

***ДНК-ТЕХНОЛОГІЇ У ДОСЛІДЖЕННІ ГЕНЕТИЧНОГО
ПОТЕНЦІАЛУ КУКУРУДЗИ***

Ю.М. Сиволап, Н.Е. Кожухова

Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН

Проаналізовано різноманітні регіони генома кукурудзи за допомогою техніки полімеразної ланцюгової реакції. За даними ДНК-профілювання ліній і гібридів кукурудзи розроблено тест-системи для комплексної оцінки генотипу кукурудзи, а саме його генетичної чистоти, автентичності, гетерозисного потенціалу, наявності стійкості до фузаріозної гнилі.

Молекулярні маркери, ДНК-профілювання, ПЛР-аналіз, кукурудза

Дослідження організації і мінливості геномів є одним із найважливіших завдань молекулярної генетики. В останні півстоліття уявлення про геном залежали від розвитку методології визначення специфічності структури ДНК. Починаючи з відкриття Е. Чаргафа видоспецифічності відношення пуринових і піримідинових азотистих основ, кожний наступний новий підхід до аналізу мінливості ДНК поповнював знання про геном. Так, аналіз кінетики реасоціації ДНК виявив різницю між геномами про- і еукаріотів, аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів ДНК дозволив оцінити організацію і мінливість окремих генів, і, нарешті, впровадження ДНК-технологій на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) надало найбільш широкі можливості аналізу мінливості ДНК [1].

Досягнення молекулярної генетики зробили величезний внесок в загальну біологію, зокрема, в рослинництво. Вирішення теоретичних і практичних проблем поліпшення рослин в останні 15 років багато в чому залежить від розвитку і впровадження молекулярних маркерів. До практики рослинництва введено відбір за допомогою маркерів (Marker Assisted Selection – MAS), що свідчить про прямий вплив досягнень молекулярної генетики на підвищення ефективності вирішення економічно важливих проблем народного господарства.

Останнім часом об'єктами молекулярно-генетичного досліджен-

ня стали геноми важливіших сільськогосподарських культур, серед яких особливе місце посідає кукурудза.

Кукурудза (*Zea mays* L.) є однією з найбільш поширених і продуктивних злакових культур у світовому землеробстві, у тому числі і в Україні. Це модельний класичний генетичний об'єкт. Генетичні дослідження кукурудзи, початі на рубежі 19 і 20 століть, сприяли корінному поліпшенню даної культури і послужили основою для розвитку теоретичної і прикладної генетики рослин. Розробки, здійснені вперше на кукурудзі, перенесені на інші культури, що сприяло підвищенню загального рівня генетичних досліджень і селекційних технологій [2].

Теоретичний і практичний інтерес представляє молекулярно-генетичний аналіз геному кукурудзи з метою розробки молекулярних маркерів для визначення генетичної чистоти і унікальності генотипів (їх реєстрація), гетерозисного потенціалу інбредних ліній, ступеня стійкості до фузаріозної гнилі.

Матеріалом слугували 58 інбредних ліній і 34 гібридів кукурудзи селекції Інституту зернового господарства (ІЗГ, м. Дніпропетровськ), Селекційно-генетичного інституту (м. Одеса) і світової колекції.

Виділення ДНК здійснювали з 7-добових етіюльованих паростків за модифікованою методикою [3]. Умови ПЛР та гель-електрофорезу наведено у попередніх роботах [4-5].

Для дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму кукурудзи використовували три типи ПЛР-аналізу - RAPD; ISSR; SSR.

У зв'язку з прогресуючим збідненням генофонду культурних рослин, збереження і збагачення генного пулу рослин, зокрема кукурудзи, є актуальною проблемою. Оцінка генетичної різноманітності вихідного селекційного матеріалу, характеристика існуючого генофонду, визначення ступеня спорідненості сортів вимагає розробки надійних і ефективних методів їх диференціації і ідентифікації. У свою чергу, оцінка генетичної різноманітності разом з інформацією про родовід і основні агрономічно важливі ознаки забезпечать об'єктивну основу для опису генотипів і їх реєстрації. Лібералізація ринку насіння, створення в країнах СНД приватних селекційно-насінневих підприємств підсилює необхідність контролю і охорони прав авторів комерційно використовуваних сортів, ліній, гібридів. Молекулярно-генетична ідентифікація ліній (точна, об'єктивна, достатньо швидка) необхідна для здійснення контролю генетичної однорідності генотипів, встановлення їх оригінальності і відповідності стандарту при обміні лініями між селекційними установами.

Для визначення генетичної однорідності і реєстрації генотипів кукурудзи використовували ПЛР-маркери «другого покоління», засно-

вані на мікросателітних повторах - SSRs, що мають такі важливі особливості, як кодомінантність, висока відтворюваність, локусоспецифічність, поліалельність і гіперваріабельність. Досліджували 20 мікросателітних локусів, критеріями добору яких (за даними літератури і електронної бази даних MaizeGDB) були локалізація на різних хромосомах, значення PIC не менше 0,5, довжина повтору не менше 3 п. н. В результаті сформована тест-панель з мікросателітних локусів phi055, phi064 (хромосома 1), phi083 phi127 (хромосома 2), phi029, phi073 (хромосома 3), phi021, phi079, phi093 (хромосома 3), phi024 (хромосома 5), phi070, phi078 (хромосома 6), phi034, phi116 (хромосома 7), phi115, phi015 (хромосома 8), phi022, phi027 (хромосома 9), phi062, phi084 (хромосома 10).

Визначення типовості, тобто відповідності, генетичних показників еталонному зразку і генетичній однорідності, інбредних ліній є однією з обов'язкових процедур в селекції. Генетично однорідні лінії забезпечують отримання гібридного насіння F₁ з високим (не менше 98 %) рівнем гібридності. Однорідність ліній оцінювали за даними ПЛР-аналізу трьох мікросателітних локусів. Етапи визначення типовості інбредних ліній наступні: виділення ДНК з 50 індивідуальних зразків лінії; створення п'яти сумішей, що містять ДНК 10 індивідуальних зразків; ПЛР-ампліфікація мікросателітних локусів; електрофорез фрагментів ДНК в поліакриламідному гелі; порівняння електрофоретичних профілів ДНК між собою. Виділення ДНК можливо здійснювати з будь-якої тканини рослини на будь-якій стадії онтогенезу (паросток, зерно, лист, корінь).

Лінію вважали однорідною у разі ідентичності спектрів ампліфікованої ДНК всіх п'яти сумішей за аналізованими локусами і гомозиготного стану аналізованих локусів. У разі виявлення внутрішньолінійної гетерогенності, тобто неідентичності між собою спектрів ампліфікації одного-усіх аналізованих локусів, або гетерозиготного стану одного-усіх аналізованих локусів, робили висновок про неоднорідність лінії. Далі проводили ПЛР-аналіз ДНК індивідуальних зразків певної суміші і передбачали вибраковування нетипових.

Використання високоякісного насіння дозволених до поширення гібридів забезпечує високий урожай зерна і зеленої маси кукурудзи. Для оцінки якості гібридного насіння необхідно встановити відсоток гібридності насіння в рік їх отримання на ділянках гібридизації (за 2-3 тижні до збору урожаю) і своєчасно прийняти рішення про подальше їх використання.

Однорідність гібридів оцінювали за даними ПЛР-аналізу трьох мікросателітних локусів. Етапи аналогічні таким при визначенні типо-

вості ліній. Гібрид вважали однорідним у разі ідентичності спектрів ампліфікованої ДНК всіх п'яти сумішей за аналізованими локусами і підсумовування в його ДНК-спектрі компонентів ампліфікації батьківських форм. У разі виявлення внутрішньогібридної гетерогенності, тобто неідентичності спектрів ампліфікованих ДНК між собою хоч би за одним аналізованим локусом, робили висновок про неоднорідність гібрида і передбачали вибраковування нетипових зразків шляхом ДНК-типуювання індивідуальних представників певної суміші.

За допомогою розробленої ДНК-технології оцінена генетична чистота вихідного матеріалу, відмічена однорідність досліджуваного матеріалу за трьома мікросателітними локусами. Для подальших досліджень використовували ДНК одного зразка кожного генотипу.

Добір генетично чистого матеріалу дозволив перейти до наступного етапу роботи, а саме диференціації та ідентифікації ліній і гібридів. ПЛР-ампліфікація ДНК-аналізованих генотипів з використанням 20 пар праймерів до мікросателітних локусів дозволила одержати унікальні для генотипів кукурудзи набори алелів. Для всіх інбредних ліній визначили гомозиготний стан досліджених локусів, тоді як для гібридів одержані гомо- і гетерозиготи. Спектр ампліфікованої ДНК гібридів містив компоненти спектрів ліній, які брали участь в їх створенні. Для кожного генотипу визначені розміри алелів мікросателітних локусів в парах нуклеотидів (п. н.). За цими показниками створена матриця даних ДНК-типуювання ліній і гібридів.

Унікальні комбінації алелів у ліній і гібридів дозволяють представити кожний генотип у вигляді генетичної формули. Кожний SSR-локус кодували буквою латинського алфавіту. Як нижній індекс використовували розмір алеля даного локусу (у п. н.). У разі гомозиготного стану локусу вказували один алель. У формулі простого гібрида підсумовуються дані алельного складу мікросателітних локусів, характерних для батьківських форм. Якщо відома формула простого гібрида і однієї з батьківських ліній, можливо визначити іншу складову - генотип другої батьківської форми, і навпаки.

На основі системи управління базами даних ORACL 10gXE з можливістю web-доступу створена комп'ютерна база даних ДНК-типуювання гібридів кукурудзи, зареєстрованих в «Реєстрі сортів рослин України» і «Державному реєстрі сортів рослин, придатних для розповсюдження в Україні» в 2003-2005 роки, і їх батьківських форм, а також ліній і гібридів світової селекції. Необхідність такої бази пов'язана як із зберіганням і порівняльним пошуком інформації про генотипи, так і з постійним поповненням результатами аналізу нових генотипів і нових мікросателітних локусів. Наявність такої бази даних до-

зволяє виконувати незалежну експертну оцінку комерційних партій насіння і захищати права селекціонерів-авторів сортів. Для визначення новизни генетичну формулу проаналізованого генотипу порівнюють з формулами генотипів бази даних. У разі відсутності такого генотипу інформація про нього поповнює банк даних.

Успіхи гетерозисної селекції кукурудзи значною мірою залежать від генетичної різноманітності вихідного матеріалу. Добір ліній для гібридних комбінацій традиційно здійснюють на основі оцінки морфологічних (фенотипових) ознак, що має ряд серйозних обмежень. Ці обмеження, а також зростаючі масштаби селекції кукурудзи ініціюють розробку нових, ефективніших, методів добору вихідних форм.

Методом ПЛР з 10 ISSR-праймерами здійснювали диференціацію 15 інбредних ліній кукурудзи середньої групи стиглості. Використано полілокусну маркерну систему, яка дозволяє одночасно охарактеризувати велику кількість ПЛР-локусів. За допомогою комп'ютерної програми «TREES 4.0» розрахували генетичні дистанції (D) між лініями. Значення D варіювали від 0,033 до 0,538.

Згідно значенням D пари ліній розділені на чотири групи: I - $D \leq 0,2$; II - $0,2 < D < 0,3$; III - $0,3 < D < 0,4$; IV - $D \leq 0,4$ (табл. 2). У I групі значення генетичних дистанцій склали 0,033-0,182; у II групі - 0,200-0,294; у III групі - 0,300-0,399; у IV групі - 0,412-0,538. Провели діалельне схрещування вихідних ліній. Дані по урожаю зерна одержані для 56 гібридів, для яких підраховали дійсний гетерозис (H) за врожаєм зерна. Порівняли угруповання вихідних ліній, здійснене за значеннями D, з розподілом рівня гетерозису. Середнє значення D I групи ліній склало 0,091, II групи - 0,245, III групи - 0,353, IV групи - 0,460. Середнє значення H гібридів, одержаних від схрещування ліній I, II, III і IV групи, склало 66, 78, 144 і 146 % відповідно. Коефіцієнти кореляції r значень генетичних дистанцій між лініями і рівнем гетерозису відповідних гібридів наступні: 0,60; 0,46, 0,61 (достовірно при рівні значущості $P = 0,05$) і 0,41 (не достовірно) для ліній I, II, III і IV групи, відповідно.

При збільшенні значень генетичних дистанцій між вихідними лініями спостерігається достовірне зростання рівня гетерозису відповідних гібридів. При значенні генетичних дистанцій між лініями менше 0,300 рекомендуємо «вибраковувати» пари для схрещування як близькосторідні і такі, що не відповідають вимогам до вихідних форм для отримання високогетерозисних гібридів. Такі зразки можливо використовувати для підвищення продуктивності ліній. Значення генетичних дистанцій вище 0,300 дозволяють рекомендувати аналізовані лінії для гібридизації з метою отримання високогетерозисних гібридів.

Молекулярно-генетична ідентифікація і оцінка ступеня спорідне-

ності вихідного матеріалу мають велике значення в практичній селекції на гетерозис. Емпіричний характер добору з десятків тисяч найбільш продуктивних гібридних комбінацій приводить до величезного об'єму неінформативних тестових схрещувань, значним витратам часу, засобів, коштів і не завжди забезпечує бажаний результат. Впровадження до селекційної практики ДНК-технології оцінки вихідного матеріалу дозволяє проводити диференціацію і ідентифікацію ліній і гібридів кукурудзи, визначати ступінь генетичної дивергенції між ними і більш цілеспрямовано підбирати батьківські пари для отримання високогетерозисних простих гібридів.

Впровадження молекулярних маркерів дозволило розвинути методологію локалізації і контролю генів, що визначають кількісні і якісні ознаки, зокрема, генів стійкості до несприятливих біотичних і абіотичних факторів. Кукурудза уражається понад 100 видами патогенів, з яких одними з найбільш шкідливих є гриби роду *Fusarium*. Більшість генотипів кукурудзи вітчизняної і зарубіжної селекції, які культивуються в Україні, відносно їх стійкості до ураження грибами роду *Fusarium* вивчено недостатньо. Ідентифікація генів стійкості значно підвищить ефективність селекційних робіт зі створення ліній і гібридів кукурудзи, стійких до збудників фузаріозних гнилей, найбільш поширених патогенів кукурудзи в умовах півдня України, а також продемонструє можливість використання молекулярних маркерів цих генів в селекційних програмах з відбором по маркерах.

Роботу із створення ДНК-маркера локусів стійкості кукурудзи до фузаріозної гнилі проводили за етапами: ПЛР-аналіз ДНК батьківських ліній і виявлення поліморфних локусів; створення сумішей ДНК рослин домінантних і рецесивних гомозиготних генотипів за даними фітопатологічного польового і лабораторного тестування; ПЛР-аналіз ДНК батьківських ліній і контрастних сумішей ДНК з використанням добраних праймерів: скринінг F_2 -популяції за поліморфними локусами; визначення зчеплення маркера(ів) з локусом(ами) стійкості.

Провели пошук серед 27 пар SSR-, 20 пар STS-, 24 ISSR- і 23 довільних праймерів тих, які детектують поліморфізм між батьківськими лініями. За допомогою ПЛР-аналізу інбредних ліній R221 і Одеська 139 визначено 40 поліморфних локусів.

Рослини F_1 , одержані від схрещування контрастних по стійкості ліній Одеська 139 і R221, мали високий ступінь стійкості (0-10 % ураження), що свідчить про домінантну природу гена стійкості. Фенотипічний прояв стійкості визначали на 170 рослинах F_2 -популяції, що розщеплюється. 32 рослини віднесли до сприйнятливих, що відповідало розщеплюванню 3 : 1 ($\chi^2 = 3,16$ при $P = 0,10-0,05$). З 138 стійких

рослин F_2 за результатами фітопатологічного польового тестування ураженості рослин F_3 -сімей фузаріозною гниллю 34 F_2 -рослини оцінили як гомозиготні стійкі генотипи, 104 - гетерозиготні генотипи. За результатами лабораторної оцінки (обліку схожості насіння на інфекційному фоні) 41 F_2 -рослину охарактеризували як гомозиготні стійкі генотипи, 97 - гетерозиготні генотипи.

На основі узагальненої (польової і лабораторної) оцінки F_3 -сімей добрані рослини покоління F_2 , гомозиготні за стійкістю (28 рослин) і сприйнятливістю (31 рослину). Створили дві суміші ДНК рослин домінуючих і рецесивних гомозиготних генотипів для ПЛР-ампліфікації по BSA-методу (15 зразків ДНК на суміші). З 14 праймерів (пар праймерів), за допомогою яких виявлений поліморфізм між батьківськими лініями, використання семи пар праймерів дозволило детектувати поліморфізм між контрастними сумішами ДНК. Проведений ПЛР-аналіз відібраних локусів у індивідуальних рослин F_2 -популяції. Дані ПЛР-аналізу за ознакою наявності/відсутності фрагмента зіставляли з результатами гібридологічного аналізу відповіді рослини на ураження (стійкість/сприйнятливість). При аналізі п'яти локусів не встановлено зв'язку між ознакою стійкості і алельним складом тестованих локусів.

При аналізі SSR-локусу $\phi i001$ знайдені поліморфні фрагменти ампліфікації, які розрізняють батьківські лінії і контрастні по стійкості пули ДНК: амплікон довжиною 180 п. н., характерний для стійкої лінії Одеська 139 і суміші ДНК стійких F_2 -зразків, і амплікон довжиною 195 п. н., характерний для нестійкої лінії R221 і суміші ДНК нестійких F_2 -зразків. Аналогічні результати отримані при використанні пари STS-праймерів RGA11, дизайн яких розроблений на основі амінокислотної послідовності лейцин-збагачених регіонів аналогів генів стійкості: амплікони довжиною 240 п. н. і 265 п. н. відповідно характерні для „стійких” і „сприйнятливих” генотипів.

Для визначення зчеплення поліморфних локусів $\phi i001$ і RGA11 з геном стійкості до фузаріозної гнилі провели генотипування рекомбінантів F_2 -популяції даними маркерами. Одержані дані генотипування рекомбінантів F_2 -популяції і фенотипового прояву стійкості до фузаріозної гнилі аналізували за допомогою комп'ютерної програми «JOINMAP ver. 2.0» з картуючою функцією Козамбі. Відстань маркерів $\phi i001$ і RGA11 від гена стійкості складала 30,3 і 18,3 см відповідно. Відома хромосомна локалізація мікросателітного локусу $\phi i001$ дозволила локалізувати локус RGA11: він знаходиться на короткому плечі хромосоми 1. Даний маркер може бути використаний в селекції при доборі генотипів кукурудзи, стійкість якої регулюється даним геном. До переваг виявленого маркера можна віднести

його кодомінантність, що дозволяє тестувати як стійкі, так і сприйнятливі генотипи кукурудзи.

Висновки. Дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму геному кукурудзи дозволило розробити системи молекулярних маркерів для вирішення таких селекційних задач, як визначення типовості і однорідності партій насіння, оцінка новизни генотипу, прогнозування гетерозисного ефекту, тестування стійкості до фузаріозної гнилі. Дібранні маркерні системи дозволяють комплексно оцінити генотип кукурудзи на його унікальність, автентичність, генетичну чистоту, наявність певних ознак.

Бібліографічний список

1. *Календарь Р.Н., Глазко В.И.* Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиол. и биохим. культ. растений. – 2002. – № 4. – С. 279-296.
2. *Циков В.С.* Кукуруза: технология, гибриды, семена. – Днепропетровск: Зоря. – 2003. – 296 с.
3. *Сиволап Ю.М., Календарь Р.Н.* Генетический полиморфизм ячменя, детектируемый ПЦР с произвольными праймерами // Генетика. – 1995. – Т. 31. – № 10. – С. 1358-1364.
4. *Єфименко В.Г., Кожухова Н.Э., Сиволап Ю.М.* Молекулярно-генетична характеристика генотипів кукурудзи за складом мікросателітних локусів // Вісник Укр. товариства генетиків і селекціонерів. – 2006. – Т. 4, № 1. – С. 21-30.
5. *Кожухова Н.Э., Сиволап Ю.М.* Молекулярные маркеры в генетико-селекционных исследованиях кукурузы // Цитология и генетика. – 2006. – № 5. – С. 82-93.

Проанализированы различные регионы генома кукурузы с помощью техники полимеразной цепной реакции. Согласно данным ДНК-профилеирования линий и гибридов кукурузы разработаны тест-системы для комплексной системы генотипа кукурузы, а именно, его генетической чистоты, аутогенетичности, гетерозисного потенциала, наличия устойчивости к фузаріозной гнилі.

Different regions of maize genome are analysed by means of PCR. According to the data DNA profiliration of maize lines and hybrids test-systems are worked out for a complex system of the maize genotype, particularly, autotentity, heterotic potential, availability of resistance to fusarium rot.