

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В.Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет
Кафедра фізіології та біохімії рослин і мікроорганізмів

Дослідження диференціації сортів сої за групами стиглості і використання
генетичного поліморфізму за локусами Е у пошуку оптимальних генотипів сої для
певних зон вирощування

Допущена до захисту «____» _____ 2023 р. Кваліфікаційна робота

здобувача другого

Завідувач кафедри _____

(магістерського) рівня вищої
освіти

заочної форми навчання

Рвачової Марини Вячеславни

Оцінка « _____ »

Голова ЕК _____

« _____ » _____ 2023р.

Науковий керівник:

к.б.н., доцент Щоголев А.С.

Харків 2023

АНОТАЦІЯ

Рвачова М. В. «Дослідження диференціації сортів сої за групами стиглості і використання генетичного поліморфізму за локусами *E* у пошуку оптимальних генотипів сої для певних зон вирощування».

Робота містить 44 сторінки, 10 рисунків, 3 таблиці, 51 використане джерело.

Мета роботи полягала в дослідженні диференціації сортів сої за групами стиглості з урахуванням генетичного поліморфізму за локусами *E* для пошуку оптимальних генотипів сої для певних зон вирощування.

Предмет дослідження - диференціація сортів сої за групами стиглості з урахуванням генетичного поліморфізму за локусами *E*.

Об'єкт дослідження - ізогенні за генами *E* ліній сої (*Glycine max* (L.) сорту Clark з різними комбінаціями алелів.

Були розроблені молекулярні маркери для виявлення *E* генів контролю цвітіння та дозрівання у ізогенних за генами *E* ліній сої (*Glycine max* (L.) Merr.). Визначено, що стан локусів домінантне/рецесивне у генотипі ізогенних ліній визначає темпи переходу рослин до цвітіння *E2* і *E3* разом обумовлюють чутливість до тривалості фотоперіоду, порівнянну з чутливістю, викликаной алелем *E1*.

Досліджено диференціацію сортів сої за групами стиглості з урахуванням генетичного поліморфізму за локусами *E* виявлено, що в межах однієї групи стиглості можуть знаходитися генотипи з різними алелями за локусами *E*.

Знайдені сіквенси *E* генів і розроблені маркери для їх виявлення в сої (*Glycine max* (L.) Merr.).

Ключові слова: соя (*Glycine max* (L.) Merr), ізогенні лінії, *E* гени, фотоперіод, молекулярні маркери, диференціація сортів.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1 Явище фотоперіодизму. Механізм реалізації сприйняття фотоперіодичного сигналу рослинами	7
1.2 Біологічні особливості сої та характеристика груп стиглості.....	8
1.3 Взаємозв'язок фотоперіодичної реакції та інших факторів зовнішнього середовища	11
1.4 Особливості будови первинних послідовності генів <i>E</i>	13
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	20
2.1 Рослинний матеріал	20
2.2 Умови і методи проведення досліджень	20
2.3 Фізіолого-біохімічні методи	21
2.4 Біоінформаційні методи	21
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	23
3.1 Вплив фотоперіоду на тривалості періоду сходи-цвітіння та врожайність сої.....	23
3.2 Диференціація сортів сої за групами стиглості з урахуванням генетичного поліморфізму за локусами <i>E</i>	27
3.3 Пошук молекулярних маркерів для виявлення <i>E</i> генів.	28
ВИСНОВКИ.....	36
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	38
SUMMARY	44

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ДНК	—	Дезоксирибонуклеїнова кислота
мРНК	—	Матрична рибонуклеїнова кислота
ПЛР	—	Полімеразна ланцюгова реакція
РНК	—	Рибонуклеїнова кислота
BLAST	—	Basic Local Alignment Search Tool
NCBI	—	National Center for Biotechnological Information
SNP	—	Single Nucleotide Polymorphism (Однонуклеотидний поліморфізм)
UTR	—	Untranslated regions (Нетрансльовані області)

ВСТУП

Актуальність теми. Вирощування сої є важливою частиною глобального сільського господарства, адже ця культура є одним з основних джерел рослинного білка та олії. Втім, продуктивність сої може значно варіюватися в залежності від конкретних умов вирощування, що вимагає постійної роботи над підбором оптимальних сортів для кожної конкретної зони вирощування.

У контексті такого пошуку генетичний поліморфізм за локусами *E* стає важливим інструментом. Локуси *E* контролюють час вегетації сої і, отже, її скоростиглість. Розуміння взаємозв'язку між різними формами цих генів і відповідними фенотипами допомагає вибрати найкращі генотипи для конкретних умов вирощування.

Диференціація сортів сої за групами стиглості дозволяє адаптувати вирощування цієї культури до різних кліматичних умов і сезонів. Наприклад, сорти, що дозрівають рано, можуть бути більш підходящими для холодних регіонів, а сорти, що дозрівають пізніше, можуть бути оптимальними для теплих регіонів з довгим періодом вегетації.

Дослідження диференціації сортів сої за групами стиглості та використання генетичного поліморфізму за локусами *E* в пошуку оптимальних генотипів сої для певних зон вирощування може відкрити нові можливості для покращення врожайності сої та стійкості до несприятливих умов вирощування, тим самим сприяючи забезпеченню продовольчої безпеки.

Мета роботи – з'ясувати диференціацію сортів сої за групами стиглості з урахуванням генетичного поліморфізму за локусами *E* для пошуку оптимальних генотипів сої для певних зон вирощування.

- 1) з'ясувати вплив фотоперіоду на врожайність сої;
- 2) встановити диференціацію сортів сої за групами стиглості з урахуванням генетичного поліморфізму за локусами *E*;

- 3) провести пошук у генетичних базах сіквенсів генів *E* ліній сої;
- 4) провести аналіз (множинне вирівнювання) та встановити відмінності у послідовностях ізогенних за генами *E* ліній сої;

Предмет дослідження - диференціація сортів сої за групами стиглості з урахуванням генетичного поліморфізму за локусами *E*.

Об'єкт дослідження - ізогенні за генами *E* ліній сої (*Glycine max* (L.) сорту Clark з різними комбінаціями алелів.

Наукова новизна роботи полягає в комплексному дослідженні генетичного поліморфізму за локусами *E* в ізогенних лініях сої, що впливають на період стиглості сої. Спираючись на данні бази NCBI були розроблені молекулярні маркери для точного виявлення генів, що контролюють цвітіння та дозрівання у сої.

Теоретичне значення роботи полягає в тому, що отримані результати розширюють розуміння генетичних механізмів, що регулюють цвітіння та дозрівання в сої. Вони дозволяють глибше зрозуміти взаємодію алельних форм генів локусів *E* та їх колективний вплив на фенотип рослини, що може стати основою для подальших теоретичних досліджень механізмів контролю переходу до цвітіння.

Практичне значення роботи полягає в тому, що розроблені молекулярні маркери та дані про генетичний поліморфізм в ізогенних лініях сої можуть бути безпосередньо застосовані в селекційній роботі для створення нових високоврожайних сортів сої з оптимальними термінами цвітіння та дозрівання. Такі сорти будуть краще адаптовані до конкретних кліматичних умов і, як результат, зможуть забезпечити стабільні та високі врожаї в різних агрокліматичних зонах.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Явище фотоперіодизму. Механізм реалізації сприйняття фотоперіодичного сигналу рослинами

Фотоперіодизм є природним явищем, яке впливає на біологічні ритми та життєві процеси в рослинах. Це явище було відкрито в 1920 році американськими вченими Гарнером і Аллардом, коли вони досліджували рослини тютюну.

Фотоперіодизм – це відгук біологічних систем на періодичні зміни світлового дня та ночі. У рослин це відображається у формуванні бруньок, цвітінні, вегетації та інших процесах. Фотоперіодизм – здатність живих організмів орієнтуватися в часі, в основі якої лежить сувора періодичність біохімічних і фізіологічних процесів, що протікають в клітинах [1].

Залежно від тривалості світлового періоду необхідного для переходу до цвітіння, рослини поділяються на три основні групи: рослини короткого дня, рослини довгого дня та рослини нейтрального дня.

Рослини короткого дня цвітуть тільки при короткій тривалості світлового дня, яка є меншою за певний критичний період – зазвичай менше 12 годин. Це включає такі рослини, як соя, рис, тютюн, хризантеми. Значущість цього явища полягає в тому, що рослини короткого дня починають цвісти тоді, коли дні стають коротшими, тобто в осінні місяці.

Рослини довгого дня цвітуть, коли тривалість світлового дня перевищує певний критичний період, зазвичай 12 годин. Це включає рослини, такі як пшениця, овес, ячмінь, льон. Вони починають цвісти, коли дні стають довгими, зазвичай в літні місяці.

Рослини нейтрального дня цвітуть незалежно від тривалості світлового дня. Це означає, що їх цвітіння не регулюється довжиною світлового дня. Приклади таких рослин включають помідори, кукурудзу, огірки [2].

Механізм реалізації сприйняття фотоперіодичного сигналу рослинами – це важливий аспект розуміння життєвого циклу рослин. Цей процес передбачає перетворення світлових сигналів у біологічну інформацію, яка впливає на вегетативний і генеративний розвиток рослин.

Головним «детектором» довжини дня в рослин є фітохром – фоторецептор, який поглинає червоне та далеке червоне світло. Фітохроми виконують важливу роль у регуляції цвітіння, переходу від вегетативної до генеративної фази, і т.д. [3].

Адаптація рослин до змінних умов освітлення здійснюється шляхом зміни активності фітохрому. Фітохром може перебувати у двох станах: активному (Pfr) і неактивному (Pr). Світло дня переводить фітохром у активний стан, а в темряві фітохром повертається до неактивного стану. Цей процес відомий як фотоконверсія [4,5].

Сприйняття фотоперіодичного сигналу відбувається у листках рослини. Інформація, отримана через фітохроми, транслюється до меристеми за допомогою спеціальної речовини – флоригену. Ця гіпотетична речовина була запропонована як відповідь на питання, як рослини передають сигнал з листків до кінцевих точок росту [6].

У 2007 році група японських вчених встановила, що білок FT (FLOWERING LOCUS T) виконує роль флоригену. Білок FT синтезується в листках під час довгого дня та переноситься до меристеми, де він взаємодіє з білком FD, запускаючи ген Flowering Locus D (FLD), який відповідає за процес цвітіння [7].

1.2 Біологічні особливості сої та характеристика груп стиглості

Соя (*Glycine max*) – це вид рослин родини бобових, що вирощується в основному для виробництва білка і масла. Це одна з найстаріших і найважливіших культур світу, походить з Східної Азії і використовується в людському харчуванні та кормах для тварин вже більше 5000 років [8].

Рослина сої може досягати висоти від 20 см до 2 м, залежно від сорту та умов вирощування. Стебло є дерев'янистим, прямостоячим, гіллястим, покритим волосками.

Листки сої є складними, з трьома листочками, які можуть бути від 3 до 15 см у довжину. Вони мають темно-зелений колір і покриті м'якими волосками, які допомагають захистити рослину від шкідників.

Квіти сої зазвичай білі або фіолетові, зібрані у великі китиці. Соя строгий само запилювач, плоди – боби. Боби є великими, до 8 см в довжину. Насіння може бути різних кольорів, включаючи жовтий, зелений, коричневий, чорний [9].

Соя є однорічною рослиною, що пристосована до різних типів клімату, але найкраще росте в помірних і тропічних регіонах. Біологічний цикл сої поділяється на вегетативну і генеративну фази. Вегетативна фаза охоплює ріст та розвиток рослини, тоді як генеративна фаза включає формування квітів, запліднення та формування бобів.

Соя є фотоперіодичною рослиною короткого дня, що означає, що її цвітінню сприяє скорочення довжини світлового дня. Така властивість дозволяє сої адаптуватися до різних географічних широт.

Соя вимагає глибоко обробленого, добре дренованого ґрунту, багатого органічними речовинами. Також вона вимагає інтенсивного освітлення для оптимального росту і врожайності [10].

Посів сої проводиться весною після останніх заморозків, коли температура ґрунту досягає приблизно 10°C. Рослини висаджуються на відстані від 5 до 15 см одна від одної в рядку, залежно від сорту.

Основними шкідниками сої є комахи, гризуни та птахи, а також деякі види грибів, бактерій і вірусів. Боротьба з цими шкідниками включає використання хімічних і біологічних пестицидів, а також агротехнічних заходів [11].

Соя має високу харчову цінність, що впливає з її унікального хімічного складу. Насіння сої містить біля 40% білка, 20% масла і значну

кількість вітамінів та мінеральних речовин [8]. Білок сої відомий своєю високою якістю, оскільки він містить всі необхідні амінокислоти, необхідні для людського здоров'я.

Соя є основним джерелом рослинного білка і масла для глобального ринку харчових продуктів та кормів. Вона використовується для виробництва різноманітних продуктів, включаючи сир, молоко, масло, борошно, соєвий соус тощо. Окрім цього, соя також є важливим джерелом лецитину, використовуваного в харчовій промисловості, і соєвого масла, яке використовується в виробництві біодизеля [12].

Групи стиглості сої – це система розподілу сортів сої за їхнім періодом вегетації від посіву до збору врожаю. Різні групи стиглості відображають відмінності в тому, як сорти сої реагують на довжину світлового дня та температуру, що значно впливає на час їх цвітіння та дозрівання. Визначають наступні групи стиглості: ультраранні (000), ранньостиглі (00), середньоранньостиглі (0), середньостиглі (I), середньопізні (II) та пізньостиглі (III) (таблиця 1.1).

Таблиця 1.1

Групи стиглості сортів сої [13]

Групи стиглості	Міжнародна класифікація	Сума активних $t^{\circ}\text{C} > 10^{\circ}\text{C}$	Тривалість вегетації, діб
Ультраранні	000	1800–2200	До 90
Ранньостиглі	00	2200–2600	91–100
Середньоранньостиглі	0	2600–2800	101–110
Середньостиглі	I	2800–3000	111–120
Середньопізні	II	3000–3200	121–130
Пізньостиглі	III	3200–3400	131–140

Ультраранні (000) сорти мають найменший період вегетації і використовуються в основному в північних регіонах з коротким вегетаційним періодом. Вони цінні для регіонів, де сезон вирощування може бути обмежений холодними температурами [14].

Ранньостиглі (00) сорти зазвичай мають трохи довший вегетаційний період в порівнянні з ультраранніми сортами і підходять для вирощування в більш помірних кліматичних умовах.

Середньоранньостиглі (0) сорти добре пристосовані до регіонів з помірною кількістю світлового дня та температур. Вони часто використовуються в регіонах, де є достатньо довгий вегетаційний період, але можливі непередбачувані зміни погодних умов.

Середньостиглі (I) та середньопізні (II) сорти вимагають більше часу для вегетації в порівнянні з ранніми групами. Ці сорти часто вирощуються в регіонах з довгим вегетаційним періодом.

Пізньостиглі (III) сорти є найпізнішими та використовуються в регіонах з найдовшим вегетаційним періодом.

1.3 Взаємозв'язок фотоперіодичної реакції та інших факторів зовнішнього середовища

Фотоперіодична реакція рослин є фундаментальним аспектом їхнього розвитку і взаємодії з навколишнім середовищем. Вона включає у себе реакції рослин на зміни довжини дня та ночі, що впливає на такі процеси, як цвітіння, вегетативний розвиток та інше [15]. Ці фотоперіодичні реакції взаємодіють з іншими екологічними чинниками, включаючи температуру, вологість та інтенсивність світла, формуючи складну мережу, яка контролює фенологію рослин [16].

Одним з найважливіших чинників, які взаємодіють з фотоперіодичними реакціями рослин, є температура. Деякі рослини потребують конкретних температурних умов, щоб «увімкнути» або «вимкнути» свої фотоперіодичні відгуки. Наприклад, в деяких видах рослин відбувається вихід зі спокою тільки після періоду холоду [17].

Температура також може впливати на швидкість фотоперіодичних реакцій. При високих температурах ці реакції можуть проходити швидше, тоді як при низьких температурах – повільніше. Це може мати важливе

значення для того, як рослини адаптуються до зміни клімату, особливо в контексті глобального потепління.

Вологість також відіграє важливу роль у взаємодії з фотоперіодичними реакціями рослин. Вологість впливає на процеси транспірації в рослинах, що може мати вплив на їх фотоперіодичні відповіді. Наприклад, при високій вологості рослини можуть зберігати воду ефективніше, що дозволяє їм пристосуватися до коротких фотоперіодів.

Вплив вологості може бути особливо помітним в аридних регіонах, де вологість може сильно коливатися. У таких умовах рослини можуть використовувати фотоперіод як «сигнал», що допомагає їм прогнозувати сезонні зміни вологості та регулювати свої процеси відповідно до цього.

Деякі рослини можуть реагувати на зміни інтенсивності світла, що може змінювати їх фотоперіодичні реакції. Наприклад, висока інтенсивність світла може сприяє фотоперіодичним відповідям, тоді як низька інтенсивність світла може пригнічувати їх [18].

Інтенсивність світла може бути особливо важливою для рослин, які ростуть у тіні. Ці рослини можуть використовувати зміни в інтенсивності світла, щоб регулювати свої фотоперіодичні відповіді та пристосуватися до змін в умовах освітлення [19].

Цікавою областю досліджень є вплив фотоперіоду на мікробіоту ґрунту, яка в свою чергу впливає на рослини. Ця взаємодія посилює складність мережі факторів, що впливають на ріст і розвиток рослин [20]. Мікроорганізми ґрунту можуть впливати на доступність поживних речовин та захист від шкідників.

Оскільки рослини є головними джерелами органічного вуглецю для мікроорганізмів ґрунту, будь-які фотоперіодичні впливи на фотосинтез рослин можуть вплинути на мікробіоту. Зміни в ритмах фотосинтезу можуть впливати на швидкість і час, коли органічні речовини надходять до ґрунту, впливаючи на динаміку популяцій мікроорганізмів [21].

Також цікавим є взаємозв'язок між рівнем CO₂ у атмосфері та фотоперіодичними реакціями рослин. З високим рівнем вуглекислого газу рослини можуть посилювати фотосинтез, що може вплинути на фотоперіодичні відповіді [22]. Високий рівень CO₂ може змінити внутрішній цикл рослини, можливо, змінюючи час початку цвітіння.

Це питання особливо важливе в контексті змін клімату, оскільки рівні CO₂ в атмосфері продовжують зростати. Вивчення того, як це впливає на фотоперіодичні реакції рослин, допоможе краще зрозуміти, як рослини можуть адаптуватися до змінюваних умов навколишнього середовища [23].

Фотоперіодичні реакції можуть мати взаємозв'язок і з іншими факторами, такими як поживні речовини, стресові чинники, наявність шкідників або хвороб тощо [24].

1.4 Особливості будови первинних послідовності генів *E*

Фотоперіод – це сукупність функцій, які виконують рослини залежно від того, день це чи ніч або сезон року. Він є важливим чинником у контролі багатьох аспектів росту і розвитку рослин, зокрема, часу цвітіння та дозрівання в умовах різних географічних регіонів. Ген *E* в сої впливає на ці процеси шляхом контролювання реакції рослини на фотоперіод [25].

Розглядаючи первинну послідовність гена *E*, важливо зрозуміти, що він складається з різних частин, кожна з яких відіграє важливу роль у його функціонуванні. На молекулярному рівні, ген *E* є складним і кодує білок, що функціонує як транскрипційний фактор регулятор. Він складається з промотора, інтронів, екзонів, некодуючих послідовностей (UTR) і регіону термінації [26].

Промотор – це регіон ДНК, який розпочинає транскрипцію гена. Він містить специфічні нуклеотидні послідовності, які визначають, де і коли почати транскрипцію. Інтрони є некодуючими регіонами гена, які видаляються під час процесу зшивання РНК (сплайсинг). Екзони, навпаки, кодують амінокислоти білка. Некодуючі послідовності допомагають

регулювати трансляцію РНК. Нарешті, регіон термінації сигналізує про закінчення транскрипції.

Зміни в будові гена *E*, такі як мутації в промоторі або в інших регіонах, можуть суттєво вплинути на його функціонування.

Промотор гена *E* у сої має ряд унікальних особливостей. Він містить різноманітні послідовності транскрипційних факторів, які визначають, коли і де ген буде активовано. Декілька таких послідовностей було ідентифіковано в промоторі гена *E*, включаючи СААТ-бокс і ТАТА-бокс, які є загальними для багатьох генів, а також деякі специфічні для гена *E* [27].

СААТ-бокс і ТАТА-бокс – це нуклеотидні послідовності, які знаходяться в промоторах і відіграють важливу роль в ініціації транскрипції. Вони зазвичай знаходяться за 80-100 пар основ до початку сайту транскрипції. Специфічні фактори, такі як фактори транскрипції, що відповідають за зв'язування з СААТ-боксом і ТАТА-боксом, впливають на регулювання активності промотора [28].

Ген *E* має декілька інтронів та екзонів, що створюють його структурну цілісність. Інтрони відіграють роль у сплайсингу, процесі, в якому некодуючі регіони (інтрони) видаляються з мРНК, а кодуєчі регіони (екзони) зшиваються разом. Відомо, що інтрони впливають на транскрипцію генів та можуть слугувати регуляторами транскрипції і трансляції.

Екзони гена *E* кодують білок, який контролює скоростиглість сої в реакції на фотоперіод. Зміни в послідовностях амінокислот, що кодуються екзонами, можуть призвести до виробництва білка з відмінними властивостями, що вплине на фотоперіодичну реакцію рослини [29].

5' UTR і 3' UTR в гені *E* впливають на стабільність, локалізацію та ефективність трансляції мРНК. 5' UTR може містити мотиви зв'язування для білків, які впливають на ініціацію трансляції. 3' UTR може містити мотиви зв'язування для білків, які стабілізують мРНК або допомагають визначити її локалізацію в клітині.

Регіон термінації гена E сигналізує про кінець процесу транскрипції. Він може містити послідовності, які забезпечують ефективне завершення транскрипції та стабільність мРНК [30].

В сої було виявлено декілька генетичних механізмів, які впливають на період цвітіння та дозрівання. Ці механізми включають набір генів E (від E1 до E10 [31–34]), званих також «локусами дозрівання», а також ген JUVENILE (J) [35] і гени FLOWERING LOCUS T (GmFT) [36].

У дослідженнях сої вчені виявили та клонували сім генів, які відіграють роль у процесі цвітіння. Ці гени включають E1, E2, E3, E4, E9, E10 та J. Особливо важливим є ген E1, який відзначається унікальними функціями серед бобових рослин. Він виступає як фактор транскрипції, що контролює час цвітіння, діючи як репресор. Це означає, що E1 може затримувати початок цвітіння сої, особливо в умовах тривалого світлового дня [37].

Ген E2, також відомий як GmGla, бере участь у внутрішньому «циркадному годиннику» сої, впливаючи на те, коли рослина починає цвісти. Цікаво, що рецесивний алель цього гена, e2, сприяє ранньому цвітінню рослини. Проте, потрібно зауважити, що ген E1 має більш значний вплив на процес цвітіння в порівнянні з E2 [38]. Хоча E2 та E1 мають схожі функції у регуляції цвітіння, їхні механізми дії відрізняються. E2 унікальним чином впливає на процес, затримуючи цвітіння шляхом пригнічення активності іншого гена, відомого як GmFT2a. Цей процес особливо важливий у умовах, коли рослина росте в умовах довгого світлового дня [39]. Останні дослідження виявили, що геном GmFT2a насправді є локус E9 [40].

Дослідження виявили цікаві функції двох генів: E3, відомого як GmPhyA3, та E4, відомого як GmPhyA2. Ці гени належать до категорії фітохромів A, які є чутливими до змін у співвідношенні червоного та далекого червоного світла. Їхня активність стає особливо важливою у умовах довгого світлового дня, впливаючи на час цвітіння рослини [41].

Нещодавно увагу дослідників привернув ген E10, ідентифікований як GmFT4. Цікаво, що діяльність цього гена в значній мірі регулюється геном E1. Мутація e10 сприяє ранньому цвітінню сої. Проте, цей гаплотип зустрічається досить рідко, і механізми, за допомогою яких він впливає на прискорення цвітіння, досі залишаються недостатньо вивченими [33].

У рамках молекулярно-генетичних досліджень сої, вчені виявили важливість гена GmFT5a у процесі регуляції цвітіння. Цей ген відіграє важливу роль у визначенні часу, коли соя починає цвісти. Крім того, дослідження показали, що гени E9 (GmFT2a) та GmFT5a мають допоміжну функцію у стимулюванні цвітіння, особливо в ситуаціях, де інші гени, відповідальні за цей процес, не активуються. Вони сприяють експресії так званих FMI-генів, які впливають на час цвітіння [42].

Окремої уваги заслуговує ген J (GmELF3). Він спочатку розглядався як локус гену e6, і виявлено, що його рецесивний алель викликає затримку в ювенільній фазі розвитку рослини [43].

Білок J має унікальну роль у регуляції цвітіння сої, оскільки він взаємодіє безпосередньо з промотором гена E1. Ця взаємодія призводить до зниження транскрипції гена E1. Важливою особливістю білка J є його здатність знімати репресію GmFT2a та GmFT5a. Ця дія білка J відіграє роль в ініціації процесу цвітіння, особливо за умов короткого світлового дня [35].

Окрім білка J, інші локуси E також впливають на процес цвітіння. Вони, як правило, сприяють ранньому цвітінню за умов довгого світлового дня. Однак, гени, які кодують ці локуси, на даний момент ще не були повністю ідентифіковані.

Вивчення впливу E-генів на розвиток сої показало, що ці гени відіграють важливу роль у контролі тривалості вегетаційного періоду рослини та її реакції на світловий день. Вони регулюють, в тій чи іншій мірі, момент запуску процесу цвітіння. Зокрема, ген E1 має здатність подовжувати вегетативну фазу розвитку сої, збільшуючи час між сходами та цвітінням на приблизно 19-23 дні, незалежно від того, чи є день 16-

годинним чи довшим. Проте, цікаво, що E1 не впливає на тривалість генеративної фази, яка включає період від цвітіння до дозрівання.

Слід зазначити, що рослини з генотипом E1e3e4 зазвичай цвітуть пізніше, але при цьому не показують збільшення загальної тривалості вегетаційного періоду, коли вони вирощуються у північних широтах з більш тривалим світловим днем [44].

Дослідження в області соєвої генетики виявили, що гени E2 та E5 мають свої унікальні впливи на вегетативний та генеративний періоди росту сої. На 16-годинному дні ці гени здатні подовжувати вегетативну фазу на приблизно 6-13 днів (для E2) та 3-7 днів (для E5). Відносно генеративної фази, яка охоплює період від цвітіння до дозрівання, E2 та E5 впливають на її тривалість, подовжуючи її на 5-6 днів та 15-16 днів відповідно [39].

Гени E3 та E4, з іншого боку, відіграють роль у реакції сої на фотоперіод протягом вегетативної фази. На 20-годинному дні ці гени можуть подовжити вегетативну фазу приблизно на 30 днів. Проте, коли фотоперіод скорочується до 16 годин або менше, ефект цих генів поступово знижується. Це вказує на те, що E3 та E4 чутливі до тривалості світлового дня та відповідно адаптують час розвитку рослини [45].

Коли в сої не відбувається експресія генів, які відповідають за фотоперіодичну чутливість, зокрема у випадку рецесивного стану генів e1-e10, процес індукції цвітіння запускається на досить ранньому етапі розвитку. Це відбувається незалежно від тривалості світлового дня, при умові, що його довжина достатня для забезпечення нормального процесу фотосинтезу [46].

Лінії та сорти сої, у яких спостерігається рецесивний стан E-генів, характеризуються відсутністю чутливості до довжини світлового дня. Це означає, що вони будуть цвісти приблизно в однакові терміни незалежно від того, чи вони вирощуються в умовах короткого, чи довгого дня. Таким чином, рецесивний стан генів e1-e10 в сої визначає її фотоперіодичну нейтральність.

В ході досліджень було встановлено, що при довжині світлового дня, яка не перевищує 13,5 годин, домінантні Е гени (E1-E10) у сої не проявляють своєї активності. Ця відсутність експресії генів впливає на фотоперіодичну реакцію рослини, зокрема на час, коли рослина починає цвісти. В результаті, в умовах світлового дня, що триває менше ніж 13,5 годин, період до початку цвітіння у рослин сої складає приблизно 35-38 днів. Цей процес відбувається незалежно від конкретного стану окремих Е-генів та їх комбінацій у генотипі рослини [47].

Е-гени відіграють критичну роль у процесі ініціації цвітіння сої, який активується відповідно до змін у фотоперіоді. Цей механізм важливий, оскільки індуктивний фотоперіод є головним тригером для початку цвітіння. Цікаво, що Е-гени не діють ізольовано; вони є частиною складної мережі, яка включає взаємодію з різними біологічними шляхами, активованими як внутрішніми (ендогенними), так і зовнішніми (екзогенними) факторами.

Можна робити припущення, що Е-гени можуть впливати на процес цвітіння не лише безпосередньо, а й опосередковано через взаємодію з гормональними та автономними системами рослини. Це означає, що Е-гени можуть відігравати роль в регулюванні різноманітних аспектів розвитку рослини, включаючи її адаптацію до змін у зовнішньому середовищі та внутрішніх фізіологічних станах.

На сучасному етапі досліджень сої одним із відкритих питань є вивчення взаємозв'язку між генами, які відповідають за фотоперіодизм, та процесами, що відбуваються на фізіологічному та біохімічному рівнях у рослині.

У контексті цих досліджень важливою є роль ізогенних ліній сої, які, маючи ідентичний генотип основного сорту, відрізняються станом окремих Е-генів. Ці лінії стають важливою моделлю для детального дослідження того, як генетичний контроль впливає на фізіологічні та біохімічні процеси в сої, особливо у відповідь на фотоперіодичні зміни.

Вивчення росту та розвитку рослин показує, що ці процеси регулюються під впливом численних зовнішніх та внутрішніх факторів. Зовнішні сигнали, такі як фотоперіод, мають здатність впливати на рослини як безпосередньо, так і опосередковано. Опосередкована дія може включати активацію або пригнічення внутрішніх регуляторних механізмів.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1 Рослинний матеріал

Об'єктами дослідження були ізогенні за генами *E* лінії сої (*Glycine max* (L.) Merr) сорту Clark з різними комбінаціями алелів. У домінантному стані ці гени викликають короткоденну відповідь, а в рецесивному – фотоперіодично нейтральну. У дослідженнях використовували короткоденний сорт Clark з генотипом *e1E2E3E4e5E7*, лінії L63-3016 з генотипом *e1E2E3e4e5E7* та L80-5879 з генотипом *E1e2e3E4e5E7* та фотоперіодичні нейтральні лінії L63-3117 з генотипом *e1e2E3E4e5E7* та L71-920 з генотипом *e1e2e3E4e5E7*.

У дослідженні використовували лінії сої з колекції кафедри фізіології, біохімії рослин та мікроорганізмів Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

2.2 Умови і методи проведення досліджень

Польові досліді проводились в період з травня по листопад на дослідній ділянці кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Дослідний матеріал було розділено на дві основні групи з урахуванням режиму освітлення: одна група рослин вирощувалася при 16-годинному денному світлі, інша – при 9-годинному. Це дозволило змодельовати умови короткого та довгого світлового дня і вивчити вплив фотоперіоду на процеси дозрівання сої.

Проведення польових дослідів було розпочато на початку травня, коли насіння сої було висіяно в ґрунт дослідних ділянок. Кожна ділянка мала площу 1 м² і була розташована так, щоб уникнути взаємного впливу між рослинами різних варіантів дослідів.

Вирощування рослин відбувалося згідно стандартних агротехнічних прийомів для сої в умовах України. Під час вегетаційного періоду

систематично проводились спостереження за ростом, розвитком, станом рослин та реєструвались всі зміни.

2.3 Фізіолого-біохімічні методи

В рамках даного дослідження фізіолого-біохімічні методи включали в себе декілька ключових методик. Перш за все, було проведено фенологічні спостереження для визначення ключових етапів розвитку сої. Особлива увага приділялася строкам початку цвітіння та дозрівання, що є критичними моментами в розвитку рослин. Дані зібрані з допомогою візуальних оцінок та фотографічних зафіксованих станів рослин на різних етапах їхнього життєвого циклу.

По закінченню вегетаційного періоду визначались показники вологості насіння. Зразки насіння брали з кожного варіанта досліді після збору та піддавали їх аналізу.

2.4 Біоінформаційні методи

Дослідження послідовностей *E* генів проводилось за допомогою онлайн-інструментів на порталі National Center for Biotechnological Information [48]. Розділ NCBI Gene містить ресурси з інформацією про гени, де можна знайти потрібні записи по їх назві. Кожен запис включає в себе деталі транскрибованих і транлюованих послідовностей, які можна завантажити у форматі FASTA для наступного аналізу.

Використовуючи програмний інструмент NCBI BLAST [49], було здійснено пошук гомологічних послідовностей. Ця програма застосовує методи локального вирівнювання для виявлення спільних доменів та структурних патернів між послідовностями. Для оцінки рівня схожості послідовностей була використана матриця BLOSUM62.

Пошук молекулярних маркерів здійснювався за допомогою програмного комплексу UGENE. Вона містить інтегровані функції для дизайну праймерів для полімеразної ланцюгової реакції. Використовуючи

інструмент моделювання ПЛР, можна отримати нуклеотидну ампліфіковану послідовність. Для відбору рестрикційних ензимів було використано модуль визначення потенційних сайтів рестрикції у заданій послідовності.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Вплив фотоперіоду на тривалості періоду сходи-цвітіння та врожайність сої.

Результати визначення тривалості періоду сходи-цвітіння у ізогенних за генами *E* ліній сої показав, що стан локусів домінантне/рецесивне у генотипі ізогенних ліній визначає темпи переходу рослин до цвітіння (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Вплив тривалості фотоперіоду на тривалість періоду сходи-цвітіння ізогенних за генами *E* ліній сої, 2021-2023

Генотип лінії	Сходи-цвітіння				ФПР
	16	9	Різниця з 16-годинним днем	%, від 16-годинного дня	
Clark (e1E2E3E4e5E7)	68,7 ± 1,2	57,0 ± 2,0	11,7*	82,9	КД
L63-3016 (e1E2E3e4e5E7)	68,7 ± 1,2	56,7 ± 2,1	12*	82,5	КД
L 80-5879 (E1e2e3E4e5E7)	69,5 ± 0,7	53,5 ± 0,7	15*	78,1	КД
L63-3117 (e1e2E3E4e5E7)	56,0 ± 1,7	50,3 ± 2,1	5,7*	89,8	ФПН
L71-920 (e1e2e3E4e5E7)	43,7 ± 4,2	43,0 ± 3,6	0,7	98,4	ФПН

Примітка: * - різниця між коротким та довгим днем у межах однієї лінії.

На довгому дні, коли світловий період тривав значно довше порівняно з коротким днем, короткоденні лінії сої переходили до цвітіння майже одночасно, а саме на 68-69 день від моменту сходів. Це свідчить про те, що довгий світловий період не сильно впливав на їх цвітіння.

На короткому дні, коли день був значно коротшим, лінії різнилися за часом переходу до цвітіння. Спостерігалось, що рослини сорту з генотипом $e1E2E3E4e5E7$ та лінія L63-3016 ($e1E2E3e4e5E7$) були схожими за своєю реакцією на короткий день і переходили до цвітіння одночасно на 57 добу від сходів. Однак рослини лінії L 80-5879 ($E1e2e3E4e5E7$) виявилися більш чутливими до світлових умов і почали цвісти ще раніше, на 53 добу.

Таким чином, за умов короткого фотоперіоду, короткоденні лінії сої починали свою генеративну фазу розвитку раніше, ніж при природному фотоперіоді.

Що стосується фотоперіодично нейтральних ліній, рослини лінії L63-3117 ($e1e2E3E4e5E7$) реагували на короткий день, переходячи до генеративної фази на 50 добу. При цьому, за умов природнього фотоперіоду, вони розпочинали цвітіння трохи пізніше, на 56 добу.

Інша фотоперіодично нейтральна лінія, L71-920 ($e1e2e3E4e5E7$), виявилася стабільною за різних світлових умов. Вона переходила до цвітіння як на довгому, так і на короткому фотоперіоді одночасно, а саме на 43 добу від сходів.

Лінії з домінантними алелями $E1$ або $E2E3$ (лінії $e1E2E3E4e5E7$, $e1E2E3e4e5E7$, $E1e2e3E4e5E7$) переходили до цвітіння пізніше порівняно з лініями, які мали рецесивні алелі цих генів, такими як $e1e2E3E4e5E7$ та $e1e2e3E4e5E7$. Це свідчить про глибокий генетичний контроль процесу цвітіння у рослин сої.

Додатково, виявилось, що ген $E3$ має особливу роль у взаємодії з іншими генами. Він не впливає на чутливість до фотоперіоду за відсутності домінантного алеля $E2$.

За ступенем чутливості до тривалості фотоперіоду досліджені лінії сої можна систематизувати. Зокрема, розподіл виглядає наступним чином: $e1E2E3E4 \geq e1E2E3e4 > E1e2e3E4 > e1e2E3E4 > e1e2e3E4$. Варто відмітити, що всі досліджені лінії мають однакові алелі $e5E7$, що підкреслює їхню спільну генетичну основу.

За літературними джерелами, існують цікаві дані щодо генетичного контролю чутливості рослин сої до тривалості фотоперіоду. Виявляється, що ген *E1* відіграє ключову роль у формуванні чутливості рослин сої, обумовлюючи їхню реакцію на тривалість дня. Він є головним фактором, що визначає, як рослини будуть адаптуватися до різних світлових умов.

Але інші гени, *E2* та *E3* не мають ніякого прямого впливу на чутливість рослин до тривалості фотоперіоду один без одного. Вони не показують значущого ефекту на рослини, коли діють окремо. Однак разом вони обумовлюють чутливість до тривалості фотоперіоду. Ця спільна дія генів *E2* і *E3* демонструє чутливість, яку можна порівняти з чутливістю, викликаною алелем *E1* [50].

Було досліджено структуру врожаю досліджених ліній сої. Результати представлені у таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Вплив тривалості фотоперіоду на елементи структури врожаю рослин ізогенних за генами *E* ліній сої, 2021, 2023 рік, польовий дослід

Фотоперіод	Кількість бобів, шт	Кількість зерен, шт	Маса зерен, г	
			На рослину	1000 зерен
Короткоденна лінія – e1E2E3E4e5E7				
16	15,7 ± 0,9	29,1 ± 2,2	2,5 ± 0,6*	67,4 ± 0,9*
9	16,8 ± 0,3	34,5 ± 4,9	6,4 ± 0,8	170,0 ± 15,4
Короткоденна лінія – e1E2E3e4e5E7				
16	20,2 ± 0,7	36,3 ± 0,1	3,1 ± 0,3*	87,3 ± 12,2*
9	17,3 ± 3,4	35,9 ± 5,5	5,8 ± 0,2	166,0 ± 19,0
Короткоденна лінія – E1e2e3E4e5E7				
16	23,2 ± 1,3	51,3 ± 3,5	4,9 ± 0,3*	93,3 ± 6,8*
9	22,5 ± 1,3	47,1 ± 2,8	6,5 ± 0,3	141,4 ± 16,7
Фотоперіодичнонейтральна лінія – e1e2E3E4e5E7				
16	16,9 ± 0,4	38,9 ± 0,1	5,0 ± 0,4	126,5 ± 9,7*
9	16,8 ± 0,9	35,5 ± 2,8	5,9 ± 0,3	164,3 ± 7,8
Фотоперіодичнонейтральна лінія – e1e2e3E4e5E7				
16	16,1 ± 2,7	35,5 ± 4,2	6,0 ± 0,6*	176,8 ± 2,7
9	14,4 ± 1,8	32,0 ± 7,2	4,5 ± 0,5	145,3 ± 17,8

Примітка: * - різниця між коротким та довгим днем у межах однієї лінії.

Лінії короткого дня сої представляють особливий інтерес через їх унікальну реакцію на тривалість фотоперіоду. Ці реакції, зокрема, можуть варіюватися в залежності від генетичного стану гена *E4*, а також від комбінації інших генів, таких як *E1* або *E2* і *E3*.

Показано, що ген *E1* відіграє ключову роль у визначенні чутливості рослини до фотоперіоду. Ця чутливість, викликана *E1*, є високою і відрізняється від реакцій, пов'язаних із генами *E2* та *E3*, коли вони діють окремо.

Кількість бобів і зерен у більшості досліджуваних ліній зростає при тривалому фотоперіоді. Однак, є виняток: сорт «Кларк» не показав такої тенденції. Це може бути пов'язано з рядом факторів, але на основі наявних даних можна припустити, що ця особливість пов'язана з домінантним станом гена *E4*.

Аналіз показників маси зерен на рослину виявив деякі цікаві тенденції. Результати демонструють, що маса зерен виявлялася більшою у короткоденних ліній сої за умов короткого дня. Це свідчить про високий ступінь адаптації цих ліній до короткого фотоперіоду.

Однак, у фотоперіодично нейтральних ліній спостерігалася інша реакція. Наприклад, лінія L63-3117 виявляла дещо вищі значення маси зерен за умов короткого дня, показуючи певну пристосованість до таких умов. З іншого боку, лінія L71-920 демонструвала збільшену масу зерен за умов тривалого дня, підкреслюючи її пристосованість до довших світлових періодів.

Було встановлено, що маса 1000 зерен у короткоденних ліній була більшою у варіантах досліду з експозицією короткого фотоперіоду протягом 14 діб, у фотоперіодичних нечутливих ліній в умовах довгого дня. Це може вказувати на оптимальні умови для зростання та розвитку цих ліній

у короткоденних умовах. Водночас, фотоперіодично нечутливі лінії показали кращі результати в умовах довгого дня, вказуючи на різницю в адаптації та відповіді між різними лініями.

3.2 Диференціація сортів сої за групами стиглості з урахуванням генетичного поліморфізму за локусами *E*

Соя є однією з основних олійних культур, яка активно вирощується в різних регіонах України. Алельний стан генів фотоперіодичної чутливості в сучасних сортах сої, представлених на українському ринку, наразі, на жаль, є малодослідженим. Це створює певний дефіцит знань в області генетичної адаптованості цієї культури до конкретних кліматичних умов регіону.

У світлі глобальних змін клімату і змінних погодних умов питання щодо визначення впливу генотипів з різним алельним станом локусів *E* на агрономічно-важливі ознаки сої стає особливо актуальним. Вивчення цієї проблеми дозволяє розуміти, які генетичні комбінації є найбільш ефективними для конкретних умов вирощування.

Відомо, що соя є вкрай поліморфною рослиною за реакцією на фотоперіод. Тому детальний аналіз ґрунтовних даних з поліморфізму за генами *E1*, *E2*, *E3*, *E4* в сортах і лініях сої відкриває перспективи для селекції і вибору сортів, що будуть найбільш адаптовані до певних кліматичних зон України.

Методи визначення алелів генів *E* за допомогою ПЛР-аналізу, можуть стати в нагоді для досліджень в цій області. Вони не тільки прискорять процес визначення генотипів, але й значно підвищують точність результатів. Така інформація буде корисною для вдосконалення системи ранжування сортів сої за групами стиглості, а також дозволить визначити оптимальні сорти для конкретних зон вирощування, враховуючи їх генетичний потенціал адаптації.

У Реєстрі сортів України наявний широкий спектр сортів сої, адаптованих до різних кліматичних умов країни. Наразі сортовий склад за

групами стиглості нараховує 5 груп. Особливо популярними є скоростиглі сорти (скс – скорочення за українською класифікацією, 000 – за міжнародною класифікацією). Ці сорти мають період вегетації 81-90 днів і є особливо привабливими для районів з коротким вегетаційним періодом.

Група ранньостиглих сортів (рс, 00) із періодом вегетації 91-110 днів також є важливою для аграрного сектору України. Ці сорти дають можливість отримати дозріле насіння, навіть якщо літо є досить коротким. Проте слід враховувати, що вони також піддаються ризику зниження врожайності у випадку посухи в липні-серпні.

Також варто враховувати, що, як правило, ранньостиглі сорти є менш урожайними в порівнянні із іншими, завдяки своєму швидкому вегетаційному періоду.

Сорти сої, що належать до категорій середньоранньої (ср, 0) та середньостиглої (сс, I) групи, відрізняються своєю тривалістю вегетаційного періоду – відповідно 111-119 та 120-130 днів. Ці сорти, завдяки тривалішому періоду росту, мають можливість накопичити більше вегетативної маси, що, у свою чергу, позитивно позначається на їхній врожайності. Оскільки ці сорти мають додатковий час для росту, вони також мають змогу краще адаптуватися до змін кліматичних умов.

Сучасна геногеографія сортів сої, що базується на алельному поліморфізмі локусів *E1*, *E2*, *E3*, *E4*, відкриває нові горизонти у селекційній роботі. Навіть в межах однієї групи стиглості можуть існувати генотипи з різною генетичною структурою, що підкреслює складність та різноманітність генетичної будови сої, а також важливість продовження досліджень у цій області [51].

3.3 Пошук молекулярних маркерів для виявлення *E* генів.

Програма UGENE є надзвичайно корисною у процесі генетичних досліджень, оскільки вона надає можливість розробляти праймери для специфічного ідентифікування генів. У нашому дослідженні, з її

допомогою, було розроблено праймери для детектування алельних варіантів *E* генів в ізогенних лініях сої. Цей методологічний підхід забезпечив високу точність та надійність результатів.

Використання алгоритмів парного та множинного вирівнювання дозволило провести порівняння генів і виявити специфічні відмінності між різними алелями.

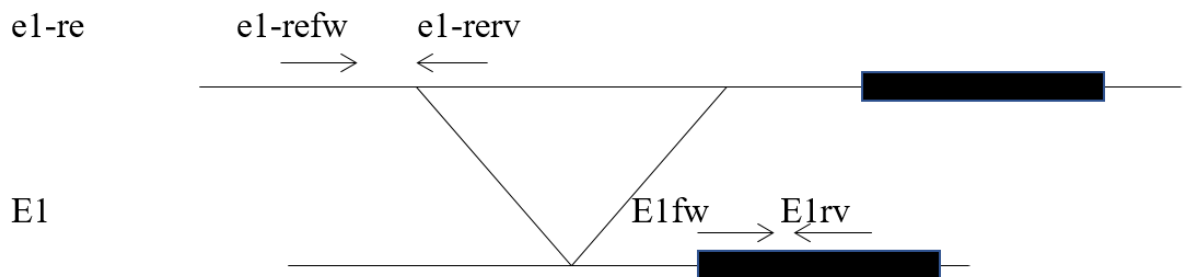
Ген *E1* є унікальним у своєму роді, оскільки він не містить інтронів і кодує транскрипційний фактор, який має значний вплив на регуляцію росту та розвитку рослин. Він відіграє важливу роль у контролі різних аспектів фізіології рослини, включаючи час цвітіння та адаптацію до різних умов освітлення.

Серед алелей гена *E1*, особливо цікавим є алель *e1-as*. Цей алель містить одонуклеотидну поліморфну заміну (SNP), яка веде до заміни амінокислоти аргеніну на треонін у структурі білка. Така заміна може суттєво змінити функціональні властивості білка, потенційно впливаючи на його здатність регулювати важливі процеси в рослині.

Інший важливий алель, *e1-fs*, характеризується наявністю делеції, яка приводить до формування завчасного стоп-кодону. Це, у свою чергу, може призвести до синтезу скороченого білка, що змінює його нормальну функцію та може вплинути на загальний розвиток рослини.

Окремим відкриттям є алель *e1-re*, який містить в собі вставку довжиною 3.1 kb. Така значна вставка може радикально змінити структуру та функціональні властивості білка, що виробляється геном *E1*.

	14 835	14840	14845	14850	14855	14860	14865	14 869																										
<i>E1</i>	G	T	C	A	A	A	G	A	A	G	A	G	G	A	A	A	T	C	C	A	C	C	A	T	A	T	G	C	G	A	A	G	C	C
<i>e1-as</i>	G	T	C	A	A	A	G	A	A	G	A	C	G	A	A	A	T	C	C	A	C	C	A	T	A	T	G	C	G	A	A	G	C	C
<i>e1-fs</i>	G	T	C	A	A	A	G	A	A	G	A	G	G	-	A	A	T	C	C	A	C	C	A	T	A	T	G	C	G	A	A	G	C	C
<i>e1-re</i>	G	T	C	A	A	A	G	A	A	G	A	G	G	A	A	A	T	C	C	A	C	C	A	T	A	T	G	C	G	A	A	G	C	C

Рис.3.1 Порівняння будови варіантів гену *E1*.Рис.3.2 Будова гену *E1*.

Для розрізнення алельних варіантів гену *E1* були розроблені наступні праймери:

E1fw

CCTTCAGATGAAAGGGAGCA

E1rv

TCTCTGGCATAGCTTGTTTAAGG

e1-refw

CCTGAACTCAAATTGGAGGAAC

e1-rerv

CTCTAGAAACACATGGCTTT

Для розрізнення алелів *e1-fs* та *e1-as* продукти ампліфікації потрібно обробити ферментами рестрикції *TaqI* та *NihfI*, таким чином алель *e1-fs* розрізеться за допомогою *NihfI* на чотири частини на відміну від інших. Натомість алель *e1-as* буде вирізнятися довжиною розрізаних *TaqI* фрагментів.

основі цього гена. Стоп-кодон припиняє процес транскрипції білка на ранньому етапі, що призводить до формування неповного білка. Дана мутація може мати велике значення для розуміння ролі гена *E2* у розвитку рослини. Вона може впливати на особливості росту та розвитку сої, включаючи її реакцію на зовнішні умови, такі як фотоперіод

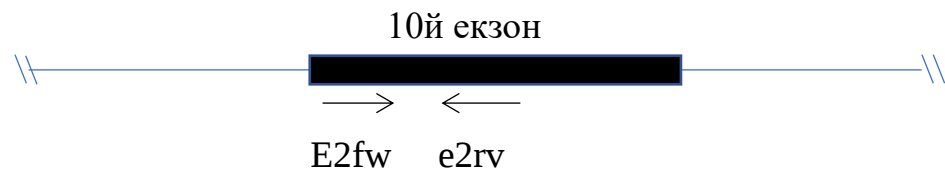


Рис. 3.5 Будова гену *E2*.

Для розрізнення алельних варіантів були розроблені праймери:

E2fw

AAGCCCATCAGAGGCATGT

e2rv

CGTGAAATCAAAGGGAACAA

Обробка продуктів ампліфікації рестриктазою *DraI* дасть різні за довжиною продукти реакції.

Ген *E3* має відносно просту структуру, і складається всього з чотирьох екзонів. Кожен з цих екзонів є важливим для кодування частин білка, який відіграє важливу роль у фізіологічних процесах рослини.

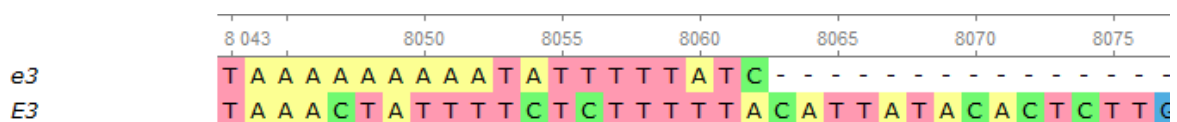


Рис. 3.6 Порівняння послідовності *E3* генів.

Особливий інтерес представляє рецесивний алель *e3-tr*, який характеризується наявністю делеції четвертого екзону. Ця делеція може істотно вплинути на структуру та функціональність білка, виробленого на основі гена *E3*. Втрата четвертого екзону може призвести до значних змін у

білку, що, у свою чергу, може впливати на розвиток рослини, включаючи її реакцію на зміни у світловому дні та інші фізіологічні процеси.

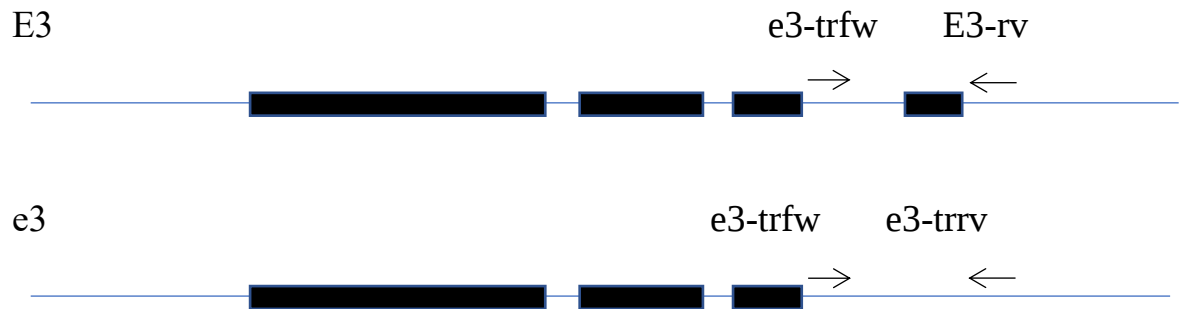


Рис. 3.7 Будова *E3* гену.

Для розрізнення *E3* генів були розроблені праймери:

e3-trfw

TGGAGGGTATTGGATGATGC

e3-trrv

GTCSTATACAATTCTTTACGACG

E3-rv

CGGTCAAGAGCCCAACATGAG

Продукти ампліфікації будуть відрізнятися довжиною. *E3* – 558 нуклеотидів, *e3* – 274 нуклеотид.

Сиквенс гену білку *E3* у форматі Fasta (NCBI)

```
>MT366573.1 Glycine max isolate II_JS9560 PhyA3 protein (E3) gene, partial
cds
ATTTCGTTGGTTATGGCAGTTGTGGTAAATGACAATGATGAAGATGGGGATAGTTCTGATGCTGTTCAACC
ACAGAAGAGTAAGAGACTCTGGGGTTTAGTAGTTTGCCATCACACTACTCCCAGATTTCGTTCCSTTTCCST
CTTAGGTATGCTTGTCAATTTCTGGCTCAAGTATTTGCGGTTTCATGTGAGCAAAGAGCTAGAGATAGAGT
ATCAAATTATTGAGAAGAACATCCTGCAAACTCAAACACTCTTGTGTGATATGCTGGTGCAAGGTGAGCC
CCTAGGCATTGTTTCACAAAGTCCTAATATAATGGATCTTGTGAAGTGTGATGGAGCAGCCCTGCTATAT
AAAAACAAGGTGTGGCGATTAGGGGTAACACCAAGTGAATCTCAAATAAAAGAGATAGCTTTGTGGCTCT
TTGAGTGCCATGAGGATTCCACAGGTTTTTGTACAGATAGCTTGTCTGATGCAGGCTTCCCTGGGGCTGC
TGCTCTTGGTGATATTGCATGTGGAATGGCAGCTGCCAGAATAGCTTCCAAAGATATACTTTTCTGGTTT
CGGTCTCACACAGCCTCAGAAATCCGATGGGGTGGTGCAAAGCATGAGCCTGGTGAAAGGGATGATGGTA
GGAGGGTGCATCCAAGATCATCATTCAGGCTTTTCTTGAAGTTGTGAAGACAAGGAGCTTACCCTGGAA
GACSTATGAAACGGATGCCATTCAATTCGTTGAGTTAATACTGAGAGATGCATTCAAAGAGACACAGAGC
ATGGAGATAAGCACATATGCTATCGATACAAGGCTAGGTGATTTGAAGATTGAAGGAATGCAAGAACTGG
ATGCAGTGACAAGTGAGGTGGTAAGGTTAATTGAAACAGCAACGGTGCCAATTTTGGCGGTTGATGTTAA
TGGGATGATCAATGGATGGAACACAAAAATTGCTGAGTTGACAGGTCTTCCAGTTGATGAAGCTATTGGA
AAGCATTTACTCACACTTGTAGA
```

E4 ген кодує фітохром А та також складається лише з чотирьох екзонів.

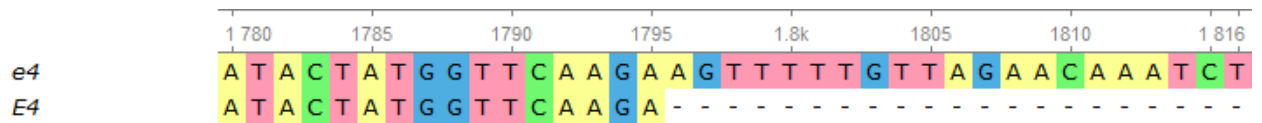


Рис. 3.8 Порівняння послідовності генів *E4*.

Що стосується рецесивного алеля *e4*, то він особливо цікавий через наявність вставки ретротранспозону в першому екзоні. Ретротранспозони є мобільними елементами геному, які можуть переміщатися в межах генетичного матеріалу, вносячи зміни в структуру генів. Вставка ретротранспозону в перший екзон гена *E4* може істотно змінити його функціонування, впливаючи на біосинтез та активність фітохрому А.



Рис. 3.9. Будова гену *E4*. Чорні прямокутники це екзони, білий прямокутник – вставка ретротранспозону.

Для розрізнення алельних варіантів гену *E4* були розроблені праймери:

e4f

CCTAGTGGGAGCATGGAAAG

e4rv

GTGGTCATTGAGCATATAAGC

E4rv

TACGTCTTTTGCAGTTACTC

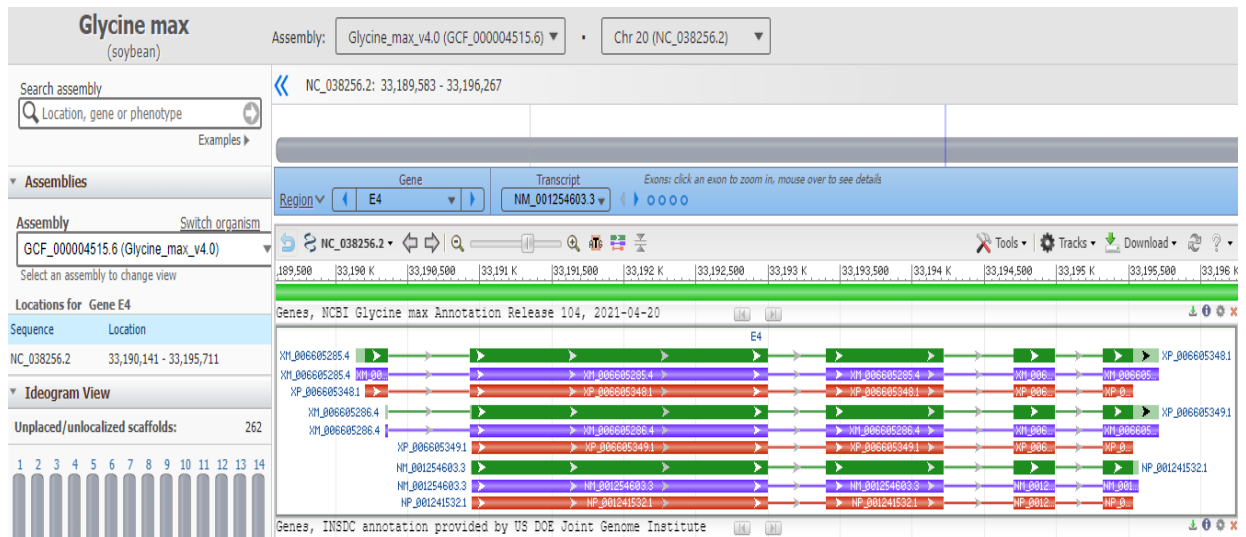


Рис. 3.10. *E4* ген у базі (NCBI).

Алельні варіанти будуть відрізнятися довжиною ампліфікованої послідовності. Алель *e4* містить 835 нуклеотидів, алель *E4* містить 906 нуклеотидів.

Таким чином, в ході дослідження були розроблені спеціалізовані праймери для ПЛР, які дозволяють виявляти *E*-гени в ДНК сої. Ці праймери можуть бути використані для вирішення різноманітних прикладних задач, таких як відбір і селекція рослин, моніторинг генетичної варіативності або для ідентифікації і вивчення специфічних мутацій, які впливають на фотоперіодичну реакцію сої.

Використання алгоритму MEGABLAST для пошуку гомологічних генів до білка *E1* підтвердило, що механізм, який вони контролюють, є поширеним у природі. MEGABLAST дозволяє порівняти послідовність гена *E1* з великою базою даних інших геномів, що дає можливість визначити ступінь спорідненості між генами різних організмів. В результаті такого порівняння можна виявити, що структури подібні до білка *E1* присутні в геномах багатьох рослин, що свідчить про еволюційну консервативність цього механізму регуляції (Рис. 3.11).

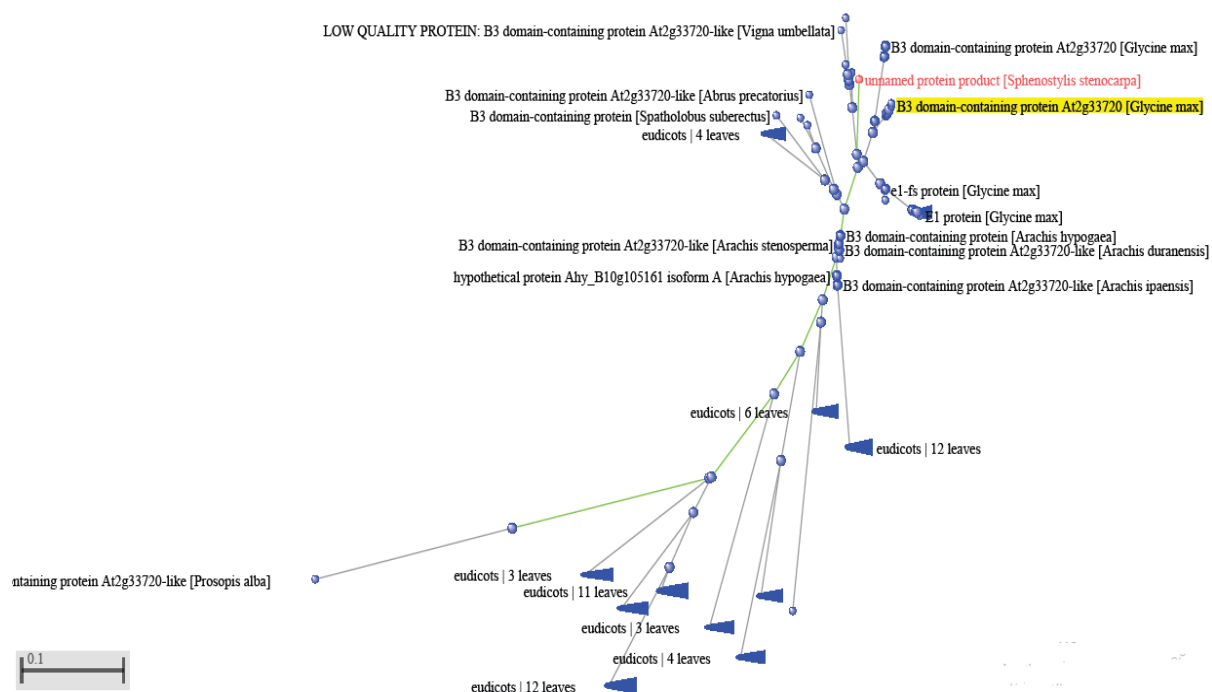


Рис. 3.11. Гомологічні гени білку Е1 ген у базі (NCBI), пошук за допомогою MEGABLAST, Distance tree(NJ) of results .

ВИСНОВКИ

В результаті виконання дипломної роботи були розроблені молекулярні маркери для виявлення *E* генів контролю цвітіння та дозрівання у ізогенних за генами *E* ліній сої (*Glycine max* (L.) Merr.).

1. Результати визначення тривалості періоду сходи-цвітіння у ізогенних за генами *E* ліній сої показав, що стан локусів домінантне/рецесивне у генотипі ізогенних ліній визначає темпи переходу рослин до цвітіння *E2* і *E3* разом обумовлюють чутливість до тривалості фотоперіоду, порівнянну з чутливістю, викликану алелем *E1*.

2. Встановлено вплив стану локусів домінантне/рецесивне у генотипі ізогенних ліній на структуру врожаю. Маса 1000 зерен у короткоденних ліній була більшою у варіантах досліду з експозицією короткого фотоперіоду протягом 14 діб, у фотоперіодичних нечутливих ліній в умовах довгого дня.

3. Досліджено диференціацію сортів сої за групами стиглості з урахуванням генетичного поліморфізму за локусами *E* виявлено, що в межах однієї групи стиглості можуть знаходитися генотипи з різними алелями за локусами *E*;

4. За допомогою біоінформатичних методів знайдені сіквенси *E* генів і розроблені маркери для їх виявлення в сої (*Glycine max* (L.) Merr.).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Харитоненко А. Дослідження щодо складності і різноманітності фотоперіодичних реакцій рослин: історичний аспект / А. Харитоненко // Матеріали III Міжнародної студентської науково-технічної конференції “Природничі та гуманітарні науки. Актуальні питання”. - 2020. - С. 180-181.
2. Heide O. M. Control of flowering and reproduction in temperate grasses / O. M. Heide // *New Phytologist*. - 1994. - №128(2). - P.347-362.
3. Smith H. Phytochromes and light signal perception by plants — an emerging synthesis / H. Smith // *Nature*. - 2020. - № 407(6804). - P. 585-591.
4. Джамєєв В. Ю. Механізми рецесії тавнутрішньоклітинного сигналіну у рослин: навчальний посібник / В.Ю. Джамєєв. - Х. : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2016. - 208 с.
5. Franklin K. A. Phytochrome functions in Arabidopsis development / K. A. Franklin, P. H. Quail // *J. Exp. Bot.* - 2010. - № 61. - P. 11-24.
6. Chailakhyan M. K. New facts in support of the hormonal theory of plant development / M. K. Chailakhyan, A. D. Krikorian // *The Botanical Review*. - 1976. - № 41. - P. 1-29.
7. Kardailsky I. Activation Tagging of the Floral Inducer FT / I. Kardailsky et al // *Science*. - 1999. - № 286(5446). - P.1962-1965.
8. Заболотний Г. М. Агробіологічні основи вирощування сої та шляхи максимальної реалізації її продуктивності / Г. М. Заболотний, В. А. Мазур, О. І. Цінанська та ін. - Вінниця. 2020. - 276 с.
9. Hymowitz T. Speciation and Cytogenetics. In: Boerma HR, Specht JE, editors. Soybeans: Improvement, Production, and Uses / T. Hymowitz // *American Society of Agronomy*. -2004. - P. 97-136.
10. Egli D. B. Seed Biology and the Yield of Grain Crops / D. B. Egli. - NY: Hardback, 1998. - 178 p.

11. Kogan M. Ecology and management of soybean arthropod pests / M. Kogan, S. G. Turnipseed // *Annual Review of Entomology*. - 1987. - № 32(1). - P. 507-538.
12. Scholz V. Prospects and risks of the use of castor oil as a fuel / V. Scholz, J. N. da Silva // *Biomass and Bioenergy*. - 2008. - № 32(2). - P. 95–100.
13. Сучасні зміни в технології вирощування сої. Режим доступу: <https://www.agronom.com.ua/suchasni-zminy-v-tehnologiyi-vyroshhuvannya-soyi/>.
14. Pedersen, P. Response of Soybean Yield Components to Management System and Planting Date / P. Pedersen, J. G. Lauer // *Agronomy Journal*, - 2004. - № 96(4). - P. 1372-1381.
15. Wareing P. F. Photoperiodism in Woody Plants / P. F. Wareing // *Annual Review of Plant Physiology*. - 1956. - № 7(1). - P. 191-214.
16. Bünning E. Die endonome Tagesrhythmik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion / E. Bünning // *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. - 1936. - № 54. - P. 590-607.
17. Heide, O. M. Dormancy release in beech buds (*Fagus sylvatica*) requires both chilling and long days / O. M. Heide // *Physiologia Plantarum*. - 1993. - № 89(1). - P. 187-191.
18. Franklin K. A. Phytochromes and shade-avoidance responses in plants / K. A. Franklin, G. C. Whitelam // *Annals of Botany*. - 2005. - № 96(2). - P. 169-175.
19. Casal J. J. Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade / J. J. Casal // *Annual Review of Plant Biology*. - 2013. - № 64. - P. 403-427.
20. Philippot L. Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere / L. Philippot, J. M. Raaijmakers, P. Lemanceau, W. H. van der Putten // *Nature Reviews Microbiology*. - 2013. - № 11(11). - P. 789-799.
21. Dennis P. G. Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? / P. G. Dennis, A.

J. Miller, P. R. Hirsch // *FEMS Microbiology Ecology*. - 2010. - № 72(3). - P. 313-327.

22. Ainsworth E. A. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions / E. A. Ainsworth, A. Rogers // *Plant, Cell & Environment*. - 2007. - № 30(3). - P. 258-270.

23. Leakey A. D. B. Gene expression profiling: opening the black box of plant ecosystem responses to global change / A. D. B. Leakey, E. A. Ainsworth, S. M. Bernard et al // *Global Change Biology*. - 2009. - № 15(5). - P. 1201-1213.

24. Ballaré C. L. The shade-avoidance syndrome: Multiple signals and ecological consequences / C. L. Ballaré, R. Pierik // *Plant, Cell & Environment*. - 2017. - № 40(11). - P. 2530-2543.

25. Liu B. Genetic redundancy in soybean photoresponses associated with duplication of the phytochrome A gene / B. Liu, A. Kanazawa, H. Matsumura et al // *Genetics*. - 2008. - № 180(2). - P. 995-1007.

26. Koornneef M. Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana* / M. Koornneef, C. Alonso-Blanco, D. Vreugdenhil // *Annual Review of Plant Biology*. - 2004. - № 55. - P. 141-172.

27. Emery R. J. Branch development in *Lupinus angustifolius* L. II. Relationship with endogenous ABA and cytokinins in axillary and main stem buds / R. J. Emery, N. E. Longnecker, C. A. Atkins // *Journal of Experimental Botany*. - 1998. - № 49(322). - P. 649-656.

28. Rushton P. J. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens / P. J. Rushton, I. E. Somssich // *Current Opinion in Plant Biology*. - 1998. - № 1(4). - P. 311-315.

29. Watanabe S. Map-based cloning of the gene associated with the soybean maturity locus E3 / S. Watanabe, R. Hideshima, Z. Xia et al // *Genetics*. - 2009. - № 182(4). - P. 1251-1262.

30. Proudfoot N. J. Ending the message: poly(A) signals then and now / N. J. Proudfoot // *Genes & Development*. - 2011. - № 25(17). - P. 1770-1782.

31. Bernard R. L. Two major genes for time of flowering and maturity in soybeans / R. L. Bernard // Crop Sci. - 1971. - № 11. - P. 242-244.
32. Bonato E. R. E6, a dominant gene conditioning early flowering and maturity in soybeans / E. R. Bonato, N. A. Vello // Genet Mol Biol. - 1999. - № 22. - P. 229-232.
33. Samanfar B. Mapping and identification of a potential candidate gene for a novel maturity locus, E10, in soybean / B. Samanfar, S. J. Molnar, M. Charette et al // Theor Appl Genet. - 2016. - № 130. - P. 377-390.
34. Cober E. R. Regulation of seed yield and agronomic characters by photoperiod sensitivity and growth habit genes in soybean / E. R. Cober, M. J. Morrison // Theor Appl Genet. - 2010. - № 120. - P. 1005-1012.
35. Lu S.. Natural variation at the soybean J locus improves adaptation to the tropics and enhances yield / S. Lu, X. Zhao, Y. Hu et al // Nat Genet. - 2017. - № 49. - P. 773-779.
36. Kong F. Two Coordinately Regulated Homologs of FLOWERING LOCUS T Are Involved in the Control of Photoperiodic Flowering in Soybean / F. Kong, B. Liu, Z. Xia et al // Plant Physiol. - 2010. - № 154. - P. 1220-1231.
37. Xia Z. Positional cloning and characterization reveal the molecular basis for soybean maturity locus E1 that regulates photoperiodic flowering / Z. Xia, S. Watanabe, T. Yamada et al // Proc Natl Acad Sci USA. – 2012. – № 109. – E2155-64. doi: 10.1073/pnas.1117982109.
38. Tsubokura Y. Natural variation in the genes responsible for maturity loci E1, E2, E3 and E4 in soybean / Y. Tsubokura, S. Watanabe, Z. Xia // Ann Bot. - 2014. - № 113(3). - P. 429-441.
39. McBlain B. A. A new gene affecting the time of flowering and maturity in soybeans / B. A. McBlain, R. L. Bernard // J. Hered. - 1987. - № 78. - P. 160-162.
40. Zhao C. A recessive allele for delayed flowering at the soybean maturity locus E9 is a leaky allele of FT2a, a FLOWERING LOCUS T ortholog / C. Zhao, R. Takeshima, J. Zhu et al // BMC Plant Biol. - 2016. - № 16. - P. 20.

41. Cober E. R. Soybean photoperiod-sensitivity loci respond differentially to light quality / E. R. Cober, J. W. Tanner, H. D. Voldeng // *Crop Sci.* - 1996. - № 36. - P. 606-610.
42. Nan H. GmFT2a and GmFT5a redundantly and differentially regulate flowering through interaction with and upregulation of the bZIP transcription factor GmFDL19 in soybean / H. Nan, D. Cao, D. Zhang et al // *PLoS One.* - 2014. – № 9. - e97669.
43. Destro D. Photoperiodism and genetic control of the long juvenile period control in soybean / D. Destro, V. Carpentieri-Pipolo, R. A. S. Kiihl, L. A. Almeida // *Crop breeding and applied biotechnology.* - 2001. - № 1. - P. 72-92.
44. Давиденко О. Г. Прояв фотоперіодичної реакції у ранньостиглих сортів сої / О. Г. Давиденко, В. В. Жмурко, Д. В. Голоєнко та ін // *Селекція і насінництво.* - 2004. - № 88. - С. 151-162.
45. Saindon G. Adjustment of the soybean phenology using the E4 locus / G. Saindon, W. D. Beversdorf, H. D. Voldeng // *Crop Sci.* - 1989. - № 29. - P.1361-1365.
46. Wang Y. Effects of soybean major maturity genes under different photoperiods / Y. Wang, C. X. Wu, X. M. Zhang et al // *Acta agronomica sinica.* - 2008. - № 34(7). - P. 1160-1168.
47. Cober E. R. A new soybean maturity and photoperiod-sensitivity locus linked to E1 and T / E. R. Cober, H. D. Voldeng // *Crop Sci.* - 2001. - № 41. - P. 698-701.
48. NCBI. [Electronic resource] / The National Center for Biotechnology Information – 2019. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
49. Altschul S.F. Basic local alignment search tool / S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman // *Journal of molecular biology* . - 1990. № 215(3). – P. 403-410.
50. Zharikova D. O. Polymorphisms in SSR-loci associated with E genes in soybean mutant lines offer perspective for breeding / D. O. Zharikova, G.O.

Chebotar, E.A. Aksyonova, I. V. Temchenko, S. V. Chebotar // Agricultural science and practice. – 2019. – № 6(3). – P. 45-55. doi:10.15407/agrisp6.03.045.

51. Zhai H. Allelic variations at four major maturity E genes and transcriptional abundance of the E1 gene are associated with flowering time and maturity of soybean cultivars / H. Zhai, S. Lu, Y. Wang et al // PLoS One. – 2014. – № 9(5). – e97636.

SUMMARY

Rvachova M. V. "Investigation of the differentiation of soybean varieties by maturity groups and the use of genetic polymorphism by E loci in the search for optimal soybean genotypes for certain growing zones."

The work contains 44 pages, 10 figures, 3 tables, 51 used sources.

The aim of the work was to study the differentiation of soybean varieties by maturity groups, taking into account genetic polymorphism at the E loci to find optimal soybean genotypes for certain growing zones.

The subject of the study is the differentiation of soybean varieties by maturity groups, taking into account genetic polymorphism at E loci.

The object of the study is soybean lines (*Glycine max* (L.) of the Clark variety that are isogenic in terms of E genes with different combinations of alleles.

Molecular markers were developed for the detection of E genes controlling flowering and ripening in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) lines isogenic for E genes. It was determined that the status of the dominant/recessive loci in the genotype of isogenic lines determines the rate of transition of plants to flowering. E2 and E3 together determine the sensitivity to photoperiod duration, comparable to the sensitivity caused by the E1 allele.

Differentiation of soybean varieties according to maturity groups was investigated, taking into account genetic polymorphism at the E loci. It was found that genotypes with different alleles at the E loci can be found within the same maturity group.

E gene sequences were found and markers were developed for their detection in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.).

Key words: soybean (*Glycine max* (L.) Merr), isogenic lines, E genes, photoperiod, molecular markers, variety differentiation.