

ЖАРИКОВА Д.О.<sup>1</sup>, ЧЕБОТАР Г.О.<sup>1</sup>, ВІЛЬГОТА М.В.<sup>2</sup>, ТЕМЧЕНКО І.В.<sup>2</sup>, ЧЕБОТАР С.В.<sup>1,3✉</sup><sup>1</sup> Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,

Україна, 65026, м. Одеса, вул. Дворянська, 2, e-mail: s.v.chebotar@onu.edu.ua

<sup>2</sup> Інститут кормів та сільського господарства Поділля НААН України

Україна, 21100, м. Вінниця, проспект Юності, 16

<sup>3</sup> Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннезнавства та сортовивчення НААН (СГІ – НЦНС),

Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дор., 3

✉ s.v.chebotar@onu.edu.ua, (0482) 68-11-02

## ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАНТНИХ ЛІНІЙ СОЇ ЗА ЛОКУСАМИ *Satt100* ТА *Satt319*, ЗЧЕПЛЕНИХ ІЗ ГЕНОМ *E<sub>7</sub>*

**Мета.** Аналіз поліморфізму в мікросателітних локусах *Satt100* та *Satt319*, які фланкують ген *E<sub>7</sub>*, що визначає чутливість рослини сої у фазі дозрівання до довжини дня, у 10 ліній сої, отриманих шляхом хімічного мутагенезу, та 4 батьківських сортів – Оксана, Феміда, Золотиста та Подільська 416. **Методи.** ДНК виділяли з насіння сої з використанням набору ДНК-NeoPrep100. ПЛР-аналіз виділеної ДНК виконували за допомогою мікросателітних маркерів *Satt100* та *Satt319*. Продукти ПЛР фракціонували методом електрофорезу у поліакриламідному гелі. **Результати.** У досліджених рослин виявлено 5 алелів за локусом *Satt100* та 3 алелі за локусом *Satt319*. 42,9% сортів та ліній сої, які було досліджено за локусом *Satt100*, виявилися носіями алеля «Е». За локусом *Satt319* 64,2% сортів та ліній виявилися носіями алеля «В». **Висновки.** Сорт Оксана, мутантні лінії Оксана М №12, Феміда М №29 – носії домінантного алеля *E<sub>7</sub>*. Детектовано, що сорт Золотиста та п'ять мутантних ліній є носіями рецесивного алеля *e<sub>7</sub>*. Визначено, що у 75% випадків в досліджених мікросателітних локусах мутантних ліній відбулися зміни алельного стану у порівнянні з вихідними сортами, що, ймовірно, є результатом впливу мутагенних речовин на генеративний апарат рослин сої й призвело до відкритого цвітіння та перезапилення.

**Ключові слова:** *Glycine max* (L.), соя, ген *E<sub>7</sub>*, мікросателітні маркери, фотоперіодична чутливість.

Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) є однією з економічно найважливіших у світі бобових культур завдяки унікальному поєднанню високого вмісту білка, олії та вуглеводів. Площі вирощування сої в Україні зросли з 73 тис. га в 2001 р.

до 1,4 млн. га в 2013 р. [1], і, за даними Державної служби статистики України, до 1,8 млн. га у 2017 р. [2].

Відповідь на фотоперіод є важливим критерієм, який визначає широтну адаптацію сортів сої [3]. Урожайність сої може бути підвищена шляхом оптимізації умов вирощування під час проходження окремих фаз розвитку рослини. Оскільки соя відноситься до рослин короткого дня, переміщення більшості її генотипів у помірні географічні зони впливає на тривалість вегетаційного періоду рослини та негативно відображається на врожайності. Через збільшення довжини світлового дня відбувається затримка цвітіння та рослинам бракує часу на дозрівання до настання негативних температур [4]. Завдяки проведенню молекулярно-генетичного аналізу серії генів *E*, що беруть участь у контролі реакції рослин на фотоперіод і зумовлюють час до цвітіння та дозрівання рослин сої, виникає можливість оцінювання адаптаційного потенціалу сортів сої щодо специфічних умов вирощування. Monlar із співавторами [5] маркували домінантний алель *E<sub>7</sub>* у групі зчеплення С2 на шостій хромосомі геному сої за допомогою мікросателітних маркерів *Satt100* та *Satt319*.

Метою нашої роботи був аналіз поліморфізму в мікросателітних локусах *Satt100* та *Satt319*, які фланкують ген *E<sub>7</sub>*, що визначає чутливість рослини сої у фазі дозрівання до довжини дня, у 10 ліній сої, отриманих шляхом хімічного мутагенезу, та 4 батьківських сортів – Оксана, Феміда, Золотиста та Подільська 416.

### Матеріали і методи

Матеріалом для роботи слугували 10 ліній сої, отриманих шляхом хімічного мутагенезу, та вихідні сорти – Оксана, Феміда, Золотиста та

© ЖАРИКОВА Д.О., ЧЕБОТАР Г.О., ВІЛЬГОТА М.В., ТЕМЧЕНКО І.В., ЧЕБОТАР С.В.

Подільська 416.

В Інституті кормів та сільського господарства Поділля НААН (ІКСГП, м. Вінниця, Україна) для отримання мутантних ліній сої насіння названих вище сортів обробляли такими мутагенами: Д-6, ДМССО-11, ДМССО-12, ДМСНПІР-11, ДУДМС-12, Д2ДМС-11В. Мутагенні речовини надано Інститутом біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України. Метод обробки полягав у замочуванні насіння у водному розчині мутагенів у концентрації 0,05 г/л, 0,5 г/л, 5 г/л, 10 г/л. Експозиція замочування становила 2, 4, 8, 16 годин. За контроль брали насіння відповідних сортів, які замочували у дистильованій воді. Вказані сорти оброблялися хімічними мутагенами для збільшення генетичної мінливості задля використання отриманого матеріалу в селекції. Сорти та лінії сої, досліджені у роботі, представлені у таблиці. Вихідні сорти належать до різних груп стиглості: середньоранні та середньостиглі [6].

ДНК виділяли з насіння сої із використанням набору ДНК-NeoPrep100 («Neogen Laboratory», Україна). ПЛР з праймерами до мікросателітних локусів *Satt100* та *Satt319* про-

дили згідно з рекомендаціями Monlar та співавт. [5]. Продукти ПЛР фракціонували у 7% поліакриламідному гелі та фарбували за допомогою  $\text{AgNO}_3$  відповідно до протоколу Promega [7]. Розмір фрагментів ампліфікацій визначали відносно маркера молекулярної маси *pUC19/Msp I* за допомогою програми «GelAnalyzer 2010a». У якості контролів для ПЛР-аналізу були використані: ізолінія з сорту Harosoy – OT89-5 та сорт Вілана, носії алелів «А» за двома локусами *Satt100* і *Satt319* та домінантного алеля за геном *E<sub>7</sub>*, а також сорт Корада, який показав наявність за обома маркерними локусами алелів «В» та має рецесивний алель гена *e<sub>7</sub>* [8].

### Результати та обговорення

За результатами електрофорезу продуктів ампліфікації десяти мутантних ліній та чотирьох вихідних сортів нами виявлено 5 алелів за локусом *Satt100* та 3 алелі за локусом *Satt319* (табл.). Алелі мікросателітних локусів *Satt100* та *Satt319*, детектовані у дослідженому матеріалі, позначали літерами згідно з номенклатурою, запропонованою Розенцвейг та інш. [9].

Таблиця. Алельний стан сортів та мутантних ліній сої за локусами *Satt100* та *Satt319*

Сорти / мутантні лінії	Алелі локусу / ген <i>E<sub>7</sub></i>				Ген
	<i>Satt 100</i>		<i>Satt 319</i>		
	п. н.	Тип	п. н.	Тип	
ОКСАНА	182	А	196	А	<i>E<sub>7</sub></i>
ОКСАНА М №2	149	Е	204	В	<i>e<sub>7</sub></i>
ОКСАНА М №12	182	А	196	А	<i>E<sub>7</sub></i>
ОКСАНА М №13	149	Е	204	В	<i>e<sub>7</sub></i>
ЗОЛОТИСТА	149	Е	204	В	<i>e<sub>7</sub></i>
ЗОЛОТИСТА М №16	147	F	204	В	?
ЗОЛОТИСТА М №20	149	Е	204	В	<i>e<sub>7</sub></i>
ФЕМІДА	115-116	С	207	С	?
ФЕМІДА М №29	182	А	196	А	<i>E<sub>7</sub></i>
ФЕМІДА М №32	125-127	G	204	В	?
ПОДІЛЬСЬКА 416	115-116	С	196	А	?
ПОДІЛЬСЬКА 416 М №33	149	Е	204	В	<i>e<sub>7</sub></i>
ПОДІЛЬСЬКА 416 М №38	149	Е	204	В	<i>e<sub>7</sub></i>
ПОДІЛЬСЬКА 416 М №40	125-127	G	204	В	?
Контрольні сорти/ лінії для ПЛР-аналізу					
OT 89-5	182	А	196	А	<i>E<sub>7</sub></i>
ВІЛАНА	182	А	196	А	<i>E<sub>7</sub></i>
КОРАДА	145	В	204	В	<i>e<sub>7</sub></i>

Із сорту Оксана після обробки мутагеном ДМССО-11 було відібрано як перспективні для селекції три мутантні лінії: Оксана М №2, Оксана М №12 і Оксана М №13. Лінія Оксана М №12 не відрізнялася від вихідного сорту Оксана за локусами *Satt100* та *Satt319*, мала алелі 182 п. н. і 196 п. н. та відповідно мала також, як Оксана в генотипі домігантний ген  $E_7$ . Лінії Оксана М №2 і Оксана М №13 характеризувались такими алелями: 149 п. н. – тип «Е» за локусом *Satt100* та 204 п. н. за локусом *Satt319*, мали рецесивний ген  $e_7$ , чим відрізнялися від батьківського сорту Оксана. Алель 149 п. н. часто трапляється в генотипах сортів, що задіяні у селекційних програмах ІКСГП. Зокрема, ми тестували цей алель у сортів Maple Belle, Srezka і у сортолінії 103 та в інших лініях гібридного походження, що досліджували раніше [4].

Сорт Золотиста та лінія Золотиста М №20 також виявилися носіями алелів 149 п. н. за локусом *Satt100* та 204 п. н. за локусом *Satt319*. У лінії Золотиста М №16 детектували інший алель – 147 п. н. – за локусом *Satt100*. Цікаво, що на локус *Satt319* хімічний мутаген не вплинув, алель залишився таким, як у генотипі вихідного сорту. У нашій попередній роботі [4] алель 147 п. н. визначали у сорту Лабрадор, який використовується у міжсортівій гібридизації в ІКСГП та має майже найкоротший термін до зацвітання серед досліджених раніше сортів та ліній сої.

Сорти Феміда та Подільська 416 характеризувалися однаковим алельним станом локусу *Satt100* та мали фрагмент ампліфікації 115 – 116 п. н. (тип «С»). За локусом *Satt319* ці два сорти різнилися – Феміда мала алель 207 п. н. – «С», а Подільська 416 – алель 196 п. н. – «А». Лінії, отримані після впливу мутагенних речовин на насіння цих двох сортів, відрізнялися від вихідних форм. Зокрема, Феміда М №29 (виділена після обробки ДМСНПІР-11) мала алелі 182 п. н. за локусом *Satt100* та 196 п. н. за локусом *Satt319*. Ця лінія за перевіреними двома МС-локусами нагадує сорт Оксана, тобто має у генотипі домігантний  $E_7$ . Лінія Феміда М №32 характеризувалася новим алелем 125 – 127 п. н. за локусом *Satt100*, який ми раніше не спостерігали серед сортів і ліній сої ІКСГП. За локусом *Satt319* у Феміди М №32 наявний алель 204 п. н., який траплявся у більш ніж 64,2% сортів та ліній, проаналізованих у цьому дослідженні. Мутантна лінія Подільська 416 М №40 мала такі ж алельні характеристики за аналізованими локусами, проте вона отримана за використання

зовсім іншого мутагена – Д-6. Інші дві мутантні лінії (Подільська 416 М №33 і Подільська 416 М №38) мали однакові алелі: 149 п. н. за *Satt100* та 204 п. н. за *Satt319* та характеризувалися наявністю рецесивного алеля  $e_7$ . Цікаво, що такий генотип ми визначали у 42,9% сортів та ліній сої, проаналізованих у цьому дослідженні.

За даними міжнародної бази даних <https://Soybase.org> у геномі сої картовано тисячі мікросателітних локусів. У нашому дослідженні аналізували лише два мікросателітних локуси у 10 мутантних ліній сої, що були отримані шляхом хімічного мутагенезу. Загалом визначено 15 випадків зміни алелів у мікросателітних локусах у порівнянні з алельним станом цих же локусів у вихідних сортів. Таким чином, спостерігали, що в 75% випадків у досліджених МС-локусах мутантних ліній за дії різних мутагенних речовин у різних концентраціях змінюється алельний стан. Водночас, можемо відзначити, що у низки мутантних ліній за локусами, які ми аналізували, спостерігаємо появу алелів, які вже поширені серед сортів та селекційних ліній ІКСГП, та майже не визначаємо появи унікальних – зовсім нових алелів. Тому можемо висунути гіпотезу щодо ймовірного впливу використаних мутагенних речовин на генеративний апарат сої, що призвело до відкритого цвітіння ліній сої, підданих хімічному мутагенезу, та можливого опилення пилком інших сортів та ліній сої, які вирощувалися поруч на експериментальному полі. Мутантні лінії сої, які успадкували нові алелі за локусами, що зчеплені з геном фотоперіодичної чутливості  $E_7$ , не характерні для вихідних сортів, були відібрані селекціонерами як перспективні, й за ними продовжуються спостереження.

### Висновки

Сорт Оксана, її нащадок лінія-мутант Оксана М №12 та мутантна лінія Феміда М №29 виявилися носіями домігантного алеля гена  $E_7$ . Мутантні лінії Оксана М №2 і Оксана М №13, сорт Золотиста та лінія Золотиста М №20, а також мутантні лінії Подільська 416 М №33, Подільська 416 М №38 – носії рецесивного алеля  $e_7$ . У цьому дослідженні не виявилось можливим порівняти інші визначені нами алелі за локусами *Satt100* і *Satt319* з алельним станом гена  $E_7$  у сортів та ліній сої Феміда, Феміда М №32, Подільська 416 і Подільська 416 М №40, Золотиста М №40, тому польові спостереження та молекулярно-генетичний аналіз буде про-

довжено.

Визначено, що у 75% випадків у досліджених МС-локусах мутантних ліній відбулися зміни алельного стану у порівнянні з вихідними сортами.

Висунуто гіпотезу щодо ймовірного впливу використаних мутагенних речовин на генеративний апарат сої, що призвело до відкритого цвітіння ліній сої, підданих хімічному мутагене-

зу, та можливого опилення пилюком інших сортів та ліній сої.

*Наше дослідження виконується у рамках проекту, що фінансується МОН №0117U1114 «Поліморфізм локусів фотоперіодичної чутливості сортів пшениці і сої та залежність розвитку рослин від їхнього алельного складу, за даними ПЛР-аналізу».*

## Література

1. Каталог сортів сої. SCP, 2014. URL: [http://fri.vin.ua/download\\_materials/catalog\\_soya\\_2014.pdf.pdf](http://fri.vin.ua/download_materials/catalog_soya_2014.pdf.pdf) (дата звернення: 17.03.2017).
2. Superagronom.com. Головний сайт для агрономів. Підсумки АгроЕкспедиції соя 2017: нелегка у вирощуванні, але вигідна для бізнесу та агрономії. 2017. URL: <https://superagronom.com/blog/160-pidsumki-agroekspeditsiyi-soya-2017-nelegka-u-viroschuvanni-ale-vigidna-dlya-biznesu-y-agronomiyi> (дата звернення: 05.01.2018).
3. Жарікова Д., Войткова В., Чеботар С. та ін. Поліморфізм селекційних ліній сої визначений за молекулярним маркером *Satt100* до гена *E7* фотоперіодичної чутливості. *Підвищення ефективності функціонування сільського господарства в умовах зміни клімату*: мат. Всеукр. наук.-практ. інтернет конф. (м. Херсон, 9 грудня 2016). Херсон, 2016. С. 52–54.
4. Zharikova D., Ivanyuk S., Chebotar G., et al. Polymorphism of soybean cultivars and breeding lines revealed by marker *Satt100* associated with *E7* locus. *Breeding Grasses and Protein Crops in the Era of Genomics*: Book of Abstracts of the Joint meeting of EUCURPIA Fodder Crops and Amenity Grasses Section and Protein Crops Working Group of Oil and Protein Crops Section. (Vilnius, 11–14 sept. 2017). Vilnius, Lithuania, 2017. P. 60.
5. 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. P. 1024–1036.
6. Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні на 2017 рік. Київ, 2017. URL: <http://sops.gov.ua/reestratsiya-prav/reiestry/reiestr-sortiv-roslyn-ukrainy> (дата звернення: 20.03.2018).
7. *Promega Technical Manual*. Gene Print. STR Systems. Printed in USA. Revised. Vol. 7. 1999. 52 p.
8. Давыденко О.Г., Голоенко Д.В., Розенцвейг В.Е. Подходы к селекции раннеспелых сортов сои. *Итоги исследований по сое за годы реформирования и направления НИР на 2005–2010 г.г.*: сб. статей коорд. совещания. Краснодар, 2004. С. 110–127.
9. 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. P. 1–7. URL: <https://www.soybase.org/sgn/articleFiles/61Rosenzweig081712%20-%2012-22-08%20-%20PDF%20-%20FINAL.pdf> (дата звернення: 20.03.2016).

## References

1. Catalog of Soybean varieties. SCP, 2014. URL: [http://fri.vin.ua/download\\_materials/catalog\\_soya\\_2014.pdf.pdf](http://fri.vin.ua/download_materials/catalog_soya_2014.pdf.pdf) (Last accessed: 17.03.2017).
2. Superagronom.com. The main site for agronomists. Results of AgroExpedition Soybeans 2017: not easy to grow, but good for business and agronomy. 2017 URL: <https://superagronom.com/blog/160-pidsumki-agroekspeditsiyi-soya-2017-nelegka-u-viroschuvanni-ale-vigidna-dlya-biznesu-y-agronomiyi> (Last accessed: 05.01.2018).
3. Zharikova D., Ivanyuk S., Voytkova V., Chebotar S., Korniyuchuk O.. Polymorphism cultivars and lines of soybean *Podillia* determined by molecular marker *Satt 100* associated with *E7* gene photoperiodic sensitivity. *National Scientific and Practical Internet Conference on "Improving the efficiency of agriculture in climate change mitigation"*, held at the Institute irrigated agriculture NAAS (Ukraine) (Kherson, December 9, 2016. 2016. P. 52–54.
4. Zharikova D., Ivanyuk S., Chebotar G., Chebotar S. Polymorphism of soybean cultivars and breeding lines revealed by marker *Satt100* associated with *E7* locus. *Breeding Grasses and Protein Crops in the Era of Genomics*: Book of Abstracts of the Joint meeting of EUCURPIA Fodder Crops and Amenity Grasses Section and Protein Crops Working Group of Oil and Protein Crops Section. (Vilnius, 11–14 sept. 2017). Vilnius, Lithuania, 2017. P. 60.
5. 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. P. 1024–1036.
6. State register of plant varieties suitable for dissemination in Ukraine in 2017. Kyiv, 2017. URL: <http://sops.gov.ua/reestratsiya-prav/reiestry/reiestr-sortiv-roslyn-ukrainy> (Last accessed: 20.03.2018)
7. *Promega Technical Manual*. Gene Print. STR Systems. Printed in USA. Revised. Vol. 7. 1999. 52 p.
8. Davydenko O.G., Golovenko D.V., Rosenzweig V.E.. Approaches to selection of early ripening soybean varieties. *Results of research soybean during the years of reforming and the direction SIWR for 2005–2010*: sat. articles of the meeting. Krasnodar, 2004. P. 110–127.
9. 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. P. 1–7. <https://www.soybase.org/sgn/articleFiles/61Rosenzweig081712%20-%2012-22-08%20-%20PDF%20-%20FINAL.pdf> (Last accessed: 20.03.2016).

ZHARIKOVA D.O.<sup>1</sup>, CHEBOTAR G.O.<sup>1</sup>, VILGOTA M.V.<sup>2</sup>, TEMCHENKO I.V.<sup>2</sup>, CHEBOTAR S.V.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Odessa I.I. Mechnikov National University,

Ukraine, 65026, Odesa, Dvoryanska str., 2, e-mail: s.v.chebotar@onu.edu.ua

<sup>2</sup> Institute of Feed research and Agriculture of Podillya of NAAS (IFRAP),

Ukraine, 21100, Vinnitsa, prospect Yunosty, 16

<sup>3</sup> Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seeds and Cultivar Investigations NAAS,

Ukraine, 65036, Odesa, Ovidiopolskaya doroga, 3

#### CHARACTERISTICS OF MUTANT SOYBEAN LINES AT *Satt100* AND *Satt319* LOCI LINKED WITH *E<sub>7</sub>* GENE

**Aim.** Analysis of genetic polymorphism of microsatellite loci *Satt100* and *Satt319* in 10 lines obtained by chemical mutagenesis, and 4 parental varieties – Oksana, Femida, Zolotysta, Podil's'ka 416. *Satt100* and *Satt319* are flanking *E<sub>7</sub>* gene, which determines sensitivity of soybean to the length of the day in ripening phase. **Methods.** DNA were isolated from soybean seeds using the kit NeoPrep100 DNA. PCR were performed with microsatellites *Satt100* and *Satt319*. The PCR products were fractionated in 7% polyacrylamide gels. **Results.** In the investigated lines were detected 5 alleles at the *Satt100* locus and 3 alleles at the *Satt319* locus. 42.9 % of the varieties and lines in this study were carriers of the «E» allele for *Satt100*. According to analysis of locus *Satt319* 64.2 % of varieties and lines were the carriers of «B» allele. **Conclusions.** Variety Oksana, mutant lines Oksana M №12, Femida M №29 – are carriers of the dominant allele *E<sub>7</sub>*. Variety Zolotysta and five mutant lines have recessive allele *e<sub>7</sub>*. In 75 % cases we have detected changes of alleles at microsatellite loci in mutant lines in comparison with parental forms. We assume that mutagenic reagents could affect at generative organs of soybean and lead to their open flowering and crosspollinations.

**Keywords:** *Glycine max* (L.), soybean, gene *E<sub>7</sub>*, microsatellite markers, photoperiodic sensitivity.