

Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна
Біологічний факультет
Кафедра фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів

**Вплив природного фотоперіоду після цвітіння та чутливості до
фотоперіоду на загальний вміст азоту та склад білків у насінні сої**

Допущений до захисту «___» _____ 2023 р. Кваліфікаційна робота
здобувача 6-го року
навчання другого
(магістерського) рівня
вищої освіти

Завідувач кафедри _____

Бруцького Д. В

Оцінка «_____»

Науковий керівник:

к.б.н. доцент.

Щоголев А.С.

Науковий консультант:

Раєвська І.М.

Голова ЕК _____

«___» _____ 2023 р.

Харків – 2023

Анотація

Бруцький Д. В. Вплив природного фотоперіоду після цвітіння та чутливості до фотоперіоду на загальний вміст азоту та склад білків у насінні сої

Робота викладена на 54 сторінках, містить 14 рисунків, 1 таблицю, 60 літературних джерел.

Мета роботи з'ясувати вплив фотоперіоду на структуру та якість врожаю у ізогенних за генами Е ліній сої.

Для досягнення цієї мети були поставлені наступні завдання:

- 1) з'ясувати вплив фотоперіоду на врожайність сої;
- 2) дослідити вплив фотоперіоду на вміст загального азоту та білку у насінні сої;
- 3) дослідити фракційний складу запасних білків насіння шляхом гель-електрофорезу в поліакриламідному гелі.
- 4) дослідити вплив фотоперіоду на вміст олії у насінні сої;
- 5) провести пошук у генетичних базах сіквенсів генів Е ліній сої;
- 6) провести аналіз (множинне вирівнювання) та встановити відмінності у послідовностях ізогенних за генами Е ліній сої різного географічного походження;

Для виконання цього завдання використано наступні методи: проведено полеве дослідження, рослини вирощувалися при 16- та 9-годинному освітленні, визначено загальний вміст азоту за методом К'ельдаля, визначено вміст білка за Лоурі у модифікації Міллера, вивчено фракційний склад запасних білків насіння шляхом гель-електрофорезу в поліакрилатному гелі, здійснено пошук послідовностей генів Е сої у біоінформаційних базах та їх гомологів за допомогою NCBI BLAST. Також проведений аналіз поліморфізмів за локусами, пов'язаними з генами Е.

Встановлено, що насіння рослин сої, які відносяться до короткоденних ліній, мають вищий вміст загального азоту та білку в умовах короткого фотоперіоду. Вміст загального азоту та білка збільшувався у рослин нейтрально денних ліній сої при довгому світловому дні. Отримані

результати свідчать про більш інтенсивне перетворення вуглеводів у азотовмісні сполуки у обох груп рослин за сприятливого для розвитку фотоперіоду.

Ключові слова: соя (*Glycine max* (L.) Merr), фотоперіодизм, гени *E*, ізогенні лінії, короткоденні та фотоперіодично нейтральні лінії.

Зміст

Перелік умовних скорочень.....	6
Вступ.....	7
1. Розділ 1 Огляд літератури.....	9
1.1.Механізм чутливості рослин до зміни тривалості світлового періоду доби.....	9
1.2.Біологічні особливості сої по відношенню до світлових умов вирощування (важливість підбору сортів сої для певної широти культивування).....	13
1.3.Взаємозв'язок фотоперіодичної реакції та інших факторів зовнішнього середовища.....	20
1.4.Вплив умов вирощування та сортових відмінностей на склад запасних речовин у насінні сої.....	22
1.5.Поліморфізм за локусами, асоційованими з генами E.....	27
2. Розділ 2 Матеріали та методи.....	31
Таблиця 2.1. Рослинні лінії сої, що були використані у дослідженні та їх кодування за номером у експерименті.....	31
2.1.Визначення загального азоту за К'ельдалем.....	32
2.2.Визначення вмісту білка за Лоурі у модифікації Міллера.....	33
2.3.Дослідження фракційного складу запасних білків насіння шляхом гель-електрофорезу в поліакрилатному гелі.....	34
2.4. Пошук сіквенсів E генів сої у біоінформаційних базах, та їх гомологів через NCBI BLAST.....	35
2.5.Пошук поліморфізмів за локусами, асоційованими з генами E...36	
3.Розділ 3. Результати та їх обговорення.....	37
3.1. Вплив фотоперіоду на вміст олії у насінні ізогеними лініями сої.....	37
3.2. Вплив фотоперіоду на вміст азоту у насінні сої ізогенних ліній сої...38	
3.3. Вплив фотоперіоду на вміст білку у насінні сої ізогенних ліній сої . 39	
3.4. Візуалізація результатів вмісту білків за допомогою електрофорезу..39	
3.5. Множинне вирівнювання послідовностей гомологів гену E2.....	41

3.6. Філогенетичне дерево порівняння гомологів гену E2.....	42
3.7. Множинне вирівнювання послідовностей гомологів гену E3.....	42
3.8. Множинне вирівнювання послідовностей гомологів гену E4.....	43
Висновок.....	45
Список використаної літератури	46

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

КДР - короткоденна рослина

ФПР - фотоперіодична реакція

ФПН - нейтральноденні рослини

КДД - критична довжина дня

ДДР - довгоденні рослини

SNP - поліморфізм

ВСТУП

Фотоперіод впливає не лише на індукцію цвітіння у сої (*Glycine max* (L.) Merr.), але також має вплив на подальші стадії репродуктивного росту цієї рослини. Проте його вплив на різні аспекти визначення врожайності досліджений недостатньо докладно. Метою даного дослідження було встановити вплив фотоперіоду на структуру та якість врожаю у ліній сої, ізогенних за генами *E*.

Соя є однією з найцінніших сільськогосподарських культур у світі через її різноманітне використання. В першу чергу, це пов'язано з біохімічним складом її зерна, де найцінніші компоненти - це білки та олія.

Однією з основних стратегій для оптимізації посівів сої в Україні та збільшення її врожайності є створення високоадаптивних сортів, які відповідали б факторам навколишнього середовища. Одним з обмежуючих факторів для успішного вирощування сої та отримання високоякісного врожаю є тривалість фотоперіоду, оскільки соя є короткоденною культурою за своєю біологічною природою.

Наразі існує обмежена кількість досліджень, які досліджують вплив фотоперіоду на вміст азоту та білків у насінні сої з урахуванням її фотоперіодичної реакції. Отже, метою цього наукового дослідження є розкриття впливу фотоперіоду на структуру та якість врожаю у лініях сої, які є ізогенними за генами *E*. Для досягнення поставленої задачі було визначено наступні завдання:

- 1) з'ясувати вплив фотоперіоду на врожайність сої;
- 2) дослідити вплив фотоперіоду на вміст загального азоту та білку у насінні;
- 3) дослідити фракційний складу запасних білків насіння шляхом гель-електрофорезу в поліакриламідному гелі;
- 4) дослідити вплив фотоперіоду на вміст олії у насінні сої.
- 5) провести пошук у генетичних базах сіквенсів генів *E* ліній сої

6) провести аналіз (множинне вирівнювання) та встановити відмінності у послідовностях ізогенних за генами E ліній сої різного географічного походження.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Механізм чутливості рослин до зміни тривалості світлового періоду доби.

В природі постійно відбуваються процеси адаптації, і фактори середовища відіграють значну роль у цих процесах [19]. Для рослинних організмів особливо важливим є фотоперіод - тривалість світлого періоду доби, яка залежить від обертання Землі навколо своєї осі. Фотоперіод варіюється на різних широтах і змінюється протягом року. Під час еволюції рослини адаптувалися до життя в умовах чергування світлого і темного періодів доби. Фотоперіодична реакція рослин - це властивість, яку вони набули, щоб реагувати на цей добовий ритм освітлення (відношення тривалості дня і ночі) [22]. Фотоперіодична реакція виявляється в зміні процесів розвитку та росту рослин, залежно від тривалості світлого періоду. Ця реакція допомагає рослинам адаптуватися до сезонних змін у кліматі, підготовляючись до невідповідного сезону або початку цвітіння. Фактично, довжина дня сприймається рослинами як один з факторів середовища, який стимулює їх до адаптації до змін у природному середовищі [14].

Рослини проявляють різні реакції на зміни у зовнішньому середовищі, адаптуючи свою життєдіяльність відповідно до цих змін. Наприклад, у невеликої квіткової рослини гусимки звичайної (*Arabidopsis thaliana*) початок цвітіння чутливий до фотоперіодичних змін, які спостерігаються протягом різних сезонів [55, 41]. Молекулярно-генетичні дослідження, спрямовані на вивчення часу цвітіння, добових ритмів та світлової сигналізації в *Arabidopsis* sp., підтвердили гіпотезу Бюннінга та розкрили молекулярні основи вимірювання тривалості дня у цього виду [58].

Дослідження також вказують на те, що у режимі тривалого дня (LD, 16 годин світла і 8 годин темряви) початок цвітіння рослини значно прискорюється порівняно з умовами короткого дня (SD, 8 годин світла і 16 годин темряви) [20].

Деякі інші рослини, такі як рис, мають зворотну фотоперіодичну регуляцію цвітіння, це означає, що вони цвітуть раніше в короткі дні, аніж в довгі. Недавно було виявлено кілька генів, які впливають на фотоперіодичну регуляцію часу цвітіння у рису. Ці гени кодують білки, які відомі своєю ролью в опосередковуванні фотоперіодичного контролю цвітіння у *Arabidopsis*, що свідчить про схожі механізми вимірювання тривалості дня в цих двох видів рослин. Проте варто зауважити, що контрастні ефекти фотоперіоду на час цвітіння в арабідопсисі та рисі виникають через різницю в регуляції експресії гена FT (це ген, що впливає на час цвітіння). У арабідопсисі, експресія гена FT активується при співпадінні світла з високим рівнем CO (карбонільного оксиду). У рису, схожі гени FT активуються генотом, подібним до CO, у темряві і пригнічуються світлом, яке сприймається фітохромами [58].

Для розвитку фотоперіодичної реакції основним фактором є певна тривалість світлового дня [31]. Іноді, навіть лише декілька днів з потрібним співвідношенням світла і темряви може спровокувати початок процесу цвітіння (фотоперіодична індукція) [29].

У рослин розрізняють два види фотоперіодичних реакцій: короткоденна - коли реакція відбувається на зменшення тривалості світлового дня, і довгоденна - коли реакція настає при збільшенні тривалості світлового дня. Редис (*Raphanus sativus*) є яскравим прикладом рослини, що виявляє другий тип реакції - він є рослиною довгого дня. Збільшення тривалості світлового дня прискорює його розвиток. Якщо світловий день триває більше 14 годин, це призводить до раннього утворення квітконосних пагонів. Проте, якщо рослина оточена світлом лише 10-12 годин, а решту часу доби - в темряві, то розвиток стебла не настає протягом декількох місяців. Таким чином, редис може тривалий час знаходитися в фазі технічної стиглості при короткому світловому дні [31].

Зміна тривалості світлового дня може впливати на розвиток рослин по-різному. Наприклад, у деяких рослин, таких як хризантеми, сприйняття тривалості дня залежить від абсолютної тривалості темряви, а не від фотоперіодичного ритму світлового періоду. Для розуміння молекулярних механізмів цвітіння у таких рослин проводили молекулярно-генетичні дослідження на диплоїдній дикій хризантемі *Chrysanthemum seticuspe* f. *boreale* (*C. seticuspe*).

У результаті дослідження було виявлено, що ця рослина має облігатну фотоперіодичну реакцію цвітіння, коли цвітіння відбувається при тривалому темному періоді (більше 12 годин) і гальмується при короткому темному періоді (менше 10 годин).

Розвиток озимих, дворічних і багаторічних рослин у життєвому циклі контролюється сезонним ритмом світлового періоду. Зі зменшенням тривалості світлового періоду в клітинах рослин відбуваються біохімічні зміни. Ці зміни призводять до формування захисних структур, накопичення запасних поживних речовин і інгібіторів росту, а також зниження кількості води в клітинах і тканинах. Наприклад, внаслідок цих змін у багаторічних рослин восени відбувається скидання листя [38].

Точно так само, як при зростанні рослин в умовах високої освітленості, тривалість світлового періоду може впливати на варіабельність параметра шляхом збільшення товщини та щільності палісадної тканини та накопиченням крохмалю в листі. Внаслідок проведених досліджень було виявлено, що збільшення фотоперіоду з 16 до 24 годин призвело до зростання величини відношення сухої маси листа до його площі (LMA) на 10% у рослин перцю і огірка, та на 13% у баклажана і томатів [10]. Ці результати підтверджують спостереження, які вказують, що вплив на величину LMA має саме добовий інтеграл освітлення, а не рівень освітленості [44, 60].

Багато злакових культур, що вирощуються в помірних регіонах світу, а також деякі екотипи арабідопсису, мають тенденцію цвітіння швидше в режимі довгого дня, за умови попереднього впливу холоду, яке називається яровизацією. Це забезпечує, що цвітіння відбувається в оптимальних екологічних умовах навесні. Недавні дослідження показали, що взаємодія між фотоперіодичними і температурними сигнальними шляхами у регулюванні часу цвітіння відбувається через антагоністичний вплив генів CO (фактор транскрипції MADS-box) і FLC на експресію флористично-індуктивних генів [58].

Соя - рослина, яка вимагає великої кількості світла для нормального росту. Однак скоростиглі сорти можуть терпіти помірне затінення [30]. Недостатнє освітлення може призводити до витягування стебел, раннього плодоношення, слабкого розвитку кореневої системи та інших проблем, які впливають на якість та кількість урожаю. Наприклад, коли інтенсивність світла зменшується на 50%, кількість вузлів, бобів і насіння на рослинах суттєво зменшується. З іншого боку, при доброму освітленні соя може розвиватися з потужними гіллястими стеблами і багатим листям та бобами [57]. Ця рослина є стійкою до затінення, що дозволяє вирощувати її в змішаних посівах разом з високорослими культурами [2].

Потреба в освітленості різниться в залежності від розвитку рослин: в молодому віці вони більш терпимі до затінення, ніж у більш пізніх стадіях життя, коли затінення може пригнічувати їх ріст. Найбільш чутливими до наявності світла є зернобобові рослини під час формування і дозрівання бобів і насіння. Крім інтенсивності освітлення, тривалість світлового періоду, або співвідношення тривалості дня і ночі, має великий вплив на розвиток рослин [24]. Соя, наприклад, реагує на тривалість світлового періоду, і вона цвіте швидше в умовах короткого дня [30].

Зі збільшенням пізнього посіву сої рослини проводять більше часу в умовах, коли день поступово скорочується, що скорочує тривалість їхньої вегетації. Позитивний вплив невеликого скорочення тривалості дня на продуктивність рослин особливо помітний в літніх (пізніх) посівах. Рослини, які висіваються в звичайні терміни, починають рости і розвиватися на довгому дні, а потім переходять до фази цвітіння в умовах тривалого дня. У пізніх посівах рослини спочатку ростуть на довгому дні, а пізніше, в період формування бутонів і цвітіння, день постійно скорочується. Природне скорочення тривалості дня, так само як і 2-3 коротких дні, які рослини отримують на початковій стадії росту, позитивно впливає на розвиток репродуктивних органів і плодоношення. Тому в літніх посівах насіння мають кращу якість порівняно з весняними. Вони добре розвиваються, менше схильні до бактеріозу, видають дружні сходи. Проте врожайність, через зменшення висоти рослин і кількості міжвузлів, трохи зменшується [4].

У сої різна тривалість світлового періоду впливає на багато аспектів рослинного розвитку, включаючи висоту рослин, розмір міжвузлів, активність цвітіння і формування бобів, тривалість генеративної фази, тривалість вегетації та продуктивність рослин [5].

1.2 Біологічні особливості сої по відношенню до світлових умов вирощування (важливість підбору сортів сої для певної широти культивування).

Для успішного вирощування різних культур, які призначені для харчування або використання як посівний матеріал, необхідний комплекс сприятливих умов, включаючи оптимальну температуру, вологість та, найважливіше, належну освітленість. Варто відзначити, що низька інтенсивність світла або недостатня кількість світла певної довжини хвилі можуть негативно впливати на морфологічні характеристики вирощуваних культур. Сонячне світло є основним джерелом енергії для рослин. Хоча спектральний склад

світла дуже широкий, рослини поглинають світло лише в певних діапазонах довжин хвиль, і ця спектральна чутливість рослин суттєво відрізняється від чутливості людського ока. Спектр світла можна розділити на наступні діапазони:

- Менше 380 нм - ультрафіолетове світло;
- 380-430 нм - фіолетове світло;
- 430-490 нм - синє світло;
- 490-570 нм - зелене світло;
- 570-600 нм - жовте світло;
- 600-700 нм - червоне світло;

Ультрафіолетовий діапазон світла з довжиною хвилі менше 280 нм може мати негативний або навіть шкідливий вплив на рослини, забарвлюючи листя у жовтий або коричневий колір та спричинюючи скручування стебел. Проте в реальних умовах ці промені практично не досягають поверхні землі, оскільки їх поглинає озоновий шар [36].

Зелена область спектра світла, на перший погляд, може здатися не таким важливим для впливу на рослини, оскільки зелене світло легко проходить через листя, і фотосинтез на ньому зазвичай є менш інтенсивним. Проте, варто враховувати, що зелений спектр світла може виконувати інші важливі функції для рослин. Наприклад, синє світло з довжиною хвилі від 430 до 460 нм є необхідним для вегетативного зростання рослин і сприяє зміцненню їх структури, розвитку кореневої системи, стебла та листя [51]. У ранній стадії розвитку рослин синє світло має велике значення, і його відсутність може призвести до витягнутості рослин, формування слабкого стебла з довгими міжвузлями. На цьому етапі росту фотоперіод, тобто тривалість і ритм освітлення, має менше значення, а головне - забезпечити рослинам достатню кількість світла для їхнього розвитку, навіть можливість підсвічувати їх практично цілодобово. Щодо червоного світла, воно важливе для рослин у фазі цвітіння та плодоношення. Червоне світло допомагає стимулювати ріст, розвиток і цвітіння рослин. На природі велика

кількість червоного світла може виникати при затіненні рослин, і це сприяє активному росту і розвитку, а також цвітінню. Фотоперіодизм стає важливим на цій фазі розвитку рослин, і для різних видів рослин він може бути різним, але, в середньому, він зазвичай відповідає періоду від 12 до 16 годин [8].

Фотоперіодична індукція цвітіння, відома як фотоперіодизм, є важливою адаптаційною властивістю рослин, яка визначає їхню здатність переходити до стадії цвітіння лише при певному співвідношенні тривалості світлового дня та ночі. Це дозволяє рослинам цвітіння у найбільш сприятливий час року.

Варто відзначити, що реакція рослин на довжину дня різних видів може бути різною. Короткоденні рослини переходять до цвітіння при тривалості ночі більше 12-14 годин. Важливою для них є саме тривалість темного періоду, а не довжина дня. Це означає, що, навіть якщо в середині темного періоду буде короткий спалах світла, короткоденні рослини не перейдуть до цвітіння.

Прикладами короткоденних рослин є рис, соя, кукурудза, просо, гарбузи, перець, баклажани та багато бобових культур, а також хризантеми. Рослини довгого дня, навпаки, розпочинають цвітіння, коли тривалість дня перевищує 12 годин. До цієї категорії належать хлібні злаки, хрестоцвіті, кріп, конюшина, буряк та морква. Існують також нейтральноденні рослини, які можуть цвітіння при будь-якій довжині дня. Деякі сорти гречки, гороху, бавовнику, а також рослини з широким ареалом та тропічні види відносяться до цієї категорії. У разі вирощування рослин під штучним освітленням вважається, що спектри синього (430-460 нм) і червоного (640-660 нм) світла є оптимальними для більшості видів рослин [35].

Світловий режим вирощування є важливим фактором для отримання врожаю сільськогосподарських культур, включаючи сою. Соя відноситься до культур, які вимагають короткого світлового дня, і дуже чутлива до змін

тривалості освітлення. Навіть невелика зміна освітленості, така як місячне світло з низькою інтенсивністю ($1/465000$ сонячного освітлення), може вплинути на цвітіння сої [25]. Ця чутливість до змін в освітленості стає помітною вже після розвитку перших листків рослини і особливо в період від утворення достатньої листкової поверхні до завершення цвітіння. У цей період рослина активно росте, і поживні речовини в основному спрямовані на формування насіння. Дослідження показали, що короткий день особливо впливає на скорочення вегетативного періоду росту сої, від моменту утворення першого трійчастого листка до гілкування, коли формується листкова поверхня рослини. Вплив тривалості дня під час бутонізації і далі вже менше помітний [16].

Соя - рослина, яка дуже чутлива до тривалості світлового дня, і може залишатися в стані вегетативного росту при безперервному освітленні або при досить довгому дні тривалістю від 15 до 17 годин. Ця реакція на тривалість дня може варіювати в залежності від сорту і його генетичного походження. Чим північніше ріст сорту і довший день, при якому сорт сформувався, тим менше він чутливий до зміни тривалості дня [12, 13].

Соя є однією з основних бобових культур, і важливим фактором її адаптації до різних регіонів є чутливість до тривалості світлового дня [34, 35]. Вчені зазначають, що соя дуже реагує на зміни у тривалості світлового дня та інтенсивності освітлення. Збільшення тривалості світлового дня може сповільнити розвиток рослин, відсунути терміни цвітіння, спричинити обпадання квітів і подовжити період вегетації. Навпаки, скорочення світлового дня може прискорити цвітіння і скоротити вегетаційний період. Для більшості сортів сої оптимальна тривалість світлового дня знаходиться в діапазоні від 13 до 16 годин. Цей діапазон відповідає приблизно широтам від 35 до 45 градусів північної широти. Важливо відзначити, що оптимальна тривалість світлового дня може варіюватися для різних сортів сої в залежності від їхніх вегетаційних характеристик і походження.

Загалом, чим північніше сорт походження і чим довший день був під час його формування, тим менше він чутливий до зміни тривалості світлового дня. Деякі сорти, які мають слабку реакцію на довжину дня, називають нейтральними. Ці різниці в адаптації до світлового режиму допомагають сортам сої успішно рости в різних кліматичних умовах [1].

Так, якщо соя вирощується в регіонах з тривалим днем, то це може призвести до дуже довгого періоду вегетації та затягнути початок цвітіння. В таких умовах рослини накопичують значну вегетативну масу і сповільнюють фізіологічні процеси, такі як формування бутонів та цвітіння [16, 25]. Однак, якщо ті ж сорти сої вирощувати в умовах короткого дня, то майже всі рослини будуть дозрівати значно швидше, приблизно за 70 -130 днів. Це свідчить про значний вплив тривалості світлового дня на фази розвитку рослин сої та їхню продуктивність [33].

Так, сорти сої, які походять з помірних регіонів і вирощуються в більш низьких широтах, можуть дозрівати раніше, але при цьому мати низьку врожайність зерна. Китайські дослідники проводили дослідження, спрямовані на введення ознак рослин довгого дня у сою з метою подовження вегетативної фази та покращення врожайності в умовах короткого дня. Це дозволило розширити можливості вирощування сої в тропічних регіонах, де зазвичай короткий день може негативно впливати на продуктивність цієї культури [57].

Дослідження бразильських учених, спрямовані на вивчення можливості пришвидшення росту рослин сої в умовах короткого дня, є важливими для розвитку цієї культури в тропічних регіонах. Вони виявили, що тривалий період росту (LJP), характерний для сортів сої, може затримувати цвітіння в умовах короткого дня. Ця ознака може бути корисною для збільшення діапазону адаптації сої до низьких широт, дозволяючи більш гнучко вибирати час сівби на одній і тій же широті [53].

Вирощування сої завжди було важливою галуззю сільськогосподарського виробництва. Головною метою селекції у сої було збільшення продуктивності нових сортів. Проте важливо враховувати, що продуктивність цієї культури залежить від багатьох факторів, таких як тривалість вегетаційного періоду, стійкість до стресів, захист від патогенів та інші. Однак продуктивність це лише один із аспектів. Покращення інших якісних характеристик сої також має важливе значення для покращення врожайності та адаптації до різних умов вирощування [7].

Селекція сої для різних ґрунтово-кліматичних умов грає важливу роль у вирощуванні цієї культури. Різні сорти та форми сої можуть бути більш адаптованими до певних умов вирощування, таких як холодостійкість, посухостійкість, тривалість світлового дня і вегетаційного періоду. Ця селекція дозволяє фермерам вирощувати сою в різних регіонах та умовах і забезпечує врожайність і якість продукції [37].

Так, соя є світлолюбною рослиною і довжина дня грає важливу роль у її розвитку та вегетаційному періоді. Умови короткого дня сприяють прискоренню цвітіння та скороченню вегетаційного періоду, що може мати важливе значення для вирощування сої в певних регіонах. Вплив довжини дня на рослини є одним із факторів, що впливають на їхню адаптацію до конкретних умов у різних широтах і кліматичних зонах [11].

Так, вплив довжини дня на розвиток сої та інших рослин стає помітним після появи листя, коли вони переходять у фазу росту і розвитку, а також особливо важливим стає під час цвітіння та формування насіння. Рослини в цей період активно використовують світло для фотосинтезу і накопичення поживних речовин, що визначають якість і врожайність. Тривалість дня і освітленість стають критичними факторами для формування врожаю в цей період росту [14].

Фотоперіодична реакція сортів сої дійсно залежить від їх тривалості вегетаційного періоду та генетичних особливостей, які виникають в результаті еволюції в різних кліматичних умовах. Сорти з коротким тривалості вегетаційного періоду частіше виявляють меншу чутливість до зміни довжини дня, оскільки вони вже пристосовані до росту в умовах короткого літа або короткого дня. Сорти, які формувалися в більш північних широтах з більш тривалим літом, мають схильність до більшої чутливості до зміни тривалості дня. Це може бути пов'язано з тим, що в їхніх природних умовах літо триває довше, і вони мають більше часу для вегетації та розвитку [28].

Різні гени у сої, такі як гени E-серії (E1, E2, E3, E4, E5, E7 і E8), впливають на реакцію рослин на тривалість фотоперіоду [36]. Зокрема, деякі з цих генів детермінують чутливість рослин до дня і ночі, що впливає на тривалість їхнього росту та цвітіння. Такі дослідження допомагають зрозуміти, як фотоперіод впливає на розвиток сої та регулюється конкретними генами.

Вивчення впливу генів на ріст і розвиток сої важливе для подальшої селекційної роботи та вдосконалення сортів. Майже ізогенні лінії (NILs), створені на основі сортів Clark і Harosoy, є корисним інструментом для таких досліджень, оскільки вони дозволяють вивчити вплив окремих генів на розвиток рослини, уникнувши при цьому впливу інших факторів. Це сприяє більш точному розумінню ролі конкретних генів у формуванні врожаю та росту сої.

Результати досліджень в культурі *in vitro* можуть допомогти розкрити нові функціональні зв'язки та розуміння генетичної регуляції росту і розвитку на більш детальному рівні. Ці дослідження можуть виявити нові аспекти та механізми впливу генів есерів на клітинну і молекулярну рівні, які можуть

бути невидимими на рівні організму. Це важливий крок для розвитку наших знань про фізіологію і розвиток рослин та може мати практичні застосування в агрономії і селекційній роботі для поліпшення сортів сої [9].

1.3. Взаємозв'язок фотоперіодичної реакції та інших факторів зовнішнього середовища

Різноманітні зовнішні умови впливають на біологічні процеси росту та розвитку сої, включаючи якість та склад її насіння.

Після початку цвітіння, природний режим світла та темряви стає ключовим фактором у формуванні та розвитку насіння сої. Зміни в тривалості світлового дня та ночі можуть впливати на фізіологічні та біохімічні процеси, такі як синтез та накопичення білків і азоту в насінні. Вивчення зв'язку між фотоперіодом і характеристиками насіння сої може розкрити важливі адаптаційні стратегії цієї рослини [49].

Чутливість сої до фотоперіоду може змінюватися в залежності від сорту та генетичних характеристик. Деякі сорти можуть бути більш вразливими до змін тривалості світлового дня і ночі, що може впливати на їхню здатність акумулювати азот та синтезувати білки. Аналіз зв'язку між чутливістю до фотоперіоду і вмістом азоту та білків у насінні допоможе визначити, які сорти сої можуть бути оптимальними для конкретних кліматичних умов [45].

Також досліджується взаємозв'язок фотоперіодичної реакції з іншими факторами зовнішнього середовища, такими як температура, вологість, ґрунтові умови та доступність мікроелементів [46]. Усі ці чинники можуть впливати на процеси фіксації азоту та синтез білків у сої, і їх детальний

аналіз сприятиме кращому розумінню складних взаємодій у зовнішньому середовищі рослин.

Температура відіграє важливу роль у фотоперіодичній реакції сої і може бути вирішальним фактором в зовнішньому середовищі рослини. Висока і низька температура можуть мати суттєвий вплив на цей процес. Наприклад, низькі температури можуть сповільнити або призупинити ріст та розвиток сої, що може зробити фотоперіодичну реакцію менш ефективною [57]. Це особливо актуально в умовах вирощування сої в північних регіонах з холодними весняними та осінніми періодами.

З іншого боку, високі температури також можуть впливати на фотоперіодичну реакцію. Занадто висока температура може створювати стрес для рослин, змінювати їхню фотоперіодичну чутливість та впливати на цвітіння та формування плодів. Враховуючи це, контроль температури під час вирощування сої є важливим аспектом для досягнення оптимальних урожаїв та якісного насіння [50].

Вологість ґрунту і світловий режим є ще двома важливими факторами, які впливають на фотоперіодичну реакцію сої. Вологість ґрунту може впливати на доступність води для рослин і їх здатність до фотосинтезу. Це, в свою чергу, може впливати на ріст і розвиток сої, а також на її фотоперіодичну реакцію.

Світловий режим також є критичним фактором. Зміни в кількості світла, доступного рослинам, можуть впливати на їхню фотоперіодичну чутливість і швидкість фотосинтезу. Це може визначати час цвітіння та інші аспекти росту сої [51]. Враховуючи ці фактори, оптимальне управління вологою та освітленням стає важливими аспектами в вирощуванні сої для досягнення найкращих результатів у виробництві насіння та урожаю.

Крім температури, вологості ґрунту та світлового режиму, існують інші фактори зовнішнього середовища, які можуть впливати на фотоперіодичну реакцію сої. Наприклад, атмосферні умови, якість ґрунту, наявність поживних речовин і інші фактори можуть грати важливу роль у регулюванні цього процесу.

Взаємодія цих різноманітних факторів в складному екосистемному контексті дійсно робить розуміння фотоперіодичної реакції сої великою викликаючою задачею. Однак дослідження впливу зовнішнього середовища на цей процес є важливим для розуміння та покращення вирощування сої та забезпечення її високого врожаю [42]. Враховуючи всі ці фактори, можна розробити оптимальні стратегії вирощування сої, які дозволять досягти найкращих результатів у виробництві насіння та урожаю в різних екологічних умовах.

1.4. Вплив умов вирощування та сортових відмінностей на склад запасних речовин у насінні сої.

Оптимальний баланс між розмірами листя та світловим режимом грає вирішальну роль у врожайності культур. Збільшення розмірів листя може вплинути на зменшення доступу світла до нижніх шарів рослини та призвести до зниження фотосинтезу і, в результаті, до недостатньої продуктивності.

Соя, завдяки своїй здатності до азотфіксації, є важливою культурою для збагачення ґрунту азотом та поліпшення його структури. Поєднання фотосинтезу та біологічної фіксації азоту дійсно забезпечує синтез цінних органічних речовин у рослині. Це робить сою цінною культурою як для харчової, так і для сільськогосподарської промисловості [34].

Роль якості насіння в отриманні гарних сходів та підвищенні врожайності незаперечна і має велике значення. Високоякісні на всіх показниках насіння становлять основу для досягнення високої продуктивності в посівах сої. Таким чином, головним завданням у сфері насінництва є

отримання насіння з високими врожайними та посівними характеристиками [26].

Насіння з округлою формою мають найбільшу природну вагу. Розмір насіння є важливою характеристикою соєвого насіння, і чим воно більше, тим більше міститься ендосперму відносно оболонки. Розмір насіння визначається його лінійними розмірами: довжиною, шириною і товщиною. Велике та добре нарощене насіння призводить до вищого вихіду продукції. Одним із специфічних показників розміру є маса 1000 насінин, яка для сої знаходиться в діапазоні від 120 до 200 г [17].

Хімічний склад соєвого насіння відрізняється сприятливим поєднанням різних компонентів, включаючи протеїн і жир, а також наявність біологічно активних речовин. У складі насіння сої міститься фосфатиди (2,5%), різноманітні вітаміни (А, В, D, Е, F, К та інші), легкозасвоювані мінеральні солі (Са, К, Mg, Р, Fe) та вуглеводи у кількості від 20% до 32%. Важливо відзначити, що вміст вітаміну В у соєвому насінні тривільно перевищує вміст цього вітаміну в сухому коров'ячому молоці. Паростки та насіння овочевих сортів сої багаті на вітамін С. Крім того, за кількістю лізину білок у соєвому насінні не поступається сухому молоку та курячому яйцю. Висока розчинність соєвого альбуміну в воді (до 94%) робить його легкозасвоюваною для людей і цінним кормом для тварин та птиці [27].

Вплив пропорцій жирних кислот, білка та вуглеводів у насінні сої (Glycine max) на його цінність і контроль над їх накопиченням вже досить детально вивчений фахівцями по всьому світу [49, 59, 18]. Молекулярні спроби змінити співвідношення жирних кислот і білка викликали лише частковий успіх у випадку споріднених бобових культур [26]. Це, в певній мірі, відображає складність метаболічних зв'язків [47] і нез'ясовану залежність між складом насіння та його метаболізмом. Один із способів полегшити вивчення метаболічних зв'язків насіння - це вирощування ембріонів in

vitro. Відсутність судинного зв'язку між насіннєвою оболонкою та ембріоном [34] означає, що перенесення субстратів з рослини на ембріон відбувається через апопласт. Дослідження насіння сої [49, 29] і порівняння між ембріонами льону (зелені) і сафлору (незелені) [26] призвели до висновку, що світло може відігравати важливу роль у забезпеченні вільної енергії, як ресурсу, регенеруючого агента та/або джерела кисню.

Науковими дослідженнями був вивчений вплив світла на ріст зародків сої та його важливу роль у їхньому метаболізмі. В результаті були визначені рівні освітленості, які досягають ембріони у природних умовах, і проведений докладний аналіз окислювально-відновного балансу та енергетичного обліку вирощування рослинних ембріонів. В рамках досліджень були здійснені численні експерименти, включаючи маркування і прямі вимірювання потоків, з метою кращого розуміння метаболізму зелених ембріонів [56]. Отримані результати вказують на наступне: а) соя в процесі розвитку використовує низький, але значущий рівень світла, який має сильний вплив на ріст; б) світло важливо для виробництва АТФ, але не є єдиним джерелом електронів для відновних процесів; в) цей світловий потік сприяє підвищенню ефективності перетворення вуглецю (CCE) і вносить значний внесок у утворення 3-фосфогліцерату (PGA) та синтез жирних кислот сої, переважаючи за внеском амінокислоти в порівнянні з іншими олійними культурами, які були вивчені до цього часу [46]. Вторинні метаболіти, які входять до групи природних фітоестрогенів, отримали назву ізофлавоїни. Вони майже виключно синтезуються рослинами з родини Leguminosae і відіграють важливу роль в ризосфері рослин [41].

Соя є одним із важливих природних джерел ізофлавоїнів. У сої ізофлавоїни переважно містяться у вигляді глікозидів, зокрема β -глюкозидів, малонілглюкозидів і ацетилглюкозидів. Два основних ізофлавоїни, які містяться в сої, це даїдзин і геністин [27]. Вивчення ізофлавоїнів в сої

привертає увагу дослідників вже протягом деякого часу. Один із дослідків включав порівняння складу та вмісту ізофлавонів у сім'ядлі, гіпокотилі та коренях 17 сортів паростків сої, вирощених у темних та світлих умовах. Загальна середня концентрація ізофлавону в цих сортах становила 2167 мкг/г (зелений паросток) і 2538 мкг/г (жовтий паросток) у сім'ядолях, 1169 мкг/г (зелений паросток) і 1132 мкг/г (жовтий паросток) у гіпокотиліях і 2399 мкг/г (зелений паросток) та 2852 мкг/г (жовтий паросток) у коренях. Цей дослід не показав суттєвих відмінностей у загальній концентрації ізофлавону між зеленими та жовтими паростками. Проте виявлені суттєві різниці в загальних кількостях ізофлавону між трьома органами рослини. Коріння виявили найвищі загальні концентрації ізофлавонів, за ними йшли сім'ядла і гіпокотилі. Загальна концентрація даїдзину в зелених (775 мкг/г) і жовтих (897 мкг/г) паростках була більше ніж в 4 рази вищою, ніж у насінні (187 мкг/г). Найвищі загальні концентрації геністину (1122 мкг/г) були виявлені у жовтих паростках, в той час як у зелених (155 мкг/г) і жовтих (155 мкг/г) паростках була загальна концентрація гліцитину. У сім'ядлах зелених і жовтих паростків геністин, даїдзен і гліцитин складали відповідно 67%, більше 28% і менше 4% від загальної кількості ізофлавонів. У гіпокотиліях загальний даїдзин становив більше 45% від загальної кількості ізофлавонів, а загальний гліцитин був вищим, ніж у сім'ядлах і коренях. Концентрації малонілглікозидів були найвищими в сім'ядлах, тоді як глікозиди найвищі в гіпокотиліях і коренях. Високий рівень накопичення ізофлавонів у коренях може пояснюватися їхньою функцією як сигнальних молекул в індукції генів мікроорганізмів [54].

Ранні сорти сої зазвичай мають менше жиру та більше білка, середньостиглі сорти характеризуються вищим вмістом жиру, а пізні сорти мають менше білка. Існує виразна зворотна залежність між вмістом білка та кількістю жиру. Сорти сої з білими квітами зазвичай містять більше жиру, ніж ті, що мають фіолетові квіти, і навпаки, відносно білка [24].

На основі проведених досліджень було встановлено, що вміст білку, жирів і вуглеводів у насінні сої визначається місцем їх формування на материнській рослині. Вміст білка в насінні зростає від нижнього ярусу до верхнього, тоді як вміст жирів і вуглеводів показує зворотну залежність, збільшуючись від верхнього ярусу до нижнього. Ця закономірність також спостерігається у вмісті білка в насінні головного стебла і бічних гілок рослини, з найвищим вмістом білка в насінні бічних гілок. Крім того, хімічний склад насіння сої змінюється не лише через сортові та видові особливості, але також внаслідок ступеня зрілості насіння, ґрунтово-кліматичних умов і агротехнічних методів обробки культури [23].

Багато відомих високобілкових сортів сої зазвичай мають менші врожаї насіння. Рідко, високобілкові сорти можуть демонструвати підвищену врожайність. Щоб покращити результати селекції, важливо розуміти механізми збільшення відносної частки білка в насінні і використовувати ті механізми, які не мають негативного впливу на урожайність. У середньому, насіння сої містить приблизно 40% білка і 20% масла, а решта 40% складається з вуглеводів і зольних речовин [3]. Ця розподіленість компонентів дозволяє сформулювати чотири динамічні моделі для збільшення вмісту білка в насінні: шляхом зміни екологічних умов під час наливу насіння, збільшення вмісту білка, зниження вмісту олії та зменшення вмісту вуглеводів і золи.

Накопичення запасних білків в насінні сої розпочинається на 10-15 днів раніше, ніж накопичення жирних кислот [21]. Отже, в умовах посухи або короткого дня, коли період наливу насіння скорочується, тканини сім'ядолей мають достатньо часу для накопичення білка, але не завжди встигають накопичити достатньо масла. Це призводить до формування насіння з підвищеним вмістом білка і зі зниженим вмістом масла. У випадку надмірних опадів або зрошення, а також у довго денних умовах, процес накопичення олії, зазвичай, завершується повністю, формуючи

насіння з близькими до типових для культури співвідношеннями білка та олії (40:20).

Багато вчених з усього світу проводили численні дослідження, присвячені селекції високоврожайних сортів сої з підвищеним вмістом білка в насінні. Проте, в більшості випадків спостерігалася негативна кореляція між цими двома характеристиками. Тим не менше, час від часу з'являються дослідження, які вказують на послаблення або повну відсутність негативного зв'язку між цими параметрами, що відкриває можливість створення високобілкових сортів сої з врожайністю, що не поступається продуктивності звичайних сортів [21, 23].

Зараз у літературі практично немає даних щодо вивчення можливої ролі генів EE у сої у регулюванні фізіологічно-біохімічних процесів. Тим не менше, такі дані є важливими для розширення наших знань про генетичний контроль росту і розвитку рослин та їхні біохімічні механізми [18].

1.5. Поліморфізм за локусами, асоційованими з генами E

Гени, що належать до локусу E, грають важливу роль у регуляції фотоперіодичної реакції та фенологічних подій у рослинах. Вони визначають, як рослини реагують на зміни тривалості світлового дня та ночі після цвітіння. Генетична різноманітність у генах E може призводити до різних типів фотоперіодичних відповідей у різних сортів і видів рослин.

Дослідження поліморфізму в генах E дозволяє встановити зв'язок між генетичною різноманітністю рослин та їхніми реакціями на зміни природного фотоперіоду. Це може мати важливі практичні застосування в сільському господарстві, де розуміння генетичних особливостей рослин може допомогти вибирати сорти та лінії, які найкраще адаптовані до конкретних кліматичних умов і дають найкращі врожаї. Такі дослідження також можуть бути корисними в біологічних дослідженнях для кращого

розуміння механізмів, що лежать в основі фотоперіодичної реакції рослин [54].

Гени E у рослинах також відіграють свою роль у регуляції відповіді на зміни фотоперіоду, зокрема, тривалості світлового дня та ночі. Ці гени кодують фотоперіодичних рецепторів, які сприймають сигнали про освітленість та регулюють вираження інших генів, що контролюють фенологічні події в рослин.

У залежності від генетичного складу рослини та її фотоперіодичної чутливості, гени E можуть визначати, коли рослина переходить у різні фази розвитку, такі як цвітіння, дозрівання насіння, а також інші фенологічні події. Розуміння функції та регуляції генів E важливо не тільки для фундаментального наукового дослідження, але і для сільськогосподарської практики, оскільки дозволяє вибирати та вирощувати рослини залежно від кліматичних умов та цілей виробництва [55].

Поліморфізм за локусами, асоційованими з генами E, є важливим для розуміння генетичної різноманітності в рослинах сої. Цей поліморфізм може включати в себе різні типи генетичних змін, такі як зміни у послідовності генів (точкові мутації), дуплікації генів, делеції, інверсії, транслокації та інші структурні варіанти.

Ці генетичні зміни можуть мати важливий вплив на фотоперіодичну реакцію та фенотип рослин. Наприклад, точкові мутації можуть змінювати функцію фотоперіодичних рецепторів або інших генів, які регулюють фотоперіодичну відповідь [58]. Дуплікація генів може призводити до збільшення кількості функціональних копій гена та підвищення вираження функції. Інші структурні варіанти можуть впливати на регуляцію фотоперіоду та різноманітність фенотипів у рослин.

Дослідження цього генетичного поліморфізму допомагає краще розуміти генетичну основу різноманітності у фотоперіодичних відповідях та фенотипах рослин сої. Це може бути важливим для вибору та розробки сортів, які найкраще адаптовані до конкретних умов вирощування та для покращення виробництва сої в різних регіонах і кліматичних умовах [49].

Дослідження поліморфізму генів E дозволяє розкрити не тільки зв'язок між генетичною різноманітністю рослин сої а і реакції на зміни фотоперіоду після цвітіння. Поліморфізм у цих генах може впливати на чутливість рослин до змін фотоперіоду і визначати час цвітіння та розмноження.

Для дослідження поліморфізму генів E в рослинах сої можна використовувати різноманітні молекулярно-генетичні методи. Наприклад, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) може бути використана для ампліфікації та аналізу конкретних регіонів генів E з різних геномів рослин. Секвенування геномів дозволяє визначити послідовність цих генів та виявити точкові мутації чи інші генетичні зміни. Аналіз генів за допомогою методів, таких як РНК-секвенування (RNA-seq), може вказати, як поліморфізм впливає на рівень та час вираження цих генів [50].

Ці дослідження допомагають краще зрозуміти генетичну основу фотоперіодичних відповідей у сої та можуть бути корисними для вибору та розробки сортів, які найкраще адаптовані до конкретних умов вирощування.

Це дійсно важливий крок у розумінні впливу генетичної різноманітності на фотоперіодичну відповідь та фенотип рослин. Інформація, яка набувається під час таких досліджень, може бути вельми корисною для селекції та вирощування сої з максимальним врожаєм та адаптованою до змін у кліматі та фотоперіоді. Розуміння різноманітності генетичних варіантів, які впливають на фотоперіодичну реакцію, дозволяє селекціонерам та

фермерам вибирати та розвивати сорти сої, які найкраще пристосовані до конкретних регіонів і кліматичних умов. Це може покращити врожайність та стійкість рослин до змін у природних умовах, що є важливим фактором в сільському господарстві в умовах зміни клімату.

Дослідження поліморфізму в генах Е у сої має велике практичне значення і може сприяти покращенню сортів та вирощуванню цієї важливої культури.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для проведення досліду була вибрана соя як об'єкт дослідження. Використовувалися рослини ізогенні за генами Е лінії сої (*Glycine max*) у лабораторії фізіології рослин ХНУ ім. В. Н. Каразіна. Рослини були вирощені при двох різних режимах освітлення: 16 годин на світлі та 9 годин у темряві.

Залежно від реакції на фотоперіод, сорти рослин були класифіковані на наступні групи:

- КДР - це рослини короткого дня, чия фотоперіодична реакція відбувається, коли фотоперіод коротший, ніж критична довжина дня (КДД);
- Нейтральноденні рослини (ФПН) цвітуть незалежно від тривалості фотоперіоду.

У нашому експерименті використовувалися рослини короткого дня та нейтральноденні рослини.

Таблиця 1. Лінії сої, що були використані у дослідженні та їх кодування за номером у експерименті

насіння 2020 року	КД (9 годин)	ДД (16 годин)
КДР сорт Clark	11	12
КД 4	13	14
ФПН 5	15	16
ФПН 7	17	18
КДР 9	19	20

Точне визначення вмісту білка та олії в насінні сої відіграє важливу роль у розвитку проростання та вегетації рослин. Запровадження швидкого, економічного та точного методу для оцінки білка та олії дозволило б оцінити багато різних генотипів і сприяло б розвитку досліджень у цій сфері. На сьогодні існує п'ять різних методів для визначення вмісту білка або олії в насінні сої, а саме: вимірювання щільності насіння (CSD),

визначення питомої ваги (CSG), використання ядерно-магнітного резонансу (NMR), метод К'ельдаля (Kj) та екстракція розчинником (SE).

Для вивчення впливу фотоперіоду на вміст азоту та білків у насінні сої були використані наступні фізіолого-біохімічні методи дослідження:

2.1. Визначення загального азоту за К'ельдалем.

Метод базується на тому, що при нагріванні в концентрованій сірчаній кислоті органічні речовини окислюються до вуглекислоти, при цьому азот вивільняється у формі аміаку, який потім зв'язується з сірчаною кислотою, утворюючи сірчаноокислий амід. З отриманої сполуки аміак вивільняється, додаючи концентрований луг для нейтралізації сірчаної кислоти. Кількість азоту визначається на основі кількості нейтралізованої кислоти.

Для прискорення процесу окислення в колбу додається 20 мг суміші $K_2SO_4:CuSO_4$ у пропорції 3:1. Потім додається 2 мл концентрованої H_2SO_4 , і колбу розміщують у нахилі на пісчану баню під витяжну шафу. Після появи жовто-зеленого забарвлення додається H_2O_2 як подальший каталізатор. Після обробки суміші в колбу додається 3 мл води і кип'ятять протягом 10 хвилин для розкладення надлишку пероксиду водню. Потім колбу охолоджують і переносять в апарат для відгонки аміаку.

Відгонка аміаку відбувається наступним чином: загальний об'єм рідини, включаючи досліджуваний матеріал та воду, становить 10 мл. Потім до колби додається 40 г 40% NaOH. Об'єм лугу визначається шляхом титрування з використанням 2 мл концентрованої сульфатної лугу. У нову колбу додається 2 мл H_2SO_4 та 50 мл води, а також індикатор метил-рот, і додається 40% NaOH до зміни кольору індикатора.

Після цього до нової колби додається 30 мл 0,02 Н розчину H_2SO_4 з використанням бюретки, а також кілька крапель метил-роту. Кінець трубки, пов'язаний з холодильником, занурюють у кислоту та пускають у відгоночну колбу пар. Відгонка триває 5 хвилин.

Кількість зв'язаного аміаку визначається на основі титрування 0,02 Н розчину H_2SO_4 з урахуванням коефіцієнта 0,28 мл азоту на кожні 1 мл

кислоти. Шляхом множення кількості мілілітрів кислоти, зв'язаних аміаком, на цей коефіцієнт визначається кількість азоту в дослідному матеріалі.

Для перевірки точності титрування було взято 10 мл 0,02 Н розчину H_2SO_4 і проведено титрування 0,02 Н розчином NaOH .

2.2. Визначення вмісту білка за Лоурі у модифікації Міллера.

Метод поєднує реакції іонів міді з пептидними зв'язками у лужних умовах (проба Біуре) з окисненням залишків ароматичних білків. Метод Лоурі ґрунтується на взаємодії утвореного при окисненні пептидних зв'язків іону міді (Cu^+), який реагує з реактивом Фолін – Чіокальтеу (суміш фосфовольфрамової та фосфомолібденової кислот в реакції Фоліна – Чіокальтеу). Механізм цієї реакції ще не в повній мірі розглянутий, проте він передбачає відновлення реагенту Фолін – Чіокальтеу та окиснення ароматичних залишків, головним чином триптофану, а також тирозину. Ця реакція призводить до утворення інтенсивно синього сполуку, відомої як гетерополімолібден синій. Концентрацію відновленого фолінового реагенту (гетерополімолібден синій) визначають за поглибленням світла при довжині хвилі 660 нм. За цим показником можна визначити загальну концентрацію білка у зразку, враховуючи концентрацію залишків триптофану та тирозину, які взаємодіють з реагентом Фолін – Чіокальтеу.

Було проведено експеримент з п'ятьма варіантами:

Варіант «А»: 10% Na_2CO_3 в 0,5 Н розчині NaOH (10 г Na_2CO_3 на магнітній мішалці в 100 мл 0,5 Н розчині NaOH).

Варіант «В»: розчин 0,5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1% розчині.

У колбі на 25 мл: 0,5 г солі + 20 мл води, в колбі на 25 мл 0,25 г CuSO_4 + 20 мл води.

Варіант «С»: 10 мл суміші варіанту «В» та 100 мл суміші варіанту «А». Зберігали до 10 днів у пластиковій тарі.

Варіант «Е»: 0,165-0,168 Н розчину Фоліна (1Н розчин розбавити водою у пропорції 1:5).

1,45 (за формулою $V1C1=V2C2$) Для 500 мл розчину було розраховано внесену кількість розчину Фоліна 344,8 мл.

2.3. Дослідження фракційного складу запасних білків насіння шляхом гель-електрофорезу в поліакрилатному гелі.

Електрофорез білків, як метод дослідження генетичних маркерів, властивостей і ознак рослин, знаходить широке використання при аналізі початкового матеріалу. Вивчення складу білка в розвитку рослинних організмів допомагає розкрити механізми регулювання їх росту та розвитку.

Принцип цього методу полягає у виявленні молекул з різними зарядами, і визначення коефіцієнта їх руху використовується для характеристики речовин. Під впливом електричного поля заряджені частки переміщуються до анода або катода в залежності від їх сумарного заряду. Швидкість руху часток залежить від напруги електричного поля, у якому вони перебувають, і від ряду їх характеристик, таких як величина сумарного заряду, маса, розмір і форма. Електрофоретичний розподіл речовин може проводитися як у рідині, так і в середовищі, яке утворює капілярну структуру. Використання останнього способу має перевагу в зниженні конвекції, що забезпечує більшу стабільність зон після розділення макромолекул. Поліакриламід є гідрофільною речовиною, і процес полімеризації цього полімеру каталізується термо- та фотокаталітичним шляхом з метою забезпечення наявності вільних радикалів, необхідних для полімеризації.

Для фотокаталізу використовується рибофлавін, який за наявності слідів кисню та під впливом світла руйнується, утворюючи вільні радикали.

Для підготовки реактивів для буферної системи і геля із 7%-й концентрації використовують наступні рецептури:

- 1 Н розчин HCl у кількості 48 мл, Трис у масі 36,6 г, ТЕМЕД у масі 0,23 г, після чого доводиться об'єм водою до 100 мл.
- Для приготування робочих розчинів дрібнопористого гелю: персульфат у масі 0,14 г розчиняють у воді до об'єму 100 мл.

2.4 Пошук сіквенсів Е генів сої у біоінформаційних базах, та їх гомологів через NCBI BLAST

NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) є найпоширенішим інструментом для пошуку генетичних послідовностей. Цей інструмент можна використовувати для порівняння відомої послідовності гена Е з геномом сої, а також для інших рослин, які містяться в базі даних NCBI GenBank [58].

Ген Е є ключовим геном у біології рослин, що кодує ендонуклеазу. Бере участь у різних біологічних процесах, таких як репарація та рекомбінація ДНК. Ген Е також відомий своєю функцією в системах захисту рослин від патогенів.

Ген Е відіграє важливу роль у забезпеченні стабільності генів рослин, а також бере участь у відновленні пошкоджень ДНК. Це також впливає на взаємодію з іншими генами та біологічними системами. Ідентифікація гена Е та його гомологів у геномі рослин може мати важливе значення для розуміння молекулярних механізмів, що лежать в основі фізіології рослин та їх реакції на стрес [48].

Після вибору додаткових параметрів на основі даних NCBI BLAST буде запущено з наступними параметрами:

- Вибір алгоритму BLAST, наприклад, BLASTn для нуклеотидних послідовностей.
- Налаштування параметрів пошуку, таких як словники, пороги значущості та інші налаштування.
- Встановлення обмежень на обсяги даних та кількість результатів.

Після завершення пошуку NCBI BLAST надасть нам результати, що містять інформацію про подібність між послідовністю гена Е та геномами рослин. Ці результати можуть бути проаналізовані для визначення наявності гомології та ступеня їх схожості [60].

2.5 Пошук поліморфізмів за локусами, асоційованими з генами Е

Щоб виконати пошук поліморфізмів (варіантів генетичних послідовностей) асоційованих з генами E, зазвичай потрібні наступні кроки.

Визначте, які гени нас цікавлять. Необхідно знати їхні ідентифікатори чи назви. Потрібно зібрати послідовності цих генів. Їх можна отримати з баз даних геномних послідовностей, таких як GenBank, Ensembl чи NCBI. Можливість використовувати програмне забезпечення для аналізу генетичних послідовностей, таке як BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), для пошуку подібних послідовностей [51].

Пошук поліморфізмів можна отримати за допомогою програмного забезпечення для аналізу послідовностей, наприклад NCBI dbSNP (Single Nucleotide Polymorphism Database), або програм, які визначають потужність поліморфізмів, таких як алелі, гомозиготи, гетерозиготності. Проаналізувати результати та визначити, які поліморфізми пов'язані з генами E. Це може включати виявлення змін у послідовності ДНК, таких як одонуклеотидні поліморфізми (SNP), вставки, видалені гени та інші варіанти [52].

Додатково також можна використовувати біоінформатичні інструменти для визначення можливих функціональних наслідків цих поліморфізмів та їх впливу на фенотип.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Акумуляція запасних білків у насінні сої розпочинається за 10-15 днів до початку накопичення жирних кислот [21]. Тому в умовах посушливості або при надмірному короткому дні, коли період наливу насіння помітно скорочується, запасні тканини сім'ядолей, зазвичай, мають можливість накопичити білок, але не завжди встигають накопичити масло, що призводить до формування насіння з високим вмістом білка і недостатнім вмістом масла. У випадку збільшення опадів або зрошування, а також при тривалому дні, процеси накопичення масла, зазвичай, завершуються повністю, формуючи більш типові співвідношення білка і олії в насінні (40:20). Результати дослідження вмісту олії в насінні сої у ізогенних лініях з генами E, вирощених в умовах короткого фотоперіоду (9 год) і тривалого фотоперіоду (16 годин), наведені на рисунку 1.

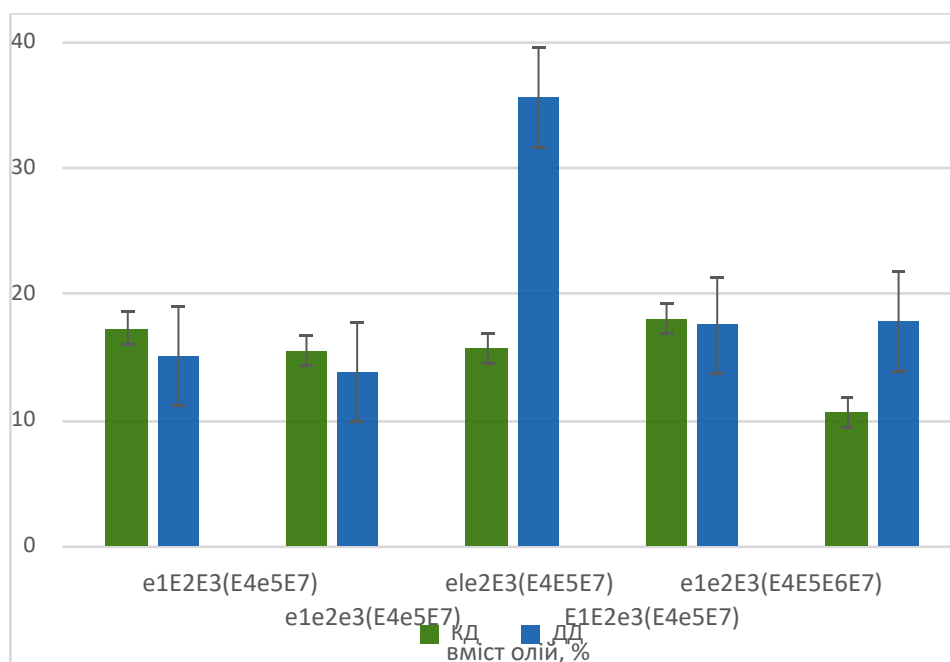


Рис 1. Вміст олії у насінні ізогенних ліній сої за генами E вирощених в умовах короткого фотоперіоду (9 год), та довгого фотоперіоду (16 годин), у %, польові дослід.

Дослідження складу жирних кислот (олії) у насінні сої, вирощеної, свідчить, що лінії, які не реагують на фотоперіод (лінії нейтрального дня),

мають найвищий вміст жирних кислот в умовах природного довгого світлового дня. Для короткоденної лінії (КД 9) також виявлено, що вміст масла є вищим за умови тривалого дня.

Проте цей результат не підтвердився для всіх ліній короткого дня. У лінії 1 КД та ФПН лінії 3 виявився більший вміст олії в умовах короткого світлового дня.

Результати аналізу вмісту загального азоту в насінні ізогенних ліній сої з генами Е, вирощених за умов короткого фотоперіоду (9 год) і довгого фотоперіоду (16 годин), подані на рисунку 2.

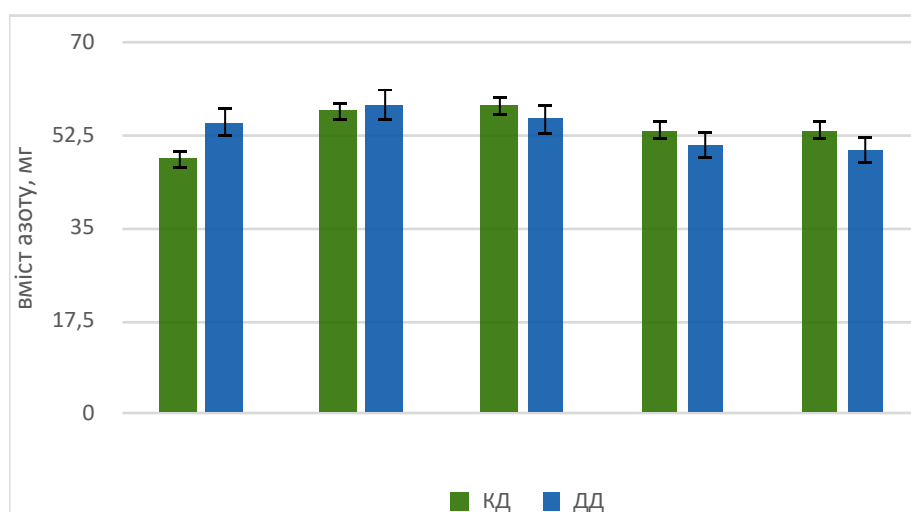


Рис. 2. Вміст загального азоту у насінні ізогенних ліній сої за генами Е вирощених в умовах короткого фотоперіоду (9 год), та довгого фотоперіоду (16 годин), мг/г сухої речовини, польові досліди.

Середній вміст азоту в усіх пробах приблизно дорівнює 55 мг/г. Медіана в кожній пробі розташована симетрично. Дані відповідають нормальному розподілу.

Азот є основним будівельним матеріалом для синтезу всіх амінокислот, які, в свою чергу, використовуються для створення білків.

Результати аналізу вмісту білка в насінні ізогенних ліній сої з генами Е, вирощених при умовах короткого фотоперіоду (9 год) і довгого фотоперіоду (16 годин), представлені на рисунку 3.

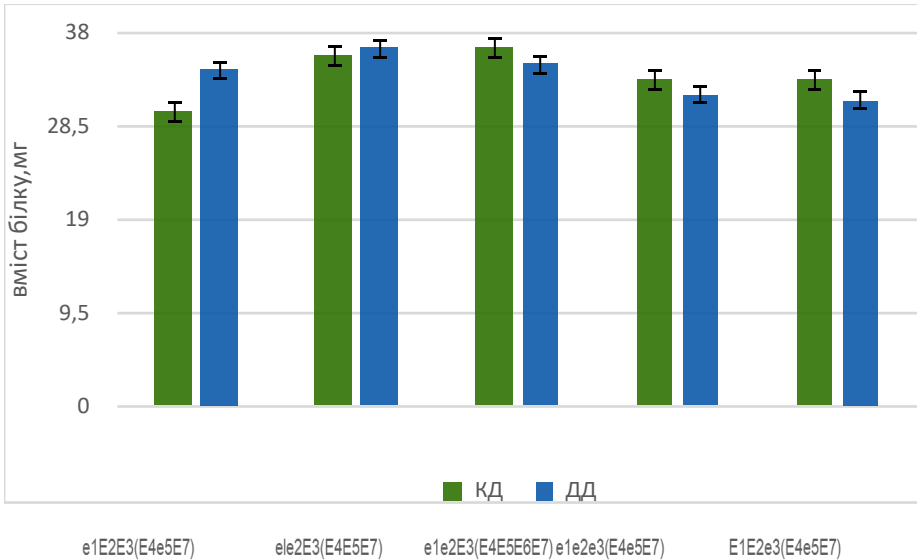


Рис.3. Вміст білку у насінні ізогенних ліній сої за генами Е вирощених в умовах короткого фотоперіоду (9 год), та довгого фотоперіоду (16 годин), мг/г сухої речовини, польові дослід.

У насінні ліній ФПН сої вміст азоту та білка був вищим в умовах короткого фотоперіоду, тоді як у насінні КД ліній сої вміст азоту та білка був вищим в умовах довгого фотоперіоду. Отримані результати вказують на більш активне перетворення вуглеводів у азотовмісні сполуки в обох групах рослин за наявності сприятливого фотоперіоду для росту.

Результати аналізу складу білка в насінні ізогенних ліній сої з генами Е, вирощених в умовах короткого фотоперіоду (9 год) і довгого фотоперіоду (16 годин), подані на рисунку 4.

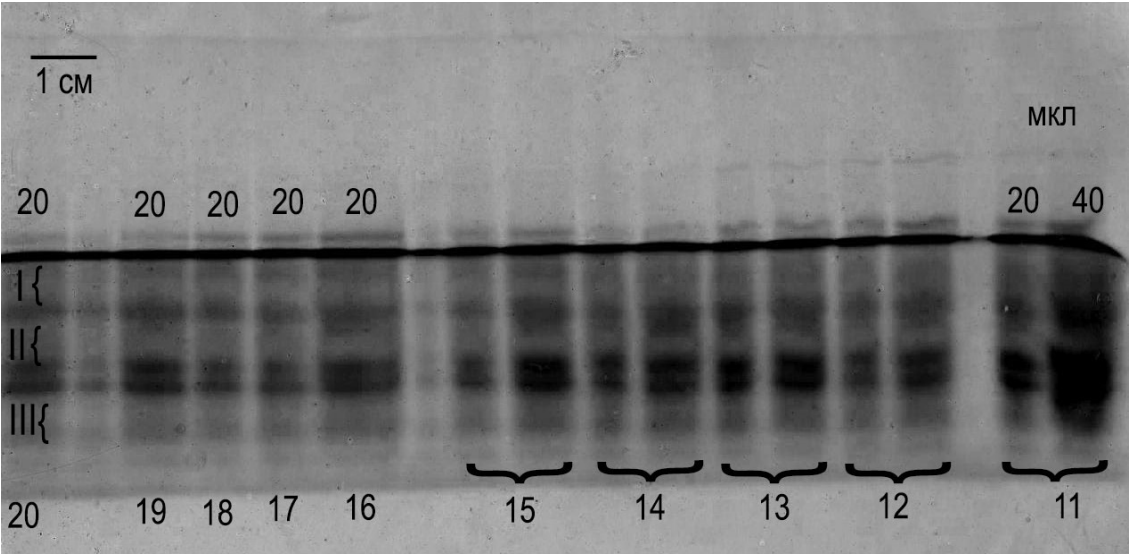


Рис. 4. Фракційний склад запасних білків насіння ізогенних ліній сої за генами Е вирощених в умовах короткого фотоперіоду (9 год), та довгого фотоперіоду (16 годин), гель-електрофорезу в поліакриламідному гелі.

У хроматографії важливим параметром є коефіцієнт рухливості, позначений як R_f . Цей показник визначається як відношення відстані від центру плями до відстані, пройденої розчинником, обидві вимірювані від стартової лінії. Величина R_f визначає характеристику зв'язку та залежить від умов хроматографії. Для ідентифікації речовин за значенням R_f використовують "маркери", які є речовинами з відомими коефіцієнтами рухливості. Ці маркери наносяться на стартову лінію і хроматографуються в одних і тих самих умовах разом з досліджуваними зразками.

Формула для обчислення R_f виглядає так: $R_f = a / b$, де "a" - відстань від стартової лінії до центру плями досліджуваної речовини, "b" - відстань від стартової лінії до переднього краю розчинника.

Електрофоретичний розподіл запасних білків у насінні сої відбувається в типовому для цього виду, і ми виділили три основні зони, позначені як I, II та III в порядку збільшення електрофоретичної рухливості. Всі ці зони є стабільними і спостерігаються у всіх генотипах, хоча є незначна варіабельність у положенні ліній. Проте, рівень внутрішньовидових відмінностей не є високим. За результатами дослідження виявлено, що найбільший вміст білка спостерігається у короткоденних лініях, що також підтверджується даними про вміст білка.

Отже, насіння сої ліній ФПН і КДР містять вищий вміст форм азоту та білка в умовах короткого фотоперіоду, що відображає фізіологічні особливості сої. Отримані результати свідчать про більш інтенсивне перетворення вуглеводів у азотовмісні сполуки в обох групах рослин за наявності сприятливого фотоперіоду для росту.

Гомологи Е генів були завантажені з NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Записи XM_041005602.1, XM_028328557.1, XM_006588403.4, XM_006588404.4, XM_006606112.4, EU252574.1,

AB554222.1, XM_014768994.2, AK245273.1, NM_001253066.3 містять послідовності E2 генів, XM_006604708.4, XM_006604709.4, XM_006604710.4 - послідовності E3 генів, NM_001254603.3, XM_006605285.4, XM_006605286.4 - послідовність E4 генів.

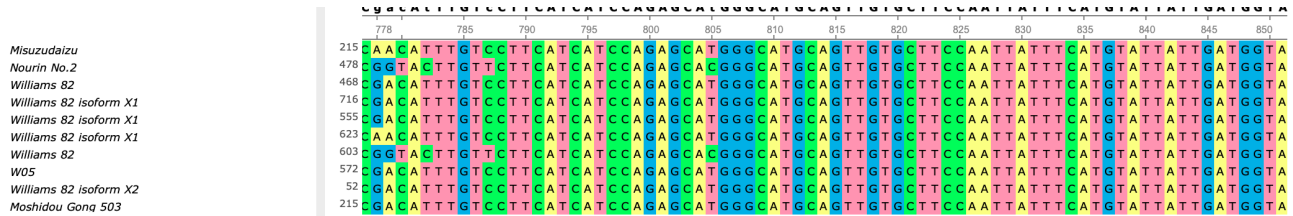


Рис 5.1. Множинне вирівнювання послідовностей гомологів гену E2

Використовуючи BLAST був проведений пошук гомологів гену E2.

І були знайдені SNP у генах E2 сорту Nourin N0.2 у позиціях:

780 (T/G), 782(C/A), 786 (C/T), 805(C/A), та сорту Williams 82 у позиціях

780 (T/G), 782 (C/A), 786 (C/T), 805 (C/A).

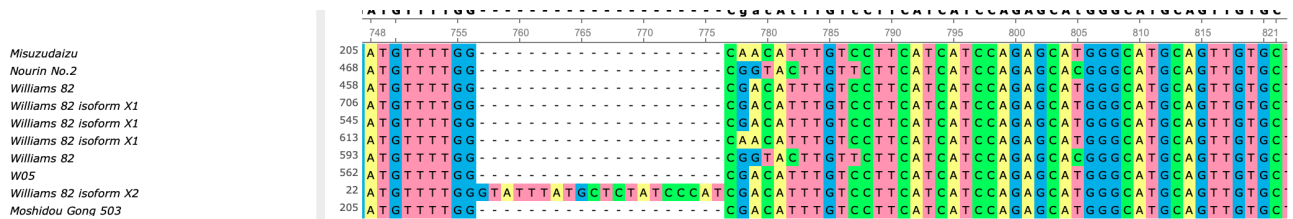


Рис 5.2. Множинне вирівнювання послідовностей гомологів гену E2

У сорту Williams 82 isoform X2 виявлена вставка у позиціях 757-776.

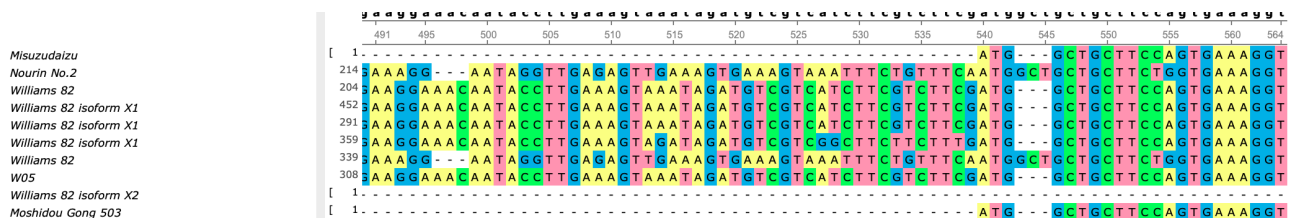
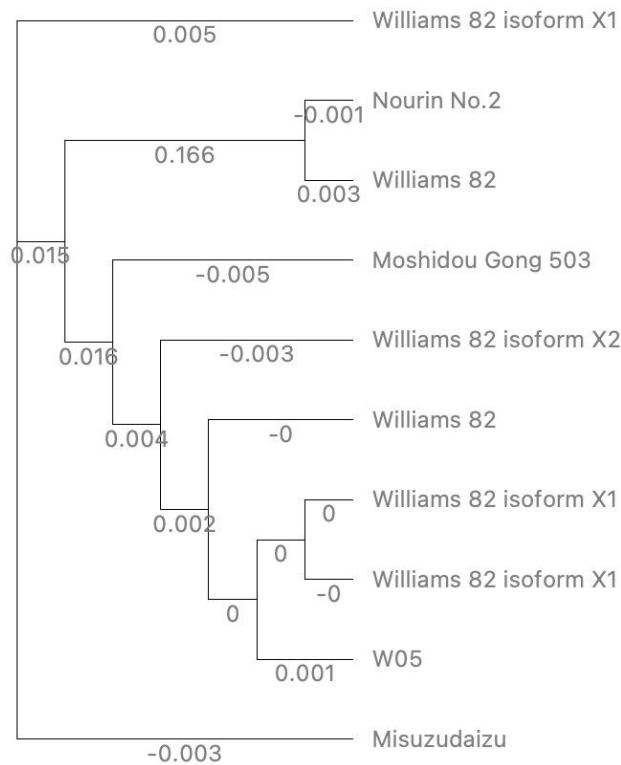


Рис 5.3. Множинне вирівнювання послідовностей гомологів гену E2

Найбільш варіабельна ділянка знаходиться у гену E2 у послідовності в позиціях 491-555.

Рис 6. Філогенетичне дерево побудоване на порівнянні гомологів гену E2



За допомогою програми UGENE, було побудоване філогенетичне дерево основане на порівнянні E2. Яке показує варіабельність нуклеатидного складу гену E2, яка пов'язана на нашу думку з пристосованністю сої культурної до різної широти вирощування.

Ген E3 був ідентифікований як фітохром, який складається з двох доменів які відповідають за білок-білкові взаємодії і передачу сигналу, гістицид-кіназного домену і сайту зв'язування з хромофором. Використовуючи BLAST було проведено пошук гомологів гену E3

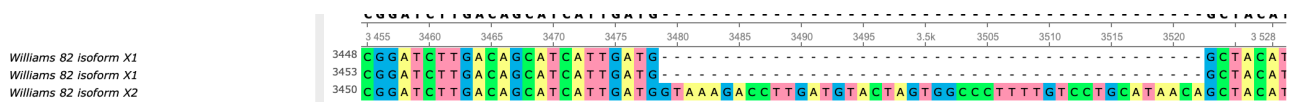


Рис 7. Множинне вирівнювання гену E3

У гені E3 було виявлено інсерцію у позиціях 3478-3522.

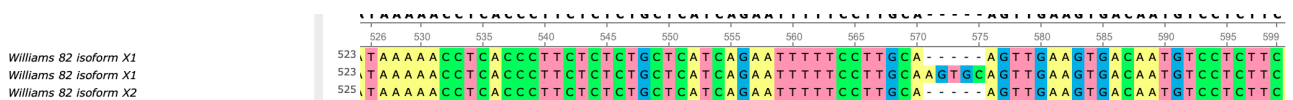


Рис 7.1. Множинне вирівнювання гену E3

Також виявлена вставка на позиціях 571-575.

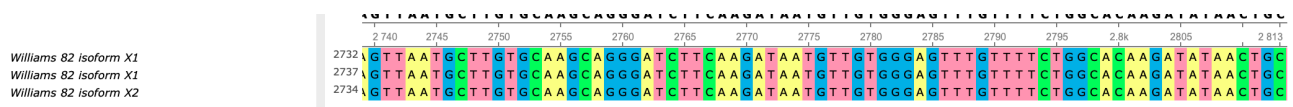


Рис 7.2. Множинне вирівнювання гену E3

Замін NSP не виявлено.

Ген E4 також кодує фітохром A і виник він у результаті дуплікації.

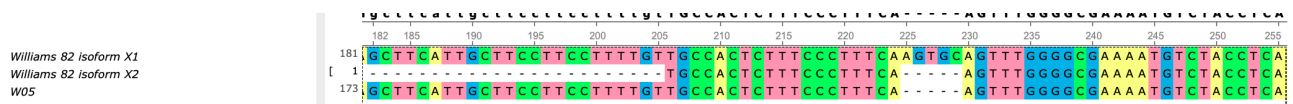


Рис 8. Множинне вирівнювання гену E4

Після вирівнювання побачили що, відбувається втрата ділянки у Williams 82 isoform X2 у позиціях 182-206. Та відбулася інсерція у позиціях 225-230. Замін NSP також не виявлено.

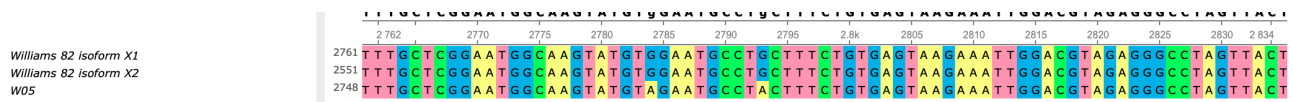


Рис 8.1. Множинне вирівнювання гену E4

Заміна виявлена у позиціях 2784 (A/T), 2793 (A/T).

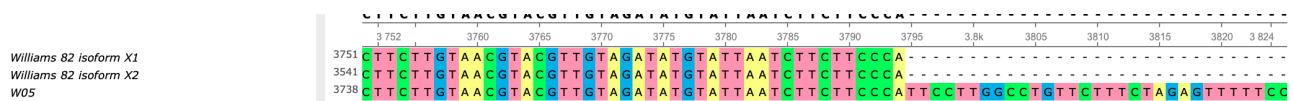


Рис 8.2. Множинне вирівнювання гену E4

Інсерція у позиціях 3794-3825.

Дослідження з використанням програми UGENE та таких інструментів, як BLAST, дали важливу інформацію про гени E2, E3 та E4 у різних сортах сої, включаючи Nourin N0.2 та Williams 82. Однонуклеотидні поліморфізми (SNP) були ідентифіковані в генах E2, зокрема, у сортів Nourin N0.2 та Williams 82, свідчать про генетичну різноманітність цих рослин.

Філогенетичне дерево, побудоване на основі порівняння гена E2, підтверджує мінливість нуклеотидного складу, що може бути пов'язане із пристосованістю сої до різних умов вирощування.

Ген E3 ідентифікований як фітохром, показав цікаві особливості, такі як інсерції у конкретних позиціях, що може впливати на біологічні функції цього гена. Відсутність замін NSP також може свідчити про стабільність цього гена в досліджених сортах.

Ген E4, який виник в результаті дуплікації, також показав варіації у послідовності, зокрема втрату ділянки та інсерцію в певних позиціях у сорті Williams 82 isoform X2. Ці зміни можуть впливати на функціональні характеристики гена.

ВИСНОВКИ

У ході виконання дипломної роботи було встановлено, що фотоперіод має вплив на структуру та якість врожаю у 5 ліній сої, які є ізогенними за генами E.

1. Виявлено, що лінії з ФПН мають найвищий вміст олії при природньому довгому дні. Дивлячись на конкретний випадок лінії з КД 9, було виявлено, що вміст олії також збільшується при довгому світловому періоді.
2. Наші дослідження показали, що вміст загального азоту у насінні ізогенних ліній сої тенденційно зменшується в умовах довгого дня для всіх ліній, крім КД лінії *e1E2E3(E4e5E7)*, де відзначено істотне збільшення вмісту азоту при довгому дні.
3. Також виявлено, що вміст білка у насінні ізогенних ліній сої тенденційно зменшується в умовах довгого дня для всіх ліній, крім КД лінії *e1E2E3(E4e5E7)*.
4. Дослідження електрофоретичного розподілу запасних білків у насінні сої підтвердило типовий для цього виду біологічний шаблон. Незважаючи на невелику варіабельність, яка визначає різницю між лініями, рівень відмінностей не є високим.
5. Аналіз послідовностей ізогенних за генами E ліній сої різного географічного походження, показує, що найбільша кількість SNP зустрічається у гені E2, в свою чергу для генів E3 та E4, що кодують фітохроми, виявлені інсерції.

ЛІТЕРАТУРА

1. Васильченко М.С., Авксентьева О.А., Жмурко В.В., 2014. Фотоперіодична реакція та калусогенез ізогенних за Е-генами ліній сої культурної. Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна, №1129, 44-52.
2. Жмурко В.В. Фотоперіодизм рослин: фізіолого-біохімічні та генетичні аспекти. – Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку у 2 т. НАН України, Ін-т фізіології рослин і генетики, Укр.. т-во фізіологів рослин; голов. ред. В.В. Моргун. К.: Логос, 2009, с.537-564.
3. Січкач В.І., Беверсдорф В. Реакція різних за скоростиглістю сортів сої на знижені температури в початкові періоди зростання. Сільськогосподарська біологія. - М: Колос, 1982, том17, вип. 5. – С. 673 – 679.
4. Січкач, В. І. Основні результати та напрямки селекції сої / В. І. Січкач // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть : у 4 томах . – К. : Логос, 2001. – Т. 3 – С. 121-125.
5. All Guide, Standard Table of Food Composition in Japan (2009) Jikyo Syupan Ltd. Tokyo.
6. Barkhem T., Carlsson B., Nilsson Y. et al. Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists // Mol. Phar - ma col. — 1998. — V. 54, N 1. — P. 105–112.
7. Board J.E. (2013) Preface in A Comprehensive Survey of International Soybean Research Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen Relationships (Ed. Board, J.E.). InTech, Rijeka, Croatia.
8. Browse, J. and Slack, C.R. (1985) Fatty-acid synthesis in plastids from maturing safflower and linseed cotyledons. Planta, 166, 74– 80.

9. Chabot B.F., Jurik T.W., Chabot J.F., 1979. Influence of instantaneous and integrated light-flux density on leaf anatomy and photosynthesis // *Am. J. Bot.* V. 66. № 8. P. 940–945.
10. Cooper R.L. (2003) A delayed flowering barrier to higher soybean yields, *Field Crop Res.* 82, 27–35.
11. Doug K. Allen, John B. Ohlrogge, Yair Shachar-Hill. (2009). The role of light in soybean seed filling metabolism. 4, 220-234.
12. Egli, D.B., Guffy, R.D., Meckel, L.W. and Leggett, J.E. (1985) The effect of source sink alterations on soybean seed growth. *Ann. Bot.* 55, 395–402.
13. Evans L.T. (1993) *Crop Evolution, Adaptation, and Yield*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
14. Fabre, F. and Planchon, C. (2000) Nitrogen nutrition, yield and protein content in soybean. *Plant Sci.* 152, 51– 58.
15. FAOSTAT crop production (2016), <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>.
16. Goggin D.E., Steadman K.J. Blue and green are frequently seen: responses of seeds to short- and midwavelength light. *Seed Science Research*. 2012; 22: 27-35.
17. Higuchi et al. (2013). The gated induction system of a systemic floral inhibitor, antiflorigen, determines obligate short-day flowering in chrysanthemums. *PNAS*. 110: 17137-17142.
18. Inheritance of a long juvenile period under short-day conditions in soybean. *Genet. Mol. Biol.* [online]. 2002, vol.25, n.4, pp.463-469. ISSN 1678-4685. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572002000400016>.

19. Kim E.H., Kim S.H. (2007). Comparison of Isoflavone Concentrations in Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) Sprouts Grown under Two Different Light Conditions. *J. Agric. Food Chem.* 55, 23, 9415–9421.
20. Koornneef, M., Hanhart, C. and Van Der Veen, J. (1991) A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 229, 57– 66.
21. Libourel, I.G.L., Gehan, J.P. and Shachar-Hill, Y. (2007) Design of substrate label for steady state flux measurements in plant systems using the metabolic network of *Brassica napus* embryos. *Phytochemistry*, 68, 2211– 2221.
22. Lu Sijia, Zhao Xiaohui, Hu Yilong. (2017). Natural variation at the soybean J locus improves adaptation to the tropics and enhances yield. *Nature Genetics*. 49, 773–779.
23. Marcelo J., Yanovsky & Steve A. Kay. (2003). Living by the calendar: how plants know when to flower. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* volume. 4, 265–276.
24. Nakasathien, S., Israel, D.W., Wilson, R.F. and Kwanyuen, P. (2000) Regulation of seed protein concentration in soybean by supra-optimal nitrogen supply. *Crop Sci.* 40, 1277– 1284.
25. Niinemets Ü., Kull O., Tenhunen J.D., 2004. Within-canopy variation in the rate of development of photosynthetic capacity is proportional to integrated quantum flux density in temperate deciduous trees // *Plant Cell Environ.* V. 27. № 3. P. 293–313.
26. Novotny, M. Overovanie parametrov nových technických prvkov kvapkovej zavlahy./ M. Novotny J. Hribik // – Ved. Prace Vysk. Ustavu Zavlah. Hospod. 1985. –V. 17. – P. 141–157.

27. Osterli, Ph. Irrigation management spells success / Ph Osterli // *am. Vegetable Grower and Greenhouse Grower*. – 1983. – V. 31. – № 9. – P. 32–33.
28. Pipolo, A.E., Sinclair, T.R. and Camara, G.M.S. (2004) Protein and oil concentration of soybean seed cultured in vitro using nutrient solutions of differing glutamine concentration. *Ann. Appl. Biol.* 144, 223– 227.
29. Portolés S., Más P. Altered oscillator function affects clock resonance and is responsible for the reduced day-length sensitivity of CKB4 overexpressing plants. *The Plant Journal*, 2007. 966-977.
30. Rjddich James, G. Modification of rood and shoot development in monocotyledon and diccotyledon seedlings by 24 epibrassionolide / Rjddich James, G. Jhekowa Nobuo/ *Plant Physiol.* - 1992. - V. 140. - № 1. - P. 70-74.
31. Rolletschek, H., Nguyen, T.H., Hausler, R.E. et al. (2007) Antisense inhibition of the plastidial glucose-6-phosphate/phosphate translocator in *Vicia* seeds shifts cellular differentiation and promotes protein storage. *Plant J.* 51, 468– 484.
32. Rostagno M. A., Villaresa A., Guillamyna E. Et al. Sample preparation for the analysis of iso avones from soybeans and soy foods // *J. Chromatogr. A.* — 2009. — V. 1216, N 1. — P. 2–29.
33. Salvagiotti F., Cassman K.G., Sprechth J.E., Walters D.T., Weiss A., Dobermann A. (2008) Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. *Field Crop Res.* 108, 1–13.
34. Schafer S. (2010) Kip Cullers Sets New Soybean World Record. *A g W e b : [http : / / w w w . a g w e b . c o m / a r t i c l e / kip_cullers_sets_new_soybean_world_record/](http://www.agweb.com/article/kip_cullers_sets_new_soybean_world_record/)* (Accessed 18, October 2010).

35. Sinclair T.R., De Wit C.T. (1975) Photosynthate and nitrogen requirements for seed production by various crops. *Science* 189, 565–567.
36. Searle, I. and Coupland, G. (2004) Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod. *EMBO J.* 23, 1217– 1222.
37. Specht J.E., Hume D.J., Kumudini S.V. (1999) Soybean yield potential—a genetic and physiological perspective. *Crop Sci.* 39, 1560–1570.
38. Takahashi Y., Chinushi T., Nakano T., Ohyama, T. (1994) Yield components of soybean plant with deep placement of N fertilizer, related to high productivity. *J. Niigata Agric. Exp. Stn.* 40, 7–5.
39. Thorne, J.H. (1981) Morphology and ultrastructure of maternal seed tissues of soybean in relation to the import of photosynthate. *Plant Physiol.* 67, 1016– 1025.
40. Tsubokura Y., Matsumura H., Xu M., Liu B., Nakashima H., Anai T., Kong F., Yuan X., Kanamori H., Katayose Y., Takahashi R., Harada K., Abe J. (2013) Genetic variation in soybean at the maturity locus E4 is involved in adaptation to long days at high latitudes. *Agronomy*, 3, 117– 134.
41. Wang Y., Wu C., Zhang X. et al. Effects of soybean major maturity genes under different photoperiods/*Acta agronomica sinica*. – 34, N7. – 2008. – P. 1160–1168.
42. Willms, J.R., Salon, C. and Layzell, D.B. (1999) Evidence for light-stimulated fatty acid synthesis in soybean fruit. *Plant Physiol.* 120, 1117– 1127.
43. Бабич А.О. Сучасне виробництво і використання сої. – Київ: Урожай, 1993. – С.8-12.
44. Державний Реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні у 2007 році (витяг). – К.: Алефа, 2007.

45. Mazur, V. A., Honcharuk, I. V., Didur, I. M., Pantsyreva, H. V., Telekalo, N. V., Kupchuk, I. M. (2021). [Innovative aspects of technologies for growing, storing and processing legumes: monograph]. Vinnytsia: Nilan-LTD.
46. Zhuikov, O. H., Ivaniv, M. O., Marchenko, T. Yu., Vozniak, V. V. (2020). [Modern soybean production as an element of solving the problem of food protein: global trends and domestic realities]. *Tavriiskyi naukovi visnyk — Taurian Scientific Bulletin*, 116, part 1, 54–63.
47. Chaudhary J, Patil GB, Sonah H, Deshmukh RK, et al. (2019). "Expanding omics resources for improvement of soybean seed composition traits." *Frontiers in Plant Science*, 10, 1407.
48. Franklin KA. (2008). "Shade avoidance." *New Phytologist*, 179(4), 930-944.
49. Бабич А.О. Соя для здоров'я і життя на планеті Земля. – К.: Аграрна наука. – 1998. – 222 с.
50. Лещенко А.К. Культура сої на Україні. – К.: Українська академія с.-г. наук, 1961. – 324с.
51. Смирнова-Іконнікова М.І., Веселова С.П. Вплив географічного чинника на зміст і склад білка зернових культур // *Біохімія зерна*. - 1960. - №5. - С. 27-35.
52. Nelson N.C. The chemistry of legume storage protein // *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 1984. – V.304. – P. 287-296.
53. Жарікова Д.О. Поліморфізм за локусами, асоційованими з генами E, в українських сортах та лініях сої (*Glycine max. (L.) Merr.*). 2021. С 108
54. Almeida R.D., Peluzio J.M., Afferri F.S.. Phenotypic, genotypic and environmental correlations in soybean grown under irrigated lowland conditions, southern Tocantins. *Biosci.* Vol. 26. 2010. P. 95-99.

55. Wang Y.-Y., Li Y.-Q., Wu H.-Y., Hu B., Zheng J.-J., Zhai H., Lv S.- X., Liu X.-L., Chen X., Qiu H.-M., et al. Genotyping of soybean cultivars with medium-density array reveals the population structure and QTNs underlying maturity and seed traits. *Frontier*
56. Бабич А.О., Бабич-Побережна А. А. Селекція і розміщення виробництва сої в Україні: монографія. Вінниця: ФОП Данилюк В. Г.. 2008. С. 216.
57. Берберець О.В. Світове виробництво сої як невичерпного джерела білків рослинного походження та місце України на світовому ринку торгівлі нею. *Агросвіт*. 2019. Вип. №10. С. 41-45. DOI: 10.32702/2306- 6792.2019.10.41
58. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990 Basic local alignment search tool *J. Mol. Biol* . 215 403 –410
59. Madden, T.L. 2002 The BLAST sequence analysis tool In McEntyre, J. (Ed.). *The NCBI Handbook* [Internet] Bethesda, MD National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information
60. Schuler, G.D., Epstein, J.A., Ohkawa, H., Kans, J.A. 1996 Entrez: molecular biology database and retrieval system *Meth. Enzymol* . 266 141 –162

SUMMARY

Brutskiy D.V. Natural post-flowering photoperiod and photoperiod sensitivity effect on total nitrogen content and protein composition in soybean seeds.

The paper is presented across 54 pages, featuring 14 figures, 1 tables, and referencing 60 literature sources.

The aim of the work is to find out the effect of photoperiod on the structure and quality of the crop in soybean lines that are isogenic for E genes.

To achieve this goal, the following tasks were set:

- 1) find out the effect of photoperiod on soybean yield;
 - 2) investigate the effect of photoperiod on the content of total nitrogen and protein in soybean seeds;
 - 3) to investigate the fractional composition of spare protein seeds by gel electrophoresis in a polyacrylamide gel.
 - 4) to investigate the effect of photoperiod on the oil content of soybean seeds;
 - 5) to conduct a search in the genetic databases of E gene sequences of soybean lines;
 - 6) to conduct an analysis (multiple alignment) and establish differences in the sequences of isogenic E genes of soybean lines of different geographical origins;
- To perform this task, the following methods were used: a field study was conducted, plants were grown under 16- and 9-hour lighting, the total nitrogen content was determined using the Kjeldahl method, the protein content was determined according to Lowry in Miller's modification, and the fractional composition of seed reserve proteins was studied by gel -electrophoresis in a polyacrylate gel, a search for E soybean gene sequences in bioinformatics databases and their homologs using NCBI BLAST was carried out. An analysis of polymorphisms at loci associated with genes of E.

It has been established that soybean seeds belonging to short-day varieties exhibit higher levels of total nitrogen and protein content under short

photoperiod conditions. The content of total nitrogen and protein increased in soybean plants of neutral daylength varieties during long daylight hours. The obtained results indicate a more intensive conversion of carbohydrates into nitrogen-containing compounds in both groups of plants under a favorable photoperiod for development.

Key words: soybean (*Glycine max* (L.) Merr), photoperiodism, *E* genes, isogenic lines, short-day and photoperiod-neutral lines.