

ДЕРКАЧ К.В.^{1✉}, БОРИСОВА В.В.¹, САТАРОВА Т.М.^{1,2}, ДЗЮБЕЦЬКИЙ Б.В.¹,
 ЧЕРЧЕЛЬ В.Ю.¹, ФЕДЬКО М.М.¹

¹ ДУ Інститут зернових культур НААН України,

Україна, 49027, м. Дніпро, вул. В. Вернадського, 14, e-mail: satarova2008@ukr.net

² ДВНЗ Український державний хіміко-технологічний університет,

Україна, 49005, м. Дніпро, пр. Гагаріна, 8

✉ katerina-d-d@yandex.ua, (050) 740-64-20

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЛІНІЙ КУКУРУДЗИ ПЛАЗМИ ЛАНКАСТЕР СЕРЕД ІНШИХ ТИПІВ ЗАРОДКОВОЇ ПЛАЗМИ ЗА РЕЗУЛЬТАТАМИ SNP-АНАЛІЗУ

Створення високопродуктивних гетерозисних гібридів кукурудзи передбачає поєднання генотипів ліній, які є віддаленими в генетичному відношенні мають високу комбінаційну здатність. У зв'язку з цим важливою є інформація про проходження ліній – потенційних батьківських форм гібрида. Лінії, які відносяться до різних типів зародкової плазми, добре комбінуються при схрещуваннях і забезпечують вищий рівень гетерозису в гібридах. Селекційні якості основних типів зародкової плазми є добре вивченими, зокрема за фенотипічними та фенологічними ознаками, а також за рівнем гетерозису в схрещуваннях [1, 2]. Проте ідентифікація ліній кукурудзи за типом зародкової плазми зараз ведеться лише за педігрі, є трудомісткою, частково суб'єктивною та здатна охопити лише певну кількість генотипів. У зв'язку з цим необхідним є залучення біотехнологічних, зокрема молекулярно-генетичних методів для оцінки та ідентифікації генетичного матеріалу кукурудзи. Одним з таких способів є аналіз алейного стану маркерів однонуклеотидного поліморфізму ДНК (SNP-маркерів), що дозволяє визначати приналежність ліній кукурудзи до того чи іншого типу зародкової плазми, спорідненість ліній та генетичні дистанції між ними. Ці ознаки є інформативними в гетерозисній селекції, а також при паспортизації та визначенні авторських прав на сорти рослин [3].

Сучасна селекція кукурудзи базується на використанні декількох основних типів зародкової плазми та однойменних гетерозисних груп: Айодент, Рейд (BSSS), Лакон, Ланкастер та ін. [4, 5]. Аналіз техаських ліній кукурудзи за SNP-маркерами, проведений S.D. Smith et al. [6], залежно від заданої кількості груп, виділяв різні

гетерозисні групи, зокрема при $k=2$ було виділено групи ліній BSSS та NSS (неBSSS), при збільшенні кількості аналізованих груп NSS поділялася на Mo17 та B73. Під час вивчення аргентинських ліній за SSR-маркерами було виділено чотири групи ліній, що дозволило ідентифікувати дві головні гетерозисні моделі [7]. Плазма Ланкастер є однією з селекційно перспективних плазм для вирощування у степу України. Її генотипи характеризується високою продуктивністю, ранньостиглістю, посухо- та жаростійкістю, високою комбінаційною здатністю, інтенсивним стартовим ростом, толерантністю до хвороб [8, 9].

Метою дослідження був порівняльний аналіз ліній кукурудзи плазми Ланкастер української селекційної програми та інших типів зародкової плазми за SNP-маркерами.

Матеріали і методи

Як матеріал для SNP-аналізу використовували 32 лінії кукурудзи (*Zea mays* L.), які за даними педігрі відносилися до зародкової плазми Ланкастер (ДК633, ДК267МВ, ДК212МВ, ДК6080МВ, ДК633266МВ, ДК298зСзМ, ДК3070МВ, ДК236СВ, ДК633325МВ, ДК296МВ, ДК1129, ДК2668, ДК3023зСзМ, ДК3626, ДК6342, ДК2965зСзМ, ДК4263, ДКД9053, ДКВ3451, ДК8143, ДК517МВ, ДК534зСзМ, ДК117зСМВ, ДК231зС, ДК6337зСзМ, ДК2953зСзМ, ДК366М, ДК3044, ДК427, ДК2980зСМВ, Oh43 та Mo17). Для порівняння аналізували 59 ліній кукурудзи інших типів зародкової плазми, зокрема 22 лінії плазми Айодент, 15 ліній плазми Рейд (BSSS), 7 ліній Європейської кременистої плазми Лакон, 1 лінію плазми A188, 1 лінію плазми Chi31, 1 лі-

© ДЕРКАЧ К.В., БОРИСОВА В.В., САТАРОВА Т.М., ДЗЮБЕЦЬКИЙ Б.В., ЧЕРЧЕЛЬ В.Ю., ФЕДЬКО М.М.

нію плазми PLS61 та 12 ліній плазми Мікс, неспорідненої з Ланкастер. Усього проаналізовано за SNP-маркерами 91 лінію. Основна частка досліджених ліній, крім загальнодоступних Mo17, Oh43, A188, Chi31, PLS61, F2, B73, B14, B37, була створена в рамках української селекційної програми в зоні Степу України в ДУ Інститут зернових культур (м. Дніпро, Україна). Приналежність ліній до того чи іншого типу зародкової плазми визначалася за педігрі.

У роботі використана розроблена фірмою BioDiagnostics, Inc. (США) на основі Illumina VeraCode Bead Plate панель BDI-III з 384 SNP-маркерами. SNP-маркери панелі BDI-III є біалельними, розташовуються на всіх 10 хромосомах і мають ранг конструктивності $>0,6$ [10]. SNP-аналіз виконувався в повністю автоматизованому режимі на обладнанні Illumina BeadStation 500 G (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA).

Аналіз результатів SNP-аналізу проведено з використанням комп'ютерної програми STRUCTURE за [11], яка дозволяє виконувати кластерний аналіз для вивчення структури популяцій за полілокусними генотипічними даними. В цій програмі вираховується частка приналежності кожного окремого генотипу до певної

популяції. Як такими, що належать до певної групи, вважаються лінії з коефіцієнтом приналежності $Q \geq 0,600$ [11, 12].

Результати та обговорення

Аналіз генетичної структури популяції з 91 лінії кукурудзи з використанням пакету програмного забезпечення STRUCTURE дозволив оцінити різноманіття вихідного матеріалу в генфонді вивчених ліній. Отримана в ході дослідження інформація про алельний стан SNP-маркерів досліджених ліній дозволила розділити їх на $k=2$ основних груп. Для кожної з досліджених ліній були розраховані коефіцієнти приналежності (Q) для оцінки відношення лінії до тієї чи іншої групи за алельним станом SNP-маркерів. У таблиці наведено коефіцієнти приналежності (Q) для досліджених ліній кукурудзи, а на рисунку – графічне зображення співвідношення часток двох груп у генотипах досліджених ліній.

Із дослідженого набору 33,0 % відносилися до групи 1, 60,4 % – до групи 2, а 6,6 % не належали жодній із груп, оскільки мали коефіцієнти приналежності менші за 0,6.

Таблиця. Коефіцієнти приналежності (Q) для ліній кукурудзи, розраховані за алельним станом SNP-маркерів, при $k=2$

Лінія	Група 1	Група 2	Лінія	Група 1	Група 2
1	2	3	4	5	6
Лінії зародкової плазми Ланкастер					
ДК1129	0,273	0,727	ДК366М	0,079	0,921
ДК117зСМВ	0,008	0,992	ДК4263	0,055	0,945
ДК212МВ	0,237	0,763	ДК427	0,264	0,736
ДК231зС	0,013	0,987	ДК517МВ	0,071	0,929
ДК236СВ	0,684	0,316	ДК534зСзМ	0,003	0,997
ДК2668	0,304	0,696	ДК6080МВ	0,223	0,777
ДК267МВ	0,302	0,698	ДК633	0,003	0,997
ДК2953зСзМ	0,036	0,964	ДК633266МВ	0,069	0,931
ДК296МВ	0,135	0,865	ДК633325МВ	0,124	0,876
ДК2965зСзМ	0,018	0,982	ДК6337зСзМ	0,120	0,880
ДК298зСзМ	0,127	0,873	ДК6342	0,210	0,790
ДК2980зСМВ	0,137	0,863	ДК8143	0,038	0,962
ДК3023зСзМ	0,004	0,996	ДКВ3451	0,005	0,995
ДК3044	0,022	0,978	ДКД9053	0,004	0,996
ДК3070МВ	0,009	0,991	Mo17	0,003	0,997
ДК3626	0,219	0,781	Oh43	0,331	0,669
<i>Середнє для ліній плазми Ланкастер</i>				0,129±0,119*	0,871±0,119

Продовження табл.

1	2	3	4	5	6
Лінії, неспоріднені із зародковою плазмою Ланкастер					
Лінії зародкової плазми Айодент					
ДК2061СВзМ	0,991	0,009	ДК721	0,997	0,003
ДК2064СВзМ	0,990	0,010	ДК7431	0,996	0,004
ДК257	0,857	0,143	ДК744М	0,996	0,004
ДК2579СВзМ	0,984	0,016	ДК7443	0,877	0,123
ДК2777	0,997	0,003	ДК7446	0,997	0,003
ДК3016	0,995	0,005	ДК772	0,997	0,003
ДК3641	0,742	0,258	ДК772М	0,997	0,003
ДК4074	0,997	0,003	ДК7736	0,997	0,003
ДК710	0,998	0,002	ДКВ3151М	0,998	0,002
ДК411М	0,999	0,001	ДКД2725СВзМ	0,601	0,399
ДК301СВзМ	0,998	0,002	ДК315СВзМ	0,893	0,107
Середнє				0,950	0,050
Лінії зародкових плазм А188, Chi31, PLS61					
А188	0,289	0,711	PLS61	0,241	0,759
Chi31	0,248	0,752			
Середнє				0,259	0,741
Лінії зародкової плазми Європейська кремєниста (Лакон)					
ДК2	0,169	0,831	ДК273МВ	0,267	0,733
ДК200зСзМ	0,261	0,739	ДК3527	0,319	0,681
ДК270	0,170	0,830	F2	0,208	0,792
ДК272зС	0,215	0,785			
Середнє				0,230	0,770
Лінії зародкової плазми Рейд (BSSS)					
ВР731	0,257	0,743	ДК367зС	0,299	0,701
ДК232МВ	0,250	0,750	ДК377С	0,321	0,679
ДК2323МВ	0,254	0,746	ДК3902	0,611	0,389
ДК2346	0,317	0,683	ДК8213	0,327	0,673
ДК2377зМ	0,343	0,657	В73	0,419	0,581
ДК239МВ	0,250	0,750	В14	0,332	0,668
ДК2396	0,190	0,810	В37	0,235	0,765
ДК3642	0,546	0,454			
Середнє				0,330	0,670
Лінії зародкової плазми Мікс, неспорідненої з Ланкастер					
ДК2285СВзМ	0,823	0,177	ДК4315СВ	0,603	0,397
ДК233МВ	0,504	0,496	ДК4402	0,496	0,504
ДК281МВ	0,584	0,416	ДК5002СВзМ	0,751	0,249
ДК2831СВ	0,724	0,276	МС1294	0,323	0,677
ДК3983	0,558	0,442	МС4169	0,989	0,011
ДК4169	0,987	0,013	МС4456	0,318	0,682
Середнє				0,638	0,362
Середнє для ліній інших (не Ланкастер) плазм				0,608±0,127	0,392±0,127

Примітки: *середні значення коефіцієнта приналежності представлені у вигляді $X \pm mt_{0,05}$, де X – середнє арифметичне значення показника, m – похибка середнього арифметичного, $t_{0,05}$ – критерій Стюдента за рівня значущості 0,05.

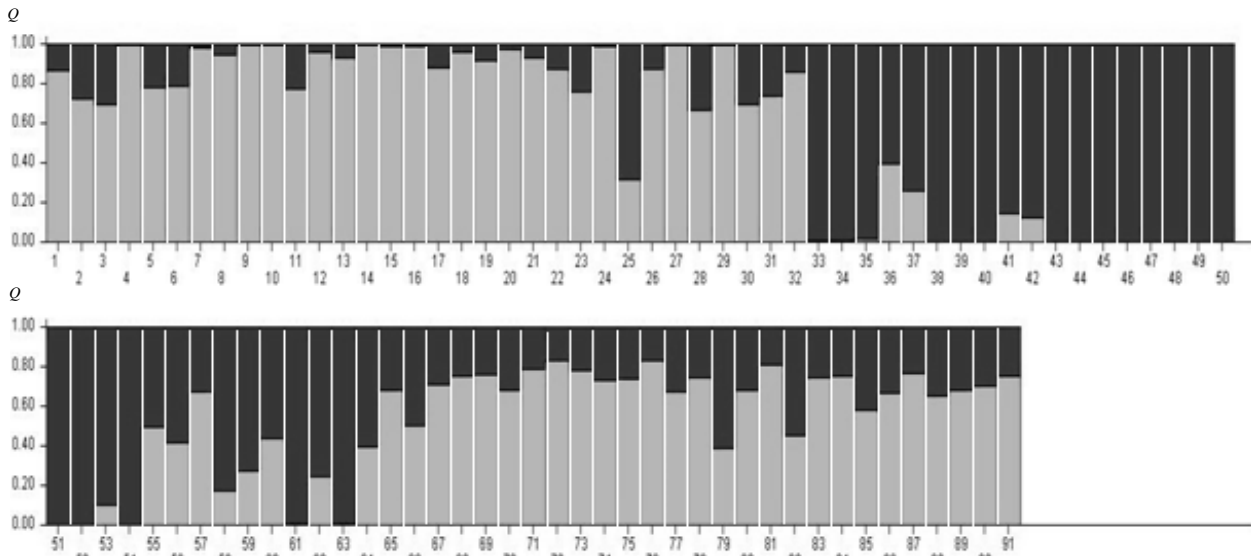


Рис. Генетична структура ліній кукурудзи за коефіцієнтами приналежності (Q), розрахованими за результатами SNP-аналізу. Кожен стовпчик відповідає одній лінії, різні кольори представляють різні групи: група 1 позначена темно сірим кольором, група 2 – світло сірим. Частка кожної групи в генотипі лінії показана часткою забарвлення певним кольором. 1-32 – лінії зародкової плазми Ланкастер, 33-54 – Айодент, 55-66 – Мікс, 67 – A188, 68 – Chi31, 69 – PLS61, 70-76 – Лакон, 77-91 – Рейд (BSSS).

Середня генетична дистанція за SNP-маркерами між лініями групи 1 склала 0,2280, в групі 2 – 0,3497, що свідчить про більше генетичне різноманіття останньої групи, оскільки, окрім ліній плазми Ланкастер, вона об'єднує лінії плазм Лакон, Рейд (BSSS), A188, Chi31, PLS61, окремі лінії Мікс. Середня частка участі лінії в групі 1 склала 44,0 %, а в групі 2 – 56,0 %.

Із 32 проаналізованих ліній, які за педігрі відносяться до зародкової плазми Ланкастер, лише одна лінія, ДК236СВ ($Q=0,684$), потрапила до групи 1, а 31 лінія (96,9 %) – до групи 2. Коефіцієнти приналежності Q цієї 31 лінії вкладалися в діапазон від 0,669 (Oh43) до 0,997 (Mo17, ДК534зСзМ, ДК633). Таким чином, досліджені лінії, які за родоводом визначаються як похідні від сорту Ланкастер, у переважній більшості відносилися до групи 2 з середнім коефіцієнтом приналежності $Q=0,871$.

Усі 22 досліджені лінії, які ведуть свій родовід від сорту Айодент, відносилися до групи 1 з діапазоном Q від 0,601 (ДКД2725СВзМ) до 0,999 (ДК411М) з середнім значенням $Q=0,950$. Три лінії, які є представниками однойменних зародкових плазм, A188, Chi31 та PLS61 відносилися до групи 2, але мали значення Q на середньому рівні, відповідно, 0,711, 0,752 та 0,759. Вісім ліній, які представляли зародкову плазму Лакон, були віднесені до групи 2, оскільки мали коефіцієнт приналежності до цієї групи більший

за 0,6; діапазон Q у цьому випадку коливався від 0,681 (ДК3527) до 0,831 (ДК2) з середнім значенням 0,770. Було проаналізовано 15 ліній зародкової плазми Рейд (BSSS), з яких до групи 1 належала лише ДК3902 ($Q=0,611$), 12 ліній продемонстрували коефіцієнти приналежності до групи 2 від 0,668 (B14) до 0,810 (ДК2396) з середнім значенням 0,670, а 3 лінії неможливо було віднести до жодної з груп, оскільки їх обидва значення Q було меншими за 0,6. Зародкова плазма Мікс, до якої входили лінії змішаного родоходу, але неспоріднені з Ланкастер, була представлена 12 лініями. З них 6 належали до групи 1 з діапазоном Q від 0,603 (ДК4315СВ) до 0,989 (MC4169) і середнім значенням 0,638. Дві лінії цієї плазми належали до групи 2 – MC1294 ($Q=0,677$) та MC4456 ($Q=0,682$), а чотири – мали значення $Q < 0,6$ і не були віднесені до жодної групи.

Порівняння середніх коефіцієнтів приналежності до групи 2 дозволяють констатувати, що цей показник достовірно вищий для ліній, які за педігрі віднесені до зародкової плазми Ланкастер ($Q=0,871 \pm 0,119$), ніж для ліній інших плазм ($Q=0,392 \pm 0,127$). Таким чином, лінії плазми Ланкастер переважно мають набір алельних варіантів SNP-маркерів групи 2. Порівняння окремих плазм показує, що досліджені лінії плазми Айодент, які у повному складі потрапляють у групу 1 ($Q=0,950 \pm 0,093$), та лінії плазми

Мікс ($Q=0,638\pm 0,319$ для групи 1) достовірно відрізняються за середнім значенням коефіцієнтів приналежності від ліній плазми Ланкастер ($Q=0,129\pm 0,119$ для групи 1). При аналогічному способі порівняння ліній Ланкастер з лініями плазм A188, Chi31, PLS61, Лакон та Рейд (BSSS) достовірної різниці за групами 1 та 2 не виявлено.

Таким чином, ідентифікований алейний стан SNP-маркерів панелі BDI-III не є унікальним для ліній плазми Ланкастер, однак допомагає виокремити їх на фоні ліній деяких інших зародкових плазм. Значно виразніше за алейним станом проаналізованих SNP-маркерів виділяється група ліній, яка за педігрі відноситься до плазми Айодент. Отже, отримані дані свідчать про те, що цей набір SNP-маркерів добре підходить для відмежування ліній плазми Ланкастер від ліній плазм Айодент, Мікс, тоді як

для розподілу ліній плазми Ланкастер та зародкових плазм A188, Chi31, PLS61, Європейська кремениста (Лакон) та Рейд (BSSS) необхідно оптимізувати набір SNP-маркерів.

Висновки

SNP-аналіз показав наявність двох груп серед 91 дослідженої лінії кукурудзи за алейним станом маркерів. Лінії, які за педігрі відносяться до зародкової плазми Ланкастер, на 96,9 % входять до групи 2. За середнім коефіцієнтом приналежності до групи 2 лінії плазми Ланкастер достовірно відрізняються від ліній плазм Айодент та Мікс. Лінії плазми Ланкастер української селекційної програми характеризуються певним набором специфічних алейних варіантів SNP-маркерів панелі BDI-III, які дозволяють відокремити їх від ліній плазми Айодент.

Література

1. Гайдаш О.Л. Оцінка комбінаційної здатності за врожайністю зерна самозапилених сімей S5 кукурудзи (*Zea mays* L.) змішаної зародкової плазми // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. – 2016. – № 1 (30). – С. 62–66.
2. Соколов В.М., Вареник Б.Ф., Пилюгин А.С., Гужва Д.В. Селекционная оценка элитных самоопыленных линий кукурузы из основных гетерозисных групп зародышевой плазмы // Генетика, селекция и технология возделывания кукурузы. – 1999. – С. 92–96.
3. Mhoswa L., Derera J., Qwabe F.N.P., Musimwa T.R. Diversity and path coefficient analysis of Southern African maize hybrids // Chilean J. Agric. Res. – 2016. – V. 76 (2). – P. 143–151.
4. Федько М.М. Результати другого циклу рекурентного добору в популяції кукурудзи (*Zea mays* L.) спорідненої з геноплазмою Lancaster Oh43 // Бюл. Ін-ту сільськогосподарства степової зони НААН України. – 2012. – № 2. – С. 55–60.
5. Troyer A.F. Temperate corn background, behavior, and breeding. – CRC Press, 2000. – 468 p.
6. Smith S.D., Murray S.C., Heffner E. Molecular analysis of genetic diversity in a Texas maize (*Zea mays* L.) breeding program // Maydica. – 2015. – V. 60. – P. 1–8.
7. Olmos S.E., Lia V.V., Eyhéabide G.H. Genetic diversity and linkage disequilibrium in the Argentine public maize inbred line collection // Plant Genetic Resources. – 2016. – P. 1–12. doi: 10.1017/S1479262116000228.
8. Дзюбецький Б.В., Боденко Н.А., Федько М.М., Гусак Ю.В. Створення середньопізніх гібридів кукурудзи на базі плазми Ланкастер (C103) // Бюл. Ін-ту сільськогосподарства степової зони НААН України. – 2012. – № 3. – С. 8–11.
9. Сатарова Т.М., Деркач К.В., Абраїмова О.С. Оцінка реципрокного ефекту в культурі *in vitro* у генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер // Бюл. Ін-ту зернового господарства. – 2011. – № 40. – С. 20–24.
10. Venkatramana P., Carlson C., Blackstad M., Bialozynski R., Schultz, Kaufman B. Development and characterization of single nucleotide polymorphism (SNP) panel for markers-assisted backcrossing in corn // Abstracts from AOSA/SCST Meeting. – 2012. – V. 32, no 2. – P. 153.
11. Акинина Г.Е., Дугарь Ю.Н., Попов В.Н. Статистический анализ генетических данных с использованием компьютерных программ ARLEQUIN, PHILYP, CLANN, STRUCTURE. – Харьков: Стиль-Издат, 2014. – 100 с.
12. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. – 2000. – V. 155. – P. 945–959.

DERKACH K.V.¹, BORYSOVA V.V.¹, SATAROVA T.M.^{1,2}, DZUBETSKY B.V.¹, CHERCHEL V.Yu.¹, FEDKO M.M.¹

¹ Institute of Grain Crops of National Academy of Agrarian Science of Ukraine, Ukraine, 49027, Dnipro, V. Vernadsky str., 14, e-mail: satarova2008@ukr.net

² SHEI Ukrainian State University of Chemical Technology, Ukraine, 49005, Dnipro, Gagarin av., 8

IDENTIFICATION OF MAIZE LANCASTER GERMPLASM INBREDS AMONG OTHER TYPES OF GERMPLASM ACCORDING TO THE RESULTS OF SNP-ANALYSIS

Aim. Lancaster is one of the most promising breeding germplasm for cultivation in Steppe Zone of Ukraine. The comparative analysis of maize Lancaster germplasm inbreds of Ukrainian breeding program with other types of germplasm

on SNP-markers was carried out. **Methods.** Identification of maize inbreds of Lancaster germplasm among other types of germplasm was made according to the results of SNP-analysis using BDI-III panel and STRUCTURE software. **Results.** The genetic diversity of 91 maize inbreds was estimated. The investigated inbreds was divided into $k=2$ groups. Identified allelic states of the SNP-markers of BDI-III panel appeared to be not unique in Lancaster germplasm inbreds, however, it can help to distinguish them from others ones. **Conclusions.** SNP-analysis revealed the presence of two groups of allelic states of SNP-markers among 91 maize inbred lines. Inbreds which according to pedigree information belong to Lancaster germplasm at 96.9 % fall into group 2. As for average coefficient (Q) of belonging to group 2 Lancaster inbreds significantly differed from Iodent and Mix inbreds. Lancaster inbreds from Ukrainian breeding program have certain set of specific allelic variants of markers of BDI-III panel which allows distinguishing from Iodent inbreds. **Keywords:** maize, SNP-markers, Lancaster germplasm, STRUCTURE software, genetic diversity.