

## ЗАСТОСУВАННЯ SNP-ГЕНОТИПУВАННЯ ДЛЯ ОЦІНКИ ГЕНЕТИЧНОЇ СПОРІДНЕНОСТІ СЕЛЕКЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ КУКУРУДЗИ

**Б. В. Дзюбецький**, доктор сільськогосподарських наук;

**Т. М. Сатарова**, доктор біологічних наук;

**В. Ю. Черчель**, кандидат сільськогосподарських наук;

**В. В. Борисова**

*Інститут сільського господарства степової зони НААН України*

*Наведені результати аналізу ліній кукурудзи за методом SNP-генотипування. Він дає можливість порівняти частоту однонуклеотидних замін в геномах різних ліній, диференціювати селекційний матеріал за генетичними дистанціями і встановити ступінь спорідненості ліній. Розроблені рекомендації з використання ліній в селекційному процесі як вихідного матеріалу для створення популяцій наступних циклів добору та гібридних комбінацій.*

**Ключові слова:** кукурудза, ДНК-аналіз, SNP-генотипування, поліморфізм, генетичні дистанції, лінії.

В сучасних умовах розвитку сільськогосподарської науки, зокрема селекції основних культурних рослин, необхідним є глибокий аналіз генетичної структури селекційного матеріалу та цілеспрямоване поєднання генів і груп генів в генотипі майбутнього сорту. У світовій селекційній практиці для аналізу генофонду рослин широкого використання набули молекулярно-генетичні методи аналізу характеру мінливості геномів рослин. Сучасні ДНК-технології успішно ввійшли в практику селекції та рослинництва і стали фундаментом підвищення її результативності у 21 столітті.

Застосування молекулярно-генетичних методів в селекції є необхідною умовою систематизації вихідного матеріалу основних зародкових плазм для гетерозисної селекції кукурудзи, ідентифікації ліній і гібридів та захисту авторських прав на сорти рослин. Різні методи аналізу варіабельності ДНК застосовують для оцінки вихідних популяцій при створенні нових ліній, ДНК-паспортизації батьківських генотипів високогетерозисних гібридів. В Україні найчастіше використовують генотипування методом полімеразної ланцюгової реакції, зокрема його різновид SSR-аналіз, переваги якого полягають у можливості відтворення результатів, взаємозв'язку маркера з відомим локусом, кодомінантному характері успадкування [1]. Такий аналіз ДНК широко використовується в сучасній селекції, оскільки він дає можливість виявляти поліморфізм в популяціях селекційного матеріалу кукурудзи. Разом з тим, уваги заслуговує впровадження іншого сучасного методу аналізу поліморфізму ДНК – SNP-методу – за допомогою специфічних маркерів можливо виявляти мінімальні зміни в нуклеотидних послідовностях; він є перспективним для встановлення спорідненості ліній кукурудзи, їх кластеризації та цілеспрямованого добору пар при створенні високогетерозисних гібридів.

Використання SNP-маркерів, вперше запропонованих A. Vignal et al. [2], являє собою аналіз однонуклеотидного поліморфізму, тобто частоти однонуклеотидних замін на ділянках ДНК, які порівнюються для різних генотипів. SNP-маркери широко розподілені по геному, вони можуть бути легко охарактеризовані шляхом використання існуючих геномних даних або методів секвенування [3]. Популярність SNP-маркерів зумовлена потенційною простотою їх використання для генотипування порівняно з три- і тетра-нуклеотидними маркерами, призначеними для аналізу зчеплення. SNP-маркери через їх біалельність піддаються автоматичній детекції і мають інші ознаки, що роблять їх придатними для широких генетичних досліджень. Основний інтерес цей метод має для дослідження генетичної варіабельності індивідумів на рівні цілого геному, алельної диференціації всередині зародкових плазм та між ними, визначення генетичної структури популяцій, кластерного аналізу [4], маркерної селекції, картування QT-локусів [5].

Мета нашої роботи полягала в аналізі ліній кукурудзи методом SNP-генотипування і визначенні їх спорідненості за частотою однонуклеотидних замін.

Матеріалом для дослідження слугували 16 ліній кукурудзи селекції Інституту сільськогосподарства степової зони та науково-виробничого фермерського господарства «Маїс» (м. Дніпропетровськ). Досліджені лінії є результатом довготривалої селекційної роботи в умовах північно-східного Степу України; вони адаптовані до зональних агрокліматичних умов, перспективні для створення високогетерозисних гібридів і є вихідним матеріалом для отримання популяцій наступного циклу добору. Для кожної лінії виділяли ДНК за СТАВ-методом. Для SNP-генотипування використовували панель з 384 маркерами, які охоплювали всі хромосоми *Zea mays*. Маркери були обрані *in silico* шляхом аналізу 90 комерційних інбредних ліній кукурудзи. SNP-аналіз проводили за методикою Golden Gate assay з використанням Illumina Bead Xpress platform. Після встановлення послідовності нуклеотидів в конкретних локусах було проведено їх порівняння для виявлення частоти однонуклеотидних замін та визначені генетичні дистанції між лініями, які були досліджені. Статистичний аналіз результатів проводився з використанням Genome Studio software. Робота виконувалася спільно з фірмою BioDiagnostics Inc. (США) за певними методиками [5, 6]. У таблицях генетичні дистанції між лініями подано в частках одиниці.

В таблиці 1 наведені генетичні дистанції між лініями кукурудзи за результатами SNP-генотипування. З даних видно, що значення генетичних дистанцій для ліній дорівнює 0, мінімальне розходження за частотою однонуклеотидних замін існує між лініями П165 М і К2048 зМ, а максимальний поліморфізм – у ліній К4 С і Дн3 М.

Для кожної лінії шляхом порівняння ми визначали середні значення генетичних дистанцій та відхилення від середньопопуляційного показника (табл. 2).

Середні значення генетичних дистанцій для ліній коливаються від мінімального значення 0,295 (П165 М) до максимального – 0,514 (К4 С) при середньопопуляційному показнику 0,376. Відповідно саме ці лінії мали найбільші відхилення від середньопопуляційного показника.

В таблиці 3 наведено характеристику варіювання генетичних дистанцій для вибірки ліній.

В цілому генетичні дистанції між лініями варіювали від 0,092 до 0,702. Мінімальні значення генетичних дистанцій мають лінії П165 М та К2048 зМ, до того ж за цим показником вони рівнозначні і визначені для прямих та зворотних комбінацій кожної з двох ліній. Максимальні значення генетичних дистанцій мають лінії К4 С та Дн3 М, вони також є однаковими з вказаної причини.

Доцільно проаналізувати розмах варіювання генетичних дистанцій для кожної лінії. Так, мінімальний розмах варіювання генетичних дистанцій мала лінія ІК172-2 С, вона лише на 14,18 % відрізнялася від інших ліній. При цьому дана лінія мала досить високе середнє значення цього показника. Лінія К2048 зМ відзначалася максимальним розмахом варіювання і на 46,52 % відрізнялася за нуклеотидним складом від проаналізованих фрагментів геному решти ліній, але при цьому середнє значення показника її генетичних дистанцій було нижче середньопопуляційного, і навіть нижче, ніж у лінії ІК172-2 С.

За результатами аналізу лінію П165 М можливо визнати як базову (найбільш типову) і рекомендувати для характеристики типових ознак у решти ліній. Лінія ІК172-2 С як генотип з найменшим варіюванням генетичних дистанцій рекомендована для використання при створенні вихідних популяцій наступного циклу добору. Лінії К2048 зМ, К4 С та Дн3 М, як найбільш відмінні від решти ліній, що були досліджені, доцільно використовувати як компоненти в гібридних комбінаціях.

*1. Генетичні дистанції ліній кукурудзи за результатами SNP-методу*

№ п/п	Лінія	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	ІК172-2С	0	0,404	0,461	0,425	0,438	0,388	0,449	0,451	0,529	0,44	0,529	0,496	0,429	0,421	0,424	0,433
2	К46 зМ	0,404	0	0,199	0,427	0,26	0,37	0,23	0,243	0,571	0,263	0,542	0,376	0,281	0,424	0,459	0,448
3	П165 М	0,461	0,199	0	0,424	0,108	0,429	0,098	0,092	0,535	0,109	0,554	0,283	0,156	0,453	0,466	0,359
4	Дн 3 зМ	0,425	0,427	0,424	0	0,431	0,407	0,394	0,424	0,549	0,429	0,285	0,462	0,414	0,438	0,256	0,416
5	ВК377 М	0,438	0,26	0,108	0,431	0	0,421	0,168	0,171	0,492	0	0,565	0,28	0,175	0,469	0,444	0,384
6	СК33 М	0,388	0,37	0,429	0,407	0,421	0	0,448	0,415	0,518	0,421	0,555	0,436	0,428	0,461	0,372	0,468
7	520 со	0,449	0,23	0,098	0,394	0,168	0,448	0	0,153	0,541	0,169	0,539	0,322	0,185	0,437	0,437	0,349
8	К2048 зМ	0,451	0,243	0,092	0,424	0,171	0,415	0,153	0	0,554	0,171	0,558	0,281	0,197	0,455	0,448	0,357
9	К4 С	0,529	0,571	0,535	0,549	0,492	0,518	0,541	0,554	0	0,492	0,702	0,531	0,534	0,577	0,556	0,538
10	ВК377	0,44	0,263	0,109	0,429	0	0,421	0,169	0,171	0,492	0	0,567	0,283	0,177	0,465	0,442	0,382
11	Дн 3 М	0,529	0,542	0,554	0,285	0,565	0,555	0,539	0,558	0,702	0,567	0	0,575	0,534	0,54	0,439	0,552
12	3737 МВ	0,496	0,376	0,283	0,462	0,28	0,436	0,322	0,281	0,531	0,283	0,575	0	0,326	0,504	0,395	0,427
13	К1058 зМ	0,429	0,281	0,156	0,414	0,175	0,428	0,185	0,197	0,534	0,177	0,534	0,326	0	0,485	0,44	0,374
14	К45 С	0,421	0,424	0,453	0,438	0,469	0,461	0,437	0,455	0,577	0,465	0,54	0,504	0,485	0	0,41	0,459
15	Дн 2 зМ	0,424	0,459	0,466	0,256	0,444	0,372	0,437	0,448	0,556	0,442	0,439	0,395	0,44	0,41	0	0,454
16	К16 зМ	0,433	0,448	0,359	0,416	0,384	0,468	0,349	0,357	0,538	0,382	0,552	0,427	0,374	0,459	0,454	0

**2. Середні значення генетичних дистанцій для ліній кукурудзи  
за результатами SNP-аналізу**

Лінія	Середнє значення генетичних дистанцій	Відхилення середнього значення генетичних дистанцій лінії від середньопопуляційного показника
ІК172-2 С	0,420	-0,043
К46 зМ	0,344	0,033
П165 М	0,295	0,081
Дн 3 зМ	0,386	-0,010
ВК377 М	0,300	0,076
СК33 М	0,409	-0,032
520	0,307	0,069
К2048 зМ	0,311	0,066
К4 С	0,514	-0,137
ВК377	0,301	0,076
Дн 3 М	0,502	-0,126
3737 МВ	0,374	0,003
К1058 зМ	0,321	0,056
К45 С	0,437	-0,061
Дн 2 зМ	0,403	-0,026
К16 зМ	0,400	-0,024
Середньопопуляційне	0,376	0,000

**3. Варіювання значень генетичних дистанцій для ліній кукурудзи  
за результатами SNP-аналізу**

Лінія	Ліміти генетичних дистанцій	Розмах варіювання
ІК172-2 С	0,388–0,529	0,142
К46 зМ	0,199–0,571	0,372
П165 М	0,092–0,554	0,462
Дн3 зМ	0,256–0,549	0,293
ВК377 М	0,108–0,565	0,457
СК33 М	0,370–0,555	0,185
520	0,098–0,541	0,451
К2048 зМ	0,092–0,558	0,465
К4 С	0,492–0,702	0,211
ВК377	0,109–0,567	0,458
Дн 3 М	0,285–0,702	0,417
3737 МВ	0,280–0,575	0,295
К1058 зМ	0,156–0,534	0,378
К45 С	0,410–0,577	0,166
Дн2 зМ	0,256–0,556	0,299
К16 зМ	0,349–0,552	0,203
Середньопопуляційне	0,092–0,702	0,328

За результатами досліджень з'ясовано можливість застосування методу SNP-генотипування для характеристики генофонду кукурудзи, залученого до вітчизняних селекційних програм. Так, генетичні дистанції, визначенні за частотою однонуклеотидних замін, досить суттєво диференціюють лінії одну від одної, при цьому цей метод, як і передбачалося, не виявив поліморфізму всередині лінії та між стерильним і фертильним аналогами однієї і тієї ж лінії. Зокрема, лінія ВК377 за середнім значенням генетичних дистанцій відрізняється від свого стерильного аналога ВК377 М на мінімальну величину порівняно з іншими лініями.

У подальшій роботі планується збільшити набір ліній та порівняти спорідненість їх не тільки за ступенем однонуклеотидного поліморфізму, але й за морфологічними, фенологічними та господарсько-цінними ознаками, а також комбінаційною здатністю для встановлення кореляцій між генетичними дистанціями і фенотиповими ознаками. Особлива увага буде зосереджена на аналізі частоти однонуклеотидних замін залежно від приналежності ліній до

певних типів зародкових плазм, кластерному аналізу для об'єднання ліній у гетерозисні групи і добору пар при створенні високопродуктивних гібридних комбінацій.

Таким чином, метод SNP-генотипування дає можливість диференціювати селекційний матеріал кукурудзи за генетичними дистанціями і встановити ступінь спорідненості ліній. Встановлено мінімальне розходження за частотою однонуклеотидних замін між лініями П165 М і К2048 зМ, максимальний поліморфізм виявлено між лініями К4 С і Дн 3 М. Лінія П165 М може бути рекомендована як базова для характеристики типових ознак; лінія ВК 377 та її стерильний аналог молдавського типу (ВК377 М) не відрізняються за складом нуклеотидних послідовностей на досліджених ділянках ДНК. Лінії К2048 зМ, К4 С та Дн3 М найбільш відмінні від інших ліній, їх рекомендовано використовувати як компоненти в гібридних комбінаціях.

### Бібліографічний список

1. *Сиволап Ю. М.* Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений // *Сиволап Ю. М., Кожухова Н.Э., Календарь Р. Н.* – Одесса: Астропринт, 2011. – 336 с.
2. *Vignal A.* A review of SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics // *A. Vignal, D. Milan, M. San Cristobal [et al.] / Genet. Sel. Evol.* – 2002. – Vol. 34. – P. 275–305.
3. *Morin P. A.* SNPs in ecology, evolution and conservation // *P. A. Morin, G. Luikart, R. K. Wayne / Trends Ecol. Evol.* – 2004. – Vol. 19. – P. 208–216.
4. *Lu Y.* Molecular characterization of global maize breeding germplasm based on genome-wide single nucleotide polymorphisms // *Y. Lu, J. Yan, C. T. Guimarães [et al.] // Theor. Appl. Genet.* – 2009. – Vol. 120. – P. 93–115.
5. *Venkatramana P.* Development and characterization of single nucleotide polymorphism (SNP) panel of marker-assisted backcrossing in corn. / *Venkatramana P.* – BioDiagnostics, Inc. 2010 // [www.biodiagnostics.net](http://www.biodiagnostics.net)
6. [www.biodiagnostics.net](http://www.biodiagnostics.net).