

ГОНЧАРОВ Ю.О.¹, ДЕРКАЧ К.В.¹, АБРАІМОВА О.Є.¹, САТАРОВА Т.М.^{1,2}✉,
 ВЕСЕЛЯНСЬКА К.В.², ГАЛАЦАН С.В.², ЛУШПІЙ А.А.², ТИШКОВСЬКА Т.О.²

¹ ДНУ Інститут зернових культур НААН України,

Україна, 49027, м. Дніпропетровськ, вул. В. Вернадського, 14, e-mail: wild91@list.ru, katerina-d-d@yandex.ua

² ДВНЗ «Український державний хіміко-технологічний університет»,

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

*satarova2008@yandex.ru, (063) 321-67-75, (095) 254-25-94

ІНФОРМАТИВНІСТЬ SSR-МАРКЕРІВ ПРИ ДОСЛІДЖЕННІ ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ЛІНІЙ КУКУРУДЗИ

Сучасний вітчизняний селекційний матеріал кукурудзи представлений великою кількістю генетично різнорідних популяцій, ліній та гібридів, які ефективно задіяні у селекційному процесі. Характеристика селекційних зразків кукурудзи у теперішній час здійснюється переважно за фенотиповими ознаками, а саме: за тривалістю вегетаційного періоду, стійкістю до біотичних та абіотичних факторів, врожайністю тощо. Проте лише таких знань часто недостатньо для розподілу зразків за генотипами та об'єднання їх у гетерозисні групи, типи зародкової плазми, для паспортизації та ідентифікації генотипів. У зв'язку з цим актуальним є залучення ДНК-аналізу для генотипування ліній кукурудзи сучасного селекційного генофонду України.

Одним із способів виявлення генетичного поліморфізму, тобто існування в популяції двох і більше переривчастих варіантів алелей гена чи негенних ділянок ДНК, є використання SSR-маркерів, або мікросателітів. SSR-маркери – це гіперваріабельні повторювані послідовності, які складаються з блоків коротких тандемно організованих повторів, основний мотив яких має довжину 2–8 п.н. Поліморфізм мікросателітних локусів пов'язаний із варіюванням числа повторів у блоці і відповідно з поліморфізмом довжин продуктів ампліфікації [1].

SSR-маркери є широко використовуваними в наукових дослідженнях кукурудзи поліалельними маркерами [2]. Вони надійні під час використання для великих обсягів аналізу та більш інформативні, ніж SNP-маркери, оскільки останні є біалельними [3]. SSR-маркери часто застосовують для аналізу агрономічних ознак у кукурудзи та урожайності [3, 4], прогнозування рівня гетерозису та комбінаційної здатності у ході створення гібридів [5], стійкості до абіотичних факторів [6] тощо.

Мета роботи – оцінити інформативність обраних SSR-маркерів у дослідженні генетичного поліморфізму ліній кукурудзи вітчизняної селекції.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугували 29 нових, перспективних ліній кукурудзи селекції ДНУ Інститут зернових культур НААН (м. Дніпропетровськ). Використані лінії створені в північній підзоні Степової зони України і адаптовані до природно-кліматичних умов цієї зони.

Для встановлення поліморфізму ДНК кукурудзи були використані 6 SSR-маркерів, представлених у таблиці 1.

ДНК виділяли за СТАВ-методом згідно з протоколом виділення рослинної ДНК з використанням протеїнази К [7]. Визначення концентрації нуклеїнових кислот проводили спектрофотометрично. Чистоту препаратів ДНК визначали за співвідношенням поглинання за довжини хвилі 230, 260, 280 та 320 нм [8]. Концентрацію зразків ДНК стандартизували до 30 нг/мл.

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за допомогою ампліфікатора TECHE NE TC-5000 за таких умов: початкова денатурація – 94°C, 2 хв; далі 30 циклів: 94°C – 0,5 хв; 56°C – 1 хв; 72°C – 1 хв; завершальна елонгація – 72°C, 5 хв. Реакційна суміш об'ємом 20 мкл мала такий склад: 2 мкл буфера для ПЛР (10× Dream Taq Green TM), 0,2 мМ кожного dNTP, по 0,5 мкл 10 мкМ праймера, 30 нг ДНК, 1 од. Dream Taq TM полімерази (Thermo Scientific).

Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в горизонтальному агарозному гелі (3 %) в приладі для електрофорезу Sub-cell GT (Bio-Rad) за напруги 5 В/см та кімнатної температури.

Характеристика використаних SSR-маркерів

SSR-маркер	Повторність нуклеотидів	Прямий/зворотній праймери	Хромосома. Бін	Посилання
phi022	GTGC	TGCGCACCAGCGACTGAC/ GCGGGCGACGCTTCCAAAC	9.03	[10]
phi034	CCT	TAGCGACAGGATGGCCTCTTCT/ GGGGAGCACGCCTTCGTTCT	7.02	[10]
phi062	ACG	CCAACCCGCTAGGCTACTTCAA/ ATGCCATGCGTTCGCTCTGTATC	10.04	[10]
phi073	AGC	GTGCGAGAGGCTTGACCAA/ AAGGGTTGAGGGCGAGGAA	3.05	[10]
phi079	AGATG	TGGTGCTCGTTGCCAAATCTACGA/ GCAGTGGTGGTTTCGAACAGACAA	4.05	[10]
phi085	AACGC	AGCAGAACGGCAAGGGCTACT/ TTTGGCACACCACGACGA	5.06	[10]

Для аналізу отриманих результатів, зокрема для візуалізації фрагментів ДНК (ампліконів), у трис-боратний буфер (ТБЕ) додавали 5 мкл/л бромистого етидію, гель фотографували та аналізували на приладі для візуалізації GelDoc™ (Bio-Rad).

Індекс поліморфності маркера i (PIC) розраховували за формулою:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2,$$

де f_i – частота i -го алеля, n – кількість алелів, i виражали в частках одиниці. Високим індексом поліморфності маркера вважається $PIC > 0,25$.

Частоту трапляння алелю розраховували як відношення кількості зразків, у яких зареєстровано цей алель, до загальної кількості проаналізованих зразків і виражали в частках одиниці.

Частоту пропущених даних за маркером i (%) визначали як процентне відношення кількості селекційних зразків, за якими не вдалося визначити алельний стан маркера i , до загальної кількості селекційних зразків, проаналізованих за маркером i .

Мажорним алелем за маркером i вважали алель, найбільш поширений за частотою трапляння у добірці досліджених селекційних зразків. Частоту мажорного алелю за маркером i визначали як відношення кількості ампліконів мажорного алелю за маркером i до загальної кількості різних розмірів ампліконів, отриманих за маркером i .

Результати та обговорення

Усі досліджені лінії виявилися гомозиготними за дослідженими мікросателітними локусами.

Поліморфізм розміру ампліконів у проаналізованій добірці з 29 ліній кукурудзи представлено в таблиці 2. Всі маркери у певній мірі виявляли поліморфізм досліджених ліній. Із вивчених маркерів найбільшим поліморфізмом серед досліджених ліній характеризувався маркер phi085. За цим маркером зафіксовано 8 алелів, які проявляються у різній довжині ампліконів. Найменший поліморфізм відзначено за праймером phi062, у якому визначилося лише 3 алелі. За іншими маркерами було ідентифіковано по 4 (phi022 та phi073) або по 5 (phi034 та phi079) алелів. Усього ідентифіковано 29 алелів, тобто в середньому по 4,83 алелю на маркерний локус, що свідчить про достатньо високе різноманіття досліджених ліній кукурудзи.

Розраховані нами показники інформативності маркерів (табл. 3) показують, що їх індекс поліморфності коливається у межах 0,44–0,78, тобто є високим. За більшістю досліджених маркерів частота пропущених даних дорівнювала нулю, а за маркерами phi079 та phi085 – знаходилася на рівні 3,45 % та 13,79 % відповідно. Розмір амплікону мажорного алелю для вивчених маркерів коливався у межах 130–230 п.н. Частоти мажорного алелю знаходилися в діапазоні 0,38–0,73.

Значення такого показника, як частота пропущених даних, більше за нуль свідчить про те, що у певній лінії або ліній ампліфікація за певним праймером не відбулася швидше за все через неприєднання праймера до ДНК. Однією з причин цього можуть бути мутантні зміни в тому місці мікросателітного локусу, куди повинен приєднатися праймер.

Таблиця 2

Частоти зустрічальності алелів мікросателітних локусів серед 29 досліджених ліній кукурудзи

Маркер	Алель	Розмір амплікону, п.н.	Частота зустрічальності алелю	Маркер	Алель	Розмір амплікону, п.н.	Частота зустрічальності алелю
phi 022	1	125	0,13	phi 079	1	162	0,04
	2	130	0,45		2	171	0,61
	3	155	0,28		3	176	0,21
	4	160	0,14		4	183	0,07
phi 034	1	118	0,17		5	189	0,07
	2	130	0,10	1	213	0,16	
	3	138	0,42	2	220	0,08	
	4	142	0,24	3	230	0,40	
	5	147	0,07	4	236	0,08	
phi 062	1	143	0,17	phi 085	5	241	0,08
	2	148	0,10		6	252	0,04
	3	155	0,73		7	260	0,08
phi 073	1	174	0,35		8	267	0,08
	2	178	0,38				
	3	182	0,17				
	4	187	0,10				

Таблиця 3

Показники інформативності SSR-маркерів, використаних для аналізу 29 ліній кукурудзи

SSR-маркер	Індекс поліморфності маркера	Частота пропущених даних, %	Розмір амплікону мажорного алелю, п.н.	Частота мажорного алелю
phi022	0,68	0	130	0,45
phi034	0,73	0	138	0,42
phi062	0,44	0	155	0,73
phi073	0,70	0	178	0,38
phi079	0,57	3,45	171	0,61
phi085	0,78	13,79	230	0,40

Деякі з використаних нами маркерів досліджувалися в роботах інших учених. Так, маркер phi022 у роботі [9] під час дослідження 66 інбредних ліній кукурудзи вітчизняної (харківської) та світової селекції проявив PIC на рівні 0,232 та два алелі з довжиною ампліконів 137 та 170 п.н. У ході дослідження ліній селекції ДНУ «Інституту зернових культур НААН України» PIC склав 0,68 та було зареєстровано чотири алелі з розміром ампліконів 125, 130, 155 та 160 п.н. Отже, у ліній селекції ДНУ «Інституту зернових культур НААН України» за цим праймером виявлено ширший поліморфізм, ніж у ліній селекції інших закладів.

Зафіксовані розміри ампліконів за використання маркера phi034, за даними [10] для понад 500 ліній північно-американської зубоподібної зародкової плазми, становили 118–145 п.н., а індекс поліморфності склав 0,57. Для ліній української селекції варіювання довжин ампліконів

склало 118–147, а індекс поліморфності відзначено на рівні 0,73. Отже, за цим маркером певні алелі у ліній української селекції співпадають із лініями світової селекції.

Для маркера phi062, за даними [10], відзначено розміри ампліконів на рівні 159–165 п.н. з індексом поліморфності 0,63 для вибірки з більш ніж 500 лініями північно-американської зубоподібної зародкової плазми. У нашому дослідженні з 29 лініями української селекції індекс поліморфності склав 0,44, а розмір ампліконів відрізнявся від північно-американського селекційного матеріалу і знаходився у межах 143–155 п.н. Цей маркер рекомендовано для визначення належності ліній кукурудзи до генофонду української селекції, зокрема ДНУ «Інститут зернових культур НААН України».

Для маркера phi073, за даними [10], відзначено розмір ампліконів на рівні 176–195 п.н. з індексом поліморфності 0,65 для понад 500 ліній

північно-американської зубоподібної зародкової плазми. Лінії селекції ДНУ «Інститут зернових культур НААН України» характеризувалися розміром ампліконів в 174–187 п.н. з індексом поліморфності 0,70, тобто, помічено схожість розмірів ампліконів для ліній кукурудзи української та зарубіжної селекції.

Для маркера *phi079*, за даними [10], визначено розмір ампліконів на рівні 179–196 п.н. з індексом поліморфності 0,73 для понад 500 ліній північно-американської зубоподібної зародкової плазми. Вітчизняні лінії характеризувалися довжиною ампліконів в 162–189 п.н. з індексом поліморфності 0,57, тобто, помічено схожість розмірів ампліконів для ліній кукурудзи української та зарубіжної селекції. Індекс поліморфності для маркера *phi079* під час дослідження 24 індійських та мексиканських ліній склав 0,25, в цьому локусі було виявлено всього 2 алелі [11].

Для маркера *phi085*, за даними [10], встановлено розмір ампліконів на рівні 236–266 п.н. з індексом поліморфності 0,79 для понад 500 ліній північно-американської зубоподібної зародкової

плазми. Проаналізовані вітчизняні лінії характеризувалися розміром ампліконів в 213–267 п.н. з індексом поліморфності 0,78, тобто помічено дещо ширший діапазон розмірів ампліконів у ліній кукурудзи української селекції порівняно із зарубіжною. У роботі [12] серед п'яти проаналізованих популяцій кукурудзи (2 популяції цукрової, 2 популяції зубоподібної кукурудзи та 1 популяція теосинте) виявлено лише один алель за маркером *phi085*.

Висновки

Таким чином, у результаті проведеного дослідження встановлено можливість використання обраних 6 SSR-маркерів для ідентифікації та характеристики поліморфізму ліній кукурудзи української селекції. Індекс поліморфності вивчених маркерів для масиву оцінених ліній кукурудзи, створених у північній підзоні зони Степу України, знаходиться у межах 0,44–0,78. Ідентифіковано 29 алелей, у середньому по 4,83 алеля на локус, що свідчить про високе різноманіття досліджених ліній кукурудзи.

ЛІТЕРАТУРА

1. Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Э., Календарь Р.Н. Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений. – Одесса: «Астропринт». – 2011. – 336 с.
2. Волкова Н.Е. Молекулярно-генетичні дослідження ядерного геному кукурудзи: [монографія]. – Одесса: «Астропринт». – 2015. – 120 с.
3. Zhang Q., Wu C., Ren F., Li Y., Zhang C. Association analysis of important agronomical traits of maize inbred lines with SSRs // *Australian Journal of Crop Science*. – 2012. – 6, № 6. – P. 1131–1138.
4. Wegary D., Vivek B., Labuschagne M. Association of parental genetic distance with heterosis and specific combining ability in quality protein maize // *Euphytica*. – 2013. – 191. – P. 205–216.
5. Wende A., Shimelis H., Derera J., Mosisa W., Danson J., Laing M. D. Genetic interrelationship among medium to late maturing tropical maize inbred lines using selected SSR markers // *Euphytica*. – 2013. – 191. – P. 269–277.
6. Oyekunle M., Badu-Apraku B., Hearne S., Franco J. Genetic diversity of tropical early-maturing maize inbreds and their performance in hybrid combinations under drought and optimum growing conditions // *Field Crops Research*. – 2015. – 170. – P. 55–65.
7. Сиволап Ю.М. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях. – К.: Аграр. наука. – 1998. – 156 с.
8. Великов В.А. Молекулярная биология. Практическое руководство. – Саратов: «Саратовский источник». – 2013. – 84 с.
9. Китаева С.С., Кириченко В.В., Чернобай Л.Н. Полиморфизм микросателлитных локусов инбредных линий кукурузы (*Zea mays* L.) харьковской и мировой селекции // *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України: Серія «Агрономія»*. – 2013. – 2, № 183. – С. 306–312.
10. MaizeGDB [Electronic resource]. – Режим доступу: www.maizegdb.org.
11. Kanagarasu S., Nallathambi G., Ganesan K.N., Kannan S., Shobhana V.G., Senthil N. Determination of genetic polymorphism among indigenous and exotic maize inbreds using microsatellite markers // *African Journal of Biotechnology*. – 2013. – 12, № 39. – P. 5723–5728.
12. Terra T.F., Wiethölter P., Souza Almeida C.C.S., Silva S.D.A., Bered F., Sereno M.J.C.M., Neto J.F.B. Genetic variability in maize and teosinte populations estimated by microsatellites markers // *Ciência Rural*. – 2011. – 41, № 2. – P. 205–211.

GONCHAROV YU.O.¹, DERKACH K.V.¹, ABRAIMOVA O.E.¹, SATAROVA T.M.^{1,2}, VESELYANS'KA K.V.², GALATSAN S.², LYSHPIY A.², TUSHKOV'S'KA T.²

¹ *SSE Institute of Grain Crops of Nat. Acad. of Agr. Sci. of Ukraine,*

Ukraine, 49600, Dnepropetrovsk, V. Vernadskogo str., 14, e-mail: katerina-d-d@yandex.ua, satarova2008@yandex.ru

² *SHEE «Ukrainian State University of Chemical Technology»,*

Ukraine, 49005, Dnepropetrovsk, Gagarin Av., 8

INFORMATIVITY OF SSR-MARKERS IN THE INVESTIGATIONS OF MAIZE LINES GENETIC POLYMORPHISMS

Aim. The aim of the investigation was to estimate the possibility of SSR-markers application for identification and characteristic of polymorphism in maize inbreds of Ukrainian selection. **Methods.** DNA-analysis was conducted with 6 SSR-markers for 29 maize inbreds having been selected in northern subzone of Steppe zone of Ukraine. **Results.** The PICs of 6 SSR-markers were on the level of about 0.44–0.78. The lengths of major allele were about 130–230 bp 29 alleles were identified, that is about 4.83 alleles per 1 locus. **Conclusions.** It was founded that the investigated SSR-markers may be used for identification and description of polymorphism in Ukrainian maize inbreds adapted to Steep zone.

Keywords: maize, SSR-markers, polymorphism, inbreds.