

УДК 633.15:631.527.8

Т. М. Сатарова, доктор біологічних наук

Б. В. Дзюбецький, доктор сільськогосподарських наук

В. Ю. Черчель, кандидат сільськогосподарських наук

В. В. Борисова

ДУ Інститут сільського господарства степової зони НААН
marketing@institut-zerna.com

М. М. Таганцова

Український інститут експертизи сортів рослин
tagancova@sops.gov.ua

SNP-аналіз у паспортизації та ідентифікації ліній кукурудзи

Розглянуто методичні аспекти використання аналізу однонуклеотидного поліморфізму ДНК (SNP-аналізу) для паспортизації та ідентифікації ліній кукурудзи. Показано, що SNP-генотипування є методом з високим дискримінаційним потенціалом, здатним вирізняти між собою лінії кукурудзи, який рекомендовано застосовувати для паспортизації ліній, аналізу їхньої однорідності, стабільності та відмінності.

Ключові слова:

SNP-маркер, SNP-аналіз, ДНК-паспортизація, ідентифікація.

Вступ. У процес селекції кукурудзи на сучасному етапі широко впроваджують новітні методи оцінки та добору вихідного селекційного матеріалу, які ґрунтуються на аналізі молекулярно-генетичного поліморфізму. Такий підхід дає можливість проводити моніторинг генетичної структури селекційних зразків незалежно від впливу умов вирощування. У рамках нового напрямку селекції – маркер-асоційованої селекції (MAS) – використання молекулярних маркерів, тобто послідовностей ДНК з відомою локалізацією, є перспективним для встановлення спорідненості селекційних зразків, прогнозування ступеня гетерозису, маркування господарсько-цінних ознак.

Молекулярно-генетичний метод аналізу генетичної варіабельності селекційного матеріалу, який отримав назву SNP (single nucleotide polymorphism), спрямований на виявлення однонуклеотидного поліморфізму, тобто точкових замін одного нуклеотиду на інший у ланцюгу ДНК (пари нуклеотидів у дволанцюговій молекулі ДНК) [1, 2]. Заміна нуклеотиду – це генна мутація типу транзиції або трансверсії, яка не змінює довжину ДНК. Однонуклеотидні заміни відбуваються у будь-яких ділянках геному. В кодуючих послідовностях вони призводять до зміни в структурі кодованих білків: залежно від місенса і нонсенса замін змінюють амінокислотну послідовність протеїну або спричиняють пе-

редчасну зупинку трансляції. Для регуляції генної експресії істотними є випадки однонуклеотидних замін у регуляторних послідовностях ДНК. Водночас встановлено, що більшість однонуклеотидних замін локалізуються в негенних та некодуючих ділянках геному або в положеннях кодонів, які не ведуть до замін у відповідних амінокислотних послідовностях і через це не відображаються у фенотипі. Саме такі однонуклеотидні заміни найчастіше використовують як SNP-маркери для аналізу загального поліморфізму. Вважають дуже продуктивним визначати колекції SNPs, які вкривають цілий геном через певні інтервали, щоб знайти ділянки геному, де характер та частота SNP-алелів відрізняються у різних особин. Для маркування ознак ціннішими є SNP-маркери, розташовані безпосередньо в генах або тісно з ними зчеплені [1–4].

SNP-аналіз у світовій селекції кукурудзи почали застосовувати близько 5–7 років тому. Нині дослідження однонуклеотидного поліморфізму ДНК кукурудзи сконцентровані в кількох напрямках: методичні розробки з виявлення нових SNP-маркерів та підвищення інформативності SNP-аналізу; порівняльний аналіз генетичного поліморфізму селекційного матеріалу, визначення спорідненості, кластеризація, прогнозування гетерозису; пошук SNP-маркерів, які маркують господарсько-цінні ознаки та ін. [3, 4]. Однак в Україні SNP-аналіз раніше не застосо-

ували, можливості його використання в селекційній практиці для кукурудзи не досліджено.

ДНК-паспортизація – це процес складання ДНК-паспортів (ДНК-профілів), тобто збирання інформації про специфічність послідовності нуклеотидів ДНК, яка властива лише певному генотипу. Така інформація може бути отримана за допомогою молекулярно-генетичних методів аналізу ДНК, найефективніше – з використанням молекулярно-генетичних маркерів, та зафіксована у вигляді певної формули – послідовності літер і цифр [5]. Для паспортизації генотипів рослин прийнято використовувати системи молекулярних маркерів з високим дискримінаційним потенціалом, які дають можливість не тільки з'ясувати ступінь однорідності зразка та диференціювати зразки між собою, а й встановлювати ступінь відмінності одного селекційного зразка від іншого та ідентифікувати генотипи [6]. Всі напрацювання в цьому напрямі й самі ДНК-паспорти можуть бути використані для ідентифікації, реєстрації ліній і гібридів кукурудзи та охорони авторських прав. Нині поширеною є система паспортизації генотипів кукурудзи на основі SSR-маркерів, за допомогою яких відслідковують стан поліморфних ділянок ДНК, що виник за рахунок мутацій хромосомного типу – делецій, дуплікацій, інсерцій, транслокацій. Можливість проводити ДНК-паспортизацію ліній кукурудзи іншим, більш точним методом – шляхом аналізу однунуклеотидного поліморфізму з використанням SNP-маркерів – не досліджено.

Мета досліджень. Оцінка можливостей використання SNP-аналізу для паспортизації та ідентифікації ліній кукурудзи.

Об'єкт досліджень. Однунуклеотидний поліморфізм ДНК у 270 ліній кукурудзи вітчизняної селекції для використання в практиці паспортизації та ідентифікації ліній цієї сільськогосподарської культури.

Матеріали та методика досліджень. SNP-генотипування ліній кукурудзи проводили з використанням GoldenGate тесту, системи зчитування результатів Illumina VeraCode та матриці Sentrix array matrince (SAM) [7]. Молекулярно-генетичну частину роботи здійснювали на базі фірми BioDiagnostics, Inc. (США), яка на основі Illumina VeraCode Bead Plate розробила панель BDI-III з 384 SNP-маркерів, найбільш придатних для виявлення поліморфізму сучасного селекційного генофонду кукурудзи. ДНК виділяли з пагонів 7-добових проростків [8]. Ідентифікацію

ліній кукурудзи здійснювали за методом морфологічного опису, який застосовують під час проведення кваліфікаційної експертизи на відмінність, однорідність і стабільність, польового інспектування та здійснення ділянкового та лабораторного сортового контролю [9–12].

Результати досліджень. Теоретично панель з 384 біалельних SNP-маркерів здатна забезпечити можливість розрізнити між собою $2^{384}=3,9402E+115$ генотипів. Сигнал детекції під час проведення наших досліджень виявили 367 маркерів, 358 з них відносять до класу інформативних. Використання маркерів панелі BDI-III з достатнім сигналом детекції дає можливість, таким чином, ідентифікувати $2^{367}=3,0061E+110$, у разі залучення лише інформативних маркерів – $2^{358}=5,8714E+107$ генотипів. Рівень цих значень є достатнім для розрізнення та створення унікальних паспортів як усіх ліній української, так і використаних для порівняння ліній світової селекції кукурудзи.

Ми сформували електронну базу даних паспортів 270 ліній кукурудзи української селекції, проаналізованих за SNP-маркерами [11]. Ця база містить також загальнодоступну інформацію про SNP-паспорти 491 поширеної світової лінії кукурудзи і може бути використана в практичній селекції для оцінки ступеня новизни створених ліній, захисту авторських прав на сорти рослин, а також для розроблення методологічних принципів реєстрації ліній та гібридів кукурудзи за алельним станом маркерів однунуклеотидного поліморфізму. Зразок паспорта за SNP-маркерами лінії кукурудзи ДК744СВ наведено в таблиці 1. У паспортах також позначено такі SNP-характеристики ліній, як ступінь гомозиготності та показник генного різноманіття.

Державну реєстрацію ліній кукурудзи здійснюють згідно з Методикою проведення експертизи сортів кукурудзи звичайної (*Zea mays* L.) на відмінність, однорідність і стабільність [9, 12]. За цим документом однорідність визначають як здатність рослин сорту з урахуванням особливостей розмноження зберігати подібність за ознаками, зазначеними в Описі сорту. Стабільність – це здатність сорту залишатися незмінним за ознаками, наведеними в Описі сорту, після неодноразового розмноження. З генетичного погляду однорідність та стабільність ліній кукурудзи визначаються ступенем їхньої гомозиготності. Тому для набору з 270 ліній кукурудзи української селекції ми встановлювали ступінь гомозиготності (гетерозиготності) за SNP-маркерами.

SNP-паспорт лінії кукурудзи ДК744СВ

Гомозиготність 100%, показник генного різноманіття 0,1782

1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
BDI-I11-1	A/A	BDI-I11-15	G/G	BDI-I11-198	A/A	BDI-I11-247	G/G	BDI-I11-297	G/G	BDI-I11-345	G/G	BDI-I11-53	G/G
BDI-I11-100	G/G	BDI-I11-150	G/G	BDI-I11-199	A/A	BDI-I11-248	A/A	BDI-I11-298	G/G	BDI-I11-346	A/A	BDI-I11-54	C/C
BDI-I11-101	A/A	BDI-I11-151	G/G	BDI-I11-2	A/A	BDI-I11-249	G/G	BDI-I11-299	A/A	BDI-I11-347	G/G	BDI-I11-55	C/C
BDI-I11-102	G/G	BDI-I11-152	G/G	BDI-I11-20	A/A	BDI-I11-25	G/G	BDI-I11-3	A/A	BDI-I11-348	G/G	BDI-I11-56	A/A
BDI-I11-103	A/A	BDI-I11-153	??	BDI-I11-200	A/A	BDI-I11-250	G/G	BDI-I11-30	G/G	BDI-I11-349	A/A	BDI-I11-57	C/C
BDI-I11-104	C/C	BDI-I11-154	A/A	BDI-I11-201	A/A	BDI-I11-251	A/A	BDI-I11-300	G/G	BDI-I11-35	G/G	BDI-I11-58	C/C
BDI-I11-105	A/A	BDI-I11-155	G/G	BDI-I11-202	C/C	BDI-I11-253	A/A	BDI-I11-301	G/G	BDI-I11-350	G/G	BDI-I11-59	A/A
BDI-I11-106	A/A	BDI-I11-156	G/G	BDI-I11-203	C/C	BDI-I11-254	A/A	BDI-I11-302	A/A	BDI-I11-351	G/G	BDI-I11-6	A/A
BDI-I11-107	G/G	BDI-I11-157	A/A	BDI-I11-204	C/C	BDI-I11-255	A/A	BDI-I11-303	A/A	BDI-I11-352	A/A	BDI-I11-60	A/A
BDI-I11-108	G/G	BDI-I11-158	T/T	BDI-I11-205	A/A	BDI-I11-256	G/G	BDI-I11-304	G/G	BDI-I11-353	G/G	BDI-I11-61	A/A
BDI-I11-109	A/A	BDI-I11-159	A/A	BDI-I11-206	A/A	BDI-I11-257	G/G	BDI-I11-305	A/A	BDI-I11-354	G/G	BDI-I11-62	A/A
BDI-I11-11	G/G	BDI-I11-16	G/G	BDI-I11-207	A/A	BDI-I11-258	A/A	BDI-I11-306	A/A	BDI-I11-355	A/A	BDI-I11-63	G/G
BDI-I11-110	A/A	BDI-I11-160	G/G	BDI-I11-208	A/A	BDI-I11-259	G/G	BDI-I11-307	A/A	BDI-I11-356	A/A	BDI-I11-64	A/A
BDI-I11-111	A/A	BDI-I11-161	A/A	BDI-I11-209	A/A	BDI-I11-26	A/A	BDI-I11-308	G/G	BDI-I11-357	G/G	BDI-I11-65	A/A
BDI-I11-112	G/G	BDI-I11-162	A/A	BDI-I11-21	G/G	BDI-I11-260	C/C	BDI-I11-309	G/G	BDI-I11-358	A/A	BDI-I11-66	G/G
BDI-I11-113	G/G	BDI-I11-163	A/A	BDI-I11-210	G/G	BDI-I11-261	A/A	BDI-I11-31	A/A	BDI-I11-359	A/A	BDI-I11-67	A/A
BDI-I11-114	C/C	BDI-I11-164	C/C	BDI-I11-211	T/T	BDI-I11-262	??	BDI-I11-310	A/A	BDI-I11-36	A/A	BDI-I11-68	T/T
BDI-I11-115	A/A	BDI-I11-165	G/G	BDI-I11-212	T/T	BDI-I11-263	G/G	BDI-I11-311	A/A	BDI-I11-360	A/A	BDI-I11-69	A/A
BDI-I11-116	A/A	BDI-I11-166	G/G	BDI-I11-213	G/G	BDI-I11-264	A/A	BDI-I11-312	G/G	BDI-I11-361	C/C	BDI-I11-7	A/A
BDI-I11-117	A/A	BDI-I11-167	G/G	BDI-I11-214	G/G	BDI-I11-265	G/G	BDI-I11-313	G/G	BDI-I11-362	A/A	BDI-I11-70	G/G
BDI-I11-118	C/C	BDI-I11-168	G/G	BDI-I11-215	C/C	BDI-I11-266	G/G	BDI-I11-314	A/A	BDI-I11-364	C/C	BDI-I11-73	C/C
BDI-I11-119	G/G	BDI-I11-169	A/A	BDI-I11-216	C/C	BDI-I11-267	A/A	BDI-I11-315	G/G	BDI-I11-365	G/G	BDI-I11-74	C/C
BDI-I11-12	G/G	BDI-I11-17	A/A	BDI-I11-217	A/A	BDI-I11-268	A/A	BDI-I11-316	C/C	BDI-I11-366	G/G	BDI-I11-75	A/A
BDI-I11-120	A/A	BDI-I11-170	A/A	BDI-I11-218	G/G	BDI-I11-269	A/A	BDI-I11-317	C/C	BDI-I11-367	G/G	BDI-I11-76	G/G
BDI-I11-121	C/C	BDI-I11-171	C/C	BDI-I11-219	A/A	BDI-I11-27	A/A	BDI-I11-318	G/G	BDI-I11-37	G/G	BDI-I11-77	G/G
BDI-I11-122	A/A	BDI-I11-172	A/A	BDI-I11-22	C/C	BDI-I11-270	C/C	BDI-I11-319	A/A	BDI-I11-370	C/C	BDI-I11-78	G/G
BDI-I11-123	G/G	BDI-I11-173	G/G	BDI-I11-220	A/A	BDI-I11-271	C/C	BDI-I11-32	G/G	BDI-I11-371	A/A	BDI-I11-79	G/G
BDI-I11-124	C/C	BDI-I11-174	A/A	BDI-I11-221	G/G	BDI-I11-272	A/A	BDI-I11-320	G/G	BDI-I11-372	C/C	BDI-I11-8	A/A
BDI-I11-125	A/A	BDI-I11-175	A/A	BDI-I11-222	C/C	BDI-I11-273	C/C	BDI-I11-321	G/G	BDI-I11-373	A/A	BDI-I11-80	C/C
BDI-I11-126	A/A	BDI-I11-176	A/A	BDI-I11-223	A/A	BDI-I11-274	A/A	BDI-I11-323	G/G	BDI-I11-374	A/A	BDI-I11-81	A/A
BDI-I11-127	G/G	BDI-I11-177	G/G	BDI-I11-224	G/G	BDI-I11-275	G/G	BDI-I11-324	G/G	BDI-I11-375	G/G	BDI-I11-82	A/A
BDI-I11-128	G/G	BDI-I11-178	G/G	BDI-I11-225	A/A	BDI-I11-276	G/G	BDI-I11-325	A/A	BDI-I11-376	C/C	BDI-I11-83	C/C
BDI-I11-129	G/G	BDI-I11-179	C/C	BDI-I11-226	G/G	BDI-I11-277	G/G	BDI-I11-326	??	BDI-I11-377	C/C	BDI-I11-84	A/A
BDI-I11-13	G/G	BDI-I11-18	A/A	BDI-I11-227	A/A	BDI-I11-278	A/A	BDI-I11-327	C/C	BDI-I11-378	A/A	BDI-I11-85	??
BDI-I11-130	A/A	BDI-I11-180	A/A	BDI-I11-228	??	BDI-I11-279	G/G	BDI-I11-328	T/T	BDI-I11-379	G/G	BDI-I11-86	A/A
BDI-I11-131	C/C	BDI-I11-181	A/A	BDI-I11-229	A/A	BDI-I11-28	A/A	BDI-I11-329	A/A	BDI-I11-38	G/G	BDI-I11-87	A/A
BDI-I11-132	A/A	BDI-I11-182	G/G	BDI-I11-23	A/A	BDI-I11-280	G/G	BDI-I11-33	A/A	BDI-I11-380	A/A	BDI-I11-88	A/A
BDI-I11-133	C/C	BDI-I11-183	G/G	BDI-I11-230	A/A	BDI-I11-281	G/G	BDI-I11-330	C/C	BDI-I11-381	??	BDI-I11-89	A/A
BDI-I11-134	G/G	BDI-I11-184	A/A	BDI-I11-231	T/T	BDI-I11-282	G/G	BDI-I11-331	A/A	BDI-I11-383	??	BDI-I11-9	A/A
BDI-I11-135	C/C	BDI-I11-185	A/A	BDI-I11-232	G/G	BDI-I11-283	A/A	BDI-I11-332	A/A	BDI-I11-384	G/G	BDI-I11-90	C/C
BDI-I11-136	C/C	BDI-I11-186	A/A	BDI-I11-233	A/A	BDI-I11-284	C/C	BDI-I11-333	A/A	BDI-I11-39	G/G	BDI-I11-91	G/G
BDI-I11-138	G/G	BDI-I11-187	A/A	BDI-I11-234	A/A	BDI-I11-285	??	BDI-I11-334	G/G	BDI-I11-4	A/A	BDI-I11-92	G/G
BDI-I11-139	G/G	BDI-I11-188	G/G	BDI-I11-235	C/C	BDI-I11-286	??	BDI-I11-335	A/A	BDI-I11-40	C/C	BDI-I11-93	G/G
BDI-I11-14	A/A	BDI-I11-189	A/A	BDI-I11-236	G/G	BDI-I11-287	G/G	BDI-I11-336	A/A	BDI-I11-41	C/C	BDI-I11-94	C/C
BDI-I11-140	G/G	BDI-I11-19	A/A	BDI-I11-237	G/G	BDI-I11-288	C/C	BDI-I11-337	A/A	BDI-I11-42	C/C	BDI-I11-95	C/C
BDI-I11-141	G/G	BDI-I11-190	T/T	BDI-I11-238	A/A	BDI-I11-289	G/G	BDI-I11-338	??	BDI-I11-43	A/A	BDI-I11-96	A/A
BDI-I11-142	G/G	BDI-I11-191	A/A	BDI-I11-239	T/T	BDI-I11-29	G/G	BDI-I11-339	G/G	BDI-I11-46	C/C	BDI-I11-97	T/T
BDI-I11-144	A/A	BDI-I11-192	A/A	BDI-I11-240	G/G	BDI-I11-290	C/C	BDI-I11-34	A/A	BDI-I11-47	G/G	BDI-I11-98	G/G
BDI-I11-145	A/A	BDI-I11-193	A/A	BDI-I11-241	T/T	BDI-I11-291	A/A	BDI-I11-340	A/A	BDI-I11-48	G/G	BDI-I11-99	G/G
BDI-I11-146	G/G	BDI-I11-194	A/A	BDI-I11-242	G/G	BDI-I11-292	A/A	BDI-I11-341	G/G	BDI-I11-49	G/G		
BDI-I11-147	A/A	BDI-I11-195	G/G	BDI-I11-244	T/T	BDI-I11-293	C/C	BDI-I11-342	C/C	BDI-I11-5	G/G		
BDI-I11-148	A/A	BDI-I11-196	G/G	BDI-I11-245	A/A	BDI-I11-294	G/G	BDI-I11-343	??	BDI-I11-50	G/G		
BDI-I11-149	A/A	BDI-I11-197	A/A	BDI-I11-246	T/T	BDI-I11-295	??	BDI-I11-344	G/G	BDI-I11-51	A/A		

Примітка. 1 – номер SNP-маркера панелі BDI-III; 2 – алельний стан SNP-маркера в гомологічних сайтах гомологічних хромосом; A – аденін; T – тимін; G – гуанін; C – цитозин; ? – відсутність сигналу.

За комплексом SNP-маркерів панелі BDI-III гетерозиготність окремого селекційного зразка в дослідженому наборі ліній вітчизняної селекції становила в середньому 0,1962% (0,72 гетерозиготних локусів з 367 досліджених маркерних локусів на 1 лінію). Для всього комплексу з 367 маркерів та 270 селекційних зразків гетерозиготність становила 0,2043%, що є свідченням високої гомозиготності (99,7957%) досліджених селекційних зразків і правомірності визначення їх як ліній.

Відмінність за [9, 12] визначають як умову, за якою сорт за виявленням ознак чітко відрізняється від будь-якого іншого сорту. Якщо сорт-кандидат може бути диференційований серед загальновідомих сортів методом порівняння їхніх морфологічних Описів, його вважають відмінним. Ідентифікація сортів рослин, у тому

числі й ліній кукурудзи, згідно з [9, 10] – це дія, спрямована на встановлення ідентифікаційного цифрового коду для підтвердження морфологічних ознак сорту та їхнього прояву у відповідній фазі росту й розвитку рослин. У зв'язку із тим, що в Описі сорту під час реєстрації використовують лише морфологічні ознаки, становить значний інтерес проведення аналізу відмінності на молекулярно-генетичному рівні за SNP-маркерами порівняно з морфологічним.

Такий аналіз наборів ліній кукурудзи української селекції ми провели, порівнюючи ступінь відмінності за морфологічними ознаками, зазначеними в описах ліній під час оцінки на ВОС. Проводили порівняння 36 ліній кукурудзи з лінією 274 СВ. Характеристики морфологічних ознак лінії 274 СВ, а також, як приклад, однієї з 36 ліній – БВ377 С наведено в таблиці 2.

Таблиця 2

Опис ліній кукурудзи 274 СВ та БВ377 С за морфологічними ознаками

№ ознаки	Назва ознаки	Код ступеня прояву		№ ознаки	Назва ознаки	Код ступеня прояву	
		274 СВ	БВ377 С			274 СВ	БВ377 С
1.	Перший листок: антоціанове забарвлення піхви	1	5	16.	Початок: антоціанове забарвлення шовку	9	9
2.	Перший листок: форма верхівки	2	1	17.	Початок: інтенсивність антоціанового забарвлення шовку	3	5
3.	Листок: кут між листовою пластинкою і стеблом (листок над верхнім качаном)	5	3	18.	Листок: антоціанове забарвлення піхви (середня частина рослини)	1	5
4.	Листок: положення листової пластинки (листок над верхнім качаном)	3	3	19.	Волоть: головна вісь за довжиною (від нижчої бічної гілочки до верхівки), см	3	5
5.	Стебло: зигзагоподібність	1	1	20.	Волоть: довжина верхівки головної осі волоті (від верхньої бічної гілочки до верхівки волоті), см	3	5
6.	Стебло: антоціанове забарвлення повітряних коренів	1	5	21.	Волоть: бічні гілочки за довжиною	3	7
7.	Волоть: час повного цвітіння (середня третина головної осі, 50% рослин)	3	–	22.	Лише для самозапильних ліній. Рослина: за довжиною (враховуючи волоть), см	7	7
8.	Волоть: антоціанове забарвлення основи колоскової луски (на середній третині головної осі)	1	3	23.	Рослина: співвідношення висоти прикріплення верхнього качана до висоти рослини	3	3
9.	Волоть: антоціанове забарвлення колоскових лусок за винятком основи (на середній третині головної осі)	1	5	24.	Листок: пластинка листка за шириною (листок верхнього качана, см)	3	5
10.	Волоть: антоціанове забарвлення пиляків на середній третині головної осі (на щойно утворених пиляках)	1	–	25.	Качан: довжина ніжки, см	3	3
11.	Волоть: розміщення колосків (на середній третині головної осі)	5	5	26.	Качан за довжиною без обгортки, см	3	7
12.	Волоть: кут між головною віссю та бічними гілочками (на нижній третині волоті)	5	3	27.	Качан: діаметр (посередині, см)	3	5
13.	Волоть: положення бічних гілочок на нижній третині волоті	3	5	28.	Качан: форма	3	3
14.	Волоть: кількість первинних бічних гілочок, шт.	3	3	29.	Качан: кількість зернових рядів, шт.	3	5
15.	Початок: час появи шовку в 50% рослин	3	6	30.	Качан: тип зернини	3	5
				31.	Качан: колір верхівки зернини	3	3
				32.	Качан: колір низу зернини	3	3
				33.	Качан: антоціанове забарвлення лусок стрижня	9	9
				34.	Качан: інтенсивність антоціанового забарвлення лусок стрижня	5	5

Під час порівняння двох ліній ознаки, за якими лінії не розрізнялися, позначали як «0 балів», а кожну з ознак, за якими лінії розрізнялися, – як «1 бал». Для кожного попарного порівняння знаходили «дистанцію при порівнянні морфологічних ознак» як частку проаналізованих ознак, які не збіглися для двох ліній та бу-

ли позначені як «1 бал». Для перевірки того, наскільки лінії, близькі за морфологічними описами, є близькими за генетичними SNP-дистанціями, розраховували коефіцієнт кореляції між показником «дистанції при порівнянні морфологічних ознак» та відповідними генетичними дистанціями (табл. 3)

Таблиця 3

Порівняння ліній кукурудзи з лінією 274 СВ за морфологічними ознаками та генетичними дистанціями

Лінія	Дистанція при порівнянні морфологічних ознак з лінією 274 СВ	Генетична SNP-дистанція з лінією 274 СВ
ДК273 МВ	0,7576	0,3966
ДК742 М стерильна	0,6563	0,4684
ДК236 СВ	0,6471	0,3686
ЛВК1 МВ	0,6471	0,4435
ДК129 СВ	0,6471	0,4615
МС481	0,6286	0,3546
ДК633/325 МВ	0,6176	0,3892
К15	0,6176	0,5028
ВК377 ВС	0,6176	0,2051
ДК257 М	0,6176	0,2493
МС252 СВ	0,5938	0,2977
БВ377 С	0,5938	0,4928
МС361 зМСВ	0,5882	0,3046
ВК377 М	0,5625	0,2068
МС23/135 МВ	0,5588	0,4099
ДН10 МВ	0,5588	0,4337
ДК232 МВ	0,5588	0,4500
ДК714/195 МВ	0,5588	0,3456
ВК138 МВ	0,5588	0,4086

Лінія	Дистанція при порівнянні морфологічних ознак з лінією 274 СВ	Генетична SNP-дистанція з лінією 274 СВ
ВК387 МВ	0,5294	0,4040
МС74со зМ	0,5294	0,4310
К4 С	0,5000	0,5424
Р2-8 МВ	0,5000	0,4329
МС296 зС	0,5000	0,3842
АЦ 151	0,5000	0,4266
ДК744 СВ	0,5000	0,1719
МС296 зС	0,5000	0,3842
ДК276 МВ	0,5000	0,3859
ДК744 М	0,4848	0,1719
ДК307 МВ	0,4706	0,3702
С85 СО МВ	0,4412	0,4295
МС236 зС	0,4412	0,4169
МС236 С	0,4063	0,4176
ДК633/266 МВ	0,3824	0,3528
БВ247 СВ	0,3824	0,4046
АЦ10 МВ	0,3235	0,4192
Min-max	0,3235–0,7576	0,2051–0,5424
* $r_{23} = -0,01$; $r_{0,05} = 0,35$		

* Коефіцієнт кореляції між «дистанціями при порівнянні морфологічних ознак» та генетичними SNP-дистанціями.

Як впливає з таблиці 3, не встановлено кореляційну залежність між дистанціями за порівнянням морфологічних ознак і попарними генетичними SNP-дистанціями. Так, для лінії ДК273 МВ, яка за балами ВОС-анкети значно (на 75,76%), відрізняється від 274 СВ, генетична дистанція становить 0,3966. Проте лінія АЦ10 МВ, яка найменше (на 32,35%) відрізняється від 274 СВ морфологічно, має навіть більшу генетичну SNP-дистанцію з нею – 0,4192. Водночас, найменша генетична дистанція (0,2051) спостерігалася між лініями 274 СВ та ВК377 ВС, які за порівнянням морфологічних показників розрізнялися на досить велику відстань – 0,6176. Все це свідчить про перспективність для застосування в аналізі на відмінність не лише морфологічних ознак, а й і молекулярно-генетичних характеристик, зокрема аельного стану комплексу SNP-маркерів.

Висновки. SNP-генотипування є методом з високим дискримінаційним потенціалом, здатним вирізняти між собою лінії кукурудзи, який рекомендується застосовувати для паспортизації ліній кукурудзи, аналізу їхньої однорідності, стабільності та відмінності генотипів. Різниці між лініями за SNP-маркерами дають можливість диференціювати генотипи зі значно більшою ідентифікаційною здатністю, ніж морфологічні ознаки, які застосовують для ВОС-тесту. Проведено генотипування й створено комп'ютерну базу SNP-паспортів 270 ліній кукурудзи української селекції. Для комплексу з 270 селекційних зразків української селекції, досліджених за 367 SNP-маркерами, гетерозиготність становила 0,2043%, що є свідченням високої гомозиготності (99,7957%) та правомірності визначення досліджених зразків як ліній.

ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Syvänen A.-Ch. Assessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms / A.-Ch. Syvänen // *Nature reviews / Genetics*. – 2001. – Vol. 2. – P. 930–942.
2. Vignal A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics / A. Vignal, D. Milan, M. Sancristobal, A. Eggen // *Genetics, selection, evolution*. – 2002. – Vol. 34, № 3. – P. 275–305.
3. Ganal M. W. A large maize (*Zea mays* L.) SNP genotyping array: development and germplasm genotyping, and genetic mapping to compare with the B73 reference genome [Електронний ресурс] / M. W. Ganal, G. Durstewitz, A. Polley et al. // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6 (12). – Режим доступу : DOI: 10.1371/journal.pone.0028334.
4. Lu Y. Molecular characterization of global maize breeding germplasm based on genome-wide single nucleotide polymorphisms / Y. Lu, J. Yan, C. T. Guimarães et al. // *Theor. Appl. Genet.* – 2009. – Vol. 120. – P. 93–115.
5. Сиволап Ю. М. Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений / Ю. М. Сиволап, Н. Э. Кожухова, Р. Н. Календарь. – Одеса : Астропринт, 2011. – 336 с.
6. Кожухова Н. Е. Геном кукурудзи та його поліпшення / Н. Е. Кожухова, Ю. М. Сиволап, Б. Ф. Вареник // *Вісник аграрної науки*. – 2011. – № 2. – С. 26–29.
7. Fan J. B. Illumina universal bead arrays / J. B. Fan, K. L. Gundersson, M. Bibikova et al. // *Methods Enzymol.* – 2006. – Vol. 410. – P. 57–73.
8. Murray M. G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA / M. G. Murray, W. F. Thompson // *Nucleic Acids Res.* – 1980. – Vol. 8, № 19. – P. 4321–4326.
9. Методика проведення експертизи сортів кукурудзи звичайної (*Zea mays* L.) на відмінність, однорідність і стабільність [Електронний ресурс] / Український інститут експертизи сортів рослин / Державна система охорони прав на сорти рослин. – Режим доступу : <http://sops.gov.ua/uploads/files/documents/Methodiki/909.pdf>. – 38 с.
10. Лещук Н. Грунтовий та лабораторний сортовий контроль: роль і значення в сортовій сертифікації [Електронний ресурс] / Н. Лещук. – К., 2009. – Режим доступу : ldni.sumy.ua/POSTcjntrol.pps.
11. Сатарова Т. М. Паспорти ліній кукурудзи за молекулярно-біологічними показниками (SNP-паспорти) // *Електронна база даних* / Т. М. Сатарова, В. В. Борисова. – Дніпропетровськ : ДУ ІСГСЗ, 2013.
12. Методика проведення експертизи на відмінність, однорідність та стабільність (ВОС-тест) кукурудзи // *Охорона прав на сорти рослин : офіц. бюлетень*. – 2003. – № 2, Ч. 3. – С. 49–57.

УДК 633.15:631.527.8

Т. Н. Сатарова, Б. В. Дзюбецький, В. Ю. Черчель, В. В. Борисова, М. Н. Таганцова. SNP-аналіз в паспортизації та ідентифікації ліній кукурудзи // *Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин : наук.-практ. журн.* – 2014. – № 3 (24). – С. 4–9.

Рассмотрены методические аспекты использования анализа однонуклеотидного полиморфизма ДНК (SNP-анализа) для паспортизации и идентификации линий кукурудзы. Показано, что SNP-генотипирование является методом с высоким дискриминационным потенциалом, способным выделять между собой линии кукурудзы, который рекомендуется применять для паспортизации линий кукурудзы, анализа их однородности, стабильности и различия генотипов.

Ключевые слова: SNP-маркер, SNP-анализ, ДНК-паспортизация, идентификация.

UDC 633.15:631.527.8

T. M. Satarova, B. V. Dziubetskyi, V. Yu. Charchel, V. V. Borysova, M. M. Tagantsova. SNP-analysis in certification and identification of maize lines // *Sortovyvchennya ta okhorona prav na sorty roslyn : naukovo-praktychnyi zhurnal (Plant Varieties Studying and Protection : journal of applied research)*. – 2014. – № 3 (24). – P. 4–9.

Methodical aspects of using the analysis of DNA single-nucleotide polymorphism (SNP-analysis) for certification and identification of maize lines are considered. It is shown that SNP-genotyping is a method with high discriminatory potential that can differentiate maize lines among themselves and is recommended to use for certification of maize lines and analysis of their homogeneity, stability and genotype differences.

Keywords: SNP-marker, SNP-analysis, DNA certification, identification.

Надійшла 08.04.2014 р.