

ANALIZA GENETICO-MOLECULARĂ A UNOR SOIURI AUTOHTONE DE *GLYCINE MAX* (L.) MERRILL PRIN UTILIZAREA MARKERILOR MICROSATELITICI

Ina BIVOL, Ana BÎRSAN

Universitatea de Stat din Moldova

Prin intermediul markerilor Inter-simplu Secvențe Repetitive (ISSR) a fost evaluată diversitatea genetică a speciei *Glycine max* L. Analiza ISSR a soiurilor autohtone de soia a pus în evidență existența polimorfismului intraspecific cu valoarea medie 25%. În spectrul variat de fragmente amplificate s-a remarcat prezența unor secvențe specifice care pot fi utilizate în calitate de markeri moleculari în genotipare la soia. Profilul electroforetic al ampliconilor ISSR a permis determinarea distanței genetice și construirea dendrogramei ce a reflectat similitudinea genetică la soiurile studiate.

Genotiparea germoplasmei de soia prezintă un instrument molecular util pentru realizarea cu succes a programelor de selecție moderne, scopul cărora este de a crea soiuri noi cu caractere dorite.

Cuvinte-cheie: *Glycine max*, soiuri autohtone, polimorfism, fragmente specifice, distanță genetică, primeri, markeri ISSR.

MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF SOME AUTOCHTHON SOYBEAN (*GLYCINE MAX* (L.) MERRILL) CULTIVARS BY USING MICROSATELLITE MARKERS

In this study, the genetic diversity of *Glycine max* L. was evaluated using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Intraspecific polymorphism of soybean landraces was 25%. The molecular marking revealed the specific fragments, which can be used as molecular markers in soybean genotyping. On the bases of ISSR analysis, the genetic distances were estimated, and dendrogram reflecting genetic similarity was constructed.

Genotyping of soybean germplasm is useful tool for modern breeding programs which are aimed at the development of new cultivars with desirable traits.

Keywords: *Glycine max*, landraces, polymorphism, specific fragments, genetic distance, primers, ISSR markers.

Introducere

Soia [*Glycine max* (L.) Merrill] este o cultură leguminoasă înalt apreciată și solicitată pe plan mondial, datorită conținutului sporit de uleiuri și proteine de calitate înaltă, utilizate în scop alimentar, furajer, tehnic și în medicină. Soia este sensibilă la secetă, având cerințe specifice față de nivelul de umiditate. Consecințele seceței, suportate de plante în perioada de înflorire, sunt resimțite prin micșorarea producției boabelor cu 14-52%, în timp ce asigurarea insuficientă cu apă la etapa de umplere a bobului cauzează reducerea recoltelor cu 41-87% [4]. Din acest motiv, extinderea cultivării soiei în regiunile secetoase se axează, în special, pe crearea de soiuri rezistente la factorii abiotici.

Obținerea de soiuri rezistente necesită o bună cunoaștere a bazelor genetice ale moștenirii caracterelor de importanță economică. În vederea realizării celor sus-menționate, se impune explorarea cât mai completă a resurselor genetice ale *Glycine max*, cu valorificarea rezultatelor obținute în ameliorarea germoplasmei de soia.

În prezent, examinarea polimorfismului genetic, selectarea plantelor ce posedă caractere valoroase pentru ameliorare și punerea în evidență a acestor caractere în procesul de selecție implică utilizarea markerilor moleculari. Cercetările moleculare ale genomului la diferite specii de plante se efectuează prin aplicarea metodelor contemporane care facilitează realizarea programelor de selecție prin estimarea variabilității genetice, studii filogenetice și populaționale, pașaportizarea moleculară a soiurilor, diagnosticarea bolilor, verificarea purității genetice, protejarea drepturilor de autor, cartarea caracterelor utile de înaltă calitate și evaluarea rezistenței la factorii de stres etc. [5,20,21,29]. Genotiparea structurală și funcțională la plante se realizează printr-un șir de strategii experimentale bazate pe tehnica PCR care, în comparație cu metodele clasice de studiu, sunt mai rapide, au o eficacitate mai înaltă, necesită cheltuieli nesemnificative, nu depind de condițiile mediului ambiant și cuprind aproape toate regiunile genomului implicate în cercetare. În dependentă de scopurile investigațiilor, caracterizarea moleculară a genotipurilor poate fi realizată prin aplicarea diverselor metode (RAPD, AFLP, ISSR, SSR, SCAR, SNP etc.), fiecare din ele având atât avantaje, cât și dezavantaje [17,20,33]. Conform surselor de specialitate, pentru studiul diversității genetice la soia în scopul obținerii unor rezultate relevante sunt utilizate diferite tipuri de markeri moleculari – proteine de rezervă [23], RAPD [24,25], ISSR [12,30-32], AFLP [6] etc. Selectarea celei mai potrivite tehnici moleculare pentru dezvoltarea unei anumite teme de cer-

cetare se efectuează în baza următoarelor criterii: diversitatea și numărul necesar de markeri, necesitatea analizei caracterelor codominante, cerințele înaintate față de cantitatea și calitatea ADN-ului extras, precum și eficiența, reproductibilitatea analizei, disponibilitatea de echipament necesar și costul experimentului [33].

Analiza ISSR realizată pe tehnica de PCR este o variantă specializată a metodei RAPD, fiind folosită frecvent în studiile genetice la diferite specii de plante [2,8,11,13]. Primerii utilizați în amplificarea ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) sunt constituiți, din motive simple, de obicei de 2-5 pb repetate în tandem (secvențe microsatelice-SSR) cu o lungime de 15-24 perechi de baze. Marcherii ISSR specifici sunt înalt polimorfi în regiunile intermicrosatelice și se moștesc dominant conform legilor mendeliene. Datorită eficienței înalte, metoda este aplicată cu succes în determinarea diferențelor dintre specii și în cadrul speciilor, chiar și dintre indivizii înrudiți cu un polimorfism mai mic [8-10,28].

Această metodă a fost utilizată în evaluarea diversității genetice atât la speciile cultivate de soia, cât și la formele lor sălbatice și a pus în evidență un polimorfism intraspecific destul de mare la genotipurile cultivate. Astfel, cercetările efectuate M.M. Козыренко [32] la trei specii de soia *Glycine max* (L.) Merr. au relevat un polimorfism de 34,81%, polimorfismul manifestat între speciile menționate și liniile somaclonale atingând un nivel înalt – de circa 52,85%. Distanțele genetice între soiurile studiate au variat în limitele de 0,1047-0,1363, iar la diferite linii somaclonale – în limitele de 0,0256 - 0,1830, valorile mici ale distanțelor genetice indicând asupra gradului apropiat de rudenie a genotipurilor.

Analiza filogenetică, realizată pe baza distanțelor genetice, a pus în evidență un nivel mediu de polimorfism genetic, egal cu 0,35 la 12 soiuri autohtone de soia din Kazahstan [30], și a permis gruparea materialului testat în 3 clustere distincte. În alte cazuri, a fost evidențiat un nivel destul de jos de variabilitate genetică la germoplasma de soia din Turcia, unde 46 ISSR-primeri au generat 31 de ampliconi polimorfi [1], datele sugerând necesitatea implicării surselor noi de germoplasmă în programele de selecție pentru sporirea diversității genetice a plantelor de cultură.

Experimentele realizate de Hai-Yan et al. [27] au demonstrat că formele sălbatice de soia manifestă grad de heterogenitate mai înalt în comparație cu formele cultivate de soia, iar testarea a 15 primeri ISSR a făcut posibilă delimitarea strictă a formelor sălbatice de populațiile cultivate. Rezultatele obținute au relevat un nivel înalt de diversitate genetică, coeficientul de similaritate variind în limitele de 0,17-0,89. Investigațiile mai aprofundate, efectuate asupra a 25 forme sălbatice de soia prin testarea cu 28 ISSR primeri, au evidențiat un grad de polimorfism genetic foarte înalt – de cca 89,23% [26]. Analiza clusteriană (metoda UPGMA) de repartitie a genotipurilor de soia de origine sălbatică în baza distanței genetice a repartizat materialul cercetat în 5 clustere, coeficientul de similaritate variind în limitele 0,4462-0,8923. Rezultatele obținute au confirmat încă o dată concluziile înaintate în experimentele anterioare [27] referitor la existența unui grad foarte înalt de polimorfism genetic la formele sălbatice de soia.

Din cele expuse se poate conchide că studierea diversității genetice prin efectuarea analizelor moleculare este deosebit de actuală, datorită valorii informațiilor pe care le furnizează, urmând ca acestea să fie puse la dispoziția amelioratorilor.

Scopul prezentei investigații a constat în analiza genotipurilor și în studierea variabilității genetice la unele soiuri autohtone de soia, cu diversă rezistență la secetă, în baza polimorfismului molecular al secvențelor microsatelice de ADN.

Material și metode

Drept obiect de studiu au servit 7 soiuri autohtone de soia (*Glycine max* L.): Colina, Enigma, Horboveanca, Zodiac, Licurici, S4O4, Aura. Materialul experimental, prezentat prin diferite soiuri ale speciei *Glycine max* L., s-a deosebit după unele caractere morfologice, însușiri biochimice, tehnologice și agronomice (perioada de vegetație; înălțimea plantei și inserției primei păstăi; masa a 1000 de boabe (MMB); conținutul proteinei și grăsimilor în boabe; rezistența la secetă și la boli; căderea, scuturarea boabelor).

ADN-ul genomic total a fost extras din materialul vegetal în azot lichid conform recomandărilor propuse [22] cu unele modificări urmate de purificare suplimentară, prin intermediul soluției de clorură de litiu 12 M, cu reducerea concentrației finale a soluției până la 4 M. Testarea calității și cuantificarea cantității de ADN s-a realizat prin analiza electroforetică în gel de agaroză de 1%. Genotipurile de soia au fost analizate molecular prin metoda ISSR, care permite estimarea integrală a variabilității genomului, nu presupune cunoașterea regiunilor flancante, are o reproductibilitate înaltă și a relevat, conform datelor din literatura de specialitate, un nivel foarte înalt de polimorfism genetic la soia [14]. Pentru analiza ISSR au fost utilizați următorii primeri

specifici: BC808 (5'-AGA GAG AGA GAG AGA GC 3'), BC835 (5'-AGA GAG AGA GAG AGA GYC 3'), BC811(5'-GAG AGA GAG AGA GAG AC 3') și BC841(5'-GAG AGA GAG AGA GAGAYC 3'). Amplificarea s-a efectuat cu ajutorul amplificatorului Genset 9700 "Applied Biosystem" după metoda acceptată [18]. Programul de amplificare: 1) denaturarea 4 min. la 94°C – 1 ciclu; 2) denaturarea 1 min. la 94°C, alinierea 1 min. la 55°C, elongarea 2 min. la 72°C – 45 cicluri; 3) elongarea finală 7 min. la 72°C – 1 ciclu.

Temperatura de aliniere (T_m) a primerilor a fost selecționată conform formulei: $T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$ și determinată empiric [7]. Pentru determinarea maselor moleculare relative ale produselor de amplificare au fost utilizate probe cu martori – marker Smart producator Eurogentech (200-10000 pb). Produsele amplificării au fost analizate prin analiza electroforetică în gel de agaroză 1,6% în soluție tampon de migrare 1x TAE (40 mM Tris-acetat, pH 8,0; 0,2 mM EDTA) la intensitatea câmpului electric de 2,5 V/oră/cm. Vizualizarea probelor în gel de agaroză s-a realizat la transiluminator în raze ultraviolete cu lungimea de undă 305 nm, după ce acesta a fost colorat cu bromură de etidiu [18]. Documentarea rezultatelor s-a efectuat prin utilizarea aparatului foto digital cu opția fluorescent Canon Power Shot A640. Nivelul de polimorfism genetic al fragmentelor amplificate a fost calculat după următoarea formulă:

$$P = \frac{\text{numarul de ampliconi polimorfi}}{\text{numarul total de ampliconi}} \times 100\% \quad [36].$$

Analiza statistică a datelor obținute s-a efectuat în pachetul de soft STATISTICA 6.

Rezultate și discuții

Analiza moleculară a diferitelor soiuri din specia *Glycine max* a fost efectuată prin metoda ISSR-PCR. Pentru realizarea scopului cercetării au fost utilizați 4 primeri specifici: BC808, BC811, BC835 și BC841. Examinând secvențele de baze azotate ale primerilor microsatelitici luați în studiu s-a constatat că lungimea BC808 este de 17 pb cu conținutul de 52,9% GC, a BC811– de 17 pb cu 52,9% GC, a BC835 – de 18 pb cu 52,8% GC și a BC841– de 18 pb cu 52,8% GC. Primerii testați au generat un număr variabil de ampliconi (1-6) la soiurile studiate de soia. Analiza fragmentelor amplificate de ADN la soiurile testate, cu 4 primeri ISSR (BC808, BC811, BC835 și BC841) a demonstrat că primerii BC808 și BC835 sunt cei mai informativi datorită faptului că au permis amplificarea mai multor fragmente de ADN, între genotipuri stabilindu-se un nivel de polimorfism genetic pronunțat de 16,67 și, respectiv, 33,33% (Fig.1, Tab.1).

Utilizarea primerului BC808 pentru analiza genotipurilor de soia a permis identificarea a 6 ampliconi, a căror fracționare s-a încadrat în limitele 400-1564 pb, în timp ce primerul BC835 a generat 3 ampliconi încadrați în limitele 555-736 pb (Fig.1), rezultatele demonstrând un diapazon mai restrâns de separare în comparație cu primerul BC808 (Fig.1, Tab.2).

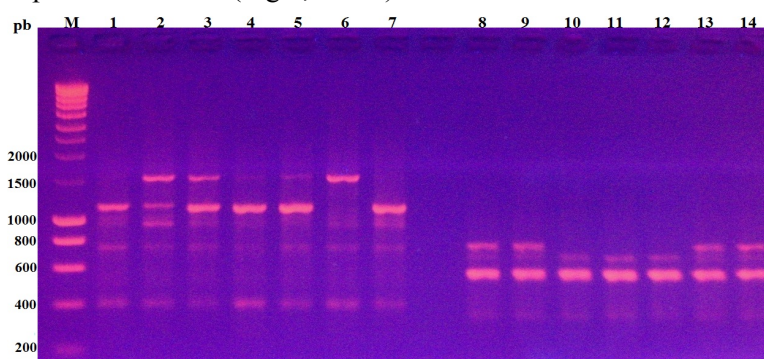


Fig.1. Analiza electroforetică a fragmentelor de ADN amplificate la diferite soiuri din specia *Glycine max* în gelul de agaroză de 1,6%.

În studiu au fost utilizați primerii BC808 (1-7) și BC835 (8-14): M – marker Smart Eurogentech; 1, 8 – soiul Colina; 2, 9 – soiul Enigma; 3, 10 – soiul Horboveanca; 4, 11 – soiul Zodiac; 5, 12 – soiul Licurici; 6, 13 – soiul S4O4; 7, 14 – soiul Aura.

Genotiparea moleculară cu primerii selectați a permis depistarea fragmentelor comune, polimorfe și specifice de ADN (Fig.1, Tab.1). Prezența fragmentelor comune de ADN în spectrele electroforetice obținute în rezultatul PCR cu primerii BC808 (400, 736 și 1130 pb) și BC835 (555 și 736 pb) dă dovadă de existența la cea mai mare

parte sau la toate soiurile studiate a regiunilor conservate în genomul soiei (Fig.1, Tab.1). Totodată, s-a remarcat prezența fragmentelor polimorfe cu lungimea de 1564 pb (în cazul primerului BC808) și de 672 pb (pentru primerul BC835), ceea ce relevă un polimorfism relativ pronunțat intraspecific la soiurile studiate de *G. max* (Fig.1, Tab.2). De menționat că fragmentele specifice cu lungimea de 1165 și de 995 pb, obținute prin amplificare cu primerul BC808, la soiul Enigma prezintă un interes deosebit ca markeri specifici ai speciei de *Glycine max*, care pot fi utilizați în calitate de instrument molecular în genotiparea și analiza relațiilor taxonomice la soia (Fig.1, Tab.1).

Tabelul 1

Caracteristica ISSR-primerilor utilizați în analiza polimorfismului ADN-ului unor soiuri autohtone de *Glycine max* (L.) Merrill. cu diversă rezistență la secetă

Primer	Secvența nucleotidică 5'-3'	Numărul de ampliconi				Nivel de polimorfism, %
		În total	comuni	polimorfi	specifci	
BC808	5'-AGA GAG AGAGAG AGA GC 3'	6	3	1	2	16,67
BC835	5'-AGA GAG AGAGAG AGA GYC 3'	3	2	1	-	33,33

Tabloul de repartitie electroforetică a ampliconilor ISSR a condus la elaborarea matricei cu caractere binare (prezența – 1 sau absența – 0 a fragmentelor de ADN cu dimensiuni egale), care a contribuit la separarea veridică a genotipurilor în clustere. Conform distanței genetice, au fost obținute 2 clustere de bază (Tab.2, Fig.2). Membrii clusterului 1: soiurile Colina, Aura, S4O4, Enigma; membrii clusterului 2: Horboveanca, Zodiac, Licurici (Fig.2). De menționat că unele soiuri de soia formează subclustere comune, în care ele sunt grupate după perioada de vegetație asemănătoare. Deci, se observă o asociere cu acest caracter cantitativ, în particular la soiurile Colina și Aura – soiuri semitimpurii, Enigma și S4O4 – semiprecoce și precoce, Zodiac și Licurici – soiuri timpurii, și, ca excepție, Horboveanca – soi semitimpuriu (Fig.2).

Tabelul 2

Matrice de distanță genetică (metoda Nearest Neighbor, Euclidean distances) la 7 soiuri de *Glycine max* L.

Soiul	Colina	Enigma	Horboveanca	Zodiac	Licurici	S4O4	Aura
Colina	0	1,060	1,554	1,414	1,414	1,044	0
Enigma	1,060	0	1,567	1,583	1,583	1,022	1,060
Horboveanca	1,554	1,567	0	1	1	1,554	1,554
Zodiac	1,414	1,583	1	0	0	1,575	1,414
Licurici	1,414	1,583	1	0	0	1,575	1,414
S4O4	1,044	1,022	1,554	1,575	1,575	0	1,044
Aura	0	1,060	1,554	1,414	1,414	1,044	0

Analiza comparativă a valorilor distanțelor genetice la diferite soiuri de *G.max* a relevat încadrarea acestui parametru în limitele 0-1,583. Caracterizarea genotipurilor studiate prin utilizarea markerilor microsatelitici ISSR, conform dendrogramei de repartitie și distanței genetice (metoda Group Average, Euclidean distances), a demonstrat un grad înalt de similitudine la soiurile Colina, Aura și Zodiac, Licurici (Tab.2, Fig.2). Dat fiind faptul că cu cât valorile distanțelor genetice sunt mai mici, cu atât genotipurile sunt mai strâns înrudite, rezultă că genomurile acestor soiuri sunt genetic apropiate.

Generalizând rezultatele obținute, putem concluziona că caracterizarea genotipurilor studiate de soia a demonstrat un grad înalt de similitudine, care se datorează, posibil, naturii înalt polimorfe și abundente a microsateliților ca urmare a alunecării în procesul de replicare a ADN-ului și, respectiv, reparare a catenelor ADN (mărirea/micșorarea numărului de repetiții nucleotidice). Varietatea genetică scăzută la soiurile locale de soia constatată în experiențele date, dar reflectată și în studiile efectuate de către Seehalak et al. [19], este, probabil, rezultatul cultivării pe parcursul anilor a soiurilor cu o bază genetică restrânsă, care s-au adaptat mai bine la condițiile agroclimatice locale. Studiile ulterioare care vor cuprinde un număr mai mare de soiuri și primeri ar putea conduce la obținerea unor rezultate mai informative și exacte.

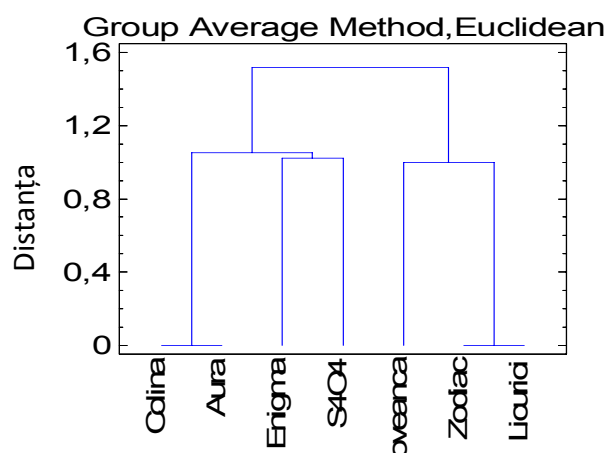


Fig.2. Dendrograma de repartire a genotipurilor de soia în baza distanței genetice.

Concluzii

În urma cercetărilor efectuate și în baza rezultatelor obținute cu privire la studierea polimorfismului genetic la soia *G. max* L., putem concluziona că nivelul polimorfismului genetic diferă de la un genotip la altul.

Demonstrând un nivel de polimorfism genetic pronunțat, primerii BC 808 și BC 835 introduși în programul de cercetare s-au dovedit a fi cei mai informativi pentru analiza unor secvențe de ADN la soia.

S-a stabilit că fragmentele specifice, obținute prin amplificare cu primerul BC808 la soiul Enigma, pot fi utilizate în calitate de markeri moleculari în genotipare la soia.

Analiza clusteriană a permis diferențierea și gruparea genotipurilor în 2 cluster de bază și 4 subclaster: clusterul 1 – soiurile Colina, Aura (care formează subclasterul 1) și S4O4, Enigma (subclasterul 2); clusterul 2 – Hoveanca (subclasterul 3) și Zodiac, Licurici (subclasterul 4).

S-a observat un nivel scăzut de asociere între profilul amplificat prin utilizarea ISSR primerilor și trăsăturile calitative și cantitative, gruparea soiurilor în subclaster fiind asociată doar cu perioada de vegetație asemănătoare.

Astfel, se poate afirma că analiza ISSR reprezintă un instrument sensibil de identificare la nivel molecular a variabilității genetice la soia în cazurile existenței unor relații filogenetice foarte strânse. În cadrul acestui studiu s-a demonstrat oportunitatea și importanța utilizării analizei genotipice, în vederea cunoașterii resurselor genetice ale genofondului de soia al Republicii Moldova, cu scopul conservării purității acestuia, precum și în vederea valorificării rezultatelor în ameliorarea germoplasmei de soia.

Bibliografie:

- BALOGH, F.S., KURT, C., ARIOGLU, H., OZKAN, H. Assaying of diversity among soybean (*Glycin max* (L.) Merr.) and peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes at DNA level. In: *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 2010, vol.34, no.4, p.285-301. ISSN 1300-011X
- BLAIR, M.W., PANAUD, O. & MCCOUCH, S.R. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). In: *Theor. Appl. Genet.*, 1999, vol.98, no.4, p.780-792. ISSN 0040-5752
- BORNET, B., BRANCHARD, M. Use of ISSR fingerprints to detect microsatellites and genetic diversity several related *Brassica* taxa and *Arabidopsis thaliana*. In: *Hereditas*, 2004, vol.140, no.3, p.245-248. ISSN 1601-5223
- CELAC, V., BUDAC, A. *Cultura soiei: Iindrumar*. Chisinau: ASM, IGFP, 2013. 36 p. ISBN 978-9975-53-244-0
- FENG, C., HOU, A., CHEN, P. et al. Genetic diversity among popular historical southern U.S. soybean cultivars using AFLP markers. In: *Journal of Crop Improvement*, 2008, vol.22, no.1, p.31-46. ISSN 1542-7528
- GAVRILĂ, L. *Genomica*. Vol.II. București: Editura Enciclopedică, 2003. 1199 p. ISBN 973-45-0463-0
- GODWIN, I., AITKEN, E., SMITH, L. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. In: *Electrophoresis*, 1997, vol.18, no.9, p.1524-1528. ISSN 1522-2683
- GOULÃO, L., MONTE-CORVO, L., OLIVEIRA, C.M. Phenetic characterization of plum cultivars by high multiplex ratio markers: amplified fragment length polymorphisms and inter-simple sequence repeats. In: *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 2001, vol.126, no.1, p.72-77. ISSN 0003-1062
- GUIMARÃES, E.P., RUANE, J., SCHERF, B.D. et al. *Marker-assisted selection – Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish*. Rome: FAO, 2007. 494 p. ISBN 978-92-5-105717-9

10. HALE, A.L., MILLER, J.C., RENGANAYAKI, K. et al. Suitability of AFLP and microsatellite marker analysis for discriminating intraclonal variants of the potato cultivar Russet Norkotah. In: *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 2005, vol.130, no.4, p.624-630. ISSN 0003-1062
11. HAI-YAN, H., WEI, S., YAN-FU, Z. Genetic diversity analysis of soybean germplasm in Heilongjiang province by ISSR markers. In: *Soybean Science*, 2011, vol.30, no.1, p.37-40. ISSN 1000-9841
12. MUDIBU, J., NKONGOLO, K.K.C., MEHES-SMITH, M. et al. Genetic analysis of a soybean genetic pool using ISSR marker: effect of gamma radiation on genetic variability. In: *International Journal of Plant Breeding and Genetics*, 2011, vol.5, no.3, p.235-245. ISSN 1819-3595
13. NAGATA, T., LÖRZ, H., WIDHOLM, J.M. *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 55: Molecular Marker Systems in Plant Breeding and Crop Improvement*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005. 478 p. ISBN 978-3-540-74006-3
14. PHARMAWATI, M., GUIJUN, Y., PATRICK, M.F. Molecular variation and fingerprinting of *Leucadendron* cultivars (*Proteaceae*) by ISSR markers. In: *Ann. Bot. (Lond.)*, 2005, vol.95, no.7, p.1163-1170. ISSN 0305-7364
15. POWELL, W., MORGANTE, M., DOYLE, J.J. et al. Genepool variation in genus *Glycine* subgenus soja revealed by polymorphic nuclear and chloroplast microsatellites. In: *Genetics*, 1996, vol.144, no.2, p.793-803. ISSN 0016-6731
16. QIAN, W., GE, S., HONG, D.-Y. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. In: *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, vol.102, no.2-3, p.440-449. ISSN 0040-5752
17. REDDY, M.P., SARLA, N., SIDDIQ, E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. In: *Euphytica*, 2002, vol.128, no.1, p.9-17. ISSN 0014-2336
18. RIBAUT, J.-M., RAGOT, M. Marker-assisted selection to improve drought adaptation in maize: the backcross approach, perspectives, limitations, and alternatives. In: *Journal of Experimental Botany*, 2007, vol.58, no.2, p.351-360. ISSN 0022-0957
19. SAMBROOK, J.F., RUSSELL D.W. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 2344 p. ISBN 0879695773, 9780879695774
20. SEEHALAK, W., TOMOOKA, N., WARANYUWAT, A. et al. Genetic diversity of the *Vigna* germplasm from Thailand and neighbouring regions revealed by AFLP analysis. In: *Genetic Res. and Crop Evol.*, 2006, vol.53, no.5, p.1043-1059. ISSN 0925-9864
21. SEMAGN, K., BJORNSTAD, A., NDJONDJOP, M.N. An overview of molecular marker methods for plants. In: *African Journal of Biotechnology*, 2006, vol.5, no.25, p.2540-2568. ISSN 1684-5315
22. VALLEJOS, C.E., SAKIYAMA, N.S., CHASE, C.D. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. In: *Genetics*, 1992, vol.131, no.3, p.733-740. ISSN 0016-6731
23. VOLLMANN, J., FRITZ, C.N., WAGENTRIST, H. et al. Environmental and genetic variation of soybean seed protein content under Central European growing conditions. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, vol.80, no.9, p.1300-1306. ISSN 0022-5142
24. XIE, J.H., MA, W.H., LIU, C.M. Analysis of genetic relationships among mango germplasm using ISSR marker. In: *Acta Hort*, 2007, no.763, p.185-190. ISSN 0567-7572
25. XU, D.H., ABE, J., GAI, J.Y. et al. Diversity of chloroplast DNA SSRs in wild and cultivated soybeans: evidence for multiple origins of cultivated soybean. In: *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, vol.105, no.5, p.645-653. ISSN 0040-5752
26. XU, D.H., GAI, J.Y. Genetic diversity of wild and cultivated soybeans growing in China revealed by RAPD analysis. In: *Plant Breeding*, 2003, vol.122, no.6, p.503-506. ISSN 1439-0523
27. YAN, J., WEN-JU, Z., DA-XU, F. et al. Sampling strategy within a wild soybean population based on its genetic variation detected by ISSR markers. In: *Acta Botanica Sinica*, 2003, vol.45, no.8, p.995-1002. ISSN 0577-7496
28. ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI A., LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. In: *Genomics*, 1994, vol.20, no.2, p.176-183. ISSN 0888-7543
29. АБУГАЛИЕВА, С.И. Генетическое разнообразие сои (*Glycine max* (L.) Merrill). В: *Биотехнология. Теория и практика*, 2013, №4, с.13-19. ISSN 1028-9399
30. АБУГАЛИЕВА, С.И., ВОЛКОВА, Л.А., ЖИДОВИНОВА, А.В. и др. Генотипирование сортов сои Казахстана с использованием ISSR-маркеров. В: *Вестник КазНУ. Серия биологическая*, 2010 №3, с.8-11. ISSN 1563-0218
31. ГЛАЗКО, В.И., ДУБИН, А.В., КАЛЕНДАРЬ, Р.Н. и др. Генетические взаимоотношения между сортами сои, оцененные с использованием ISSR маркеров. В: *Цитология и генетика*. 1999, т.33, №5, с.47-51. ISSN 0564-3783
32. КОЗЫРЕНКО, М.М., ФИСЕНКО, П.П., АРТЮКОВА, Е.В. Анализ генетического разнообразия сортов и соматоклональных линий культурной сои (*Glycine max* (L.) Merr.) методом маркирования межмикросателлитных последовательностей (ISSR). В: *Биотехнология*, 2007, №1, с.3-13.
33. ОМАШЕВА, М.Е., АУБАКИРОВА, К.П., РЯБУШКИНА, Н.А. Молекулярные маркеры. Причины и последствия ошибок генотипирования. В: *Биотехнология. Теория и практика*, 2013, №4. ISSN 1028-9399

34. ПЕТИБСКАЯ, В.С. *Соя: химический состав и использование*. Майкоп: ОАО Полиграф-Юг, 2012. 432 с. ISBN 978-5-7992-0733-5
35. РАЙЫМБЕКОВА, И.Қ. *Экологические особенности агрофитоценоза сои при ресурсосберегающей технологии выращивания на юго-востоке Казахстана / Диссертация на соискание учёной степени доктора философии. Специальность – Экология*. Алматы, 2012.
36. СИВОЛАП, Ю.М., СОЛОДЕНКО, А.Е., БУРЛОВ, В.В. RAPD-анализ молекулярно-генетического полиморфизма подсолнечника (*Helianthus annuus*). В: *Генетика*, 1998, т.34, №2, с.266-271. ISSN 0016-6758

Prezentat la 6.11.2014