

Порівняльний аналіз ліній кукурудзи звичайної (*Zea mays* L.) за морфологічними та молекулярними характеристиками

Л. М. Присяжнюк*, Ю. В. Шитікова, М. М. Таганцова, І. О. Діхтяр, С. М. Гринів

Український інститут експертизи сортів рослин, вул. Горіхуватський шлях, 15, м. Київ, 03041, Україна,

*e-mail: prysiazhniuk_l@ukr.net

Мета. Встановити філогенетичні зв'язки між лініями кукурудзи звичайної за результатами морфологічного опису (ВОС-тест) та SSR маркерами. **Методи.** Польові (описова морфологія рослин), молекулярні (ПЛР, капілярний електрофорез), статистичні (кореляційний аналіз, ієрархічна кластеризація). **Результати.** Внаслідок польових досліджень 57 ліній кукурудзи за морфологічними ознаками встановлено коди прояву якісних і кількісних ознак, що дало змогу визначити три групи досліджуваних ліній відповідно до ступеня їхньої подібності: відмінні, подібні та дуже подібні. На основі коефіцієнтів подібності за Пірсоном розраховано фенотипові дистанції між лініями й одержано п'ять кластерних груп та сім окремих кластерів, сформованих окремими лініями. Найбільш подібними за кодами прояву морфологічних ознак виявилися лінії кукурудзи з коефіцієнтом подібності 0,997, які за результатами експертизи на відмінність, однорідність та стабільність (ВОС) належать до групи подібних. Коефіцієнти подібності між лініями, що зараховують до групи дуже подібних, були достатньо високими: від 0,890 до 0,990. Однак між двома лініями з цієї групи коефіцієнт подібності становив 0,771. На основі молекулярних дистанцій за Роджером для дев'яти SSR маркерів як найподібніші визначено лінії з коефіцієнтом подібності 0,16, хоча за результатами експертизи на ВОС ця пара належить до відмінних. Найбільш відмінною за SSR маркерами виявилася пара ліній із коефіцієнтом подібності 0,42. Внаслідок розрахунку кореляційної залежності між матрицями фенотипових і молекулярних дистанцій встановлено дуже слабку обернену кореляцію ($r = -0,1$). **Висновки.** З'ясовано, що розрахунок фенотипових і молекулярних дистанцій відображає рівень подібності досліджуваних генотипів за морфологічними ознаками та SSR маркерами. Продemonстровано, що ступінь подібності між досліджуваними лініями кукурудзи різниться залежно від застосованого підходу оцінювання. На це вказує експертна оцінка ліній кукурудзи за результатами експертизи на ВОС.

Ключові слова: фенотипові та молекулярні дистанції; SSR маркери; коефіцієнти подібності; кореляція; алель.

Вступ

Кукурудза – одна з найпоширеніших зернових культур у світі. Попит на неї постійно зростає, оскільки завдяки високому потенціалу врожайності її використовують у харчо-

вих і кормових цілях, а також як промисловий ресурс для виробництва крохмалю, фармацевтичних препаратів, алкогольних напоїв, олій, косметики та текстилю [1, 2]. Кукурудза посідає третє місце (після пшениці озимої та соняшнику) у структурі посівних площ України. У 2024 році її посівні площі становили 4,0 млн га, що на 1,5 млн га менше, ніж у 2020-му. Таке скорочення, передусім у Харківській, Вінницькій, Житомирській та Сумській областях, без сумніву, спричинили військові дії [3]. Проте за обсягами виробництва у 2023/2024 маркетинговому році зібрано 31,0 млн т цієї культури, що на 0,7 млн т більше, ніж у 2020/2021-му. Також в Україні майже на 20% зросли обсяги експорту кукурудзи. Якщо у 2020/2021 році вони становили приблизно

Larysa Prysiazhniuk
<https://orcid.org/0000-0003-4388-0485>
Yuliia Shytikova
<https://orcid.org/0000-0002-1403-694X>
Maryna Tahantsova
<https://orcid.org/0000-0003-3737-6477>
Iryna Dikhtiar
<https://orcid.org/0000-0001-7736-6121>
Svitlana Hryniv
<https://orcid.org/0000-0002-2044-4528>

76% від всієї виробленої, то у 2023/2024-му підвищилися до 95% [3]. Отже, з огляду на значні обсяги виробництва кукурудзи в нашій державі та експортний потенціал, для забезпечення високих врожаїв та якості продукції необхідно використовувати сучасні високопродуктивні гібриди, придатні для поширення в Україні.

Генетичне різноманіття є важливим аспектом селекційних програм для створення високоврожайних сортів. Процес селекції рослин потребує вивчення, оцінювання філогенетичних зв'язків і порівняння великої кількості генотипів. Щоб дослідити взаємозв'язки між лініями кукурудзи, широко використовують різноманітні ДНК маркери [4]. Перед науково-технічною експертизою сортів рослин, однією з цілей якої є визначення відповідності сорту, що подається з метою отримання майнових прав інтелектуальної власності, критеріям ВОС, постають схожі виклики. Вони, зокрема, пов'язані з тим, що зі збільшенням кількості нових сортів стає обмеженим комбінаційний простір ознак. Тому необхідні додаткові для встановлення відмінності сорту. Багато ознак мають низьку спадковість, що призводить до їхньої більшої варіативності та зростання чисельності нетипових рослин під час проведення експертизи [5].

Відповідно до рекомендацій Міжнародного союзу з охорони нових сортів рослин (International Union for the Protection of New Varieties of Plants – UPOV) молекулярні маркери використовують як додатковий інструмент науково-технічної експертизи на ВОС, зокрема для управління колекціями загальновідомих сортів та визначення відмінності за поєднання фенотипових і молекулярних дистанцій між сортами [6]. SSR (Simple Sequence Repeats) маркери багатьох експертних закладів держав-учасниць UPOV застосовують для обчислення молекулярних дистанцій завдяки їхній високій роздільній здатності та надійній відтворюваності [7]. Це дає змогу поєднати молекулярні дистанції, розраховані відповідно до ідентифікованих алелів, із фенотиповими у процесі визначення відмінності між сортами.

Під час дослідження інбредних ліній кукурудзи SSR маркери показали вищу ефективність для диференціації генотипів та їхніх філогенетичних зв'язків, як порівняти з морфологічними ознаками ВОС [8]. Для розроблення маркерної панелі з метою підтримання експертизи на ВОС автори використали шість SSR маркерів, які продемонстрували високий рівень поліморфізму на досліджуваних генотипах кукурудзи [9]. Інші дослідни-

ки оцінювали генетичне різноманіття ліній кукурудзи за SSR маркерами та морфологічними ознаками, описаними в методиках експертизи на ВОС, застосовуючи молекулярні та морфологічні дистанції [10, 11].

Реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні, налічує приблизно дві тисячі ліній кукурудзи звичайної. Щороку з метою набуття майнових прав інтелектуальної власності та/або майнового права на поширення подають орієнтовно 300 ліній [12]. Значна кількість загальновідомих ліній і тих, які щорічно проходять експертизу на ВОС, спонукає до створення нових сучасних способів проведення науково-технічної експертизи із залученням комплексного оцінювання морфологічних і молекулярних даних.

Мета досліджень – встановити філогенетичні зв'язки між лініями кукурудзи звичайної за результатами морфологічного опису (ВОС-тест) та SSR маркерами.

Матеріали та методика досліджень

Дослідження проводили протягом 2021–2023 рр. в Українському інституті експертизи сортів рослин. Вивчали 57 ліній кукурудзи звичайної колекції загальновідомих сортів, зокрема п'ять ліній розглядали як робочу колекцію для прямих порівнянь у польових умовах.

Молекулярно-генетичний та морфологічний аналіз ліній кукурудзи

Екстракцію ДНК виконували з п'ятиденних проростків ліній кукурудзи у двох повтореннях, використовуючи СТАВ-метод [13]. Насіння пророщували відповідно до ДСТУ 4138-2002 [14]. ПЛР проводили із застосуванням дев'яти SSR маркерів, описаних у міжнародному стандарті ISO 17623:2015 Molecular biomarker analysis – SSR analysis of maize як такі, що продемонстрували високе значення індексу поліморфності (PIC – Polymorphic Information Content) [15] (табл. 1).

TouchDown ПЛР виконували на ампліфікаторі SureCycle G8800A (Agilent, США). Реакційна суміш (об'єм – 10 мкл) містила 50 нг ДНК, 1×ПЛР буфер (10 mM Tris-HCl, pH 9,0; 50 mM KCl; 0,01% Triton X-100), 3 mM MgCl₂; 125 мкМ дезоксинуклеотидтрифосфатів (дНТФ), 0,25 мкМ кожного з праймерів та 0,25 одиниць Taq полімерази [15]. Продукти ПЛР розділяли за допомогою капілярного електрофорезу, застосовуючи аналізатор фрагментів нуклеїнових кислот Fragment Analyzer (Agilent, США); довжина матриці становила 55 см. Розділення проводили, використовуючи набір реактивів DNF 905 [dsDNA 905 Reagent Kit (1–500bp)] відповідно до інструкції виробника.

Таблиця 1

Характеристики та нуклеотидні послідовності праймерів, використаних у роботі

SSR	Послідовність праймерів 5'→3'	Хромосома, на якій гібридується праймер	Мотив	Очікуваний розмір алелів, п. н.
phi064	F – CCGAATTGAAATAGCTGCGAGAACCT R – ACAATGAACGGTGGTTATCAACACGC	1	(ATCC) _n	75–110
umc1448	F – ATCCTCTCATCTTTAGGTCCACCG R – CATATACAGTCTCTTCTGGCTGCTCA	2	(GCT) ₅	137–161
umc1061	F – AGCAGGAGTACCCATGAAAGTCC R – TATCACAGCACGAAGCGATAGATG	10	(TCG) ₆	97–107
bnlg1782	F – CGATGCTCCGCTAGGAATAG R – TGTGTTGGAAATTGACCCAA	8	(AG) ₁₃	219–236
bnlg1129	F – GAGAGTATGCTACTCGCCGC R – GACGAGTTTGGAGTGCCATT	9	(AG) ₁₂	179–202
phi093	F – AGTGCCTCAGCTTCATCGCTACAAG R – AGGCCATGCATGCTTGCAACAATGGATACA	4	AGCT	281–294
phi233376	F – CCGGCAGTCGATTACTCC R – CGAGACCAAGAGAACCCTCA	8	CCG	140–159
phi083	F – CAAACATCAGCCAGAGACAAGGAC R – ATTCATCGACGCGTCACAGTCTACT	2	(AGCT) ₂	123–136
phi96100	F – AGGAGGACCCCAACTCCTG R – TTGCACGAGCCATCGTAT	2	ACCT	275–294

Примітка. F – прямий праймер; R – зворотний праймер.

Упродовж 2021–2022 рр. на двох дослідних пунктах Полтавської та Кіровоградської філій Українського інституту експертизи сортів рослин проводили польові дослідження з визначення морфологічних ознак. Ступені їхнього прояву позначали цифрами від 1 до 9 [16]. Морфологічний опис ліній кукурудзи звичайної здійснювали за 35 якісними та кількісними ознаками, ступінь прояву яких становить кодову формулу, відповідно до Методики проведення експертизи сортів кукурудзи звичайної (*Zea mays* L.) на ВОС.

Статистична обробка даних

На основі отриманих алелів будували матрицю, в якій присутність / відсутність певного алеля позначали 1/0 відповідно. Молекулярні дистанції за Роджером між досліджуваними лініями кукурудзи розраховували згідно з [17].

Лінії групували у кластери за допомогою методу незваженого попарного середнього (Unweighted pair group average) на основі дистанцій за Роджером із використанням комп'ютерної програми XLSTAT (Trial version). Для визначення подібних ліній на основі кодів прояву морфологічних ознак розраховували коефіцієнти подібності за Пірсоном [18].

Кореляційний аналіз між матрицею подібності за кодами прояву морфологічних ознак та матрицею молекулярних дистанцій між досліджуваними лініями кукурудзи проводили, використовуючи тест Мантела (кореляція за Пірсоном, Two-tailed test), за допомогою комп'ютерної програми XLSTAT (Trial version) [19].

Результати досліджень

Відповідно до кодів прояву морфологічних ознак, отриманих за результатами польових досліджень з експертизи на ВОС, виділено 12 пар ліній кукурудзи звичайної, що можна класифікувати як відмінні, 10 пар із високим ступенем подібності та чотири, які майже не відрізняються за морфологічними ознаками. Ці лінії є дуже подібними та потребують проведення прямих порівнянь у польових умовах (side-by-side) або залучення таких додаткових методів досліджень, як молекулярні маркери, з метою встановлення відмінності.

Для порівняння експертної оцінки ліній кукурудзи та коефіцієнтів подібності за Пірсоном розраховували фенотипові дистанції. За результатами одержали п'ять кластерних груп і сім окремих кластерів. До одного кластера увійшли лінії ЛН4 та ЛН5. Дві окремі кластерні групи сформовано лініями ЛН13, ЛН14 та ЛН21, а також ЛН39, ЛН40 та ЛН49. Найбільша група кластерів об'єднала 31 лінію, інші дві – сім та п'ять ліній. Лінії ЛН1, ЛН11, ЛН17, ЛН26, ЛН28 та ЛН32 виділено в окремі кластери (рис. 1).

Найбільш подібними за кодами прояву морфологічних ознак виявилися лінії кукурудзи звичайної ЛН14 та ЛН13 із коефіцієнтом подібності 0,997. Високий ступінь подібності відмічено між лініями ЛН24 та ЛН20, ЛН25 та ЛН23, ЛН35 та ЛН34, що мали коефіцієнти подібності 0,990; 0,988 та 0,983 відповідно (табл. 2).

Серед ліній, що визначені експертом сорту як подібні за результатами експертизи на ВОС, коефіцієнти подібності були досить висо-

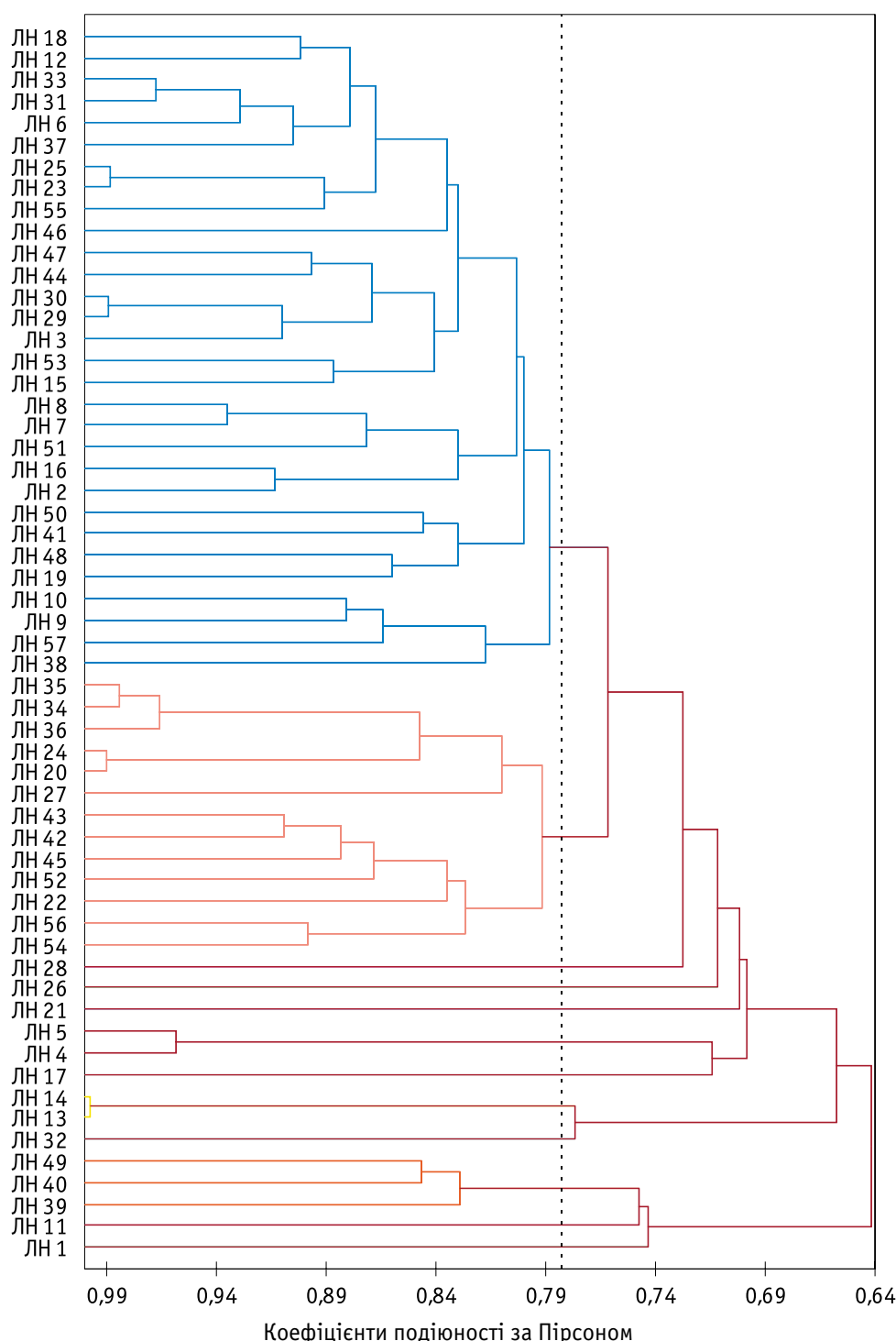


Рис. 1. Дендрограма зв'язків між лініями кукурудзи звичайної за кодами прояву морфологічних ознак (2021–2022 рр.)

кими й становили: між ЛН36 та ЛН34 – 0,972, ЛН7 та ЛН8 – 0,934, ЛН33 та ЛН31 – 0,967, ЛН56 та ЛН53 – 0,866, ЛН45 та ЛН44 – 0,889, між ЛН55 та ЛН18 – 0,887. Лінії ЛН56 та ЛН57 виявилися дещо відмінними згідно з результатами розрахунку коефіцієнтів подібності за кодами прояву морфологічних ознак: їхній коефіцієнт подібності мав значення 0,771. Між лініями ЛН4 та ЛН5, а також ЛН30 та

ЛН29, зарахованими експертом з ВОС до групи дуже подібних, встановлено досить високі коефіцієнти подібності – 0,957 та 0,89 відповідно. Однак варто зауважити, що лінії ЛН40 та ЛН27 виявились порівняно відмінними за значенням коефіцієнта подібності (0,771).

Загалом, результати порівняння ліній кукурудзи звичайної на основі розрахованих коефіцієнтів подібності за морфологічними

Таблиця 2

Лінії кукурудзи звичайної відповідно до експертизи на ВОС, коефіцієнтів подібності за кодами прояву морфологічних ознак та SSR маркерами

Експертиза на ВОС		Фенотипові та молекулярні дистанції	
Відмінні		Коефіцієнт подібності за Пірсоном	Молекулярні дистанції за Роджером
ЛН16	ЛН2	0,917	0,34
ЛН37	ЛН38	0,836	0,34
ЛН6	ЛН26	0,783	0,38
ЛН9	ЛН12	0,823	0,30
ЛН19	ЛН1	0,549	0,34
ЛН6	ЛН22	0,801	0,42
ЛН11	ЛН15	0,675	0,38
ЛН52	ЛН17	0,699	0,30
ЛН51	ЛН28	0,759	0,34
ЛН47	ЛН41	0,819	0,30
ЛН46	ЛН10	0,820	0,38
ЛН42	ЛН43	0,907	0,16
Подібні		—	
ЛН35	ЛН34	0,983	0,30
ЛН36	ЛН34	0,972	0,26
ЛН25	ЛН23	0,988	0,30
ЛН7	ЛН8	0,934	0,34
ЛН33	ЛН31	0,967	0,30
ЛН13	ЛН14	0,997	0,42
ЛН56	ЛН53	0,866	0,30
ЛН45	ЛН44	0,889	0,34
ЛН55	ЛН18	0,887	0,30
ЛН54	ЛН57	0,766	0,34
Дуже подібні		—	
ЛН20	ЛН24	0,990	0,38
ЛН4	ЛН5	0,957	0,30
ЛН30	ЛН29	0,890	0,38
ЛН40	ЛН27	0,771	0,34

ознаками частково збігаються з розподілом ліній, визначеним експертом внаслідок проведення експертизи на ВОС. Для групи відмінних результати розрахунку коефіцієнтів подібності відрізняються. Так, найбільш відмінними виявилися лінії ЛН38 та ЛН17 зі значенням коефіцієнта подібності 0,393. Їх визначено експертом як відмінні, проте згруповано з іншими лініями. Коефіцієнти подібності між парами ЛН37 та ЛН38, а також ЛН52 та ЛН17, які за результатами експертизи на ВОС належать до відмінних, становлять 0,836 і 0,699 відповідно.

Найбільше за коефіцієнтом подібності серед групи відмінних різнилися лінії ЛН19 та ЛН1 – 0,549. Лінії ЛН11 та ЛН15 із коефіцієнтом подібності 0,675 також були достатньо відмінними. Коефіцієнти між іншими парами ліній, визначеними як відмінні за результатами експертизи на ВОС, перебували в межах від 0,759 до 0,917.

Отже, результати аналізу ліній кукурудзи звичайної за кодами прояву морфологічних ознак на основі суто статистичного методу обчислення подібності відрізняються від оцінки ліній за результатами експертизи на ВОС. Це можна пояснити тим, що під час порівнян-

ня сортів за результатами ВОС-тесту експерт визначає відмінності на підставі числового значення коду прояву морфологічних ознак з урахуванням значущості різниці між кодами за певними ознаками.

Внаслідок ПЛП-аналізу 57 ліній кукурудзи за дев'ятьма SSR маркерами отримано від чотирьох до 12 алелів (у середньому 7,6 алелів на локус). Їхній розмір, а також індекси поліморфності локусів (PIC) наведено в таблиці 3.

Таблиця 3

Характеристики ідентифікованих алелів за SSR маркерами

SSR	Кількість алелів, шт.	Розмір алелів, п. н.	PIC
umc1061	5	99–114	0,72
phi093	6	266–299	0,73
umc1448	9	130–191	0,74
bnlg1782	12	206–277	0,90
phi083	7	127–163	0,81
bnlg1129	9	177–232	0,80
phi064	8	72–108	0,85
phi233376	4	141–158	0,41
phi96100	8	240–299	0,83

Відповідно до отриманих даних найбільш поліморфним був SSR маркер bnlg1782, для якого PIC становив 0,90. Найменше алелів ідентифіковано за використання маркера phi233376; його PIC дорівнював 0,41. Застосовуючи інші маркери, виявили від 5 до 9 алелів, про рівномірність розподілу яких серед досліджуваних ліній кукурудзи звичайної свідчать високі PIC.

Розрахувавши PIC за маркером umc1061, автори [20] одержали значення нижче, ніж у наших дослідженнях (0,49 проти 0,72). Втім для маркера phi233376 у вказаній публікації ідентифіковано сім алелів, тоді як нам вдалося отримати лише чотири. Відповідно й значення PIC було нижчим (0,41 проти 0,66). У роботі [21] маркер umc1448 визначено як один із найбільш поліморфних; водночас PIC маркера umc1061 виявився низьким. У праці [22] за маркером bnlg1782 ідентифіковано значну кількість алелів (9), до того ж PIC (0,85) свідчить про рівномірний їх розподіл серед досліджуваних генотипів кукурудзи. У наших дослідженнях цей маркер дав змогу виявити найвищий рівень поліморфізму, а от маркер phi233376 був найменш поліморфним. Відмінності в кількості алелів між нашим та іншими дослідженнями можуть бути зумовлені генотипами різного походження, а також методиками, застосованими для візуалізації продуктів ампліфікації.

На основі бінарної матриці наявності / відсутності ідентифікованих алелів розраховано молекулярні дистанції за Роджером між

досліджуваними лініями кукурудзи звичайної. Внаслідок групування ліній на основі молекулярних дистанцій за методом незваженого попарного середнього (Unweighted pair group average) отримано шість кластерних груп та чотири окремі кластери (рис. 2).

Три лінії – ЛН5, ЛН6 та ЛН53 – виділено в окремі кластери. Визначено, що лінії ЛН22

та ЛН32 сформували один кластер. До двох окремих кластерних груп увійшло по три лінії: ЛН2, ЛН11, ЛН13 та ЛН21, ЛН28 та ЛН37. Інші чотири групи кластерів налічували від п'яти до 17 ліній.

Найподібнішими за SSR маркерами виявилися лінії кукурудзи звичайної ЛН43 та ЛН48 зі значенням молекулярних дистанцій

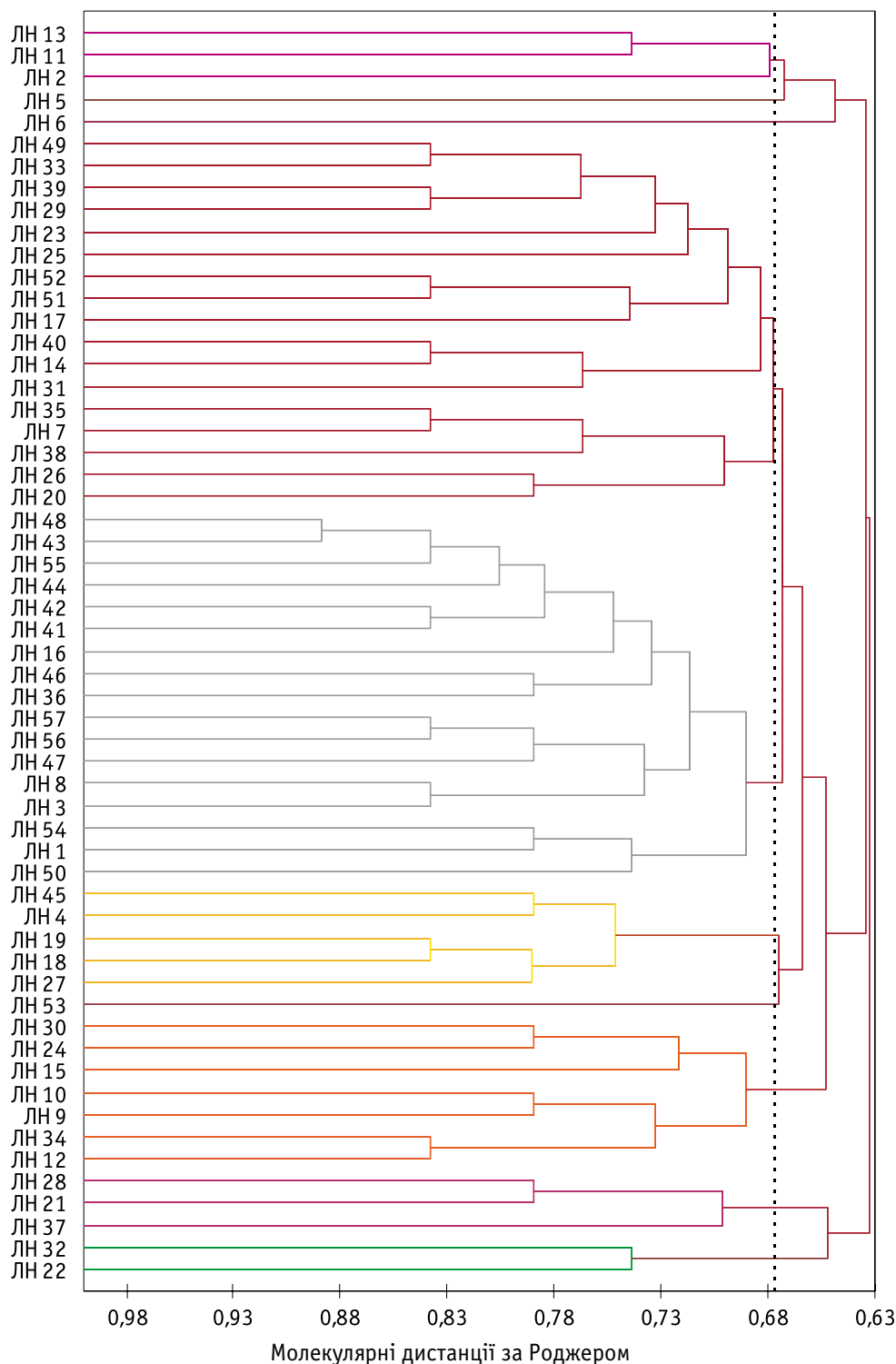


Рис. 2. Дендрограма зв'язків між лініями кукурудзи звичайної за результатами ПЛР-аналізу з використанням SSR маркерів

0,11. Досить подібними також були 17 пар ліній, молекулярні дистанції між якими становили 0,16 (табл. 2).

Якщо розглядати пари ліній, що визначені за результатами експертизи на БОС як дуже подібні, на основі кодів прояву морфологічних ознак, то молекулярні дистанції між ними становили від 0,30 до 0,38. Найбільш подібними за SSR маркерами з цієї групи були ЛН4 та ЛН5 (0,30). Однак з огляду на те, що максимальне значення молекулярних дистанцій за Роджером для досліджуваних ліній кукурудзи становить 0,42, можна стверджувати, що всі лінії з групи дуже подібних виявилися досить відмінними за SSR маркерами.

Схоже твердження можна застосувати і для групи подібних, в якій для всіх пар ліній молекулярні дистанції становили понад 0,30 (від 0,30 до 0,42). Найбільш подібними за SSR маркерами з цієї групи виявилися лінії ЛН36 та ЛН34 (значення молекулярних дистанцій – 0,26), найбільш відмінними – ЛН13 та ЛН14 (молекулярні дистанції – 0,42).

Серед досліджуваних ліній кукурудзи звичайної, визначених за результатами експертизи на БОС як відмінні, спостерігали варіювання у значеннях молекулярних дистанцій. Так, у найвідміннішій парі ЛН6 та ЛН22 вони становили 0,42, у ліній ЛН42 та ЛН43 з високим ступенем подібності – 0,16, в інших пар – від 0,30 до 0,38.

Унаслідок розрахунку кореляційної залежності між коефіцієнтами подібності за Пірсоном, отриманими на основі кодів прояву морфологічних ознак, та молекулярними дистанціями за Роджером визначено дуже слабку обернену кореляцію – на рівні 95% ймовірності. Коефіцієнт кореляції становив 0,1.

З огляду на те, що між показниками молекулярних дистанцій і коефіцієнтами подібності не спостерігається сильної кореляції, розподіл ліній за SSR маркерами різниться з розподілом за морфологічними ознаками, що демонструє доцільність поєднання двох маркерних систем для спрощення визначення відмінності. Ефективність застосування ДНК маркерів для визначення відмінності сортів доведено в багатьох працях. Так, автори роботи [23] поєднували SSR маркери з описом морфологічних ознак у межах експертизи на відмінність, однорідність і стабільність. Результати подібних досліджень наведено у праці [24], де порівняно застосування різних типів ДНК маркерів і морфологічного опису ліній кукурудзи та наголошено на ефективності поєднання двох маркерних систем.

У роботі [25] досліджено використання SSR маркерів і морфологічних ознак для виявлення філогенетичних зв'язків між загальнопоширеними в Італії генотипами кукурудзи. Автори показали, що філогенетичні зв'язки за морфологічними ознаками та SSR маркерами, застосованими в роботі, є відмінними, проте дають змогу виявити різницю між загальнопоширеними генотипами кукурудзи. За результатами наших досліджень також виявлено відмінності між оцінками ліній кукурудзи за морфологічними ознаками та SSR маркерами, а також між визначенням подібності ліній за оцінкою експерта БОС, який використовує кодову формулу морфологічних ознак і бере до уваги рівень вагомості відмінностей за певними, особливо груповими, морфологічними ознаками.

У публікації [26] встановлено п'ять головних компонентів, що визначають 80% варіювання морфологічних ознак. А саме: дати цвітіння та появи шовку, висота рослини, довжина листка та качана. За Методикою визначення відповідності сортів кукурудзи звичайної критеріям БОС [16], згідно з якою проводили морфологічний опис досліджуваних ліній, ознаки, пов'язані з часом цвітіння та появи шовку, а також довжиною качана, рекомендовано до групування з подібними загальновідомими сортами. Крім того, автори [26] продемонстрували відмінності між отриманими кластерними групами за морфологічними ознаками та SSR маркерами. Виявлену тенденцію також підтверджують результати наших досліджень.

Висновки

Результати досліджень свідчать, що використані в роботі SSR маркери є достатньо інформативними та можуть бути застосовані для вивчення генетичного різноманіття кукурудзи звичайної. Водночас порівняння її ліній окремо за різними маркерними системами не дає змоги отримати об'єктивну оцінку ступеня відмінності для підготовки експертного висновку науково-технічної експертизи на БОС (що показала оцінка ліній кукурудзи за SSR маркерами та морфологічними ознаками із застосуванням статистичних методів аналізу). Це зумовлено тим, що експерт з БОС, крім певних статистичних методів, для встановлення відмінності сортів також використовує підхід визначення вагомості (значущості) певної ознаки з метою оцінювання пари ліній. Розрахунок молекулярних дистанцій є допоміжним інструментом, який можна застосовувати під час встановлення відмінності, а також добору подібних ліній (тих, що проходять екс-

пертизу на ВОС, і ліній робочої колекції загальновідомих сортів) для розміщення їх поряд одна з одною з метою проведення досліджень у польових умовах.

References

- Kumar, B., Choudhary, M., Kumar, P., Kumar, K., Kumar, S., Singh, B. K., & Rakshit, S. (2022). Population structure analysis and association mapping for turcicum leaf blight resistance in tropical maize using SSR markers. *Genes*, 13(4), Article 618. doi: 10.3390/genes13040618
- Afriyie-Debrah, C., Addo, J. S., Berchie, J. N., Nyandanu, D., & Ribeiro, P. F. (2018). DNA-based markers as the DUS descriptors to assess the genetic diversity in the maize varieties. *Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology*, 4(1), 1–9. doi: 10.9734/AJB2T/2018/41367
- The Cabinet of Ministers of Ukraine. (2024). State Statistics Service of Ukraine (the data are valid as of December, 15, 2024). Kyiv. Retrieved from <https://www.ukrstat.gov.ua> [In Ukrainian]
- Bocianowski, J., Nowosad, K., Wróbel, B., & Szulc, P. (2021). Identification of associations between SSR markers and quantitative traits of maize (*Zea mays* L.). *Agronomy*, 11(1), Article 182. doi: 10.3390/agronomy11010182
- Yang, C. J., Russell, J., Ramsay, L., Thomas, W., Powell, W., & Mackay, I. (2021). Overcoming barriers to the registration of new plant varieties under the DUS system. *Communications Biology*, 4(1), Article 302. doi: 10.1038/s42003-021-01840-9
- Achard, F., Butruille, M., Madjarac, S., Nelson, P. T., Duesing, J., Laffont, J. L., ... Smith, J. S. C. (2020). Single nucleotide polymorphisms facilitate distinctness uniformity stability testing of soybean cultivars for plant variety protection. *Crop Science*, 60(5), 2280–2303. doi: 10.1002/csc2.20201
- Jamali, S. H., Cockram, J., & Hickey, L. T. (2019). Insights into deployment of DNA markers in plant variety protection and registration. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(7), 1911–1929. doi: 10.1007/s00122-019-03348-7
- Yu, J. K., & Chung, Y. S. (2021). Plant variety protection: Current practices and insights. *Genes*, 12(8), Article 1127. doi: 10.3390/genes12081127
- Kyi, S., Win, K. K., Than, H., Win, S., Htwe, N., & Hlaing, A. (2022). DNA fingerprinting of selected maize (*Zea mays* L.) genotypes using SSR markers. *Environmental and Rural Development*, 13, 158–163.
- Dandan, D. O. U., Jianjun, S. U. N., Yuxi, G. U. O., Dexin, W. A. N. G., Xinhai, G. U. O., & Chaoming, D. I. N. G. (2023). Genetic diversity and population structure analyses of maize inbred lines based on DUS test traits in Huang Huai Hai region. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 52(5), 24–32. doi: 10.15933/j.cnki.1004-3268.2023.05.004
- Choudhary, M., Singh, A., Das, M. M., Kumar, P., Naliath, R., Singh, V., ... Rakshit, S. (2023). Morpho-physiological traits and SSR markers-based analysis of relationships and genetic diversity among fodder maize landraces in India. *Molecular Biology Reports*, 50(8), 6829–6841. doi: 10.1007/s11033-023-08602-2
- Ministry of Agrarian Policy and Food of Ukraine. (2024). *Register of plant varieties suitable for distribution in Ukraine* (the register is valid as of November 21, 2024). Kyiv. Retrieved from <https://minagro.gov.ua/file-storage/rejestr-sortiv-roslin> [In Ukrainian]
- Gupta, N. (2019). DNA extraction and polymerase chain reaction. *Journal of Cytology*, 36(2), 116–117. doi: 10.4103/JOC.JOC_110_18
- Seeds of agricultural crops. *Methods for determining quality: State Standard of Ukraine 4138:2002*. (2003). Kyiv: Derzhspozhyvstandart Ukrainy. [In Ukrainian]
- International Organization for Standardization. (2015). *Molecular biomarker analysis – SSR analysis of maize (E): ISO/TR 17623:2015*. Geneva.
- Ukrainian Institute for Plant Variety Examination. (2021). *Methodology for the examination of maize (Zea mays L.) varieties for distinctness, uniformity, and stability*. Kyiv. Retrieved from <https://sops.gov.ua/uploads/page/metodiki/2021-08-13-zernovy.pdf> [In Ukrainian]
- Xia, X. (2018). DAMBE7: New and improved tools for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1550–1552. doi: 10.1093/molbev/msy073
- Prysiachniuk, L., Starychenko, Y., Hryniv, S., Shytikova, Y., Leshchuk, N., Melnyk, S., & Kliachenko, O. (2021). The comparison analysis of software for Mantel test between DNA markers and morphological traits of plant varieties. *AGROFOR*, 6(2), 1–12. doi: 10.7251/AGRENG2102132P
- Lu, Z., Ma, Z., Fu, M., & Su, J. (2024). Clustering analysis of natural D-borneol resource plants based on simple sequence repeat (SSR) markers, leaf morphology, and chemical composition. *Biochemical Genetics*, 1–20. doi: 10.1007/s10528-024-10755-z
- Adu, G. B., Awuku, F. J., Amegbor, I. K., Haruna, A., Manigben, K. A., & Aboyadana, P. A. (2019). Genetic characterization and population structure of maize populations using SSR markers. *Annals of Agricultural Sciences*, 64(1), 47–54. doi: 10.1016/j.aos.2019.05.006
- Vasile, V., Ciucă, M., Nicolae, E., Voaiș, C., & Cornea, C. P. (2022). Assessment of genetic similarity and purity degree among several Romanian maize inbred lines using SSR markers. *Scientific Bulletin Series F. Biotechnologies*, 26(1). Retrieved from https://biotechnologyjournal.usamv.ro/pdf/2022/issue_1/Art2.pdf
- Nikolić, A., Kravić, N., Srdić, J., Kovačević, D., Anđelković, V., Filipović, M., & Mladenović-Drinić, S. (2019). Divergence among maize genotypes with different kernel types according to SSR marker analysis. *Genetika*, 51(1), 237–249. doi: 10.2298/GEN-SR1901237N
- Gunjaca, J., Buhinicek, I., Jukic, M., Sarcevic, H., Vragolovic, A., Kozic, Z., & Pejic, I. (2008). Discriminating maize inbred lines using molecular and DUS data. *Euphytica*, 1–2, 165–172. doi: 10.1007/s10681-007-9518-z
- Kumar, A., Longmei, N., Kumar, P., & Kaushik, P. (2022). Molecular marker analysis of genetic diversity in maize: A review. *OBM Genetics*, 6(1), 1–19. doi: 10.21926/obm.genet.2201150
- Stagnati, L., Soffritti, G., Martino, M., Lanubile, A., Desiderio, F., Ravasio, A., ... Busconi, M. (2021). Morphological and genetic characterization of local maize accessions from Emilia Romagna Region, Italy. *Sustainability*, 14(1), Article 91. doi: 10.3390/su14010091
- Andjelkovic, V., Nikolic, A., Kovacevic, D., Mladenovic-Drinic, S., Kravic, N., Babic, V., ... Bosev, D. (2018). Conserving maize in gene banks: Changes in genetic diversity revealed by morphological and SSR markers. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 78(1), 30–38.

UDC 633.15: 58.084.2: 577.213.3

Prysiazhniuk, L. M.*, Shytikova, Y. V., Tahantsova, M. M., Dikhtiar, I. O., & Hryniv, S. M. (2024). Comparative analysis of maize (*Zea mays* L.) lines based on morphological and molecular characteristics. *Plant Varieties Studying and Protection*, 20(4), 234–242. <https://doi.org/10.21498/2518-1017.20.4.2024.324206>

*Ukrainian Institute for Plant Variety Examination, 15 Horikhuvatskyi shliakh St., Kyiv, 03041, Ukraine, *e-mail: prysiazhniuk_l@ukr.net*

Purpose. To determine the phylogenetic relationships between maize lines based on morphological description (DUS test) and SSR markers. **Methods.** Field studies (descriptive plant morphology), molecular techniques (PCR, capillary electrophoresis), and statistical analyses (correlation analysis, hierarchical clustering). **Results.** Based on field studies of 57 maize lines by morphological traits, the codes of qualitative and quantitative characteristics were determined, allowing the classification of the studied maize lines into three groups according to their similarity level: distinct, similar, and very similar. Pearson correlation coefficients were used to calculate phenotypic distances between the studied maize lines, resulting in five cluster groups and seven separate clusters formed by individual lines. The most similar maize lines according to the morphological character codes were those with a similarity coefficient of 0.997, which belong to the group of similar lines according to the results of the testing for distinctness, uniformity, and stability (DUS). The simi-

larity coefficients among lines classified as very similar were sufficiently high, ranging from 0.890 to 0.990, although one pair of lines within this group had a similarity coefficient of 0.771. Based on Roger's molecular distances for nine SSR markers, the most similar lines had a similarity coefficient of 0.16, yet this pair was classified as distinct according to DUS testing. The most distinct pair of lines based on SSR markers had a similarity coefficient of 0.42. The correlation analysis between phenotypic and molecular distance matrices revealed a very weak inverse correlation ($r = -0.1$). **Conclusions.** It was found that the calculation of phenotypic and molecular distances reflects the level of similarity among the studied genotypes based on morphological traits and SSR markers. It was shown that the degree of similarity among the studied maize lines varies depending on the evaluation approach, as indicated by expert assessment based on DUS testing results.

Keywords: maize; phenotypic and molecular distances; SSR markers; similarity coefficients; correlation; allele.

Надійшла / Received 03.12.2024

Погоджено до друку / Accepted 20.12.2024