

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].

Молекулярно-генетическую основу адаптации сои к различным зонам возделывания обеспечивают гены, обозначенные как *E*. Известно, двенадцать основных генов сои, контролирующих время цветения и созревания сои: *E1- E11* и *J*. Из всех этих генов *E1, E2, E3, E4* [7], *E7* [8] были описаны как количественные фотопериодические гены, рецессивные аллели которых, приводят к фотопериодической нейтральности, а доминантные аллели замедляют переход к репродуктивной фазе и наступлению спелости.

В Казахстане сою возделывают в основном на орошаемых полях Алматинской (24,3 тыс. га) и Жетысуской (74,5 тыс. га) областях. В настоящее время актуальной задачей для республики является продвижение сои в обширные северные регионы и создание отечественных сортов сои северного экотипа. В связи с этим в КазНИИЗиР проводятся работы по внедрению маркер-ассоциированного отбора в селекционный процесс сои по признаку чувствительности к фотопериоду для продвижения сои в северные регионы РК.

Цель – Создание фотопериодически нейтральных линий сои для возделывания в северных широтах (52-53° с. ш.) Казахстана с использованием маркерной селекция по генам нечувствительности к фотопериоду *E1, E3, E4, E7*.

Материал и методы исследований. Материалом исследований служили 17 родительских форм MG 000, MG 00, MG 0 и MG I групп спелости и 11 гибридных популяции сои (*F2-F3*), полученные на основании их скрещиваний. В качестве положительных и отрицательных контролей использовали изогенные линии с рецессивными и доминантными аллелями генов *E1, E7, E3, E4* - Наросой OT94-47 (*e1e3e4e7*), Наросой OT89-5 (*e1e3e4E7*), Наросой (*e1E3E4E7*), OT93-26 (*E1e3E4E7*), полученные из ООО «Соя-Север» (Белоруссия) и Australian GrainsGenbank (Австралия).

Опыты по подбору родительских пар, гибридизации, браковке и отбору ценных форм *F1-F3* проведены на базе Казахского НИИ земледелия и растениеводства в период 2017-2021 гг. Данный центр расположен на юго-востоке Республики на 43⁰ с.ш. Испытание в условиях севера, выделенных по комплексу признаков и искомой аллельной вариацией генов *E* линии сои, проведено в 2022 году в условиях Костанайской области на базе ОХ «Заречное» (географическое расположение 53°21' с. ш., 76°54' в. д.).

Гибридизацию проводили согласно опубликованных методик [9, 10, 11].

В течение вегетации были проведены фенологические наблюдения за ростом и развитием растений сои согласно методики описанной Fehr W.R., Cavines, С.Е., 1979. [12]. Оценка элементов продуктивности проведена согласно методической рекомендации Вишняковой М.А., 2018 [13].

Экстрагирование ДНК сои было проведено с использованием СТАВ-метода [14]. В дальнейшем растения продолжали свое развитие.

ПЦР-анализ проводили в амплификаторе «Eppendorf Mastercycler» (Германия). В работе использовали молекулярные маркеры к гену *E1 Satt 557, Satt 365* [16], к гену *E3 Satt 229* [15], к гену *E4* [16] и к гену *E7 - Satt 100* и *Satt 319* [15].

Детектирование проводилось методом электрофореза продуктов амплификации в 8%-ом полиакриламидном геле (Sigma Life Science, Китай). В качестве маркеров молекулярных весов использовали ДНК маркер «Step50» (ООО «Биолабмикс», Россия, г. Новосибирск)

Статистическая обработка данных проведена в программной среде R, версия 4.1.2 (2021-11-01) "Bird Hippie".

Результаты исследований. На основании данных аллельной вариации рабочей коллекции, их испытания в Алматинской и Костанайской областях РК были подобраны родительские формы для скрещиваний. В качестве материнских форм были подобраны два сорта (Бірлік KB и Зара) с белыми цветами, которые отличались крупноцветковостью. В качестве отцовских форм были подобраны сорта MG 000 – MG I групп спелости, с высокой продуктивностью, не растрескивающиеся, имеющие ценные рецессивные аллели генов нечувствительности к фотопериоду (Rana, Toury, Припять, Gignon 5, Память ЮКГ, Soer 345, Altom, Бара, Малета, Soer 3, Устя, Mapleamber, Fiskeby III, Jhony). По результатам гибридизации процент завязываемости составлял от 0 до 23,5%, в зависимости от гибридной

комбинации. По комбинациям *Zara x Altom*, *Zara x Fiskeby III*, *Zara x Mapleamber* гибридизация прошла безуспешно, семена не были получены. В 2019 г. в первом поколении F_1 проведен отбор истинных гибридов. Из 73 растений отобрано 38 растений (52%) 11 комбинаций скрещиваний.

Семена 38 растений 11 гибридных популяций поколения F_2 были высеяны в 2020 году, этикетированы и идентифицированы по аллельной вариации генов *E1*, *E3*, *E4*, *E7*. На основании ДНК-идентификации были выделены индивидуальные растения гомозиготные по рецессивным аллелям генов *E*. После самоопыления в 2021 году проведена ДНК-идентификация растений генерации F_3 , тех популяций, которые были гетерозиготны по изучаемым генам. Общее число изучаемых растений в маркерной селекции составило 667 шт.

На основании ПЦР-анализа индивидуальных растений гибридных популяций F_2 - F_3 с использованием двух маркеров *Satt365* и *Satt 557* идентифицированы 311 растений – носителей ценной рецессивной аллели *e1e1*.

Идентификация рецессивной аллели *e3* показала, что ценная аллель обнаружена у 40 растениях комбинации Бірлік КВ x Rana и 27 растений *Zara x Малета*.

Использование праймеров *PhyA2* позволило идентифицировать 65 растений с фрагментом 837 п.н., что соответствует рецессивной аллели *e4* (Harosoy 94-47, *e4e4*) и 204 растений с фрагментом 1229 п.н., что соответствует доминантной аллели *E4* (Harosoy *E4E4*) согласно Liu et al., 2008 [35]. Зафиксировано так же 22 гетерозиготных растений по аллелям гена *E4*. Анализ был проведен только в 5 гибридных комбинациях (Бірлік КВ x Припять, *Zara x Бара*, *Zara x Малета*, *Zara x Устя*, *Zara x Jhony*), где родительские формы являлись носителями рецессивной аллели *e4*.

На основании ПЦР-анализа по двум маркерам (*Satt100* и *Satt319*) выделено 298 индивидуальных растений с рецессивной аллелью *e7e7* в гомозиготном состоянии, отвечающей за не чувствительность к фотопериоду.

В Костанайскую область было передано 104 линии сои 6 генотипов *e1e3E4e7*, *e1E3E4e7*, *E1E3e4E7*, *E1e3E4E7*, *e1E3e4e7*, *E1E3E4E7*, отобранные по продуктивности. Из шести изученных генотипов селекционных линий сои, наиболее перспективная комбинация аллелей генов *E*, контролирующей нечувствительность к фотопериоду, была *e1 e3 E4 e7*. По результатам исследований выделено 20 перспективных линий, вызревающих в условиях Костанайской области в течение 92-100 дней.

Выводы. Маркерная селекция позволила улучшить эффективность селекции. На основании маркерного отбора выделены 20 линий сои с генотипами *e1e3E4e7*, *e1E3E4e7*, *e1E3e4e7* вызревающих в условиях Костанайской области в течение 92-100 дней. Данные являются потенциальными сортами для северных регионов Казахстана 52-53° с. ш.

Список литературы

1 Kumawat G., Gupta S., Ratnaparkhe M. B., Maranna S., & Satpute, G. K. QTLomics in soybean: a way forward for translational genomics and breeding. *Frontiers in Plant Science*, 2016, vol. 7, pp.1852. [Doi. 10.3389/fpls.2016.01852](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01852)

2 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, pp. 1416–1427. DOI: 10.1007/s11427-016-9154-x.

3 Liu L, Song W, Wang L, Sun X, Qi Y, Wu T, et al. Allele combinations of maturity genes *E1-E4* affect adaptation of soybean to diverse geographic regions and farming systems in China. *PLoS ONE*, 2020, vol. 15(7): e0235397. [https://doi.org/ 10.1371/journal.pone.0235397](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235397)

4 Fedorina, J.V., Khlestkina, E.K., Seferova, I.V., Vishnyakova, M.A. Genetic mechanisms underlying the expansion of soybean *Glycine max* (L.) Merr. cultivation to the north. *Ecological Genetics* this link is disabled, 2022, vol.20(1), pp.13–30 DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen83879>

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, no. 6, pp. 981–994. DOI: 10.1111/jipb.13021.

6 Yang W.Y., Wu T.T., Zhang X.Y., Song W.W., Xu C.L., Sun S., Hou W.S., Jiang B.J., Han T.F., Wu C.X. Critical photoperiod measurement of soybean varieties in different maturity groups. *Crop Science*, 2019, vol. 59, DOI:10.2135/cropsci2019.03.0170/

7 Jiang B., Nan H., Gao Y., Tang L., Yue Y., Lu S., Ma L., Cao D., Sun S., Wang J., Wu C., Yuan X., Hou W., Kong F., Han T., Liu B. Allelic combinations of soybean maturity loci E1, E2, E3 and E4 result in diversity of maturity and adaptation to different latitudes. *PLoS ONE*, 2014. vol. 9(8). DOI: 10.1371/journal.pone.0106042.

8. Cober E.R., Voldeng H.D. A new soybean maturity and photoperiod-sensitivity locus linked to E1 and T. *Crop Sci.*, 2001. vol. 41, No. 3. pp. 698–701. DOI: 10.2135/cropsci2001.413698x

9 Bernard R.L. and Weiss M.G. Qualitative genetics. In B.E. Galdwell (ed) Soybeans, improvement, and uses Agronomy, *Am. Soc. Agron., Madison*, 1973, vol. 16, pp. 117-154

10 Walker, A. K., Cianzio, S. R., Bravo, J. A., & Fehr, W. R. (1979). Comparison of Emasculation and Nonemasculation for Hybridization of Soybeans 1. *Crop Science*, vol. 19(2), pp. 285-286.

11 Патент №31427 на изобретение «Способ гибридизации сои», авторы: Дидоренко С.В., Карягин Ю.Г., Булатова К.М.// ТОО «Казахский НИИ земледелия и растениеводства», заявка № 2011/0010.1 подано 06.01.2011, опубликовано 21.07.2016

12 Fehr, W. R. Cavines CE Stages of Soybean Development. *Cooperative Extension Service. Ames, Iowa: Iowa State Univ.* 1979.

13 Вишнякова, М. А., Сеферова, И. В., Буравцева, Т. В., Бурляева, М. О., Семенова, Е. В., Филипенко, Г. И., ... & Другова, Е. В. Коллекция мировых генетических ресурсов зерновых бобовых ВИР: пополнение, сохранение и изучение: методические указания. Санкт-Петербург: Мин. науки и высшего образования РФ, 2018. 143 с. DOI: [10.30901/978-5-905954-79-5](https://doi.org/10.30901/978-5-905954-79-5)

14 Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // *Nucleic Acids Res.* 1980. vol. 8. pp. 4321–4325. DOI: 10.1093/nar/8.19.4321.

15 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). pp. 1024–1036. DOI: 10.1139/g03-079.

16 Liu B., Kanazawa A., Matsumura H., Takahashi R., Harada K., & Abe, J. Genetic redundancy in soybean photoresponses associated with duplication of the phytochrome A gene. *Genetics*, 2008. vol. 180(2), pp.995-1007. DOI: 10.1534/genetics.108.092742

УДК 575.22.085:631.527

**Внутрикallусная генетическая изменчивость андрогенных удвоенных гаплоидов риса
Oryza sativa L.**

Марина Владиславовна Илюшко

ФГБНУ «Федеральный научный центр агробиотехнологий Дальнего Востока им. А.К.
Чайки», г. Уссурийск

Изучалась частота возникновения внутрикallусной изменчивости в андрогенезе *in vitro* риса с целью определения степени генетической однородности удвоенных гаплоидов одного пыльника. Исследования проведены среди удвоенных гаплоидов, полученных в андрогенезе *in vitro* гибридов риса *Oryza sativa* L. Проведен молекулярно-генетический анализ 855 растений (56 кallусных линий) на наличие аллелей устойчивости/восприимчивости следующих генов устойчивости риса к *Pyricularia oryzae* Cav. [*Magnaporthe grisea* (Hebert Barr.)]: *Pi-z*, *Pi-b*, *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-ta*². Среди удвоенных гаплоидов проводили детекцию одного-трех генов в зависимости от наличия их в исходных гибридах. Выявлены кallусные линии с