

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ
ТА ГЕНОМІКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»**

ЖАРІКОВА ДАР'Я ОЛЕКСАНДРІВНА



УДК 577.2: 633.34

**ПОЛІМОРФІЗМ ЗА ЛОКУСАМИ, АСОЦІЙОВАНИМИ З ГЕНАМИ *E*, *B*
УКРАЇНСЬКИХ СОРТАХ ТА ЛІНІЯХ СОЇ (*GLYCINE MAX* (L.) MERR.)**

03.00.22 – молекулярна генетика

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано на кафедрі генетики та молекулярної біології біологічного факультету Одеського національного університету імені І. І. Мечникова

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НААН України
Чеботар Сабіна Віталіївна,
Одеський національний університет
імені І.І. Мечникова,
завідувач кафедри генетики та молекулярної біології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Дробик Надія Михайлівна
Тернопільський національний педагогічний університет
імені Володимира Гнатюка, декан хіміко-біологічного
факультету

кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник

Пірко Ярослав Васильович
Державна установа «Інститут харчової біотехнології та
геноміки Національної академії наук України», учений
секретар

Захист дисертації відбудеться 12 травня 2021 року об 11.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д26.254.01 ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а.
Тел/факс: (044) 463-05-32, e-mail: d26.254.01@ukr.net

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Держаної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а.

Автореферат розіслано «12» квітня 2021 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради,
к.б.н., доцент



Н.Л. Пастухова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Україна посідає перше місце в Європі та сьоме в рейтингу світових експортерів сої за даними на 2019 рік (ФАО, 2020). В останні роки глобальні зміни клімату з підвищенням середньорічних температур на території нашої країни (близько 2°C), нерівномірний розподіл вологи та інші зміни факторів навколишнього середовища, створюють нові умови для розвитку рослин сої, в основних регіонах її вирощування (Адаменко, 2019). Повне секвенування геному сої у 2010 році (Schmutz et al., 2010) дозволило активізувати дослідження цієї культури у всьому світі, отже актуальною є і молекулярно-генетична характеристика українського генетичного пулу сої.

Досягнення високої урожайності та адаптивності сорту до зміни клімату у заданому регіоні вирощування, нерозривно пов'язане з фотоперіодичною чутливістю, часом цвітіння та дозрівання сої. Генетичним фактором, що впливає на час цвітіння сої – є гени серії *E* (early maturity), які контролюють реакцію рослини на зміну довжини дня і таким чином час переходу рослин від генеративної до репродуктивної стадії розвитку, та одночасно зчеплені з низкою інших агрономічно-важливих локусів (QTL), таких, що впливають на час зацвітання, час дозрівання, тривалість вегетаційного періоду, масу 1000 насінин, врожайність та інш. (Wang et al., 2018, Cao et al., 2017, Machado et al., 2017). Складність визначення алелів генів чутливості до зміни фотоперіоду за фенотиповим проявом у сої стримує використання у селекційних програмах домінантних та рецесивних алелів генів *E* та добір певних *E*-генотипів для вирощування у визначених агроекологічних умовах нашої країни.

Дані щодо впливу алелів генів фотоперіодичної чутливості на агрономічно-важливі ознаки сої при вирощуванні в Україні та генетичного поліморфізму за генами *E1*, *E2*, *E3*, *E4*, *E7* в сортах і лініях сої в вітчизняних джерелах літератури майже відсутні, а застосування мікросателітних маркерів у дослідженні та селекції на жаль є малопоширеним (Волкова з співавт., 2017, Присяжнюк з співавт., 2019). Отже, виконання роботи з дослідження поліморфізму за генами чутливими до фотоперіоду є обґрунтованим та доцільним.

Визначення алелів генів *E* за допомогою ПЛР-аналізу з мікросателітними та алель-специфічними маркерами допоможе оцінити різноманіття генетичного пулу українських сортів та селекційних ліній сої, ідентифікувати та диференціювати сорти, створити їх генетичні паспорти. Знання ефектів алелів *E* генів на агрономічно важливі ознаки дозволить розширити уявлення про функціонування цих генів та прояв їх плейотропних ефектів у фенотипі при вирощуванні в умовах України, що може використовуватися у маркер-опосередкованій селекції.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано на кафедрі генетики та молекулярної біології біологічного факультету Одеського національного університету імені І. І. Мечникова в рамках науково-дослідної теми «Поліморфізм локусів фотоперіодичної чутливості сортів пшениці і сої та залежність їх продуктивності від алельного складу локусів за даними ПЛР-аналізу» (№ ДР 0117U001114, 2017-2019 рр.).

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було визначити за допомогою мікросателітних та алель-специфічних маркерів алелі генів *E1*, *E2*, *E3*, *E4* та *E7* в сортах та лініях сої, створених в різних селекційних центрах України, оцінити їх вплив на агрономічно-важливі ознаки сої при вирощуванні в умовах Правобережного Лісостепу України.

Для досягнення мети вирішували наступні завдання:

1. Дослідити поліморфізм за мікросателітними локусами, асоційованими з генами *E1*, *E2*, *E3*, *E4*, *E7*, в генотипах сучасних українських сортів та ліній сої та визначити алельний стан вказаних генів.

2. За допомогою алель-специфічних маркерів встановити алельний стан генів *E3*, *E4*, виявити частоти алелів вказаних генів у генотипах сучасних українських сортів та ліній сої.

3. Оцінити вплив алелів генів *E* та асоційованих з ними мікросателітних локусів на агрономічні ознаки сої при вирощуванні в умовах Правобережного Лісостепу України.

4. Оцінити можливість використання панелі застосованих мікросателітних маркерів для диференціювання та паспортизації генотипів сої.

5. Дослідити вплив мутагенів, похідних тетрагідротіофен-*N*-діоксиду 3,4-діаміну та тетрагідротіофен-*N*-діоксиду 3,4-піридину на генетичну мінливість в мікросателітних локусах, що асоційовані з генами *E* сої, в перспективних селекційних лініях, створених за програмою хімічного мутагенезу в ІКСГП.

6. Дослідити експресивність та поліморфізм у сортах і лініях сої за ізоформами ферментів антиоксидантної системи, що приймають участь у відповіді на навколишні чинники і можуть бути пов'язані з генами *E*.

7. Визначити донорів домінантних та рецесивних алелів генів *E* для застосування у схрещуваннях зі створення ранньостиглих / пізньостиглих генотипів сої.

Об'єкт дослідження: генетичний поліморфізм сої (*Glycine max.* (L.) Merr.).

Предмет дослідження: алелі маркерних локусів й генів фотоперіодичної чутливості *E* в сортах і лініях сої української селекції та їх вплив на агрономічні ознаки.

Методи дослідження: молекулярно-генетичні – екстракція та очищення геномної ДНК з різних органів рослини (насіння, паростки), сортів та ліній сої, ПЛР-аналіз ДНК сої із використанням мікросателітних і алель-специфічних маркерів, електрофорез продуктів ампліфікації в агарозних і поліакриламідних гелях та на генетичному аналізаторі ABI PRISM Genetic Analyzer 3500 (США), біохімічні - алозимний аналіз про-, і антиоксидантних ферментів: НАДФ•*N*-оксидази, пероксидази і супероксиддисмутази, аналіз електрофоретичного розподілу продуктів ампліфікації в гелях проводили із застосуванням програми GelAnalyzer 2010a та GeneMapper® Software Version 4.1. Кластерний аналіз сортів сої проводили із залученням програми MEGA x 10.2.4, використовуючи метод UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Sokal et al., 1958). Вплив визначених алелів на агрономічно-важливі ознаки аналізували за допомогою статистичних методів в програмі Statistica 12.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше охарактеризовано генотипи українських сортів та ліній сої за допомогою МС-маркерів, зчеплених з генами *E1*, *E2*, *E3*, *E4*, *E7*, та створено інформаційну базу даних. Вперше визначено алелі генів *E3* та *E4* в генотипах українських сортів та перспективних ліній сої за допомогою алель-специфічних маркерів. Запропонована панель маркерів, яка дозволяє диференціювати сорти сої та паспортизувати їх генотипи. Визначено сорт - донордомінантних та рецесивних генів *E*, які можна застосувати у схрещуваннях для створення селекційних ліній зі зміненими темпами розвитку.

За допомогою статистичного аналізу визначено вплив алелів генів *E1*, *E2*, *E3*, *E4*, *E7* на агрономічні ознаки сортів і ліній сої при вирощуванні в умовах Правобережного Лісостепу. Сорти сої з генотипами з рецесивними алелями локусів *E* (*e1 e2 e3 e4 e7* алелі), характеризуються коротшим вегетаційним періодом. Генотипи-носії домінантного алелю гена *E7* мали період вегетації на 10-11 днів довший, ніж носії рецесивного *e7*. Вперше продемонстровано, що вплив певних мутагенів похідних тетрагідротіофен-N-діоксиду3,4-діаміну та тетрагідротіофен-N-діоксиду3,4-піридину індукує мінливість в мікросателітних локусах та змінюють алельний стан гена *E3* в генотипах ліній сої, отриманих шляхом хімічного мутагенезу.

Практичне значення одержаних результатів. Визначені алельні характеристики за локусами *Satt100*, *Satt229*, *Satt319*, *Satt354*, *Satt365*, *Sat_038*, дозволяють паспортизувати низку сортів та ліній сої та рекомендувати використання цих МС-локусів як маркерної панелі для ідентифікації та диференціації сучасних сортів сої української селекції. Проведена оцінка впливу генів *E1*, *E2*, *E3*, *E4*, *E7* на агрономічно-важливі ознаки: строки цвітіння та дозрівання, тривалість вегетаційного періоду і врожайність за умов вирощування в Вінницькій області. Надано рекомендації щодо добору та створення ранньостиглих сортів сої, згідно яких слід враховувати, що більш короткий вегетаційний період характерний для рослин з алелями 131 п.н. за локусом *Satt100* і 178 п.н. *Satt319*; більш раннє цвітіння характерне для рослин з алелем 247 за локусом *Sat_038*. Слід використовувати маркерну селекцію для відбору ліній сої з алелями *Satt365*₂₇₀, *Sat_038*₂₄₇, *Satt229*₂₃₀, *Satt354*₁₇₈, *Satt100*₁₃₁, *Satt319*₁₇₈, як таких, що мають прискорені темпи розвитку, зокрема раннє цвітіння та дозрівання, застосовувати генотип мутантної лінії 'Золотиста М16' (як ранньостиглий) як донор генів для створення ранньостиглих форм сої. Для селекції направленої на стабільність врожаю в умовах Вінницької області (або наближених до них) рекомендуємо генотипи гібридних ліній 'ПСВ-I №4001', 'СР-II №2372', 'СР-II №2375', 'КР-II №3045', 'КР-II №3014'.

Рекомендації надані за результатами проведеної ПЛР для визначення алельного стану генів фотоперіодичної чутливості (*E1*, *E2*, *E3*, *E4*, *E7*), у селекційному матеріалі, створеному за допомогою методу хімічного мутагенезу та шляхом гібридизації сортів різних груп стиглості, сучасних сортів української селекції впроваджено у дослідно-селекційну роботу лабораторії селекції сої і зернобобових культур Інституту кормів та сільського господарства Поділля НААН. *Акт впровадження додається.*

Особистий внесок здобувача. Спільно з науковим керівником обрано тему наукового дослідження, сформульовано мету та основні завдання роботи, проведено обговорення отриманих даних. Результати, викладені у дисертації, автор отримав особисто та за безпосередньої участі у виконанні експериментів. Здобувач самостійно провів пошук та аналіз літератури з тематики дослідження, виконав експериментальну частину роботи, статистичну обробку та попередній аналіз даних. Планування окремих етапів роботи, аналіз отриманих експериментальних даних, обговорення результатів дослідження, висновків дисертаційної роботи та підготовка наукових публікацій проводили спільно з к.б.н., доцентом Г.О. Чеботар, к.б.н., доцентом В.А. Топтіковим, науковим керівником д.б.н., професором С. В. Чеботар, з якими автор має спільні публікації. Допомогу при виконанні фрагмент-аналізу на генетичному аналізаторі ABI PRISM Genetic Analyzer 3500 (США) надавала провідний науковий співробітник лабораторії цитоплазматичної спадковості Інституту генетики та цитології (Білорусь) к.б.н. О.А. Аксьонова. Дані польових спостережень сортів і ліній сої надані к.с.-г.н. С.В. Іванюком і к.с.-г.н. І.В. Темченко з Інституту кормів та сільського господарства Поділля НААН, які є співавторами опублікованих праць.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були представлені на Всеукраїнській науково-практичній інтернет-конференції «Підвищення ефективності функціонування сільського господарства в умовах зміни клімату» (Херсон, 2016), на Міжнародній конференції «Breeding Grasses and Protein Crops in the Era of Genomics» The Joint Meeting of EUCARPIA Forage Crops and Amenity Grasses Section and Protein Crops Working Group of Oil and Protein Crops Section (Вільнюс, 2017), на Міжнародній науково-практичній конференції «Еколого-генетичні аспекти в селекції польових культур в умовах змін клімату» (Полтава, 2019 р.), на Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених «Селекція, генетика і технології вирощування сільськогосподарських культур» (Миронівка, 2019 р.), на третьому Міжнародному конгресі «Plant Biology and Biotechnology» (Сінгапур, 2019), на Біологічній секції «The Importance of G. Gamow's Ideas for Biology of the 21st Century» Міжнародної Гамовської конференції в Одеському національному університеті імені І.І. Мечникова (Одеса, 2020). Результати експериментальних досліджень були представлені на наукових семінарах кафедри генетики та молекулярної біології та щорічних звітних конференціях біологічного факультету Одеського національного університету імені І. І. Мечникова.

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 12 наукових праць, з них 6 статей в українських та закордонних наукових виданнях та 6 тез доповідей у збірниках матеріалів всеукраїнських та міжнародних конференцій. Опубліковані роботи відображають основний зміст дисертації.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел та додатків. Дисертацію викладено на 230 сторінках друкованого тексту і

проілюстровано 47 рисунками та 36 таблицями. Список використаних джерел складає 282 найменувань.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В огляді літератури наведено сучасні дані щодо ботанічної та молекулярно-генетичної характеристики сої *Glycine max* (L.) Merr. Описано молекулярну структуру генів *E1*, *E2*, *E3*, *E4*, *E7*, їх локалізацію та продукти експресії та вказані основні ДНК-маркери, які використовуються для детекції алельного стану зазначених генів фотоперіодичної чутливості. Наведено основні напрями селекції сої в Україні з використанням генів чутливості до фотоперіоду, та їх вплив на агрономічні ознаки сої, цвітіння, дозрівання, тривалість вегетаційного періоду, масу 1000 насіння та врожайність. Проведено аналіз даних молекулярно-генетичного поліморфізму за локусами *E* у світовому генофонді сої, охарактеризовано алельні комбінації за генами фотоперіодичної чутливості, оптимальні для помірних широт Північної півкулі. Обґрунтовано актуальність та доцільність проведення досліджень за темою дисертації.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Рослинний матеріал. Матеріалом для дослідження слугували 22 сорти сої культурної (*Glycine max* L. Merr.): 12 сортів української та 10 іноземної селекції різних груп стиглості та 29 селекційних ліній. Рослинний матеріал розділили на 3 вибірки, першу з яких складала 12 сортів української селекції – ‘Подяка’, ‘Кобза’, ‘Криниця’, ‘Геба’, ‘Мавка’, ‘Ромашка’, ‘Золотиста’, ‘Оксана’ ‘Подільська 416’ ‘Феміда’ ‘Полтава’ ‘Галина’ з Реєстру сортів рослин, придатних до поширення в Україні (наданих Національним центром генетичних ресурсів рослин Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр’єва); десять сортів іноземної селекції ‘Linia103’, ‘Sreska72’, ‘Labrador’, ‘Maple Belle’, ‘Malpe Arrow’, ‘Korada’, ‘Cormoran’ AC, ‘Horo soy’ OT89-5, ‘Вілана’, ‘Рось’, які відносяться до різних груп стиглості.

Другу вибірку складала 10 ліній, що отримані за допомогою хімічного мутагенезу, створенні в Інституті кормів та сільського господарства Поділля НААН України (ІКСГП), похідні від сортів, що належать до різних груп стиглості: 3 лінії ‘Оксана М2’, ‘Оксана М12’, ‘Оксана М13’ – похідні від сорту ‘Оксана’; 2 лінії ‘Феміда М29’, ‘Феміда М32’ – похідні від сорту ‘Феміда’; 2 лінії ‘Золотиста М16’, ‘Золотиста М20’ – від сорту ‘Золотиста’; 3 лінії ‘Подільська 416 М33’, ‘Подільська 416 М38’, ‘Подільська 416 М40’ – від сорту ‘Подільська 416’.

19 ліній, які створено шляхом гібридизації, входили до трьох родин (F₈₋₁₀), що отримані від схрещувань: ‘Оксана’ x ‘Labrador’ – 5 ліній (родина 1): ‘СР-II №2365’, ‘СР-II №2367’, ‘СР-II №2369’, ‘КР-II №3035’, ‘ПСВ-I №4001’; ‘Maple Belle’ x ‘Sreska72’ – 7 ліній (родина 2): ‘СР-II №2372’, ‘СР-II №2375’, ‘СР-II №2377’, ‘КР-II №3014’, ‘КР-II №3045’, ‘ПСВ-I №4005’, ‘ПСВ-II №4017’; ‘Linia103’ x ‘Korada’ – 7 ліній (родина 3): ‘СР-I №2220’, ‘СР-I №2226’, ‘СР-I №2234’, ‘СР-I №2245’, ‘СР-I №2250’, ‘СР-I №2265’, ‘СР-I №2359’ – віднесено до третьої вибірки.

Методи дослідження. Під час виконання роботи застосовували методи виділення ДНК з різних органів рослини (насіння, паростки), з лізуючим буфером зі ЦТАВ (Zhai et al. 2014), та за допомогою NeoPrep100DNA_plant, концентрацію отриманої ДНК вимірювали за допомогою NanoDrop (Thermo Scientific, США). ПЛР аналіз проводили за допомогою мікросателітних маркерів *Satt100* і *Satt319* (асоційовані з локусом *E7*), *Satt229* (з локусом *E3*), *Satt354* (з локусом *E4*), *Satt365* (з локусом *E1*), *Sat_038* (з локусом *E2*) і алель-специфічних маркерів – *E3-Mi*, *E3-Ha*, *e3-tr* до алелів локусу *E3*, та *E4* і *e4-SORE-1* до алелів локусу *E4* (Xu et al. (2013). Використовували ампліфікатор FlexCycler (AnalytikJena, Німеччина). Електрофорез продуктів ампліфікації проводили в агарозних гелях різної концентрації – 1%, 1,5%, 2%, як рекомендовано Kurasch et al. (2017), в поліакриламідному (7%) гелі на приладах VE-20 (Helicon, Росія) та на генетичному аналізаторі ABI PRISM Genetic Analyzer 3500 (США) із застосуванням полімеру POP-6® (384). Візуалізацію продуктів ПЛР здійснювали за допомогою додавання інтеркалюючого у ДНК барвника – бромистого етидію (BrEt $C_{(кінцева)}=0,01$ мкг/мл) до агарозних гелів, та із фарбуванням поліакриламідних гелів в розчині $AgNO_3$. Після фарбування отримані гелі фотографували або сканували. Аналіз продуктів ампліфікації, що фракціоновані за допомогою електрофорезу в гелі, проводили із застосуванням програми GelAnalyzer 2010a та GeneMapper® Software Version 4.1. ПЛР виконували з триразовим повторенням для перевірки відтворення результатів за ДНК-маркерами. Кластерний аналіз сортів сої проводили із залученням програми MEGA x 10.2.4, використовуючи метод UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Sokal et al., 1958). Одно- та двохфакторний дисперсійний аналіз та розрахунок кореляцій виконували в програмі Statistica 12. Індекс поліморфності маркера (polymorphism information content) розраховували за формулою: $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2$ де, f_i^2 – частота і-го алеля, n – кількість алелів, і виражали в частках одиниці. Частоту алелю розраховували як відношення кількості алелів досліджуваного типу у всіх зразків вибірки до загальної кількості проаналізованих зразків (в частках одиниці). Алозимний аналіз проводили за ензимами обміну активних форм кисню: НАДФ Н-оксидаза, пероксидаза і супероксиддисмутаза. За результатами електрофоретичної рухливості ізоформ вказаних ферментів опрацьованими в програмі «АнаіС» (аналізатор зображень спектрів) було проведено порівняльний аналіз. На підставі алозимного аналізу з'ясували кореляційні відносини між експресивністю досліджуваних ензимів з генами *E* та деякими агрономічно-важливими ознаками.

Агрономічні характеристики щодо часу цвітіння, часу дозрівання, тривалості вегетаційного періоду, маси тисячі насінин, врожайності отримані протягом 2015–2019 рр. Для цього сорти і лінії сої вирощували на дослідних полях ІКПСГ, розміщених в Лісостепу правобережної України, Вінницького району, Вінницької області (49° півн.ш.). Польові досліді проводилися спільно з к.с.-г.н. Іванюком С.В. та с.н.с Темченко І.В., за загально прийнятими методами. В проведенні фенологічних спостережень керувались «Методикою польового досліді» (Доспехов, 1985), «Методикою державного сортовипробування сільськогосподарських культур» (2001).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Алельний стан локусів *E*, що детермінують чутливість сої до фотоперіоду, в українських сортах та лініях сої. За допомогою молекулярно-генетичного аналізу за мікросателітними та алель-специфічними маркерами визначено поліморфізм за генами фотоперіодичної чутливості *E1*, *E2*, *E3*, *E4*, *E7* для двадцяти двох сортів вітчизняної та іноземної селекції і двадцяти дев'яти ліній сої, з яких дев'ятнадцять ліній, отриманих шляхом гібридизації, десять ліній, отриманих шляхом хімічного мутагенезу. Генотипування вибірки з дванадцяти сортів сої української селекції за ДНК-маркерами демонструє, що четверта частина сортів, характеризуються наявністю домінантних алелів за трьома локусами *E3-На E4 E7* (25% від загальної кількості сортів вибірки). Сорти-носії рецесивних алелів *e1 e2 e3 e4 e7*, складають 16,7% вибірки, інші 32% розподілилися між генотипами-носіями інших алельних комбінацій (рис. 1).

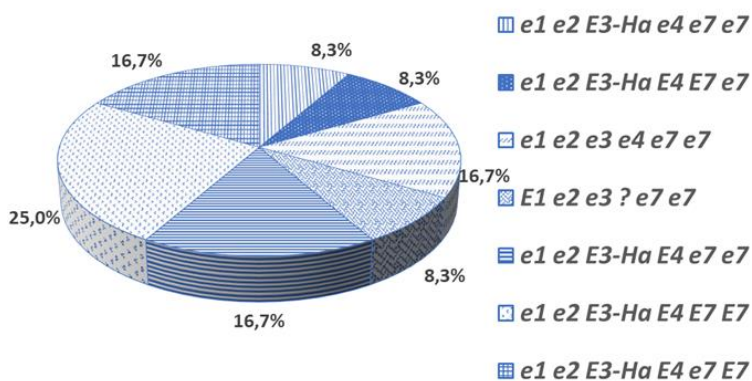


Рис. 1. Частоти генотипів в дослідженій вибірці з 12 сортів сої української селекції

За результатами польових досліджень, проведених в умовах Правобережного Лісостепу (Вінницька область), встановлено, що генотипи з різними алельними комбінаціями по-різному проходили фази розвитку рослин та мали різну врожайність. Рослини-носії генотипів з присутніми домінантними алелями локусів *E1 E3-На E4 E7* мали довшу тривалість вегетаційного періоду, ніж генотипи з всіма рецесивними алелями за вказаними локусами. Домінантний алель гена *E7*, достовірно впливав на час до цвітіння, час дозрівання, довжину вегетаційного періоду. Так його наявність призводила до більш пізнього цвітіння (на 3-9 діб), і часу дозрівання (7-9 діб) та довшого вегетаційного періоду (на 10–11 діб) у порівнянні з генотипами з рецесивними алелями *e7*, що співпадає з результатами досліджень Розенцвейга з співавт. (2008), Xu et al. (2013), Волкової з співавт. (2017). Нами показано, що рослини-носії генотипів з рецесивними алелями за локусами *e1-e4, e7* проявляли меншу чутливість до зміни фотоперіоду, мали коротшу тривалість вегетації, порівняно з сортами носіями домінантних алелів ($p=0,05$). Отримані нами данні узгоджуються з даними, опублікованими Kurusch et al. (2017), Langewich et al. (2017), Miladinivich et al. (2018).

За показниками фенотипових ознак встановлено, що за період трирічних спостережень вирощування у Вінницькій області існувала помірна позитивна кореляція між тривалістю вегетаційного періоду та врожайністю рослин сої ($r=0,32$, $p<0,05$).

Використання мікросателітних локусів, асоційованих з генами *E*, для ідентифікації та паспортизації сортів сої. За допомогою аналізу продуктів ампліфікації шести МС-локусів досліджували сорти сої ‘Подяка’, ‘Кобза’, ‘Мавка’, ‘Геба’, ‘Полтава’, ‘Ромашка’, ‘Галина’, ‘Золотиста’, ‘Криниця’ та контрольні сорти та лінії сої: ізолінія ‘Harosoy’ OT89-5, сорти ‘Вілана’, ‘Maple Arrow’, ‘Cormoran’ АС та ‘Рось’.

У дослідженому матеріалі виявили 28 алелів за застосованими МС-маркерами. В середньому детектували 4,7 алелів на МС-локус. Індекс поліморфності (PIC) коливався від 0,68 для локусів *Satt365*, *Sat_038* до 0,76 – для локусу *Satt229*. Для кожного з досліджених в роботі сортів нами запропоновані індивідуальні генетичні формули за шістьма мікросателітними локусами (табл. 1).

Таблиця 1

Паспорти досліджених сортів сої української селекції

Сорт	Група стиглості	Паспорт сорту
‘Подяка’	рс	<i>Satt100</i> ₁₆₇ , <i>Satt229</i> ₂₁₂ , <i>Satt319</i> ₁₇₅ , <i>Satt354</i> ₂₃₂ , <i>Satt365</i> ₃₀₇ , <i>Sat_038</i> ₂₄₇
‘Кобза’	скс	<i>Satt100</i> ₁₄₁ , <i>Satt229</i> ₂₃₄ , <i>Satt319</i> ₁₇₈ , <i>Satt354</i> ₂₃₀ , <i>Satt365</i> ₂₈₈ , <i>Sat_038</i> ₂₄₅
‘Криниця’	скс	<i>Satt100</i> ₁₆₇ , <i>Satt229</i> ₂₃₄ , <i>Satt319</i> ₁₈₀ , <i>Satt354</i> ₂₃₀ , <i>Satt365</i> ₃₀₁ , <i>Sat_038</i> ₂₄₅
‘Геба’	скс	<i>Satt100</i> ₁₃₁ , <i>Satt229</i> ₂₃₀ , <i>Satt319</i> ₁₇₈ , <i>Satt354</i> ₂₄₉ , <i>Satt365</i> ₂₇₀ , <i>Sat_038</i> ₂₄₉
‘Мавка’	скс	<i>Satt100</i> ₁₄₁ , <i>Satt229</i> ₂₃₄ , <i>Satt319</i> ₁₈₂ , <i>Satt354</i> ₁₇₈ , <i>Satt365</i> ₃₀₁ , <i>Sat_038</i> ₂₄₅
‘Ромашка’	сп	<i>Satt100</i> ₁₆₇ , <i>Satt229</i> ₂₃₄ , <i>Satt319</i> ₁₇₅ , <i>Satt354</i> ₂₃₀ , <i>Satt365</i> ₃₀₅ , <i>Sat_038</i> ₂₄₅
‘Золотиста’	сп	<i>Satt100</i> ₁₄₁ , <i>Satt229</i> ₂₃₄ , <i>Satt319</i> ₁₈₀ , <i>Satt354</i> ₂₃₂ , <i>Satt365</i> ₃₀₁ , <i>Sat_038</i> ₂₄₇
‘Полтава’	сс	<i>Satt100</i> ₁₄₁ , <i>Satt229</i> ₂₃₀ , <i>Satt319</i> ₁₈₂ , <i>Satt354</i> ₂₃₀ , <i>Satt365</i> ₃₀₁ , <i>Sat_038</i> ₂₄₉
‘Галина’	сс	<i>Satt100</i> ₁₄₁ , <i>Satt229</i> ₂₃₀ , <i>Satt319</i> ₁₈₂ , <i>Satt354</i> ₁₇₈ , <i>Satt365</i> ₃₀₁ , <i>Sat_038</i> ₂₄₉

В роботі розраховували генетичні дистанції з метою визначення генетичної подібності сортів сої та проводили кластерний аналіз (рис. 2).

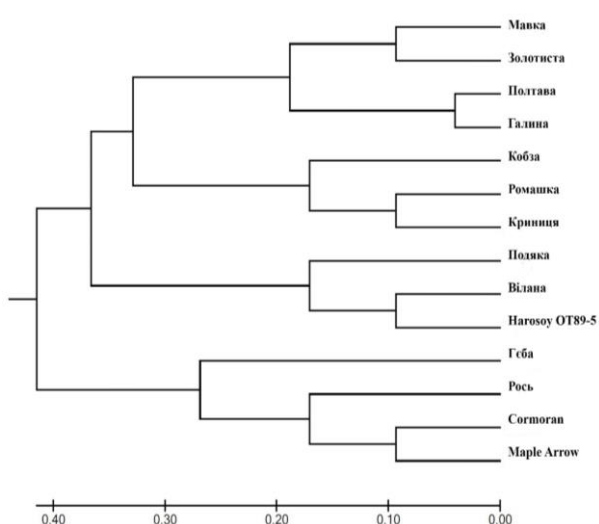


Рис. 2. Кластеризація сортів сої за генетичними дистанціями, розрахованими за даними аналізу 6 МС-локусів із застосуванням методу UPGMA. Нижня вісь - генетичні дистанції в у. о.

Таким чином, використані в роботі мікросателітні маркери, асоційовані з генами фотоперіодичної чутливості, дозволяють чітко диференціювати сорти один від одного. Тому рекомендуємо використовувати панель з шести вказаних МС-

маркерів для диференціації, паспортизації та реєстрації сортів сої й для захисту авторських прав.

ПЛР аналіз за мікросателітними маркерами *Satt365*, *Sat_038*, *Satt229*, *Satt354*, *Satt100*, *Satt319*, які є близько зчепленими з генами фотоперіодичної чутливості, рекомендованими для детекції локусів *E1*, *E2*, *E3*, *E4*, і *E7* за інформацією Molnar et al. (2003), і Розенцвейг з співавт. (2008), показав, що генотип сорту 'Гєба' за локусом *E1* виявився носієм домінантного алелю *E1*, який детектовано за МС-маркером *Satt365*. Генотипи інших сортів вибірки характеризувалися наявністю різних фрагментів ампліфікації, віднесені до рецесивного алелю *e1*, який призводить до більш раннього цвітіння (Xia et al., 2012, Xu et al., 2013, Tsubocura et al., 2014). За локусом *E2*, який рекомендовано (Molnar et al., 2003) визначати за допомогою мікросателітного маркеру *Sat_038*, домінантний алель *E2* виявлено лише у референсного сорту 'Рось', фрагмент ампліфікації розміром 243 п.н. Інші сорти вибірки мали фрагменти ампліфікації, що характеризують рецесивну алельну форму гену *e2*. У генотипах трьох сортів 'Подяка', 'Ромашка' та 'Оксана', як і у контрольних сортів 'Вілана' та 'Harosoy' ОТ89-5 із МС-маркерами *Satt100* і *Satt319* детектовано фрагменти ампліфікації розміром 167 п.н. і 175 п.н., які за даними Molnar et al. (2003) та Розенцвейг (2008), відповідають домінантному алелю гена *E7*, що характеризує генотипи чутливі до фотоперіоду (рис. 3, 4).

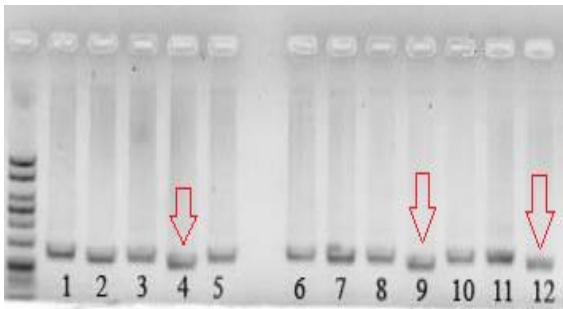


Рис. 3. Електрофореграма в 2% агарозному гелі за МС-маркером *Satt365* сортів сої: 1 – 'Подяка', 2 – 'Кобза', 3 – 'Мавка', 4 – 'Гєба', 5 – 'Полтава', 6 – 'Ромашка', 7 – 'Галина', 8 – 'Золотиста', 9 – 'Рось', 10 – 'Вілана', 11 – 'Harosoy' ОТ89-5, 12 – 'Cormoran' АС

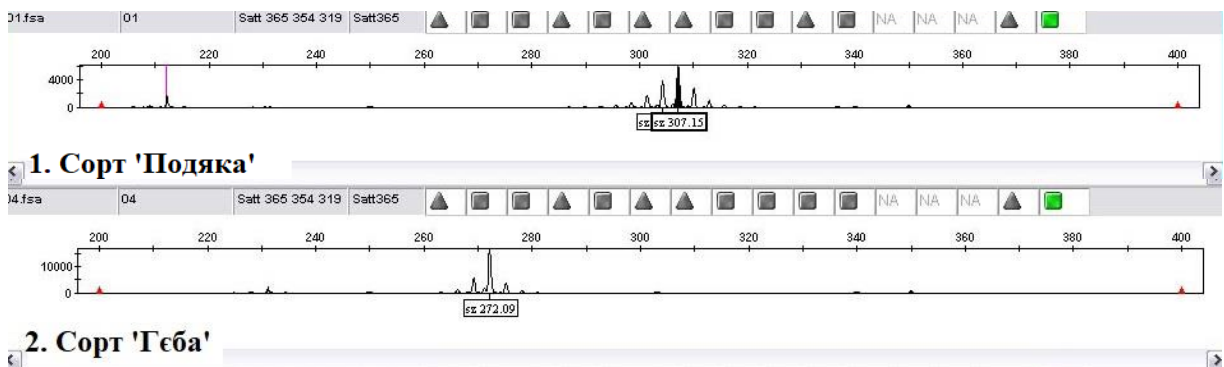


Рис. 4. Електрофоретичний спектр фрагментів ампліфікації з МС-маркером *Satt365* сортів сої, виявлений за допомогою генетичного аналізатора ABI PRISM® 3500

За результатами мікросателітного аналізу встановлено, що мікросателітні локуси *Satt229* і *Satt354*, не є діагностичними маркерами, як то вказували Molnar et

al. (2003) для визначення алелів за генами *E3*, *E4*, тому алельний стан цих генів уточнювався нами за допомогою алель-специфічної ПЛР. Додаткове генотипування, як рекомендовано Xu et al. (2013), Kurasch et al. (2017), за алелями *E3-Mi/E3-Ha/e3-tr* локусу *E3*, показало, що наявні контрольні зразки з сортів ‘Maple Arrow’ та ‘Рось’ з доміантним алелем *E3* за даними літератури, виявилися носіями фрагменту ампліфікації розміром 275 п.н., який детектує рецесивний алель *e3-tr*. Сорти ‘Подяка’, ‘Галина’ мали фрагмент ампліфікації розміром 558 п.н., що за даними Xu et al. (2013), відповідає доміантному алелю *E3-Ha*. Xu et al., (2013) відзначили, що більшість генотипів, попередньо визначених як носії доміантного алелю *E3*, після секвенування нуклеотидної послідовності локусу *E3*, виявилися носіями дисфункціонального алелю *e3-tr* (truncated), з делецією 3' регіону, включаючи четвертий екзон (Watanabe et al., 2009) і, таким чином, продукували усічені білки гену *GmPHYA3* (*E3*). За локусом *E4* доміантний алель, визначали за розміром фрагмента ампліфікації 1229 п.н. в алель-специфічній ПЛР (Kurasch et al., 2017), детектували в генотипах сортів ‘Подяка’, ‘Полтава’, ‘Галина’, а сорти ‘Золотиста’, ‘Мавка’ мали фрагмент розміром 837 п.н., який є специфічним до рецесивного алелю *e4-SORE-1*, з інсерцією в послідовності кодуючої ДНК в 6238 п.н. (схожий на ретротранспозон (*Ty1/copia*)) (Swaminathan et al., 2008, Tsubocura et al., 2013).

У сорту ‘Геба’ за результатами ПЛР-аналізу за локусом *E4*, не виявили фрагментів, характерних для алелів *E4* і *e4-SORE-1*, тож, за нашими припущеннями, генотип сорту ‘Геба’ може бути носієм одного з трьох інших дисфункціональних алелів – *e4-kes*, *e4-oto*, *e4-kam*.

За результатами алель-специфічної ПЛР визначили, що переважна більшість досліджених сортів сої 83% та 72% є носіями доміантних алелів *E3* та *E4*, відповідно. Носіями генотипів з рецесивними алелями *e3-tr*, *e4-SORE-1* виявилися сорти ‘Мавка’ і ‘Золотиста’, а у сорта ‘Кобза’ детектовано доміантний алель *E3-Ha* і рецесивний алель *e4-SORE-1* (рис. 5, 6).



Рис. 5. Електрофорез в 1% агарозному гелі фрагментів ампліфікації ДНК сортів сої, отриманих в ПЛР з алель-специфічними маркерами: **а)** до алелю *E3-Ha*: доріжки 1-5 ‘Оксана’ 6, 7, 9, 10 – ‘Maple Arrow’, 11-13 ‘Золотиста’, 14, 15 – ‘Ромашка’, 16-18 – ‘Мавка’; **б)** до алелю *e3-tr*: доріжки 1-2 – ‘Геба’, 3-5 – ‘Мавка’, 6-8 – ‘Ромашка’, 10-12 ‘Золотиста’, 13-15 – ‘Рось’, 16-18 – ‘Maple Arrow’. М – маркер молекулярної маси CLS-MDNA-100BPH DNA Ladder RTU



Рис. 6. Електрофорез в 1% агарозному гелі фрагментів ампліфікації ДНК сортів сої, отриманих в ПЛР з алель-специфічними маркерами: **а)** до алелю *E4*, доріжка 1-4 – ‘Мавка’, 5-6 – ‘Подяка’, 7, 9 – ‘Гєба’, 10-12 – ‘Криниця’, 13-16 – ‘Золотиста’, 17-18 – ‘Вілана’; **б)** до алелю *e4-SORE-1*, доріжка 1-2 – ‘Рось’, 3-4 – ‘Криниця’, 6-7 – ‘Мавка’, 8-9 – ‘Золотиста’, 10-12 – ‘Гєба’, 13-16 – ‘Подяка’, 17-18 – ‘Ромашка’; М – маркер молекулярної маси CLS-MDNA-100BPH DNA Ladder RTU

Можна відзначити, що сорти з однаковими комбінаціями алелів за генами фотоперіодичної чутливості відносилися до різних груп стиглості за даними Abugalieva et al. (2016). Так, сорт ‘Золотиста’ з генотипом *e1 e2 E3 E4 e7* за даними Іванюка, 2012, віднесений до I групи стиглості, а сорт ‘Галина’ з таким самим генотипом *e1 e2 E3 E4 e7* віднесено до II групи. Можливо, сорти сої з селекційних центрів різних регіонів України охарактеризовані оригінаторами відповідно до ознак, які генотип проявляє при вирощуванні в умовах, де він був створений, що і стало підставою для такої невідповідності. Характеристики за групою стиглості можуть змінюватися при вирощуванні сорту в інших умовах і стають менш або більш помітними, коли майбутні сорти порівнюються з сортами, створеними в різних регіонах.

Не встановлено чіткої відповідності між детектованими алельними комбінаціями за МС-маркерами та ранжуванням сортів сої у Державному реєстрі сортів рослин, придатних до поширення в Україні 2019 року відповідно до групи стиглості, але слабка тенденція поєднання ранньостиглих груп з рецесивними алелями, та пізньостиглих груп з домінантними алелями за локусами *E* спостерігається.

Поліморфізм за локусами асоційованими з генами *E* у перспективних для селекції мутантних ліній сої. Досліджено рівень генетичного поліморфізму за мікросателітними та алель-специфічними маркерами 4 вихідних сортів та 10 похідних ліній, отриманих шляхом хімічного мутагенезу. Кількість алелів, детектованих за локусом, варіювала від 2 до 5 із середнім значенням 3,3, всього детектовано 20 алелів. Визначено нові алелі за МС-маркерами, яких не було в вихідних сортах, виявлено зміни розміру алелів у 10 мутантних ліній порівняно з вихідними сортами. За нашими припущеннями, обробка мутагенами могла вплинути на генеративний апарат сої (Жарікова з співавт., 2018), що могло привести до відкритого цвітіння та можливого запилення пилком інших сортів та ліній сої, але ознаки такого перезаплення мусили відобразитися на морфологічних ознаках рослин сої, однак змін за морфологічними ознаками не спостерігали.

За результатами МС-аналізу домінантний алель *E1*, асоційований з МС-маркером *Satt365* виявлено у мутантної лінії ‘Золотиста М16’ і у контрольного сорту ‘Cormoran’ АС. Алель *E2*, близько зчеплений з МС-маркером *Sat_038*, детектовано

лише у референсного за цим локусом сорту 'Рось', тобто вважаємо, що всі 16 зразків представленої вибірки є носіями рецесивних алелів *e2* (табл. 2).

Фрагменти ампліфікації розміром 167 п.н. і 175 п.н., визначені за локусами *Satt100* і *Satt319*, детектують домінантний алель *E7*, й були виявлені в генотипах мутантних ліній 'Оксана М12' і 'Феміда М29'.

Таблиця 2

Алельна характеристика вихідних сортів та мутантних ліній за МС-локусами

Вихідні сорти / мутантні лінії і контрольні сорти	Мікросателітні локуси (п.н.)					
	<i>Satt100</i>	<i>Satt229</i>	<i>Satt319</i>	<i>Satt354</i>	<i>Satt365</i>	<i>Sat_038</i>
'Оксана'	167	230	175	232	301	247
'Оксана М2'	141	230	180	232	301	247
'Оксана М12'	167	234	175	249	301	245
'Оксана М13'	141	234	180	249	301	245
'Золотиста'	141	234	180	178	301	247
'Золотиста М16'	131	230	178	178	270	247
'Золотиста М20'	141	230	180	230	301	247
'Феміда'	110	212	175	230	301	247
'Феміда М29'	167	212	175	178	301	245
'Феміда М32'	113	212	175	230	301	245
'Подільська 416'	110	215	175	230	301	245
'Подільська 416 М33'	141	234	180	230	301	247
'Подільська 416 М38'	141	234	180	230	301	245
'Подільська 416 М40'	113	212	175	230	301	247
'Рось'	145	215	178	178	270	243
'Вілана'	167	234	175	249	301	247
'Harosoy' OT 89-5	167	183	175	216	301	247
'Cormoran AC'	131	183	178	178	270	247
'Maple Arrow'	131	215	178	178	215	247

За результатами однофакторного дисперсійного аналізу за три роки польових спостережень показано, що фактор «МС-локус» достовірно впливав на час цвітіння, і наявність домінантного алелю *E1* у мутантній лінії 'Золотиста М16', що приводило до більш раннього цвітіння (приблизно на 10 днів). При цьому, за фактором «МС-локус» домінантний алель гена *E7* достовірно впливав на час до цвітіння, час дозрівання, довжину періоду сходи-цвітіння та вегетаційного періоду, а генотипи з домінантним алелем *E7* характеризувалися більш пізнім цвітінням (3-9 діб), часом дозрівання та більш довгим вегетаційним періодом (на 10-11 днів) у порівнянні з генотипами з рецесивними алелями *e7* (рис. 7). Щодо ознаки врожайність, лінія 'Оксана М12' показала вищу врожайність з усіх досліджених сортів і похідних ліній. Це, на нашу думку, може бути пов'язане з наявністю в лінії 'Оксана М12' домінантного алелю *E7* за обома МС-маркерами (*Satt100*, *Satt319*), єдиної з усіх мутантних ліній. За даними Аксьонової з співавт., (2014), домінантний алель *E7* сприяє підвищенню врожайності.

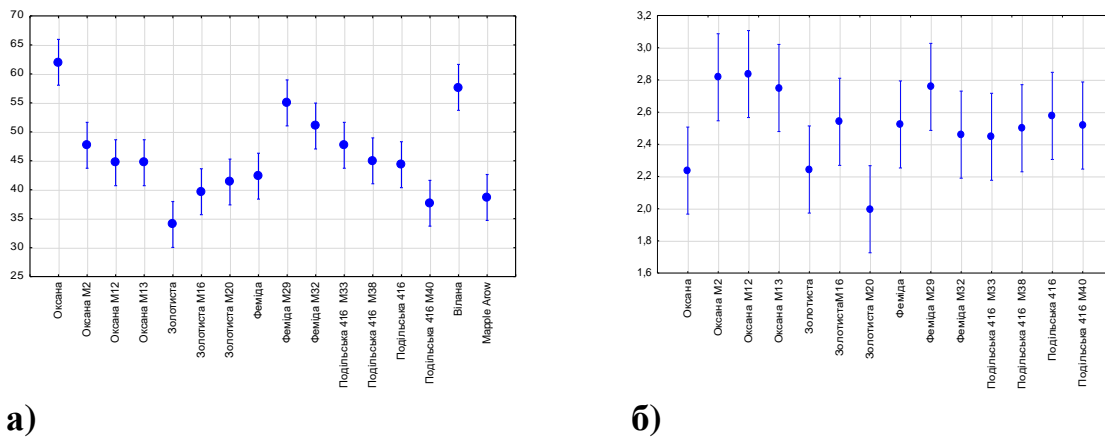


Рис.7. Середні значення \pm стандартна похибка за ознакою: **а)** час дозрівання у днях з початку серпня (вісь координат); **б)** урожайність в т / га (вісь координат) для мутантних ліній та батьківських сортів сої за період спостережень протягом трьох років (2016 - 2018). Вуса (лінії) від показника значення – стандартна похибка

Алелі МС-локусу *Satt100* впливали на всі ознаки, крім часу до цвітіння ($p=0,05$); алелі МС-локусів *Satt319* та *Satt354* впливали на довжину вегетаційного періоду та час дозрівання сої ($p=0,05$); і алелі МС-локусу *Sat_038* впливали на час до цвітіння та період сходи-цвітіння ($p=0,05$).

Мутантні лінії ‘Оксана М2’, ‘Оксана М12’, ‘Оксана М13’, показали достовірно коротший вегетаційний період ($p = 0,05$ і $p = 0,01$) приблизно на 15-18 діб, ніж вихідний сорт ‘Оксана’ завдяки скороченню часу дозрівання та збільшення врожайності (на 0,6 т/га), у порівнянні з вихідною формою сортом ‘Оксана’ (рис. 6 Б). Лінія ‘Феміда М29’ досягла зрілості достовірно ($p = 0,05$) пізніше на 13 днів, ніж вихідний сорт ‘Феміда’. Для сорту ‘Золотиста’ тривалість вегетаційного періоду була коротшою на 28 діб (майже на 1 місяць), порівняно з сортом ‘Оксана’, що свідчить, про більш виражену нечутливість до фотоперіоду першого сорту. Кореляційним аналізом різних комбінацій генотипів за вказаними ДНК-маркерами з фазами розвитку рослин та тривалістю вегетаційного періоду встановлено достовірну кореляцію ($P \leq 0,05$) лише між урожайністю та довжиною вегетаційного періоду ($r = 0,32$). Не було визначено достовірної кореляції між ознаками час до цвітіння та довжиною вегетаційного періоду ($r = 0,03$), між урожайністю і часом дозрівання ($r = 0,03$), урожайністю і часом до цвітіння ($r = -0,22$).

Застосовані мутагени призводили до змін в нуклеотидній послідовності гену *E3*. Так, вихідні сорти ‘Оксана’ і ‘Подільська 416’ мали домінуючий алель *E3-Ha*, фрагмент ампліфікації 558 п.н. з алель-специфічними праймерами, а після проведення обробки мутагеном похідні від зазначених сортів мутантні лінії, характеризувалися наявністю фрагментів ампліфікації – 275 п.н., отриманими із праймерами до алелю *e3-tr*. Для ліній ‘Золотиста М16’, ‘Золотиста М20’ спостерігали також зміни за розміром фрагментів ампліфікації, але в іншому напрямку, алель *e3-tr* відновився до дикого типу і став домінуючим *E3* (рис. 8). Висунуто припущення про наявність зворотної або супресорної мутації, яка призвела до реверсії алелю *E3-Ha*.

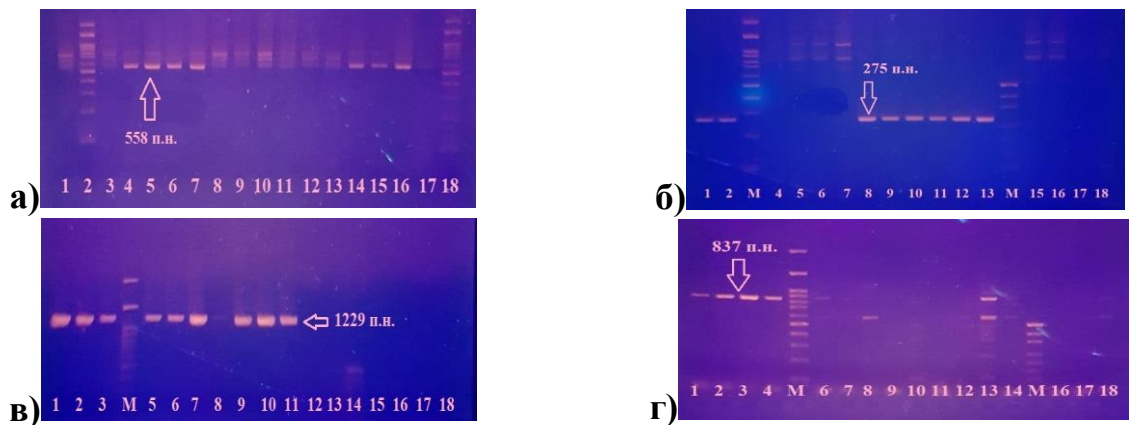


Рис. 8. Електрофорез в 1,0% агарозному гелі фрагментів ампліфікації ДНК сортів і ліній сої з алель-специфічними маркерами: **а)** до алелю *E3-Ha* доріжки 1, 3 – ‘Оксана М12’, 4, 5 – ‘Оксана’, 6, 7 – ‘Оксана М2’, 8-10 – ‘Оксана М13’, 11-13 – ‘Подільська 416 М33’, 14-16 – ‘Подільська 416’, 17 – ‘Подільська 416 М33’, 18 – маркер молекулярної маси CLS-MDNA-100BPH DNA Ladder RTU; **б)** до алелю *e3-tr* доріжки 1, 2 – ‘Золотиста’, 4, 5 – ‘Золотиста М16’, 6, 7 – ‘Золотиста М20’, 8, 9 – ‘Оксана М12’, 10, 11 – ‘Оксана М13’, 12, 13 – ‘Подільська 416 М33’, 15-18 – ‘Подільська 416’; **в)** до алелю *E4* доріжки 1-3 – ‘Оксана’, 5, 6 – ‘Оксана М2’, 7, 8 – ‘Оксана М12’, 9-11 ‘Оскана М13’, 12, 13 – ‘Золотиста’, 14, 15 – ‘Золотиста М16’, 16, 18 – ‘Золотиста М20; **г)** до алелю *e4-SORE-1* доріжки 1, 2 – ‘Золотиста’, 3, 4 – ‘Золотиста М16’, 6, 7 ‘Золотиста М20’, 8-10 – ‘Феміда’, 11, 12 – ‘Феміда М29’, 13, 14, 16 – ‘Феміда М32’, 17, 18 ‘Подільська 416’; М – маркер молекулярної маси - CLS-MDNA-100BPH DNA Ladder RTU

За результатами ПЛР-аналізу з алель-специфічними маркерами до локусів *E3*, *E4* в дослідженій вибірці сортів і мутантних ліній більше 70% генотипів виявилися носіями домінантних алелів *E3*, *E4*.

Таким чином, можемо відмітити, що генотипи з домінантними алелями за локусами *E3*, *E4*, *E7* мають більш тривалий вегетаційний період та підвищену врожаність в умовах вирощування, характерних для агро-кліматичної зони Лісостепу України. Більшу врожайність сортів з домінантними алелями *E3*, *E4*, *E7* спостерігали і в дослідженнях 86 сортів вирощених в умовах Білорусі (52°–54° Півн.ш.) (Rosenzweig et al., 2003) та 120 сортів і ліній, вирощених в Казахстані (53° Півн.ш.) (Abugalieva et al., 2016).

Генетико-біохімічні особливості сортів і ліній сої та їх кореляції з генами чутливості до фотоперіоду. Антиоксидантна система знижує шкідливу дію вільних радикалів та активних форм кисню (АФК) (Колупаєв, 2013), які є інтегративними сигнальними молекулами і відіграють важливу роль у багатьох біологічних процесах та функціонують разом з іншими сигнальними шляхами (Сахно, 2017). Інформація щодо можливих зв'язків між сигнальними шляхами систем антиоксидантної і фотоперіодичної чутливості у рослин сої на сьогодні відсутня. За нашими припущеннями, дослідження показників активності ферментів антиоксидантної системи у сортах і лініях сої, та аналіз їх кореляційних зв'язків зі станом алелів, чутливих до фотоперіоду локусів *E*, нададуть можливість передбачати генотипи з вищою адаптаційною спроможністю, пластичністю, а отже і

з прогнозованою стабільністю врожаю стосовно стресових абіотичних чинників. Тобто, за нашою гіпотезою, існує зв'язок активності ферментів антиоксидантної системи з алельним станом генів *E* і врожайністю рослин сої. На виборці з 36 сортів і ліній сої, проводився загальний аналіз, досліджено кореляційні зв'язки електрофоретичних спектрів ензимів – пероксидази (POX) і супероксиддисмутази (SOD) – з алельним станом генів *E* і показниками врожайності попередньо досліджених певних сортів і ліній сої. Додатково, індивідуальні рослини двох сортів і двох ліній сої, окрім зазначених вище ферментів, аналізували електрофоретичний спектр НАДФ·Н-оксидази (NOX).

В досліджених 36 зразках сої виявлено до 14 електрофоретичних форм пероксидази, сорти та лінії відрізнялися між собою за загальною пероксидазною активністю та за розташуванням окремих форм ензиму у спектрі.

Спектри POX умовно поділено на п'ять зон: малорухлива-5 (відносна електрофоретична рухливість R_f 0,01-0,06), малорухлива-4 (R_f 0,08-0,14), області середньої рухливості 3 (R_f 0,18-0,21) і 2 (R_f 0,24-0,31) та швидкорухлива зона (R_f 0,34-0,37). Розподіл форм у спектрі мав нерівномірний характер: у середньому більше половини ензимної активності знаходилося у зонах середньої рухливості (R_f від 0,18 до 0,32), а біля третини у частині спектра з низькою рухливістю (R_f 0,01-0,06).

Аналіз спектрів ферменту SOD показав наявність до 15 електрофоретичних форм. У спектрі SOD чітко виявлялася мажорна зона (R_f 0,50-0,57), в якій у середньому зосереджувалось майже 80% всієї активності ензиму.

За результатами кореляційного аналізу за Пірсоном, доміантний алель гена *E3* демонстрував асоційованість з деякими формами як POX, так і SOD, а доміантний алель гену *E1*, напевно, проявляє свою дію без залучення зазначених ензимів. Встановлено помірну позитивну кореляцію доміантного алелю гену *E7* з мало рухливими формами (R_f 0,06-0,21) та помірну негативну з середньо рухливими (R_f 0,021-0,34) частками форми пероксидази. Швидкі форми ферменту з електрофоретичною активністю (R_f 0,34-0,37) не демонстрували асоційованості з доміантним алелем *E7* (табл. 3).

Як видно, багато форм пероксидази демонструє зв'язок з алельним станом локусу *E7*. Цей висновок цілком співпадає з результатами, отриманими за дослідження сорту 'Феміда' та ліній, одержаних на її основі (Топтиков з співавт., 2018).

Встановлено слабкий зворотній зв'язок ($r=-0,17$) за загальною активністю фермента супероксиддисмутази з показниками врожайності сої. Інших зв'язків за отриманими результатами показників активності ферментів антиоксидантної системи з врожайністю не виявлено.

За результатами алозимного аналізу сортів 'Korada' і 'Феміда' і двох похідних ліній 'Феміда M29', 'Феміда M32' виявлено сім локусів POX і по шість локусів NOX і SOD.

Всього з 19 локусів досліджених ензимів 15 були поліморфними з двома виявленими алелями. За ген-ензимними системами досліджені зразки сої характеризувалися значною поліморфністю (0,79).

**Кореляція експресивності ферментів POX і SOD та станом генів
фотоперіодичної чутливості E**

Генетичні показники (алелі генів)	Показники спектрів								Співвідношення активності POX/SOD
	POX				SOD				
	Частка форми з Rf 0,04	Частка форми з Rf 0,06	Частка форми з Rf 0,21	Частка форми з Rf 0,24	Частка форми з Rf 0,31	Частка фракції з Rf 0,24-0,31	Частка форми з Rf 0,63	Частка форми з Rf 0,72	
<i>E1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E7</i>	0,32*	0,56**	0,33*	-0,33*	-0,31*	-0,37*	-	-	-
<i>E3</i>	-	0,54**	0,39*	-	-	-	-	0,59**	-
<i>E4</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,35*
Алельна комбінація за локусами <i>E3</i> і <i>E4</i>	-	-	-	-	-	-	0,43**	-	0,32*

Примітка: *, ** - значення коефіцієнта достовірно при $p < 0,05$ і $p < 0,01$ відповідно, - достовірних значень немає

За частотою генотипів встановлено, що лінія ‘Феміда М32’ відрізнялася від сорту ‘Феміда’ за 5 локусами (33%), лінія ‘Феміда М29’ за 9 локусами (60%), сорти ‘Феміда’ і ‘Korada’ не схожі між собою за 10 з 15 поліморфних локусів (67%). Найбільш сильний кореляційний зв'язок з алелем *E7* виявлений для локусів POX-7 і SOD-4 (коефіцієнти кореляції $r = -0,80$ і $0,71$ відповідно). З тривалістю вегетаційного періоду найсильніше корельований локус SOD-3 ($r = 0,71$). За іншими комбінаціям кореляційна взаємодія була більш слабкою.

Характеристика за мікросателітними та алель-специфічними маркерами локусів E ліній сої, отриманих шляхом гібридизації.

Загалом у трьох родинях ліній покоління (F₇₋₈) від схрещувань: ‘Linia103’ x ‘Korada’ – 7 ліній (родина I), ‘Оксана’ x ‘Labrador’ – 5 ліній (родина II), ‘Maple Belle’ x ‘Sreska72’ – 7 ліній (родина III) виявлено 25 алелів за шістьма МС-локусами, тобто 4,2 алеля на локус. Значення індексу поліморфності за дослідженими МС-локусами, варіювало від 0,44 до 0,69 (в середньому 0,55). Частота мажорних алелів знаходилася в межах 0,40 до 0,72, в залежності від локусу.

За локусом *Satt365*, асоційованим з геном *E1*, сорти ‘Korada’ і ‘Labrador’ показали фрагмент ампліфікації розміром 270 п.н. Такий самий розмір фрагментів детектовано у референсного сорту ‘Cormoran AC’, що згідно з даними Розенцвейг з співавт. (2008), є носієм домінантного алелю *E1*, чутливим до фотоперіоду. У батьківських форм ‘Linia103’, ‘Оксана’, ‘Maple Belle’ розмір фрагменту ампліфікації становив 301 п.н., як і в сорту ‘Галина’, останій за даними Абугалієвої з співавт. (2016), є носієм рецесивного напів функціонального алелю *e1-as* (рис. 9).

За результатами МС-аналізу генотипи сортів ‘Korada’, ‘Labrador’ і ліній ‘СР-II №2365’, ‘СР-II №2367’, ‘СР-II №2369’ є носіями домінантного алеля *E1*, а сорти ‘Linia103’, ‘Оксана’, ‘Maple Belle’ та всі інші лінії, отримані шляхом гібридизації, носії фрагменту ампліфікації розміром 301 п.н., несуть напів функціональний алель *e1-as*. Вийняток склали сорт ‘Sreska 72’ і похідні від нього гібридні лінії

‘СР-II №2372’, ‘СР-II №2375’, генотипи яких за локусом *Satt365* показали фрагмент ампліфікації розміром 314 п.н., який віднесено нами до рецесивного алелю *e1*, для визначення точної форми потрібно додаткове тестування за алель-специфічною ПЛР.

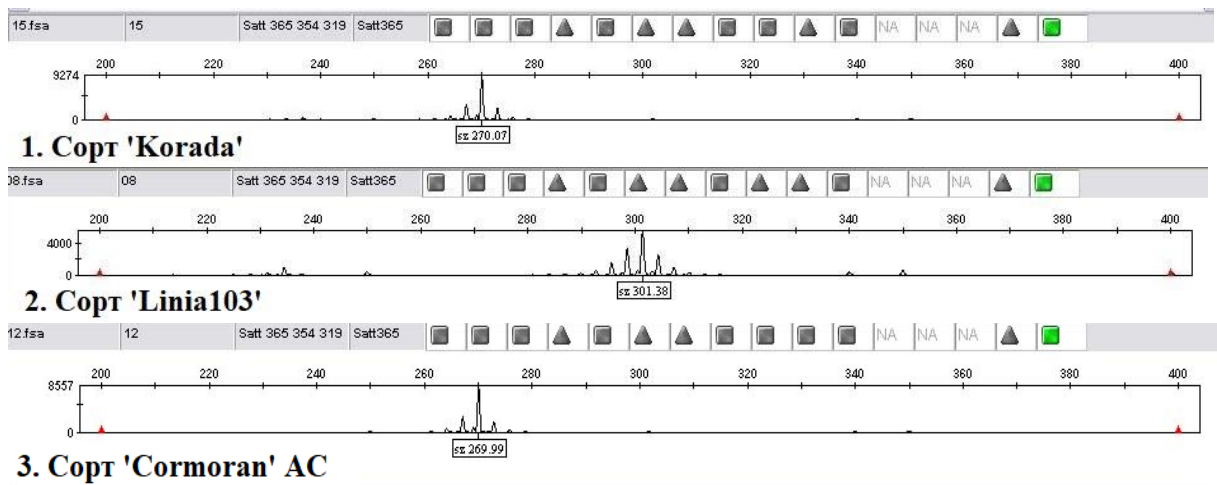


Рис. 9. Електрофоретичний розподіл продуктів ампліфікації ДНК зразків сої за локусом *Satt365* в 7 % ПААГ отриманий на генетичному аналізаторі ABI PRISM® Genetic Analyzer 3500

Домінантний алель *E2* за даними Аксьонової з співавт. (2014), присутній у рослин сої з фрагментом ампліфікації 243 п.н. за локусом *Sat_038*, в нашому дослідженні такий алель виявлений лише у контрольного сорту ‘Рось’. Всі інші лінії трьох родин показали фрагменти більшого розміру за цим локусом: 245 п.н., 247 п.н., 249 п.н. Тобто, батьківські сорти і лінії-нащадки можуть нести різні форми рецесивного алелю *e2*, (*e2-ns* або *ft2*), які сприяють ранньому цвітінню (Watanabe et al., 2011, Wang et al., 2016).

За результатами МС-аналізу та даними Molnar et al. (2003), щодо зчеплення МС-локусів з *E* генами, у ліній родини I за локусом *E3* ми припускали наявність рецесивної форми нефункціонального алелю *e3*. Однак, базуючись на алельних характеристиках МС-локусів, ми не мали можливості точно діагностувати форму алелів за отриманими результатами та віднести лінії до відомих функціональних алелів – *E3-Ha*, *E3-Mi*, чи нефункціональних – *e3-ns*, *e3-fs*, *e3-tr*, *e3-Mo*, які визначає Xu et al., (2013). Тож, ми провели ПЛР-аналіз з алель-специфічними маркерами до алелів *E3-Ha*, *E3-Mi*, *e3-tr* і встановили, що рідкісний алель *E3-Mi* в генотипах трьох досліджених родин відсутній, а за алелями *E3-Ha* і *e3-tr* спостерігався поліморфізм.

Близько 70 % генотипів вибірки є носіями доміантних алелів *E3-Ha*, *E4*. Батьківські сорти і лінії-нащадки родин I і II виявилися носіями фрагменту розміром 588 п.н., який за даними Xu et al. (2013), відповідає доміантному алелю *E3-Ha*. Домінантні алелі гену *E3* асоціюються з тривалішими строками переходу до цвітіння і подовженням тривалості вегетаційного періоду, а всі три нефункціональні рецесивні алелі *e3* сприяють ранньому зацвітінню та ранній стиглості сої (Tardivel et al., 2014), що узгоджується і з результатами наших досліджень. Всі представники родини III характеризувалися наявністю рецесивного алелю *e3-tr*, який відповідає фрагменту розміром 275 п.н. При визначенні алелів з алель-специфічними

маркерами до гена *E4* у більшості генотипів вибірки виявлено фрагмент ампліфікації розміром 1229 п.н., який за даними Xu et al. (2013) і Kurasch et al. (2017) відповідає алелю *E4*, а в сортах ‘Korada’, ‘Labrador’, ‘Maple Belle’ та гібридних ліній ‘СР-I №2250’, ‘ПСВ-I №4001’, ‘СР-II №2375’, ‘СР-II №2372’ нами детектовано продукт ПЛР розміром 837 п.н., який вказані дослідники відносили до нефункціонального алелю *e4-SORE-1* (рис. 10).



Рис. 10. Електрофореграма в 1,0% агарозних гелях продуктів ПЛР ДНК сортів і ліній сої з алель-специфічними маркерами до алелів: **а)** *E3-Ha* доріжки 1, 3 – ‘Linia 103’, 4-5 – ‘Korada’, 6, 7 – ‘СР-I № 2250’, 8-9 – ‘СР-I №2226’, 10, 12 – ‘СР-I №2220’, 13-15 – ‘СР-I №2234’, 16-18 – ‘СР-I №2265’; **б)** *e3-tr* доріжки 1, 2 – ‘Labrador’, 3, 6, 7 – ‘Maple Belle’, 4, 5 – ‘ПСВ-I №4001’, 8-10 – ‘Sreska72’, 12, 13 – ‘СР-II №2377’, 14, 15 – ‘СР-II №2367’, 16-18 – ‘ПСВ-II №4017’, **в)** *e4-SORE-1* доріжка 6 – ‘Maple Belle’, 7-9 – ‘Sreska72’, 10, 11 – ‘СР-II №237’, 12-13 – ‘ПСВ-I №4005’; *E4* доріжки 14-15 – ‘СР-II №2365’, 16-18 – ‘СР-II №2369’; М – маркер молекулярної маси - CLS-MDNA-100BPH DNA Ladder RTU

Батьківські форми родини I не відрізнялися один від одного і від ліній-нащадків за локусами *Satt319* (180 п.н.) та *Satt354* (249 п.н.). За локусом *Satt100* у сорту ‘Korada’ детектували фрагмент ампліфікації 131 п.н., що відповідає продукту ПЛР, отриманому для контрольного сорту ‘Maple Arrow’, який за даними Molnar et al. (2003), несе рецесивний алель *e7*. При цьому, батьківський сорт ‘Linia103’, як і всі нащадки родини I, мали фрагмент розміром 141 п.н., який відрізняється від розміру домінантного алелю за локусом *E7* (167 п.н.), що присутній у контрольних сортах ‘Вілана’ та ізолінії ‘Harosoy’ OT89-5. Останні за даними Molnar et al. (2003) та Розенцвейг з співавт. (2008), визначені носіями домінантного алелю *E7*, що детектується у ПЛР з МС-маркерами за локусами *Satt100* і *Satt319*. У трьох родин сої за допомогою МС-аналізу встановили, що розмір продуктів ампліфікації 167 п.н. за локусом *Satt100*, переважно зустрічався в генотипі в комбінації з продуктом ампліфікації розміром 175 п.н. за локусом *Satt319*, за винятком однієї гетерозиготної лінії ‘КР-II №3035’, яка виявилася носієм двох фрагментів 131 п.н. та 167 п.н. за локусом *Satt100* (рис. 11).

За результатами МС-аналізу, алель-специфічної ПЛР встановили, що у батьківських сортів і похідних ліній сої, фрагмент розміром 270 п.н. за локусом *Satt365* (алель *E1*) поєднувався з фрагментом розміром 131 п.н. за локусом *Satt100*, який попередньо віднесений до рецесивного алелю *e7*.

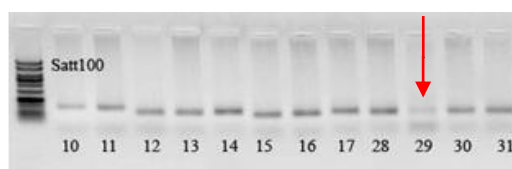


Рис. 11. Електрофореграма продуктів ампліфікації в 2% агарозному гелі. Стрілкою відмічено лінію КР-II №3035- гетерозиготну за локусом *Satt100*

За даними Molnar et al. (2003), ген *E1* є близько зчепленим з *E7* (2,2 сМ), і можливо саме така комбінація алелів *E1*₂₇₀ *e7*₁₃₁ сприяє скороченню фази сходивцвітіння (на 5–7 діб) в умовах Вінницької області. Таку ж саму тенденцію демонстрували сорт ‘Labrador’ та лінія ‘ПСВ-I №4001’ (нащадок схрещування родини II), з генотипами з алелем 215 п.н. за локусом *Satt229* (домінантний алель *E3*), які переходили до цвітіння в середньому на 36,5 день, що на 6 діб раніше ніж генотипи-носії алелю 234 п.н. за цим локусом, до останніх відносяться сорт ‘Maple Belle’, всі лінії родини III, сорт ‘Korada’ і лінія ‘СР-I №2234’.

За локусом *Satt319* нами спостерігалася тенденція до подовження фази цвітіння-дозрівання, яка у генотипів з алелем 175 п.н. (домінантний алель *E7*) складала $78,8 \pm 3,2$ діб, що порівняно з генотипами, які характеризувалися алелями 178 п.н., і 180 п.н. (рецесивні алелі *e7*), була тривалішою на 5,1 та 6,7 діб, відповідно.

На ознаку довжина вегетаційного періоду, за нашими даними, достовірно впливали алелі локусів *Satt100*, *Satt319*, *Sat_038*. Сорт ‘Оксана’ і лінія ‘КР-II №3035’, які з алелем 167 п.н. за локусом *Satt100* (домінантний алель *E7*), показали тривалість вегетаційного періоду у 120,8 діб, що на 9,8 діб триваліше за рослини з генотипами – носіями 131 п.н. (рецесивний алель *e7*) за цим локусом. Вегетація рослин з генотипами, що характеризуються алелями 175 п.н. за локусом *Satt319* (домінантний алель *E7*), тривала на 11 діб довше, порівняно з вегетаційним періодом рослин, для яких був визначений алель 178 п.н. (рецесивний алель *e7*), що в середньому за період вегетації нараховувала 109 діб для сорту ‘Labrador’, ліній ‘СР-II №2365’, ‘СР-II №2367’, ‘СР-II №2369’.

Рослини сої, що характеризувалися фрагментом ампліфікації розміром 245 п.н. за МС-локусом *Sat_038*, мали період вегетації тривалістю 111,8 діб, достовірно коротший на 7,9 діб від показника за цієї ж ознакою у генотипів з фрагментом 249 п.н., тривалість вегетаційного періоду в яких складала 119,7 діб.

Однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA на підставі даних за три роки польових спостережень дозволив виявити, що за ознакою час до цвітіння (ЧДЦ) рослини всіх трьох родин, у межах родин між собою суттєво не відрізнялися. За часом дозрівання (ЧД) батьківські сорти та гібридні лінії родини III мали достовірні відмінності ($p < 0,05$). Так, за критерієм Тьюкі HSD тесту (Tukey's honestly significant difference – достовірно значущі різниці), попарних порівнянь групових середніх, батьківський сорт ‘Maple Belle’ і лінії ‘СР-II №2372’, ‘СР-II №2375’, ‘КР-I №3014’ достовірно відрізнялися від сорту ‘Sreska72’ (ЧД = 88 днів). Вказані зразки сої дозрівали на 28, 20, 18 і 23 доби швидше, порівняно з останнім ($p_{HSD} < 0,05$). За ознакою тривалість вегетаційного періоду (ТВП) попарне порівняння ліній і батьківських сортів між собою у родині II показало відмінності між сортом ‘Оксана’

і лінією СР-II №2367, яка мала тривалість вегетації на 20 діб коротшу, ніж сорт 'Оксана' ($p_{UHSD} < 0,05$). Представники інших двох родин не відрізнялися між собою ні за ЧД, ні за ТВП. За ознаками врожайності та маса тисячі зерен (МТЗ) лінії і батьківські сорти в трьох родинах між собою істотно не відрізнялися. Достовірно значимих відмінностей у попарних порівняннях нами встановлено не було.

Для визначення впливу факторів «генотип» і «рік», за результатами МС-аналізу в поєднанні з результатами алель-специфічної ПЛР, у дослідженій вибірці передбачено 10 генотипів або алельних комбінацій за генами *E* (табл. 4).

Таблиця 4

Середні значення за агрономічними ознаками (за 2015-2017 роки), згруповані за фактором впливу «генотип» для сортів і гібридних ліній сої

Комбінація алелів за локусами <i>E</i>	Час до цвітіння	Час дозрівання	Тривалість вегетаційного періоду	Врожайність	Маса тисячі зерен
<i>e1-as e2 E3-Ha E4 e7</i>	40,3	69,2	109,5	2,12	120,4
<i>E1 e2 E3-Ha e4 e7</i>	35,2	79,5	114,7	2,82	138,9
<i>e1-as e2 E3-Ha E4 E7</i>	42,7	82,0	128,0	1,99	115,7
<i>E1 e2 E3-Ha E4 e7</i>	38,2	72,3	108,6	2,37	149,3
<i>e1-as e2 E3-Ha E4 E7/e7-?</i>	38,3	80,0	118,3	3,0	-
<i>e1-as e2 E3-Ha e4 E7</i>	39,3	74,3	113,7	2,22	174,7
<i>e1-as e2 e3 e4 e7</i>	39,7	66,3	106,0	2,80	153,9
<i>e1 e2 e3 E4 e7</i>	38,3	88,0	126,3	3,32	145,0
<i>e1 e2 e3 e4 e7</i>	45,0	68,6	113,7	2,29	-
<i>e1-as e2 e3 E4 e7</i>	44,3	69,5	113,8	2,30	149,4
НІР _{0,05}	4,24	6,74	7,83	-	-
НІР _{0,01}	6,02	9,57	11,13	-	-

В умовах Правобережного Лісостепу сорти 'Korada' і 'Labrador', носії алелів *E1* і *E3-Ha e7* переходили до фази цвітіння майже на 10 діб раніше ($p_{UHSD} < 0,05$), ніж лінії 'СР-II №2372', 'СР-II №2375', 'КР-I №3014', 'КР-II №3045', носії напівфункціонального *e1-as* і рецесивних алелів *e1* і *e3-tr e7* за цими локусами. Вважаємо, цей ефект відбувається завдяки плейотропному впливу алелів локусів *E* (*E1* і *e7*), та є характерним для вказаного регіону вирощування. За ознакою дозрівання лінії з генотипом 8 (*e1 e2 e3 E4 e7*) дозрівали за 88 діб, що значно довше, порівняно з лініями-носіями генотипу 7 (*e1-as e2 e3 e4 e7*) ($p_{UHSD} = 0,01$), генотипу 9 (*e1 e2 e3 e4 e7*) ($p_{UHSD} = 0,03$), які мали час дозрівання тривалістю близько 68 діб.

За тривалістю вегетаційного періоду рослини з генотипом 3 (*e1-as e2 E3-Ha E4 E7*), до якого відноситься сорт 'Оксана', мали достовірно довшу тривалість вегетації, а ніж рослини з генотипом 7 (*e1-as e2 e3 e4 e7*), який детектовано в канадського сорту 'Maple Belle'.

За даними літератури (Розенцвейг з спіавт., 2008, Xu et al., 2013, Kurasch et al., 2017), рослини носії генотипів з рецесивними алелями за локусами *E*, проявляють меншу чутливість до фотоперіоду, мають коротшу тривалість вегетації, порівняно з рослинами-носіями домінантних алелів за цими локусами.

За результатами двохфакторного аналізу фактори «Рік» і «Генотип», впливали на час до цвітіння, час дозрівання і тривалість вегетаційного періоду, а взаємодія факторів була достовірно значимою для ознаки час до цвітіння ($p \leq 0,05$).

Рослини носії генотипів з комбінацією домінантних алелів *E1 E3-Ha* і рецесивного *e7* (генотип 2), на 10 днів раніше переходили до цвітіння, у порівнянні з рослинами-носіями алельної комбінації з напів-функціональним алелем *e1-as (e1)* і рецесивними алелями *e3-tr e7* (генотипи 9, 10), що можна пояснити характерними умовами вирощування у Вінницькій області. Генотипи сої з алелями *e1 E4* на фоні рецесивних алелів за іншими локусами *E* (генотип 8) дозрівають на 20 днів довше, на відміну від генотипів з алелями *e1 e4* (генотип 9) і *e1-as E4* (генотип 10) з таким самим фоном. Отримані нами дані свідчать, що поєднання алелів *e1 E4* може впливати на час дозрівання, подовжуючи його, що співвідноситься з раніше опублікованими результатами Xu et al., (2013). Вказані автори тестували 53 нечутливих до фотоперіоду сорти сої в локаціях помірних географічних широт Північної півкулі.

Цікаво відмітити, що рослини з генотипами з рецесивними алелями *e1 e3-tr e7* (генотипи 7, 9) *e1-as e3-tr e7* (генотип 10) мали коротший період вегетації, порівняно з генотипами з домінантними алелями за цими ж локусами. Це свідчить про меншу чутливість до фотоперіоду перших, що можна співставити з даними Розенцвейг з спіавт., (2008), Xu et al., (2013), Kurasch et al., (2017) (рис. 12).

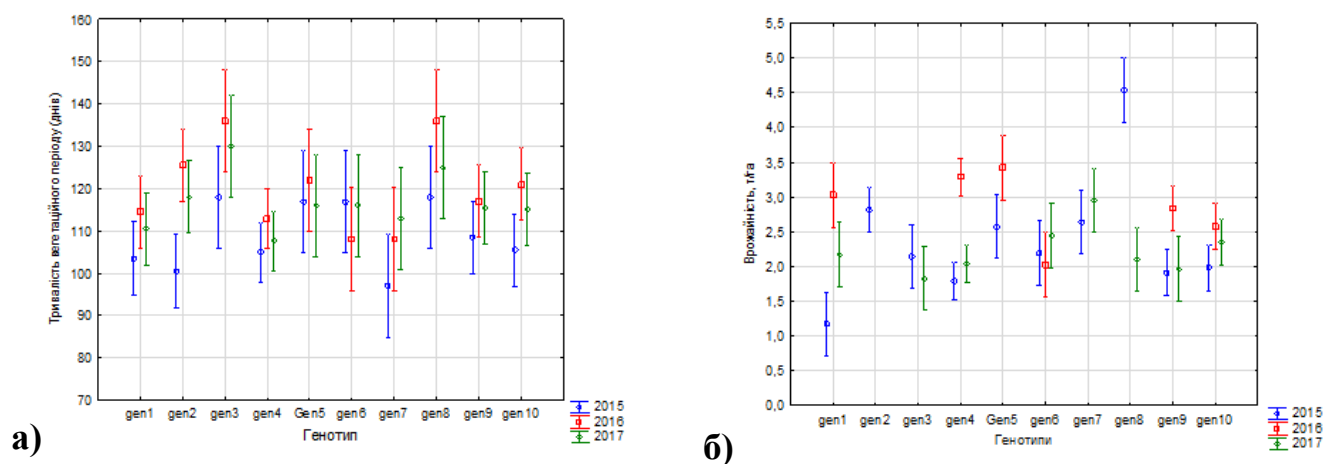


Рис. 12. Графік середніх значень для сортів і гібридних ліній сої, згрупованих за фактором впливу «генотип-рік» за період трирічних спостережень (2015 – 2017 роки): **а)** за ознакою тривалість вегетаційного періоду у днях з початку перших сходів; **б)** за ознакою врожайність у т/га. Вуса (лінії) від показника значення – межі довірчого інтервалу $\pm 0,95$, $p=0,05$

Таким чином, для ліній, отриманих шляхом гібридизації з рецесивними алелями за локусом *E7* з генотипами *e1-as E4 e7* (генотип 1), *E1 E4 e7* (генотип 4), *e1-as e4 e7* (генотип 7), *e1 e4 e7* (генотип 9), *e1 E4 e7* (генотип 10), характерна скорочена тривалість вегетаційного періоду, порівняно з іншими генотипами дослідженої вибірки, а лінії-носії генотипів з алелями *e1-as E4 E7* (генотип 3) *e1 E4 e7* (генотип 8), навпаки, відзначилися подовженим вегетативним періодом в умовах вирощування у Вінницькій області, що можна співвіднести з даними Розенцвейга з

співавт. (2008), які проводили дослідження на 85 сортах і лініях сої на території Білорусі (52° півн. ш.)

Щодо двофакторного аналізу впливу варіанси (рік, генотип) на ознаку врожайності, необхідно відзначити рослини-носії генотипів 6, 9, 10, які демонстрували відносну стабільність врожаю за три роки польових досліджень (рис. 16). Ішні генотипи проявляли сильний відклик на фактори впливу умов навколишнього середовища та відрізнялися за річними показниками стабільності врожаю. Також детектовано слабку позитивну кореляція між тривалістю вегетаційного періоду та врожайністю рослин сої ($r=0,26$).

Отримані характеристики за агрономічними ознаками для досліджених сортів і гібридних ліній сої відповідно до алельного стану за локусами генів *E1*, *E2*, *E3*, *E4*, *E7*, дають можливість визначати генотипи, які можуть бути корисними для використання як донори генів фотоперіодичної чутливості, для селекції нових сортів з передбачуваною тривалістю стадій розвитку рослин. Обрання сорту з визначеною алельною комбінацією генів чутливості до фотоперіоду надає можливості для прогнозування строків збору врожаю і очікуваної врожайності для певних регіонів вирощування.

Результати статистичного аналізу показують, що продуктивність сортів сої змінюється залежно від тривалості періоду вегетації та окремих її фаз. У той же час, на тривалість вегетаційного періоду рослин сої достовірно впливає генотип обраного сорту, регіон вирощування та погодні умови року. Таким чином, збільшення показників врожайності сортів сої в Україні значною мірою залежить від правильного вибору групи стиглості сортів для конкретного регіону вирощування.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі проаналізовано та узагальнено результати дослідження з визначення генетичного поліморфізму за генами *E* – фотоперіодичної чутливості для українських сортів і ліній сої та надано оцінку їх впливу на агрономічні ознаки. Отримані результати дозволяють сформулювати наступні висновки:

1. Визначено високий рівень генетичного поліморфізму за мікросателітними локусами, асоційованими з генами *E1*, *E2*, *E3*, *E4*, *E7*, в досліджених генотипах сої, зокрема, серед 22 сортів, 19 ліній, отриманих шляхом гібридизації, та 10 ліній сої, отриманих шляхом хімічного мутагенезу, за шістьма МС-локусами виявлено 28 алелів (4,7 алеля/локус), значення індексу поліморфності варіювало від 0,44 до 0,71.

2. Встановлено, що більшість сортів і ліній сої української селекції характеризується домінантними алелями за генами *E3* – 70% і *E4* – 75 % за результатами алель-специфічної ПЛР.

3. Використання панелі МС-локусів – *Satt100*, *Satt229*, *Satt319*, *Satt354*, *Satt365*, *Sat_038*, дозволило диференціювати досліджені в роботі сорти сої та запропонувати для них генетичні паспорти. Панель вказаних маркерів може залучатися для диференціації та ідентифікації сучасних сортів сої української селекції для створення генетичних паспортів і захисту авторських прав на сорти сої.

4. Детектовано вплив алелів за локусами *Satt100* і *Satt319*, що визначають домінантний алель гена *E7*, на подовження тривалості періоду вегетації (на 10-11 діб), у порівнянні з носіями рецесивного *e7*, за вирощування в Правобережному Лісостепу.

5. Сорти сої з генотипами з рецесивними алелями *e1 e2 e3 e4 e7* порівняно з генотипами, в яких присутні певні домінантні алелі – *e1 e2 E3 E4 E7*, характеризуються коротшим вегетаційним періодом за вирощування в умовах Правобережного Лісостепу України.

6. Мутагени – похідні тетрагідротіофен-N-діоксиду-3,4-діаміну та тетрагідротіофен-N-діоксиду-3,4-піридину – призводили до генетичної мінливості у геномі сої, до збільшення алельної різноманітності за локусами, зчепленими з *E* генами, та впливали на алельний стан гена *E3* в генотипах ліній сої, отриманих шляхом хімічного мутагенезу.

7. За біохімічними маркерами (пероксидазою, супероксиддисмутазою, НАДФ•Н-оксидазою), виявлено зв'язок експресивності досліджених ензимів з алелями генів *E3, E4, E7*.

8. Рекомендуємо застосовувати генотип мутантної, ранньостиглої лінії ‘Золотиста М16’ як донора генів для створення ранньостиглих сортів сої. Використовувати МС-маркери, як інструмент маркерної селекції для відбору ліній сої з алелями *Satt365*₂₇₀, *Sat_038*₂₄₇, *Satt229*₂₃₀, *Satt354*₁₇₈, *Satt100*₁₃₁, *Satt319*₁₇₈, як таких, що мають прискорені темпи розвитку, зокрема раннє цвітіння та дозрівання. МС-маркери *Satt229* і *Satt354* не можуть бути рекомендованими для ідентифікації алелів генів *E3, E4* в українському генетичному пулі сортів сої.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Охримович О.В., **Жарікова Д.О.**, Чеботар С.В., Чеботар Г.О. Молекулярна будова *E*-генів сої та їх функціональні мутації. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2020. Т. 82. С. 3-13. <https://doi.org/10.30970/vlubs.2020.82.01> (Здобувачем разом зі співавторами проведено аналіз літературних даних, та написано оглядову статтю)

2. **Жарікова Д.О.**, Аксьонова О.А., Чеботар Г.О., Чеботар С.В. Використання мікросателітних локусів, зчеплених з генами *E*, для ідентифікації та паспортизації сортів сої. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2019. Т. 24. С. 80-86. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v24.1083> (Здобувачем особисто проведено дослідження, проведено аналіз літературних даних, узагальнення власних експериментальних даних, разом зі співавторами написано статтю)

3. **Zharikova D.O.**, Chebotar G.O., Aksyonova E.A., Temchenko I.V., Chebotar S.V. Polymorphisms in SSR-loci associated with *E* genes in soybean mutant lines offer perspective for breeding. Agricultural science and practice. 2019. Vol. 6 (3). P.45-55. <https://doi.org/10.15407/agrisp6.03.045> (Здобувачем особисто проведено дослідження, проведено узагальнення експериментальних даних, разом зі співавторами написано статтю)

4. **Zharikova D.**, Ivanyuk S., Chebotar G., Korniychuk O., Chebotar S. Polymorphism of soybean cultivars and breeding lines revealed by marker *Satt100* associated with the *E7* locus, that involved in determination of time to flowering / Breeding Grasses and Protein Crops in the Era of Genomics. Lithuania, Vilnius: Springer Nature, 2018. P. 220-225. https://doi.org/10.1007/978-3-319-89578-9_40 *(Здобувачем разом зі співавторами проведено аналіз літературних даних, узагальнення деяких власних експериментальних даних та написано розділ до монографії)*

5. **Жарікова Д.О.**, Чеботар Г.О., Вільгота М.В., Темченко І.В., Чеботар С.В. Характеристика мутантних ліній сої за локусами *Satt100* та *Satt319*, зчеплених з геном *E7*. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2018. Т. 23 С. 50-56. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v23.989> *(Здобувачем особисто проведено дослідження, проведено узагальнення експериментальних даних, разом зі співавторами написано статтю)*

6. Топтиков В.А., **Жарикова Д.А.**, Г.А. Чеботарь, Темченко И.В., Чеботарь С.В. Генетико-биохимические особенности мутантных линий сои. Вісник Одеського національного університету ім. І.І. Мечникова. Серія біологія. 2018. Т.23, №2 (43). С. 73-94. [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2018.2\(43\).147013](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2018.2(43).147013) *(Здобувачем разом зі співавторами проведено аналіз літературних даних, узагальнення експериментальних даних та написано статтю)*

7. **Zharikova D.O.**, Chebotar G.O., Temchenko I.V., Aksyonova E.A., Chebotar S.V. Polymorphisms of microsatellite loci, associated with photoperiod sensitive *E* genes, in Ukrainian soybean varieties and perspective lines for breeding. theses presented at the Biological Session of Conference “The Importance of G. Gamow's Ideas for Biology of the 21st Century” (13-th of August 2020, Odesa) Odesa I.I. Mechnikov National University, Odesa. Вісник ОНУ. Серія біологія. 2020. Т. 25, № 2 (47). С.203-205.

8. Chebotar S., **Zharikova D.**, Chebotar G., Aksyonova E., Korniychuk O. Polymorphism in SSR-loci associated with *E* genes in soybean mutant lines perspective for breeding. Theses presented at the 3rd Global Congress on Plant Biology and Biotechnology (March 11-13, 2019, Singapore). 2019. P. 63.

9. **Жарікова Д.О.**, Чеботар Г.О., Аксьонова О.А., Чеботар С.В. Визначення алельного стану генів *E1*, *E2*, *E3*, *E4* та *E7* за допомогою зчеплених з ними мікросателітних локусів у сортів сої сучасної селекції. Еколого-генетичні аспекти в селекції польових культур в умовах змін клімату: тези представлені на Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченої 90- річчю з дня народження генетика, селекціонера, професора М.М. Чекаліна (18-19 квітня 2019 р.). Полтавська державна аграрна академія. Полтава, 2019. С. 29.

10. **Жарікова Д.О.**, Темченко І.В., Аксьонова О.А., Чеботар Г.О., Чеботар С.В. Асоціації алельних варіантів за МС-локусами, зчепленими з *E* генами сої, з агрономічними ознаками у ліній отриманих шляхом хімічного мутагенезу. Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур: тези представлені на VII Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених і спеціалістів (с. Центральне, 19 квітня 2019 р.). НААН ім. В.М. Ремесла, М-во аграр.

політики та прод. України, Укр. Ін-т експертизи сортів рослин. Вінниця: ТОВ «Твори», 2019. С. 48-49.

11. Zharikova D., Ivanyuk S., Chebotar G., Korniychuk O., Chebotar S. Polymorphism of soybean cultivars and breeding lines revealed by marker *Satt100* associated with the *E7* locus. “Breeding Grasses and Protein Crops in the Era of Genomics” Book of abstracts of the Joint Meeting of EUCARPIA Fodder Crops and Amenity Grasses Section and Protein Crops Working Group of Oil and Protein Crops Section. September 11-14, 2017, Vilnius, Lithuania. P. 60.

12. Жарікова Д., Войткова В., Чеботар С., Корнійчук О. Поліморфізм селекційних ліній сої визначений за молекулярним маркером *Satt100* до гена *E7* фотоперіодичної чутливості. Підвищення ефективності функціонування сільського господарства в умовах зміни клімату: матеріали Всеукраїнської науково-практичної інтернет конференції (м. Херсон, 9 грудня 2016). Херсон, 2016. С. 52-54

АНОТАЦІЯ

Жарікова Д.О. Поліморфізм за локусами асоційованими з генами *E*, в українських сортах та лініях сої (*Glycine max* (L.) Merr.). – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика. – Одеський національний університет імені І. І. Мечникова. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2021.

Дисертація присвячена вивченню алельного стану генів фотоперіодичної чутливості *E1*, *E2*, *E3*, *E4*, *E7* в генотипах сортів і селекційних ліній сої, створених у різних селекційних центрах України, та оцінці впливу алелів генів *E* на агрономічні ознаки рослин сої, при вирощуванні в Правобережному Лісостепу України.

За допомогою молекулярно-генетичного аналізу за мікросателітними та алель-специфічними маркерами визначено поліморфізм за генами фотоперіодичної чутливості *E1*, *E2*, *E3*, *E4*, *E7* для 22 сортів вітчизняної та іноземної селекції і 29 ліній сої, з яких 19 ліній, створені шляхом гібридизації, 10 ліній, створені за використанням хімічного мутагенезу. У дослідженому матеріалі генотипування за МС-локусами *Sat_038*, *Satt100*, *Satt229*, *Satt319*, *Satt354*, *Satt365* продемонструвало високий рівень генетичного поліморфізму; виявлено 28 алелів (4,7 алелі/локус), що свідчить про високе генетичне різноманіття за дослідженими локусами зчепленими з генами *E*.

За результатами наших досліджень панель з вказаних шести МС-локусів може бути запропонована для диференціації і ідентифікації сучасних сортів сої української селекції та створення їх генетичних паспортів. ПЛР-аналіз з алель-специфічними маркерами до алелів локусів *E3* і *E4* показав, що більшість сортів і ліній сої української селекції характеризується домінантними алелями – 70% за геном *E3* і 75% за *E4*.

Мутагени – похідні тетрагідротіофен-N-діоксиду_{3,4}-діаміну та тетрагідротіофен-N-діоксиду_{3,4}-піридину – призводили до генетичної мінливості у геномі сої, до збільшення алельної різноманітності за локусами, зчепленими з *E* генами, та впливали на алельний стан гена *E3* в генотипах ліній сої, отриманих шляхом хімічного мутагенезу.

Сорти сої з генотипами з рецесивними алелями *e1 e2 e3 e4 e7*, порівняно з генотипами, в яких присутні певні домінантні алелі – *e1 e2 E3 E4 E7*, характеризуються коротшим вегетаційним періодом за вирощування в умовах Правобережного Лісостепу України. Детектовано вплив алелів за локусами *Satt100* і *Satt319*, що визначають домінантний алель гена *E7*, наявність яких призводить до подовження тривалості періоду вегетації (на 10-11 діб довше) у порівнянні з носіями рецесивного *e7*, за вирощування в Правобережному Лісостепу.

За біохімічними маркерами (пероксидазою, супероксиддисмутазою, НАДФ•Н-оксидазою), виявлено зв'язок експресивності досліджених ензимів з алелями генів *E3, E4, E7*.

Рекомендовано застосування генотипу мутантної, ранньостиглої лінії ‘Золотиста М16’ як донора генів для створення ранньостиглих сортів сої, а також використовувати МС-маркери, як інструмент маркерної селекції для відбору ліній сої з алелями *Satt365*₂₇₀, *Sat_038*₂₄₇, *Satt229*₂₃₀, *Satt354*₁₇₈, *Satt100*₁₃₁, *Satt319*₁₇₈, як таких, що мають прискорені темпи розвитку, зокрема раннє цвітіння та дозрівання.

Маркер асоційованна селекція може вдосконалити систему диференціації сортів сої за групами стиглості і використання генетичного поліморфізму за локусами *E* може допомогти у пошуку оптимальних генотипів сої для певних зон вирощування.

Ключові слова: соя, *Glycine max* (L.) Merr., гени *E*, ПЛР-аналіз, мікросателітні маркери, чутливість до фотоперіоду, генетичний поліморфізм, алель-специфічні ДНК-маркери

SUMMARY

Zharikova D. O. Polymorphism at loci associated with *E* genes in Ukrainian soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) varieties and lines. – Manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences, specialty 03.00.22 – molecular genetics. – Odesa I.I. Mechnikov National University. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine. Kyiv, 2021.

This thesis presents the study of the alleles of photoperiodic sensitivity genes *E1, E2, E3, E4, E7* in genotypes of soybean varieties and lines that have been created in different breeding centers of Ukraine, and the evaluation of the effects of alleles of *E* genes on agronomic traits of soybean plants that have grown in Right-Bank Forest-Steppe zone of Ukraine.

Molecular genetic analysis by using microsatellite and allele-specific markers permitted to reveal polymorphism in photoperiod sensitivity genes *E1, E2, E3, E4, E7* genes for 22 varieties and 29 soybean lines, among which 19 lines created by crossing, 10

lines created using chemical mutagenesis. Genotyping at MS loci *Sat_038*, *Satt100*, *Satt229*, *Satt319*, *Satt354*, *Satt365* we have shown a high level of genetic polymorphism in the studied material. There were detected 28 alleles (4,7 alleles / locus), that indicated a high genetic diversity at microsatellite loci linked with *E* genes.

According to our results, the panel of these six MS-markers can be proposed for the differentiation and passportization for modern ukrainian soybean varieties. PCR analysis with allele-specific markers for alleles of *E3* and *E4* genes showed that most of ukrainian soybean varieties and lines characterized by dominant alleles for *E3* gene 70% and 75% for *E4* gene.

Mutagens - derivatives of tetrahydrothiophene-N-dioxide_{3,4}-diamine and tetrahydrothiophene-N-dioxide_{3,4}-pyridine - led to the increase of genetic variability in the soybean genome and allelic diversity at loci linked to *E* genes, and affected the alleles of *E3* gene in genotypes of soybean lines that have been obtained by chemical mutagenesis.

Genotypes of soybean varieties with recessive alleles *e1 e2 e3 e4 e7*, compared to genotypes with alleles *e1 e2 E3 E4 E7*, have been characterized by the shorter growing period in the Right-Bank Forest-Steppe of Ukraine. We detected the effects of alleles at *Satt100* and *Satt319* loci, that linked to the *E7* gene. The dominant allele of the *E7* gene led to the prolongation of the growing season (for 10-11 days longer) in comparison with genotypes-carriers of recessive *e7* cultivated in the Right-Bank Forest-Steppe zone.

We have revealed correlations between of the expression of the enzymes and some alleles of genes *E3*, *E4*, *E7* according to analysis of biochemical markers (peroxidase, superoxide dismutase, NADP H-oxidase).

We recommended the genotype of the mutant early-maturing line 'Zolotyza M16' as a gene donor for creation of early-maturing soybean varieties. The MS-markers *Satt365*₂₇₀, *Sat_038*₂₄₇, *Satt229*₂₃₀, *Satt354*₁₇₈, *Satt100*₁₃₁, *Satt319*₁₇₈ can be useful for marker assisted selection of soybean lines with accelerated rate of development, including early flowering and ripening.

The usage of the marker-assisted selection can be usefull to improve the system of differentiation soybean varieties according to maturity groups and the knowledge of the genetic polymorphism at *E* loci can help in searching the optimal genotypes of soybean for specific growing areas.

Key words: soybean, *Glycine max* (L.) Merr., *E* genes, PCR analysis, microsatellite markers, photoperiod sensitivity, genetic polymorphism, allele-specific DNA-markers

Підписано до друку 09.04.2021.
Формат 60x84/16. Обсяг 0.9 авт.арк. Тираж 100 прим.
Папір офсетний. Зам. №234-04/21

Надруковано у ПП «Студія «Печать»
65082, м. Одеса, провул. Некрасова, буд. 6, кв. 11,
тел.: (048) 789 07 06, buh@pechat.od.ua