

Научная статья

УДК 633.34:575.1

EDN UPEVNH

<https://doi.org/10.22450/1999-6837-2026-20-3-26-37>**Генотипирование генов *E1–E4* сортов сои с использованием аллель-специфичных маркеров: апробация мультиплексной ПЦР для локусов *E3* и *E4*****Анастасия Андреевна Катрушенко¹, Павел Дмитриевич Тимкин²,
Андрей Андреевич Пензин³, Анна Петровна Галиченко⁴**^{1, 2, 3, 4} Всероссийский научно-исследовательский институт сои

Амурская область, Благовещенск, Россия

¹ lsi@vniisoi.ru, ² tpd@vniisoi.ru, ³ paa@vniisoi.ru, ⁴ gap@vniisoi.ru

Аннотация. Фотопериодическая чувствительность сои (*Glycine max* (L.) Merrill) ограничивает ее возделывание в высоких широтах, поэтому оценка аллельного состава ключевых генов *E1–E4*, контролирующих цветение и созревание, является актуальной задачей селекции. Цель работы – апробация мультиплексной ПЦР для генотипирования локусов *E3* и *E4* в сравнении с традиционным подходом раздельной амплификации, а также скрининг аллельного состояния генов *E1*, *E2*, *E3* и *E4* у 11 сортов сои различного эколого-географического происхождения, возделываемых в Амурской области. ДНК выделяли из семян с использованием набора «ДНК-Экстрен-3». Генотипирование проводили методом ПЦР с аллель-специфичными праймерами: для *E3* и *E4* реакцию выполняли как в мультиплексном, так и в раздельном форматах, для *E1* и *E2* – только в раздельных реакциях; локус *E2* анализировали с использованием CAPS-маркера после рестрикции эндонуклеазой DraI. Установлено, что все изученные сорта несут нефункциональные аллели *E1* (*e1-as* или *e1-fs*); все образцы, за исключением сорта Саска, имеют рецессивный (нефункциональный) аллель *e2-ns* в гомозиготном состоянии, тогда как сорт Саска имеет только доминантный вариант *E2*. По гену *E3* выявлены аллели *E3-Ha* (5 сортов) и *e3-tr* (6 сортов); по гену *E4* только сорт Hidaka содержит мутантный аллель *e4-SORE*, остальные несут функциональный *E4*. Показано, что мультиплексная ПЦР дает результаты, полностью совпадающие с раздельной амплификацией, при этом существенно сокращая трудозатраты и расход реактивов. Наибольший потенциал скороспелости выявлен у сорта Hidaka, сочетающего четыре нефункциональных аллеля (*e1-fs*, *e2-ns*, *e3-tr*, *e4-SORE*). Полученные данные могут быть использованы для целенаправленного подбора родительских форм в селекции на адаптацию к условиям длинного дня.

Ключевые слова: соя (*Glycine max*), фотопериодическая чувствительность, гены *E1–E4*, аллель-специфичные маркеры, мультиплексная ПЦР, скороспелость, генотипирование, молекулярные маркеры

Для цитирования: Катрушенко А. А., Тимкин П. Д., Пензин А. А., Галиченко А. П. Генотипирование генов *E1–E4* сортов сои с использованием аллель-специфичных маркеров: апробация мультиплексной ПЦР для локусов *E3* и *E4* // Дальневосточный аграрный вестник. 2026. Том 20. № 3. С. 26–37. <https://doi.org/10.22450/1999-6837-2026-20-3-26-37>.

Original article

Genotyping of soybean *E1–E4* genes using allele-specific markers: validation of multiplex PCR for the *E3* and *E4* loci**Anastasiya A. Katrushenko¹, Pavel D. Timkin²,
Andrei A. Penzin³, Anna P. Galichenko⁴**^{1, 2, 3, 4} All-Russian Research Institute of Soybean

Amur region, Blagoveshchensk, Russian Federation

¹ lsi@vniisoi.ru, ² tpd@vniisoi.ru, ³ paa@vniisoi.ru, ⁴ gap@vniisoi.ru

Abstract. Photoperiod sensitivity of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) limits its cultivation at high latitudes. Therefore, assessing the allelic composition of key genes *E1–E4*, which control flowering and maturation, is an important task for breeding programs. The aim of this study was to validate multiplex PCR for genotyping the *E3* and *E4* loci in comparison with the conventional approach of separate amplification, as well as to screen the allelic state of genes *E1*, *E2*, *E3*, and *E4* in 11 soybean varieties of different ecogeographical origin cultivated in the Amur region. DNA was isolated from seeds using the DNA-Extran-3 kit. Genotyping was performed by PCR with allele-specific primers: for *E3* and *E4*, the reaction was performed in both multiplex and separate formats, while for *E1* and *E2*, only separate reactions were used. The *E2* locus was analyzed using a CAPS marker after restriction with the *DraI* endonuclease. It was found that all studied varieties carry non-functional *E1* alleles (*e1-as* or *e1-fs*); all varieties, except for *Saska*, carry the recessive (non-functional) *e2-ns* allele in a homozygous state, while *Saska* has only the dominant *E2* variant. For the *E3* gene, the *E3-Ha* (5 varieties) and *e3-tr* (6 varieties) alleles were detected; for the *E4* gene, only the *Hidaka* variety contains the mutant allele *e4-SORE*, the others carry the functional *E4*. It was shown that multiplex PCR gives results that are completely consistent with separate amplification, while significantly reducing labor costs and reagent consumption. The greatest potential for early maturity was found in the *Hidaka* variety, which combines four non-functional alleles (*e1-fs*, *e2-ns*, *e3-tr*, *e4-SORE*). The obtained data can be used for targeted selection of parental forms in breeding for adaptation to long-day conditions.

Keywords: soybean (*Glycine max*), photoperiod sensitivity, *E1–E4* genes, allele-specific markers, multiplex PCR, early maturity, genotyping, molecular markers

For citation: Katrushenko A. A., Timkin P. D., Penzin A. A., Galichenko A. P. Genotyping of soybean *E1–E4* genes using allele-specific markers: validation of multiplex PCR for the *E3* and *E4* loci. *Dal'nevostochnyi agrarnyi vestnik*. 2026;20;3:26–37. (in Russ.). <https://doi.org/10.22450/1999-6837-2026-20-3-26-37>.

Введение. Соя (*Glycine max* (L.) Merrill) является растением короткого дня, что обуславливает ее чувствительность к фотопериоду и, как следствие, сужает естественный ареал распространения культуры в пределах ограниченного диапазона широт. Несмотря на эту особенность, соя остается важнейшей в мире зернобобовой культурой [1].

Фотопериодизм представляет собой физиологическую реакцию растений на изменение продолжительности светлого и темного времени суток. Впервые это явление было описано у сои и табака, а впоследствии его присутствие подтверждено у широкого круга видов. Изучение фотопериодической реакции заложило основу для понимания механизмов регуляции сезонных ритмов у растений – от инициации цветения до процессов роста и репродуктивного развития. Кроме того, фотопериод определяет также смену этапов развития и продолжительность всего вегетационного периода.

Время наступления цветения и созревания относится к экологически и агрономически значимым признакам, определяющих успешность адаптации сортов сои. Поскольку фотопериодическая

реакция у сои выражена ярко, в условиях длинного светового дня, характерного для высоких широт, востребованы генотипы с пониженной чувствительностью к фотопериоду, способные полностью созреть до наступления осенних заморозков [2–4].

В северных широтах, где продолжительный день сочетается с укороченным безморозным периодом, многие традиционные сорта растений демонстрируют значительное замедление переходов к цветению и созреванию. Такое фенотипическое проявление напрямую сдвигает сроки уборочных работ и негативно отражается на количественных и качественных показателях урожая [5].

При продвижении с юга на север вегетационный период сои закономерно удлиняется. Цветение и созревание сои находится под контролем множества генов, среди которых 12 локусов – *E1–E11* и *J*. Особое значение имеют гены *E1–E4*, которые вносят решающий вклад в адаптацию сортов к различным широтам, определяют чувствительность к фотопериоду и влияют на продолжительность вегетационного периода от прорастания до цветения и созревания [6, 7].

Фотопериодическая регуляция цветения и созревания сои опосредована сложной сетью генетических взаимодействий. Доказано, что локусы *E1*, *E3*, *E4* и *E7* непосредственно чувствительны к фотопериоду и условиям освещения; при этом *E1*, *E3* и *E4* взаимодействуют с *E2*, *E9* и *J*, совместно контролируя переход к цветению и созреванию [8, 9].

По характеру наследования все доминантные аллели, обуславливающие позднее цветение (*E1*, *E2*, *E3*), проявляют частичное доминирование над соответствующими рецессивными аллелями раннего цветения (*e1*, *e2*, *e3*) [8]. Сорта, несущие доминантные варианты генов *E1–E4*, демонстрируют выраженную задержку цветения и созревания, тогда как рецессивные аллели этих локусов снижают фотопериодическую чувствительность и ускоряют развитие. При этом каждый из четырех локусов выполняет специфические функции в регуляции сроков цветения и созревания [8, 10, 11].

Локус *E1* кодирует специфичный для бобовых транскрипционный фактор с доменом ВЗ, который подавляет цветение. Он оказывает наиболее сильное влияние на время цветения при различных условиях окружающей среды [8]. Среди его мутантных аллелей: *e1-fs* (делеция одного нуклеотида со сдвигом рамки считывания) и *e1-nl* (полная делеция гена) – полностью нефункциональны, тогда как *e1-as* (миссенс-мутация) частично сохраняет активность, и сорта с этим генотипом занимают промежуточное положение по срокам цветения и созревания между растениями с функциональным *E1* и полностью утратившим функцию *e1-fs* [10].

Локус *E2* проявляет высокую гомологию с белком GIGANTEA арабидопсиса, участвующим в циркадном ритме, и действует как ингибитор цветения в условиях длинного дня. Это указывает на эволюционную консервативность фотопериодического пути регуляции цветения среди покрытосеменных растений. У сои выявлено 3 ортолога GIGANTEA с разными функциями, при этом *E2* связан с регуляцией процессов цветения и циркадного ритма. Это второй по значимости локус, определяющий фотопериодическую чувствительность сои. Его рецессивный аллель *e2-ns* несет нонсенс-мутацию (однонукле-

отидную замену, приводящую к преждевременному стоп-кодону), что делает белок нефункциональным и устраняет задерживающий цветение эффект [7, 8, 10].

Гены *E3* и *E4* кодируют изоформы фитохрома А (GmPhyA3 и GmPhyA2 соответственно) и контролируют цветение при различном соотношении красного и дальнего красного света (R/FR): *E3* реагирует на высокое отношение R/FR, *E4* – на низкое. Доминантные аллели *E3* и *E4* активируют экспрессию *E1*, что ведет к позднему цветению как при коротком, так и при длинном дне, тогда как рецессивные варианты *e3* и *e4* обуславливают нечувствительность к длинному фотопериоду и более ускоренное развитие [7].

Аллели *E3-Mi* и *E3-Ha* кодируют функциональный белок, тогда как мутантные варианты *e3-ns*, *e3-tr*, *e3-fs* и *e3-Mo* приводят к образованию нефункционального продукта. Среди рецессивных аллелей локуса *E4* наиболее частым в сортах из разных регионов мира является аллель *e4-SORE*, возникший вследствие вставки ретротранспозона. Он обуславливает синтез укороченного белка. Другие мутантные аллели (*e4-oto*, *e4-tsu*, *e4-kam* и *e4-kes*) встречаются значительно реже [6, 10, 11].

Несмотря на то, что в настоящее время идентифицировано 11 локусов *E*-серии (*E1–E11*) и ген *J*, контролирующих фотопериодическую реакцию и сроки цветения сои, большинство исследований посвящено генам *E1*, *E2*, *E3* и *E4*. Эти четыре локуса были клонированы и детально охарактеризованы на молекулярном уровне раньше других, что позволило идентифицировать их основные функциональные и нефункциональные аллели и разработать надежные аллель-специфичные маркеры. Хорошо изучены их основные аллельные варианты (например, *e1-as*, *e1-fs*, *e2-ns*, *e3-tr*, *e4-SORE*). Также клонированы и частично охарактеризованы *E9* и *J* [3, 12]. Для остальных генов (*E5–E11* и *J*) молекулярная структура либо еще не установлена, либо они только картированы на хромосомах. Существование некоторых локусов (например, *E5*) до сих пор не подтверждено на молекулярном уровне [7].

Для идентификации аллельных вариантов генов фотопериодизма в настоящее время широко используются молекулярно-генетические методы, среди которых

наиболее распространены аллель-специфичная ПЦР (AS-PCR) и ПЦР с последующим рестрикционным анализом (CAPS). Данные подходы позволяют проводить анализ большого количества образцов с высокой точностью и воспроизводимостью.

Аллельные вариации *E1–E4* генов рассматриваются как главные генетические детерминанты, определяющие адаптацию сортов к различным широтным условиям. Их аллельные комбинации могут объяснить 62–66 % различий в цветении сои, указывая на то, что они играют важную роль в определении сроков цветения сои и зоны произрастания [3, 10]. Кроме того, гены *E1* и *E2* обладают плейотропным действием, влияя не только на сроки цветения, но и на признаки, связанные с урожайностью и качеством семян, что делает их особенно привлекательными для селекции [3]. Это подчеркивает ключевую роль аллельного состава локусов *E1–E4* в фотопериодической реакции сои.

Возделывание сои в Амурской области сосредоточено в широтном диапазоне от 49 до 53 градусов северной широты, где относительно короткий безморозный период варьирует от 90–100 дней на севере до 120–130 дней на юге, а продолжительность светового дня в летние месяцы достигает 16–17 часов. Такие условия требуют использования сортов с пониженной фотопериодической чувствительностью, способных завершать полный цикл развития в сжатые сроки. В регионе возделывается широкий спектр сортов, адаптированных к местным условиям, однако преобладающая часть из них относится к среднеспелой группе [13].

Целями исследований являлись:

1. *Апробация мультиплексного формата ПЦР для одновременной детекции аллелей генов *E3* и *E4* в сравнении с традиционным подходом раздельной ПЦР каждой парой праймеров.*

2. *Оценка аллельного состава локусов *E1–E4* у коллекции из 11 сортов сои различного происхождения, выращиваемых в Амурской области, для определения их фотопериодической реакции и прогноза скороспелости в условиях высоких широт.*

Материалы и методы исследований. Объектом исследований служили 11 сортов сои различного эколого-геогра-

фического происхождения: Jim (США), Саска (Канада), Киото (Канада), Терек (Украина), Кордоба (Австрия), НС Катя (Сербия), Нidaka (Япония), Хэйхэ 12 и Хэйхэ 43 (КНР), а также два сорта селекции Всероссийского научно-исследовательского института сои – Сентябрька и Куханна. Семена урожая 2025 г.

Выделение геномной ДНК проводили из семян (предварительно удаляли семенные оболочки) с использованием набора «ДНК-Экстрем-3» (Синтол, Россия) согласно протоколу производителя. Анализировали по 5 индивидуальных семян каждого сорта, что позволяло оценить внутрисортную однородность по исследуемым локусам.

Концентрацию и чистоту ДНК оценивали на спектрофотометре EZDrop (Blue-Ray Biotech, Китай). Для анализа отбирали образцы с отношением оптических плотностей A260/A280 в интервале 1,8–2,0 и концентрацией ~100 нг/мкл.

ПЦР-амплификацию проводили на амплификаторе QuantGene 9600 (Bioer, Китай) с использованием аллель-специфичных праймеров для генов *E1*, *E2*, *E3* и *E4* (табл. 1), подобранных по литературным данным.

Состав реакционной смеси (общий объем 25 мкл): 12,5 мкл 2× ПЦР-смеси БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (Биолабмикс, Россия); по 1 мкл прямого и обратного праймеров; 1 мкл ДНК-матрицы, а также 9,5 мкл стерильной деионизированной воды. Для мультиплексной ПЦР генов *E3* и *E4* в реакционную смесь добавляли по 0,6 мкл каждого из четырех праймеров (для *E3*) и по 0,8 мкл каждого из трех праймеров (для *E4*), корректируя объем воды. Исходные стоковые растворы праймеров, имеющие концентрацию 100 мкМ, перед использованием разводили дистиллированной водой в 50 раз, получая рабочие растворы концентрацией 2 мкМ.

Дополнительно для верификации результатов проводили раздельную амплификацию каждой парой праймеров для генов *E3* (с парами FR1, FR2, FR3) и *E4* (с парами FR1, FR2).

Программа амплификации включала следующие этапы:

– предварительная денатурация при температуре 95 °C (5 мин);

Таблица 1 – Используемые аллель-специфичные праймеры

Table 1 – Allele-specific primers used in this study

Ген/ аллель	Последовательность (5'→3')	Длина продукта, пар нуклеотидов	Рекомендуемая температура отжига, °C	Номер источника
<i>E1</i>	F: GGGAGCAGTGTCAAAAGAAGAG R: GTGCTATCCCTTAGTTAATTAAATA	1 403	60	14
<i>E1/e1-fs/ e1-nl</i>	F: CACTCAAATTAAGCCCTTTCA R: TCCGATCTCATCACCTTTCC	547	55	15
<i>e1-as</i>	F: GGGAGCAGTGTCAAAAGAAGAC R: GTGCTATCCCTTAGTTAATTAAATT	1 403	60	14
<i>E2</i> (CAPS- маркер)	F: GAAGCCCATCAGAGGCATGTCTTATT R: AAGCCTATGCCAGCTAGGTATTT	<i>E2</i> : 130 <i>e2-ns</i> : 107+23	55	16
<i>E3</i>	F: TGGAGGGTATTGGATGATGC R1: CTAAGTCCGCCTCTGGTTTCAG R2: CGGTCAAGAGCCAACATGAG R3: GTCCTATACAATTCTTTACGACG	<i>E3-Mi</i> : 1 339 <i>E3-Ha</i> : 558 <i>e3-tr</i> : 275	58	17
<i>E4</i>	F: AGACGTAGTGCTAGGGCTAT R1: GCATCTCGCATCACCAGATCA R2: GTCATCCCTTCGAATTCAG	<i>E4</i> : 1 229 <i>e4-SORE-1</i> : 837	58	18

– 40 циклов: денатурация при температуре 95 °C (10 с), отжиг праймеров при 55–62 °C (в зависимости от пары) (20 с), элонгация при 72 °C (30 с);

– финальная элонгация при температуре 72 °C (5 мин).

Для генотипирования локуса *E2* использовали CAPS-маркер: после ПЦР продукты гидролизуют эндонуклеазой рестрикции *DraI* (СибЭнзим, Россия) согласно рекомендациям производителя. Смесь общим объемом 20 мкл состояла из ПЦР-продукта (8 мкл), 10× SE-буфера *G* (2 мкл), BSA (2 мкл), *DraI* (2 мкл) и воды (6 мкл). Условия инкубации: ночь (16 час) при температуре 37 °C, затем 20 мин при 65 °C для инактивации фермента.

Для оптимизации мультиплексной ПЦР проводили подбор температуры отжига в диапазоне от 58 до 65 °C. Критериями оптимальности служили наличие целевого продукта ожидаемого размера, отсутствие неспецифических фрагментов и сопоставимая интенсивность амплификации всех аллелей в мультиплексной реакции по сравнению с отдельной.

Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1,5-процентном агарозном геле с добавлением бромистого этидия в камере для горизонтального электрофореза SE-1 (Хеликон, Россия) в

0,5×TBE, с силой тока 50 мА и напряжением 100 В. Визуализацию и документирование результатов осуществляли в системе Gel Doc Ez Imager (Bio-Rad, США).

В качестве маркеров молекулярной массы использовали ДНК-маркеры 50 bp или 100 bp+ (Евроген, Россия).

Результаты исследований и их обсуждение. В результате генотипирования 11 сортов сои по локусам *E1–E4* установлен аллельный состав каждого образца (табл. 2). Ни один из исследованных сортов не содержит функционального (доминантного) аллеля *E1*: все образцы несут либо *e1-as* (миссенс-мутация с частичной потерей функции), либо *e1-fs* (мутация со сдвигом рамки считывания, полностью утрачивающая функцию).

По локусу *E2* у 10 из 11 изученных сортов выявлен рецессивный аллель *e2-ns* в гомозиготном состоянии. Исключение составляет сорт Саска, который является гомозиготным по функциональному аллелю *E2*. По гену *E3* распределение следующее: 5 сортов (Терек, НС Катя, Киото, Саска, Сентябрька) имеют аллель *E3-Ha*, 6 сортов (Jim, Hidaka, Хэйхэ 12, Хэйхэ 43, Кордоба, Куханна) – аллель *e3-tr*.

По локусу *E4* доминантный аллель выявлен у всех сортов, за исключением Hidaka, у которого детектирован мутант-

Таблица 2 – Аллельный состав *E1–E4* проанализированных сортовTable 2 – Allelic composition of *E1–E4* in the analyzed varieties

Сорт	<i>E1</i>	<i>E2</i>	<i>E3</i>	<i>E4</i>
Jim	<i>e1-as</i>	<i>e2-ns</i>	<i>e3-tr</i>	<i>E4</i>
Терек	<i>e1-as</i>	<i>e2-ns</i>	<i>E3-Ha</i>	<i>E4</i>
НС Катя	<i>e1-as</i>	<i>e2-ns</i>	<i>E3-Ha</i>	<i>E4</i>
Hidaka	<i>e1-fs</i>	<i>e2-ns</i>	<i>e3-tr</i>	<i>e4-SORE</i>
Хэйхэ 12	<i>e1-as</i>	<i>e2-ns</i>	<i>e3-tr</i>	<i>E4</i>
Хэйхэ 43	<i>e1-as</i>	<i>e2-ns</i>	<i>e3-tr</i>	<i>E4</i>
Саска	<i>e1-fs</i>	<i>E2</i>	<i>E3-Ha</i>	<i>E4</i>
Киото	<i>e1-fs</i>	<i>e2-ns</i>	<i>E3-Ha</i>	<i>E4</i>
Кордоба	<i>e1-fs</i>	<i>e2-ns</i>	<i>e3-tr</i>	<i>E4</i>
Сентябринка	<i>e1-as</i>	<i>e2-ns</i>	<i>E3-Ha</i>	<i>E4</i>
Куханна	<i>e1-as</i>	<i>e2-ns</i>	<i>e3-tr</i>	<i>E4</i>

ный аллель *e4-SORE*. Всего среди изученных сортов по генам *E1–E4* выявлено четыре комбинации аллелей.

Скороспелость сортов коррелирует с накоплением рецессивных (нефункциональных) вариантов изученных генов. Наиболее раннеспелый генотип – Hidaka, сочетающий четыре нефункциональных аллеля: *e1-fs* (полная потеря функции *E1*), *e2-ns* (нефункциональный *E2*), *e3-tr* (нефункциональный *E3*) и *e4-SORE* (нефункциональный *E4*). Такая комбинация обеспечивает максимальную фотопериодическую нейтральность и, следовательно, наиболее раннее цветение и созревание среди всех рассматриваемых сортов.

К группе раннеспелых сортов отнесены также Jim, Хэйхэ 12, Хэйхэ 43, Кордоба и Куханна, которые несут нефункциональный *E1* (*e1-as* или *e1-fs*) в сочетании с *e2-ns* и *e3-tr* при сохранении функционального *E4*. Наличие *e3-tr* снижает фотопериодическую чувствительность и ускоряет развитие по сравнению с генотипами, сохраняющими функциональный *E3*.

Группа среднеспелых сортов (Терек, НС Катя, Киото, Сентябринка) характеризуется наличием нефункциональных *E1* (*e1-as* или *e1-fs*) и *e2-ns*, но сохраняет функциональный *E3* (*E3-Ha*), что частично замедляет переход к цветению. Наиболее поздним в этой группе является сорт Саска – единственный среди изученных, несущий функциональный аллель *E2* (без мутации *e2-ns*). Доминантный *E2* усиливает ингибирующий эффект на цветение в условиях длинного дня, что делает

сорт Саска более поздним по сравнению с остальными среднеспелыми сортами, несмотря на наличие *e1-fs*.

Сравнение полученных результатов с литературными данными выявило общие закономерности в распределении аллелей *E1–E4*.

По общей аллельной структуре: сочетание нефункциональных аллелей *E1* (у всех сортов), *E2* (у 10 из 11 сортов) и *E3* (у 6 из 11 сортов) представляет собой типичный аллельный профиль для сортов, адаптированных к условиям высоких широт, и хорошо согласуется с литературными данными для северных регионов.

Анализ аллельных комбинаций, проведенный в работе Jia с соавторами для сортов Северо-Восточного Китая и Дальнего Востока России, выявил широкий спектр из семи генотипов по локусам *E1–E4*; при этом локусы *E1* и *E2* были представлены преимущественно рецессивными аллелями [19]. Авторы отметили разнообразие аллельных комбинаций, обеспечивающих раннее созревание в высоких широтах. В исследованных нами сортах также наблюдается несколько комбинаций, различающихся по сочетанию функциональных и нефункциональных аллелей *E1–E4*. Это подтверждает, что селекция на скороспелость в северных регионах не сводится к единственному «оптимальному» генотипу, а допускает несколько равнозначных вариантов.

В работе Miladinović с соавторами описывается, что линии сортов североамериканского происхождения относительно

равномерно распределены между несколькими разными гаплогруппами, наиболее распространенной из которых является *e1-as/e2/E3/E4* [3]. Часть европейских сортов, рассмотренных в этой работе, имела аллельный состав *e1-as/E2/E3/E4*; примерно та же часть – *e1-as/E2/e3-tr/E4*; при этом небольшая часть имела гаплогруппу *e1-as/e2/E3/E4*. Также среди сербских сортов *e1-as/e2/E3/E4* имеют больше половины генотипов. Большинство образцов из Китая имели *e1-as/e2/e3-tr/E4*.

По локусу *E1* наши данные согласуются с опубликованными работами. Так, в работе Kurasch с соавторами показано, что среди исследованных европейских сортов чувствительный к фотопериоду аллель *E1* также отсутствует; при этом все образцы содержали либо полностью нефункциональный *e1-nl*, либо частично функциональный *e1-as* [1]. Аналогичная картина описана для американских и северо-восточных китайских сортов, где доминирует аллель *e1-as* [6]. В нашей коллекции распределение *e1-as* (7 из 11 сортов) и *e1-fs* (4 из 11 сортов) соответствует ранее описанным закономерностям для северных экотипов, у которых селекционное давление направлено на утрату функции *E1* как основного репрессора цветения в условиях длинного дня.

По локусу *E2* наши данные полностью согласуются с большинством литературных источников: у 10 из 11 изученных сортов выявлен рецессивный гомозиготный генотип *e2-ns/e2-ns*, что характерно для раннеспелых и среднеспелых сортов из северных регионов. В работе Zhang с соавторами у китайских сортов также преобладали гомозиготные генотипы *e2-ns*, частота которых возрастала в раннеспелых группах [10]. Это подтверждает, что селекция на сокращение вегетационного периода в условиях длинного дня направлена на фиксацию нефункционального аллеля *e2-ns*, который устраняет ингибирующий эффект *E2* на цветение. Исключение составляет сорт Саска, гомозиготный по функциональному *E2*; он может представлять интерес для селекционных программ, направленных на создание сортов с контролируемой задержкой цветения или для использования в качестве донора доминантного аллеля в гибридизации. В литературе также чаще всего описаны

преимущественно гомозиготные генотипы: рецессивные *e2/e2* для сербских, американских и китайских сортов или функциональные *E2/E2* для части европейских линий [3, 20].

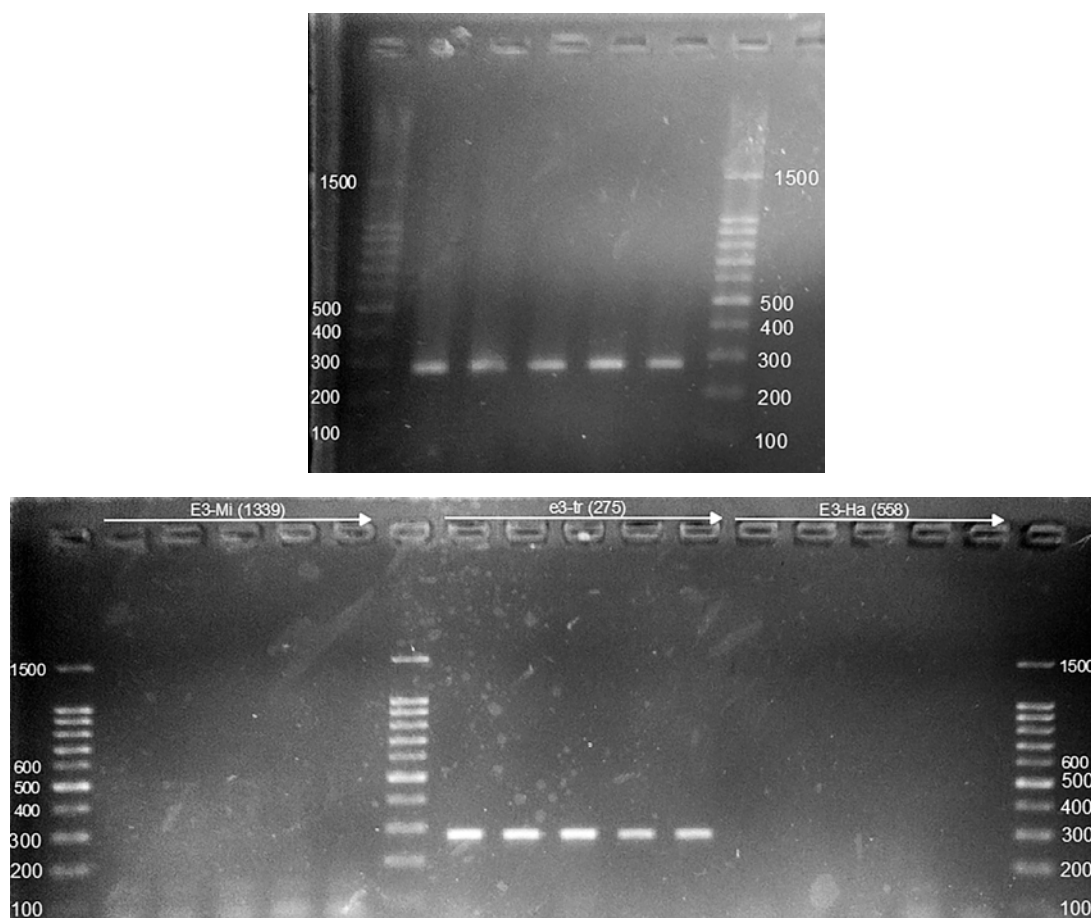
По локусу *E3* наши данные хорошо согласуются с региональными закономерностями. В работе Miladinović с соавторами часть европейских сортов имела аллель *E3-Ha*, другая часть – *e3-tr*, что обнаружено и в нашей работе (два европейских сорта с *E3-Ha* и один сорт с *e3-tr*) [3]. В исследовании у китайских сортов из бассейна Хуан-Хуай-Хай и Северо-Западного Китая все изученные образцы несли функциональные аллели *E3* (*E3-Ha* или *E3-Mi*), тогда как *e3-tr* не встречался [10]. Это отличие обусловлено, по-видимому, тем, что указанный регион Китая находится в более низких широтах, где необходимость в нефункциональном *E3* для ускорения созревания менее критична. В то же время для сортов северных регионов Китая (провинция Хэйлунцзян) характерны генотипы с несколькими рецессивными аллелями, включая *e3-tr*, который присутствует в исследованных в нашей работе северо-китайских сортах Хэйхэ 12 и Хэйхэ 43 [20]. Это подтверждает связь этого аллеля с адаптацией к высоким широтам.

По локусу *E4* анализируемые в нашем исследовании сорта в целом соответствуют литературным данным для большинства изученных регионов. В работе Zhang с соавторами все китайские сорта несли функциональный *E4* [10]. Из всех изученных в работе Miladinović с соавторами генотипов только небольшая часть из Северной Америки и Китая имела нефункциональный аллель *e4* [3]. В нашей выборке у большинства сортов также функциональный *E4*. Исключением является сорт Hidaka, у которого детектирован мутантный аллель *e4-SORE*. Этот аллель был ранее описан у образцов культурной сои из северных регионов Японии и обеспечивает максимальное ускорение цветения в сочетании с другими рецессивными аллелями [21]. Отсутствие *e4-SORE* у остальных изученных сортов указывает на то, что данный аллель является относительно редким и имеет строгое географическое происхождение, что подтверждает его уникальную ценность для селекции на скороспелость.

Сравнительный анализ мультиплексного и отдельного форматов ПЦР для генов *E3* и *E4* показал полное совпадение результатов: состав аллелей, определенный в мультиплексной реакции, совпадает с результатом при отдельной амплификации каждой парой праймеров. На примере сорта Куханна (имеющего только аллель *e3-tr*) продемонстрировано, что мультиплексная ПЦР дает четкий бэнд ожидаемого размера (275 пар нуклеотидов) в одной реакции, тогда как для получения того же результата в отдельном формате требуется постановка трех независимых ПЦР (рис. 1). Таким

образом, мультиплексный подход является надежным и более эффективным, сокращая трудозатраты и расход реактивов без потери специфичности и чувствительности.

При стандартной для праймерных систем к *E3* и *E4* температуре отжига (58 °C), рекомендованной в литературных источниках, в ПЦР-продуктах наблюдались неспецифические полосы, что, вероятно, может быть связано с недостаточной жесткостью условий гибридизации. Повышение температуры до 65 °C, наоборот, приводило к значительному снижению эффективности амплификации – в большинстве образцов



во всех пяти повторах виден только бэнд 275 п. н., соответствующий аллелю *e3-tr*; полосы *E3-Mi* (1 339) и *E3-Ha* (558) отсутствуют, так как у сорта Куханна отсутствуют оба эти аллеля; маркер длин ДНК – 100 bp+

in all five replicates, only the 275 bp band corresponding to the *e3-tr* allele is visible; the *E3-Mi* (1 339 bp) and *E3-Ha* (558 bp) bands are absent, as the variety Kukhanna lacks both of these alleles; DNA ladder – 100 bp+

Рисунок 1 – Электрофореграмма ампликонов, полученных мультиплексной ПЦР (верхний рисунок) и после трех отдельных ПЦР (отдельно для *E3-Mi*, *e3-tr* и *E3-Ha*) (нижний рисунок) для одного и того же сорта (Куханна, по пять образцов)

Figure 1 – Electropherogram of amplicons obtained by multiplex PCR (upper figure) and three separate PCR reactions (separately for *E3-Mi*, *e3-tr* and *E3-Ha*) (lower figure) for the same variety (Kukhanna, 5 samples each)

не детектировались целевые продукты. В связи с этим была подобрана оптимальная температура отжига, составившая 62 °C: при этом значении достигается четкая амплификация продукта ожидаемого размера и полное отсутствие неспецифических фрагментов. Эта закономерность наблюдалась как для мультиплексного, так и для раздельного формата ПЦР.

Заключение. В ходе выполнения работы проведена апробация мультиплексной ПЦР для генотипирования генов *E3* и *E4* у 11 сортов сои. Мультиплексный формат дает результаты, полностью идентичные раздельной амплификации каждой парой праймеров, при этом позволяет значительно сократить количество ПЦР-реакций, расход реактивов и время анализа.

Анализ аллельного состава локусов *E1–E4* выявил, что все изученные сорта несут нефункциональные аллели *E1*; 10

из 11 сортов являются гомозиготными по рецессивному аллелю *e2-ns*; по генам *E3* и *E4* распределение аллелей варьирует.

Наибольший адаптационный потенциал для возделывания в условиях длинного дня (высоких широт) имеет сорт Hidaka, сочетающий все четыре нефункциональных аллеля (*e1-fs*, *e2-ns*, *e3-tr* и *e4-SORE*), что обеспечивает максимальную фотопериодическую нейтральность.

Сорта Jim, Хэйхэ 12, Хэйхэ 43, Кордоба и Куханна, несущие *e1*, *e2-ns* и *e3-tr*, также перспективны для селекции на скороспелость.

Полученные данные могут быть использованы для целенаправленного подбора родительских форм в селекционных программах, направленных на создание сортов сои, адаптированных к условиям высоких широт.

Список источников

1. Kurasch A. K., Hahn V., Leiser W. L., Vollmann J., Schori A., Bétrix C. A. [et al.]. Identification of mega-environments in Europe and effect of allelic variation at maturity *E* loci on adaptation of European soybean // Plant, Cell & Environment. 2017. Vol. 40. No. 5. P. 765–778. doi: 10.1111/pce.12896.
2. Zhai H., Lü S., Wang Y., Chen X., Ren H., Yang J. [et al.]. Allelic variations at four major maturity *E* genes and transcriptional abundance of the *E1* gene are associated with flowering time and maturity of soybean cultivars // PLoS One. 2014. Vol. 9. No. 5. Art. e97636. doi: 10.1371/journal.pone.0097636.
3. Miladinović J., Čeran M., Đorđević V., Balešević-Tubić S., Petrović K., Đukić V. [et al.]. Allelic variation and distribution of the major maturity genes in different soybean collections // Frontiers in Plant Science. 2018. No. 9. P. 1286. doi: 10.3389/fpls.2018.01286.
4. Lin X., Liu B., Weller J. L., Abe J., Kong F. Molecular mechanisms for the photoperiodic regulation of flowering in soybean // Journal of Integrative Plant Biology. 2021. Vol. 63. No. 6. P. 981–994. doi: 10.1111/jipb.13021.
5. Иванов С. В., Рамазанова С. А., Гучетль С. З. Использование аллель-специфичных молекулярных маркеров для скрининга аллельного состояния генов фотопериодической реакции в сортах сои // Масличные культуры. 2025. № 4 (204). С. 22–30. doi: 10.25230/2412-608X-2025-4-204-22-30. EDN GLCYKO.
6. Крупин П. Ю., Омелянюк Л. В., Самарина М. А., Архипов А. В., Асанов А. М., Ульянов Д. С. [и др.]. Анализ аллельной структуры генов фотопериодизма *E1–E4* в коллекции сои и ее влияния на сроки и продолжительность цветения в условиях Омской области // Российские нанотехнологии. 2024. Т. 19. № 6. С. 781–795. doi: 10.56304/S1992722324602544. EDN FOOVQB.
7. Федорина Я. В., Хлесткина Е. К., Сеферова И. В., Вишнякова М. А. Молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе продвижения ареала возделывания сои к северу // Экологическая генетика. 2022. Т. 20. № 1. С. 13–30. <https://doi.org/10.17816/ecogen83879>. EDN ILIPDF.
8. Xia Z., Zhai H., Wu H., Xu K., Watanabe S., Harada K. The synchronized efforts to decipher the molecular basis for soybean maturity loci *E1*, *E2*, and *E3* that regulate flowering and maturity // Frontiers in Plant Science. 2021. No. 12. P. 632754. doi: 10.3389/fpls.2021.632754.

9. Gupta S., Kumawat G., Agrawal N., Tripathi R., Rajesh V., Nataraj V. [et al.]. Photoperiod trait: Insight in molecular mechanism for growth and maturity adaptation of soybean (*Glycine max*) to different latitudes // Plant Breeding. 2022. No. 4 (141). P. 483–500. doi: 10.1111/pbr.13041.
10. Zhang X., Wu T., Wen H., Song W., Xu C., Han T. [et al.]. Allelic variation of soybean maturity genes *E1–E4* in Huang-Huai-Hai river valley and Northwest China // Agriculture. 2021. Vol. 11. No. 6. P. 478. doi: 10.3390/agriculture11060478.
11. Синявская М. Г., Александрович В. В., Воронкова Е. В., Томашова А. Ю., Шатарнов О. П. Генетика признака «фотопериодическая реакция» у сои // Молекулярная и прикладная генетика. 2025. Т. 38. С. 133–143. EDN XLWNYF.
12. Liu L., Song W., Wang L., Sun X., Qi Y., Wu T. [et al.]. Allele combinations of maturity genes *E1–E4* affect adaptation of soybean to diverse geographic regions and farming systems in China // PLoS One. 2020. Vol. 15. No. 7. Art. e0235397. doi: 10.1371/journal.pone.0235397.
13. Фокина Е. М., Беляева Г. Н., Титов С. А. Новые сорта сои для Дальневосточного региона // Дальневосточный аграрный вестник. 2020. № 3 (55). С. 68–75. doi: 10.22450/1999-6837-2020-3-68-75. EDN GUITGP.
14. Перфильев Р. Н., Щербань А. Б., Салина Е. А. Разработка панели маркеров для генотипирования отечественных сортов сои по генам, контролирующим срок вегетации и реакцию на фотопериод // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021. Т. 25. № 7. С. 761–769. doi: 10.18699/VJ21.087. EDN DKOSYA.
15. Xia Z., Watanabe S., Yamada T., Tsubokura Y., Nakashima H., Zhai H. [et al.]. Positional cloning and characterization reveal the molecular basis for soybean maturity locus *E1* that regulates photoperiodic flowering // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012. No. 32 (109). P. E2155–64. doi: 10.1073/pnas.1117982109.
16. Watanabe S., Xia Z., Hideshima R., Tsubokura Y., Sato S., Yamanaka N. [et al.]. A map-based cloning strategy employing a residual heterozygous line reveals that the *GIGANTEA* gene is involved in soybean maturity and flowering // Genetics. 2011. No. 2 (188). P. 395–407. doi: 10.1534/genetics.110.125062.
17. Watanabe S., Hideshima R., Xia Z., Tsubokura Y., Sato S., Nakamoto Y. [et al.]. Map-based cloning of the gene associated with the soybean maturity locus *E3* // Genetics. 2009. No. 4 (182). P. 1251–1262. doi: 10.1534/genetics.108.098772.
18. Liu B., Kanazawa A., Matsumura H., Takahashi R., Harada K., Abe J. Genetic redundancy in soybean photoresponses associated with duplication of the phytochrome A gene // Genetics. 2008. No. 2 (180). P. 995–1007. doi: 10.1534/genetics.
19. Jia H., Jiang B., Wu C., Lu W., Hou W., Sun S. [et al.]. Maturity group classification and maturity locus genotyping of early-maturing soybean varieties from high-latitude cold regions // PLoS One. 2014. Vol. 9. No. 4. Art. e94139. doi: 10.1371/journal.pone.0094139.
20. Zheng N., Guo Y., Wang S., Zhang H., Wang L., Gao Y. [et al.]. Identification of *E1–E4* allele combinations and ecological adaptability of soybean varieties from different geographical origins in China // Frontiers in Plant Science. 2023. No. 14. P. 1222755. doi: 10.3389/fpls.2023.1222755.
21. Tsubokura Y., Watanabe S., Xia Z., Kanamori H., Yamagata H., Kaga A. [et al.]. Natural variation in the genes responsible for maturity loci *E1*, *E2*, *E3* and *E4* in soybean // Annals of Botany. 2014. No. 3 (113). P. 429–441. doi: 10.1093/aob/mct269.

References

1. Kurasch A. K., Hahn V., Leiser W. L., Vollmann J., Schori A., Béatrix C. A. [et al.]. Identification of mega-environments in Europe and effect of allelic variation at maturity *E* loci on adaptation of European soybean. Plant, Cell & Environment, 2017;40;5:765–778. doi: 10.1111/pce.12896.
2. Zhai H., Lü S., Wang Y., Chen X., Ren H., Yang J. [et al.]. Allelic variations at four major maturity *E* genes and transcriptional abundance of the *E1* gene are associated with flowering time and maturity of soybean cultivars. PLoS One, 2014;9;5:e97636. doi: 10.1371/journal.pone.0097636.

3. Miladinović J., Čeran M., Dorđević V., Balešević-Tubić S., Petrović K., Đukić V. [et al.]. Allelic variation and distribution of the major maturity genes in different soybean collections. *Frontiers in Plant Science*, 2018;9:1286. doi: 10.3389/fpls.2018.01286.
4. Lin X., Liu B., Weller J. L., Abe J., Kong F. Molecular mechanisms for the photoperiodic regulation of flowering in soybean. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021;63;6:981–994. doi: 10.1111/jipb.13021.
5. Ivanov S. V., Ramazanov S. A., Guchetl S. Z. Use of allele-specific molecular markers for screening the allele status of photoperiodic response genes in soybean varieties. *Maslichnye kul'tury*, 2025;4(204):22–30. doi: 10.25230/2412-608X-2025-4-204-22-30. EDN GLCYKO (in Russ.).
6. Krupin P. Yu., Omelyanyuk L. V., Samarina M. A., Arkhipov A. V., Asanov A. M., Ulyanov D. S. [et al.]. Analysis of the allelic structure of *E1–E4* photoperiodism genes in the soybean collection and its effect on the timing and duration of flowering in the Omsk region. *Rossiiskie nanotekhnologii*, 2024;19;6:781–795. doi: 10.56304/S1992722324602544. EDN FOOVQB (in Russ.).
7. Fedorina Ya. V., Khlestkina E. K., Seferova I. V., Vishnyakova M. A. Molecular and genetic mechanisms underlying the advancement of soybean cultivation area to the north. *Ekologicheskaya genetika*, 2022;20;1:13–30. <https://doi.org/10.17816/ecogen83879>. EDN ILIPDF (in Russ.).
8. Xia Z., Zhai H., Wu H., Xu K., Watanabe S., Harada K. The synchronized efforts to decipher the molecular basis for soybean maturity loci *E1*, *E2*, and *E3* that regulate flowering and maturity. *Frontiers in Plant Science*, 2021;12:632754. doi: 10.3389/fpls.2021.632754.
9. Gupta S., Kumawat G., Agrawal N., Tripathi R., Rajesh V., Nataraj V. [et al.]. Photoperiod trait: Insight in molecular mechanism for growth and maturity adaptation of soybean (*Glycine max*) to different latitudes. *Plant Breeding*, 2022;4(141):483–500. doi: 10.1111/pbr.13041.
10. Zhang X., Wu T., Wen H., Song W., Xu C., Han T. [et al.]. Allelic variation of soybean maturity genes *E1–E4* in Huang-Huai-Hai river valley and Northwest China. *Agriculture*, 2021;11;6:478. doi: 10.3390/agriculture11060478.
11. Sinyavskaya M. G., Aleksandrovich V. V., Voronkova E. V., Tomashova A. Yu., Shatarnov O. P. Genetics of the trait "photoperiodic reaction" in soybean. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika*, 2025;38:133–143 EDN XLWNYF (in Russ.).
12. Liu L., Song W., Wang L., Sun X., Qi Y., Wu T. [et al.]. Allele combinations of maturity genes *E1–E4* affect adaptation of soybean to diverse geographic regions and farming systems in China. *PLoS One*, 2020;15;7:e0235397. doi: 10.1371/journal.pone.0235397.
13. Fokina E. M., Belyaeva G. N., Titov S. A. New soybean varieties for the Far East region. *Dal'nevostochnyi agrarnyi vestnik*, 2020;3(55):68–75. doi: 10.22450/1999-6837-2020-3-68-75. EDN GUITGP (in Russ.).
14. Perfil'yev R. N., Shcherban A. B., Salina E. A. Development of a marker panel for genotyping of domestic soybean cultivars for genes controlling the duration of vegetation and response to photoperiod. *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii*, 2021;25;7:761–769. doi: 10.18699/VJ21.087. EDN DKOSYA (in Russ.).
15. Xia Z., Watanabe S., Yamada T., Tsubokura Y., Nakashima H., Zhai H. [et al.]. Positional cloning and characterization reveal the molecular basis for soybean maturity locus *E1* that regulates photoperiodic flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012;32(109):E2155–64. doi: 10.1073/pnas.1117982109.
16. Watanabe S., Xia Z., Hideshima R., Tsubokura Y., Sato S., Yamanaka N. [et al.]. A map-based cloning strategy employing a residual heterozygous line reveals that the *GIGANTEA* gene is involved in soybean maturity and flowering. *Genetics*, 2011;2(188):395–407. doi: 10.1534/genetics.110.125062.
17. Watanabe S., Hideshima R., Xia Z., Tsubokura Y., Sato S., Nakamoto Y. [et al.]. Map-based cloning of the gene associated with the soybean maturity locus *E3*. *Genetics*, 2009;4(182):1251–1262. doi: 10.1534/genetics.108.098772.
18. Liu B., Kanazawa A., Matsumura H., Takahashi R., Harada K., Abe J. Genetic redundancy in soybean photoresponses associated with duplication of the phytochrome A gene. *Genetics*, 2008;2(180):995–1007. doi: 10.1534/genetics.

19. Jia H., Jiang B., Wu C., Lu W., Hou W., Sun S. [et al.]. Maturity group classification and maturity locus genotyping of early-maturing soybean varieties from high-latitude cold regions. PLoS One, 2014;9;4:e94139. doi: 10.1371/journal.pone.0094139.

20. Zheng N., Guo Y., Wang S., Zhang H., Wang L., Gao Y. [et al.]. Identification of *E1–E4* allele combinations and ecological adaptability of soybean varieties from different geographical origins in China. Frontiers in Plant Science, 2023;14:1222755. doi: 10.3389/fpls.2023.1222755.

21. Tsubokura Y., Watanabe S., Xia Z., Kanamori H., Yamagata H., Kaga A. [et al.]. Natural variation in the genes responsible for maturity loci *E1*, *E2*, *E3* and *E4* in soybean. Annals of Botany, 2014;3(113):429–441. doi: 10.1093/aob/mct269.

© Катрушенко А. А., Тимкин П. Д., Пензин А. А., Галиченко А. П., 2026

Статья поступила в редакцию 03.07.2026; одобрена после рецензирования 08.09.2026; принята к публикации 09.09.2026.

The article was submitted 03.07.2026; approved after reviewing 08.09.2026; accepted for publication 09.09.2026.

Информация об авторах

Катрушенко Анастасия Андреевна, младший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт сои, lsi@vniisoi.ru;

Тимкин Павел Дмитриевич, младший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт сои, tpd@vniisoi.ru;

Пензин Андрей Андреевич, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт сои, paa@vniisoi.ru;

Галиченко Анна Петровна, старший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт сои, gap@vniisoi.ru

Information about authors

Anastasiya A. Katrushenko, Junior Researcher, All-Russian Research Institute of Soybean, lsi@vniisoi.ru;

Pavel D. Timkin, Junior Researcher, All-Russian Research Institute of Soybean, tpd@vniisoi.ru;

Andrei A. Penzin, Candidate of Agricultural Sciences, Leading Researcher, All-Russian Research Institute of Soybean, paa@vniisoi.ru;

Anna P. Galichenko, Senior Researcher, All-Russian Research Institute of Soybean, gap@vniisoi.ru

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

The authors declare no conflicts of interests.