



УДК 633.853.52:575:577.29
DOI 10.25230/conf12-2023-81-86

ТЕСТИРОВАНИЕ SSR-МАРКЕРОВ ГЕНА ФОТОПЕРИОДИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ НА СОРТАХ СОИ

Иванов С.В., Рамазанова С.А.
ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК
sergey.ivanov23042000@gmail.com

Расширение ареала возделывания сои на север является путем к решению продовольственной безопасности России. Для выполнения этой задачи необходимо создавать высокопродуктивные и вместе с тем сорта с пониженной реакцией на длину дня, чтобы получать качественный урожай в оптимальные сроки. В ходе исследования была выделена ДНК исследуемых сортов по методике набора для экстракции ДНК, проведены подбор оптимальных условий для ПЦР-анализа и тестирование двух SSR-маркеров гена *E7* на 13 сортах сои, детекция продуктов амплификации велась в полиакриламидном геле. В результате испытаний маркер Satt100 проявил себя полиморфным по исследуемым сортам, а по маркеру Satt319 достоверного полиморфизма не выявлено.

Ключевые слова: соя, фотопериодическая чувствительность, *E7*, ДНК-маркеры.

Введение. Соя – вторая по важности после подсолнечника масличная культура в Российской Федерации. Это ценнейший источник растительного белка и масла, витаминов, вторичных метаболитов и др. веществ. Основные направления использования сои в России – это масложировая промышленность и производство белковых кормов [1, 2]. Площади ее возделывания, по данным государственной статистики, увеличиваются на 5–6 % ежегодно, за 2022 год было выделено 3,468 млн. га пашни под выращивание сои [3]. В связи с этим идет тенденция к расширению зоны возделывания сои на север страны. Однако, соя растение короткого дня, для ее развития требуется определенное соотношение дня и ночи, а также она является фотопериодически высокочувствительной культурой. При удлинении светового дня затормаживается наступление фаз цветения и созревания и увеличивается их длительность, что отрицательно влияет на сроки уборки и приводит к потерям урожая и снижению качества продукции [4, 5].

Генетический контроль чувствительности к фотопериоду у сои обеспечивается генами *E* и включает более 10 известных локусов. Они способствуют тонкой адаптации генотипа к определенной широте и климату. На сегодняшний день картировано 12 генов, отвечающих за чувствительность к фотопериоду *E1–E11* и *J*. Доминантные аллели локусов *E1–E5*, *E7*, *E8* и *E10* задерживают время цветения, в то время как *E6*, *E9*, *E11* и *J* способствуют раннему цветению [6, 7].

Из всех известных генов чувствительности к фотопериоду, по мнению селекционеров, наиболее перспективным является ген *E7*. Данный локус связан с реакцией на качество света и может быть связан с фитохромом – фоторецептором, влияющим на наступление фазы цветения у сои [6]. Доминантный аллель данного гена *E7E7* приводит к более позднему цветению и зрелости, в то время как рецессивный аллель *e7e7* способствуют меньшей чувствительности к фотопериоду [7].

Для идентификации данного гена и его аллельного состояния у сортов сои были разработаны молекулярно-генетические маркеры на основе микросателлитных локусов ДНК [7].



В связи с этим, целью нашего исследования является подбор оптимальных условий для постановки полимеразной цепной реакции и тестирование ДНК-маркеров на коллекции сортов сои с целью выявления рецессивного аллеля *e7*.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования были выбраны 12 сортов сои северного экотипа отечественной и зарубежной селекции, и один сорт южного экотипа (табл. 1). Сорт Ясельда в своем генотипе по данным многих авторов [7] имеет два рецессивных аллеля *e7* и в нашем исследовании выступает контролем.

Таблица 1. Изучаемые сорта сои отечественной селекции

№ п/п	Наименование сорта	Оригинатор – патентообладатель
1	Ясельда	ООО "Соя-Север Ко" (Республика Беларусь)
2	Соер 3	Ершовская опытная станция орошаемого земледелия НИИСХ Юго-Востока
3	Окская	Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ
4	Касатка	
5	Светлая	
6	Георгия	
7	Магева	
8	Малета	
9	Брянская	Брянский ГАУ
10	Свапа	ФГБНУ ВНИИЗБК
11	Ланцетная	
12	Зуша	
13	Ирбис	ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК

Для выделения геномной ДНК использовали методику экстракции специальным набором реактивов «Diamond DNA», основанную на разрушении клеточной стенки лизис-буфером и очистки лизата от органических примесей и ингибирующих ПЦР веществ сорбентом и соевым буфером. Выделение ДНК проводилось из зародыша семени сои. Концентрацию и чистоту выделенной ДНК измеряли на спектрофотометре Nano-300.

Для ПЦР анализа использовали 2 праймера, разработанных для маркирования гена фотопериодической чувствительности (*E7*) (табл. 2) [8]. Определение температуры отжига, локализацию и длину продуктов амплификации исследуемых праймеров проводилось с использованием вебверсии программы Primer-BLAST в референсном геноме *Glycine max* (L.) Merr., секвенированном объединенным институтом генома министерства энергетики США в 2021 г.

Таблица 2. Характеристика подобранных праймеров

Наименование праймера	Ген	Хромосома	Нуклеотидный состав
Satt100	<i>E7</i>	6	F ACCTCATTTTGGCATAAA
			R TTGGAAAACAAGTAATAATAACA
Satt319	<i>E7</i>	6	F CAACTCAGTAGGGGTCAATAACAA
			R TGAAATAGGGAAAATAAGGGAACA

Для проведения амплификации применяли реакционную смесь следующего состава 67 мМ трис-НСl, рН8,8; 16,6 мМ сульфата аммония; 3 мМ MgCl₂; 0,01 % Tween 20; по 0,2 мМ каждого из дезоксирибонуклеозидфосфатов; 10 пМ праймера; 10 нг матричной ДНК и 1 ед. рекомбинантной термостабильной ДНК полимеразы (Сибэнзим, Москва). ПЦР проводили в термоциклере MiniAmp (Thermo Fisher Scientific, США) при следующих температурных режимах: начальная денатурация при 95 °С в течении 5 мин., далее 35 циклов с последовательной сменой температур: денатурация при 95 °С, в течении 25 сек., отжиг



праймера при 50 °С – 25 сек., элонгация при 72 °С – 35 сек., и заключительная элонгация при 72 °С в течении 10 мин [9].

Электрофорез продуктов амплификации проводили в 8 %-ном полиакриламидном геле в нативных условиях, в камере для вертикального электрофореза VE-20 (Хеликон, Россия). Гели окрашивали бромистым этидием. Для визуализации и документирования результатов электрофореза применяли систему цифровой документации видеоизображения GenoSens 2200 Touch (Clinx Science Instrument Co, Китай).

Результаты и обсуждения. Для получения качественного результата исследования на первом этапе работы необходимо провести оценку чистоты и концентрацию ДНК в полученных препаратах для реакции амплификации. Провели измерения оптической плотности раствора при длинах волн 260, 280 и 230 нм, т.е. на максимумах поглощения для ДНК, белков и полисахаридов, соответственно. Значение соотношения A260/280 для чистой ДНК должно быть приблизительно равно 1.8. В случае меньших значений показателя 260нм/280нм препарат содержит большое количество примесей белка, фенола или иных веществ, имеющих значительное поглощение при 280 нм. Другим показателем чистоты препарата ДНК является отношение значений соотношения 260нм/230нм. В случае чистого препарата это соотношение обычно равно 1.8–2.2. Меньшие значения коэффициента 260нм/230нм свидетельствуют о загрязнении препарата компонентами, которые остаются после процедуры выделения ДНК. Из представленных в таблице 3 данных видно, что такие загрязнения присутствуют в большинстве полученных препаратов ДНК. Однако проведенные реакции с использованием этих препаратов ДНК показали, что они оказывают незначительное влияние на качество амплификации.

Таблица 3. Концентрация и чистота образцов экстрагированной ДНК

Наименование сорта	Концентрация	A260/280	A260/230
Соер 3	221,5	2,13	1,80
Ясельда	158,7	2,13	1,68
Окская	180,8	2,14	1,76
Касатка	246,6	2,14	1,75
Светлая	75,0	2,07	1,30
Свапа	257,3	2,16	1,87
Геorgia	167,8	2,13	1,65
Брянская	252,7	2,15	1,86
Магева	100,8	2,14	1,39
Ланцетная	119,3	2,12	1,50
Малета	111,3	2,10	1,47
Зуша	183,5	2,13	1,75
Ирбис	167,8	2,13	1,65

Следующим этапом работы был подбор оптимальных значений температуры гибридизации (отжига) праймеров с матрицей. Теоретическую температуру отжига брали из базы данных, которая определяется в зависимости от структуры праймера. Однако, практически всегда требуется экспериментальный подбор. В таблице 4 показано сравнение теоретических и экспериментальных температур отжига для выбранных праймеров. Известно, что чем выше температура отжига, тем меньше вероятность неспецифичного связывания праймера с матричной ДНК, т. е. снижение температуры отжига ведет к гибридизации праймера с не полностью комплементарной ему последовательностью нуклеотидов. При этом могут появляться дополнительные, невоспроизводимые фракции ДНК. А слишком высокая температура приводит к тому, что гибридизация праймера с матрицей вообще может не произойти.



Таблица 4. Подбор оптимальных температур отжига для праймеров

Праймер	Теоретическая температура отжига	Экспериментальная температура отжига
Satt100	53	50*
		55
		60
Satt319	58	55
		58
		60*

Примечание. * – оптимальная температура отжига для получения фракций ДНК с четкой визуализацией.

После подбора оптимальных условий ПЦР-анализа проведено тестирование микросателлитных маркеров на сортах сои. Были получены электрофоретические спектры для каждого сорта по двум изучаемым микросателлитным маркерам. На рисунке 1 приведена электрофореграмма, полученная по SSR-маркеру Satt100. На фореграмме показано, что в результате ПЦР у изученных сортов сои было выявлено четыре фрагмента разного размера, обозначенные буквами А, В, С и D. Из литературных источников известно, что по данному локусу было амплифицировано всего пять фрагментов. Их обозначали буквами латинского алфавита. Фрагмент А имеет размер 168 п.н., соответствует доминантному аллелю *E7*. Фрагменты D и В длиной приблизительно 133 п.н. и 149 п.н. соответственно, и маркируют рецессивный аллель *e7* [7]. Результаты нашего исследования показали, что сорта Ясельда (D) и Ланцетная (B) имеют рецессивный аллель *e7*. Эти данные подтверждают результаты других авторов [6, 7]. А сорта Соер 3, Окская, Касатка, Свапа, Георгия, Брянская, Магева и Ирбис – доминантный аллель *E7*. Пока в литературе нет информации о том какой аллель маркируется фрагментом С.

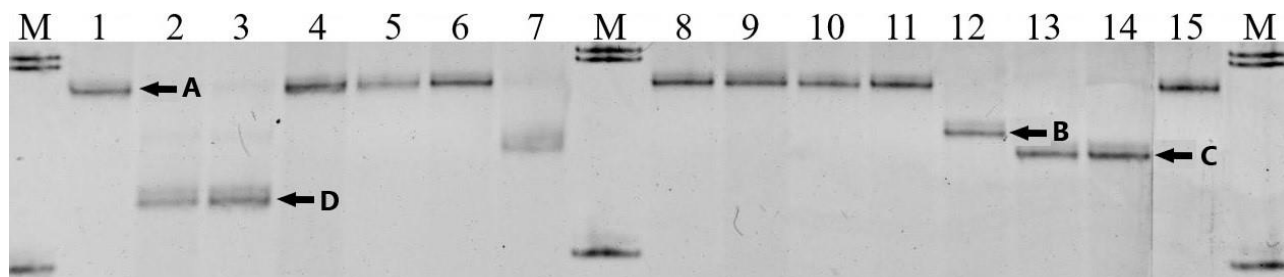


Рисунок 1 – Электрофоретические спектры продуктов амплификации сортов сои по маркеру Satt100. Дорожки: 1 – Соер 3; 2, 3 – Ясельда; 4, 5 – Окская; 6 – Касатка; 7 – Светлая; 8 – Свапа; 9 – Георгия; 10 – Брянская; 11 – Магева; 12 – Ланцетная; 13 – Малета; 14 – Зуша; 15 – Ирбис, М – маркер молекулярного веса.

Для более точной идентификации аллельного состояния гена *E7* применяют несколько микросателлитных маркеров. В результате полимеразной цепной реакции с маркером Satt319 (рис. 2) было обнаружено две фракции А и В, но практически все сорта имели такой же фрагмент, что и у сорта Ясельда. Выделились только два сорта – Светлая и Ланцетная, имеющие фрагмент В.

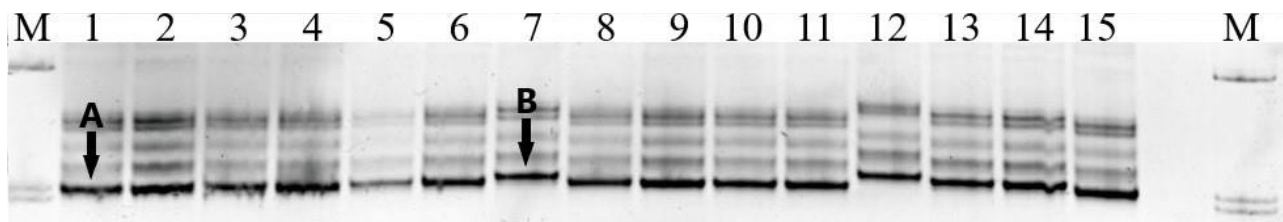


Рисунок 2 – Электрофоретические спектры продуктов амплификации сортов сои по маркеру Satt319. Дорожки: 1 – Соер 3, 2, 3 – Ясельда, 4, 5 – Окская, 6 – Касатка, 7 – Светлая, 8 – Свапа, 9 – Георгия, 10 – Брянская, 11 – Магева, 12 – Ланцетная, 13 – Малета, 14 – Зуша, 15 – Ирбис, М – маркер молекулярного веса.

Полученные результаты показали, что для оценки диагностической ценности молекулярных маркеров Satt100 и Satt319 необходимо их дальнейшее изучение на коллекции сортов разных групп спелости.

Заключение. Маркер Satt100 показал себя полиморфным в изучаемой коллекции сортов сои, а маркер Satt319 отличился слабым полиморфизмом. По результатам идентификации аллельного состояния гена *E7*, можно сделать вывод, что необходимо расширить коллекцию отечественных сортов и пул маркеров для идентификации рецессивного аллеля *e7*.

Литература

1. Соя в России / В. А. Федотов, С. В. Гончаров, О. В. Столяров [и др.]; под редакцией В.А. Федотова, С.В. Гончарова. М.: Агролига России, 2013. 431 с.
2. Зайцев Н.И., Бочкарев Н.И., Зеленцов С.В. Перспективы и направления селекции сои в России в условиях реализации национальной стратегии импортозамещения // Масличные культуры. НТБ ВНИИМК. 2016. № 2 (166). С. 3–11.
3. Рынок сои в 2022 году: тенденции и прогнозы [Электронный ресурс]: Экспертно-аналитический центр агробизнеса. – Режим доступа: <https://ab-centre.ru/news/rynok-soi-v-2022-godu-tendencii-i-prognozy>
4. Zhang SR., Wang H., Wang Z., Ren Y., Niu L., Liu J., Liu B. Photoperiodism dynamics during the domestication and improvement of soybean // Science China Life Sciences. 2017. Vol. 60. P. 1416–1427.
5. Lin X., Liu B., Weller L., Abe J., Kong F. Molecular mechanisms for the photoperiodic regulation of flowering in soybean // Journal of Integrative Plant Biology. 2020. Vol. 63. Issue 6. P. 981–994.
6. Zharikova D. O. Polymorphisms in SSR-loci associated with E genes in soybean mutant lines offer perspective for breeding // Agricultural Science and Practice. 2019. Т. 6. № 3. С. 45–55.
7. Rosenzweig V.E., Aksyonova E.A., Milash S.B., Goloenko D.V., Davydenko O.G. Prospects of exploiting of photoperiod sensitivity gene *E7* in early soybean breeding and revealing of its sources with SSR-markers // Soybean Genetics Newsletter. 2008. Vol. 35.
8. Molnar S.J., Rai S., Charette M., Cober E.R. Simple sequence repeat (SSR) markers linked to *E1*, *E3*, *E4*, and *E7* maturity genes in soybean // Genome. 2003. Vol. 46. № 6. P. 1024–1036.
9. Ержебаева Р.С., Бабисекова Д.И., Дидоренко С.В. Использование ДНК-маркеров в селекции сои для отбора фотопериодически нейтральных линий // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2022. Т. 52. № 5. С. 136–146.



TESTING OF SSR-MARKERS OF PHOTOPERIODIC SUSCEPTIBILITY GENE IN SOYBEAN VARIETIES

Ivanov S.V., Ramazanova S.A.

V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops

Expansion of soybean cultivation to the North is the way to ensure food security in Russia. To meet this challenge, it is necessary to develop high-yielding varieties with a reduced response to the length of the day to obtain a quality yield at the optimal time. During the study, we identified the DNA of the studied varieties using DNA extraction kit methodology, selected optimal conditions for PCR analysis and tested two SSR-markers of the *E7* gene on 13 soybean varieties, conducted the detection of amplification products in polyacrylamide gel. As a result of the tests, the Satt100 marker appeared to be polymorphic in the studied varieties, while no reliable polymorphism was detected for the Satt319 marker.

Key words: soybean, photoperiod susceptibility, *E7*, DNA markers.