA                 | 56                  | 226                                | TAMRA     |
|           | R: CCATTCTCAACCTCAATCTTATAT               | 57                  |                                    | -         |

Примечание: F – прямой праймер; R – обратный праймер; T<sub>m</sub> – температура плавления праймера, значение из Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>)

Note: F – forward primer; R – reverse primer; T<sub>m</sub> – primer melting temperatures, the value supplied from Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>)

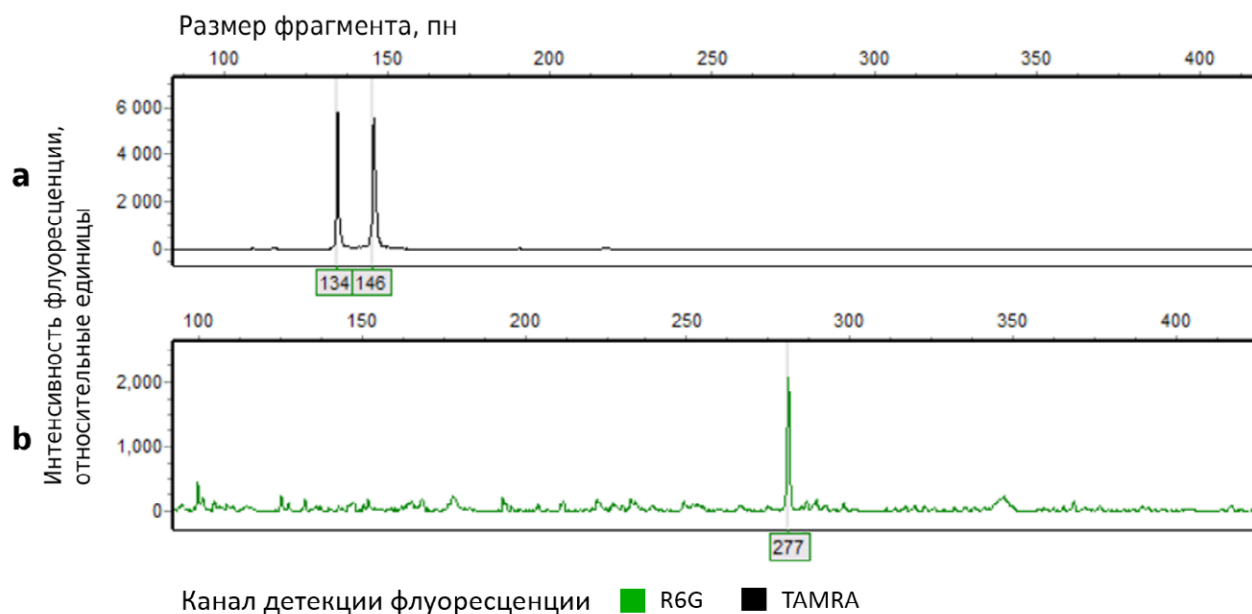
словлено смещением положения праймеров в последовательности, фланкирующей микросателлит. Наблюдаемый эффект указывает на некорректную работу праймеров, использованных ранее (из SoyBase). На рисунке 1 представлены результаты амплификации фрагментов по SSR-маркеру Satt141 с применением разных пар праймеров на примере образца ДНК растения сорта 'Уника'.

Таким образом, конструирование новых пар праймеров привело температуры отжига к идентичным значениям и обеспечило специфичную амплификацию целевых фрагментов ДНК, что создало возможность для по-

следующего объединения праймеров в мультиплексные ПЦР.

На выборке анализируемых образцов для каждого SSR-маркера были установлены фактические размеры амплифицированных фрагментов ДНК и диапазоны их значений. В таблице 2 SSR-маркеры сгруппированы в два блока в соответствии с их дальнейшим распределением в мультиплексных системах.

Полученные аллельные варианты по всем SSR-маркерам (см. табл. 2) представляют собой ДНК-профили, уникальные для анализируемых образцов. Следует отме-



**Рис. 1.** Электрофореграммы разделения ПЦР-продукта SSR-маркера Satt141 (растение сорта 'Уника'): а – с праймерами, представленными в SoyBase; б – с новыми праймерами

**Fig. 1.** Electrophoregrams of PCR product separation for the SSR marker Satt141 (a plant of cv. 'Unika'): а – with primers from SoyBase; б – with the newly designed primers

**Таблица 2.** Размеры фрагментов ДНК, соответствующих SSR-маркерам, у сортов сои, пн  
**Table 2.** Sizes of DNA fragments corresponding to SSR markers in soybean cultivars, bp

| Сорт              | SSR-маркер |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
|-------------------|------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                   | Satt507    | Satt681 | Satt149 | Satt532 | Satt141 | Satt614 | Satt442 | Satt263 | Satt309 | Satt359 | Satt286 |
| 'Ли́ра'*          | 211        | 333     | 407     | 165     | 319     | 433     | 192     | 338     | 261     | 348     | 466     |
| 'Williams 82'     | 211        | 333     | 422     | 168     | 331     | 472     | 207     | 329     | 276     | 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     |
| 'Оптимa'          | 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     |
| 'Весточка'        | 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 значений | 208–214    | 327–345 | 398–425 | 162–174 | 277–331 | 415–481 | 189–207 | 308–338 | 255–276 | 348–375 | 451–466 |

Таблица 2. Окончание

Table 2. The end

| Сорт              | SSR-маркер |         |         |         |          |         |         |         |         |         |         |
|-------------------|------------|---------|---------|---------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                   | CSSR531    | Satt596 | Satt287 | Satt197 | AW277661 | Satt181 | Satt168 | Satt549 | Satt353 | Satt292 | Soyprp1 |
| ‘Ли́ра’*          | 111        | 237     | 360     | 202     | 275      | 364     | 199     | 299     | 251     | 336     | 360     |
| ‘Williams 82’     | 114        | 252     | 390     | 190     | 275      | 361/373 | 199/226 | 314     | 251     | 321     | 387     |
| ‘Ходсон’          | 111        | 255     | 390     | 205     | 257      | 331     | 229     | 299     | 251     | 294     | 390     |
| ‘Си́бНИИК-315’    | 117        | 246     | 360     | 205     | 275      | 364     | 229     | 290     | 251     | 336     | 390     |
| ‘Оптимá’          | 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     |
| ‘Си́бириада’      | 114        | 282     | 360     | 205     | 260      | 331     | 229     | 299     | 251     | 339     | 387     |
| ‘Даурия’          | 114        | 249     | 360     | 205     | 275      | 355     | 229     | 299     | 236     | 321     | 390     |
| ‘Ли́дия’          | 114        | 252     | 360     | 199     | 257      | 331     | 199     | 299     | 251     | 294     | 387     |
| ‘Весточка’        | 114        | 240     | 390     | 205     | 260      | 331     | 211     | 314     | 236     | 264     | 387     |
| ‘Зара’            | 111        | 240     | 390     | 205     | 260      | 331     | 211     | 314     | 236     | 294     | 387     |
| ‘Куба́нь’         | 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 значений | 96–117     | 237–282 | 360–390 | 190–205 | 257–275  | 331–373 | 199–229 | 290–314 | 236–254 | 264–339 | 360–390 |

Примечание: \* – ПК0; размеры фрагментов использовались как контрольные для сопоставления результатов при разных постановках анализа

Note: \* – positive control; fragment sizes were used as reference values for comparison of results across different analytical runs

туть, что данные профили отражают генотипы отдельных растений, а не сорта в целом, и не могут рассматриваться как их полная характеристика ввиду возможного внутрисортного полиморфизма, для определения которого необходим анализ выборки растений сорта. По этой же причине в рамках настоящего исследования не проводился анализ генетического разнообразия сортов, включающий расчет статистических показателей.

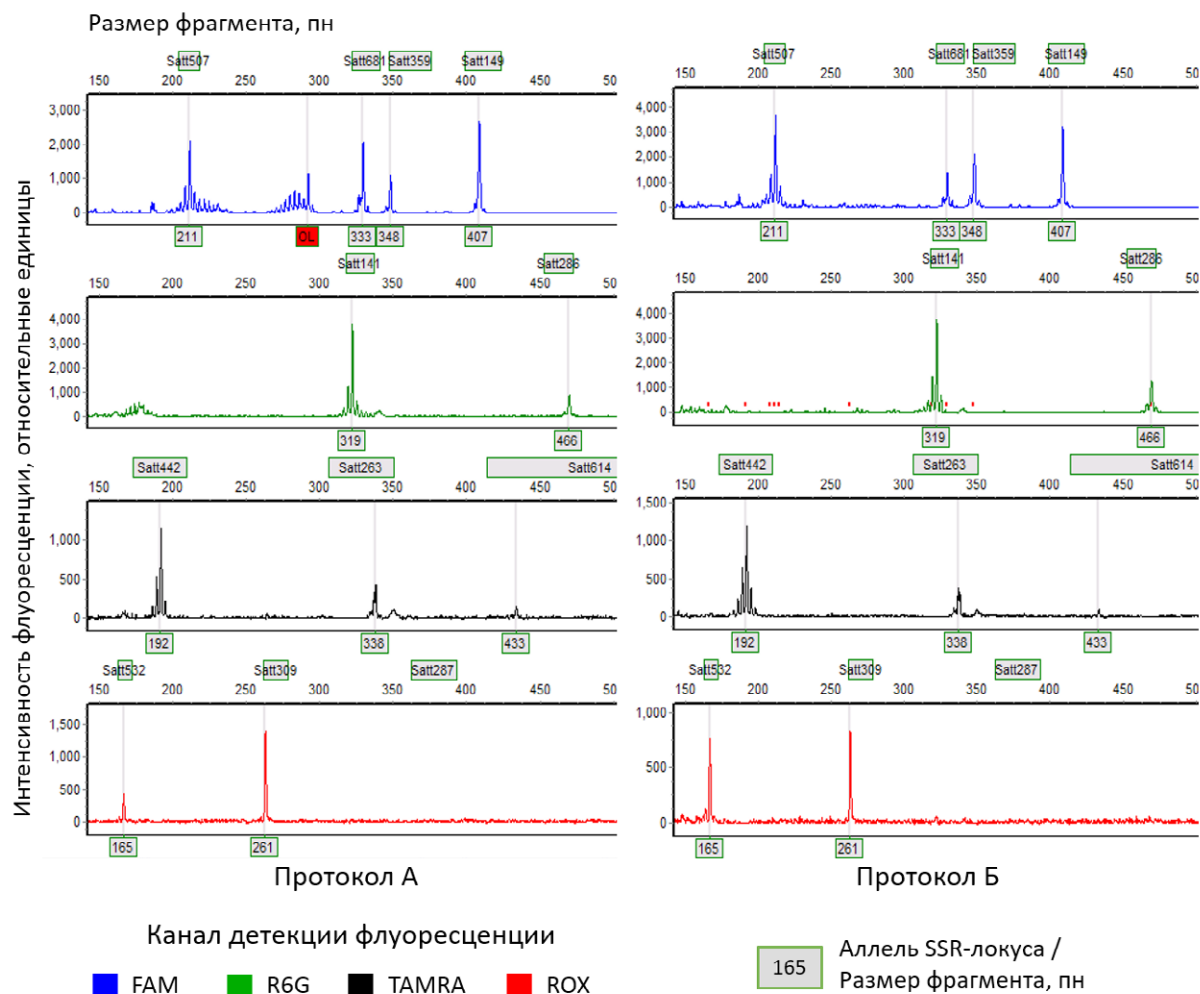
Следующим этапом работы стало формирование мультиплексных систем, заключающееся в поэтапном пополнении наборов SSR-маркеров по результатам успешной амплификации при их совместном использовании. В результате проведенной работы были сформированы две мультиплексные системы, позволяющие проводить одновременную совместную амплификацию фрагментов 11 SSR-маркеров в каждой (см. табл. 2).

При проведении мультиплексных ПЦР со сформированными наборами SSR-маркеров амплифицировались фрагменты ДНК, размеры которых полностью соответствовали значениям, установленным в результате моноплексных ПЦР (см. табл. 2). Однако амплификация характеризовалась недостаточной стабильностью: при повторных постановках мультиплексных ПЦР наблюдалась переменность интенсивности сигнала по отдельным

SSR-маркерам, а также появление неспецифичных продуктов реакции.

С целью получения стабильных и воспроизводимых результатов амплификации провели оптимизацию температурно-временных условий мультиплексных ПЦР. При сравнении двух отличающихся условиями протокола было установлено, что оба обеспечивают амплификацию фрагментов по всем SSR-маркерам мультиплексной системы 1. Однако использование *протокола А* привело к появлению неспецифичных продуктов, что видно на каналах детекции флуоресценции FAM и R6G, тогда как по *протоколу Б* они отсутствуют (рис. 2). При этом в обоих случаях наблюдался слабый сигнал по SSR-маркерам Satt263 и Satt614.

Во второй мультиплексной системе при амплификации по *протоколу А* также отмечалось наличие неспецифичных продуктов по каналам детекции FAM и R6G. Интенсивность сигналов по SSR-маркерам Satt549, Satt181, Satt168, CSSR531, Satt197, Satt353, Satt292 и Satt287 была слабой, а для части анализируемых образцов ДНК вовсе отсутствовала. Проведение мультиплексной ПЦР по *протоколу Б* обеспечило стабильную амплификацию только целевых фрагментов ДНК по всем SSR-маркерам (рис. 3).



**Рис. 2.** Электрофореграммы разделения ПЦР-продуктов мультиплексной системы 1, полученных при разных протоколах амплификации (растение сорта 'Лира')

**Fig. 2.** Electrophoregrams of PCR product separation in multiplex system 1, obtained with different amplification protocols (a plant of cv. 'Lira')

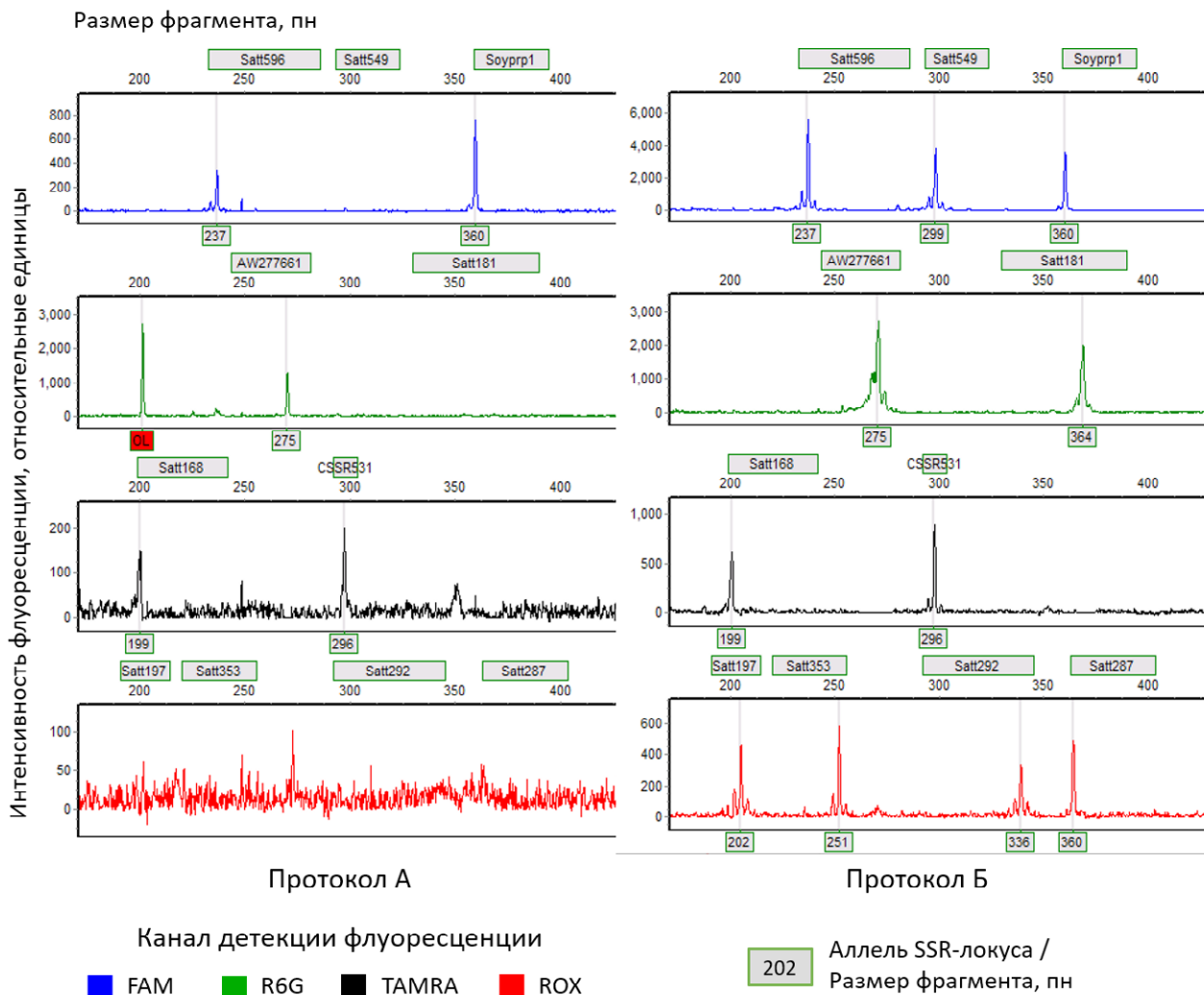
В целом проведенный опыт показал преимущество протокола 2-шаговой ПЦР (*протокол Б*) для получения стабильных результатов амплификации при совместном использовании SSR-маркеров, поэтому данный протокол температурно-временных режимов был выбран в качестве оптимального для разработанных мультиплексных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

Однако, как уже было отмечено выше, для отдельных SSR-маркеров сохранялась относительно низкая интенсивность сигнала (см. рис. 2), что могло вызывать затруднение при интерпретации результатов фрагментного анализа. Описанная проблема наблюдалась при использовании одинаковых концентраций всех праймеров в мультиплексной ПЦР (0,4 пкМ/мкл). Поэтому было необходимо оптимизировать состав реакционной смеси. На рисунке 4 представлены электрофореграммы по каналу детекции флуоресценции TAMRA, демонстрирующие вариабельность интенсивности сигналов SSR-маркеров при различных соотношениях подбираемых концентраций праймеров.

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 (вариант 1). При увеличе-

нии 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 происходит 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. Пики остальных SSR-маркеров воспроизводились с достаточной для интерпретации интенсивностью во всех вариантах. Однако сигнал маркера Satt614 сохранялся на низком уровне даже после оптимизации концентраций.

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 (Modorov et al., 2024). Следовательно, добиться повышения сигнала можно изменением флуорофора на более интенсивный по уровню флуоресценции. Кроме того, перераспределение флуорофоров решает потенциальную проблему перекрытия диапазонов размеров фрагментов ДНК разных SSR-маркеров. Так, напри-



**Рис. 3.** Электрофореграммы разделения ПЦР-продуктов мультиплексной системы 2, полученных при разных протоколах амплификации (растение сорта 'Лира')

**Fig. 3.** Electrophoregrams of PCR product separation in multiplex system 2, obtained with different amplification protocols (a plant of cv. 'Lira')

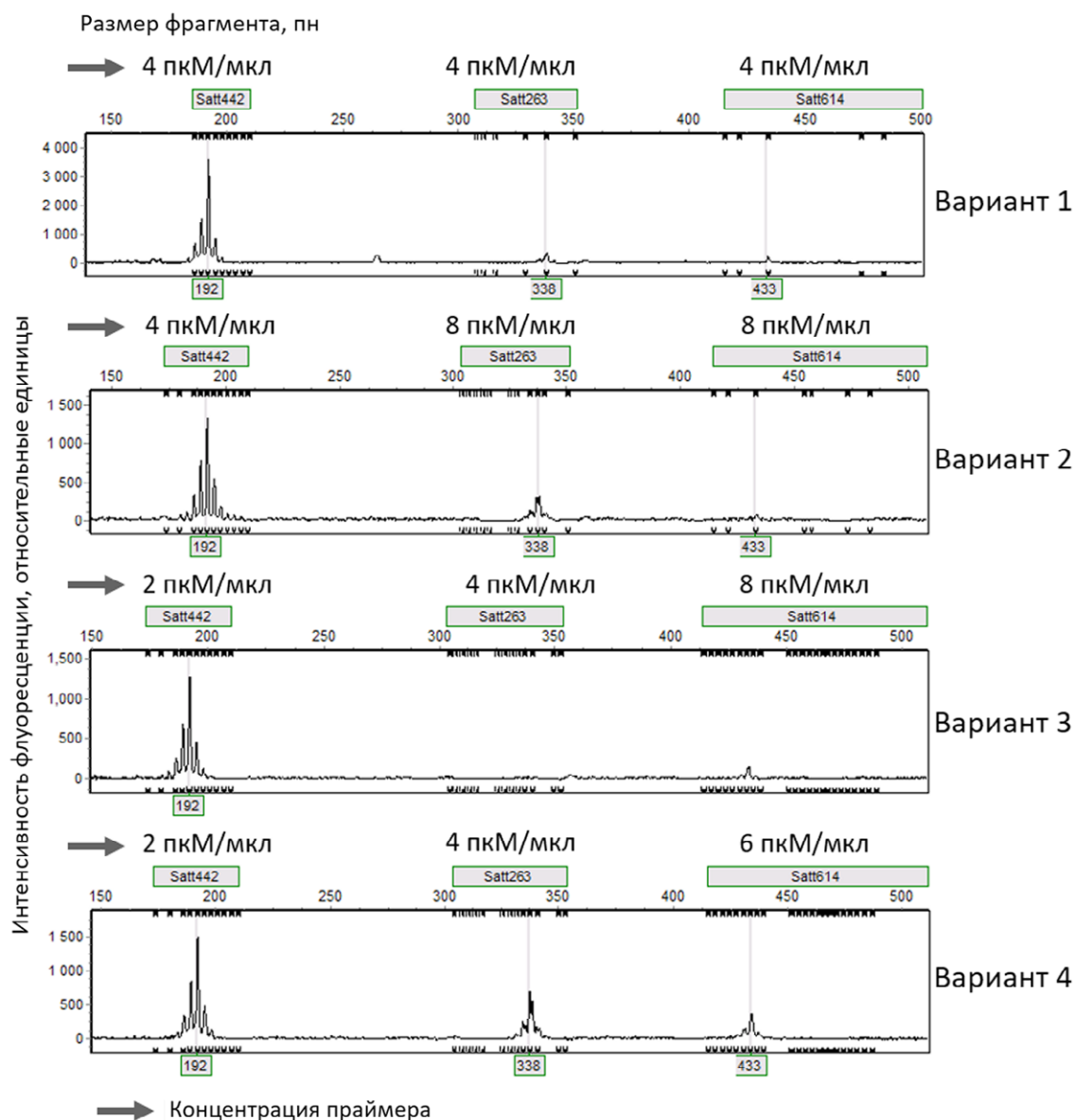
мер, в мультиплексной системе 1 у маркеров Satt681 и Satt359, меченных одним флуорофором (FAM), диапазоны размеров отличаются всего на 3 пн, а в мультиплексной системе 2 довольно близкие диапазоны с разницей в 8 пн имеют SSR-маркеры Satt596 и Satt549, меченные FAM (см. табл. 2). В случае появления новых 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 ими фрагментов ДНК (в таблице 1 представлены актуальные последовательности).

Перераспределение флуорофоров, как и ожидалось, привело к изменению интенсивности сигналов. Соответственно, концентрации праймеров, подобранные выше, требовали корректировки. Итоговые значения концентраций праймеров и распределение между ними флуорофоров указаны в таблице 3.

Кроме того, изменение флуорофоров для SSR-маркеров привело к смещению определяемых размеров ам-

плифицируемых фрагментов. Так, при сравнении результатов фрагментного анализа ПКО (ДНК растения сорта 'Лира') по одному и тому же SSR-маркеру Satt359, меченному разными флуорофорами (FAM и ROX), различие в определяемых размерах составляло 4 пн. В целом размер фрагмента является относительной величиной и может варьировать в зависимости от условий проведения фрагментного анализа (параметры электрофореза, длина капилляров, тип полимера, флуорофор). Для практического применения разработанных мультиплексных систем SSR-маркеров в целях паспортизации и идентификации генотипов принципиальное значение имеет воспроизводимость определения аллельных вариантов, основанная на корректности интерпретации размеров амплифицируемых фрагментов. В связи с этим в программе GeneMarker для обеих мультиплексных систем дополнительно были сформированы файлы панелей, содержащие информацию об аллельных вариантах каждого SSR-маркера. Для примера на рисунке 5 представлена часть панели для одного из маркеров мультиплексной системы 1 по каналу детекции флуоресценции R6G.

При интерпретации результатов фрагментного анализа первоначально проводится проверка соответствия



**Рис. 4.** Электрофореграммы разделения ПЦР-продуктов мультиплексной системы 1 (растение сорта 'Лира'): Satt442 – маркер с достаточной для интерпретации интенсивностью сигнала; Satt263, Satt614 – маркеры с устойчиво пониженной интенсивностью сигнала

**Fig. 4.** Electrophoregrams of PCR product separation in multiplex system 1 (a plant of cv. 'Lira'): Satt442 – marker with signal intensity sufficient for interpretation; Satt263 and Satt614 – markers with consistently reduced signal intensity

**Таблица 3.** Характеристика разработанных мультиплексных систем SSR-маркеров сои  
**Table 3.** Characteristics of the developed multiplex SSR marker systems for soybean

| SSR-маркер                      | Концентрация каждого из пары праймеров, пкМ/мкл | Флуорофор | Количество выявленных аллелей* |
|---------------------------------|---|-----------|--------------------------------|
| <b>Мультиплексная система 1</b> |   |           |                                |
| Satt507                         | 0,75  | FAM       | 3                              |
| Satt681                         | 1,75  | FAM       | 4                              |
| Satt149                         | 0,50  | FAM       | 4                              |
| Satt532                         | 0,75  | R6G       | 4                              |
| Satt141                         | 0,75  | R6G       | 5                              |
| Satt614                         | 4,50  | R6G       | 6                              |
| Satt442                         | 2,25  | TAMRA     | 4                              |

Таблица 3. Окончание

Table 3. The end

| SSR-маркер                      | Концентрация каждого из пары праймеров, пкМ/мкл | Флуорофор | Количество выявленных аллелей* |
|---------------------------------|---|-----------|--------------------------------|
| Satt263                         | 4,00  | TAMRA     | 5                              |
| Satt309                         | 2,00  | ROX       | 3                              |
| Satt359                         | 4,00  | ROX       | 4                              |
| Satt286                         | 4,75  | ROX       | 4                              |
| <b>Мультиплексная система 2</b> |   |           |                                |
| CSSR531                         | 0,25  | FAM       | 4                              |
| Satt596                         | 0,75  | FAM       | 7                              |
| Satt287                         | 0,75  | FAM       | 2                              |
| Satt197                         | 0,75  | R6G       | 4                              |
| AW277661                        | 0,50  | R6G       | 3                              |
| Satt181                         | 0,75  | R6G       | 5                              |
| Satt168                         | 2,75  | TAMRA     | 4                              |
| Satt549                         | 2,75  | TAMRA     | 3                              |
| Satt353                         | 1,75  | ROX       | 3                              |
| Satt292                         | 3,00  | ROX       | 4                              |
| Soyprp1                         | 3,25  | ROX       | 3                              |

Примечание: \* – на выборке анализируемых образцов

Note: \* – within the analyzed sample set

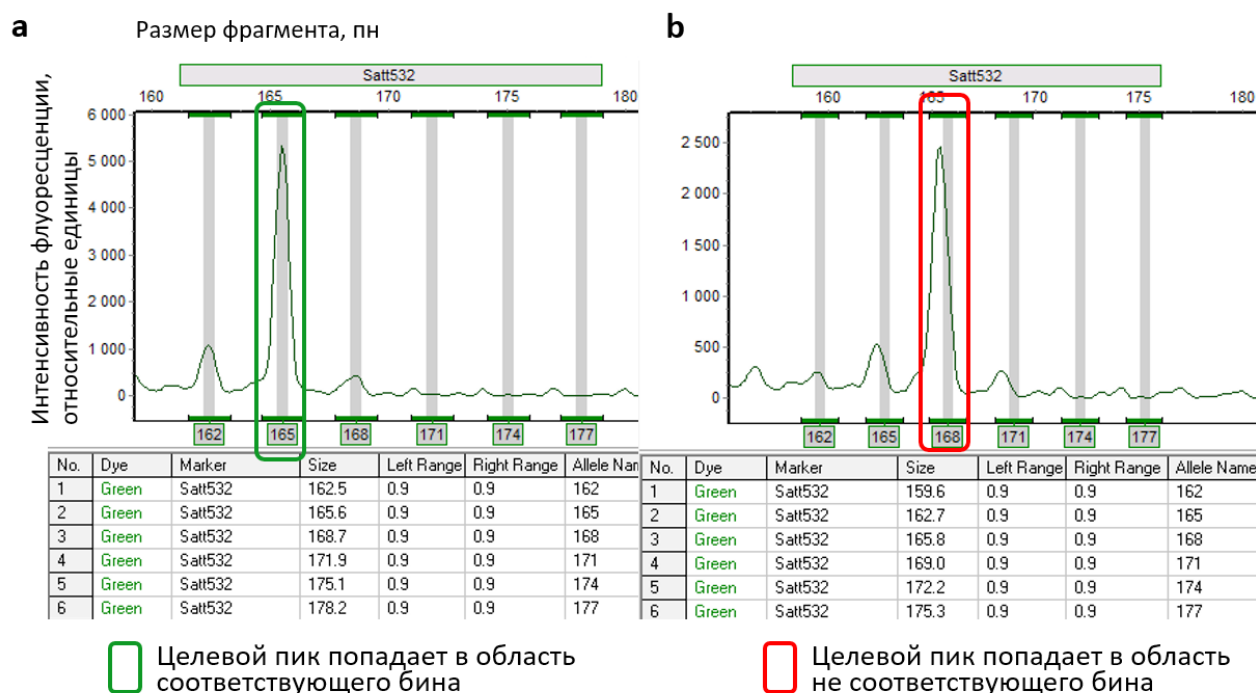


Рис. 5. Определение положения панели для маркера Satt532 относительно пика ПКО: а – корректное положение; б – некорректное положение

Fig. 5. Determining the position of the Satt532 marker panel versus the positive control peak: а – correct position; б – incorrect position

значения, определенного для ПКО в текущем анализе, контрольному значению. Согласно данным, приведенным в таблице 2, сорт 'Ли́ра' по маркеру Satt532 имеет фрагмент размером 165 пн. При корректном положении панели целевой пик ПКО попадает в бин, соответствующий данному значению (165 пн) (см. рис. 5, а). В случае несоответствия (см. рис. 5, б), что может наблюдаться при изменении условий проведения электрофореза, положение панели корректируется до достижения совпадения значений. Таким образом обеспечивается сопоставимость результатов генотипирования между различными сериями анализа, что повышает надежность использования разработанных мультиплексных систем. При выявлении новых аллельных вариантов, появление которых возможно при анализе генотипов, не вошедших в настоящее исследование, данные панели будут пополняться.

Полученные результаты могут применяться для задач паспортизации и идентификации при условии анализа расширенного набора сортов и подтверждения уникальности их ДНК-профилей с учетом внутрисортного полиморфизма.

### Заключение

В результате исследования разработаны две мультиплексные системы ДНК-маркеров, каждая из которых позволяет проводить одновременную амплификацию фрагментов ДНК 11 SSR-маркеров, что способствует сокращению продолжительности анализа. Для 19 из 22 микросателлитных локусов сконструированы новые последовательности праймеров, обеспечивающие их специфичность в мультиплексной ПЦР. Оптимизация условий проведения мультиплексной ПЦР позволила получить стабильную и воспроизводимую амплификацию фрагментов по каждому маркеру и надежно интерпретировать результаты фрагментного анализа. Разработанные мультиплексные системы SSR-маркеров могут быть использованы для паспортизации и идентификации сортов сои при подтверждении уникальности расширенной выборки сортов.

### References / Литература

- Alves S.I.A., Dantas C.W.D., Macedo D.B., Ramos R.T.J. What are microsatellites and how to choose the best tool: a user-friendly review of SSR and 74 SSR mining tools. *Frontiers in Genetics*. 2024;15:1474611. DOI: 10.3389/fgene.2024.1474611
- Bondarenko O.N., Ivaniy A.A., Penzin A.A. The experience of using the certification system in establishing the varietal affiliation of soybeans. *Vestnik Chuvash SAU*. 2025;1(32):7-14. [in Russian] (Бондаренко О.Н., Иванов А.А., Пензин А.А. Опыт использования системы паспортизации в установлении сортовой принадлежности сои. *Вестник Чувашского государственного аграрного университета*. 2025;1(32):7-14). DOI: 10.48612/vch/xxxx-gr7g-5kf7
- Divashuk M.G., Krupin P.Yu., Karlov G.I., Klimushina M.V., Samarina M.A., Zlobnova N.V., Arkhipov A.V. Method for molecular genetic identification of soybean cultivars and lines (Sposob molekulyarno-geneticheskoy identifikatsii sortov i liniy soi). Russian Federation; patent number: 2839697; 2025. [in Russian] (Дивашук М.Г., Крупин П.Ю., Карлов Г.И., Климушина М.В., Самарина М.А., Злобнова Н.В., Архипов А.В. Способ молекулярно-генетической идентификации сортов и линий сои. Российская Федерация; патент № 2839697; 2025). URL: <https://www.fips.ru/cdfi/fips.dll/ru?ty=29&docid=2839697> [дата обращения: 17.03.2026].
- Golovatskaya A.V., Guchetl S.Z. Assessment of the genetic diversity of sunflower lines of VNIIMK breeding based on multiplex microsatellite analysis. *Agrarian Science*. 2024;(11):117-121. [in Russian] (Головатская А.В., Гучетль С.З. Оценка генетического разнообразия линий подсолнечника селекции ВНИИМК на основе мультиплексного микросателлитного анализа. *Аграрная наука*. 2024;(11):117-121). DOI: 10.32634/0869-8155-2024-388-11-117-121
- Guchetl S.Z., Golovatskaya A.V., Savichenko D.L., Loginova E.D., Zhudina E.I. Development of highly informative microsatellite markers for the genetic analysis of sunflower. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2025;186(4):142-154. [in Russian] (Гучетль С.З., Головатская А.В., Савиченко Д.Л., Логинова Е.Д., Жудина Э.И. Разработка высокоинформативных микросателлитных маркеров для генетического анализа подсолнечника. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2025;186(4):142-154). DOI: 10.30901/2227-8834-2025-4-142-154
- Khlestkina E.K., Gavrilenko T.A., Chukhina I.G., Gekht M.A., Antonova O.Yu., Ukhatova Yu.V. Genetic passports: science for the economy. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2025;8(2):63-79. [in Russian] (Хлесткина Е.К., Гавриленко Т.А., Чухина И.Г., Гехт М.А., Антонова О.А., Ухатова Ю.В. Генетические паспорта: наука – экономике. *Биотехнология и селекция растений*. 2025;8(2):63-79). DOI: 10.30901/2658-6266-2025-2-05
- Kolobova O.S., Maluchenko O.P., Shalaeva T.V., Shanina E.P., Shilov I.A., Alekseev Ya.I. et al. Multiplexed set of 10 microsatellite markers for identification of potato varieties. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(1):124-127. [in Russian] (Колобова О.С., Малюченко О.П., Шалаева Т.В., Шанина Е.П., Шилов И.А., Алексеев Я.И. и др. Генетическая паспортизация картофеля на основе мультиплексного анализа 10 микросателлитных маркеров. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(1):124-127). DOI: 10.18699/VJ17.230
- Koltun A., da Silva P.A., Torres I.Y., Bonifácio-Anacleto F., Yasitepe J.E.C.T. Microsatellite markers in maize: challenges and guidelines for implementing multiplex SSR analyses. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 2024;24(1):e46392411. DOI: 10.1590/1984-70332024v24n1a01
- Li F., Sayama T., Yokota Y., Hiraga S., Hashiguchi M., Tanaka H. et al. Assessing genetic diversity and geographical differentiation in a global collection of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) and assigning a mini-core collection. *DNA Research*. 2024;31(2):dsae009. DOI: 10.1093/dnares/dsae015
- Modorov M.V., Kiseleva O.A., Polezhaeva M.A., Chebotok E.M. Development of multiplex microsatellite markers set for black currant (*Ribes nigrum* L.) genetic identification. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2024;7(4):68-81. [in Russian] (Модоров М.В., Киселева О.А., Полежаева М.А., Чеботок Е.М. Разработка мультиплексного набора микросателлитных маркеров для генетической идентификации черной смородины (*Ribes nigrum* L.). *Биотехнология и селекция растений*. 2024;7(4):68-81). DOI: 10.30901/2658-6266-2024-4-06
- NIH. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. Genome assembly Glycine\_max\_v4.0: [website]. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF\\_000004515.6](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000004515.6) [accessed Jan. 12, 2026].

- NIH. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. Primer-BLAST: A tool for finding specific primers: [website]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> [accessed Jan. 12, 2026].
- Ramazanova S.A., Kolomytseva A.S. Optimization of soybean genotyping process using analysis of a polymorphism of SSR-loci in DNA. *Oil Crops*. 2020;1(181):42-48. [in Russian] (Рамазанова С.А., Коломыцева А.С. Оптимизация технологии генотипирования сои на основе анализа полиморфизма SSR-локусов ДНК. *Масличные культуры*. 2020;1(181):42-48). DOI: 10.25230/2412-608X-2020-1-181-42-48
- Ramazanova S.A., Savichenko V.G., Ustarkhanova E.G., Loginova E.D., Ramazanov R.M., Guchetl A.Kh. Search of the new SSR-loci of DNA for development of effective technology for soybean genotyping. *Oil Crops*. 2021;4(188):18-24. [in Russian] (Рамазанова С.А., Савиченко В.Г., Устарханова Э.Г., Логинова Е.Д., Рамазанов Р.М., Гучетль А.Х. Поиск новых SSR-локусов ДНК для создания эффективной технологии генотипирования сои. *Масличные культуры*. 2021;4(188):18-24). DOI: 10.25230/2412-608X-2021-4-188-18-24
- Savichenko V.G., Ramazanova S.A., Guchetl S.Z. Search of informative SSR-markers for soybean cultivars passportization. *Oil Crops*. 2024a;2(198):10-15. [in Russian] (Савиченко В.Г., Рамазанова С.А., Гучетль С.З. Поиск информативных SSR-маркеров для паспортизации сортов сои. *Масличные культуры*. 2024a;2(198):10-15). DOI: 10.25230/2412-608X-2024-2-198-10-15
- Savichenko V.G., Savichenko D.L., Ramazanova S.A., Guchetl' S.Z. Genetic polymorphism of soybean varieties bred by All-Russian Research Institute of Oil Crops. *Achievements of Science and Technology of AIC*. 2024b;38(10):5-10. [in Russian] (Савиченко В.Г., Савиченко Д.Л., Рамазанова С.А., Гучетль С.З. Генетический полиморфизм сортов сои селекции ВНИИМК. *Достижения науки и техники АПК*. 2024b;38(10):5-10). DOI: 10.53859/02352451\_2024\_38\_10\_5
- Shilov I.A., Velishaeva N.S., Aniskina Yu.V., Kolobova O.S., Shalaeva T.V., Borisenko O.M. et al. Genetic identification of *Helianthus annuus* L. sunflower lines and hybrids based on multiplex microsatellite analysis. *Achievements of Science and Technology of AIC*. 2023;37(1):10-15. [in Russian] (Шилов И.А., Велишаева Н.С., Анискина Ю.В., Колобова О.С., Шалаева Т.В., Борисенко О.М. и др. Генетическая идентификация линий и гибридов подсолнечника *Helianthus annuus* L. на основе мультиплексного микросателлитного анализа. *Достижения науки и техники АПК*. 2023;37(1):10-15). DOI: 10.53859/02352451\_2023\_37\_1\_10
- SoyBase: [website]. Available from: <https://www.soybase.org> [accessed Jan. 14, 2026].
- Tripathi M.K., Tripathi N., Tiwari S., Mishra N., Sharma A., Tiwari S. et al. Identification of Indian soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) genotypes for drought tolerance and genetic diversity analysis using SSR markers. *Scientist*. 2023;3(3):31-46. DOI: 10.5281/zenodo.7697640
- Zatybekov A., Yermagambetova M., Genievskaya Y., Didorenko S., Abugalieva S. Genetic diversity analysis of soybean collection using simple sequence repeat markers. *Plants (Basel)*. 2023;12(19):3445. DOI: 10.3390/plants12193445
- Zubov V.V., Sakhabutdinova A.R., Chemeris D.A., Garafutdinov R.R., Chemeris A.V. Variants of PCR with more than two primers. II. The principle and features of multiplex PCR. *Biomics*. 2024;16(2):234-243. [in Russian] (Зубов В.В., Сахабутдинова А.Р., Чемерис Д.А., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В. Варианты ПЦР с более чем двумя праймерами. II. Принцип и особенности мультиплексной ПЦР. *Биомика*. 2024;16(2):234-243). DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2024-14

#### Информация об авторе

**Виолетта Георгиевна Савиченко**, научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта, 350038 Россия, Краснодар, ул. им. Филатова, 17, violet.savichenko@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6803-7809>

#### Information about the author

**Violetta G. Savichenko**, Researcher, V.S. Pustovoit All-Russia Research Institute of Oil Crops, 17 Filatova St., Krasnodar 350038, Russia, violet.savichenko@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6803-7809>

Статья поступила в редакцию 30.01.2026; одобрена после рецензирования 05.05.2026; принята к публикации 14.05.2026. The article was submitted on 30.01.2026; approved after reviewing on 05.05.2026; accepted for publication on 14.05.2026.