

Національна академія аграрних наук України
Селекційно-генетичний інститут —
Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення

**ДНК-ТЕХНОЛОГІЇ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ГЕНІВ
ЗАПАСНИХ БІЛКІВ ТА ФЛАВОНОЇДІВ СОЇ
КУЛЬТУРНОЇ (*GLYCINE MAX* (L.) MERR.)
І ГЕНІВ СТІЙКОСТІ ДО ЗБУДНИКА
ФУЗАРІОЗНОГО В'ЯНЕННЯ НУТУ
ЗВИЧАЙНОГО (*CICER ARIETINUM* L.)**

Методичні рекомендації

Одеса
«Екологія»
2021

Розроблено методику ДНК-типування сортів сої за генами синтезу конгліцину та сортів нуту за локусами, пов'язаними зі стійкістю нуту звичайного до збудника фузаріозного в'янення *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Визначено поліморфізм генотипів сої за локусами *Cgy-1*, *F3'S'H-In*, *Satt516*, *Barcsoyssr_13_0687*, *Satt314*, *Satt338* та *Satt448* та генотипів нуту за локусами *TA37*, *TA200* та *TR2*. Розроблена методика дозволить скоротити довготривалий етап селекції зі створення сортів із зазначеними комбінаціями даних генів та локусів.

Розглянуто і затверджено до друку вченою радою Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннезнавства та сортовивчення (протокол № 8 від 6 листопада 2020 р.)

Автори:

Венгер А. М., науковий співробітник відділу загальної та молекулярної генетики СГІ—НЦНС, кандидат біол. наук;

Венгер О. О., молодший науковий співробітник відділу загальної та молекулярної генетики СГІ—НЦНС, кандидат біол. наук;

Файт В. І., заступник директора СГІ—НЦНС з наукової роботи, доктор біол. наук, с. н. с., член-кор. НААН

Рецензенти:

Молодченкова О. О., завідувачка лабораторії біохімії рослин СГІ—НЦНС, доктор біол. наук, с.н.с.;

Буцулян О. В., провідний науковий співробітник відділу селекції кормових культур ІКСГП НААН України; кандидат с.-г. наук, с.н.с.

Відповідальний за випуск: директор СГІ—НЦНС, член-кор. НААН **Соколов В. М.**

ЗМІСТ

<i>Вступ</i>	4
1. ОПИС МЕТОДУ	5
2. ЕТАПИ АНАЛІЗУ	6
2.1. Виділення ДНК з індивідуальних рослин (паростків, листків)	6
2.2. Спектрометричне визначення концентрації ДНК	6
2.3. Проведення полімеразної ланцюгової реакції	6
2.4. Електрофоретичний розподіл продуктів ампліфікації	8
2.5. Візуалізація продуктів ампліфікації	8
2.6. Документування результатів	9
3. ОПРАЦЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	9
3.1. Молекулярно-генетичний аналіз генотипів нуту	9
3.2. Молекулярно-генетичний аналіз сортів сої за локусами, що зумовлюють синтез флавоноїдів	11
3.3. Молекулярно-генетичний аналіз сортів сої за геном <i>Cgy-1</i> , пов'язаним із синтезом конгліциніну	11
<i>Висновки</i>	14
<i>Список бібліографічних посилань</i>	15

ВСТУП

Соєва культура (*Glycine max* (L.) Merr.) — важлива сільськогосподарська рослина, що широко використовується в продовольчому, кормовому та технічному напрямках і має велике агротехнічне значення як азотфіксуюча культура. Вона є однією з найбільш вивчених у генетичному відношенні рослиною. Оприлюднені в 2010 р. результати секвенування генома *G. max* та ресеквенування генома *G. soja* відкрили нові можливості функціонально характеризувати гени [1; 2]. Системний підхід (геноміка, транскриптоміка, протеоміка, метаболоміка, біоінформатика) до характеристики цих генів дозволяє визначити процеси, що контролюють такі складні ознаки, як врожайність, вміст олії, склад білка, фотоперіод, відповіді на абіотичні й біотичні стреси та ін. [3–6]. Для збереження та аналізу інформації з «оміків» сої є електронний ресурс «SoyBase and the Soybean Breeder's Toolbox» [7].

У дослідженнях геному сої нині широко використовують різні типи молекулярних маркерів, розроблених на основі поліморфізму довільно ампліфікованої ДНК (Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD), довжини ампліфікованих послідовностей ДНК (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP), повторів простих послідовностей (Simple Sequence Repeats, SSR), міжмікросателітного поліморфізму (Inter Simple Sequence Repeats, ISSR), одонуклеотидного поліморфізму (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) та ін. [8–10].

Вирізняльна особливість насіння сої — підвищений вміст протеїну (30–50 %) та поліпшена, у порівнянні зі злаковими та олійними культурами, збалансованість за амінокислотним складом. Найбільш перспективними протеїнами для виготовлення соєпродуктів є 7S і 11S глобуліни — β-конгліцинін і гліцинін відповідно, на які припадає близько 70 % загальної кількості протеїну насіння. Досліджено молекулярну еволюцію родин генів гліцинину та β-конгліцинину. Науковцями різних країн проведено молекулярно-генетичні дослідження генів, що кодують субодиниці β-конгліциніна [11; 12]. Молекулярно-генетичний аналіз дібраних сортів сої вітчизняної селекції за геном *Cgy-1*, пов'язаним із синтезом конгліцинину, дозволить при створенні сортів сої продовольчого напрямку враховувати не тільки вміст глобулінів, але й їхній компонентний склад. Прикладом впровадження молекулярних маркерів у селекції сої на поліпшення якості насіння

є ідентифікація гена *F3'5'H-In* та мікросателітних локусів *Satt229*, *Satt006*, *Satt516*, *Barcsoyssr_13_0687*, *Satt314*, *Satt338*, *Satt448* генів, що пов'язані з синтезом флавоноїдів [9; 13].

Серед біотичних обмежень, що впливають на виробництво нуту, є фузаріозне в'янення (*Fusarium wilt*), викликане *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, яке є основним захворюванням, що знижує врожай до 90 %. Наявність стійкості до грибних фітопатогенів — важлива складова формування врожайності. Стійкість нуту до фузаріозного в'янення — комплексна ознака, що контролюється певною кількістю генів / локусами кількісної ознаки (quantitative trait loci, QTL). Визначено гени (кластери генів) стійкості нуту до *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*: *Foc-1*, *Foc-2*, *Foc-3*, *Foc-4*, *Foc-5* [14] та розроблено / валідовано молекулярні маркери [15–18].

Отже, молекулярно-генетичний аналіз геномів нуту та сої дозволить розробити молекулярні біотехнології оцінки генотипів щодо наявності певних агрономічних ознак, провести моніторинг генетичних ресурсів та здійснити добір найкращих генотипів на ранніх стадіях селекційного процесу.

1. ОПИС МЕТОДУ

В основу метода покладено завдання — розробка методики виявлення поліморфізму генів та мікросателітних локусів *F3'5'H-In*, *Satt516*, *Barcsoyssr_13_0687*, *Satt314*, *Satt338*, *Satt448*, *Satt229*, *Satt006*, *TA37*, *TA200*, *TR2*, *TA19*, *FOF*. Ідентифікацію цих генів та локусів проводили шляхом аналізу спектрів ампліфікації ДНК за результатами полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням пар праймерів, зчеплених досліджуваними ділянками геному сої та нуту. Отримані продукти ампліфікації ДНК фракціонували електрофорезом в 10 % неденатуруючому поліакриламідному гелі. Визначали розмір продукту ампліфікації ДНК. Виявлення специфічного продукту ампліфікації за парою праймерів свідчить про наявність відповідного гена або локусу.

2. ЕТАПИ АНАЛІЗУ

2.1. Виділення ДНК з індивідуальних рослин (паростків, листків)

Сегмент паростка, листка (чи будь-якого органу рослини) розміром 1 см чи насіння в 1,5 мл пробірці типу «епендорф» (далі — епендорф) гомогенізували скляним товкачем до повної мацерації тканин та заливали 0,5 мл лізуючого буфера такого складу: 0,02 М Na₃EDTA, 0,1 М Трис-НСl рН 8,0, 1,4 М NaCl, 2,0 % СТАВ, 100 мкг/мл протеїнази К. Лізат інкубували 40 хв за 65 °С. Обробляли лізат рівною кількістю суміші хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1 за об'ємом), перемішуючи до утворення білої емульсії. Отриману суміш центрифугували 5 хв при 14000 об./хв на мікрофузі «Eppendorf 5415», водну фазу перенесли в інший епендорф. До водної фази додавали 0,6 об'єму ізопропилового спирту і витримували протягом 10 хв за кімнатної температури. Нуклеїнові кислоти (НК) осаджували центрифугуванням за 14000 об./хв протягом 1 хв на мікрофузі «Eppendorf 5415». Осад промивали двічі 70 %-м етанолом, підсушуючи за кімнатної температури 15–20 хв і розчиняючи в 120 мкл ТЕ-буфера (10 мМ Трис-НСl рН 8,0, 1 мМ EDTA). Після повного розчинення НК здійснювали РНКазну обробку: до розчину НК додавали РНКазу А до кінцевої концентрації 1 мкг/мл та інкубували 30 хв за 37 °С.

2.2. Спектрометричне визначення концентрації ДНК

Концентрацію виділеної ДНК визначали на спектрофотометрі NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer («Thermo scientific», США) згідно з рекомендаціями виробника обладнання.

2.3. Проведення полімеразної ланцюгової реакції

Поліморфізм генів за вибіркою сортів і гібридів сої та нуту проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Продукти ампліфікації (12 мкл аліквоти ПЛР-суміші) фракціонували у 7 %-му поліакриламідному гелі (ПААГ). 7 %-й ПААГ фарбували сріблом відповідно до «Silver sequence TM DNA Sequencing System Technical Manual» («Promega», США).

Валідацію та підбір праймерів до досліджуваних локусів сої та нуту проводили за онлайн-програмою BLAST-N (табл. 1).

Таблиця 1

Праймери, використані у дослідженні [5; 9; 10; 12; 13]

№ з/п	Назва	Послідовність (5'-3')	№ з/п	Назва	Послідовність (5'-3')
1	<i>F3'5'H-InF</i>	cccaaccaattctaagaaatgtaa	8	<i>Satt448F</i>	gcgctaaaggggcaattttattcaaa
	<i>F3'5'H-InR</i>	cccaaccaattctaagaaatgtaa		<i>Satt448R</i>	gcgagccctgttcagttttctttttgic
2	<i>Satt229F</i>	tggcagcacaccctgctaaaggggaataaa	9	<i>Cgy-1_IF</i>	cgttggctccaccctcactttcag
	<i>Satt229R</i>	gcgagggtgctcaaaattattaccctat		<i>Cgy-1_2F</i>	gggtcgcaccaaaaacaacct
3	<i>Satt006F</i>	caatgtagttttggaaa	10	<i>Cgy-1_R</i>	caaccagcatgctatcaaaag
	<i>Satt006R</i>	gggttaatggttttttata		<i>TA37F</i>	acttaccatgaattatctttctggicc
4	<i>Satt516F</i>	gcgtagcactattttttacaaga	11	<i>TA37R</i>	cgtattcaaaataatctttcatcagtca
	<i>Satt516R</i>	gcgccgttcctcttactttat		<i>TA200F</i>	tttctcctctactattatgatcaccag
5	<i>Barcsoyssr_13_0687F</i>	gogttagcactattttttacaaga	12	<i>TA200R</i>	ttgagaggggttagaacctattatggtt
	<i>Barcsoyssr_13_0687R</i>	gogccgttcctcttactttat		<i>TR2F</i>	ggccttagagttcaaaagagagaa
6	<i>Satt314F</i>	gcgagattggaaccttacttacc	13	<i>TR2R</i>	aaccaagattggaagtgtg
	<i>Satt314R</i>	gccccgaccaaaataaatacaaaa		<i>TA194F</i>	tttttggctatttagacagact
7	<i>Satt338F</i>	gcccccaagattattagagattttgat	14	<i>TA194R</i>	ttgccataaaaatacaaaaatcc
	<i>Satt338R</i>	gcgataattttaaaactggacca		<i>FOFI</i>	acataccactgtttgctctg
				<i>FORI</i>	cggcaatcaatttggaggaaacg

ПЛР з ДНК нуту виконували за таких температурно-часових умов: денатурація — 2 хв за 94 °С, 35 основних циклів — 30 с за 94 °С, 1 хв за 54 °С та 1,5 хв за 72 °С, заключна елонгація — 72 °С 10 хв.

ПЛР з ДНК сої проводили за таких температурно-часових умов: денатурація — 2 хв за 96 °С; 30 циклів по 60 с за 94 °С, 180 с за 55 °С та 60 с за 72 °С; заключна елонгація — 72 °С 10 хв.

Для уникнення псевдопозитивних чи псевдонегативних результатів за використання кожного праймера робили негативний контроль (замість ДНК в пробірку вносили 2 мкл стерильної дистильованої води (К)).

2.4. Електрофоретичний розподіл продуктів ампліфікації

Продукти ПЛР-ампліфікації фракціонували в 10 % неденатуруючому поліакриламідному гелі в 1xTBE-буфері (89,0 mM Трис, 89,0 mM борна кислота, 2,0 mM Na₃EDTA) за постійної напруги 550 В 1,5–2,0 години залежно від довжини фрагментів ампліфікації. Для приготування одного гелю розміром 20x20 см завтовшки 0,75 мм змішували 12,5 мл розчину 30 % поліакриламідну з 8 М сечовиною, 2,5 мл 10xTBE буферу, 20 мкл ТЕМЕД, 250 мкл 10 % розчину амонію персульфату.

Гель заливали у форми згідно з інструкцією устаткування. Перед нанесенням на електрофорез 10–12 мкл реакційної суміші змішували з 6 мкл буфера для нанесення (0,25 % (w/v) ксиленціанол, 98 % (w/v) формамід, 150 mM трис-НСІ рН 7,6, 60 % гліцерину). Потім проби наносили у лунки поліакриламідного гелю. Проводили електрофорез. Для визначення молекулярної маси використовували стандарт рUC 19 DNA/*Msp*I.

2.5. Візуалізація продуктів ампліфікації

Поліакриламідні гелі фарбували сріблом відповідно до методики «Silver sequence TM DNA Sequencing System Technical Manual» («Promega», США): гель клали на 5 хв у 10 % розчин етанолу, потім перенесли в 1 % розчин HNO₃ на 3 хв, після чого кілька разів промивали дистильованою водою. Витримували протягом 20 хв у 0,012 М AgNO₃ у темряві. Двічі промивали дистильованою водою. Заливали гель-відновлюючим розчином (0,28 М Na₂CO₃ (безводний), 0,019 % формалін), інкубували, перемішуючи до появи забарвлення фраг-

ментів ампліфікації. Двічі промивали дистильованою водою і клали у 10 % розчин оцтової кислоти на 2 хв. На завершення добре промивали дистильованою водою — до усунення запаху оцтової кислоти. Гель зберігали між двома прозорими поліетиленовими плівками.

2.6. Документування результатів

Відеозображення електрофоретичних профілів ампліфікованої ДНК та оцінки довжини продуктів ампліфікації одержували за допомогою системи гель-документації і аналізу гелів згідно з інструкцією виробника обладнання.

3. ОПРАЦЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Після проведення електрофорезу продуктів ПЛР на доріжках гелю або чітко детектувалися фрагменти ДНК відповідного розміру, або виявилася цілковита відсутність зазначених ампліконів.

3.1. Молекулярно-генетичний аналіз генотипів нуту

За результатами ПЛР-аналізу локусів *TA37*, *TA200*, *TR2*, *TA194*, *FOF* виявляють характерний для генотипу, що тестують, набір алелів (табл. 2). Локуси *TA37*, *TA200*, *TR2*, *TA194*, *FOF* є маркерами генів *Foc-1*, *Foc-2*, *Foc-3*, *Foc-4*, *Foc-5* стійкості до збудника фузаріозу відповідно. Вивчені сорти та лінії нуту виявилися поліморфними за локусами *TA37*, *TA200* та *TR2*. Локус *TA37* має 2 алелі: 282 п.н. та 284 п.н., з яких перший присутній у всіх генотипів (рис. 1). Локус *TA200* в даній вибірці генотипів представлений чотирма алелями, розміром 274 п.н., 286 п.н., 292 п.н. та 295 п.н. Всі сорти та лінії виявилися гетерогенними та у всіх без виключення генотипів присутній алель розміром 286 п.н. У вивченій вибірці сортів за локусом *TR2* виявлено алелі розміром 223 п. н., 229 п. н., 241 п. н. та 244 п. н. Всі генотипи за цим локусом також є гетерогенними й у всіх присутній алель 229 п. н.

За локусами *TA194* та *FOF* генотипи наведеної вибірки сортів не розрізнялися. Всі генотипи є носіями алелів розміром 204 п. н. та 340 п. н. відповідно за першим та другим генами.

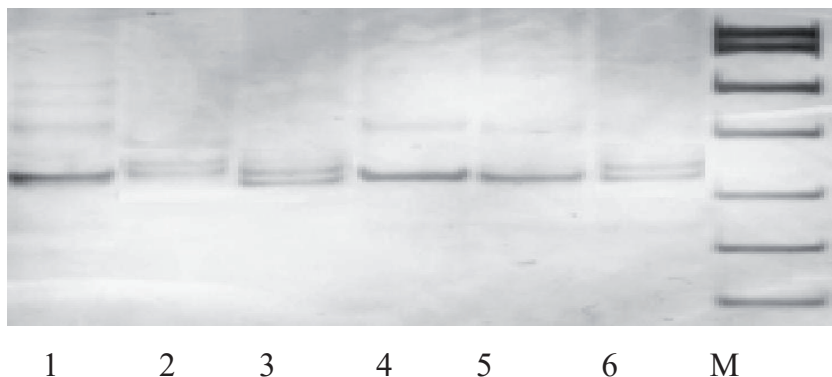


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК нуту за локусом *TA37*: 1 — Пегас; 2 — Туреччина 2; 3 — EC 26445; 4 — GL 599; 5 — NEC 214; 6 — Буджак; М — маркер молекулярної маси рUC19/MspI

Таблиця 2
ДНК-типуння сортів та ліній нуту за локусами *TA37*, *TA200*, *TR2*, *TA194*, *FOF*

Сорт/зразок	Розмір продуктів ампліфікації локусів, п. н.				
	<i>TA37</i>	<i>TA200</i>	<i>TR2</i>	<i>TA194</i>	<i>FOF</i>
Антей	282	286, 292	223, 229	204	340
Пам'ять	282, 284	286, 295	229, 241	204	340
ІЛС 3346	282	286, 295	223, 229	204	340
Тріумф	282, 284	274, 286	229, 244	204	340
Красноградський 213	282, 284	274, 286	229, 241	204	340
Тарас Бульба	282	286, 295	229, 244	204	340
Одіссей	282	274, 286	223, 229	204	340
Буджак	282, 284	274, 286	229, 241	204	340
Скарб	282	286, 295	229, 241	204	340
Туреччина 2	282, 284	274, 286	223, 229	204	340
Адмірал	282	274, 286	223, 229	204	340
Йордан	282, 284	286, 295	229, 244	204	340
Пегас	282	274, 286	229, 241	204	340
Ярина	282	286, 292	229, 241	204	340
QW-517	282	274, 286	229, 244	204	340
NO-42	282, 284	274, 286	229, 244	204	340
NEC 2319	282	274, 286	223, 229	204	340
EC26422	282	286, 295	229, 244	204	340
EC26415	282	286, 292	229, 244	204	340
EC 26445	282, 284	274, 286	229, 244	204	340

Закінчення табл. 2

Сорт/зразок	Розмір продуктів ампліфікації локусів, п. н.				
	<i>TA37</i>	<i>TA200</i>	<i>TR2</i>	<i>TA194</i>	<i>FOF</i>
Befehagan 302	282	286, 295	223, 229	204	340
NEC 2189	282, 284	274, 286	229, 244	204	340
GL 599	282	274, 286	229, 244	204	340
NEC 214	282, 284	286, 295	223, 229	204	340
K1286	282	274, 286	229, 244	204	340

3.2. Молекулярно-генетичний аналіз сортів сої за локусами, що зумовлюють синтез флавоноїдів

Локуси *F3'5'H-In*, *Satt229*, *Satt006*, *Satt516*, *Barcsoyssr_13_0687*, *Satt314*, *Satt338*, *Satt448* є маркерами синтезу та накопичення флавоноїдів у сої. Результати молекулярно-генетичних досліджень сої наведені у табл. 3.

За результатами аналізу локусу *F3'5'H-In* у вибірці 38 сортів сої виявлено два алелі розміром 342 та 395 п. н., а за результатами аналізу локусу *Satt516* — алелі розміром 249, 252, 255, 258, 261 та 270 п.н. За результатами аналізу локусу *Barcsoyssr_13_0687* виявлено алелі розміром 216, 222, 225, 228, 231 та 240 п.н. За результатами аналізу локусу *Satt314* виявлено алелі розміром 240, 243 та 246 п.н. За результатами аналізу локусу *Satt338* виявлено алелі розміром 225, 261 та 270 п.н. За результатами аналізу локусу *Satt448* виявлено алелі розміром 270 та 273 п.н. Локуси *Satt229* та *Satt006* у наведеній вибірці сортів не є поліморфними. За локусом *Satt229* виявлено алель розміром 225, а *Satt006*—132 п.н. відповідно.

3.3. Молекулярно-генетичний аналіз сортів сої за геном *Cgy-1*, пов'язаним із синтезом конгліциніну

Локус *Cgy-1* є маркером синтезу та накопичення конгліциніну у сої. За результатом ДНК-аналізу 38 сортів сої за локусом *Cgy-1* у 8 з них виявлено продукти ампліфікації та показано можливість синтезувати та накопичувати конгліцинін (табл. 4).

Таблиця 3

ДНК-типунання сортів сої за локусами, що зумовлюють сингез флавоноїдів

Сорт	Розмір продуктів ампліфікації, п. н.									
	<i>F3'5'H-In</i>	<i>Satt516</i>	<i>Varcsoussr_13_0687</i>	<i>Satt314</i>	<i>Satt338</i>	<i>Satt229</i>	<i>Satt448</i>	<i>Satt006</i>		
Устя	342	252, 255	216	240, 243	225	225	270, 273	132		
Антарес	395	249, 252	222	246	261	225	270	132		
Валюта	395	255	225, 228	240, 243	225, 261	225	270, 273	132		
Аполлон	342	252, 255	228	246	225, 261	225	270	132		
Аратта	342	255, 258	216, 240	240, 243	261	225	270	132		
Вільшанка	395	255	228, 226	240, 243	261	225	270, 273	132		
Ювілейна	342	249, 255	222, 225	240	225, 261	225	270, 273	132		
Подоланка	342	255, 258	228, 231	246	261	225	270	132		
Кардіф	395	261	225	240, 243	225, 261	225	270	132		
Ментор	395	255, 258	222, 225	240, 246	261	225	270, 273	132		
Васильківська	342	255	228, 231	240, 246	261, 270	225	270	132		
Фарватер	395	249, 258	225	246	261	225	270, 273	132		
Селекта	395	249, 261	243	240, 246	261	225	270, 273	132		
Мельпомена	395	270	225, 228	240, 243	225, 270	225	270	132		
Смолянка	342	258	222, 243	240, 243	225, 261	225	270	132		
Галлик	395	249, 258	225	246	261	225	270	132		
Данко	342	255	225	246	225, 270	225	270, 273	132		

Валлас	395	249	228, 231	240, 243	225, 261	225	270, 273	132
Шарм	395	252, 255	225, 231	240, 243	225, 261	225	270, 273	132
Танаїс	342	258	222, 231	246	225	225	270	132
Білявка	342	258	228, 231	246	225, 261	225	270, 273	132
Ворскла	342	255	222, 228	243	261	225	270	132
Мерлін	395	261	231	240, 246	225, 270	225	270	132
Рапсодія	395	255, 258	222, 225	246	225, 270	225	270, 273	132
Алігатор	395	261, 270	222, 231	240, 246	225, 261	225	270, 273	132
Артеміда	395	258	225	240, 243	225	225	270	132
Талі	395	249, 252	222	240, 243	225	225	270, 273	132
Романтика	342	255	231	240, 246	225, 261	225	270	132
Монарх	395	261	225	246	261	225	270	132
Фенікс	342	255, 258	225	240, 243	225	225	270	132
Симфонія	342	255, 258	222, 228	240, 243	225, 261	225	270, 273	132
Ариадна	395	252, 255	228	246	225, 270	225	270, 273	132
Сяйво	342	249	222, 225	240, 243	225, 270	225	270, 273	132
Орфей	395	255, 258	222, 231	240, 246	225	225	270	132
Евридика	395	261, 270	225	240, 243	225, 261	225	270, 273	132
Південна Зоря	395	255	222, 231	240, 243	225, 270	225	270, 273	132
Аврора	395	255, 258	225, 228	240, 243	225, 261	225	270, 273	132
Таверна	342	261	228, 240	240, 243	225	225	270	132

Таблиця 4

ДНК-аналіз сортів сої за локусом *Cgy-1*, що зумовлює синтез конгліциніну*

Сорт	Наявність продуктів ампліфікації	Сорт	Наявність продуктів ампліфікації
Аврора	+	Ментор	–
Алігатор	–	Мерлін	+
Антарес	–	Монарх	–
Аполлон	–	Орфей	–
Аратга	–	Південна Зоря	–
Аріадна	+	Подольнянка	–
Артеміда	–	Рапсодія	–
Білявка	–	Романтика	–
Валлас	–	Селекта	–
Валюта	+	Симфонія	–
Васильківська	+	Смолянка	–
Вільшанка	–	Сяйво	–
Ворскла	–	Таверна	–
Галі	–	Танаїс	–
Галлик	–	Устя	+
Данко	–	Фарватер	–
Евридика	–	Фенікс	–
Кардіф	–	Шарм	–
Мельпомена	+	Ювілейна	+

* наявність продукту ампліфікації корелює зі здатністю синтезувати та накопичувати конгліцинін.

ВИСНОВКИ

1. Визначено поліморфізм локусів *F3'5'H-In*, *Satt516*, *Barc-soyssr_13_0687*, *Satt314*, *Satt338* та *Satt448*, консервативність локусів *Satt229* і *Satt006* за вибіркою 38 сортів сої.
2. Визначено поліморфізм генів *TA37*, *TA200* та *TR2* і консервативність генів *TA19* та *FOF* за вибіркою 25 сортів нуту.
3. Проведено ДНК-аналіз сортів сої за локусом *Cgy-1*, визначені сорти із здатністю накопичувати конгліцинін.

СПИСОК БІБЛЮГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ

1. Kim M., Lee S., Van K. et al. Whole-genome sequencing and intensive analysis of the undomesticated soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. Vol. 107 (51). P. 22032–22037.
2. Schmutz J., Cannon S., Schlueter J. et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*. 2010. Vol. 463. P. 178–183.
3. Soybean. Molecular aspects of breeding / Edit. A. Sudaric. In Tech Europe, Croatia, 2011. 514 p.
4. Qiu L., Xing L., Guo Y. et al. A platform for soybean molecular breeding: the utilization of core collections for food security. *Plant Mol. Biol.* 2013. Vol. 83. P. 41–50.
5. Gupta S., Bhatia V., Kumawat G. et al. Genetic analyses for deciphering the status and role of photoperiodic and maturity genes in major Indian soybean cultivars. *J. Genet.* 2017. Vol. 96, Iss. 1. P. 147–154.
6. Волкова Н. Е. Поліморфізм сортів сої культурної (*Glycine max* (L.) Merr.) за мікросателітним маркером *Satt100* гена *E7* фотоперіодичної чутливості. *Plant Varieties Studying and Protection*. 2017. Т. 13, № 4. С. 373–378.
7. <http://soybase.org>
8. Брик А. Ф., Сиволап Ю. М. Молекулярно-генетический полиморфизм сои, детектированный ПП-ПЦР, SSRP и ISSR. *Цитология и генетика*. 2001. Т. 35, № 5. С. 3–10.
9. Kumar V., Rani A., Jha P. et al. Molecular identification of dominant cultivars of soybean using simple sequence repeat markers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* DOI: 10.1007/s40011–015–0641–7.
10. Jegadeesan S., Yu K., Woodrow L. et al. Molecular analysis of glycinin genes in soybean mutants for development of gene-specific markers. *Theor. Appl. Genet.* 2012. Vol. 124. P. 365–372.
11. Li C., Zhang Y. Molecular evolution of glycinin and b-conglycinin gene families in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Heredity*. 2011. Vol. 106. P. 633–641.
12. Rayhan M., Van K., Kim D. et al. Identification of *Gy4* nulls and development of multiplex PCR-based co-dominant marker for *Gy4* and α' sub-unit of β -conglycinin in soybean. *Gen. Genom.* 2011. Vol. 33. P. 383–390.
13. Guo Y., Qiu L. Allele-specific marker development and selection efficiencies for both flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes in soybean subgenus soja. *Theoretical and Applied Genetics*. 2013. Vol 126 (6). P. 1445–1455.

14. Choudhary A., Kumar S., Patil B. et al. Narrowing yield gaps through genetic improvement for Fusarium wilt resistance in three pulse crops of the semi-arid tropics. *J. Breed. Gen.* 2013. Vol. 45, N 3. P. 341–370.
15. Padaliya R. V., Suthar Kiran P., Diwakar Singh, Mahesh Kumar Mahatma, Patil V. R. Marker assisted characterization of chickpea genotypes for wilt resistance. *African journal of biotechnology.* 2013. Vol. 12(50). P. 6907–691.
16. Sabbavarapu M. M., Sharma M., Chamarthi S. K., Swapna N., Rathore A., Thudi M., Gaur P. M., Pande S., Singh S., Kaur L, Varshney R. K. Molecular mapping of QTLs for resistance to *Fusarium* wilt (race 1) and *Ascochyta* blight in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Euphytica.* 2013. Vol. 193. P. 121–133.
17. Ahmad Z., Mumtaz A., Ghafoor A. et al. Marker Assisted Selection (MAS) for chickpea *Fusarium oxysporum* wilt resistant genotypes using PCR based molecular markers. *Mol. Biol. Rep.* 2014. Vol. 41, N 10. P. 6755–6762.
18. Varshney R., Mohan S., Gaur P. et al. Marker-assisted backcrossing to introgress resistance to *Fusarium* wilt race 1 and *Ascochyta* blight in C 214, an elite cultivar of chickpea. *Plant Genome.* 2014. Vol. 7 (1). DOI: 10.3835/plantgenome2013.10.003511 p.

Д54

ДНК-технології ідентифікації генів запасних білків та флавоноїдів сої культурної (*Glycine max* (L.) Merr.) і генів стійкості до збудника фузаріозного в'янення нуту звичайного (*Cicer arietinum* L.): методичні рекомендації / авт.: А. М. Венгер, О. О. Венгер, В. І. Файт ; СГІ –НЦНС. — Одеса : Екологія, 2021. — 20 с.

Розроблено методику ДНК-типування сортів сої за генами синтезу конгліцину та сортів нуту за локусами, пов'язаними зі стійкістю нуту звичайного до збудника фузаріозного в'янення *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Визначено поліморфізм генотипів сої за локусами *Cgy-1*, *F3'5'H-In*, *Satt516*, *Baresoyssr_13_0687*, *Satt314*, *Satt338* та *Satt448* та генотипів нуту за локусами *TA37*, *TA200* та *TR2*. Розроблена методика дозволить скоротити довготривалий етап селекції зі створення сортів із зазначеними комбінаціями даних генів та локусів.

УДК 635.657:632.9

Науково-методичне видання

**ДНК-ТЕХНОЛОГІЇ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ГЕНІВ
ЗАПАСНИХ БІЛКІВ ТА ФЛАВОНОЇДІВ СОЇ
КУЛЬТУРНОЇ (*GLYCINE MAX* (L.) MERR.)
І ГЕНІВ СТІЙКОСТІ ДО ЗБУДНИКА
ФУЗАРІОЗНОГО В'ЯНЕННЯ НУТУ
ЗВИЧАЙНОГО (*CICER ARIETINUM* L.)**

Методичні рекомендації

Автори:

Венгер А. М., Венгер О. О., Файт В. І.

Завідувачка редакції *Т. М. Забанова*
Редактор *В. Я. Крижанівський*

Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 1,16.
Тираж 100 прим. Зам. № 105.

Видавництво і друкарня «Екологія»
65091, м. Одеса, вул. Разумовська, 23/1
Тел.: (0482) 33-07-18, 37-14-25, 7-855-855

e-mail: astro_print@ukr.net; www.astroprint.ua; www.stranichka.in.ua
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК No1873 від 20.07.2004 р.

