

Ш. Мазкират , Д.И. Бабисекова , С.В. Дидоренко ,
Ж.Е. Кулахметова , К.М. Булатова* 

Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства,
Казахстан, п. Алмалыбак
*e-mail: bulatova_k@rambler.ru

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОДОМИНАНТНЫХ БЕЛКОВЫХ И ДНК МАРКЕРОВ В ИДЕНТИФИКАЦИИ F1 ГИБРИДНОГО ПОТОМСТВА СОИ

Гибридизация была и остается основным методом создания исходного для селекции генетического пула, из которого селекционер отбирает подходящие под критерии новые селекционные линии, сорта, гибриды. Соя – облигатная автогамная культура, принудительная гибридизация которой во многом зависит от мастерства и опыта селекционера. Одной из проблем межсортовой гибридизации сои является определение истинно гибридных растений и элиминация «ложных» гибридов в самом начале селекционного процесса. Морфологические отличия между родительскими формами недостаточны для контроля гетерозиготности гибридов первого поколения, поскольку число таких показателей ограничено и многие из них имеют доминантный характер проявления. Преимуществом белковых и молекулярных маркеров является их полиаллельность и кодоминантность. Целью исследований являлась идентификация родительских форм питомника гибридизации сои и выявление кодоминантно наследуемых белковых и ДНК маркеров для использования их в распознавания гетерозиготных гибридов сои. В исследованиях использованы: метод SDS-PAGE электрофореза запасных белков семян сои, ПЦР анализ ДНК сои с 11 SSR маркерами. Установлены родительские линии, имеющие специфичный состав глицининов –запасных белков семян сои. Для 17 схем скрещиваний сортообразца сои Victory, использованной в качестве материнской формы с разными образцами рабочей коллекции, выявлены SSR маркеры, перспективные в отборе F1 гибридов. Контроль гетерозиготности гибридных линий на основе маркеров белкового и ДНК уровня расширит возможности гибридизации и приведет к вовлечению в отечественную селекцию сои ценных признаков и новых полезных комбинаций генов в созданных линиях.

Ключевые слова: соя, гибридизация, гетерозиготность, кодоминантность, белковые и молекулярные маркеры.

Sh. Mazkirat, D.I. Babissekova, S.V. Didorenko,
Zh.E. Kulakhmetova, K.M. Bulatova

Kazakh Research Institute of Agriculture and Crop Production, Kazakhstan, Almalybak village
*e-mail: bulatova_k@rambler.ru

Use of codominant protein and dna markers in identification of f1 hybrid progenies in soybean

Hybridization has been and remains the main method of creating an initial genetic pool for breeding, from which the breeder selects new breeding lines, varieties, and hybrids that meet the criteria. Soy is an obligate autogamous crop, the forced hybridization of which largely depends on the skill and experience of the breeder. One of the problems of inter variety hybridization of soybeans is the identification of true hybrid plants and the elimination of “false” hybrids at the very beginning of the breeding process.

Morphological differences between parental forms are not sufficient to control the heterozygosity of the first generation hybrids, since the number of such indicators is limited and many of them have a dominant manifestation. The advantage of protein and molecular markers is their polyallellicity and codominance.

The aim of the research was to identify the parental forms of the soybean hybridization nursery and to identify codominantly inherited protein and DNA markers for their use in the recognition of heterozygous soybean hybrids. The studies used: SDS-PAGE electrophoresis of soybean seed storage proteins, PCR analysis of soybean DNA with 11 SSR markers.

Parental lines with a specific composition of glycinins, storage proteins of soybean seeds, have been established. For 17 crossing schemes of the Victory soybean variety used as a mother form with different samples of the working collection, SSR markers were identified that are promising in the selection of F1 hybrids. The control of heterozygosity of hybrid lines on the basis of protein and DNA level markers will expand the possibilities of hybridization and will lead to the involvement of valuable traits and new useful combinations of genes in the created lines into domestic soybean breeding.

Key words: soybean, hybridization, heterozygosity, codominance, protein and molecular markers.

Ш. Мазкират, Д.И. Бабисекова, С.В. Дидоренко,
Ж.Е. Кулахметова, К.М. Булатова*

Қазақ егіншілік және өсімдік шаруашылығы ғылыми зерттеу институты, Алмалы бақ
*e-mail: bulatova_k@rambler.ru

Белоктық және днк кодоминантты маркерлерін соя буданының f₁ ұрпағын идентификациялауға пайдалану

Будандастыру селекцияның бастапқы генетикалық қорын құрудың негізгі әдісі болды және болып қала береді, оның ішінен селекционер критерийлерге сәйкес келетін жаңа селекциялық линияларды, сорттарды және будандарды таңдайды. Соя – облигатты автогамды дақыл, оның мәжбүрлі будандастырылуы көбінесе селекционердің шеберлігі мен тәжірибесіне байланысты. Сояның сортаралық будандастыру мәселелерінің бірі – нағыз буданды өсімдіктерді анықтау және селекцияның ең басында «жалған» будандарды жою. Ата-аналық формалар арасындағы морфологиялық айырмашылықтар бірінші ұрпақ будандарының гетерозиготалығын бақылау үшін жеткіліксіз, өйткені мұндай көрсеткіштердің саны шектеулі және олардың көпшілігі доминантты болады. Белок және молекулалық маркерлердің артықшылығы олардың полиаллельдігі мен кодоминанттылығында.

Зерттеудің мақсаты – соя будандастыру питомнигінің ата-аналық формаларын идентификациялау және кодоминантты тұқым қуалайтын белок және ДНҚ маркерлерін анықтап гетерозиготалы соя будандарын тану үшін пайдалану.

Зерттеуде қолданылды: соя тұқымын қор белоктарының SDS-PAGE электрофорезі, 11 SSR маркер көмегімен сояның ДНҚ-ПТР талдауы. Соя тұқымдарының қор белоктарында глицининнің спецификалық құрамы бар ата-аналық линиялар белгіленді. Жұмыс коллекциясының әртүрлі үлгілерімен аналық форма ретінде пайдаланылған Victory соя сортүлгісінің 17 будандастыру схемасы үшін F1 будандарын таңдауда перспективті SSR маркерлері анықталды. Гибридті линиялардың гетерозиготалылығын белок және ДНҚ деңгейіндегі маркерлермен бақылау – будандастыру мүмкіндіктерін кеңейтеді және шығарылған линиялардағы құнды белгілер мен гендердің жаңа пайдалы комбинацияларын отандық соя шаруашылығында қолдануға мүмкіндік береді.

Түйін сөздер: соя, будандастыру, гетерозиготалық, кодоминанттылық, белоктық және молекулалық маркерлер

Сокращения и обозначения: ТОО «КазНИ-ИЗиР» – товарищество с ограниченной ответственностью «Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства». SDS-PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. ПЦР – полимеразная цепная реакция. ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота. SSR – simple sequence repeats – простые повторяющиеся последовательности (микросателлиты)

Введение

Соя является одной из важнейших белково – масличных культур, возделываемых в Казахстане, продукты переработки семян которой имеют главным образом пищевое и кормовое назначе-

ние. Селекция и семеноводство сои ведется в Казахстане более 40 лет, создано и внедрено в производство 16 сортов. Площади под посевами сои увеличиваются ежегодно и к настоящему времени составляют более 120 тыс. га., что все еще недостаточно для обеспечения сырьем масло-перерабатывающие заводы и животноводческие фермы, птицефабрики страны.

Гибридизация была и остается основным методом создания исходного для селекции генетического пула, из которого селекционер отбирает подходящие под критерии новые селекционные линии, сорта, гибриды. Основные селекционные показатели, по которым ведется подбор родительских форм для скрещивания – продуктивность, технологичность, длина вегетационного периода. По качественным показателям исход-

ные формы должны соответствовать требованиям к содержанию белка, жира, минимальному содержанию антипитательных веществ.

Соя – облигатная автогамная культура, принудительная гибридизация которой во многом зависит от мастерства и опыта селекционера. Завязываемость гибридных семян в сильной степени зависит от условий среды, методов кастрации цветка и др. [1].

Нами разработан способ гибридизации сои, позволяющий значительно повысить число гибридных семян [2].

Однако, в гибридизации сои имеется проблема, сопряженная с невозможностью чёткого контролирования процесса опыления, часть полученных бобов может оказаться негибридной, так называемыми «ложными» гибридами [3].

Для теоретических и практических задач в гибридизации сои и других самопылителей применяют морфологические различия между сортами, к примеру такие как окраска венчика, цвет кожуры семени и др. при этом в качестве материнской формы используется генотип с рецессивным выражением признака [4, 5].

При гибридизации учитывается также крупность цветка, сходство в прохождении фаз развития. Так, Kocheguga и др. (2016) отметили успешность гибридизации в тех комбинациях, где в качестве материнских форм использовали высокоурожайные, хорошо адаптированные к местным условиям сорта с продолжительным вегетационным периодом. Такие сорта характеризуются крупными размерами цветка и чётким прохождением фаз его развития [6].

Использование только морфологических отличий между родительскими формами недостаточно для контроля гетерозиготности гибридов первого поколения, поскольку число таких показателей ограничено [7]. В то же время селекционные признаки, не имеющие внешнего проявления, такие как содержание белка, жира, ингибиторов трипсина в семенах имеют тенденцию наследования со стороны как отцовской, так и материнской линий [8].

Кроме того, поскольку по большей части морфологические признаки имеют доминантно/рецессивный характер проявления, в качестве материнской формы используется, как правило, линия с рецессивным признаком, при этом возникают проблемы с использованием в качестве материнской формы с доминантным морфологическим признаком источника ценных селекционных признаков.

Кодоминантное наследование генетических факторов родительских форм, проявляющееся в 100% пенетрантности соответствующих белковых полос в электрофоретическом спектре, позволяет устанавливать гетерозиготность семян F1 поколения. Такого рода биохимическое маркирование используется в селекции гибридов перекрестноопыляемых культур, к примеру: кукурузы и подсолнечника [9, 10].

SSR маркеры широко применяются в селекции сельскохозяйственных культур по причине их высокой полиаллельности, кодоминантности наследования и хорошей воспроизводимости [11]. Полиморфизм SSR маркеров исходных родительских линий и их кодоминантное проявление в гибриде является действенным методом в определении реально гибридного происхождения растений F1 поколения [12].

Аллели этого типа маркеров четко проявляются в спектре разделяющего геля при создании искусственного аналога гибридного состояния (смешение ДНК исходных родительских форм) [13].

Генетическое разнообразие коллекционных образцов сои к настоящему времени по ДНК маркерам достаточно широко изучено как за рубежом, так и в Казахстане [14-17].

Внедрение молекулярных маркеров в традиционную селекцию (MAS) имеет важное значение на всех этапах селекции, начиная с изучения разнообразия исходных форм, подбора пар для скрещиваний, гибридизации (определение истинно гибридных растений и элиминация «ложных» гибридов), выделения гомозиготных по целевым маркерам линий в последующих генерациях, отбор перспективных по комплексу хозяйственно-ценных признаков линий [18].

Однако применение маркеров в анализе родительских форм, используемых в схемах скрещиваний и контроле гетерозиготности растений в F1 и последующих сегрегирующих популяциях на конкретных этапах отечественной селекции сои не проводилось.

Исследования были нацелены на идентификацию исходных родительских форм сои в питомнике гибридизации лаборатории масличных культур ТОО «Казахский НИИ земледелия и растениеводства» и выявление белковых и ДНК маркеров, эффективных в отборе истинных гибридов F1 поколения.

Расширение возможностей гибридизации на основе маркерного контроля гетерозиготности гибридных линий приведет к вовлечению в от-

еественную селекцию сои ценных признаков и новых полезных комбинаций генов в создаваемых перспективных линиях и сортах, пригодных для разнообразной конечной продукции, соответствующей запросам переработчиков и потребителей не только на внутреннем рынке, но и на внешних, экспортных направлениях.

Материалы и методы исследований

Объектами исследований являлись исходные родительские линии (таблица 1), использованные в питомнике гибридизации сои 2022г., а также семена гибридов F₁ гибридных комбинаций «Ласточка х Спонсор» и «Зара х Малета».

В качестве материнской формы в 17 схемах гибридизации использовался сорт сои Victory отечественной селекции, адаптированный к условиям выращивания на Юго-Востоке Казахстана, характеризующийся высоким содержанием олеиновой кислоты в семенах, тогда как в качестве материнской формы использовались 17 сортов сои из рабочей коллекции с хозяйственно – ценными признаками, необходимыми для улучшенных сортов.

Определение специфичности родительских форм по геномному составу велось с использованием 11 высокополиморфных SSR маркеров [19, 20], таблица 2.

Таблица 1 – Схемы скрещиваний сортообразцов сои в питомнике гибридизации, 2022 г.

♀		♂	
Бело-цветковый	Характеристика	Фиолетово-цветковый	Выделяющиеся признаки
Victory	Vegetационный период 130-135 суток. Урожайность 40-45 ц/га, содержание белка 38,8 %, содержание масла 22,1 %, содержание олеиновой кислоты в масле 32%. (высокоолеиновый)	Жансяя	Высокоурожайный, среднеспелый
Victory		Ласточка	Высокоурожайный, среднепоздний
Victory		Дельта	Высокоурожайный, среднеранний
Victory		Селекта 301	Высокоурожайный, высокобелковый
Victory		Вилана	Высокоурожайный, высокобелковый
Victory		Корсак	Высокоурожайный, детерминантный тип развития
Victory		Воеводжанка	Высокоурожайный
Victory		Сава	Высокоурожайный, высокомасличный
Victory		Ascacubi	«Нулевик» по ингибитору трипсина Кунитца
Victory		Trijulf	Высокоурожайный
Victory		Sponsor	Высокоурожайный, засухоустойчивый
Victory		Safrana	Высокоурожайный
Victory		Santana	Высокоурожайный
Victory		Декабиг	Высокоурожайный
Victory		Зен	Высокоурожайный
Victory		Atlantik	Высокоурожайный
Victory		Hilario	«Нулевик» по ингибитору трипсина Кунитца, высокомасличный

Таблица 2 – SSR маркеры, использованные для маркирования родительских форм сои

Маркер	Хромосома	Forward primer (5'→3')	Reverse Primer (3'→5')
Satt 001	9	tgtgcaatgatagtacatagatat	gtgctgattgaactattgtagt
Satt 005	2	tatacctagagaagaactaaaaa	gtcgattaggcttgaataatac
Satt 160	13	acatcaaaaagttataacgtgtag	ctccacacagtttcatataat
Satt 171	13	ttgagggctccacacagtt	caaaaagttataacgtgtagattaa

Продолжение таблицы

Маркер	Хромосома	Forward primer (5'→3)	Reverse Primer (3'→5)
Satt 173	10	ccggtccaatcttattcaaac	ccaagcgaaatcacctctct
Satt 185	15	catatgaataggttaagttgcact	tgctactataaatggctactatta
Satt 285	16	gcgacatattgcattaaaaacatactt	gctgactaattctatttacaccaacaac
Satt 307	6	gcgctggcctttagaac	gcgtttaggaaattgagtagtaag
Satt 309	18	gcgcttcaaatggcgtctt	gctgcttaataaaaacccgaaact
Satt 409	8	ccttagaccatgaatgtctcgaagata	cttaaggacacgtggaagatgactac
Satt 228	8	tcataacgtaagagatggtaaaact	cattataagaaaacgtgctaaaagag

ДНК экстрагировали методом Dellaporta и др. (1983), [21]. Экстрагированную и осажденную ДНК обрабатывали RNase A (10 мг/мл) при 37 °C в течение 30 минут, осаждали охлажденным 97 %-ым этанолом, отмывали 70%-ым этанолом.

Выделенное ДНК растворяли в ddH₂O, измеряли концентрацию на спектрофотометре Jenway, доводили концентрацию до 0,1 мкг/мкл и определяли качество электрофорезом в 8.0%-ом полиакриламидном геле.

Для ПЦР анализа состав реакционной смеси был следующим: 100 нг геномной ДНК, 1.6 x PCR буфер, 2 mM MgCl₂, 210 нМ каждого dNTP, 7-10 pmole каждого праймера, 0,5 ед Taq – полимеразы, BSA (0,07 мкг/мкл). Амплификацию проводили в термоциклере iCycler “BIORAD”. Условия амплификации: начальная денатурация – 94 °C 3 мин, затем 30 циклов 1 мин. при 94 °C, 1 мин. при 55 °C и 1 мин. при 72 °C, финальная элонгация- 5 мин.

Детектирование проводилось методом электрофореза продуктов амплификации в 8%-ом полиакриламидном геле, трис – боратном буфере при 200 В в течение 70 мин. Продукты амплификации проявляли бромистым этидием. Документирование полученных электрофореграмм проводили с помощью геля документирующей системы Quantum ST4. Размерность продуктов определяли с помощью компьютерной программы “quantum capt, image analysis” относительно маркеров длины фрагментов ДНК.

Выделение запасных белков – глицининов велось фосфатным буфером pH 6,9, система электрофоретического разделения соответствовала методу Лэммли [22] с небольшими модификациями состава верхнего и нижнего электродных буферов [23]. Концентрация акриламида в разделяющем геле составляла 12%, соотношение между акриламидом и метиленби-

сакриламидом было равно 48. Фиксация и окрашивание белковых полос проводились в 12,5% трихлоруксусной кислоте (ТХУ). В качестве маркера молекулярных масс белков использовали смесь Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder с ранжированием от 10 до 180 kDa. Маркирование компонентов глицинина и β- конглицинина проводили путем сопоставления белковых полос и их групп на электрофореграммах, полученных нами со спектрами белков сои, представленных в публикациях Fontes et al. (1984) и Yaklich (2001) [24, 25].

Гибридизацию сои для распознавания гетерозиготного состояния растений в F1 поколении и в расщепляющихся популяциях с использованием кодоминантных белковых и ДНК маркеров проводили методом, разработанным в лаборатории масличных культур [2].

Результаты и обсуждение

Схемы гибридизации, приведенные в таблице 1 составлены так, что в качестве материнской формы используется сорт с рецессивным признаком: белой окраской венчика, а в качестве отцовской формы взяты сорта с фиолетовой окраской венчика. Морфологические признаки имеют доминантно/рецессивный характер проявления, для контроля фактической гетерозиготности полученных растений на практике, селекционер использует в качестве материнской формы, как правило, линию с рецессивным признаком, в данном случае – с белой окраской венчика. Фактически гетерозиготными растениями F1 поколения будут растения, у которых проявится доминантный морфологический признак: фиолетовая окраска цветка.

Использование только морфологических признаков в дифференциации истинно гетерозиготных растений при принудительной ги-

бридизации самоопыляющихся культур сужает возможности подбора пар для скрещиваний, снижает генетическое разнообразие селекционного материала.

Число настоящих гибридных растений в F1 не достигает 100%. Так, в исследованиях Talięcio и др. (2017) [26], содержание ложных гибридов в 2-ух комбинациях скрещиваний составляло 1%, тогда как в результате 11 комбинаций скрещиваний, проведенных Li et.al. (2019) [12] лишь 14,1% растений оказались настоящими гибридными растениями.

Проблема распознавания гетерозиготности растений в F1 поколении и возможность ее решения на основе применения молекулярных маркеров освещена во многих публикациях [27-30].

Высокая полиморфность и кодоминантное наследование SSR маркеров, а также специфичность состава запасных белков семян позволяют селекционеру вводить в селекцию исходные формы с ценными признаками, создавать реци-

прокные гибридные комбинации, создавать сорта, востребованные производством.

При подборе пар для скрещивания, всегда можно установить молекулярные маркеры, по которым родительские формы имеют четкие различия и использовать их в анализе гетерозиготности полученных F1семян.

В таблице 3 приведены генетические формулы исходных родительских форм в планируемых скрещиваниях в питомнике бридизации лаборатории масличных культур ТОО «КазНИИЗиР». Все маркеры в этом наборе сортов проявили полиморфность, наибольшее число аллелей (4) выявлено у маркеров *Satt001*, *Satt160*, *Satt409*. Для отцовской формы (Victory) можно подобрать один или несколько маркеров, по которым родительские формы будут иметь разные по размерности продукты амплификации. Эти маркеры могут использоваться для контроля гетерозиготности растений как в прямых, так и в обратных реципрокных скрещиваниях.

Таблица 3 – Генетические формулы сортообразцов сои, используемых в схемах скрещиваний гибридного питомника лаборатории масличных культур ТОО «КазНИИЗиР»

Родительские формы		SSR маркеры										
		<i>Satt005</i>	<i>Satt001</i>	<i>Satt160</i>	<i>Satt171</i>	<i>Satt173</i>	<i>Satt185</i>	<i>Satt285</i>	<i>Satt307</i>	<i>Satt309</i>	<i>Satt409</i>	<i>Satt228</i>
♀	Victory	165	225	276	310	205	220	268	200	147	185	267
♂	Жансяя	200	210	298	310	144	244	268	186	172	185	267
♂	Ласточка	165	210	280	310	144	220	215	186	172	200	267
♂	Дельта	165	190	233	230	205	220	268	200	172	175	267
♂	Селекта_301	175	190	276	295	145	244	268	200	172	175	237
♂	Вилана	175	190	276	295	205	244	268	200	147	175	237
♂	Корсак	200	210	276	295	205	220	268	210	147	200	237
♂	Воеводжанка	200	210	276	295	205	244	268	200	172	175	267
♂	Сава	200	210	276	295	205	220	268	200	172	175	267
♂	Аскасуби	200	225	276	295	144	220	268	186	147	170	237
♂	Триумф	200	185	276	295	205	190	268	200	172	170	237
♂	Спонсор	165	225	276	295	144	190	215	186	172	200	267
♂	Сафрана	165	225	280	295	205	244	215	200	172	200	267
♂	Декабиг	165	225	276	295	144	244	268	200	172	200	267
♂	Зен	200	225	276	295	144	220	268	210	172	185	267
♂	Атлантик	165	225	276	295	144	244	268	200	172	200	267
♂	Хиларио	165	225	276	295	205	220	268	210	172	185	237
Число аллелей		3	4	4	3	3	3	2	3	2	4	2

Данные исходных форм по аллельным вариантам молекулярных маркеров позволяют вычлнять истинные гетерозиготы в F1 поколении и отделять ложные гибриды на самом раннем этапе селекционного процесса, что снижает нагрузку на полевые мероприятия по посеву, выращиванию и оцениванию селекционного материала.

На рисунке 1 приведены результаты ПЦР анализа ДНК гибридов F1, полученных от скрещивания сорта Ласточка (материнская форма) и сорта Спонсор (отцовская форма) в разные сроки в 2021 году. Для четкого различения F1

гибридов и браковки растений сорта Ласточка, у которых не произошло переопыления, выбран SSR маркер *Satt185*, продукты амплификации которого имели большое различие у родителей по размерности (таблица 3). Для сорта Ласточка характерна аллель, размерностью 200 п.н., тогда как для сорта Спонсор - 190 п.н.

Результаты анализа показали, что опыление, произведенное 5 июля, дало хороший результат: все семена оказались гибридными, тогда как при опылении 10 июля лишь ¼ часть семян была гибридной.

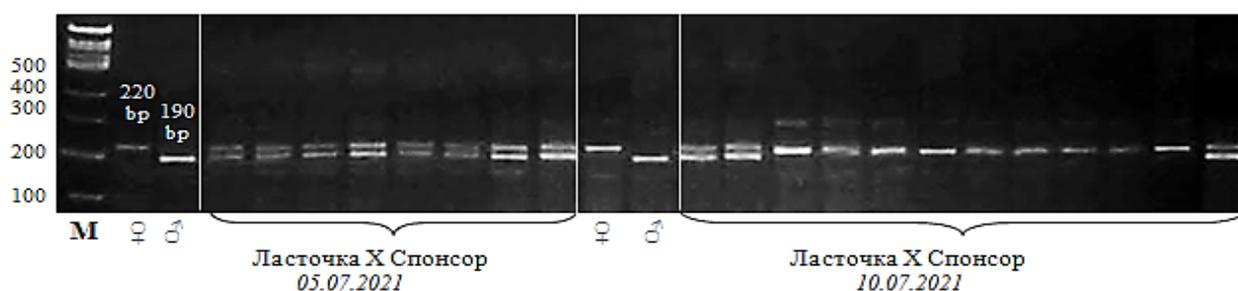


Рисунок 1 – Спектр продуктов амплификации SSR маркера *Satt185* при ПЦР анализе ДНК семян сортов сои Ласточка (♀), Спонсор (♂) и их гибридов F1

Возможность четкого различения гетерозиготного состояния растений F1 от гомозиготного на основе разнообразия кодоминантных ДНК маркеров устраняет узкие места селекции на этапе скрещивания самоопыляющихся культур, в том числе сои, улучшать методы принудительной гибридизации, позволяет осуществлять любые варианты скрещивания вне зависимости от доминантно-рецессивного проявления морфологических признаков.

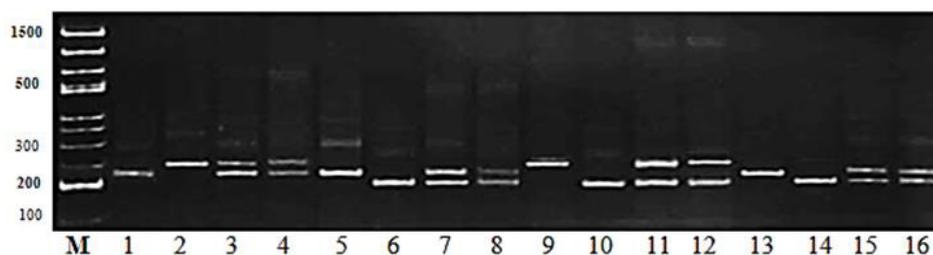
Выделением ДНК и его ПЦР анализом на стадии созревания семян можно распознавать истинные гибриды F1 до посева, тогда как по морфологическим доминантным признакам растений дифференциация возможна лишь на стадии нескольких листьев либо цветения.

Предварительное генотипирование исходных родительских линий дает информацию о конкретных маркерах, которые можно использовать для отбора истинно гибридных линий. На рисунке 2 приведены результаты визуализации продуктов амплификации маркера *Satt185* после ПЦР ДНК сортообразцов сои и искусственной гибридной смеси ДНК. Для эксперимента были использованы ДНК сортов: Алматы и Жансая, а также их смесь (Алматы+Жансая), Алматы и Спонсор, а также их

смесь (Алматы+Спонсор), Бламокос и Спонсор, их смесь (Бламокос + Спонсор), Ласточка и Спонсор, их смесь (Ласточка +Спонсор). Все четыре искусственно созданных гибридных состояний ДНК в ходе ПЦР производят аллельные варианты маркера *Satt185*, по которым различаются исходные, так называемые, родительские формы. На примере ПЦР ДНК Ласточки и Спонсора и их смеси (Ласточка +Спонсор) видно, что картина проявления продуктов амплификации смеси ДНК («искусственный» гибрид) аналогична спектру настоящих гетерозиготных F1 гибридов (рисунок 1).

Следует отметить, что 2 отцовские формы (Атлантик и Декабиг), использованные в качестве отцовских форм в планируемых скрещиваниях, идентичны по использованным SSR маркерам (таблица 3), при необходимости их дифференциации следует, по видимому, расширить список используемых маркеров, в том числе молекулярных и биохимических.

Новые образцы, пополняющие исходный для гибридизации материал, требуют предварительного скрининга на отличимость от уже изученных образцов, в том числе и от другой родительской формы, что связано с затратой времени, реактивов и средств.



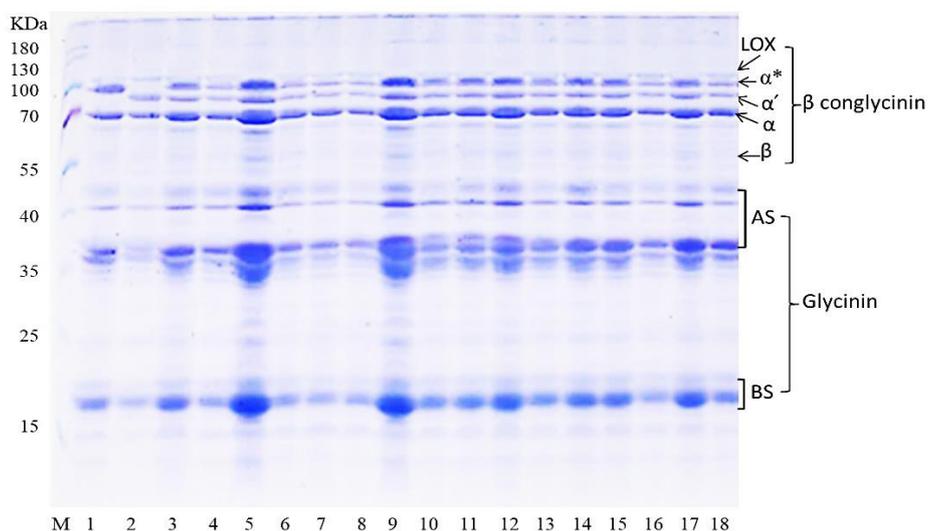
1-Алматы; 2 – Жансая; 3,4 – (Алматы + Жансая); 5 – Алматы; 6 – Sponsor; 7,8 – (Алматы + Sponsor);
9 – Blamcos; 10 – Sponsor; 11, 12 – (Blamcos + Sponsor); 13 – Ласточка; 14 – Sponsor;
15, 16 – (Ласточка + Sponsor)

Рисунок 2 – Электрофоретические спектры продуктов амплификации SSR маркера *Satt185* при ПЦР анализе ДНК семян сортов сои

Электрофорез запасных белков в силу кодоминантного наследования генетических факторов родительских форм, проявляющегося в 100% пенетрантности соответствующих белковых полос в электрофоретическом спектре, также позволяет устанавливать гетерозиготность семян F1 поколения и выявлять гетерозиготные генотипы в расщепляющихся поколениях. В случае имеющих в белковом спектре исходных родительских форм отличий по подвижности компонентов, использование белковых маркеров является эффективным подходом в оценке хода гибридизации.

На рисунке 3 приведен спектр запасных белков семян сортов Зара и Малета, а также гибридных линий F1, полученных в ходе их принудительного перекрестного опыления.

Сорт Зара имеет специфичную субъединицу в зоне β конглицининов – α^* . Сорт Малета имеет спектр, обычный для большей части сортов с субъединицей α в этой зоне. В электрофоретическом спектре гибридов F1 наблюдается кодоминантное наследование обоих компонентов, что свидетельствует о гетерозиготном состоянии и истинности гибридов F1.



M – маркер – PageRuler Prestained Protein Ladder: 10-180 кДа.
Зара ♀; 2- Малета ♂; 3-18 – гибриды F1.

Рисунок 3 – Полиакриламидный гель-электрофорез белков семян сои в системе с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE)

Заключение

При принудительном переопылении самоопыляющихся культур для распознавания гетерозиготного состояния в F1 поколениях исходных форм селекционеры используют морфологические признаки, число которых ограничено и лимитирует проведение реципрокных скрещиваний.

Исследования были направлены на изучение и внедрение молекулярных и белковых маркеров в селекционный процесс на стадии гибридизации.

Исходные родительские формы сои питомника гибридизации идентифицированы с помощью 11 полиморфных SSR маркеров.

На основе генотипирования исходных родительских линий выявлены маркеры, которые можно использовать для отбора истинно гибридных линий. На примере ПЦР ДНК исходных родительских форм – сортов сои Ласточка и Спонсор а также их гибридов подтверждено кодоминантное наследование аллелей SSR маркера *Satt185* у гетерозиготных образцов и показана возможность отбора истинных гибридов в F1.

Специфичность компонентов белкового спектра родительских форм, выявляемую методом электрофореза, также можно использовать для контроля успешности принудительного опыления у сои.

Возможность четкого различения гетерозиготного состояния растений F1 от гомозиготного на основе разнообразия кодоминантных ДНК и белковых маркеров устраняет узкие места селекции на этапе скрещивания самоопыляющихся культур, в том числе сои, позволяет улучшать методы принудительной гибридизации, осуществлять любые варианты скрещиваний вне зависимости от доминантно-рецессивного проявления морфологических признаков.

Конфликт интересов

Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

Источник финансирования

Исследования, подготовка статьи финансировались Министерством сельского хозяйства Республики Казахстан в рамках целевой программы «Создание высокопродуктивных сортов и гибридов масличных и крупяных культур на основе достижений биотехнологии, генетики, физиологии, биохимии растений для устойчивого их производства в различных почвенно-климатических зонах Казахстана» (ИРН BR10764991).

Литература

1. Matsuo E, Sedyama T, Cruz CD, Brommonschenkel SH, Ferreira SdC, Fialho GS. «Efficiency of artificial hybridization in soybean during the summer depending on temperature and relative humidity». *Bioscience Journal* 31, no. 6 (2015): 1663-70. DOI : 10.14393/VJ-v31n6a2015-26171.
2. Дидоренко С. В. Карягин Ю.Г, Булатова К. М., Патент № 31427 на изобретение «Способ гибридизации сои» / ТОО «Казахский НИИ земледелия и растениеводства», заявка № 2011/0010.1 подано 06.01.2011, опубликовано 21.07.2016.
3. Кочегура А.В. ТМВ, Ткачева А.А. Эффективность гибридизации сои в условиях юга европейской части России // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур.- 2016.-Вып.2 (166).-С. 50-56. ISSN 2412–608X.
4. Kannan U, Altaher A, Båga M, Hucl P, Chibbar R. “Utilization of microsatellite markers to assess hybridity and genetic identity of canary seed (*Phalaris canariensis* L.) genotypes”. *Canadian Journal of Plant Science* 97, no. 5 (2017): 835-41. <https://doi.org/10.1139/cjps-2016-0129>.
5. Ray JD, Kilen TC, Abel CA, Paris RL. “Soybean natural cross-pollination rates under field conditions”. *Environmental biosafety research* 2, no. 2 (2003): 133-8. <https://doi.org/10.1051/ebr:2003005>.
6. Kochevura A.V. ТМВ, Ткачева А.А. Efficiency of soybean hybridization in the conditions of the south of the European part of Russia // Oil cultures. Scientific and Technical Bulletin of the All-Russian Research Institute of Oilseeds.- 2016.-Vol.2 (166).-S. 50-56. ISSN 2412-608X.
7. Nadeem M, Wang X, Akond M, Awan FS, Riaz A, Younis A. “Hybrid identification, morphological evaluation and genetic diversity analysis of Rosa x hybrida by SSR markers”. *Australian journal of crop science* 8, no. 2 (2014): 183-90.
8. Shurtleff W, Aoyagi A. History of Soybeans and Soyfoods in the Middle East: Extensively Annotated Bibliography and Sourcebook: *Soyinfo Center*, 2008.
9. Nikolić Z, Vujaković M, Jevtić A. “Genetic purity of sunflower hybrids determined on the basis of isozymes and seed storage proteins/Pureza genética de híbridos de girasol determinada sobre la base de isoenzimas y proteínas de reserva en semilla/Pureté

génétique d'hybrides de tournesol déterminée sur la base des isozymes et des protéines de réserve dans la graine". *Helia* 31, no. 48 (2008): 47-54. <https://doi.org/10.2298/hel0848047n>.

10. Zheng J, Wen D, Zhao H, Zhang C. "Acetic acid urea-polyacrylamide gel electrophoresis: a rapid method for testing the genetic purity of sunflower seeds". *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods* 9, no. 1 (2017): 41-6. <https://doi.org/10.3920/QAS2015.0593>.

11. Gupta P, Varshney R. "The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat". *Euphytica* 113, no. 3 (2000): 163-85. <https://doi.org/10.1023/A:1003910819967>.

12. Li F, Liu X, Wu S, Luo Q, Yu B. "Hybrid identification for Glycine max and Glycine soja with SSR markers and analysis of salt tolerance". *PeerJ* 7, no. (2019): e6483. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30809456>.

13. Bohra A, Jha R, Pandey G, Patil PG, Saxena RK, Singh IP, et al. "New Hypervariable SSR Markers for Diversity Analysis, Hybrid Purity Testing and Trait Mapping in Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh]". *Front Plant Sci* 8, no. (2017): 377. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28408910>.

14. Mulato BM, Möller M, Zucchi MI, Quecini V, Pinheiro JB. "Genetic diversity in soybean germplasm identified by SSR and EST-SSR markers". *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45, no. (2010): 276-83.

15. Abugaliyeva S, Volkova L, Nurlanova A, Zhanpeissova A, Turuspekova E. "DNA-FINGERPRINTING OF SOYBEAN VARIETIES IN KAZAKHSTAN USING SSR-MARKERS". *Eurasian Journal of Applied Biotechnology* no. 3 (2013). <https://biotechlink.org/index.php/journal/article/view/276>.

16. Mittal PK, Madan A, Sharma V, Gottam G, Gupta B. "Cryopreservation of buffalo bull semen-restriction and expectation: A review". *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 8, no. 1 (2019): 1351-68.

17. Hwang T-Y, Gwak BS, Sung J, Kim H-S. "Genetic diversity patterns and discrimination of 172 Korean soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) varieties based on SSR analysis". *Agriculture* 10, no. 3 (2020): 77. <https://doi.org/10.3390/agriculture10030077>.

18. Jiang G-L. "Molecular markers and marker-assisted breeding in plants". *Plant breeding from laboratories to fields* 3, no. (2013): 45-83.

19. Tantasawat P, Trongchuen J, Prajongjai T, Jenweerawat S, Chaowiset W. "SSR Analysis of Soybean ('*Glycine max*' (L.) Merr.) Genetic Relationship and Variety Identification in Thailand". *Australian Journal of Crop Science* 5, no. 3 (2011): 283-90.

20. Kim MS, Park MJ, Jeong WH, Nam KC, Chung JI. "SSR marker tightly linked to the Ti locus in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]". *Euphytica* 152, no. 3 (2006): 361-6. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9223-3>.

21. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. "A plant DNA miniprep: version II". *Plant molecular biology reporter* 1, no. 4 (1983): 19-21.

22. Laemmli UK. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *nature* 227, no. 5259 (1970): 680-5.

23. Булатова КМ. "Изучение компонентного состава глютенина пшеницы". *Вестник с-х науки Казахстана* 4, no. (1985): 37-9.

24. Fontes EPB, Moreira MA, Davies CS, Nielsen NC. "Urea-elicited changes in relative electrophoretic mobility of certain glycinin and β -conglycinin subunits". *Plant physiology* 76, no. 3 (1984): 840-2. <https://doi.org/10.1104/pp.76.3.840>.

25. Yaklich RW. " β -Conglycinin and glycinin in high-protein soybean seeds". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, no. 2 (2001): 729-35. <https://doi.org/10.1021/jf001110s>.

26. Taliercio E, Eickholt D, Rouf R, Carter T. "Changes in gene expression between a soybean F1 hybrid and its parents are associated with agronomically valuable traits". *PLoS One* 12, no. 5 (2017): e0177225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177225>.

27. Yanting Y, Rui G, Jiaqi D, Zhang Y, Fengling S, Fang T. "IDENTIFICATION BY SSR AND SRAP MARKERS AND HETEROISIS ANALYSIS OF F1 HYBRIDS (*Medicago ruthenica* L.)". *Turkish Journal Of Field Crops* 26, no. 2 (2021): 163-9.

28. Li X, Zheng B, Xu W, Ma X, Wang S, Qian M, et al. "Identification of F1 hybrid progenies in mango based on Fluorescent SSR markers". *Horticulturae* 8, no. 12 (2022): 1122. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8121122>.

29. Salem KF, Alghuthaymi MA, Elabd AB, Elabsawy EA, Mierah HH. "Prediction of Heterosis for Agronomic Traits in Half-Diallel Cross of Rice (*Oryza sativa* L.) under Drought Stress Using Microsatellite Markers". *Plants* 11, no. 12 (2022): 1532.

30. Gao Z, Yun L, Li Z, Liu Q, Zhang C, Ma Y, et al. "Hybrid purity identification using EST-SSR markers and heterosis analysis of quantitative traits of Russian wildrye". *PeerJ* 10 (2022): e14442. [10.7717/peerj.14442](https://doi.org/10.7717/peerj.14442).

References

1. Abugaliyeva S, Volkova L, Nurlanova A, Zhanpeissova A, Turuspekova E. "DNA-FINGERPRINTING OF SOYBEAN VARIETIES IN KAZAKHSTAN USING SSR-MARKERS". *Eurasian Journal of Applied Biotechnology* no. 3 (2013). <https://biotechlink.org/index.php/journal/article/view/276>.

2. Bohra A, Jha R, Pandey G, Patil PG, Saxena RK, Singh IP, et al. «New Hypervariable SSR Markers for Diversity Analysis, Hybrid Purity Testing and Trait Mapping in Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh]». *Front Plant Sci* 8, no. (2017): 377. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28408910>.

3. Bulatova KM. «Izuchenie komponentnogo sostava gljutenina pshenicy». *Vestnik s-h nauki Kazahstana* 4, no. (1985): 37-9.

4. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. «A plant DNA miniprep: version II». *Plant molecular biology reporter* 1, no. 4 (1983): 19-21.

5. Didorenko S.V. Karjagin Ju.G., Bulatova K.M., Patent № 31427 na izobretenie «Sposob gibridizacii soi» / TOO «Kazahskij NII zemledelija i rastenievodstva», zajavka № 2011/0010.1 podano 06.01.2011, opublikovano 21.07.2016.

6. Fontes EPB, Moreira MA, Davies CS, Nielsen NC. «Urea-elicited changes in relative electrophoretic mobility of certain glycinin and β -conglycinin subunits». *Plant physiology* 76, no. 3 (1984): 840-2. <https://doi.org/10.1104/pp.76.3.840>.
7. Gao Z, Yun L, Li Z, Liu Q, Zhang C, Ma Y, et al. «Hybrid purity identification using EST-SSR markers and heterosis analysis of quantitative traits of Russian wildrye». *PeerJ* 10 (2022): e14442. [10.7717/peerj.14442](https://doi.org/10.7717/peerj.14442).
8. Gupta P, Varshney R. «The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat». *Euphytica* 113, no. 3 (2000): 163-85. <https://doi.org/10.1023/A:1003910819967>.
9. Hwang T-Y, Gwak BS, Sung J, Kim H-S. «Genetic diversity patterns and discrimination of 172 Korean soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) varieties based on SSR analysis». *Agriculture* 10, no. 3 (2020): 77. <https://doi.org/10.3390/agriculture10030077>.
10. Jiang G-L. «Molecular markers and marker-assisted breeding in plants». *Plant breeding from laboratories to fields* 3, no. (2013): 45-83.
11. Kannan U, Altaher A, Båga M, Hucl P, Chibbar R. «Utilization of microsatellite markers to assess hybridity and genetic identity of canary seed (*Phalaris canariensis* L.) genotypes». *Canadian Journal of Plant Science* 97, no. 5 (2017): 835-41. <https://doi.org/10.1139/cjps-2016-0129>.
12. Kim MS, Park MJ, Jeong WH, Nam KC, Chung JI. «SSR marker tightly linked to the Ti locus in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]». *Euphytica* 152, no. 3 (2006): 361-6. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9223-3>.
13. Kochegura A.V. TMV, Tkacheva A.A. Efficiency of soybean hybridization in the conditions of the south of the European part of Russia // Oil cultures. Scientific and Technical Bulletin of the All-Russian Research Institute of Oilseeds. - 2016. - Vol.2 (166). - S. 50-56. ISSN 2412-608X. no.
14. Kochegura A.V. TMV, Tkachjova A.A. Jeftektivnost' gibrizacii soi v uslovijah juga evropejskoj chasti Rossii // Maslichnye kul'tury. Nauchno-tehnicheskij bjulleten' Vserossijskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta maslichnyh kul'tur. - 2016. - Vyp.2 (166). - S. 50-56. ISSN 2412-608X.
15. Laemmli UK. «Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4». *nature* 227, no. 5259 (1970): 680-5.
16. Li F, Liu X, Wu S, Luo Q, Yu B. «Hybrid identification for *Glycine max* and *Glycine soja* with SSR markers and analysis of salt tolerance». *PeerJ* 7, no. (2019): e6483. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30809456>.
17. Li X, Zheng B, Xu W, Ma X, Wang S, Qian M, et al. «Identification of F1 hybrid progenies in mango based on Fluorescent SSR markers». *Horticulturae* 8, no. 12 (2022): 1122. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8121122>.
18. Matsuo E, Sedyama T, Cruz CD, Brommonschenkel SH, Ferreira SdC, Fialho GS. «Efficiency of artificial hybridization in soybean during the summer depending on temperature and relative humidity». *Bioscience Journal* 31, no. 6 (2015): 1663-70. DOI : 10.14393/BJ-v31n6a2015-26171.
19. Mittal PK, Madan A, Sharma V, Gottam G, Gupta B. «Cryopreservation of buffalo bull semen-restriction and expectation: A review». *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 8, no. 1 (2019): 1351-68.
20. Mulato BM, Möller M, Zucchi MI, Quecini V, Pinheiro JB. «Genetic diversity in soybean germplasm identified by SSR and EST-SSR markers». *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45, no. (2010): 276-83.
21. Nadeem M, Wang X, Akond M, Awan FS, Riaz A, Younis A. «Hybrid identification, morphological evaluation and genetic diversity analysis of Rosa x hybrida by SSR markers». *Australian journal of crop science* 8, no. 2 (2014): 183-90.
22. Nikolić Z, Vujaković M, Jevtić A. «Genetic purity of sunflower hybrids on the basis of isozymes and seed storage proteins/Pureza genética de híbridos de girasol determinada sobre la base de isoenzimas y proteínas de reserva en semilla/Pureté génétique d'hybrides de tournesol déterminée sur la base des isozymes et des protéines de réserve dans la graine». *Helia* 31, no. 48 (2008): 47-54. <https://doi.org/10.2298/hel0848047n>.
23. Ray JD, Kilen TC, Abel CA, Paris RL. «Soybean natural cross-pollination rates under field conditions». *Environmental biosafety research* 2, no. 2 (2003): 133-8. <https://doi.org/10.1051/ebr:2003005>.
24. Salem KF, Alghuthaymi MA, Elabd AB, Elabsawy EA, Mierah HH. «Prediction of Heterosis for Agronomic Traits in Half-Diallel Cross of Rice (*Oryza sativa* L.) under Drought Stress Using Microsatellite Markers». *Plants* 11, no. 12 (2022): 1532.
25. Shurtleff W, Aoyagi A. History of Soybeans and Soyfoods in the Middle East: Extensively Annotated Bibliography and Sourcebook: *Soyinfo Center*, 2008.
26. Taliércio E, Eickholt D, Rouf R, Carter T. «Changes in gene expression between a soybean F1 hybrid and its parents are associated with agronomically valuable traits». *PLoS One* 12, no. 5 (2017): e0177225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177225>.
27. Tantasawat P, Trongchuen J, Prajongjai T, Jenweerawat S, Chaowiset W. «SSR Analysis of Soybean ('*Glycine max*' (L.) Merr.) Genetic Relationship and Variety Identification in Thailand». *Australian Journal of Crop Science* 5, no. 3 (2011): 283-90.
28. Yaklich RW. « β -Conglycinin and glycinin in high-protein soybean seeds». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, no. 2 (2001): 729-35. <https://doi.org/10.1021/jf001110s>.
29. Yanting Y, Rui G, Jiaqi D, Zhang Y, Fengling S, Fang T. «IDENTIFICATION BY SSR AND SRAP MARKERS AND HETEROSIS ANALYSIS OF F1 HYBRIDS (*Medicago ruthenica* L.)». *Turkish Journal Of Field Crops* 26, no. 2 (2021): 163-9.
30. Zheng J, Wen D, Zhao H, Zhang C. «Acetic acid urea-polyacrylamide gel electrophoresis: a rapid method for testing the genetic purity of sunflower seeds». *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods* 9, no. 1 (2017): 41-6. <https://doi.org/10.3920/QAS2015.0593>.