

В. А. Топтиков¹, к.б.н., доцент,

Д. А. Жарикова¹, аспирант

Г. А. Чеботарь¹, к.б.н., доцент

И. В. Темченко², ст.научн.сотр.,

С. В. Чеботарь^{1,3}, д.б.н., профессор

¹Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, кафедра генетики и молекулярной биологии, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина

²Институт кормов и сельского хозяйства Подолья НААН Украины, проспект Юности, 16, Винница, 21100, Украина

³Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноведения и сортоизучения НААН Украины, Овидиопольская дор., 3, Одесса, 65036, Украина, e-mail: v.a.toptikov@gmail.com

ГЕНЕТИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МУТАНТНЫХ ЛИНИЙ СОИ

С помощью аллозимного анализа проведен сравнительный популяционно-генетический анализ мутантных линий сои, полученных в результате химического мутагенеза сорта Фемида, а также сортов Фемида и Корада. В качестве белковых маркеров использовали ферменты обмена активных форм кислорода: НАДФ•Н-оксидазу, пероксидазу и супероксиддисмутазу. Установлена значительная генетическая гетерогенность исследуемых образцов. Показано, что генетические дистанции между разными группами сои, несмотря на высокий уровень гетерогенности, находятся в рамках внутривидовых границ. Выявлены достоверные корреляционные отношения между некоторыми локусами изоцистов и рядом хозяйственно ценных признаков сои, а также геном фотопериодической чувствительности E_7 .

Ключевые слова: *Glycine max* (L.); аллозимы; генетическая структура; генетическая дистанция; корреляция; ген E_7 ; фотопериодическая чувствительность.

Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) является ценной сельскохозяйственной культурой, благодаря богатому биохимическому составу ее семян и зеленой массы в целом, а также способности растений обогащать почву усвояемым азотом за счет симбиоза с клубеньковыми микроорганизмами. Однако ее распространение в средних и высоких географических широтах ограничивается особенностями биологии этого вида. Соя относится к тепло- и влаголюбивым, чувствительным к фотопериоду короткодневным растениям, требовательным к плодородию почвы с довольно длинным вегетационным периодом в средних географических широтах [15]. В связи с этим, в условиях Украины для стабильного получения урожая этой культуры необходим продуманный подбор сортов сои со свойствами, адекватными конкретному региону выращивания [10].

Одним из свойств, влияющих на продуктивность сои, является начало и продолжительность репродуктивного периода в цикле развития растений [37]. Это определяет важность одного из приоритетных направлений в селекции сои: изучение генетических факторов, ответственных за реакцию растений к продолжительности светового периода [10].

Успешная селекция любой культуры зависит от разнообразия исходного материала. Одним из источников необходимого разнообразия является гибридизация. Однако для сои этот подход крайне трудоемок и дает низкий выход гибридных семян [13]. Дополнительным источником повышения разнообразия селекционного материала сои выступает искусственный мутагенез [4]. В Институте кормов и сельского хозяйства Подолья НААН Украины (КСГП, г. Винница) путем химического мутагенеза получены мутантные линии сои, различающиеся по морфологическим, физиологическим показателям, а также по чувствительности к фотопериоду.

Ранее мы определяли полиморфизм мутантных форм сои по микросателлитным локусам *Satt 100* и *Satt 319* [8; 42]. Целью данной работы было изучение генетико-биохимических особенностей линий сои, полученных после обработки семян химическими мутагенами. Для достижения этой цели ставились следующие задачи: 1) определить популяционно-генетические показатели образцов сои; 2) установить генетические дистанции между линиями и родительским материалом; 3) выявить возможные коррелятивные отношения между локусами исследуемых энзимов и другими генетическими системами, а также морфофизиологическими параметрами.

Материалы и методы исследования

Исследовали две мутантные линии сои, полученные на основе сорта Фемида: Фемида М29 (n=9), Фемида М32 (n=12), а также сорта Фемида (n=10) и Корада (n=9).

Гомогенаты получали из недельных этиолированных проростков, выращенных в чашках Петри при температуре +26–27 °С. Для получения экстрактов ткани гомогенизировали в буфере для следующего состава: 0,05 М Трис-*HCl* (pH 6,8), 0,01 % дитиотреитол, 0,01 % аскорбиновая кислота, 0,01 % натриевая соль ЭДТА, 1 % тритон X-100, 15 % сахароза. Соотношение ткань : буфер (масса в мг : объем в мкл) составляло 1 : 1. Пробы растирали непосредственно в центрифужных пробирках, 3 раза подвергали замораживанию-оттаиванию, после чего центрифугировали 20 мин при 10000 g при температуре +4 °С. Электрофоретическое разделение белков проводили в системе Дэвиса [21] в 10 % ПААГ в аппарате VE-4М («Хеликон», Россия) в пластинах 130×110×1 мм. Энзимы в гелях детектировали в соответствии с рекомендациями [31]. Пероксидазу (РОХ, КФ. 1.11.1.7) выявляли с использованием бензидина в качестве субстрата энзима, НАДФ-Н-оксидазу (NPOX, КФ 1.6.2.4) и супероксиддисмутазу (SOD, КФ 1.15.1.1) проявляли по восстановлению красителя нитротетразо-

лиевого синего.

Анализ популяционно-генетических показателей исследуемых групп сои (линия или сорт) проводили согласно общепринятым подходам и формулам [1-3, 16, 22, 30, 32, 35, 39, 40]. Рассчитывали частоту аллелей и их ошибку, эффективное число аллелей n_e , наблюдаемую гетерозиготность по отдельным локусам H_o , среднюю наблюдаемую гетерозиготность по всем локусам H_o^{av} и их стандартную ошибку, ожидаемую гетерозиготность по каждому отдельному локусу H_E , среднюю ожидаемую гетерозиготность по исследуемым локусам H_E^{av} и ее стандартную ошибку, полокусный и средний дефицит гетерозиготности по всем исследуемым локусам (D_H и D_H^{av}), их ошибку и достоверность. Соответствие фактических частот генотипов теоретически ожидаемым частотам согласно уравнению Харди-Вайнберга оценивали с помощью критерия χ^2 при 5 % уровне значимости.

Коэффициент инбридинга для каждой исследуемой группы F рассчитывали через отношение наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности

$$F' = 1 - \frac{H_o}{H_E},$$

где H_o и H_E – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность в отдельной группе.

Количественную оценку степени близкородственного скрещивания осуществляли с помощью коэффициентов инбридинга Райта: F_{IS} (коэффициент инбридинга особи конкретной группы, к которой она относится, показатель дефицита гетерозиготности в отдельной группе или гетерогенность отдельной группы), F_{IT} (коэффициент инбридинга особи относительно всей совокупности групп или гетерогенность в целом всех исследуемых образцов сои) и F_{ST} (коэффициент инбридинга исследуемой группы относительно всех исследуемых образцов, показатель дифференциации между исследуемыми группами).

Оценку генного разнообразия проводили также с помощью G_{ST} -статистики согласно протоколу [22]. Определяли H_T – общее для всех образцов генное разнообразие, H_S – внутрисортное (внутрилинейное) генное разнообразие, D_{ST} – межгрупповое разнообразие, G_{ST} – межгрупповую дифференциацию, трактуемую как долю генного разнообразия, распределенное между группами.

Степень генетического подобия I и отдаленности D рассчитывали по Нею (анализ по частотам аллелей) и по индексу генетического подобия Джеффриса-Матуситы (анализ по частотам генотипов) (GSI).

Все расчеты популяционно-генетических показателей осуществляли с помощью матриц, созданных в пакете *Microsoft Excel*.

Уровень связи между разными параметрами растений оценивали по коэффициенту корреляции Пирсона в программе *Microsoft Excel*. Для вычисления коэффициентов корреляции качественные показатели (аллели, генотипы) оцифровывали, количественные данные (продолжительность вегетационного периода, высота растения высота формирования нижних бобов) ранжировали,

придавая им значения 0, 1 и т.д. в зависимости от количества показателей и рангов.

Результаты исследования и их обсуждение

Электрофоретические спектры исследуемых энзимов – НАДФ·Н-оксидазы (NPOX), пероксидазы (POX) и супероксиддисмутазы (SOD) – показаны на рис. 1. Выбор энзимов обусловлен их ключевой ролью в регуляции содержания и соотношения в клетках активных форм кислорода (АФК). Последние, как известно, выполняют функцию посредников, сигнальных молекул в ответной реакции организмов на разные биотические и абиотические воздействия со стороны окружающей среды, фотопериод в том числе [7; 14; 19; 20; 23–29; 34; 36; 41].

При генетической трактовке электрофоретических спектров НАДФ·Н-оксидазы и пероксидазы исходили из известных данных о мономерной организации этих энзимов [31]. Спектры супероксиддисмутазы также адекватно описывались такой моделью. Всего выявлено семь локусов POX и по шесть локусов NPOX и SOD. Причем в зависимости от генотипа некоторые локусы проявляли себя по-разному. У сорта Фемида и производных от него мутантных линий локус NPOX-1 был мономорфным по изоформе с электрофоретической Rf 0,33 подвижностью.

Однако у некоторых растений сорта Корада не обнаруживалось этой формы энзима, что позволяло трактовать локус NPOX-1 как полиморфный с нуль-аллелем. Подобная ситуация была с локусами POX-1, POX-2, POX-4 и SOD-4 (табл. 1).

Всего из 19 локусов исследуемых энзимов 15 были полиморфными с двумя выявляемыми аллелями. Таким образом, по исследуемым ген-энзимным системам соя характеризовалась значительной полиморфностью (0,79).

Результаты расчета популяционно-генетических показателей исследуемых образцов сои представлены в табл. 2–5.

Как видно из табл. 2, по ряду локусов наблюдались особенности в частоте встречаемости аллелей в исследуемых выборках сои. Сорт Корада отличался от остальных образцов в большей степени. Всего с учетом только полиморфных локусов Корада разнился по частоте встречаемости аллелей от остальных образцов почти по половине локусов: семи из 15 (в табл. 2 помечено полужирным шрифтом).

Мутантные линии по сравнению с родительской формой также имели отличия по частоте встречаемости аллелей: линия M29 – по трем локусам (20 %), M32 – по четырем (27 %).

Из общих закономерностей относительно изменений частоты встречаемости аллелей следует отметить следующее. Наиболее стабильными из полиморфных локусов являлись локусы НАДФ·Н-оксидазы, наибольшим изменениям подвергался аллельный состав локусов пероксидазы и полиморфных локусов

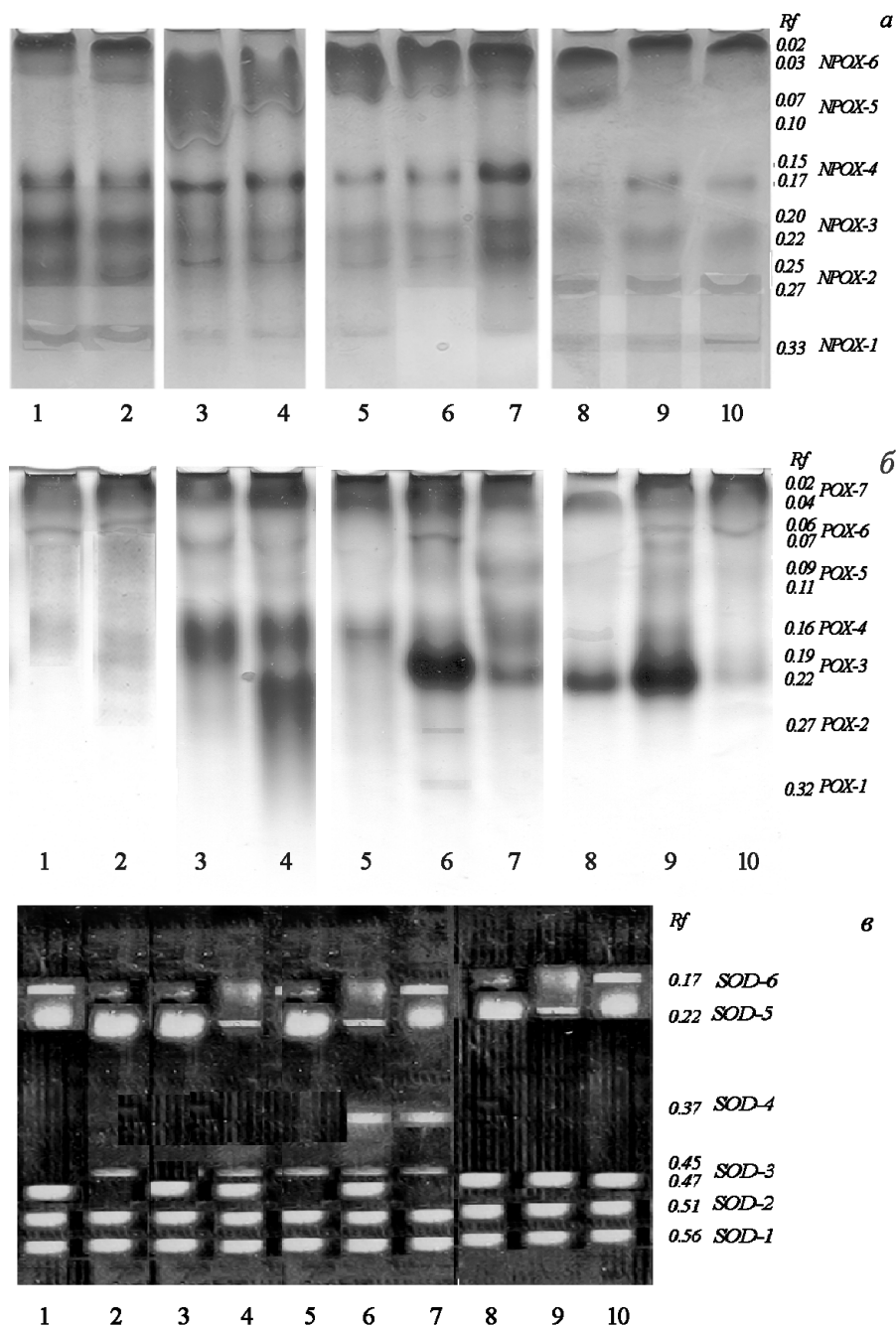


Рис. 1. Электрофореграммы молекулярных форм НАДФ•Н-оксидазы (а), пероксидазы (б) и супероксиддисмутазы (в) исследуемых образцов сои: 1–10 – номера треков; 1, 2 – линия Фемиды М32, 3, 4 – линия Фемиды М29, 5–7 – сорт Корда, 8–10 – сорт Фемиды; Rf – относительная электрофоретическая подвижность молекулярных форм ферментов.

Таблиця 1

Проявление аллелей в локусах исследуемых энзимов в разных образцах сои

Локус	Аллели	Rf	Сорт (линия)				Характеристика локуса
			Фемида	Фемида М32	Фемида М29	Корада	
NPOX-1	A	0,33	+	+	+	+	Полиморфный с 0-аллелем
	a	-				0-аллель	
NPOX-2	A	0,27	+	+	+	+	Полиморфный
	a	0,25	+	+	+	+	
NPOX-3	A	0,22	+	+	+	+	Полиморфный
	a	0,20	+	+	+	+	
NPOX-4	A	0,17	+	+	+	+	Полиморфный
	a	0,15	+	+	+	+	
NPOX-5	A	0,10	+	+	+	+	Полиморфный
	a	0,07	+	+	+	+	
NPOX-6	A	0,03	+	+	+	+	Полиморфный
	a	0,02	+	+	+	+	
POX-1	A	0,32	+	-	-	+	Полиморфный с 0-аллелем
	a	-	0-аллель	0-аллель	0-аллель	0-аллель	
POX-2	A	0,27	+	-	-	+	Полиморфный с 0-аллелем
	a	-	+	0-аллель	0-аллель	+	
POX-3	A	0,22	+	+	+	+	Полиморфный
	a	0,19	+	+	+	+	
POX-4	A	0,16	+	+	+	+	Полиморфный с 0-аллелем
	a	-	+	0-аллель	0-аллель	+	
POX-5	A	0,11	+	+	+	+	Полиморфный
	a	0,09	+	+	+	+	
POX-6	A	0,07	+	+	+	+	Полиморфный
	a	0,06	+	+	+	+	
POX-7	A	0,04	+	+	+	+	Полиморфный
	a	0,02	+	+	+	+	
SOD-1	A	0,56	+	+	+	+	Мономорфный
SOD-2	A	0,51	+	+	+	+	Мономорфный
SOD-3	A	0,47	+	+	+	+	Полиморфный
	a	0,45	+	+	+	+	
SOD-4	A	0,37	-	-	-	+	Полиморфный с 0-аллелем
	a	-	0-аллель	0-аллель	0-аллель	0-аллель	
SOD-5	A	0,22	+	+	+	+	Мономорфный
SOD-6	A	0,17	+	+	+	+	Мономорфный

Примечание: Rf – относительная электрофоретическая подвижность аллозима; +, – – присутствие, отсутствие аллозима в исследуемой группе растений; сочетание «+» и «0-аллель» означает присутствие аллозима у части растений исследуемой группы; сочетание «-» и «0-аллель» означает отсутствие аллозима у всех растений исследуемой группы.

Таблиця 2

Встречаемость аллелей в разных группах сои

Локус	Аллель	Генотипы					
		Фемида	Фемида М32	Фемида М29	Группа генотипов Фемида	Корада	Все генотипы
NPOX-1	A	1,00	1,00	1,00	1,00	0,78	0,95
	a	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22	0,05
NPOX-2	A	0,00	0,04	0,00	0,02	0,06	0,02
	a	1,00	0,96	1,00	0,98	0,94	0,98
NPOX-3	A	0,10	0,00	0,11	0,06	0,00	0,05
	a	0,90	1,00	0,89	0,94	1,00	0,95
NPOX-4	A	0,00	0,00	0,22	0,06	0,11	0,08
	a	1,00	1,00	0,78	0,94	0,89	0,92
NPOX-5	A	0,30	0,08	0,17	0,18	0,06	0,15
	a	0,70	0,92	0,83	0,82	0,94	0,85
NPOX-6	A	0,30	0,08	0,33	0,23	0,00	0,18
	a	0,70	0,92	0,87	0,77	1,00	0,82
POX-1	A	0,10	0,00	0,00	0,03	0,44	0,12
	a	0,90	1,00	1,00	0,97	0,56	0,88
POX-2	A	1,00	0,00	0,78	0,55	1,00	0,65
	a	0,00	1,00	0,22	0,45	0,00	0,35
POX-3	A	0,50	0,38	0,56	0,47	0,78	0,54
	a	0,50	0,62	0,44	0,53	0,22	0,56
POX-4	A	1,00	0,92	1,00	0,97	0,78	0,92
	a	0,00	0,08	0,00	0,03	0,22	0,08
POX-5	A	0,00	0,04	0,33	0,11	0,00	0,09
	a	1,00	0,96	0,67	0,89	1,00	0,91
POX-6	A	0,20	0,62	1,00	0,60	0,72	0,62
	a	0,80	0,38	0,00	0,40	0,28	0,38
POX-7	A	0,85	0,75	1,00	0,86	0,22	0,71
	a	0,15	0,25	0,00	0,14	0,78	0,29
SOD-3	A	1,00	0,83	0,56	0,81	0,06	0,64
	a	0,00	0,17	0,44	0,19	0,94	0,36
SOD-4	A	0,00	0,00	0,00	0,00	0,67	0,15
	a	1,00	1,00	1,00	1,00	0,33	0,85

Примечание: локусы SOD-1, -2 -5, -6 как мономорфные в таблицу не включены, полужирным шрифтом отмечены частоты аллелей, специфичные для сорта Корада, курсивом – встречаемость аллелей, характерная для данной исследуемой группы.

супероксиддисмутазы. Это можно связать с особенностями регуляции баланса разных АФК: первичная продукция АФК производится НАДФ•Н-оксидазой, а контроль над их содержанием обеспечивается супероксиддисмутазой и пероксидазой.

По частоте встречаемости генотипов исследуемые группы сои различались еще в большей степени (табл. 3): линия М32 отличалась от сорта Фемида по 5 локусам (33 %), линия М29 – по 9 (60 %). Сорта Фемида и Корада несхожи между собой по 10 из 15 полиморфных локусов (67 %). Кроме количественного изменения частот генотипов, наблюдались другие формы трансформации генотипического состава. Так, у мутантных линий по сравнению с родительской формой повышалась доля гетерозиготных генотипов по локусам NPOX-3, -4, -5, а также локусу SOD-3. В локусах POX-3 и POX-6, наоборот, частота гетерозигот снижалась. В локусе POX-6 у мутантных форм, по сравнению с исходным сортом, наблюдалась инверсия частот гомозигот по альтернативным аллелям. Описанные изменения генотипического состава наблюдались и при сравнении исследуемых сортов – Фемида и Корада (табл. 3).

Таблица 3

Распределение генотипов в исследуемых образцах сои

Локус	Генотип	Генотипы					
		Фемида	Фемида М32	Фемида М29	Группа генотипов Фемида	Корада	Все генотипы
1	2	3	4	5	6	7	8
NPOX-1	AA	1,00	1,00	1,00	1,00	0,78**	0,95**
	Aa	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	aa	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,05
NPOX-2	AA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Aa	0,00	0,08	0,00	0,03	0,11	0,05
	aa	1,00	0,92	1,00	0,97	0,89	0,95
NPOX-3	AA	0,10	0,00	0,00	0,03*	0,00	0,03*
	Aa	0,00	0,00	0,22	0,07	0,00	0,05
	aa	0,90	1,00	0,78	0,90	1,00	0,92
NPOX-4	AA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Aa	0,00	0,00	0,44	0,13	0,22	0,15
	aa	1,00	1,00	0,56	0,87	0,78	0,85
NPOX-5	AA	0,30**	0,00	0,00	0,10*	0,00	0,08*
	Aa	0,00	0,17	0,33	0,16	0,11	0,15
	aa	0,70	0,83	0,67	0,74	0,89	0,77
NPOX-6	AA	0,30**	0,08**	0,33**	0,23**	0,00	0,17**
	Aa	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	aa	0,70	0,92	0,67	0,77	1,00	0,83

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8
POX-1	AA	0,10**	0,00	0,00	0,03**	0,44**	0,12**
	Aa	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	aa	0,90	1,00	1,00	0,97	0,56	0,88
POX-2	AA	1,00	0,00	0,78**	0,55**	1,00	0,65**
	Aa	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	aa	0,00	1,00	0,22	0,45	0,00	0,35
POX-3	AA	0,00	0,33*	0,44	0,26	0,67	0,35
	Aa	1,00	0,08	0,22	0,42	0,22	0,38
	aa	0,00	0,59	0,34	0,32	0,11	0,27
POX-4	AA	1,00	0,92**	1,00	0,97**	0,78	0,92**
	Aa	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	aa	0,00	0,08	0,00	0,03	0,22	0,08
POX-5	AA	0,00	0,00	0,33*	0,10**	0,00	0,08**
	Aa	0,00	0,08	0,00	0,03	0,00	0,02
	aa	1,00	0,92	0,67	0,87	1,00	0,90
POX-6	AA	0,00	0,58*	1,00	0,52**	0,56*	0,52**
	Aa	0,40	0,08	0,00	0,16	0,33	0,20
	aa	0,60	0,34	0,00	0,32	0,11	0,28
POX-7	AA	0,70	0,58	1,00	0,74	0,00**	0,62**
	Aa	0,30	0,33	0,00	0,23	0,78	0,18
	aa	0,00	0,08	0,00	0,03	0,60	0,20
SOD-3	AA	1,00	0,83**	0,33	0,74**	0,00	0,58**
	Aa	0,00	0,00	0,44	0,13	0,11	0,12
	aa	0,00	0,17	0,23	0,13	0,89	0,30
SOD-4	AA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,67**	0,15**
	Aa	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	aa	1,00	1,00	1,00	1,00	0,33	0,85

Примечание: *, ** – отклонение частот генотипов от равновесного достоверно при уровне значимости нулевой гипотезы $p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно; курсивом обозначены локусы, ведущие себя в своей группе как мономорфные; полужирным шрифтом отмечены частоты генотипов, характерные для данной исследуемой группы.

Как и следовало ожидать для самоопылителей с незначительной вероятностью образования гибридного потомства, исследуемые генотипы сои характеризовались невысоким уровнем гетерозиготности (табл. 4). В среднем, в зависимости от исследуемых генотипов, доля гетерозигот составляла от 4 до 9 процентов. Для всей совокупности исследуемых образцов сои средние наблюдаемая, ожидаемая гетерозиготность и дефицит гетерозигот составляли $H_o^{av} = 0,07 \pm 0,02$, $H_E^{av} = 0,22 \pm 0,04$ и $D_H^{av} = 0,15 \pm 0,03$.

При этом достоверных значений дефицита гетерозигот обнаружено не было. Закономерно, что при такой незначительной гетерозиготности исследуе-

мые образцы сои характеризовались большими положительными величинами коэффициента инбридинга F (50–70 %).

Таблица 4

Гетерозиготность исследуемых образцов сои

Локус	Исследуемые генотипы											
	Фемида			Фемида М32			Фемида М29			Корада		
	H_O	H_E	D	H_O	H_E	D	H_O	H_E	D	H_O	H_E	D
NPOX-1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,39
NPOX-2	0,00	0,00	0,00	0,08	0,09	0,01	0,00	0,00	0,00	0,11	0,12	0,01
NPOX-3	0,00	0,20	0,20	0,00	0,00	0,00	0,22	0,22	0,00	0,00	0,00	0,00
NPOX-4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,44	0,39	-0,05	0,22	0,22	0,00
NPOX-5	0,00	0,47	0,47	0,17	0,17	0,00	0,33	0,31	-0,02	0,11	0,12	0,01
NPOX-6	0,00	0,47	0,47	0,00	0,17	0,17	0,00	0,50	0,50	0,00	0,00	0,00
POX-1	0,00	0,20	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,56	0,56
POX-2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22	0,56	0,34	0,00	0,00	0,00
POX-3	1,00	0,56	-0,44	0,08	0,52	0,44	0,00	0,00	0,00	0,22	0,39	0,17
POX-4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17	0,17	0,00	0,50	0,50	0,00	0,39	0,39
POX-5	0,00	0,00	0,00	0,08	0,09	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
POX-6	0,40	0,36	-0,04	0,08	0,52	0,44	0,00	0,00	0,00	0,33	0,45	0,12
POX-7	0,30	0,28	-0,02	0,34	0,42	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,39
SOD-1	0,00	0,00	0,00	0,08	0,09	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SOD-2	0,00	0,00	0,00	0,08	0,09	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SOD-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,31	0,31	0,44	0,55	0,11	0,11	0,12	0,01
SOD-4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,50
SOD-5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SOD-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Среднее ± ошибка	0,09± 0,06	0,27± 0,05	0,04± 0,06	0,04± 0,02	0,13± 0,04	0,17± 0,03	0,09± 0,04	0,18± 0,05	0,30± 0,04	0,06± 0,02	0,19± 0,05	0,16± 0,05
F	0,66*			0,66*			0,51			0,70*		
F	0,68**											

Примечание: H_O и H_E – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность, D – дефицит гетерозигот, F – коэффициент инбридинга, *, ** – достоверность коэффициента при уровне значимости нулевой гипотезы $p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно.

Статистика Райта и G_{ST} -статистика дает возможность оценить генетическое разнообразие на разных уровнях, в данном случае – на индивидуальном, внутри сорта (линии) и вида сои в целом. Низкие значения коэффициента F_{ST} свидетельствуют о высокой индивидуальной изменчивости в линии Фемида М29 и, особенно, у сорта Корада. В остальных образцах индивидуальная, внутригрупповая и межгрупповая изменчивости вносят примерно равный вклад в общую генетическую гетерогенность. Об этом говорят сопоставимые значения всех показателей статистики Райта. Общую картину значительной гетерогенности исследуемых образцов сои подтверждает и G_{ST} -статистика (табл. 5). Данный вывод согласуется с мнением исследователей, говорящих о высоком адаптивном потенциале сои, основанном на значительном генетическом разнообразии вида [5; 6; 9; 11; 12].

Таблица 5

Внутри- и межпопуляционное разнообразие исследуемых образцов сои

Сорт, линия	Расчеты	Статистика Райта			G_{ST} -статистика							
		F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	H_T	H_S	D_{ST}	G_{ST}				
Фемида	по всей выборке	0,31	0,68	0,38****	0,68	0,34	0,34	0,50				
	по всем генотипам сорта Фемида	0,46	0,60	0,25****								
Фемида М32	по всей выборке	0,31	0,68	0,28****								
	по всем генотипам сорта Фемида	0,45	0,60	0,28****								
Фемида М29	по всей выборке	0,47	0,68	0,16***								
	по всем генотипам сорта Фемида	0,60	0,60	0,00*								
Корада	по всей выборке	0,64	0,68	0,11**								
	по всем генотипам сорта Фемида	0,63	0,60	-0,08*								
Вся выборка												

Примечание: F_{IS} – мера отклонения фактических и ожидаемых частот генотипов внутри отдельных выборок; F_{IT} – мера отклонения фактических и ожидаемых частот генотипов отдельной выборки в сравнении с обобщенной выборкой; F_{ST} – мера генной дифференциации исследуемых выборок; G_{ST} – относительная генная дифференциация между исследуемыми выборками (генное разнообразие совокупной выборки); D_{ST} – межвыборочное генетическое разнообразие; H_T – общее генное разнообразие, H_S – внутригрупповое разнообразие; *, **, ***, **** – генетическая дифференциация малая, средняя, большая, очень большая соответственно [39].

Высокая межгрупповая гетерогенность исследуемых образцов сои определяет необходимость установления степени их родства. Результаты анализа по Нею и Джеффрису-Матисите представлены в табл. 6.

Таблица 6

Генетическое родство исследуемых образцов сои

	Фемида	Фемида М32	Фемида М29	Корада
Фемида		0,91 (0,10)	0,93 (0,08)	0,84 (0,17)
Фемида М32	0,91*		0,93 (0,08)	0,82 (0,19)
Фемида М29	0,91*	0,92 ⁰		0,88 (0,13)
Корада	0,91*	0,91*	0,91*	

Примечание: над диагональю указано показатель родства по Нею (*I*), в скобках – дистанция по Нею (*D*), под диагональю индекс подобия Джеффриса-Матиситы (*GSI*), * – различие между образцами достоверно при уровне значимости $p < 0,05$, ⁰ – достоверного различия между образцами нет, формы достоверно подобны.

По данным, которые приводят для растений Ф. Айала и Дж. Кайгер [2], для разных видов показатель *I* составляет 0,51 и *D* – 0,81, а для локальных популяций – 0,97 и 0,04 соответственно. Как видно, по индексу генетической схожести Нея различия между разными группами сои находились на внутривидовом уровне. Однако, по некоторым локусам наблюдалась дистанция, характерная для разных видов или даже для очень отдаленных таксономических групп (табл. 7). Индекс Джеффриса-Матиситы подтвердил достоверность выявляемых дистанций. Сорт Корада генетически более отдален от остальных образцов сои. Из мутантных линий, производных сорта Фемида, ближе к родительской форме оказалась линия М29.

Вероятно, что все вышеуказанные в данной работе различия между сортами и линиями сои по энзимным локусам не случайны, а имеют закономерную связь с генеалогией материала и морфофизиологическими особенностями растений. Так, сорт Корада канадского происхождения, Фемида – украинского. Кроме того, сорт Корада отличается нечувствительностью к фотопериоду, раннеспелостью и другими важными морфофизиологическими признаками (высотой закладки нижних бобов, содержанием белка, жиров и др. качествами). Различаются также между собой и от родительской формы сестринские мутантные линии. Так, сорт Фемида является среднеспелой формой, линия М29 относится к группе раннеспелых. У линии М32 в среднем вегетационный период на 10 суток продолжительнее, чем у сорта Фемида, нижние генератив-

ные органы закладываются на 7 см выше, она более высокоросла и т.д. [4]. В связи со сказанным был проведен корреляционный анализ для выявления возможных связей между локусами исследуемых энзимов и некоторыми морфофизиологическими показателями образцов сои, а также аллельным составом одного из генов, ответственных за реакцию растений на фотопериод – гена E_7 . Полученные результаты показаны в табл. 8.

Таблица 7

Генетические расстояния между исследуемыми образцами сои по некоторым локусам энзимов

	Фемида	Фемида М32	Фемида М29	Корада
Фемида		POX-2 – -ln(0)	POX-7 – 1,42	SOD-3 – 2,83 SOD-4 – 0,80 POX-6 – 0,55 POX-7 – 0,83
Фемида М32			POX-2 – 1,29	SOD-3 – 1,37 SOD-4 – 0,80 POX-2 – -ln(0) POX-7 – 0,57
Фемида М29				SOD-3 – 0,40 SOD-4 – 0,80 POX-7 – 1,29

Примечание: указаны названия локусов и дистанция между образцами по этим локусам.

Наиболее сильная связь с аллелем e_7 обнаружена для локусов POX-7 и SOD-4 (коэффициенты корреляции $r = -0,80$ и $0,71$ соответственно). С продолжительностью вегетационного периода сильнее всего коррелирован локус SOD-3 ($r = 0,71$). С высотой расположения нижних генеративных органов наиболее тесно связанными оказались локусы POX-2 и SOD-3 ($r = 0,82$ и $0,71$ соответственно). По другим комбинациям взаимодействие было более слабым (табл. 8).

Таким образом, изменения аллельного состава восьми из 19 исследуемых локусов статистически достоверно коррелировали с некоторыми селекционно-ценными показателями растений (*QTL*-признаками), а также с аллельным состоянием одного из генов фотопериодической чувствительности. Разумеется, что обнаруженная связь требует подтверждения с большим количеством вариантов образцов сои и большим объемом выборок в каждом варианте.

Следует обратить внимание на то, что для маркирования образцов растений были выбраны энзимы, контролирующие обмен активных форм кислорода. Последние, как было отмечено ранее, являются сигнальными, медиаторными молекулами, регулирующими активность генов. Выявленная в работе тесная связь локусов этих генов с *QTL*-признаками хорошо согласуется с регуляторной ролью исследуемых энзимов.

Таблиця 8

Корреляції локусів досліджуваних ензимів з некоторими ознаками сортів і ліній сои

Локус	Признак			Пояснення
	Ген E_7 , n=18	Довжина вегетації, сутки n=40	Висота розташування нижніх бобів, см n=40	
NPOX-1	–	-0,35*	–	0-аллелі локусу відповідають більш ранній зрілості
POX-1	0,53**	-0,43**	-0,42**	Наявність алелю POX-1 пов'язано з рецесивним алелем e_7 , більш низьким прикріпленням нижніх бобів і більш короткою вегетацією
POX-2	–	-0,64**	-0,82***	0-аллелі локусу позитивно корелюють з пізнізрілістю і більш високим прикріпленням нижніх бобів
POX-3	–	-0,35*	-0,35*	Гомозиготне стан гену по алелю «А» характеризує більш коротку вегетацію і низьке прикріплення нижніх бобів
POX-6	-0,53**	-0,35*	–	Алелі «а» і особливо гомозиготи по «а» обох локусів характеризують пізнізрілість і більш високе прикріплення нижніх бобів
POX-7	-0,80***	0,34*	–	Гомозиготи «аа» пов'язані з рецесивним алелем гену e_7 і більш коротким вегетаційним періодом
SOD-3	-0,66**	0,71***	0,71***	Гомозиготи «аа» пов'язані з рецесивним алелем гену e_7 , більш коротким вегетаційним періодом і низьким прикріпленням нижніх бобів
SOD-4	0,71***	-0,65**	-0,57***	Наявність алелю SOD-4 характеризує наявність рецесивного алелю гену e_7 , а 0-аллель пов'язаний з пізнізрілістю і більш високим прикріпленням нижніх бобів

Примечание: *, **, *** – значення коефіцієнта кореляції достовірно при рівнях значимості $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ відповідно, «–» – значення коефіцієнта не достовірно.

Як видно з табл. 8, найбільш сильні взаємозв'язки були виявлені для пероксидази і супероксиддисмутази, що може свідчити про важливу роль цих ензимів у регуляції процесів розвитку рослин. Це припущення знаходить згоду з результатами, отриманими на інших рослинних об'єктах [17; 18; 38].

Выявление казуальных генов является одной из важных проблем современной генетики [5]. Это важно как для маркировки искомого гена, так и для выяснения механизма его функционирования. Возможно, что какой-то из исследуемых изозимов является продуктом гена, казуального локусу E_7 или другому локусу, ответственному за фотопериодическую чувствительность.

Заключение

Несмотря на то, что соя является строгим самоопылителем с крайне низкой частотой формирования гибридных потомков, исследуемые образцы характеризовались высокой генетической гетерогенностью по локусам НАДФ•Н-оксидазы, пероксидазы и супероксиддисмутазы. Статистика Райта и *Gst*-статистика показали, что генетическая гетерогенность связана как с индивидуальной, так и с внутри- и межгрупповой изменчивостью. Вклад разных видов изменчивости в общую генетическую дифференциацию был примерно равнозначным. Линия М29 оказалась более гетерогенной с существенным вкладом в общую дифференциацию индивидуальной изменчивости. Межгрупповая изменчивость проявлялась в виде неодинаковой встречаемости разных аллелей энзимных локусов и разной частотой альтернативных генотипов. При существенной генетической гетерогенности средняя гетерозиготность по исследуемым локусам для всей совокупности образцов была незначительной и составляла 7 %.

Анализ генетической дистанции между исследуемыми группами сои показал высокую степень их родства. Различия между ними находились в пределах внутривидовых. По показателю родства Нея линия М32 более отдаленна от родительской формы, чем сестринская линия М29.

Выявлены статистически достоверные взаимосвязи восьми из 19 исследуемых энзимных локусов с некоторыми морфофизиологическими показателями образцов и аллельным составом гена E_7 . При этом, наиболее сильные корреляции обнаружены для локусов супероксиддисмутазы и пероксидазы. На этом основании можно предположить, что эти энзимы играют важную роль в регуляции индивидуального развития растений сои.

Статья поступила в редакцию 26.09.2018

Список использованной литературы

1. Айала Ф. Введение в популяционную и эволюционную генетику / Ф. Айала. – М.: Мир, 1984. – 232 с.
2. Айала Ф. Современная генетика / Ф. Айала, Дж. Кайгер, пер. с англ. А. Д. Базыкина. – М.: Мир, 1987. – 337 с. (Т. 3).
3. Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях / Ю. П. Алтухов. – М.: ИКЦ «Академ-книга», 2003. – 431 с.
4. Бабич А. О. Вплив хімічних мутагенів на мінливість ознак рослин сої / А. О. Бабич, С. В. Иванюк, М. В. Вильгота, П. Г. Дульнев // Корми і кормовиробництво. – 2011. – Вип. 69. – С. 55–59.

5. Вишнякова М. А. Требования к исходному материалу для селекции сои в контексте современных биотехнологий / М. А. Вишнякова, И. В. Сеферова, М. Г. Самсонова // *Сельскохозяйственная биология*. – 2017. – Т. 52, № 5. – С. 905–916.
6. Дзюбенко Н. И. Коллекция сои ВИР в начале XXI-го века: состав и потенциал селекционного использования / Н. И. Дзюбенко, И. В. Сеферова // *Корми і кормовиробництво*. – 2011. – Вип. 69. – С. 20–25.
7. Ершова А. Н. Роль ферментов СОД и липоксигеназы в процессах накопления АФК в клетках растений в условиях кратковременной гипоксии и CO₂- среды / А. Н. Ершова, О. С. Бердникова // *Вестник ВГУ, Серия Химия, Биология, Фармация*. – 2013. – № 1. – С. 132–136.
8. Жарікова Д. О. Характеристика мутантних ліній сої за локусами Satt100 та Satt319, зчеплених з геном E7 / Д. О. Жарікова, Г. О. Чеботар, М. В. Вільгота и др. // *Фактори експериментальної еволюції організмів*. – 2018. – Том 23. – С. 52–56.
9. Микус В. Е. Создание исходного материала для селекции сортов сои с повышенной адаптивной способностью / В. Е. Микус // *Корми і кормовиробництво*. – 2011. – Вип. 69. – С. 85–90.
10. Петриченко В. Ф. Наукові основи сталого соєсіяння в Україні / В. Ф. Петриченко // *Корми і кормовиробництво*. – 2011. – вип. 69. – С. 3–10.
11. Синеговская В. Т. Итоги координации научно-исследовательских работ по сое зоны Дальнего Востока и Сибири / В. Т. Синеговская, Е. Т. Наумченко // *Корми і кормовиробництво*. – 2011. – Вип. 69. – С. 32–36.
12. Сичкарь В. И. Методы создания сортов сои с улучшенным биохимическим составом семян / В. И. Сичкарь // *Корми і кормовиробництво*. – 2011. – Вип. 69. – С. 37–44.
13. Січкарь В. І. Особливості створення вихідного матеріалу сої за умов південного степу України / В. І. Січкарь, Г. Д. Лаврова, О. І. Ганжело // *Селекція і насінництво*. – 2016. – Вип. 110. – С. 123–131.
14. Ткачук В. А. Пероксид водорода как новый вторичный посредник / В. А. Ткачук, П. А. Тюрин-Кузьмин, В. В. Белоусов, А. В. Воротников // *Биологические мембраны*. – 2012. – Т. 29, № 1–2. – С. 21–37.
15. Толмачева А. В. Влияние агрометеорологических условий на произрастание культуры сои / А. В. Толмачева // *Вісник Одеського державного екологічного університету*. – 2013. – вип. 15. – С. 89–94.
16. Физиолого-биохимические и генетические исследования ихтиофауны Азово-Черноморского бассейна / *Методическое руководство*. – Ростов-на-Дону: Эверест. – 2005. – 105 с.
17. Baek K.-H. Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near isogenic wheat lines / K.-H. Baek, D. Z. Skinner // *Plant Sci*. – 2003. – 165, No 6. – P. 1221–1227.
18. Baek K.-H. Differential expression of manganese superoxide dismutase sequence variants in near isogenic lines of wheat during cold acclimation / K.-H. Baek, D. Z. Skinner // *Plant Cell Rep*. – 2006. – 25, No 2. – P. 223–230.
19. Boss P. K. Multiple Pathways in the Decision to Flower: Enabling, Promoting, and Resetting / P. K. Boss, R. M. Bastow, J. S. Mylne, C. Dean // *The Plant Cell*. – 2004. – Vol. 16. – P. 18–31.
20. Conside M. J. Redox regulation of plant development / M. J. Conside, C. H. Foyer // *Antioxidants and redox signaling*. – 2014. – Vol. 21, No 9, – P. 1305–1326.
21. Davis B. I. Disc electrophoresis. 2. Method and application to human serum proteins / B. I. Davis // *Ann. N.Y. Acad. Sci*. – 1964. – V. 121, N 2. – P. 404–427.
22. De Vicente M. C. Genetic diversity analysis with molecular marker data: learning module, / M. C. De Vicente, C. López, T. Fulton. – International Plant Genetic Resources Institute (Ipgr), Rome, 2004. – 126 p.
23. Deng W. Direct links between the vernalization response and other key traits of cereal crops / W. Deng, M. C. Casao, P. Wang // *Nature communications*. – 2015. – P. 1–8.
24. Filek M. Changes of Redox Activity during the Development of Rape / M. Filek, M. Mirek, M. Długolecka // *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen*. – 2006. – P. 548–552.

25. Hatano-Iwasaki A. Redox metabolism in response to environmental stimuli for flowering / A. Hatano-Iwasaki, K. Ogawa // *Functional plant science and biotechnology*. – 2007. – Vol. 1, No 2. – P. 246–253.
26. Ishibashi Y. NADPH Oxidases Act as Key Enzyme on Germination and Seedling Growth in Barley (*Hordeum vulgare* L.) / Y. Ishibashi, T. Tawaratsumida, S.-H. Zheng et al. // *Plant Prod. Sci.* – 2010. – Vol. 13, No 1. – P. 45–52.
27. Janmohammadi M. Proteomic analysis of cold acclimation in winter wheat under field conditions / M. Janmohammadi, H.-P. Mock, A. Matros // *Icel. Agric. Sci.* – 2014. – No 27. – P. 3–15.
28. Jiménez-Quesada M. J. NADPH Oxidase-Dependent Superoxide Production in Plant Reproductive Tissues / M. J. Jiménez-Quesada, J. Á. Traverso, J. Dios Alché de // *Frontiers in Plant Science*. – 2016. – Vol. 7. – Article 359 doi: 10.3389/fpls.2016.00359.
29. Kim D.-H. Genetic and Epigenetic Mechanisms Underlying Vernalization / D.-H. Kim, S. Sung // *The Arabidopsis Book*. – 2014. – P. 1–15.
30. Li Ch.Ch. First course in population genetics / Ch. Ch. Li. – Pacific Grove, California, 1976. – 631 p.
31. Manchenko G. P. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels / G. P. Manchenko. – CRC Press LLC, 2003. – 592 p.
32. Nei M. Genetic distance between populations / M. Nei // *Amer. Naturalist*. – 1972. – V. 106, N 949. – P. 283–292.
33. Penfield S. Temperature perception and signal transduction in plants / S. Penfield // *New Phytologist*. – 2008. – No 179. – P. 615–628.
34. Qu Y. Functional regulation of plant NADPH oxidase and its role in signaling / Y. Qu, M. Yan, Q. Zhang // *Plant signaling and behavior*. – 2017. – Vol. 12, No. 8. – P. 1–3.
35. Slatkin M. Gene flow in natural populations / M. Slatkin // *Ann. Rev. Ecol. Syst.* – 1985. – V. 16. – P. 393–430.
36. Sung S. Remembering Winter: Toward a Molecular Understanding of Vernalization / S. Sung, R. M. Amasino // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2005. – No 56. – P. 491–508.
37. Tasma I. M. Mapping flowering time gene homologs in soybean and their association with maturity (E) loci / I. M. Tasma, R. C. Shoemaker // *Crop Sci.* – 2003. – Vol. 43. – P. 319–328.
38. Toptikov V. A. Expression of antioxidant oxidoreductases and protein profile of seedling tissues of winter and spring forms of cereals under extreme temperature fluctuations / V. A. Toptikov, L. F. Diachenko, V. M. Totsky // *Cytology and Genetics*. – 2012. – Vol. 46, I. 3. – P. 161–171.
39. Wright S. *Evolution and the Genetics of Populations. Variability within and among natural populations.* / S. Wright – Chicago: The University of Chicago Press, 1978. – V. 4. – P. 242–322.
40. Wright S. The genetical structure of populations / S. Wright // *Ann. Eugen.* – 1951. – V. 15. – P. 323–354.
41. Xia X.-J. Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance / X.-J. Xia, Y.-H. Zhou, K. Shi, et al. // *J. Exp. Bot.* – 2015. – Vol. 66, No. 10. – P. 2839–2856.
42. Zharikova D. Polymorphism of soybean cultivars and breeding lines revealed by marker Satt100 associated with E7 locus / D. Zharikova, S. Ivanyuk, G. Chebotar et al. // *Breeding Grasses and Protein Crops in the Era of Genomics: Book of Abstracts of the Joint meeting of EUCURPIA Fodder Crops and Amenity Grasses Section and Protein Crops Working Group of Oil and Protein Crops Section.* Vilnius, 11–14 sept. 2017– Vilnius, Lithuania, 2017. – P. 60.

**Топтiков В. А.¹, Жарiкова Д. А.¹, Чеботар Г. А.¹, Темченко I. В.²,
Чеботар С. В.^{1,3}**

¹Одеський національний університет імені I. I. Мечникова, кафедра генетики та молекулярної біології, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна;

²Інститут кормів та сільського господарства Поділля НААН України, проспект Юності, 16, Вінниця, 21100; Україна

³Селекційно-генетичний інститут - Національний центр насіннезнавства та сортовивчення НААН України, Овідіопольська дор., 3, Одеса, 65036, Україна

ГЕНЕТИКО-БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ МУТАНТНИХ ЛІНІЙ СОІ

Резюме

Метою даної роботи було вивчення генетико-біохімічних особливостей ліній сої, отриманих після обробки насіння хімічними мутагенами. Для виконання цієї мети ставилися наступні завдання: 1) визначити популяційно-генетичні показники зразків сої; 2) встановити генетичні дистанції між лініями і батьківським матеріалом; 3) виявити можливі корелятивні відносини між локусами досліджуваних ензимів і іншими генетичними системами, а також морфо-фізіологічними параметрами.

Матеріал. Лінії, отримані шляхом хімічного мутагенезу сорту Феміда. Сорти сої Феміда і Корада.

Методи. Електрофорез. Аллозимний аналіз. Як білкові маркери використовували ензими обміну активних форм кисню: НАДФ•Н-оксидазу, пероксидазу і супероксиддисмутазу. Методи популяційної генетики. Кореляційний аналіз. Методи описової статистики. Комп'ютерне опрацювання даних.

Результати. За досліджуваними локусами зразки сої показали значний поліморфізм, який склав 79 %. За використаних ген-ензимних систем встановлена значна генетична гетерогенність зразків сої. Статистика Райта і Gst-статистика показали, що генетична гетерогенність пов'язана як з індивідуальною, так і з внутрішньо- і міжгруповою мінливістю. Внесок різних видів мінливості у загальну генетичну диференціацію був приблизно рівнозначним. Міжгрупова мінливість виявлялася у вигляді неоднакової зустрічальності різних алелей ензимних локусів і різної частоти альтернативних генотипів. Крім кількісної зміни частот генотипів, спостерігались інші форми трансформації генотипового складу. Так, у мутантних ліній в порівнянні з батьківською формою підвищувалася частка гетерозиготних генотипів по локусах NPOX-3, -4, -5, а також SOD-3. У локусах POX-3 і POX-6, навпаки, частота гетерозигот знижувалася. У локусі POX-6 у мутантних форм порівняно з вихідним сортом спостерігалася інверсія частот гомозигот по альтернативних алелях. Описані зміни генотипового складу спостерігались і за порівняння досліджуваних сортів – Феміди і Коради. В цілому, сорти Феміда і Корада були несхожі між собою за 10 з 15 поліморфних локусів (67 %). Лінія M32 відрізнялася від сорту Феміда за 5 локусами (33 %), лінія M29 – за 9 (60 %). Лінія M29 виявилася більш диференційованою з істотним внеском у загальну гетерогенність індивідуальної мінливості. При значній

генетичної гетерогенності середня гетерозиготність за досліджуваними локусами для всієї сукупності зразків була незначною і становила 7 %.

Показано, що генетичні дистанції між різними групами сої, незважаючи на високий рівень гетерогенності, знаходяться в рамках внутрішньовидових меж. На підставі показника Нея лінія М32 була більш віддалена від батьківської форми, ніж сестринська мутантна лінія.

Виявлено достовірні кореляційні відносини між деякими локусами ізозимів та деякими господарсько-цінними ознаками сої, а також геном фоточутливості E7. Найбільш сильні взаємозв'язки були виявлені для пероксидази і супероксиддисмутази, що може свідчити про важливу роль цих ензимів у регуляції процесів розвитку рослин.

Ключові слова: *Glycine max* (L.), аллозими, генетична структура, генетична дистанція, кореляція, ген E7, фотоперіодична чутливість.

V. A. Toptikov¹, D. A. Zharikova¹, H. A. Chebotar¹, I. V. Temchenko²,
S. V. Chebotar^{1,3}

¹Odesa Mechnykov National University, department of genetics and molecular biology,

2, Dvorianska str., Odesa, 65082, Ukraine;

²Institute of forage and agriculture of Podillia NAAS of Ukraine,

16, Yunost ave., Vinnytsia, 21100, Ukraine

³Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation NAAS of Ukraine, 3, Ovidiopol Road, Odesa, 65036, Ukraine

GENETIC AND BIOCHEMICAL PECULIARITIES OF SOYA MUTANT LINES

Abstract

The **aim** of the work was to study genetic and biochemical peculiarities of soya lines, obtained after treatment of seeds with chemical mutagens. In order to realise the stated aim the following **tasks** were set: 1) to determine population-genetic indices of soya samples, 2) to establish genetic distances between lines and parental material, 3) to determine potential correlative relationship between loci of the enzymes studied and other genetic systems, as well as morphological and physiological parameters.

Material. The lines, obtained by chemical mutagenesis of Femida variety. Soya varieties Femida and Korada.

Methods. Electrophoresis. Allozyme analysis. Enzymes of exchange of active oxygen forms: NADP N-oxidase, peroxydase and superoxyzedismutase were used as protein markers. Methods of population genetics. Correlation analysis. Methods of descriptive statistics. Computer data processing.

Results. With respect to the loci studied the soya samples demonstrated considerable polymorphism, constituting 79 %. Considerable genetic heterogeneity of the soya samples was determined as to gene-enzyme systems. Wright and G_{st}-statistics showed

that genetic heterogeneity is connected both with individual and with internal- and inter-group variability. Contribution of various types of variability into general differentiation was approximately equal. Inter-group variability was manifested in form on different occurrence of different alleles of enzyme loci and different frequency of alternative genotypes. In addition to quantitative change of genotype frequency, other forms of genotype composition transformation were observed. So, fraction of heterozygous genotypes by loci NPOX-3, -4, -5, as well as SOD-3 increased in mutant lines in comparison with parental form. On the contrary, frequency of heterozygotes decreased in loci POX-3 and POX-6. Inversion of frequencies of homozygotes by alternative alleles was observed in locus POX-6 in mutant forms in comparison with output variety. The described changes of genotypic composition also observed in comparison of the studied varieties – Femida and Korada. On the whole, varieties Femida and Korada were different from each other by 10 of 15 polymorphic loci (67 %). Line M29 turned out to be more differentiated with considerable contribution to the general heterogeneity of individual variability. With considerable genetic heterogeneity the average heterozygosity by the studied loci was inconsiderable for the entire totality of samples and constituted 7 %.

It was shown that genetic distances between different groups of soya are within intraspecific limits in spite of high level of heterogeneity. Basing on Neya index line M323 was more remote from parental form than sisterly mutant line.

Reliable correlative relationship between some loci of izozymes and some economically valuable features of soya, as well as photosensitivity genome E7 were determined. The strongest interrelationship was observed for peroxidase and superoxidodismutase, which can testify to an important role of the said enzymes in regulation of plant development processes.

Keywords: Glycine max (L.), allozymes, genetic structure, genetic distance, correlation, gene E7, photoperiodic sensitivity.

References

1. Ayala, F. J., (1982), *Population and evolutionary genetics: a primer*, Benjamin/Cummings: Menlo Park, California, 268 p.
2. Ayala, F.J., and Kiger, J. A., (1984), *Modern Genetics*, 2nd Edition, Benjamin/Cummings: Menlo Park, California, 923 p.
3. Altukhov Yu. P., (2003), *Genetic processes in populations*, [Geneticheskiye protsessy v populyatsiyakh], Moscow, Akademkniga, 431 p.
4. Babych A. A., Ivanyuk S. V., Vilgota M. V., Dulnev P. G., (2011), «Influence of chemical mutagens on the trait variability of soybean plants» [«Vplyv khimichnykh mutaheniv na minlyvist oznak roslyn soyi»], *Feeds and Feed Production*, Issue 69, P. 55–59.
5. Vishnyakova M. A., Seferov I. V., Samsonova M. G., (2017), «Genetic sources required for soybean breeding in the context of new biotechnologies» [«Trebovaniya k iskhodnomu materialu dlya selektsii soi v kontekste sovremennykh biotekhnologiy»], *Agricultural Biology [Sel'skokhozyaistvennaya biologiya]*, Vol. 52, No 5, P. 905–916.
6. Dzubenko I., Seferova I. V., (2011), «Vir soybean collection in the 21 century: composition and breeding potential» [«Kollektsiya soi VIR v nachale KHKHÍ-go veka: sostav i potentsial selektsionnogo ispol'zovaniya»], *Feeds and Feed Production [Kormy i kormovyrobnytstvo]*, Issue 69, P. 20–25.
7. Ershova A. N., Berdnikova O. S.(2013), «The role of SOD enzymes and lipoxygenase in the

processes of ROS accumulation in plant cells under conditions of short-term hypoxia and CO²-environment» [«Rol' fermentov SOD i lipoksigenazy v protsessakh nakopleniya AFK v kletkakh rasteniy v usloviyakh kratkovremennoy gipoksii i SO²-sredy»], *Herald of VSU, Series Chemistry, Biology, Pharmacy*, No 1, P. 132–136.

8. Zharikova D. O., Chebotar G. O., Vilgota M. V., Temchenko I. V., Chebotar S. V., (2018), «Characteristics of mutant soybean lines at *Satt100* and *Satt319* loci linked with E7 gene» [«Kharakterystyka mutantnykh liniy soyi za lokusamy *Satt100* ta *Satt319*, zcheplenykh z henom E7»], *Factors in experimental evolution of organisms* [Faktory eksperymental'noyi evolyutsiyi orhanizmiv], Vol. 23, P. 52–56.
9. Mikys V. E., (2011), «Creation of feedstock for selection of soybean varieties with enhanced adaptive ability» [«Sozdaniye iskhodnogo materiala dlya selektsii sortov soi s povyshennoy adaptivnoy sposobnost'yu»], *Feeds and Feed Production* [Kormy i kormovyrobnystvo], Issue 69, P. 85–90.
10. Petrychenko V. F., (2011), «Scientific foundations of stable soybean cultivation in Ukraine» [«Naukovi osnovy staloho soyesiyannya v Ukrayini»], *Feeds and Feed Production* [Kormy i kormovyrobnystvo], Issue 69, P. 3–10.
11. Sinegovskaya V. T., Naumchenko E. T., (2011), «Totals of coordination of the scientific research works on soybean of Siberia and the Far East zone» [«Itogi koordinatsii nauchno-issledovatel'skikh rabot po soye zony Dal'nego Vostoka i Sibiri»], *Feeds and Feed Production* [Kormy i kormovyrobnystvo], Issue 69, P. 32–36.
12. Sichkar V. I., (2011), «The methods of breeding soybean varieties with improved biochemical seed composition» [«Metody sozdaniya sortov soi s uluchshennym biokhimicheskim sostavom semyan»] // *Feeds and Feed Production* [Kormy i kormovyrobnystvo], Issue 69, P. 37–44.
13. Sichkar V. I., Lavrova G. D., Ganzhelo O. I., (2016), «PECULIARITIES OF CREATION OF SOYBEAN BREEDING MATERIAL IN THE SOUTHERN STEPPE OF UKRAINE» [«Osoblyvosti stvorenniya vykhidnogo materialu soyi za umov pivdennoho stepu Ukrayiny»], *Selection and seed production* [Selektsiya i nasinnystvo], Issue 110, P. 123–131.
14. Tkachuk V. A., Tyurin-Kuzmin P. A., Belousov V. V., Vorotnikov A. V., (2012), «Hydrogen Peroxide as a New Second Messenger» [«Peroksid vodoroda kak novyy vtorichnyy posrednik»], *Biological membranes* [Biologicheskiye membrany], Vol. 29, No 1–2, P. 21–37.
15. Tolmachova A., (2013) «Influence of agrometeorological terms on sprouting of soya» [«Vliyaniye agrometeorologicheskikh usloviy na proizrastaniye kul'tury soi»], *Bulletin of the Odessa State Ecological University*, [Visnyk Odes'koho derzhavnoho ekolohichnoho universytetu], Issue 15, P. 89–94.
16. *Physiological, biochemical and genetic studies of fish fauna of the Azov-Black Sea pool: Methodological Guide*, (2005), [Fiziologo-biokhimicheskiye i geneticheskkiye issledovaniya ikhtiofauny Azovo-Chernomorskogo basseyna / Metodicheskoye rukovodstvo], Everest, Rostov-on-Don.
17. Baek K. -H., Skinner D. Z., (2003), «Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near isogenic wheat lines», *Plant Sci.*, Vol. 165, No 6, P. 1221–1227.
18. Baek K. -H., Skinner D. Z., (2006), «Differential expression of manganese superoxide dismutase sequence variants in near isogenic lines of wheat during cold acclimation», *Plant Cell Rep.*, Vol. 25, No 2, P. 223–230.
19. Boss P. K., Bastow R. M., Mylne J. S., Dean C., (2004), «Multiple Pathways in the Decision to Flower: Enabling, Promoting, and Resetting», *The Plant Cell*, Vol. 16, P. 18–31.
20. Considine M. J., Foyer C. H., (2014), «Redox regulation of plant development», *Antioxidants and redox signaling*, Vol. 21, No 9, P. 1305–1326.
21. Davis B. I., (1964), «Disc electrophoresis. 2. Method and application to human serum proteins», *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, V. 121, N 2, P. 404–427.
22. De Vicente, M. C., López, C., Fulton, T., (2004), *Genetic diversity analysis with molecular marker data: learning module*, International Plant Genetic Resources Institute (Ipgr), Rome.

23. Deng W., Casao M. C., Wang P., Sato K., Hayes P. M., Finnegan E. J., Trevaskis B., (2015), «Direct links between the vernalization response and other key traits of cereal crops», *Nature communications*, P.1–8.
24. Filek M., Mirek M., Długolecka M., (2006), «Changes of Redox Activity during the Development of Rape», *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, Tübingen, P. 548–552.
25. Hatano-Iwasaki A., Ogawa K., (2007), «Redox metabolism in response to environmental stimuli for flowering», *Functional plant science and biotechnology*, Vol. 1, No 2, 246–253.
26. Ishibashi Y., Tawaratsumida T., Zheng S.-H., Yuasa T., Iwaya-Inoue M., (2010), «NADPH Oxidases Act as Key Enzyme on Germination and Seedling Growth in Barley (*Hordeum vulgare* L.)», *Plant Prod. Sci.*, Vol. 13, No 1, P. 45-52.
27. Janmohammadi M., Mock H.-P., Matros A., (2014), «Proteomic analysis of cold acclimation in winter wheat under field conditions», *Icel. Agric. Sci.*, No 27, P. 3-15.
28. Jiménez-Quesada M. J., Traverso J. Á., de Dios Alché J., (2016), «NADPH Oxidase-Dependent Superoxide Production in Plant Reproductive Tissues», *Frontiers in Plant Science*, Vol. 7, Article 359 doi: 10.3389/fpls.2016.00359
29. Kim D.-H., Sung S., (2014), «Genetic and Epigenetic Mechanisms Underlying Vernalization», *The Arabidopsis Book*, P. 1–15.
30. Li, Ch. Ch., (1976), *First course in population genetics*, Pacific Grove, California, 631 p.
31. Manchenko G. P., (2003), *Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels*, CRC Press LLC, 592 p.
32. Nei, M., (1972), «Genetic distance between populations», *Amer. Naturalist*, Vol. 106, No. 949, P. 283–292
33. Penfield S., (2008), «Temperature perception and signal transduction in plants», *New Phytologist*, No 179, P. 615–628.
34. Qu Y., Yan M., Zhang Q., (2017), «Functional regulation of plant NADPH oxidase and its role in signaling», *Plant signaling and behavior*, Vol. 12, No. 8, P. 1-3.
35. Slatkin, M., (1985), «Gene flow in natural populations», *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, Vol. 16, P. 393–430.
36. Sung S. and Amasino R. M., (2005), «Remembering Winter: Toward a Molecular Understanding of Vernalization», *Annu. Rev. Plant Biol.*, No 56, P. 491–508.
37. Tasma I. M., Shoemaker R. C., (2003), «Mapping flowering time gene homologs in soybean and their association with maturity (E) loci», *Crop Sci.*, Vol.43, P. 319–328.
38. Toptikov V. A., Diachenko L. F., Totsky V. M., (2012), «Expression of antioxidant oxidoreductases and protein profile of seedling tissues of winter and spring forms of cereals under extreme temperature fluctuations», *Cytology and Genetics.*, Vol. 46, I. 3, P.161–171.
39. Wright, S., (1984), *Evolution and the genetics of populations. Vol. 4. Variability within and among natural populations*, Univ. Chicago Press, 590 p.
40. Wright, S., (1951), «The genetical structure of populations», *Ann. Eugen.*, Vol. 15, No. 4, P. 323–354.
41. Xia X.-J., Zhou Y.-H., Shi K., Zhou J., Foyer C. H., Yu J.-Q., (2015), «Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance», *J. Exp. Bot.*, Vol. 66, No. 10, P. 2839–2856,
42. Zharikova D., Ivanyuk S., Chebotar G., et al., (2017), «Polymorphism of soybean cultivars and breeding lines revealed by marker Satt100 associated with E7 locus», Breeding Grasses and Protein Crops in the Era of Genomics: Book of Abstracts of the Joint meeting of EUCURPIA Fodder Crops and Amenity Grasses Section and Protein Crops Working Group of Oil and Protein Crops Section. (Vilnius, 11–14 sept. 2017). Vilnius, Lithuania, P. 60.