

**АССОЦИАЦИЯ МЕЖДУ ДЛИНАМИ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ
И ПРОЯВЛЕНИЕМ ЦЕННЫХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ
У ДИКОЙ СОИ**

O.N. Bondarenko, A.P. Galichenko, A.A. Blinova

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный научный центр
«Всероссийский научно-исследовательский институт сои»,
675027, г. Благовещенск, Игнатьевское шоссе, 19, Российская Федерация*

В данном исследовании были изучены связи между длинами микросателлитных локусов и проявлением ключевых сельскохозяйственных характеристик у дикой сои (*Glycine soja*). Объектом анализа послужили 46 коллекционных форм данной культуры, собранные из различных районов Амурской области, а также 2 формы из Китая, 1 из Приморского края и 1 из Хабаровского края. В ходе полевых экспериментов 2023 года проводились фенологические наблюдения за ростом и развитием растений, а также оценка хозяйственно ценных признаков на базе лаборатории селекции и первичного семеноводства (с. Садовое Тамбовского района). Проводили стандартную ПЦР на готовой реакционной смеси с использованием 20 пар праймеров. В ходе анализа простых последовательных повторов (SSR) установлены 11 маркеров, ассоциированных с локусами количественных признаков (QTLs), такими как вегетационный период, масса семян, содержание белка и масла в семенах сои. Корреляционный анализ проводили с помощью коэффициента взаимной сопряженности Пирсона. Результаты показали существование прямой умеренной связи между массой 1000 семян и локусом *Satt517* ($r_{xy}=0,39$). В то же время, установлена обратная зависимость между массой семян и локусом *Satt005* ($r_{xy}=-0,34$), что подчеркивает его влияние на снижение этого показателя. Анализ содержания белка в семенах выявил умеренную корреляцию с локусом *Satt431* ($r_{xy}=0,32$). Что касается содержания масла, только *Satt005* проявил обратную умеренную связь ($r_{xy}=-0,34$). Другие локусы, такие как *Satt002*, *Satt173*, *Satt234*, *Satt281*, *Satt373*, *Satt442*, *Satt556* и *Satt565*, продемонстрировали слабую корреляцию с хозяйственно-ценными признаками, что может ограничивать их использование в селекции сои. Микросателлиты представляют собой важный инструмент для изучения генетических свойств организмов, поскольку они могут выступать маркерами определённых фенотипических проявлений. Тем не менее, на сегодняшний день влияние этих маркеров на продуктивные качества ещё не установлено. Результаты текущего исследования, проведённого на ограниченной выборке и с использованием небольшого числа маркеров, требуют дальнейшей проверки. Для получения более точных и обширных данных необходимо провести масштабные исследования, такие как картирование связей или анализ больших популяций. Это позволит глубже понять роль микросателлитов в фенотипическом разнообразии.

Ключевые слова: дикая соя, генетическое разнообразие, ДНК-маркеры, микросателлитные локусы, урожайность, продуктивность

**ASSOCIATION BETWEEN THE LENGTHS OF MICROSATELLITE LOCI AND THE
MANIFESTATION OF VALUABLE AGRICULTURAL TRAITS IN WILD SOYBEANS**

O.N. Bondarenko, A.P. Galichenko, A.A. Blinova

*Federal State Budget Scientific Institution Federal Research Center “All-Russian Scientific Research
Institute of Soybean”,
19, Ignatevsky highway, Blagoveshchensk, 675027, Russian Federation*

The relationships between the lengths of microsatellite loci and the manifestation of key agricultural characteristics in wild soybeans (*Glycine soja*) were studied. The object was 46 forms of this culture from various districts of the Amur Region, as well as 2 forms from China, 1 from the Primorsky

Territory and 1 from the Khabarovsk Territory. In the field experiment (Sadovoye village, 2023), phenological observations were carried out, as well as an assessment of economically valuable signs. Standard PCR was performed on the finished reaction mixture using 20 pairs of primers. During the SSR analysis, 11 markers associated with QTLs were identified (9vegetation period, seed weight, protein and oil content in soybean seeds). The correlation analysis was performed using the Pearson coefficient of mutual conjugacy. The results showed the existence of a direct moderate relationship between the mass of 1000 seeds and the locus *Satt517* ($r_{xy}=0.39$). An inverse relationship has been established between the seed mass and the *Satt005* locus ($r_{xy}=-0.34$), which emphasizes its effect on reducing this indicator. Analysis of the protein content in the seeds revealed a moderate correlation with the *Satt431* locus ($r_{xy}=0.32$). *Satt005* showed an inverse moderate relationship with the oil content ($r_{xy}=-0.34$). Other loci *Satt002*, *Satt173*, *Satt234*, *Satt281*, *Satt373*, *Satt442*, *Satt556*, *Satt565* showed a weak correlation with economically valuable traits, which limits their use in soybean breeding. Microsatellites are an important tool for studying the genetic properties of organisms, but today the effect of these markers on productive qualities has not yet been established. The results of the current study, conducted on a limited sample and using a small number of markers, require further verification.

Keywords: wild soybeans, genetic diversity, DNA markers, microsatellite loci, yield, productivity

Введение. Дикие родственники сельскохозяйственных культур, несомненно, полезны для современного сельского хозяйства, предоставляя селекционерам потенциал полезных генетических ресурсов. Растет число случаев получения высокоурожайных производных гибридов, которые были созданы с использованием диких родственников, включая и сою, которые указывают на то, что дикие родственники культуры могут использоваться в качестве генного ресурса для повышения урожайности возделываемых культур посредством традиционной селекции или отбора с помощью молекулярных маркеров [1, 5, 8].

Достижения в области секвенирования генома и транскриптома позволяют обнаруживать у дикой сои аллели, связанные с желаемыми признаками, которые были утрачены при одомашнивании сои. Сбор, изучение *Glycine soja* и анализ ее геномных особенностей ускорят селекцию сои и будут способствовать устойчивому сельскому хозяйству и производству продуктов питания [4]. Для оценки генетического разнообразия дикой сои применяются микросателлитные маркеры, которые имеют высокую специфичность и полиморфизм. Некоторые участки не кодирующей ДНК могут влиять на сплайсинг, а также могут играть регуляторную роль, действуя как энхансеры или же сайленсеры [2, 3]. **Целью исследований** было определить корреляцию между хозяйствственно-ценными признаками, идентифицированными у диких форм сои и длинами исследуемых микросателлитных локусов. Информация о наличии таких связей будет полезна для селекционной работы.

Условия, материалы и методы. Объектами исследования являлись 46 коллекционных форм *G. soja*, отобранных в различных районах Амурской области (Зейский, Тамбовский, Белогорский, Михайловский, Архаринский, Благовещенский), 2 формы из КНР, 1 из Приморского края и 1 из Хабаровского края. В качестве стандартов: сорт сои Лидия – культурного типа; форма дикой сои – КТ156.

Полевой опыт проводили в 2023 году на экспериментальном поле лаборатории селекции и первичного семеноводства ФНЦ ВНИИ сои (с. Садовое Тамбовского района Амурской области). В период вегетации проводили фенологические наблюдения, в период созревания – оценку по хозяйственно ценным признакам. Учет урожая и биометрический анализ проводили по каждому растению. Содержание белка и масла в семенах определяли методом диффузного отражения в ближайшей инфракрасной области в лаборатории переработки сельскохозяйственной продукции с использованием анализатора «Foss NIRSystem 5000» (Швеция). Лабораторный опыт проводили на базе лаборатории биотехнологии. Объектом исследования служили 20 пар SSR-праймеров, предложенных ранее коллективом авторов статьи в качестве предлагаемой маркерной системы для идентификации и паспортизации форм дикой сои [6]. Экстракцию суммарной ДНК выполняли набором реагентов «ДНК-Экстрап» из семян сои. Концентрацию и качество двухцепочечной ДНК измеряли с помощью нано-спектрофотометра EzDrop 1000 (Тайвань). ПЦР осуществляли в финальном объеме реакционной смеси 25 мкл с использованием

реакционной смеси «БиоМастер» HS-Taq ПЦР-Color (2×). Амплификацию выделенных фрагментов ДНК сои проводили с помощью амплификатора CFX96 (США) при подобраных ранее температурных режимах [11]. Продукты реакции разделяли методом электрофореза в 2 %-м агарозном геле окрашенном бромистым этидием, в 0,5×TBE с использованием камеры для горизонтального электрофореза SE-1 (ООО «Компания Хеликон», Россия) в течение 1,5…2 часов (сила тока 50 мА, напряжение 90–100 В). Размер фрагментов определяли относительно маркёра молекулярной массы 50bp DNA Ladder. Визуализация осуществлена с использованием гель-документирующей системы GelDoc EZ (США). Идентификацию и определение размеров аллелей локусов проводили с использованием программы Image Lab Version 6.0.14 Standard Edition. Выявленные аллели по каждому локусу обозначали соответственно молекулярному весу в п. н. Тесноту взаимосвязи между хозяйственно ценными признаками сопоставляли и длинами последовательностей локусов по коэффициенту корреляции с использованием программы Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение. Продуктивность играет решающую роль в оценке сельскохозяйственных культур, особенно сои. Главные показатели продуктивности включают массу семян с растения, массу 1000 семян и количество бобов/семян на каждом растении. Однако, кроме урожайности, для селекционного отбора сортов сои важны и другие факторы. К ним относится продолжительность вегетационного периода, которая влияет на сроки сбора урожая, а также содержание питательных веществ, таких как белок и масло в семенах. Эти характеристики имеют значение для повышения качества и конкурентоспособности продуктов. Результаты полевого опыта и оценка указанных характеристик форм дикой сои были ранее изложены в работе коллектива авторов [7].

Из исследуемых 20 пар праймеров те, что фланкировали локусы *Satt236*, *Satt590* не гибридизировались с матричной ДНК. Локусы *Satt453*, *Satt268*, *Satt571* и *Satt022* оказались мономорфными. Кроме того, биоинформационный поиск ассоциаций показал, что не все локусы из 20 маркеров могут быть использованы для генотипирования определенных качеств, которые сцеплены с находящимися рядом участками (QTLs), ассоциированных с необходимыми признаками. Таким образом, полностью пригодными для дальнейшего исследования имеющихся генотипов сои оказались только 11 SSR-локусов (табл. 1).

Таблица 1.

Локусы SSRs и их ассоциации с QTL исследуемых признаков дикой сои

| Локус | Ассоциированные QTLs | Локус | Ассоциированные QTLs |
|----------------|--|----------------|---|
| <i>Satt002</i> | Масса семян с растения Масса 1000 семян | <i>Satt556</i> | Период вегетации Масло семян |
| <i>Satt565</i> | Количество бобов с растения Белок семян Масса 1000 семян | <i>Satt431</i> | Масло семян Белок семян Масса семян с растения |
| <i>Satt281</i> | Белок семян Масса семян Масса 1000 семян | <i>Satt234</i> | Количество бобов с растения Количество семян с растения Масса семян на растении |
| <i>Satt005</i> | Высота растения Масло семян Масса 1000 семян | <i>Satt173</i> | Количество бобов с растения Масло семян Белок семян Масса 1000 семян |
| <i>Satt442</i> | Период вегетации Масло семян Белок семян | <i>Satt373</i> | Количество бобов с растения Период вегетации Масло семян Белок семян Масса семян с растения |
| <i>Satt517</i> | Масса 1000 семян | | |

После того как были отобраны локусы, подходящие под задачи исследования, был проведен корреляционный анализ между длинами ампликонов, полученных после проведения ПЦР, и показателями хозяйственно-ценных признаков (табл. 2).

Таблица 2.

Сила корреляционной связи (абсолютное значение r_{xy}) между признаком и длиной SSR локуса

| Локус | Период вегетации | Наименование признака | | | | | |
|----------------|------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------|--------------|
| | | Масса 1000 семян | Масса семян с растения | Количество бобов с растения | Количество семян с растения | Белок семян | Масло семян |
| <i>Satt002</i> | | 0,27 | 0,26 | | | | |
| <i>Satt005</i> | | | -0,34 | | | | -0,34 |
| <i>Satt173</i> | | -0,06 | | 0,15 | | 0,05 | -0,10 |
| <i>Satt234</i> | | | -0,14 | -0,10 | -0,11 | | |
| <i>Satt281</i> | | 0,04 | 0,21 | | | -0,18 | |
| <i>Satt373</i> | -0,28 | | 0,14 | -0,02 | | -0,24 | 0,21 |
| <i>Satt431</i> | | | -0,26 | | | 0,32 | -0,06 |
| <i>Satt442</i> | -0,17 | | | | | 0,24 | 0,00 |
| <i>Satt517</i> | | 0,39 | | | | | |
| <i>Satt556</i> | 0,12 | | | | | | -0,29 |
| <i>Satt565</i> | | -0,10 | | 0,12 | | -0,01 | |

Примечание: где теснота (сила) корреляционной связи менее 0,3 – слабая; от 0,3 до 0,5 – умеренная; от 0,5 до 0,7 – заметная; от 0,7 до 0,9 – высокая; более 0,9 – весьма высокая.

Была выявлена прямая взаимосвязь умеренной силы массы 1000 семян с локусом *Satt517* ($r_{xy}=0,39$). Обратная умеренная зависимость была выявлена между показателем массы семян с растения с локусом *Satt005* ($r_{xy}=-0,34$). Разнонаправленная корреляция между содержанием белка в семенах была отмечена с разными локусами, в том числе умеренная прямая – с локусом *Satt431* ($r_{xy}=0,32$). Среди локусов, ассоциированных с содержанием уровня масла в семенах сои, только с локусом *Satt005* ($r_{xy}=-0,34$) обнаружили обратную взаимосвязь умеренной силы. Анализ корреляции микросателлитов *Satt002*, *Satt173*, *Satt234*, *Satt281*, *Satt373*, *Satt442*, *Satt556*, *Satt565* с хозяйствственно-ценными признаками показал, что каждый из них имел слабую корреляционной связь с признаком ($r_{xy} \leq 0,3$).

Заключение. В результате проведенного исследования было обнаружено, что *Satt002*, *Satt005* и *Satt517*, имеют некоторую связь с такими признаками, как масса 1000 семян, масса семян с растения, уровень содержания белка и масла семенах сои. *Satt005* же имеет связь сразу с двумя, показывая идентичную отрицательную корреляцию умеренной силы разными признаками. Это указывает на то, что микросателлиты возможно могут выступать в роли маркеров определенных признаков или обладать регуляторной функцией, влияя на уровни экспрессии некоторых генов. Микросателлиты представляют собой важный инструмент для изучения генетических свойств организмов, поскольку они могут выступать маркерами определенных фенотипических проявлений. Тем не менее, на сегодняшний день влияние этих маркеров на продуктивные качества ещё недостаточно изучено. Результаты текущего исследования, проведённого на ограниченной выборке и с использованием небольшого числа маркеров, требуют дальнейшей проверки. Для получения более точных и обширных данных необходимо провести масштабные исследования, такие как картирование связей или анализ больших популяций. Это позволит глубже понять роль микросателлитов в фенотипическом разнообразии.

Финансирование: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00076, <https://rscf.ru/project/23-26-00076/>

Библиографический список

1. Hu Z, Zhang D, Zhang G, Kan G, Hong D, Yu D. Association mapping of yield-related traits and SSR markers in wild soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) // Breed Sci. – 2014. – №63(5). – P. 441-449. –doi:10.1270/jsbbs.63.441.
2. Maeda R.K, Karch F. Gene expression in time and space: additive vs hierarchical organization of cis-regulatory regions // Curr Opin Genet Dev. – 2011. – №21. – P.187-193.
3. Perenthaler, E., Yousefi, S., Niggl, E., & Barakat, T. S. Beyond the exome: the non-coding genome and enhancers in neurodevelopmental disorders and malformations of cortical development // Frontiers in cellular neuroscience. – 2019. – Vol.13(352). – P. 1-20. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00352/>
4. Zhuang Y, Li X, Hu J, Xu R, Zhang D. Expanding the gene pool for soybean improvement with its wild relatives // aBIOTECH. – 2022. – №3(2). – P. 115-125. <https://doi.org/10.1007/s42994-022-00072-7>.
5. Бондаренко О.Н. К вопросу о микросателлитных ассоциациях культурной сои Амурской области с сельскохозяйственными признаками / О.Н. Бондаренко, П.Д. Тимкин, Л.Е. Иваченко, А.А. Блинова, А.А. Пензин // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2023. – Т. 13, № 3(46). – С. 425-433. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-425-433>.
6. Бондаренко О.Н. Комбинированный метод оптимизации условий ПЦР для скрининга дикой сои / О.Н. Бондаренко, С.И. Лаврентьева // Пермский аграрный вестник. – 2023. – № 4(44). – С. 34-43. https://doi.org/10.47737/2307-2873_2023_44_34
7. Галиченко А.П. Оценка генофонда коллекционных форм *Glycine soja* по хозяйственно ценным признакам / А.П. Галиченко, О.Н. Бондаренко, А.А. Блинова // Пермский аграрный вестник. – 2024. – № 2(46). – С. 38-44. https://doi.org/10.47737/2307-2873_2024_46_38
8. Пензин А.А. Корреляционный анализ длин микросателлитных локусов с хозяйственно ценными признаками диких форм сои / А.А. Пензин, П.Д. Тимкин // Биотехнология: взгляд в будущее: Материалы IX Международной научно-практической конференции, Ставрополь, 30 марта 2023 года. – Ставрополь: Изд-во СтГМУ, 2023. – С. 80-82.