

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ SSR-МАРКЕРОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ СОИ К ЦЕРКОСПОРОЗУ

Тарасова Ольга Николаевна, младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии, ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский институт сои», E-mail: ton@vniisoi.ru

Аннотация: В рамках отработки методики проведения идентификации аллелей микросателлитных маркеров *Satt244* и *Satt547*, связанных с устойчивостью к церкоспорозу в двух отобранных для исследования сортах сои селекции ФГБНУ ФНЦ ВНИИ сои был выявлен аллель *Satt244-154*, характеризующие устойчивость к *C. sojina*.

Ключевые слова: соя, церкоспороз, SSR-маркеры, молекулярно-генетический анализ.

Введение. Соя (*Glycines max (L.) Merr*) – культура чувствительная к болезням и инфекциям, которые поражают растение на всех стадиях роста. Несмотря на то, что усилия селекционеров в последние годы направлены на выведении сортов с высокой продуктивностью, устойчивостью к болезням и другими высокими функциональными качествами, ежегодно с ростом площадей посевов происходит увеличение степени поражения сои, что существенно влияет в конечном итоге на урожайность и качество сои. В течение всего вегетационного периода на сою оказывают влияние листовые болезни, среди которых на Дальнем Востоке широкое распространение имеет грибковое заболевания сои церкоспороз [1].

Церкоспороз или серая пятнистость (возбудители – *Cercospora sojina*, *Cercospora cruenta* и др.) распространена повсеместно, где выращивается соя. Возбудителями являются грибы семейства *Mycosphaerellaceae* в несовершенной стадии. Симптомы поражения в основном проявляются на листовой поверхности, но в то же время, болезнь также поражает семена, в виде неправильно-округлых, коричнево-серебристых пятен с бурой каймой. При сильном развитии данной болезни урожай сои снижается в 2-3 раза, кроме того, уменьшается качество зерна, свидетельством которой является низкое содержание белка и масла [2].

Наиболее эффективным способом защиты растений является использование устойчивых к болезням сортов. Применение молекулярно-генетических маркеров позволяет идентифицировать эффективные гены устойчивости в сортах и

гибридах, что ускоряет отбор целевых генотипов и повышает эффективность селекционного процесса [3].

К настоящему времени выявлено большое количество генов, контролирующих устойчивость к различным болезням и вредителям у сои. Для выявления фрагментов этих генов используют генетические маркеры, в частности, в рамках нашей работы использовались микросателлитные маркеры (SSR-маркеры), которые считаются надежным инструментом для выявления генов, контролирующих устойчивость к грибковым болезням сои. Наличие определенных аллелей SSR-маркера *Satt244* и *Satt547* в сое характеризует ее устойчивость к церкоспорозу [4, 5].

Ранее никем не проводилась молекулярно-генетическая оценка сортов амурской сои на наличие локусов, связанных с резистентностью к *C. sojina*.

Целью данной работы была отработка методики проведения идентификации аллелей микросателлитных маркеров *Satt244* и *Satt547*, связанных с устойчивостью к церкоспорозу в нескольких сортах сои селекции ФГБНУ ФНЦ ВНИИ сои.

Материалы и методы. Исследования проводили в лаборатории биотехнологии ФГБНУ ФНЦ ВНИИ сои. В качестве материала для исследований использовали 3 сорта сои амурской селекции Лидия, Даурия, Сентябринка (урожая 2020 года). Семенной материал данной коллекции получен от лаборатории селекции и генетики сои ФГБНУ ФНЦ ВНИИ сои (с. Садовое, Амурской области). Семена сои проращивали согласно ГОСТ 12044-93 в рулонах фильтровальной бумаги. Общий объем выборки в эксперименте – 100 семян. Проростки сои использовали для дальнейшего выделения ДНК.

Выделение и очистку ДНК проводили с применением готового набора для выделения геномной ДНК «ДНК-ЭКСТРАН-3. Набор реагентов для выделения геномной ДНК из растений» (ООО Синтол), согласно прилагаемой инструкции производителя. Концентрацию ДНК определяли на флуориметре MAXLIFE согласно инструкции по применению к набору Test dsDNA-100 (ООО «МВМ-Диагностик»). По результатам данного этапа, перед проведением амплификации, концентрация выделенной ДНК была разбавлена до 100 нг/мкл.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием 2 пар SSR-праймеров на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad laboratories Inc., США), с соответствующей оптимизацией условий ПЦР для конкретных пар праймеров (таблица).

Таблица. Информация по микросателлитным маркерам, связанным с устойчивостью к церкоспорозу

№ п.п.	Маркер	Хромосома	Группа сцепления	Температура отжига, °С	Количество циклов
1	<i>Satt565</i>	4	C1	62	35
2	<i>Satt244</i>	16	J	59	40

Для амплификации готовили реакционную смесь объемом 25 мкл, которая включала в себя: 12,5 мкл готовой реакционной смеси БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×) (ООО «Биолабмикс»), содержащей 100 мМ Трис-НСl, рН 8,5 (при 25 °С), 100 мМ КСl, 0,4 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 4 мМ MgCl₂, 0,06 ед. акт./мкл Таq ДНК-полимеразы, 0,2% Tween 20, стабилизаторы HS-Taq ДНК-полимеразы и красители; 1 мкл образца выделенной ДНК; по 1 мкл прямого и обратного праймеров; 9,5 мкл стерильной воды. ПЦР проводили в 2-х кратной повторности, с установкой режима шагов согласно инструкции к набору БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×). Продукты реакции разделяли методом электрофореза в 2 %-ом агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, в 0,5×ТВЕ буфере. Визуализация осуществляли облучением геля ультрафиолетом с использованием гель-документирующей системы GelDoc EZ (Bio-Rad laboratories Inc., США).

Результаты и их обсуждение. Для отработки методики были отобраны несколько сортов сои селекции ФГБНУ ФНЦ ВНИИ сои. Выбор сделан на основании того, что наиболее популярные и востребованные сорта Лидия и Даурия занимают 25,5 и 25,2% соответственно от всей площади посевов сои в Амурской области, а сорт сои нового поколения Сентябринка является наиболее перспективным, обладает улучшенными хозяйственно ценными признаками и превышает по урожайности стандарт сорт Лидия.

В результате микросателлитного анализа с помощью маркера *Satt244*, ассоциированного с устойчивостью к церкоспорозу, у сортов Сентябринка и Лидия был обнаружен аллель *Satt244-154* (рисунок 1А), что совпадает с их иммунологической характеристикой как устойчивых сортов к данному заболеванию. Кроме того, в данных образцах обнаружили аллель *Satt244-148*, связанный с восприимчивостью к церкоспорозу.

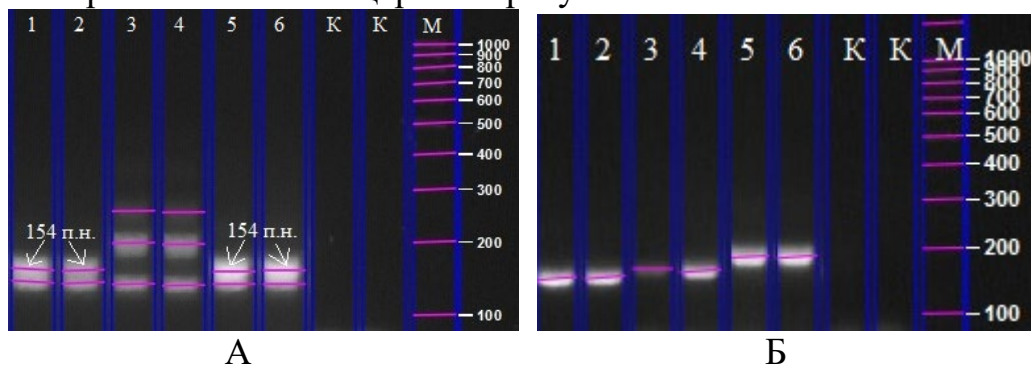


Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК сортов сои по локусу *Satt244*.

Дорожки 1-6 фрагменты ДНК сортов (1-2 –Сентябринка, 3-4 – Даурия, 5-6 – Лидия), К – контрольный образец, М – маркер молекулярных весов (DNA Ladder, 100+ bp)

У сорта Даурия также присутствовал аллель восприимчивости к церкоспорозу, но не был обнаружен аллель *Satt244-154*, связанный с

устойчивостью. Информация об устойчивости данного сорта к церкоспорозу в литературных источниках отсутствует. В то же время, по маркеру *Satt565*, отмеченному Ding et al. [5], как тесно сцепленному с геном, контролирующим устойчивость к церкоспорозу, не был идентифицирован аллель устойчивости *Satt565-208* во всех исследуемых образцах сои (рисунок 1Б).

Заключение. Таким образом, в рамках отработки методики проведения идентификации аллелей микросателлитных маркеров *Satt244* и *Satt547*, связанных с устойчивостью к церкоспорозу в двух отобранных для исследования сортах сои селекции ФГБНУ ФНЦ ВНИИ сои был выявлен аллель *Satt244-154*, характеризующие устойчивость к *C. sojina*. Полученные результаты будут использованы в дальнейшей работе по генетической паспортизации сортов селекции института для расширения информации молекулярного-генетических паспортов сортов о наличии фрагментов специфических генов, связанных с устойчивостью к грибковым болезням сои, необходимой для эффективного проведения селекционных программ.

Библиографический список

1. Брынцев С.И., Уварова А.Г., Ярыгина И.В. Проблемы выращивания сои и возможные пути решения // Молодежная наука – гарант инновационного развития АПК: материалы X Всероссийской (национальной) научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, г. Курск, 19–21 декабря 2018 г. Курск : Изд-во КГСХА, 2019 – С. 45–50
2. Zhang G., Bradley C.A. Survival of *Cercospora sojina* on soybean leaf debris in Illinois // Plant Health Research. – 2014. – Vol.15, №.3. – P.92-96.
3. Кохметова, А. М. Идентификация источников устойчивости к стеблевой ржавчине пшеницы с использованием молекулярных маркеров / А. М. Кохметова, М. Н. Атишова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – Т. 16. – № 1. – С. 132-141.
4. A study of the genetic diversity in the world soybean collection using microsatellite markers associated with fungal disease resistance / A. K. Zatybekov, Y. T. Turuspekov, B. N. Doszhanova, et al. // Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. – 2020. – Vol. 181. – No 3. – P. 81-90. – DOI 10.30901/2227-8834-2020-3-81-90.
5. Establishment of Molecular ID of Soybean Varieties (Lines) Using SSR Markers Linked to Resistance Genes against *Cercospora sojina* / Ding J.J., Jiang C.L., Gu X., et al. // ACTA AGRONOMICA SINICA. – 2012. – Vol.38, №.12. – P.2206-2216.

Use of SSR- markers for detection of stability of soy to cercosporosis

***Tarasova Olga Nikolaevna, Junior Researcher, Biotechnology Laboratory
Federal State Budget Scientific Institution Federal Research Center "All-Russian
Scientific Research Institute of Soybean"
675027, Blagoveshchensk, Ignatevsky highway, 19***

Abstract: *As part of the development of the methodology for identifying alleles of microsatellite markers Satt244 and Satt547 associated with resistance to cercosporosis in two selected soybean varieties of the selection of the FSBSI FRC ARSRIS, an allele of Satt244-154 characterizing resistance to C. sojina was identified.*

Key words: *soybeans, cercosporosis, SSR markers, molecular genetic analysis.*