П. В. Фисенко, ВНС, к.б.н.

Е. С. Бутовец, СНС, к.с.-х.н.

ФГБНУ «ФНЦ агробиотехнологий Дальнего Востока им. А. К. Чайки»,

Россия, г. Уссурийск, п. Тимирязевский

phisenko@bk.ru

УДК633.34: 577.21

DOI 10.31676/2073-4948-2019-59-343-353

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ В СЕЛЕКЦИИ СОИ В ФНЦ АГРОБИОТЕХНОЛОГИЙ ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА ИМ. А. К. ЧАЙКИ

Реферат. Статья посвящена внедрению молекулярно-генетических методов в селекционный процесс сои. Соя — одна из важнейших сельскохозяйственных культур Дальнего Востока, и для ускорения её селекции необходимо применять современные подходы. Данные, приведенные в работе, получены в процессе подбора родительских пар для гибридизации сои с использованием метода маркирования межмикросателлитных последовательностей (ISSR) с целью скрещивания генетически удаленных сортообразцов для создания гибридов различного морфологического типа и достижения эффекта гетерозиса. Также внедряется метод маркирования микросателлитных локусов (SSR), в силу кодоминантного типа наследования маркеров этого типа позволяющих однозначно выявлять образцы гибридного происхождения. Внедряемые молекулярно-генетические методы (метод один, используются разные маркеры ISSR и SSR) призваны ускорить селекционный процесс за счет исключения сомнительного в происхождении гибридного материала сои из работы селекционера, уменьшая этим нагрузку и объем исследований.

Ключевые слова: селекция сои, генетическая изменчивость, микросателлиты, SSR, ISSR, гибриды

Summary. The article is devoted to the introduction of molecular genetic methods into the soybean breeding process. Soybean is one of the most important crops in the Far East and to accelerate its breeding it is necessary to apply modern approaches. The paper presents the data obtained in the process of selection of parent pairs for hybridization using the method of marking intermicrosatellite sequences (ISSR), in order to cross genetically remote accessions to obtain the effect of heterosis in the resulting hybrids. Also, the method of marking microsatellite loci (SSR) is being implemented, due to the codominant type of inheritance of markers of this type, they allow to uniquely identify samples of hybrid origin. The implemented molecular genetic methods (method one, using different ISSR and SSR markers) are designed to accelerate the breeding process by eliminating the soybean hybrid material of doubtful origin from the work of the breeder, thereby reducing the burden and research volume.

Keywords: soybean breeding, genetic variation, microsatellites, SSR, ISSR, hybrids

Введение

ФГБНУ «ФНЦ агробиотехнологий Дальнего Востока им. А. К. Чайки» ведет на территории Приморского края активную работу по созданию новых высокоурожайных сортов сои с повышенной устойчивостью к стрессовым

факторам среды. Основная задача при этом — создание традиционных (не трансгенных) сортов сои с высоким генетическим потенциалом продуктивности, способных успешно конкурировать по этому признаку с зарубежными аналогами.

Селекционеры центра используют для скрещивания родительские формы сои, отличающиеся по морфологическим маркерам, хорошо различимым визуально, проявление которых не зависит от условий окружающей среды. Это, как правило, качественные признаки — окраска различных частей растения, размер побегов, устойчивость к вредителям и болезням и другие. Культурная соя в отличие от других сельскохозяйственных культур имеет сравнительно низкий уровень генетической изменчивости, а наиболее важный фактор, ограничивающий ее — система размножения [1, 2]. Потомство формируется преимущественно за счет самоопыления растений, поэтому культурная соя характеризуется узкой генетической базой [3]. Проблема усугубляется еще и тем, что родословные многих сортов утрачены, а потому высока вероятность скрещивания близкородственных линий, что не обеспечивает необходимого разнообразия для последующего отбора.

Известно, что использование наиболее различных генетически родителей может привести к эффекту гетерозиса, обеспечивающего в потомстве высокие показатели основных хозяйственно ценных признаков [4]. Молекулярно-генетические методы исследования, такие как маркирование межмикросателлитных последовательностей (ISSR) [5-7] и анализ микросателлитных локусов (SSR) [8-10], являются эффективным и современным инструментом для подобных исследований. Оба метода относительно просты и не дороги в использовании.

Таким образом, первостепенной задачей для повышения эффективности ведения селекции является оценка и подбор генетического разнообразия перспективных образцов, которые предполагается использовать в качестве родительских пар в гибридизации.

Материалы и методы исследований

Изучение, оценка и целенаправленный подбор исходного генетического материала (генофонда) проводился на основе биоресурсной коллекции лаборатории селекции сои центра агробιοтехнологий (более 250 образцов сои различного эколого-географического происхождения), многообразие которой позволяет выделить источники и доноры хозяйственно ценных признаков (продуктивность, период вегетации, масса 1000 зерен, содержание белка и масла в семенах, устойчивость к болезням) для использования их в различных селекционных программах [11].

В «ФНИЦ агробιοтехнологий Дальнего Востока им. А. К. Чайки» родительские формы, включаемые в процесс гибридизации, исследуются методом ISSR-

анализа с 2013 г. Полученная информация о генетических различиях частично проверена путем анализа гибридного потомства в сравнении с исходным материалом и использована в дальнейшем для создания перспективных сортов сои.

Исходный материал сои создавался наиболее широко распространенным и эффективным методом конструирования генетической изменчивости для селекции — искусственной гибридизацией с использованием в селекционном процессе метода «Педигри».

Соя выращивалась в соответствии с принятой для Приморского края агротехникой [12]. Площадь делянки в питомнике варьировала от 1,8 до 2,7 м². Описание селекционного материала и фенологические наблюдения осуществлялись по методикам ВНИИР в течение всего периода вегетации сои [13].

В целях подбора родительских пар исследовано 10 сортообразцов (CBX 14T00C3, YSZ II, Муссон, Приморская 1385, Асука, Сфера, Dong Nong 690, Hei He 38, Talpprod-Fisk, Ходсон) методом ISSR-анализа с использованием десяти праймеров (табл. 1). ISSR-маркеры представляют собой мультилокусную систему и наследуются по доминантному типу. Праймерами для ISSR служат микросателлитные повторы.

Таблица 1.

ISSR-праймеры, используемые для исследования генетической изменчивости сортообразцов сои в целях подбора родительских пар

Код праймера	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')	Число учитываемых фрагментов ДНК	
		всего	полиморфных
808	(AG) ₈ C	6	0
812	(GA) ₈ T	8	0
834	(AG) ₈ (CT)T	5	0
868	(GAA) ₆	6	4
C5	(TCG) ₆ G	8	5
856	(AC) ₈ CTA	5	0
840	(GA) ₈ (CT)T	7	7
S2	(ACA) ₅	7	6
S9	(CA) ₈ GT	6	3
S1	(CA) ₈ TG	6	3
Всего		64	28

В работе использовали общепринятые методики проведения молекулярно-генетических исследований. Тотальную ДНК выделяли из свежих и лиофильно высушенных листьев сои солевым методом [14]. ПЦР проводили в амплификаторе T100 (Био-рад) на основании литературных данных, варьируя некоторые параметры (температура отжига праймеров, состав реакцион-

ной смеси) для оптимального протекания амплификации [5 — 10] с использованием 2X реакционной смеси БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (Биолабмикс). Для визуализации результатов ПЦР использовали электрофорез в агарозном геле, окрашенном бромистым этидием.

Для каждого ISSR-праймера составлены бинарные матрицы, где присутствие или отсутствие фрагмента с одной молекулярной массой обозначается «1» или «0», соответственно. На основании бинарных матриц рассчитаны основные показатели генетической изменчивости. Статистическую обработку полученных данных проводили с применением пакетов программ POPGENE [15], TFPGA [16].

Проводилась идентификация образцов сои, полученных в результате скрещивания в 2017 году, с целью выявления их гибридного происхождения методом маркирования микросателлитных локусов ДНК (SSR-анализ). Исследовано потомство трех гибридных комбинаций (♀Муссон × ♂Dong Nong 690, ♀Муссон × ♂Тайфун, ♀Муссон × ♂Hei He 38) с использованием пяти пар праймеров (табл. 2). SSR-маркеры в отличие от ISSR обладают кодоминантным типом наследования, что позволяет однозначно идентифицировать особи гибридного происхождения. Для разделения продуктов амплификации использовали 3 %-ный гель агарозы MetaPhor от компании Lonza (США), способный разделять фрагменты от 20 п. н. Визуализацию проводили облучением геля, окрашенного бромистым этидием, ультрафиолетовым излучением.

Результаты

Подбор родительских пар с использованием ISSR-анализа

В результате ПЦР ДНК 10 сортообразцов сои с использованием 10 ISSR-праймеров было амплифицировано 64 фрагмента, 28 из которых, оказались полиморфными (43,75 %), остальные — мономорфные, т. е. присутствовали в спектрах всех исследованных растений (табл. 1). При анализе фореграмм не учитывались вариации интенсивности свечения фрагментов, а только их наличие или отсутствие. Размер выявленных фрагментов варьировал от 300 до 3000 п. н.

Наиболее распространенным и информативным показателем генетических различий являются генетические дистанции [17]. На основе анализа бинарной матрицы рассчитаны индексы генетического различия и сходства для исследуемых сортообразцов (табл. 3). На основе анализа бинарной матрицы с использованием пакета программ PopGen проведено попарное сравнение исследуемых сортообразцов. Наибольшее значение генетических дистанций (0,5108) обнаружено между парами Hei He 38/ Муссон и Hei He 38/ Приморская 1385. Несколько меньшее значение (0,4700) получено для пар образцов Приморская 1385/ CBX 14T00C3, Муссон/ YSZ II, Сфера/ YSZ II, Асука/ Приморская 1385, Dong Nong 690/ Муссон, Dong Nong 690/ Приморская 1385, Dong Nong 690/ Сфера, Hei He 38/ CBX 14T00C3, Talppod — Fisk/ Приморская 1385; а также Hei He 38/ Сфера (0,4308).

Таблица 2.
Характеристика и оптимальные условия амплификации микросателлитных локусов, используемых для идентификации гибридов

Локус	Повтор	Сиквенс праймеров	Темпера- тура отжига, °С	Концент- рация хлорида магния, мМ	Количество фрагментов		
					всего	агароза	MetaPhor
Satt1	(AAT) ₂₄	F — AGTACATAGATATGTAAGTCT R — AAATGATGAACGTGAATTATT	60	3.5	4	2	4
Satt2	(AAT) ₁₈	F — AATAATGTGGAAACTAAATGG R — TAATGTGCCATATCCTTGCTTT	60	3	2	2	4
Satt9	(AAT) ₁₂	F — ATTACTAGAGAAATTAGTTTA R — CTTACTAGGGTATTAAACCTT	45	3	5	3	6
Soypr1	(TAT) ₂₀	F — CGAAGAGCTACGTGCCAAATT R — GTTAGAAAACTCCGCCACAC	60	1.5	3	2	2
Soyhsp 176	(AT) ₁₅	F — TGTGGGCCACAAAACGTATAG R — CGTACGTTCTAGTAGTCTTC	60	3	4	1	2

Таблица 3.

Генетические дистанции десяти сортообразцов сои по данным ISSR-анализа

Сортообразец	CBX 14T00C3	YSZ II	Муссон	П 1385	Асука	Сфера	Dong Nong	Hei He 38	Talppod - Fisk
YSZ II	0.1625	***							
Муссон	0.3930	0.4700	***						
П 1385	0.4700	0.5534	0.1054	***					
Асука	0.2877	0.2231	0.3930	0.4700	***				
Сфера	0.3930	0.4700	0.1625	0.1054	0.3930	***			
Dong Nong	0.3567	0.2231	0.4700	0.4700	0.2877	0.4700	***		
Hei He 38	0.4700	0.3930	0.5108	0.5108	0.2549	0.4308	0.3216	***	
Talppod - Fisk	0.2822	0.2877	0.3930	0.4700	0.2877	0.3216	0.2877	0.3216	***
Ходсон	0.3567	0.2877	0.4700	0.4700	0.2877	0.3930	0.2877	0.2549	0.2231

Примечание: жирным шрифтом отмечены наибольшие значения генетических различий

Для визуализации генетических различий исследуемых сортообразцов с помощью пакета программ TFPGA, используя алгоритм невзвешенного парно-группового анализа (UPGMA), построена дендрограмма филогенетических взаимоотношений исследуемых сортообразцов сои (рис. 1).

Рис. 1. Дендрограмма филогенетических взаимоотношений десяти сортообразцов сои по десяти праймерам. Длина ветвей дерева указывает на уровень различий

На дереве выявился кластер, в который вошла большая часть исследуемых сортообразцов — Ходсон, YSZ II, Hei He 38, Talppod-Fisk, Dong Nong 690, Асука, CBX 14Т00С3. Таким образом, Приморская 1385, Сфера и Муссон имеют максимальные отличия от остальных сортообразцов (максимальная длина ветви). Топология дерева поддерживается значениями генетических дистанций, рассчитанных по результатам анализа.

Полученные данные могут быть полезны в селекционном процессе сои, так как дают возможность подобрать родительские пары, обладающие наибольшими генетическими различиями, что позволит увеличить разнообразие в гибридном потомстве и вероятность наследования необходимых хозяйственно ценных признаков.

Идентификация гибридов F_1 методом маркирования микросателлитных локусов

Проведено исследование потомства F_1 методом SSR-анализа в целях установления его гибридного происхождения трех комбинаций первого поколения: Муссон $\times$ Dong Nong 690 (1), Муссон $\times$ Тайфун (2), Муссон $\times$ Hei He 38 (3).

Комбинация (1) ♀ Муссон $\times$ ♂ Dong Nong 690, номера гибридов — 68-1, 68-2, 68-3, 70-1, 70-2, 75-1, 75-2. Всего исследовано 9 образцов, включая родительские формы. Локусы Satt2 и Soyhsp176 оказались мономорфными, то есть не выявили отличий родительских форм (рис. 2).

Рис. 2. Электрофореграммы амплификации образцов гибридной комбинации (1) с использованием праймеров для локуса Soyhsp176. А — обычная агароза, Б — агароза Metaphor. М и DN — родительские формы; цифрами обозначено потомство; К — контроль реакции

В результате амплификации локусов Satt1 и Satt9 получены полиморфные картины распределения фрагментов, родительские формы имеют четкие отличия, гибридное потомство обладает суммой фрагментов родителей (рис. 3). Таким образом, можно признать гибридное происхождение исследованных образцов данной комбинации.

Рис. 3. Электрофореграммы амплификации образцов гибридной комбинации (1) с использованием праймеров для локуса Satt1. А — обычная агароза, Б — агароза Metaphor. М и DN — родительские формы; цифрами обозначено потомство; К — контроль реакции

Оценка данных гибридов в полевых условиях 2018 г. показала проявление эффекта гетерозиса по ряду признаков — продуктивность, габитус куста, ветвистость. По фенотипическим признакам существуют значительные отличия от материнской формы — отличительный цвет окраски венчика цветка, размер боба и форма листовой пластины, которые были унаследованы от отцовской как доминантные.

Гибридная комбинация (2) ♀Муссон × ♂Тайфун, представлена шестью гибридами — 80-1, 80-2, 80-3, 88-1, 88-2, 88-3. Всего исследовано 8 образцов, включая родительские формы. В результате исследования только для локуса Soyhsp 176 не выявлены отличия родительских форм. Остальные локусы ока-

зались полиморфны (рис. 4). Образцы обладают суммой фрагментов родительских форм, что свидетельствует об их гибридном происхождении.

Рис. 4. Электрофореграммы амплификации образцов гибридной комбинации (2) с использованием праймеров для локуса Satt 2. А — обычная агароза, Б — агароза Metaphor. М и Т — родительские формы; цифрами обозначено потомство; К — контроль реакции

При визуальной оценке в питомнике данных гибридов отмечены: эффект гетерозиса по габитусу куста, отличительная от материнской формы окраска венчика цветка и опушения, цвет рубчика семени, что характеризует их как представителей «истинный гибрид».

Гибридная комбинация (3) ♀Муссон × ♂Hei He 38, номера гибридов — 92-1, 92-2, 92-3, 92-4. В результате исследования локусы Satt 1, Satt 2, Soyhsp 176 оказались полиморфными, локусы Satt 9 и Soypr 1 не выявили различий (рис. 5). Образцы выявили фрагменты родителей, что является подтверждением их гибридного происхождения.

Рис. 5. Электрофореграммы амплификации образцов гибридной комбинации (3) с использованием праймеров для локусов Satt 2, Satt 1 и Satt 9. А — обычная агароза, Б — агароза Metaphor. М и Hh — родительские формы; цифрами обозначено потомство; К — контроль реакции

Оценивая гибриды номера 92, отметили гетерозисный эффект по габитусу куста растений, обнаружили фенотипические признаки, характерные отцовской форме.

Все вышеупомянутые гибриды различных комбинаций в последующих поколениях будут изучаться на предмет расщепления по признакам и закрепления гетерозисного эффекта (трансгрессии).

В результате исследования можно сделать вывод, что все представленные образцы первого поколения имеют гибридное происхождение. Стоит отметить, что для ряда локусов у исследуемых образцов выявлены дополнительные фрагменты, отсутствующие у родительских форм. Природа этих ампликонов на данный момент не ясна. Это могут быть как продукты не специфической реакции, так и возможные изменения в геноме гибридных образцов, произошедшие под воздействием процесса рекомбинации.

В дальнейшем апробированные подходы исследования генетического разнообразия гибридных форм позволят ускорить селекционный процесс за счет быстрой оценки потомства с целью исключения из процесса растений, не являющихся гибридами. Кроме того, появляется возможность изучить влияние отбора на картины распределения изменчивости в поколениях, эта фундаментальная задача может иметь и прикладной аспект в целях оптимизации селекционного процесса.

Выводы

1. В результате ISSR-анализа рассчитаны основные генетические характеристики десяти сортообразцов сои по десяти ISSR-праймам. По результатам анализа на филогенетическом дереве образовалось два неравнозначных кластера: большой (объединяющий большинство исследуемых сортообразцов) — Ходсон, YSZ II, Hei He 38, Talppod-Fisk, Dong Nong 690, Асука, CBX 14T00C3, и малый, в который вошли сорта Приморская 1385, Сфера и Муссон, имеющие максимальные генетические отличия от остальных образцов, со значениями 0.5108-0.4308. Полученные результаты позволяют планировать схему скрещивания, подбирая на основе топологии филогенетического дерева родительские формы, имеющие максимальные генетические отличия.

2. Проанализировано три гибридных комбинации первого поколения методом маркирования микросателлитных локусов ДНК (SSR-анализ), дана селекционная оценка этим образцам по результатам полевых наблюдений развития растений, в результате чего установлено их гибридное происхождение.

Список использованной литературы

1. **Gizlice Z.**, Carter T. E., Gerig T. M. [et al.] Genetic relationships within old US soybean cultivar groups // CropSci, 1996. — Vol. 36. — P. 743-752.
2. **Сеитова А. М.**, Игнатов А. Н., Супрунова Т. П. [и др.] Оценка генетического разнообразия дикорастущей сои (*Glicinesoja Sieboldet Zucc.*) в Дальневосточном регионе России // Генетика, 2004. — Т. 40. — № 2. — С. 224-231.
3. **Hamrick J. L.**, Godt M. J. W. Allozyme diversity in plant species // Plant population genetics, breeding, and genetic resources / eds. A. H. D. Broun, M. T. Clegg, A. L. Kahler, B. S. Weir. — Massachusetts: Sunauer Associates, Sunderland, 1989. — P. 43-63.
4. **Соя на Дальнем Востоке** / А. П. Ващенко, Н. В. Мудрик, П. П. Фисенко, Л. А. Дера, Н. В. Чайка, Ю. С. Капустин. — Владивосток: Дальнаука, 2010. — 435 с.

5. **Козыренко М. М.**, Фисенко П. П., Артюкова Е. В. Анализ генетического разнообразия сортов и соматоклональных линий культурной сои (*Glicinemax*(L.) Merr.) методом маркирования межмикросателлитных последовательностей (ISSR) // Биотехнология, 2007. — № 1. — С. 3-13.
6. **Глазко В. И.**, Дубинин А. В., Календарь Р. Н. [и др.] Генетические взаимоотношения между сортами сои с использованием ISSR маркеров // Цитология и генетика, 1999. — Т. 31. — № 10. — С. 1358-1364.
7. **Фисенко П. В.** Анализ генетической изменчивости сортообразцов сои (*Glicine max* (L.) Merrill) методом маркирования межмикросателлитных последовательностей (ISSR) // Вестник Сельскохозяйственной науки, 2016. — № 5. — С. 17-19.
8. **Рамазанова С. А.**, Гучетль С. З., Антонова Т. С. ДНК-генотипирование на основе SSR-маркеров. Апробирование и подбор оптимальных условий для *Glycine max* (L.) Merr // НТБ ВНИИМК Масличные культуры — Краснодар, 2007. — № 2 (137). — С.78-80.
9. **Рамазанова С. А.**, Гучетль С. З., Челюстникова Т. А. [и др.] Идентификация гибридов F1 сои с использованием микросателлитных локусов ДНК // Генетика, физиология и биохимия, 2008. — № 8. — С. 137-141.
10. **Zietkiewicz E.**, Rafalski A., Labuda D. Genom fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics, 1994. — Vol. 20. — P. 176-183.
11. **Васина Е. А.**, Бутовец Е. С., Дега Л. А. Распределение сортов сои по устойчивости к патогенам в эколого-географических группах // Защита и карантин растений, 2019. — № 6. — С. 50-52.
12. **Чайка А. К.**, Тильба В. А., Моисеенко А. А. [и др.] Адаптивные и прогрессивные технологии возделывания сои и кукурузы на Дальнем Востоке: метод. рекомендации. — Владивосток: Дальнаука, 2009. — 139 с.
13. **Соя.** Методические указания по селекции и семеноводству / Сост.: Н. И. Корсаков, Ю. П. Мякушко. — Л.: ВИР, 1975. — 159 с.
14. **Salah M.** Aljanabi, Iciar Martinez Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques// Nucleic Acids Research, 1997. — Vol. 25. — No. 22. — P. 4692-4693.
15. **Yeh F. C.**, Boyle T. J. B. Population Genetic Analysis of Codominant and Dominant Markers and Quantitative Traits// Belgian Journal of Botany, 1997. — Vol. 129. — P. 157-163.
16. **Miller M. P.** Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. 1997. Computer software distributed by author.
17. **Nei M.** Genetic distance between populations // American Naturalist, 1972. — Vol. 106 (949). — P. 283-292.

P. V. Fisenko, E. S. Butovets

A. K. Chayka Federal Scientific Center of agrobiotechnology in the Far East,
Ussuriysk, Russia

**MOLECULAR GENETIC APPROACHES IN SOYBEAN BREEDING AT
A. K. CHAYKA FEDERAL SCIENTIFIC CENTER AGROBIOTECHNOLOGY OF
THE FAR EAST**