

СЕКЦИЯ 1. ГЕНЕТИКА И ЦИТОГЕНЕТИКА

УДК 578:631.527:635.655

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ СОИ ПО ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ SSR-МАРКЕРОВ

Айгуль Айдаровна Амангелдиева, Раушан Сайлаувна Ержебаева

ТОО «Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства»,
Алматинская область, Республика Казахстан

Аннотация. В статье представлены результаты разработки ДНК-маркеров, связанных с признаком засухоустойчивости сои. На основании сопоставления результатов генотипирования 80 образцов коллекции сои с использованием 40 SSR-маркеров, фенотипирования по признаку засухоустойчивости и биоинформатического анализа сцепления выделенного маркера *Satt157* подобран ген-кандидат GmTEM1 Glyma.02g0999500. По данному гену обнаружен полиморфизм по числу SSR повторов в промоторной зоне у контрастных по засухоустойчивости форм сои. Разработан ДНК - маркер GmTEM1, охватывающий полиморфный район гена для генотипирования образцов сои по засухоустойчивости. Предлагаемый метод генотипирования растений сои с использованием SSR-маркера GmTEM1 будет дополнительно апробирован на большем количестве сортов сои.

Ключевые слова: коллекция, соя, засухоустойчивость, продуктивность, SSR-маркер, полиморфизм.

GENOTYPING OF SOYBEAN COLLECTION ON DROUGHT RESISTANCE USING SSR MARKERS

Aigul Aidarovna Amangeldiyeva, Raushan Sailauvna Yerzhebayeva

LLP «Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant growing» Almaty region, Republic of
Kazakhstan

Abstract. The article presents the results of the development of DNA markers associated with the sign of drought resistance of soybeans. Based on the comparison of the results of genotyping of 80 samples of the soybean collection using 40 SSR markers, phenotyping based on drought resistance and bioinformatic coupling analysis of the isolated marker *Satt157*, the candidate gene GmTEM1 Glyma.02g0999500 was selected. Polymorphism in the number of SSR repeats in the promoter zone was found for this gene in forms of soybeans contrasting in drought resistance. The GmTEM1 DNA marker covering the polymorphic region of the gene for genotyping soybean samples for drought resistance has been developed. The proposed method of genotyping soybean plants using the GmTEM1 SSR marker will be additionally tested on a larger number of soybean varieties.

Keywords: collection, soybean, drought resistance, productivity, SSR marker, polymorphism.

Введение. В Казахстане соя (*Glycine max* (L.) Merrill) является одной из важных бобовых и масличных культур. Сою возделывают в основном на орошаемых полях Алматинской (24,3 тыс. га) и Жетысуской (74,5 тыс. га) областях. Основным фактором, снижающим урожайность и рентабельность данной культуры, является дефицит воды для орошения, частые засухи [1,2]. В Казахстане наблюдается учащение аномальных явлений погоды, сокращение орошаемых земель, дефицит орошаемой воды, в связи с этим требуются ориентация селекции сои на высокую адаптивность к абиотическим стрессам, прежде всего к засухе. Основным адаптивным параметрам вновь создаваемых сортов сои должна быть

достаточная продуктивность в условиях дефицита влаги, обеспечивающая хорошую рентабельность и конкурентоспособность. Селекция сои на устойчивость к дефициту влаги в настоящее время ограничена отбором по фенотипическим признакам [3]. Для стабильного увеличения производства сои, являющейся важной культурой для продовольственной безопасности как в мире, так и в РК, требуется внедрение современных знаний и технологий в практическую селекцию и повышение ее эффективности. В связи с этим начаты работы по генотипированию и фенотипированию сои по признаку засухоустойчивости.

Цель исследований – Разработка SSR-маркеров для маркерной селекции на основе генотипирования и фенотипирования сои в условиях орошения и без орошения.

Материал и методы исследований. Материалом исследований служила коллекция из 98 сортообразцов сои 6 групп спелости. Образцы представлены мировым разнообразием (Япония, Латвия, Китай, Канада, Венгрия, Франция, Грузия, Бразилия, Швеция, Молдова, Румыния, Таджикистан, Польша, Куба).

Экстракция геномной ДНК была проведена СТАБ (цетилтриметил аммония бромид) методом [4]. В работе были использованы 40 SSR – маркеров, сцепленных с QTL, потенциально связанных с засухоустойчивостью [5, 6, 7].

ПЦР-анализ проводили в амплификаторе «Eppendorf Mastercycler» (Германия). Детектирование продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 8%-ом полиакриламидном геле. Продукты амплификации окрашивали бромистым этидием. Документирование полученных электрофореграмм проводили с помощью геледокументирующей системы Quantum ST4.

При проведении генотипирования визуализированные фрагменты - аллели были обозначены маленькими буквами латинского алфавита: 'a', 'b', 'c', 'd' 'e' 'f' согласно длине амплифицированного фрагмента от меньшей длины к большей.

Коллекционные сортообразцы сои изучались на полевых стационарах Казахского НИИ земледелия и растениеводства (КазНИИЗиР) в период 2018-2020 гг. Полевой научный стационар расположен в Алматинской области, на высоте 740 метров над уровнем моря, 43°15' с.ш., 76°54' в.д. Испытания проведены на опытном участке с поливом и на не поливном участке (засушник). Вегетационные поливы на орошаемых участках были проведены трижды за сезон. Делянки при изучении коллекции размером 1 погонный метр, по 25 семян. Посев рандомизированный в трехкратной повторности. В течение вегетации были проведены фенологические наблюдения за ростом и развитием растений сои согласно методики описанной Fehr W.R., Cavines, С.Е., 1979 [8]. Оценка элементов продуктивности проведена согласно методической рекомендации Вишняковой М.А., 2018 [9].

Индекс засухоустойчивости STI (Stress tolerance index) $STI = (Y_p \times Y_s) / \bar{Y}_p^2$ [10], где Y_p – урожайность генотипа при орошении; Y_s – урожайность при стрессе засухи; \bar{Y}_p – среднее значение урожайности при орошении всех испытываемых образцов

Результаты исследований. С использованием 40 SSR – маркеров, сцепленных с QTL засухоустойчивости сои и связанные в основном с признаком урожайности семян (бобов) в условиях засухи проведено генотипирование 80 образцов коллекции сои. В результате микросателлитного анализа образцов сои были получены электрофоретические профили для каждого сорта по всем 40 SSR-маркерам. Для всех изученных 40 маркеров было всего идентифицировано 98 аллелей, что в среднем составило 2-3 аллеля на маркер. Количество аллелей варьировало от 1 до 6. Были выявлены наиболее полиморфные маркеры по сортам сои – Satt157, Satt171, Satt044, Satt608. Их PIC составил 0.74, 0.41, 0.55, 0.67 соответственно.

Установлено, что 5 маркеров Satt128, Satt227, Satt347, Satt312, Satt 648 были мономорфными по всем изучаемым образцам.

При проведении генотипирования визуализированные фрагменты - аллели были обозначены маленькими буквами латинского алфавита: 'a', 'b', 'c', 'd' 'e' 'f' согласно длине амплифицированного фрагмента от меньшей длины к большей.

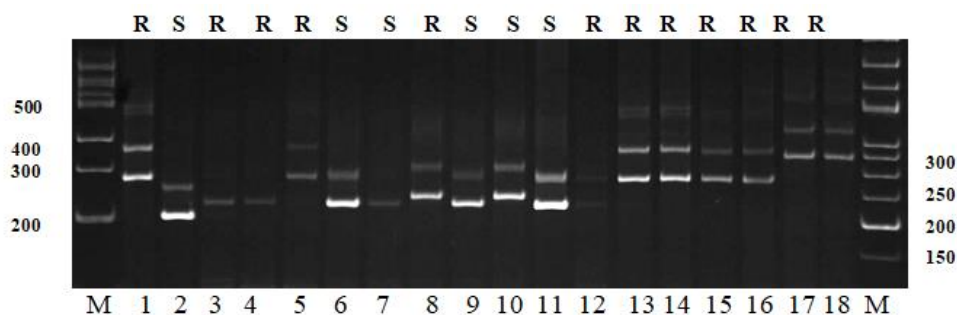
По результатам фенотипирования по комплексу признаков из 80 сортов в каждой группе спелости выделены самые засухоустойчивые сортообразцы - MG 00 Устя (Украина), MG 0

Десна (Украина), MG I Xinjiang (Китай) D11-252, MG II Цзи-ти (Китай), MG II Букурия (Молдавия), Zen (Швейцария), MG III Sponsor (Франция), Скытнея (Молдова), которые рекомендованы для возделывания без орошения в Алматинской области. Из всех изученных признаков продуктивности наибольшее воздействие стресс засухи оказал на массу семян с деланки, массу 1000 зерен и выполненность семян. Данные признаки могут служить фенотипическими маркерами засухоустойчивости.

Все образцы в соответствии с полученными результатам условно были ранжированы на три группы: чувствительные, среднеустойчивые и устойчивые к засухе.

Сопоставление данных результатов генотипирования 80 коллекционных образцов сои с генотипированием по 40 SSR-маркерами показало, что наибольшее соответствие с фенотипированием по изучаемым образцам зафиксировано по маркеру *Satt157*. Засухоустойчивые образцы сои, выделенные по высокому индексу засухоустойчивости: Sponsor, Черемош, Nin zhen No. 1, Спритна, Zen, Красивая мечта, Цзи-ти, Жанся, Танаис, Скытнея, Память ЮКГ имеют фрагмент длиной 290 п.н., обозначенной аллелью - d (рисунок 1).

По результатам проведенного биоинформатического анализа сцепления маркера *Satt157* с геном-кандидатом засухоустойчивости сои в Базе данных 'Soybase', удалось установить, что наиболее близко расположенным к маркеру *Satt157* является ген *GmTEM1* Glyma.02g0999500. Ген Glyma.02g0999500, AP2/ERF и репрессор транскрипции TEM1, содержащий домен В3, на основе сходства с *Arabidopsis*. Белок AP2/ERF и репрессор транскрипции, контролируемый геном *GmTEM1* (Glyma.02g0999500), вероятно действует как активатор транскрипции и участвует в регуляции экспрессии генов стрессовых факторов (<https://www.uniprot.org/uniprot/P82280>).



М 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 М
 1-Жанся, 2-Селекта 302, 3-Устя, 4-Припять, 5-Десна, 6-Янтарная, 7-Marpleamber, 8-Красивая мечта, 9-Соер345, 10-Marplearrow, 11-Ситора, 12-Xinjiand D11-252, 13-Sponsor, 14-Zen, 15-Черемош, 16-Память ЮКГ, 17-Вилана, 18-Славия

Рисунок 1 – Элетрофореграмма коллекционных сортов сои по SSR маркеру *Satt157*

Для секвенирования последовательности геномной ДНК гена *GmTEM1* было выбрано 4 сорта сои: 2 засухоустойчивых (Скытнея и Цзи-ти) и два чувствительных (Янтарная и Азиатская). Секвенирование последовательности геномной ДНК гена *GmTEM1* (Glyma.02g0999500) было проведено в AGRF (Аделаида, Австралия). По результатам секвенирования обнаружен полиморфизм по числу повторяющихся SSR элементов "СТ": 8 (как у аннотированного сорта) в засухоустойчивых сортах Скытнея и Цзи-ти и в чувствительных сортах Янтарная и Азиатская.

После обнаружения полиморфизма по числу SSR повторов в промоторной зоне гена сои *GmTEM1* (Glyma.02g0999500) были разработаны праймеры, охватывающие полиморфный район, таблица 1.

Таблица 1 – Сиквенсы праймеров для генотипирования по SSR фрагменту в промоторной зоне гена *GmTEM1* (Glyma.02g099500)

Наименование	Последовательность	Длина (п.н.)	GC (%)	Темп. отжига	Ампликон (п.н.)
GmTEM1-SSR-F4	ATTCAGTTGACCCACACCATC	22	50	54.8°C	183-189
GmTEM1-SSR-R4	GGAAACTGTCCCTAGTAAATGTGT	24	42	54.0°C	

Генотипирование с праймерами показало, что засухоустойчивые образцы Цзи-ти-4, Скытнея, Sponsor, Черемош, Nin zhen, Спритна, Zen имеют короткий фрагмент размером 183 п.н., а сорта Янтарная, Азиатская, Диндоне имеют более длинный фрагмент – 189 п.н. Предлагаемый SSR маркер можно использовать в практической селекции сои на устойчивость к засухе.

Вывод. Разработан ДНК - маркер GmTEM1, охватывающий полиморфный район гена для генотипирования образцов сои по засухоустойчивости. Предлагаемый метод генотипирования растений сои с использованием SSR-маркера GmTEM1 будет дополнительно апробирован на большем количестве сортов сои.

Финансирование: грант МВОиН РК (Руководитель Ержебаева Р.С.) ИРН AP19677163 «Разработка SNP-маркеров по признаку засухоустойчивости на основе полногеномного анализа ассоциаций (GWAS) для применения в маркер-опосредственной селекции сои (*Glycine max*. L)»

Список литературы

1. Manavalan, L.P. Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean [Text] / L.P. Manavalan, S.K. Guttikonda, L.S.P. Tran, H.T. Nguyen // Plant and Cell Physiology. - 2009. - Vol. 50. - № 7. - P. 1260-1276.
2. Turner, N.C. Adaptation of grain legumes (pulses) to water limited environments [Text] / N.C. Turner, G.C. Wright, K.H.M. Siddique // Adv. Agron. - 2001. - Vol. 71. - P. 193-203.
3. Didorenko, S. Formation of Production Characters of Soya Genotypes [*Glycine max* (L.) Merr.] in the Areas of South-East Kazakhstan with Sufficient and Limited Water Supply [Text] / S. Didorenko, R. Yezhebayeva, D. Abildaeva, A. Amangeldiyeva // Agrivita. – 2020. – Vol. 42(3). – P. 509-520.
4. Murray, M.G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [Text] / M.G. Murray, W.F. Thompson // Nucleic Acids Res. - 1980. - Vol. 8. pp.4321–4325. DOI: 10.1093/nar/8.19.4321.
5. Du, W. Detection of quantitative trait loci for yield and drought tolerance traits in soybean using a recombinant inbred line population [Text] / W. Du, D.Yu, S. Fu // Journal of Integrative Plant Biology. - 2009. - Vol.51, No. 9. - P.868-878. doi:10.1111/j.1744-7909.2009.00855.x.
6. Wang, M. Construction of a molecular marker linkage map and its use for quantitative trait locus (QTLs) underlying drought tolerance at germination stage in soybean [Text] / M. Wang, W.M. Yang, W.J. Du // African Journal of Biotechnology. - 2012. - Vol. 11, № 65. - P. 12830-12838.
7. Specht, J.E. Soybean response to water: a QTL analysis of drought tolerance [Text] / J.E. Specht, K. Chase, M. Macrander, G.L. Graef, J. Chung, J.P. Markwell et al. // Crop Science. - 2001. - Vol. 41, № 2. - P. 493-509.
8. Fehr, W. R. Stages of Soybean Development [Text] / W. R. Fehr, C.E. Cavines. Cooperative Extension Service. Ames, Iowa: Iowa State Univ. 1979.
9. Вишнякова, М. А. Коллекция мировых генетических ресурсов зерновых бобовых ВИР: пополнение, сохранение и изучение [Текст]: методические указания / М. А. Вишнякова, И. В. Сеферова, Т. В. Буравцева, М. О. Бурляева, Е. В. Семенова, Г. И. Филипенко, Е. В. Другова - Санкт-Петербург: Мин. науки и высшего образования РФ, 2018. - 143 с. DOI: 10.30901/978-5-905954-79-5

10. Bates, L.D. Rapid determination of free praline for water – stress studies [Text] / L.D. Bates, R.P. Waldren, I.D. Teare // Plant and Soil. - 1973. - Vol.39. - P.2005-2007.

УДК 578:631.52:635.655

Создание фотопериодически нейтральных линий сои (*Glycine max* (L.) Merr.) с использованием маркерной селекции

Раушан Сайлаувна Ержебаева, Светлана Владимировна Дидоренко, Айгуль Айдаровна Амангедиева

ТОО «Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства»,
Алматинская область, Республика Казахстан

Аннотация. В статье представлены данные по результатам проведения маркерной селекции сои по четырем генам *E1*, *E3*, *E4*, *E7*, контролирующим фотопериодическую чувствительность сои. Из 11 гибридных популяций, представленных 667 индивидуальными растениями сои с использованием SSR-маркеров, были отобраны растения с рецессивными аллелями генов *E* в гомозиготном состоянии. Испытание выделенных генотипов в условиях 53⁰ северной широты позволило выделить 20 скороспелых, фотопериодически нейтральных генотипов *e1e3E4e7*, *e1E3E4e7*, *e1E3e4e F4* с вегетационным периодом 92-100 дней. Данные линии являются потенциальными сортами для северных регионов Казахстана

Ключевые слова: соя, гены фотопериодической чувствительности, SSR-маркеры, селекция, вегетационный период,

Development of photoperiodically neutral soybean lines (*Glycine max* (L.) Merr.) using marker selection

Raushan Sailaunva Yerzhebayeva, Svetlana Vladimirovna Didorenko, Aigul Aidarovna Amangedieva

LLP "Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant Growing", Almaty region, Republic of Kazakhstan

Abstract. The article presents data on the results of marker selection of soybeans for four genes *E1*, *E3*, *E4*, *E7*, which control the photoperiodic sensitivity of soybeans. From 11 hybrid populations represented by 667 individual soybean plants, plants with recessive alleles of the E genes in a homozygous state were selected using SSR-markers. Testing of the selected genotypes in conditions of 53⁰ northern latitude made it possible to identify 20 early-ripening, photoperiodically neutral genotypes *e1e3E4e7*, *e1E3E4e7*, *e1E3E4e F4* with a growing season of 92-100 days. These lines are potential varieties for the northern regions of Kazakhstan

Key words: soybean, photoperiodic sensitivity genes, SSR-markers, breeding, growing season

Введение. Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) - ведущая в мире масличная культура. Соевые бобы являются богатым источником растительного масла и белка. Это культура многоцелевого использования: продовольственного, кормового, медицинского и технического [1]. Мировое производство сои ежегодно растет. Ее площадь увеличилась с 76,7 млн. га (2001 г.) по 129 млн. га в 2021 году (<http://www.fao.org/faostat>). Несмотря на то, что соя является культурой короткого дня с высокой фотопериодической чувствительностью, ее возделывают в разнообразных климатических зонах в диапазоне от 35° ю.ш. до 56° с. ш. [2, 3, 4]. Такое широкое распространение соя получила благодаря достижениям селекции, основанных на генетике цветения, спелости и чувствительности к фотопериоду [2, 3, 5, 6].