

Технологія генотипування KASP™ та її використання в генетико-селекційних програмах (на прикладі кукурудзи)

Н. Е. Волкова*, В. М. Соколов

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннезнавства та сортовивчення, вул. Овідіопольська дорога, 3, м. Одеса, 65036, Україна, *e-mail: natavolki@ukr.net

Мета. Здійснити огляд публікацій щодо суті технології генотипування – конкурентної алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції (*англ.* competitive allele-specific PCR, нині має назву Kompetitive Allele Specific PCR, KASP™) та її використання в різних генетико-селекційних напрямках досліджень (на прикладі кукурудзи). **Результати.** Висвітлено суть технології KASP-генотипування, його переваги. Представлено вимоги до матричної ДНК, оскільки успіх KASP-аналізу залежить від її якості й кількості. Наведено приклади глобальних проектів у сфері селекції рослин для підвищення врожайності, в яких використовують технологію KASP-генотипування. На прикладі кукурудзи представлено результати KASP-генотипування та їх впровадження в селекцію й насінництво, зокрема, для визначення генетичної ідентичності, генетичної чистоти, перевірки походження, маркер-допоміжного добору та ін. Продемонстровано, як геномний добір за технологією KASP-генотипування може сприяти швидкому генетичному посиленню посухотолерантності у кукурудзи. Шляхом порівняння ефективності створення ліній з певними ознаками (наприклад, поєднання високої врожайності зерна та посухотолерантності) з використанням підходів традиційної селекції (добір за фенотипом) та молекулярно-генетичних методів (добір за маркерами) доведено: для того, щоб розкрити потенціал генотипу рослини у разі використання звичайного самозапилення, тест-кросингу й оцінки, необхідно чотири сезони (два роки за наявності теплиць), тоді як у разі застосування маркерів популяцію збагатили цільовими алелями за один сезон. При цьому не було потреби в стресовому чиннику. **Висновки.** Технологія KASP-генотипування є високоточним і ефективним інструментом сучасної генетики та селекції, який успішно використовують для дослідження генетичної різноманітності, генетичної спорідненості, структури популяцій, визначення генетичної ідентичності, генетичної чистоти, перевірки походження, картування локусів кількісної ознаки, визначення алелів, маркер-допоміжного добору, маркер-допоміжної селекції. Доцільним і своєчасним є впровадження технології KASP-генотипування в нашої країні для вирішення широкого кола завдань сучасної генетики, селекції, насінництва.

Ключові слова: *однонуклеотидний поліморфізм, технологія KASP™, генотипування, кукурудза, молекулярний маркер.*

Вступ

Однонуклеотидний поліморфізм (*англ.* single nucleotide polymorphism, SNP) є зміною одного нуклеотиду в послідовності ДНК зі звичайною альтернативою з двох можливих нуклеотидів у цьому положенні. Отже, поліморфізм виникає тоді, коли один нуклеотид (А, Т, С або G) у геномі або іншій послідовності вирізняється між членами одного виду або між парними хромосомами в індивідуума. Технологічний прогрес у сиквенуванні та наявність інформації щодо послі-

довностей геномів призвели до виявлення й розроблення SNP-маркерів для сільськогосподарських культур. SNP-маркери значною мірою замінили маркери на основі послідовностей простих повторів (*англ.* simple sequence repeats, SSR) для сиквенованих видів сільськогосподарських культур, зокрема кукурудзи. Очікується, що SNP-маркери замінять інші типи молекулярних маркерів для генотипування більшості видів у найближчому майбутньому у зв'язку з дедалі ширшим використанням технологій сиквенування наступного покоління [1].

Завдяки низькій вартості, широкій представленості в геномі, локуспецифічності, кодомінантності, простому обліку (документуванню), потенціалу для аналізу з високою

Nataliia Volkova

<http://orcid.org/0000-0002-9333-4872>

пропускною здатністю й відносно низькому рівню помилки генотипування [2, 3], SNP-маркери стали потужним інструментом для багатьох генетичних і селекційних програм, включаючи характеристику зародкової плазми (дослідження генетичної різноманітності, генетичної спорідненості, структури популяцій), аналіз контролю якості (*англ.* quality control analysis) (визначення генетичної ідентичності, генетичної чистоти, перевірка походження), картування локусів кількісної ознаки (*англ.* quantitative trait loci, QTL), визначення алелів (*англ.* allele mining), маркер-допоміжний беккросинг (*англ.* marker-assisted backcrossing, MABC), маркер-допоміжний рекурентний добір (*англ.* marker-assisted recurrent selection, MARS), геномний добір (*англ.* genomic selection, GS).

Безперервний прогрес у геномних технологіях високої пропускної здатності призвів до появи численних платформ SNP-генотипування, які комбінують різноманітні хімічні техніки й техніки дискримінації алелів (розщеплення ендонуклеазами рестрикції, сиквенування, гібридизація з алель-специфічними зондами, алель-специфічна ампліфікація, олігонуклеотидне лігування та ін.), методи детекції (колориметрія, спектрометрія, флуоресценція, флуоресцентне резонансне перенесення енергії, флуоресцентна поляризація, хемілюмінесценція) і формати реакції (рідиннофазні, твердофазні, гель-електрофорез, сиквенування наступного покоління).

Однією з найчастіше використовуваних уніплексних платформ SNP-генотипування є конкурентна алель-специфічна ПЛР (*англ.* competitive allele-specific PCR) (нині має назву Kompetitive Allele Specific PCR, KASP™) [4].

Мета досліджень – огляд публікацій щодо суті технології KASP-генотипування та її використання в різних генетико-селекційних напрямках досліджень (на прикладі кукурудзи).

Результати досліджень

Технологія KASP-генотипування, розроблена та запатентована компанією «LGC Genomics» (Велика Британія) для внутрішнього використання, перетворилася на глобальну еталонну технологію. Вона ґрунтується на подовженні алель-специфічних олігонуклеотидів та флуоресцентному (Форстерівському) резонансному перенесенні енергії (*англ.* Förster resonance energy transfer, FRET) для генерації сигналу [5]. FRET – процес, в якому відбувається перенесення енергії від одного флуорофора до іншого: збуджуючи одну молекулу (донор), можна спостерігати флуоресценцію

іншої (акцептора). Докладно принцип KASP-генотипування викладено на сайті компанії «LGC Genomics» [6].

Застосовуючи технологію KASP-генотипування, можна точно ідентифікувати алельний поліморфізм типу SNP та вставки/делеції (26–200000 п.н.) будь-яких типів зразків (людина, тварини, рослини, мікроорганізми). До переваг відносять швидкий робочий процес – отримання результату протягом 1–2 годин, висока точність ідентифікації SNP (> 99,8%), можливість легкого масштабування (1–1536000 точок на добу), варіювання кількістю зразків та SNP-маркерів.

Технологія KASP-генотипування є доступною як продукт у вигляді валідованих та/або невалідованих наборів реагентів, а також як послуга генотипування (аутсорсінг) через сервісні лабораторії компанії «LGC Genomics» в Америці та Європі. Витрати на один KASP-аналіз становлять близько 15 доларів США, узагальнення результатів може бути представлено наступного дня (для порівняння: аналіз за допомогою платформи GoldenGate™ (Illumina) коштує близько 42 доларів США і триває близько шести тижнів).

Успіх KASP-аналізу залежить від якості й кількості матричної ДНК, яку можна екстрагувати зі зразків листя (свіжого, замороженого, ліофілізованого, висушеного) або насіння з використанням «домашнього» (звичного) протоколу та «hand made» розчинів або одного з декількох комерційно доступних наборів екстракції ДНК (наприклад, Qiagen DNeasy plant DNA extraction kit, Nucleon PhytoPure system, Promega Wizard genomic DNA purification kit, Zymo Research ZR plant/seed DNA kits, Norgen genomic DNA isolation kit, Bioneer ExiPrep plant genomic DNA kit).

Для проведення реакції необхідно 5–50 нг ДНК. Оскільки KASP нормалізовані на ДНК людини (розмір ядерного геному 3000 Мп.н.), для аналізу кожного SNP необхідно мінімум 5 або 10 нг матричної ДНК (визначено за допомогою флуороспектрометра безкюветного типу NanoDrop або спектрофотометрично на основі абсорбції відповідно). Для геномів інших організмів потрібно розраховувати концентрацію за формулою: концентрація ДНК = (геном організму в п.н. / 3000 п.н.) × 5,5. Наприклад, для KASP-аналізу цибулі необхідна така концентрація ДНК: 16400 Мп.н. / 3000 Мп.н. × 5,5 = 27,5 нг.

Чистота ДНК має важливе значення, оскільки наявність домішок у ДНК може негативно впливати на проходження полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), тобто ви-

моги до чистоти ДНК є стандартними для ПЛР. Джерелом ДНК можуть бути геномна, мітохондріальна ДНК, ПЛР-амплікони, повногеномні амплікони.

Залежно від мети дослідження, ДНК може бути екстрагована з однієї рослини або суміші кількох рослин. Для інбредних ліній, гібридів одиничного схрещування і двобатьківських картованих популяцій зазвичай змішують еквівалентні фрагменти листя 10–15 рослин на зразок для екстракції ДНК. Для MARS використовують ДНК, виділені з індивідуальних рослин. Під час KASP-генотипування зразків перехреснозапилених культур і місцевих рас необхідно або генотипувати ДНК, виділену з індивідуальних рослин, або генотипувати щонайменше чотири повтори сумішей ДНК, або виконувати кількісне SNP-генотипування [7].

Щоб мінімізувати помилки, необхідно аналізувати мінімум 24 зразки й два негативні (без матриці) контролю. Різниця в інтенсивності флуоресцентного сигналу між наявністю й відсутністю матричної ДНК дає змогу підвищити впевненість у достовірності результатів генотипування. Рекомендовано також включати позитивні контрольні зразки ДНК відомого генотипу.

Залежно від ступеня перевірки й випуску до використання маркери KASP-генотипування потрапляють в одну з трьох категорій перевірки компанією «LGC Genomics»: (1) «Тільки *in silico* дизайн». Всі дослідження виконують *in silico* за допомогою запатентованого програмного забезпечення проектування праймерів (Primerpicker). (2) «Функціонально підтверджено». Маркери розроблено на замовлення для використання «зовні». Внутрішню (In-house) оптимізацію не проводять. Ефективність оцінено на основі зовнішнього тестування, яке виконує замовник. (3) «Повністю підтверджено». Ефективність оцінено внутрішньою перевіркою, умови оптимізовано для кожного маркера кожного локусу. На основі більш як 10-річного досвіду компанія гарантує, що навіть на найнижчому рівні перевірки (*in silico* дизайн) значна більшість KASP-маркерів буде добре працювати без необхідності в подальшій оптимізації.

Технологія KASP-генотипування може бути використана для широкого спектра видів рослин, тварин і людини для різних потреб. Так, частковий перелік організмів, що генотиповано за допомогою цієї технології, містить 78 видів, серед яких – такі важливі сільськогосподарські культури, як ячмінь, рис, кукурудза, буряк, виноград, перець, кар-

топля, соя, соняшник, томат. Створено бібліотеку з майже 14 тис. маркерів сільськогосподарських рослин, яка постійно поповнюється як новими видами, так і новими маркерами.

Компанія «LGC Genomics» пропонує комплексне рішення поставленого завдання й забезпечує наборами для збору зразків рослин, екстракції ДНК і генотипування. Послуги аутсорсінгу компанії «LGC Genomics» дають змогу селекціонерам навіть у віддалених районах застосувати маркер-допоміжний добір (*англ.* marker-assisted selection, MAS). При цьому немає обмеження мінімального замовлення, можна замовити будь-яку кількість маркерів з бібліотеки.

Технологію KASP-генотипування використовують у 312 глобальних проектах у галузі селекції рослин для підвищення врожайності. Серед партнерів – такі відомі міжнародні організації, як Продовольча і сільськогосподарська організація Об'єднаних Націй (*англ.* Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO), Міжнародний центр покращення пшениці та кукурудзи (*англ.* International Maize and Wheat Improvement Center, CIMMYT), Міжнародний науково-дослідний інститут сільськогосподарських культур для напівпосушливих тропіків (*англ.* International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, ICRISAT), французький Національний інститут сільськогосподарських досліджень (*фр.* Institut national de la recherche agronomique, INRA), Консорціум з питань реліктових африканських сільськогосподарських культур (*англ.* African Orphan Crops Consortium, AOCC), Міжнародний центр сільськогосподарських досліджень у посушливих регіонах (*англ.* International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, ICARDA) та ін.

KASP-маркери кукурудзи. Набір з більш ніж 1200 функціонально перевірених KASP™ SNP-маркерів для генотипування кукурудзи розроблено для програм CIMMYT: Глобальної програми кукурудзи (*англ.* Global Maize Program) і Програми викликів покоління (*англ.* Generation Challenge Programme) [8]. Ці KASP™ SNP-маркери були застосовані у більш ніж 500 проектах CIMMYT і Консультативної групи з міжнародних сільськогосподарських досліджень (*англ.* Consultative Group for International Agricultural Research, CGIAR) у всьому світі. Тепер через компанію «LGC Genomics» ці маркери є доступними для співтовариства генетиків та селекціонерів кукурудзи, щоб прискорити розроблення поліпшених сортів шляхом MAS. KASP-мар-

кери кукурудзи призначені для аналізу таких ознак, як посухотолерантність, ефективність використання азоту, стійкість проти біотичних стресів, толерантність до алюмінію та ін.

SNP-маркери кукурудзи створено на основі даних картування проти еталонного генома B73 і дослідження щодо визначення SNP в експресованих послідовностях (*англ.* expressed sequence tag, EST). SNP картовані з використанням 284 популяцій рекомбінантних інбредних ліній кукурудзи – IBM (B736×Mo17) і LHRF (F26×F252), 24 патентованих сортів компанії «Pioneer» і 60 елітних сортів, північноамериканських і європейських ліній, тропічних ліній. Серед KASP-маркерів є такі, що детектують SNP у генах, наприклад, *ae1* (*amylose extender1*), *bt2* (*brittle endosperm2*), *fea2* (*fasciated ear2*), *glb1* (*globulin1*), *kip1* (*knotted interacting protein1*), *sh1-sh2* (*shrunk1*), *wx1* (*waxy1*) та ін. Незважаючи на мільйони відкритих в геномі кукурудзи SNP, відносно невелика кількість цих поліморфізмів є достатньою для молекулярно-генетичних досліджень та селекційних програм, що дає можливість добрати «гнучкий» набір високоефективних маркерів для виконання різнопланових завдань. Наприклад, серед майже 130 тис. опублікованих маркерів обрано набір з 695 високополіморфних SNP (значення частоти мінорного алеля > 0,3), ідентифікованих в екзонах, 5' та 3' нетрансльованих регіонах генів та конвертованих у проби чотирьох високопропускних технологій, у т. ч. і KASP [9]. «Гнучкий» набір 162 SNP, за якими в усіх чотирьох підходах отримано досконалі результати генотипування, можна використовувати для виконання різнопланових завдань.

На відміну від чипових систем з фіксованими маркерними наборами, бібліотека KASP-маркерів кукурудзи компанії «LGC Genomics» дає можливість здійснювати гнучкий вибір інформативних маркерів і легку адаптацію до різних колекцій зародкової плазми в деяких селекційних програмах. Крім того, KASP-генотипування є економічно високо-ефективним, забезпечуючи використання тих самих SNP-маркерів протягом всієї селекційної програми.

Аналіз контролю якості є важливим компонентом селекції кукурудзи та системи насінництва й включає визначення генетичної ідентичності, генетичної чистоти, перевірку походження [10].

Підтримка генетичної чистоти (гомогенності) інбредної лінії й підтвердження генетичної ідентичності тієї самої інбредної лінії,

що підтримується в різних місцях, є важливими функціями контролю якості в програмах селекції кукурудзи. Інбредні лінії мають бути чистими й повинні мати всі ті ознаки, які добирає селекціонер. Невеликі зміни в частотах алелів можуть відбуватися в процесі насінництва, підтримання лінії в різних місцях, змішування під час підтримання та розмноження лінії або від забруднення насінням чи пилком інших зразків. Але істотні зміни в генетичній структурі такої лінії можуть негативно позначитися на продуктивності, а також призвести до появи «неправильних» гібридів або сортів.

Аналіз контролю якості може бути реалізований на різних етапах селекційної програми (зокрема, в період створення та розмноження ліній, перед використанням як батьківських форм) для оцінки однорідності, гомозиготності та ідентичності. Якщо ресурси є обмеженими, аналіз контролю якості можна відкласти, поки лінії не будуть розмножені у достатній кількості. Батьківські форми в усіх селекційних проектах з новими родоводами рекомендовано генотипувати за високої щільності, тому отримані лінії можна порівняти з батьківськими генотипами для підтвердження їх походження.

Для картованих популяцій аналіз контролю якості має бути зроблений шляхом генотипування батьківських форм і F_1 тими самими SNP-маркерами з двох причин: (1) підтвердити, що F_1 містять «істинні» (*англ.* true-to-type) алелі від своїх батьків, і (2) перевірити генетичну чистоту інбредних батьківських форм. Зразки F_1 з істинними батьківськими алелями щонайменше для 90% SNP-маркерів, які були поліморфними між батьками, мають бути використані в подальшому, тоді як решта (10%) з небатьківськими алелями має бути видалена. Інбредні батьківські форми, які використовують у розробленні популяції, що картують, мають бути генетично чистими, тому очікується, що майже за всіма маркерами будуть виявлені гомозиготи.

У дослідженні [11] оцінювали генетичну ідентичність серед 2–4 джерел насіння однієї й тієї самої інбредної лінії кукурудзи, оцінювали ступінь генетичної однорідності в межах інбредних ліній, визначали підгрупи високоінформативних SNP-маркерів для рутинного й маловитратного генотипування. Використовували 28 інбредних ліній для вивчення генетичної ідентичності серед різних джерел насіння шляхом генотипування 532 і 1065 SNP-маркерами платформ KASPar і GoldenGate відповідно. Додатковий набір 544 інбредних ліній використано для вивчення

генетичної однорідності. Частка алелів, які відрізнялися між джерелами насіння тієї самої інбредної лінії, коливалася від 0,1 до 42,3%. Джерела насіння, що проявляли високі рівні генетичних відстаней, були неправильно марковані, тоді як джерела з нижчими рівнями різниці були забруднені або продовжували розщеплюватися. Генетична однорідність варіювала від 68,7 до 100% з 71,3% інбредних ліній, які вважають однорідними. На основі наборів даних, отриманих для широкого діапазону розмірів вибірки й різних генетичних фонів, автори рекомендували підгрупу 50–100 SNP для рутинного й недорогого генотипування, перевірили їх в іншому наборі подвійних гаплоїдних та інбредних ліній і розробили протокол, який може бути використаний для зведення до мінімуму помилок у генетичних аналізах і селекції. Таким чином, розроблено простий протокол KASP-генотипування для контролю якості з використанням підгрупи 50–100 SNP-маркерів, обраних серед 532 і 1065 SNP-платформ, для визначення однорідності зразка і для встановлення генетичної ідентичності різних партій насіння однієї й тієї самої інбредної лінії. Кореляції між підгрупою 50–100 SNP-маркерів, обраних для рутинного контролю якості, та платформами 532 і 1065 SNP-маркерів коливалися від 0,90 до 0,98.

Завданням дослідження [12] було оцінити рівень генетичної чистоти та ідентичності між 2–8 джерелами насіння 16 інбредних ліній з використанням 191 KASP-маркера і 257268 маркерів, отриманих за допомогою генотипування через секвенування (*англ.* genotyping by sequencing, GBS), та порівняти кореляцію між KASP-маркерами низької щільності і GBS-маркерами високої щільності в аналізі контролю якості. Встановлено, що генетична чистота в межах кожного джерела насіння варіювала від 49 до 100% під час використання KASP-маркерів і від 74 до 100% – для GBS-маркерів. Всі інбредні лінії, отримані з CIMMYT, крім однієї, показали 98–100% однорідності незалежно від типу маркера. Навпаки, лише 16 і 21% зразків, отриманих з Ефіопського інституту сільськогосподарських досліджень (*англ.* Ethiopian Institute of Agricultural Research), продемонстрували чистоту $\geq 95\%$ у разі використання KASP- і GBS-маркерів відповідно. Генетична відстань між кількома джерелами тієї самої лінії варіювала від 0 до 0,295 для KASP-маркерів і від 0,004 до 0,230 – для GBS-маркерів. У п'яти ліній CIMMYT відстань кількома джерелами тієї самої лінії

становила $\leq 0,05$; в інших 11 інбредних ліній, включаючи дві CIMMYT і дев'ять з Ефіопії, генетичні відстані для двох або більше джерел насіння були більшими, ніж очікувалося. Кореляція між 191 KASP- і 257268 GBS-маркерами становила 0,88 під час визначення чистоти і 0,93 – у разі встановлення ідентичності. Зменшення кількості GBS-маркерів до 1343 знижувало коефіцієнт кореляції тільки на 0,03. Отже, виявлено високу невідповідність у генетичній чистоті та ідентичності за походженням джерел насіння (установ) незалежно від типу платформи генотипування й кількості маркерів, використаних для аналізу. Хоч і були деякі відмінності між даними, отриманими за допомогою KASP- і GBS-маркерів, загальні висновки, зроблені за результатами використання обох методів, в основному були схожими. Це чітко доводить, що менший набір попередньо обраних і високоякісних маркерів є достатнім для аналізу контролю якості, аналіз можна легко зробити за допомогою платформ генотипування з маркерами низької щільності, такими як KASP.

Як відомо, в селекції рослин інформація про генетичні відстані між окремими зразками необхідна під час добору батьківських генотипів для забезпечення ефективнішого використання генетичної мінливості. В дослідженнях з асоціативного картування є важливою поправка на структуру популяції, щоб контролювати ідентифікацію хибних асоціацій між фенотипом і генотипом (помилка I типу). В дослідженні [13] вивчено генетичне різноманіття й структуру популяції в наборі 132 інбредних ліній кукурудзи в рамках Програми селекції сорго та кукурудзи Корпорації сільськогосподарських досліджень Бразилії (*порт.* Empresa Brasileira de Pesquisa Agropesubria, Embrapa). Геномну ДНК цих ліній генотиповано за 1250 SNP з використанням технології KASP-генотипування (аутсорсінг компанії «LGC Genomics»). Загалом для 719 SNP встановлено менше ніж 20% невідповідних даних. Комплексний аналіз свідчить, що цей набір ліній кукурудзи складається з чотирьох субпопуляцій: група ліній кременистої кукурудзи, пов'язаних з лінією L3, група ліній зубоподібної кукурудзи, пов'язаних з лінією L228-3, група недавно розроблених зразків зубоподібної кукурудзи, пов'язаних з лінією L371101-2, і велика група, утворена рештою ліній. Це групування добре узгоджується з даними родоводів. Результати аналізу можуть бути безпосередньо використані в селекційних програмах для дослідження генетичної мін-

ливості в межах гетерозисних груп з розроблення нових ліній і між групами – для створення перспективних гібридів. Крім того, отримана інформація є корисною для виправлення помилки типу I в асоціативному картуванні.

Генетичне різноманіття інбредних ліній кукурудзи за KASP-маркерами оцінено в дослідженнях [14, 15].

Картування *QTL* включає ідентифікацію підгрупи маркерів, які значною мірою пов'язані з одним або більше локусами, що впливають на прояв цільової ознаки. CIMMYT у співпраці з національними дослідницькими системами сільського господарства 14 країн субсахарної Африки, Міжнародним інститутом тропічного сільського господарства (англ. International Institute of Tropical Agriculture, IITA), Фондом аграрних технологій Африки (англ. African Agricultural Technology Foundation, AATF) і компанією «Monsanto» виконує проекти зі створення посухотолерантної кукурудзи для Африки (англ. drought tolerant maize for Africa, DTMA) і водозберігаючої кукурудзи для Африки (англ. water-efficient maize for Africa, WEMA) з використанням традиційної селекції, MARS і/або трансгенної технології. Для MARS-компонента DTMA-проекту CIMMYT провів широкомасштабну мультилокаційну польову перевірку, KASP-генотипування кожної популяції й мета-аналіз *QTL* кількох популяцій [16]. Платформа KASP дала змогу генотипувати будь-яку кількість зразків з будь-якою кількістю поліморфних SNP без необхідності розроблення конкретних мультиплексних наборів. Також важливим моментом проекту є проведення етапів генотипування так, щоб мати можливість добору рослин до цвітіння для прискорення циклів рекомбінації.

Для S-типу цитоплазматичної чоловічої стерильності (ЦЧС-S) кукурудзи характерним є часткове відновлення фертильності, що ускладнює її комерційне застосування в селекційних програмах зі створення гібридів. Явище нестабільності фертильності CMS-S контролюється не основним геном-відновником ядерної фертильності *Rf3*, а кількома мінорними *QTL*. Проведено сиквенування РНК та ідентифіковано шість потенційно асоційованих генів у *QTL* з мінорними ефектами, що зумовлюють нестабільність фертильності [17]. Результати свідчать, що ці гени можуть бути залучені в такі біологічні процеси, як диференціація органів і регулювання розвитку квітки, енергетичний метаболізм і біосинтез вуглеводів, що сприяє відновленню фертильності пилку в частині рос-

лин. За допомогою KASP-маркерів валідовані SNP ідентифіковано в двох потенційних генах, асоційованих з відновленням фертильності. Отримані дані сприяють розумінню молекулярного механізму часткового відновлення фертильності CMS-S у кукурудзи і, таким чином, дають можливість корегувати програми селекції.

Заболочування є важливим абіотичним стресом, що призводить до значних втрат врожаю кукурудзи, вирощеної в південній та південно-східній Азії через нерівномірний розподіл опадів. Щоб компенсувати збитки, завдані заболочуванням, найекономічнішим варіантом є генетичне «додавання» толерантності в сорти, які широко культивують у цільових агроекологічних зонах. У дослідженні [18] оцінено генетичну мінливість у популяції рекомбінантних інбредних ліній (PII), отриманих від схрещування лінії CAWL-46-3-1, толерантної до заболочування, та елітної, але сприйнятливої лінії CML311-2-1-3. Було виявлено значний діапазон варіації ознаки «врожайність зерна» під впливом стресу заболочування. PII генотипували, використовуючи KASP-маркери 331 SNP. Виявлено п'ять *QTL* на хромосомах 1, 3, 5, 7 і 10, які разом пояснювали приблизно 30% фенотипової дисперсії для ознаки «врожайність зерна». Серед 22 генів-кандидатів з відомими функціональними доменами для шістьох встановлено асоціацію з анаеробними реакціями і для кукурудзи, і для інших модельних видів. Для кожного з *QTL* була визначена пара фланкуючих SNP-маркерів і розроблено маркерні тести високопропускної здатності для швидкої інтрогресії толерантності до заболочування в програми селекції тропічної кукурудзи.

За використання технології KASP-генотипування також досліджено гени *bm2* [19] та *bm4* [20] ензимів, пов'язаних з акумуляцією та складом лігніну, *QTL*, асоційованих з морфологією коренів, акумуляцією біомаси та вмістом фосфору в проростках [21].

Широкомасштабне визначення алелів є перспективним підходом до «препарування» (розсічення) природної алельної варіації генів-кандидатів, що контролюють основні агрономічні ознаки. За допомогою широкогеномного асоціативного аналізу (англ. genome-wide association study, GWAS) та інших технік картування можна виявити функціональні поліморфізми [22]. CIMMYT використовує KASP-платформи для систематичної оцінки великих колекцій зародкової плазми щодо конкретних функціональних поліморфізмів. SNP або невеликі інделі (вставки-делеції), що були або діагностичними, або тіс-

но зчепленими з такими поліморфізмами, можуть бути використані в KASP-платформі для оцінки великої колекції зародкової плазми, щоб ідентифікувати зразки зі сприятливими алелями в локусі(ах)-мішені. Такий підхід є особливо корисним, коли фенотипування є або трудомістким, або занадто дорогим для великої кількості зразків, що рутинно скринуються в прикладних селекційних програмах.

Проведено GWAS для виявлення алелів, пов'язаних з підвищеною стійкістю проти фузаріозної гнилі, збудником якої є грибок *Fusarium verticillioides*, у наборі 854 інбредних ліній кукурудзи, оцінених в трьох середовищах [23]. Виявлені 45 SNP та 15 гаплотипів, асоційованих зі стійкістю, розташовані всередині або поряд з 38 генами-кандидатами, серед яких 21 був геном-кандидатом, пов'язаним з толерантністю рослин до стресів, включаючи стійкість проти хвороб. Для перевірки результатів GWAS проведено картування з використанням KASP-маркерів 1250 SNP в чотирьох двобатьківських популяціях та ідентифіковано QTL, пов'язані з толерантністю до *F. verticillioides*. Інтеграція результатів обох аналізів показала вісім локусів на хромосомах 2, 3, 4, 5, 9 і 10. QTL на хромосомах 2 і 9 є новими. Ці результати свідчать, що стійкість проти *F. verticillioides* є складною ознакою, яка обумовлена дією кількох генів з незначними ефектами. Внесок добору за виявленими маркерами для посилення стійкості є обмеженим; найімовірніше, добір для об'єднання «стійких» алелів з малими ефектами в поєднанні з геномним добром на полігенному фоні як для ознаки інтересу, так і ознак загальної адаптації може бути плідним для підвищення стійкості кукурудзи проти *F. verticillioides*.

Результати досліджень генів стійкості проти збудників хвороб з використанням KASP-маркерів представлено також у роботах [24–26].

У публікації поточного року [27] продемонстровано, як геномний добір за технологією KASP-генотипування може привести до швидкого генетичного посилення посухотолерантності у кукурудзи. Білозерну лінію кукурудзи CML444, яку культивують в Африці, оскільки вона є високопосухотолерантною, схрещено з двома елітними жовтозерними лініями, розробленими в Азії, – CML470 і VL1012767. Проведено генотипування популяцій з використанням 1214 KASP-SNP-маркерів, за результатами якого створено дві посухотолерантні лінії зі збільшеною врожайністю зерна. Дуже показовим

результатом цієї роботи є також порівняння ефективності створення ліній з певними ознаками (зокрема поєднання високої врожайності зерна та посухотолерантності) за використання підходів традиційної селекції (добір за фенотипом) та молекулярно-генетичних методів (добір за маркерами). Для того, щоб розкрити потенціал генотипу рослини у разі використання звичайного самозапилення, тест-кросингу та оцінки, необхідно чотири сезони (два роки за наявності теплиць). Використовуючи маркери, автори збагатили популяцію цільовими алелями за один сезон. При цьому не було необхідності в стресовому чиннику. Отже, дослідники обґрунтували потенціал швидкого генетичного поліпшення сільськогосподарських культур шляхом використання молекулярних маркерів і довели їхню ефективність у «збиранні» корисних генів як альтернативу традиційній практиці селекціонерів.

Висновки

За даними огляду різноманітних джерел інформації, технологія KASP-генотипування є, безумовно, високоточним та ефективним інструментом сучасної генетики та селекції. Понад 200 видів рослин і тварин генотиповано за цією технологією. Опубліковано більш ніж 2 тис. наукових статей. Цю технологію успішно використовують для дослідження генетичної різноманітності, генетичної спорідненості, структури популяцій, визначення генетичної ідентичності, генетичної чистоти, перевірки походження, картування локусів кількісної ознаки, визначення алелів, маркер-допоміжного добору, маркер-допоміжної селекції. Доцільним і своєчасним є впровадження технології KASP-генотипування в нашій країні для вирішення широкого кола завдань сучасної генетики, селекції, насінництва.

Використана література

1. Semagn K., Babu R., Hearne S., Olsen M. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement (Review). *Mol. Breed.* 2014. Vol. 33, No. 1. P. 1–14. doi: 10.1007/s11032-013-9917-x
2. Mammadov J., Aggarwal R., Buyyarapu R., Kumpatla S. SNP markers and their impact on plant breeding. *Int. J. Plant Genomics.* 2012. Vol. 2012. Article ID 728398. doi: 10.1155/2012/728398
3. Melo A., Bartaula R., Hale I. GBS-SNP-CROP: a reference-optional pipeline for SNP discovery and plant germplasm characterization using variable length, paired-end genotyping-by-sequencing data. *BMC Bioinformatics.* 2016. Vol. 17, Iss. 29. doi: 10.1186/s12859-016-0879-y
4. He C., Holme J., Anthony J. SNP genotyping: the KASP assay. *Methods Mol. Biol.* 2014. Vol. 1145. P. 75–86. doi: 10.1007/978-1-4939-0446-4_7

5. Clegg R. Förster Resonance Energy transfer – FRET what is it, why do it, and how it's done. *FRET and FLIM Techniques. Series: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology* / T. Gadella (Ed.). 2008. Vol. 33. P. 1–57.
6. How does KASP work. URL : <https://www.lgcgroup.com/kasp/#.WQmlKkgVzcs>
7. Henshall J., Hawken R., Dominik S., Barendse W. Estimating the effect of SNP genotype on quantitative traits from pooled DNA samples. *Genet. Sel. Evol.* 2012. Vol. 44. P. 1–12. doi: 10.1186/1297-9686-44-12
8. Maize genotyping library. URL : https://www.lgcgroup.com/maize/#.WME_WEGVzcs
9. Chen W., Mingus J., Thompson S., Kumpatla S. Development of versatile gene-based SNP assays in maize (*Zea mays* L.). *Mol. Breed.* 2012. Vol. 29, No. 3. P. 779–790. doi: 10.1007/s11032-011-9589-3
10. Chen J., Zavala C., Ortega N. et al. The development of quality control genotyping approaches: A case study using elite maize lines. *PLoS ONE*. 2016. Vol. 11(6): e0157236. doi: 10.1371/journal.pone.0157236
11. Semagn K., Beyene Y., Makumbi D. et al. Quality control genotyping for assessment of genetic identity and purity in diverse tropical maize inbred lines *Theor. Appl. Gen.* 2012. Vol. 125, No. 7. P. 1487–1501. doi: 10.1007/s00122-012-1928-1
12. Ertiro B., Ogugo V., Worku M. et al. Comparison of Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) and genotyping by sequencing (GBS) for quality control analysis in maize. *BMC Genomics*. 2015. Vol. 16:908. doi: 10.1186/s12864-015-2180-2
13. Ribeiro C., Pastina M., Guimarães L. et al. Genetic diversity and population structure assessed by SNP markers in a panel of maize inbred lines. *Resumos do 59 Congresso Brasileiro de Genética*, 16–19.09.2013, Águas de Lindóia, Brasil.
14. Dao A., Sanou J., Mitchell S. et al. Genetic diversity among INERA maize inbred lines with single nucleotide polymorphism (SNP) markers and their relationship with CIMMYT, IITA, and temperate lines. *BMC Genetics*. 2014. Vol. 15. P. 127–141. doi: 10.1186/s12863-014-0127-2
15. Tandzi L., Ngonkeu E. Molecular characterization of selected maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Maize Genom. Genet.* 2015. Vol. 6, No. 2. P. 1–5. doi: 10.5376/mgg.2015.06.0002
16. Semagn K., Beyene Y., Warburton M. et al. Meta-analyses of QTL for grain yield and anthesis silking interval in 18 maize populations evaluated under waterstressed and well-watered environments. *BMC Genomics*. 2013. Vol. 14, Iss. 313. doi: 10.1186/1471-2164-14-313
17. Su A., Song W., Xing J. et al. Identification of genes potentially associated with the fertility instability of S-type cytoplasmic male sterility in maize via bulked segregant RNA-Seq. *PLoS ONE*. 2016. Vol. 11, Iss. 9. e0163489. doi: 10.1371/journal.pone.0163489
18. Zaidi P., Rashid Z., Vinayan M. et al. QTL mapping of agronomic waterlogging tolerance using recombinant inbred lines derived from tropical maize (*Zea mays* L.) germplasm. *PLoS ONE*. 2015. Vol. 10, Iss. 4. e0124350. doi: 10.1371/journal.pone.0124350
19. Tang H., Liu S., Hill-Skinner S. et al. The maize *brown midrib2* (*bm2*) gene encodes a methylenetetrahydrofolate reductase that contributes to lignin accumulation. *Plant J.* 2014. Vol. 77, Iss. 3. P. 380–392. doi: 10.1111/tpj.12394
20. Li L., Hill-Skinner S., Liu S. et al. The maize *brown midrib4* (*bm4*) gene encodes a functional folylpolyglutamate synthase. *Plant J.* 2015. Vol. 81, Iss. 3. P. 493–504. doi: 10.1111/tpj.12745
21. Azevedo G., Cheavegatti-Gianotto A., Negri B. Multiple interval QTL mapping and searching for PSTOL1 homologs associated with root morphology, biomass accumulation and phosphorus content in maize seedlings under low-P. *BMC Plant Biology*. 2015. Vol. 15, Iss. 172. doi: 10.1186/s12870-015-0561-y
22. Beissinger T., Hirsch C., Sekhon R. et al. Marker density and read-depth for genotyping populations using genotyping-by-sequencing. *Genetics*. 2013. Vol. 193, Iss. 4. P. 1073–1081. doi: 10.1534/genetics.112.147710
23. Chen J., Shrestha R., Ding J. et al. Genome-wide association study and QTL mapping reveal genomic loci associated with Fusarium ear rot resistance in tropical maize germplasm. *3G: Genes. Genomes. Genetics*. 2016. Vol. 6, Iss. 12. P. 3803–3815. doi: 10.1534/g3.116.034561
24. Jamann T., Poland J., Kolkman J. et al. Unraveling genomic complexity at a quantitative disease resistance locus in maize. *Genetics*. 2014. Vol. 198, Iss. 1. P. 333–344. doi: 10.1534/genetics.114.167486/-/DC1
25. Horn F., Habeku A., Stich B. Linkage mapping of *Barley yellow dwarf* virus resistance in connected populations of maize. *BMC Plant Biol.* 2015. Vol. 15, Iss. 29. doi: 10.1186/s12870-015-0420-x
26. Nair S., Babu R., Magorokosho C. et al. Fine mapping of *Msv1*, a major QTL for resistance to Maize Streak Virus leads to development of production markers for breeding pipelines. *Theor. Appl. Genet.* 2015. Vol. 128, No. 9. P. 1839–1854. doi: 10.1007/s00122-015-2551-8
27. Vivek B., Krishna G., Vengadessan V. et al. Use of genomic estimated breeding values results in rapid genetic gains for drought tolerance in maize. *Plant Genome*. 2017. Vol. 10, No. 1. doi: 10.3835/plantgenome2016.07.0070

References

1. Semagn K., Babu R., Hearne S., & Olsen, M. (2014). Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement (Review). *Mol. Breed.*, 33(1), 1–14. doi: 10.1007/s11032-013-9917-x
2. Mammadov, J., Aggarwal, R., Buyyarapu, R., & Kumpatla, S. (2012). SNP markers and their impact on plant breeding. *Int. J. Plant Genomics*, 2012, Art. ID 728398. doi: 10.1155/2012/728398
3. Melo, A., Bartaula, R., & Hale, I. (2016). GBS-SNP-CROP: a reference-optional pipeline for SNP discovery and plant germplasm characterization using variable length, paired-end genotyping-by-sequencing data. *BMC Bioinformatics*, 17(29). doi: 10.1186/s12859-016-0879-y
4. He, C., Holme, J., & Anthony, J. (2014). SNP genotyping: the KASP assay. *Methods Mol. Biol.*, 1145, 75–86. doi: 10.1007/978-1-4939-0446-4_7
5. Clegg, R. (2008). Förster Resonance Energy transfer – FRET what is it, why do it, and how it's done. In T. Gadella (Ed.), *FRET and FLIM Techniques. Series: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, 33, 1–57.
6. How does KASP work. Retrieved from <https://www.lgcgroup.com/kasp/#.WQmlKkgVzcs>
7. Henshall, J., Hawken, R., Dominik, S., & Barendse, W. (2012). Estimating the effect of SNP genotype on quantitative traits from pooled DNA samples. *Genet. Sel. Evol.*, 44, 1–13. doi: 10.1186/1297-9686-44-12
8. Maize genotyping library. Retrieved from https://www.lgcgroup.com/maize/#.WME_WEGVzcs
9. Chen, W., Mingus, J., Thompson, S., & Kumpatla, S. (2012). Development of versatile gene-based SNP assays in maize (*Zea mays* L.). *Mol. Breed.*, 29(3), 779–790. doi: 10.1007/s11032-011-9589-3
10. Chen, J., Zavala, C., Ortega, N., Petrolci, C., Franco, J., Burgueno, J., ... Hearne, S. (2016). The development of quality control genotyping approaches: A case study using elite maize lines. *PLoS ONE*, 11(6), e0157236. doi: 10.1371/journal.pone.0157236
11. Semagn, K., Beyene, Y., Makumbi, D., Mugo, S., Prasanna, S., Magorokosho, C., & Atlin, G. (2012). Quality control genotyping for assessment of genetic identity and purity in diverse tropical maize inbred lines. *Theor. Appl. Gen.*, 125(7), 1487–1501. doi: 10.1007/s00122-012-1928-1
12. Ertiro, B., Ogugo, V., Worku, M., Das, B., Olsen, M., Labuschagne, M., & Semagn, K. (2015). Comparison of Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) and genotyping by sequencing (GBS) for quality control analysis in maize. *BMC Genomics*, 16(908). doi: 10.1186/s12864-015-2180-2

13. Ribeiro, C., Pastina, M., Guimarães, L., Guimarães, P., Pacheco, C., Magalhaes, J., ... Guimarães, C. (2013). Genetic diversity and population structure assessed by SNP markers in a panel of maize inbred lines. In *59 Congresso Brasileiro de Genética: materials*. 16–19.09.2013, Águas de Lindóia, Brasil.
14. Dao, A., Sanou, J., Mitchell, S., Gracen, V., & Danquah, E. (2014). Genetic diversity among INERA maize inbred lines with single nucleotide polymorphism (SNP) markers and their relationship with CIMMYT, IITA, and temperate lines. *BMC Genetics*, *15*, 127–141. doi: 10.1186/s12863-014-0127-2
15. Tandzi, L., & Ngonkeu, E. (2015). Molecular characterization of selected maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Maize Genom. Genet*, *6*(2), 1–5. doi: 10.5376/mgg.2015.06.0002
16. Semagn, K., Beyene, Y., Warburton, M., Tarekegne, A., Mugo, S., Meisel, B., Sehabiague, P., & Prasanna, B. (2013). Meta-analyses of QTL for grain yield and anthesis silking interval in 18 maize populations evaluated under waterstressed and well-watered environments. *BMC Genomics*, *14*(313), 1–15. doi: 10.1186/1471-2164-14-313
17. Su, A., Song, W., Xing, J., Zhao, Y., Zhang, R., Li, C. ... Zhao, J. (2016). Identification of genes potentially associated with the fertility instability of S-type cytoplasmic male sterility in maize via bulked segregant RNA-Seq. *PLoS ONE*, *11*(9), e0163489. doi: 10.1371/journal.pone.0163489
18. Zaidi, P., Rashid, Z., Vinayan, M., Almeida, G., Phagna, R., & Babu, R. (2015). QTL mapping of agronomic waterlogging tolerance using recombinant inbred lines derived from tropical maize (*Zea mays* L.) germplasm. *PLoS ONE*, *10*(4), e0124350. doi: 10.1371/journal.pone.0124350
19. Tang, H., Liu, S., Hill-Skinner, S., Wu, W., Reed, D., Yeh, C., Nettleton, D., & Schnable, P. (2014). The maize *brown midrib2* (*bm2*) gene encodes a methylenetetrahydrofolate reductase that contributes to lignin accumulation. *Plant J.*, *77*(3), 380–392. doi: 10.1111/tpj.12394
20. Li, L., Hill-Skinner, S., Liu, S., Beuchle, D., Tang, H., Yeh, C., Nettleton, D., & Schnable, P. (2015). The maize *brown midrib4* (*bm4*) gene encodes a functional folylpolyglutamate synthase. *Plant J.*, *81*(3), 493–504. doi: 10.1111/tpj.12745
21. Azevedo, G., Cheavegatti-Gianotto, A., Negri, B., Hufnagel, B., da Costa e Silva, L., Magalhaes, J., ... Guimarães, C. (2015). Multiple interval QTL mapping and searching for PSTOL1 homologs associated with root morphology, biomass accumulation and phosphorus content in maize seedlings under low-P. *BMC Plant Biol.*, *15*(172). doi: 10.1186/s12870-015-0561-y
22. Beissinger, T., Hirsch, C., Sekhon, R., Foerster, J., Johnson, J., Muttoni, G., ... de Leon, N. (2013). Marker density and read-depth for genotyping populations using genotyping-by-sequencing. *Genetics*, *193*(4), 1073–1081. doi: 10.1534/genetics.112.147710
23. Chen, J., Shrestha, R., Ding, J., Zheng, H., Mu, C., Wu, J., & Mahuku, G. (2016). Genome-wide association study and QTL mapping reveal genomic loci associated with Fusarium ear rot resistance in tropical maize germplasm. *3G: Genes. Genomes. Genetics*, *6*(12), 3803–3815. doi: 10.1534/g3.116.034561
24. Jamann, T., Poland, J., Kolkman, J., Smith, L., & Nelson, R. (2014). Unraveling genomic complexity at a quantitative disease resistance locus in maize. *Genetics*, *198*(1), 333–344. doi: 10.1534/genetics.114.167486/-/DC1
25. Horn, F., Habeku, A., & Stich, B. (2015). Linkage mapping of *Barley yellow dwarf virus* resistance in connected populations of maize. *BMC Plant Biol.*, *15*(29), 1–13. doi: 10.1186/s12870-015-0420-x
26. Nair, S., Babu, R., Magorokosho, C., Mahuku, G., Semagn, K., Beyene, Y., ... Boddupalli, P. (2015). Fine mapping of *Msv1*, a major QTL for resistance to Maize Streak Virus leads to development of production markers for breeding pipelines. *Theor. Appl. Genet.*, *128*(9), 1839–1854. doi: 10.1007/s00122-015-2551-8
27. Vivek, B., Krishna, G., Vengadessan, V., Babu, R., Zaidi, P., Kha, L., ... Crassa, J. (2017). Use of genomic estimated breeding values results in rapid genetic gains for drought tolerance in maize. *Plant Genome*, *10*(1), 1–8. doi: 10.3835/plantgenome2016.07.0070

УДК 577.21:575.22:581.6

Волкова Н. Э.*, **Соколов В. М.** Технология генотипирования KASP™ и ее использование в генетико-селекционных программах (на примере кукурузы) // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. 2017. Т. 13, № 2. С. 131–140. <http://dx.doi.org/10.21498/2518-1017.13.2.2017.105394>

Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноводства и сортоизучения, ул. Овидиопольская дорога, 3, г. Одесса, 65036, Украина, *e-mail: natavolki@ukr.net

Цель. Сделать обзор публикаций, касающихся сути технологии генотипирования – конкурентной аллель-специфической полимеразной цепной реакции (*англ.* Competitive allele-specific PCR, в настоящее время имеет название Competitive Allele Specific PCR, KASP™) и ее использования в различных генетико-селекционных направлениях исследований (на примере кукурузы). **Результаты.** Освещены суть технологии KASP-генотипирования, его преимущества. Представлены требования к матричной ДНК, так как успех KASP-анализа зависит от ее качества и количества. Приведены примеры глобальных проектов в области селекции растений для повышения урожайности, использующие технологию KASP-генотипирования. На примере кукурузы представлены результаты KASP-генотипирования и их внедрения в селекцию и семеноводство, в частности, для определения генетической идентичности, генетической чистоты, проверки происхождения, маркерного отбора и др. Продемонстрировано, как геномный отбор по технологии KASP-генотипирования может привести к быстрому генетическому усилению засухоустойчивости у кукурузы. Сравнением эффективности создания линий с определенными признаками (например, сочетание высокой урожайности зерна и засухоустойчивости) при использова-

нии подходов традиционной селекции (отбор по фенотипу) и молекулярно-генетических методов (отбор по маркерам) доказано: для того, чтобы раскрыть потенциал генотипа растения при использовании традиционного самоопыления, тест-кроссинга и оценок необходимо четыре сезона (два года при наличии теплиц), в то время как при использовании маркеров популяцию обогатили целевыми аллелями за один сезон. При этом не было необходимости в стрессовом факторе. **Выводы.** Технология KASP-генотипирования является высокоточным и эффективным инструментом современной генетики и селекции, успешно используется для исследования генетического разнообразия, генетического родства, структуры популяций, определения генетической идентичности, генетической чистоты, проверки происхождения, картирования локусов количественного признака, определения аллелей, маркерного отбора, маркерной селекции. Целесообразным и своевременным является внедрение технологии KASP-генотипирования в нашей стране для решения широкого круга задач современной генетики, селекции, семеноводства.

Ключевые слова: однонуклеотидный полиморфизм, технология KASP™, генотипирование, кукуруза, молекулярный маркер.

UDC 577.21:575.22:581.6

Volkova, N. E.*, & **Sokolov, V. M.** (2017). KASP™ genotyping technology and its use in genetic-breeding programs (a study of maize). *Plant Varieties Studying and Protection*, 13(2), 131–140. <http://dx.doi.org/10.21498/2518-1017.13.2.2017.105394>

*Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation, 3 Ovidiopska doroga Str., Odesa, 65036, Ukraine, *e-mail: natavolki@ukr.net*

Purpose. To review publications relating to the key point of the genotyping technology that is competitive allele-specific polymerase chain reaction (which is called now Kompetitive Allele Specific PCR, KASP™) and its use in various genetic-breeding researching (a study of maize).

Results. The essence of KASP-genotyping, its advantages are highlighted. The requirements for matrix DNA are presented, since the success of the KASP-analysis depends on its quality and quantity. Examples of global projects of plant breeding for increasing crop yields using the KASP genotyping technology are given. The results of KASP genotyping and their introduction into breeding and seed production, in particular, for determining genetic identity, genetic purity, origin check, marker-assisted selection, etc. are presented using maize as an example. It is demonstrated how genomic selection according to KASP genotyping technology can lead to rapid genetic enhancement of drought resistance in maize. Comparison of the effectiveness of creating lines with certain traits (for example, combination of high grain

yield and drought resistance) using traditional breeding approaches (phenotype selection) and molecular genetic methods (selection by markers) was proved that it takes four seasons (two years in case of greenhouses) in order to unlock the potential of the plant genotype using traditional self-pollination, test-crossing and definitions), while using markers, the population was enriched with target alleles during one season. At the same time, there was no need for a stress factor. **Conclusions.** KASP genotyping technology is a high-precision and effective tool for modern genetics and breeding, which is successfully used to study genetic diversity, genetic relationship, population structure, genetic identity, genetic purity, origin check, quantitative locus mapping, allele mapping, marker-assisted selection, marker-assisted breeding. It is expedient and timely to introduce KASP genotyping technology in our country to solve a wide range of modern genetics, breeding, seed production tasks.

Keywords: *single nucleotide polymorphism, KASP™ technology, genotyping, maize, molecular marker.*

Надійшла / Received 10.04.2017

Погоджено до друку / Accepted 17.05.2017