

УДК 633.15:631.524:575.113:542.1

Н. І. БУКРЕЄВА., наук. співроб.,  
А. О. БЕЛОУСОВ, д. б. н., ст. наук. співроб., зав. лаб.,  
Ю. М. СИВОЛАП, проф., д. б. н., акад. НААН, зав. від.  
СГІ–НЦНС, Одеса  
e-mail: natastor@rambler.ru

## **SSR-МАРКУВАННЯ QTL ОЗНАКИ «УРОЖАЙНІСТЬ ЗЕРНА» У КУКУРУДЗИ**

*Для маркування локусів кількісних ознак (QTL), що відповідають за розвиток ознаки «урожайність зерна» у кукурудзи, використано метод SSR-аналізу. Виявлена специфічність алелів маркерних локусів для аналогічних рівнів фенотипового прояву полігенної ознаки «урожайність зерна». Обговорюються критерії інформативності маркерних локусів. Показана можливість добору цінних генотипів на підставі визначення алелів певних маркерних локусів, пов'язаних з необхідними для селекції значеннями ознак. Маркуючу здатність визначених SSR-локусів перевірено у різних умовах вирощування кукурудзи.*

*Ключові слова: P1L, SSR-маркери, локуси кількісних ознак, урожайність зерна, кукурудза.*

**Вступ.** Найбільш цінні господарські ознаки культурних рослин, зокрема й продуктивність та якість врожаю, є кількісними. Генетично зумовлена мінливість кількісних ознак пов'язана з їхньою полігенною природою, а також з розщепленням поліморфних локусів, що контролюють їхній розвиток. Масштаби і складність добору при скринингу популяцій в традиційних селекційних програмах потребують нових підходів, до яких з впевненістю можна віднести добір за допомогою молекулярних маркерів (Marker-Assisted Selection, MAS) [1].

З подальшим розвитком методів молекулярного маркування та картування генома з'явилися нові підходи у маркерній селекції, зокрема такий напрям, як геномний добір (GS — genomic selection) [3–5]. Фундаментальна ідея геномної селекції полягає у тому, що функціональні послідовності ДНК тісно пов'язані з поліморфними маркерами. Ця інформація буває переважно прямою, коли поліморфний маркер зчеплений з локусом, що кодує ознаку, і рідше — непрямою, що заснована на поліморфізмі локусів, які асоціюються з QTL. Маркер-опосередкований добір вважається перспективним для поліпшення сільськогосподарських рослин і пов'язаний з комплексним використанням методів традиційної та маркерної селекції на основі маркування QTL, що відповідають за

розвиток ознаки, яка потрібна селекціонеру. Отже, MAS спрямована на добір певних локусів, за якими відбувається покращення агрономічних властивостей культурних рослин.

Методика маркерної детекції полігенної ознаки передбачає зокрема поділ популяції на класи за генотипом маркерних локусів та оцінку достовірності різниці середніх значень ознаки за отриманими класами. Важливою умовою успішного маркування локусів кількісних ознак є оцінка достовірності різниці середніх між «селективною вагою» алелів маркерних локусів [6–9]. Суттєва різниця між маркерними генотиповими класами за фенотиповими значенням ознаки усіх особин популяції свідчить, що гени, які зумовлюють прояв певної ознаки, зчеплені з маркерним локусом. Цей підхід забезпечує статистично коректне ДНК-маркування локусів кількісних ознак й визначає селекційну цінність маркерних алелів. У СГІ–НЦНС ведуться дослідження з розробки технології селекційного добору цінних генотипів кукурудзи на основі молекулярного маркування QTL-ознак продуктивності культури.

**Метою** даної роботи є маркування локусів кількісної ознаки «урожайність зерна» за допомогою SSR-маркерів, що використані для генотипування популяції рекомбінантних інбредних ліній (РІЛ)  $F_4$ , які є основою для розробки прогнозуючих моделей ефективного добору у кукурудзи.

**Матеріали та методи.** Вихідний матеріал — елітні інбредні лінії кукурудзи GK 26, Мо 17, популяція рекомбінантних інбредних ліній (РІЛ) (GK 26 x Мо 17)  $F_4$  і інбредні тестерні лінії Одеська 308 МВ і Одеська 329 (лінії, які використані як запилювачі на ділянках гібридизації з материнськими РІЛ  $F_4$ ). Інбредні лінії суттєво різняться за основними морфобіологічними ознаками і належать до різних гетерозисних груп. GK 26 відноситься до групи зародкової плазми Iodent, Мо17 — Lancaster, Од 308 МВ — Mindszenpuszta, а лінія Одеська 329 — до окремої гетерозисної групи, яка утворює з лініями інших груп високогетерозисні гібриди.

Схрещування рекомбінантних ліній популяції  $F_4$  з тестерами та сорто-випробування отриманих гібридів проводили на експериментальних базах СГІ–НЦНС «Дачна» — Степ (С) та «Новоселівське» — Лісостеп (ЛС). Гібриди з відповідними стандартами висівали рендомізованими блоками у трикратній повторності. Урожайність зерна оцінювали в розрахунку на 14 % вологості, статистично обробляли дані за загальнопоширеними методами [10].

Відібрано зразки для виділення ДНК з листя РІЛ  $F_4$  на ізольованих ділянках гібридизації з тестерами Од 308 МВ і Од 329 з трьох рослин кожної родини: 50 РІЛ x 3 рослини x 3 тестера = 450. З технічних причин вибірку, яку досліджували за молекулярними маркерами, було зменшено до 239 генотипів.

Для детекції поліморфізму ДНК використано аналіз за 47 SSR-локусами за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Мі-

кросателітні локуси умовно розділено на генотипи «AA», «Aa», «aa» за молекулярною масою, для маркування QTL. ДНК виділяли з листя кукурудзи із застосуванням цетавлону [11]. Умови ампліфікації ДНК з SSR-праймерами, відібраними нами з бази даних про геном кукурудзи [16], оптимізовані для приладу MJ Research (PTC-200) (США). Для ампліфікації застосовували оптимальні температурні режими в залежності від нуклеотидної послідовності праймерів до кожного SSR-локусу.

Електрофоретичний розподіл фрагментів ампліфікації проводили у 4 % агарозному та 10 % поліакриламідному гелях. Документували отримані електрофореграми за допомогою відеосистеми VDS (Pharmacia Biotech, США). Молекулярну масу поліморфних фрагментів ДНК підраховували за комп'ютерною програмою «Image Master 1D Elite» згідно із стандартом pUC19/Mspl, pBR322/Mspl та  $\lambda$ /PstI (Fermentas, Латвія).

Таблиця 1

Характеристика поліморфних SSR-локусів ліній ГК 26 і Мо 17

SSR-локус	Ген, назва продукту гена ( <a href="http://www.maizegdb.org">http://www.maizegdb.org</a> )[14]	Хромосома локалізація	Генотип, визначений за фрагментами ампліфікації (п. н.)	
			ГК 26	Мо 17
phi 064	<i>csu89</i> , гомолог мієліноподібного лужного білка	1.11	86–86	78–78
phi 083	<i>prp2</i> , білок, пов'язаний з патогенезом	2.04	126–126	130–130
nc 030	<i>tri4</i> , тріозофосфат-ізомераза 4	3.04	112–112	108–108
phi 031	<i>pl1</i> , транскрипційний активатор для генів флавоноїдів, пурпурова рослина	6.03	187–187	191–191
phi 112	<i>o2</i> , регулюючий білок, ендосперм непрозорий	7.01	137–137	161–161
phi 057	<i>o2</i> , регулюючий білок, ендосперм непрозорий	7.01	154–154	158–158
phi 080	<i>gst1</i> , глутатіон S-трансфераза 1	8.08	162–162	158–158
phi 044	<i>sh1</i> , цукросинтетаза	9.01	76–76	72–72
phi 061	<i>wx1</i> , <i>gbss</i> — гранулоасоційована крохмальсинтаза	9.03	80–80	88–88
phi 084	<i>pac1</i> , NaCl стрес-білок 1	10.04	159–159	155–155

Для статистичної обробки фенотипових даних використано пакет програм фірми StatSoft, Inc. (США) STATISTICA (V 7.0) за алгоритмами Лакіна [12], для генотипових даних — алгоритми Мазера [13].

**Результати та обговорення.** Для порівняльного аналізу геномної ДНК вихідних елітних ліній ГК 26 та Мо17, а також отриманих шляхом самозапилення популяції РІЛ (ГК26 x Мо17)  $F_4$ , використано 47 SSR-локусів. Відібрано 10 локусів (nc 030, phi 061, phi 064, phi 083, phi 031, phi 044,

phi 057, phi 084, phi 080, phi 112), за якими детектовано поліморфізм у вихідних батьківських ліній — ГК 26 і Мо 17 (табл. 1). У результаті ПЛР-аналіза ДНК вихідних батьківських ліній ГК 26 та Мо 17 за 10 поліморфними мікросателітними локусами визначено розмір їх алелів у парах нуклеотидів (п. н.).

За поліморфними локусами, що були детектовані у батьківських ліній, проведено генотипування популяції РІЛ  $F_4$  (рис.).

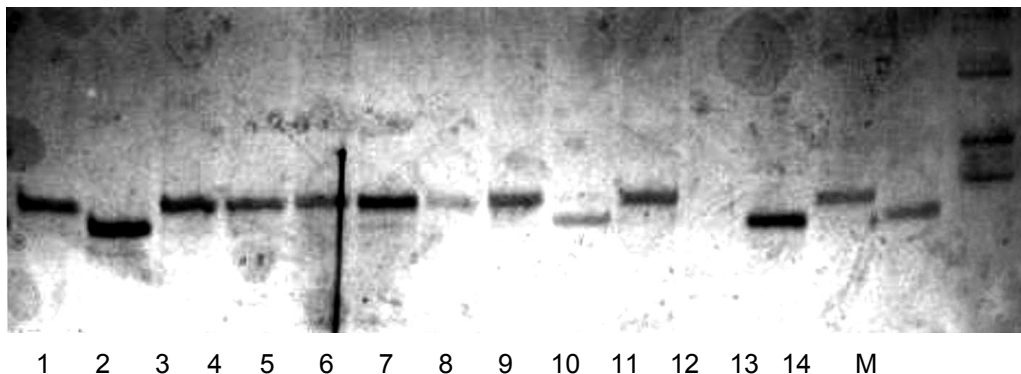


Рис. Електрофореграма генотипування РІЛ з популяції (ГК 26 x Мо 17)  $F_4$  за SSR-локусом phi 044; 1–14 продукти ампліфікації РІЛ 4418–4431; М — маркер молекулярної маси pUC19/MspI

Молекулярне маркування 239 генотипів з популяції  $F_4$  за 10 SSR-локусами дозволило простежити розщеплення та визначити алельний стан поліморфних локусів, які були детектовані у вихідних батьківських ліній. Отже, виявлено 10 потенційних маркерів для ознаки «урожайність зерна». З використанням заходів, описаних у Tanksley [6], виявлені маркерні алелі визначених локусів, які асоціюються з відмінностями у прояві кількісної ознаки «урожайність зерна».

Для кожного маркерного алеля (А або а) визначали «селективну вагу» (згідно з Животовським [7]) як середнє значення ознаки усіх особин популяції, що мають даний алель. Метод SSR-ПЛР дає можливість детектувати обидва алелі в генотипі Аа, і це значно підвищує ефективність маркування цінних ознак. Інформативність маркерних локусів аналізували з урахуванням таких параметрів: 1) алельний стан маркерного локусу; 2) достовірність різниці середніх величин ознаки для маркерних алелів; 3) максимальне значення ознаки у генотипів з певним алелем.

Нерівновага за зчепленням (linkage disequilibrium — LD) — це не випадкова асоціація алелів різних поліморфних локусів у популяції, яка може бути викликана дією таких факторів, як відбір і генетичний дрейф. Фактично нерівновага за зчепленням — це кореляція у частотах зустрічаємості гена у геномі між невидимими алелями QTL і видимими алелями маркера, отриманого експериментально при схрещуванні популяцій.

Таблиця 2

Інформативність алельного складу маркерних SSR-локусів у РІЛ  $F_4$  з різними значеннями ознаки «урожайність зерна» (т/га), для тестерних гібридів з Од 308 МВ

Локус	Алелі, детектовані у РІЛ $F_4$ (п. н.)		Генотипи та середнє значення ознаки у тестерних гібридів від РІЛ $F_4$			Достовірність різниці середніх ( $P <$ )	Фаза нерівноваги за зчепленням
			AA	Aa	aa		
ДГ «Дачна», 2006							
nc 030	112–112	108–108	<b>5,34*</b>	4,77	4,62	0,045	притягнення
			<b>±0,12</b>	±0,47	±0,19		
			5,34	4,77	<b>4,62*</b>		
			5,34	<b>4,77*</b>	4,62	0,34	відштовхування
phi 112	161–161	137–137	5,00	<b>4,53*</b>	4,67	0,026	притягнення
			±0,15	<b>±0,14</b>	±0,22		
			5,00	4,53	<b>4,67*</b>		
			<b>5,00*</b>	4,53	4,67		
			4,25*	4,49	5,05	0,026	притягнення
			<b>±0,20</b>	±0,28	±0,14		
			4,25	4,49	<b>5,05*</b>		
			4,25	<b>4,49*</b>	5,05	0,105	відштовхування

Примітка: \* – маркерні алелі визначених локусів, що асоціюються з відмінностями у прояві ознаки; ж — алелі, які не пов'язані з мінливістю ознаки «УЗ».

Однак у первинно розщеплених поколіннях ( $F_2$ – $F_4$ ) переважною причиною нерівноваги за зчепленням є фізичне зчеплення локусів, яке успадковується від батьківських форм. Саме це дало можливість генетичного картування та маркування.

Проаналізована фенотипова та генотипова інформація у РІЛ  $F_4$  за ознакою «урожайність зерна». У таблиці 2 наведено результати оцінки нерівноваги за зчепленням між алелями маркерних SSR-локусів та QTL у тестерних гібридів, отриманих від схрещування РІЛ  $F_4$  і тестерних ліній Од 308 МВ, Од 329. З 10 SSR-маркерів, детектованих в  $F_4$ , нерівновага за зчепленням у фазі притягання характерна для певних локусів у досліджених РІЛ  $F_4$ , що вирощували у різних умовах.

Таким же чином проведено маркування QTL урожайності зерна у інших екологічних умовах — ДГ «Дачна», 2005 р. та ДГ «Новоселівське», 2006 р. За аналізом маркуючої здатності виділені групи ліній, які містять асоціації з маркерними локусами у певних умовах вирощування. Результати маркерного аналізу мінливості ознак кукурудзи за алелями SSR-локусів виявили, що кількість маркерів, що припадає на ознаку «урожайність зерна» коливалась від 3 до 7 в залежності від умов вирощування. Частина досліджених локусів знаходилась у фазі «відштовхування» за нерівноваги за зчепленням.

У тестерних гібридів з Од 308 МВ маркерними є алелі SSR-локусів, молекулярна маса яких наведена нижнім індексом (у дужках зазначений рівень розвитку ознаки «урожайність зерна» у певних умовах вирощування):  $\rho$ i 044\_76 (2,68); пс 030\_112 (5,34);  $\rho$ i 057\_158 (4,25);  $\rho$ i 080\_158 (4,47);  $\rho$ i 044\_72 (4,63);  $\rho$ i 044\_76 (4,00);  $\rho$ i 064\_86 (3,38)  $\rho$ i 112\_161 (4,50);  $\rho$ i 112\_137 (4,00).

Виявлено маркери, що детектують мінливість дослідної ознаки у тестерних гібридів РІЛ  $F_4$  з Од 329:  $\rho$ i 031\_191 (3,68) пс 030\_108 (3,68); пс 030\_108 (5,36);  $\rho$ i 084\_155 (5,66);  $\rho$ i 083\_130 (3,56);  $\rho$ i 061\_80 (5,98);  $\rho$ i 064\_86 (3,57);  $\rho$ i 064\_78 (6,57);  $\rho$ i 112\_137 (4,41).

За результатами маркування проведено порівняння інформативності і маркуючої здатності маркерних локусів, що асоціювалися з рівнем розвитку ознаки «урожайність зерна», та виділено групи РІЛ  $F_4$ , які містять маркерні алелі в певних умовах вирощування (табл. 3).

Відомо, що внаслідок існування генетичної коадаптації певний алель або група алелів можуть підлягати позитивному добору в одних популяціях та негативному в інших. Максимально коадаптовані блоки алелів знаходяться у стані нерівноваги за зчепленням, тому ДНК-маркер і маркований QTL, який впливає на ознаку, можна «розпізнати» як той, що знаходиться у фазі «притягання».

Перевірка можливого зчеплення маркер — QTL була проведена шляхом аналізу успадковування ознаки від батьків до рекомбінантів  $F_4$ . Аналізували алелі маркерних локусів, що характерні для генотипів з більшим рівнем розвитку ознаки.

Прикладом може слугувати маркерний локус пс 03, за яким алель 112 п. н., що визначений у тестерних гібридів РІЛ  $F_4$ /Од 308 МВ (ДГ «Дачна», 2006 р.), відповідає більшому рівню розвитку ознаки і знаходиться у фазі «притягнення», тобто має «селективну вагу» 5,34 при  $P < 0,05$ . Фізичний зміст цього полягає у тому, що маркер і QTL розташовані досить близько у групі зчеплення і не рекомбінують. Отже, визначені і інші маркери, що зчеплені з QTL, які беруть участь у розвитку кількісної ознаки «урожайність зерна» кукурудзи і, імовірно, істотно впливають на певну частину її мінливості.

Певні маркерні локуси виявлені у однакових умовах вирощування РІЛ. Наприклад, у досліджених генотипах РІЛ  $F_4$  на ДГ «Дачна», 2005 р. виявлені маркерні алелі локусів  $\rho$ i 031\_187–191 та  $\rho$ i 080\_158–162, а в ДГ Новоселівське, 2006 р. — алелі локусу  $\rho$ i 112\_137–161. Максимальну різницю за ознакою «урожайність зерна» для тестерних гібридів з Од 308 МВ виявлено для генотипів «АА» і «аа» за локусами пс 030,  $\rho$ i 057,  $\rho$ i 064, а для тестерних гібридів з Од 329 — за локусами пс 030,  $\rho$ i 064.

Цікавим є той факт, що за локусами пс 030,  $\rho$ i 064 проводився добір з метою поліпшення популяції (ГК26 х Мо17)  $F_2$ – $F_3$  за 18 кількісними ознаками, зокрема й групи ознак продуктивності, і саме локус пс 030 маркував ознаки групи продуктивності «індивідуальна продуктивність»

та «маса 100 зерен» [13]. Тобто, у  $F_4$  не відбулося відокремлення цих локусів у ході рекомбінації. За даними авторів [7; 14; 15] це свідчить про те, що між цими локусами і QTL продуктивності встановився значний кореляційний зв'язок, і таке щільне зчеплення можна використовувати як надійний маркер для добору потенційно високопродуктивних форм. Щоб оцінити зміни, які відбуваються за добором, потрібно порівняти ознаки двох чи декількох поколінь.

Таблиця 3

Порівняння інформативності маркерних SSR-локусів у РІЛ  $F_4$ 

Умови вирощування, рік	Маркерні алелі SSR-локусів	Генотип та значення ознаки, т/га*	РІЛ
Од 308 МВ/РІЛ $F_4$			
Дачна, 2005	phi 044_76	AA (2,68)	4305, 4308
	phi 031_187–191	Aa (2,67)	4311, 4312
	phi 080_158–162	Aa (2,67)	4343, 4348
Дачна, 2006	nc 030_112	AA (5,34)	4300, 4308,
	phi 057_158	aa (4,25)	4316, 4344
	phi 112_137–161	Aa (4,53)	
Нововселівське, 2006	phi 044_76	AA (4,00)	4300, 4303,
	phi 044_72	aa (4,63)	4306, 4321,
	phi 112_161	AA (4,50)	4323, 4333,
	phi 112_137	aa (4,04)	4345, 4348
	phi 064_86	AA (3,38)	
	phi 080_158	aa (4,47)	
Од 329/РІЛ $F_4$			
Дачна, 2005	phi 031_191	AA (3,68)	5854, 5857,
	phi 031_187–191	Aa (3,39)	5860, 5872,
	phi 080_158–162	Aa (3,32)	5878, 5880,
	phi 083_130	AA (3,56)	5883, 5897,
	phi 064_78	aa (3,57)	5899
Дачна, 2006	phi 084_155	aa (5,66)	5851, 5852,
	phi 061_80	aa (5,98)	5876, 5893,
	phi 064_86	AA (6,57)	5892, 5897,
Нововселівське, 2006	nc 030_108	aa (3,89)	5852, 5856,
	nc 030_112	AA (5,36)	5857, 5860,
	phi 112_137	aa (4,41)	5880, 5885
	phi 112_137–161	Aa (5,22)	

Примітка: \* – наведені приклади генотипів з більшим рівнем розвитку ознаки «УЗ».

**Висновки.** Отже, у РІЛ  $F_4$  кукурудзи встановлено маркерні алелі SSR-локусів, які достовірно асоціюються з відмінностями у прояві кількісної ознаки «урожайність зерна», оскільки вони знаходяться у фазі «притягання» з алелями певних QTL ознаки. Виділені групи РІЛ  $F_4$ , які несуть маркерні алелі, що асоціюються з більшим рівнем розвитку озна-

ки «урожайність зерна» в аналогічних умовах вирощування. Цим самим продемонстрована можливість застосування ДНК-маркерів для добору генотипів за алелями маркерних локусів, що пов'язані з мінливістю ознаки «урожайність зерна». Отримання маркерів саме до локусів кількісних ознак відкриває перспективи прогнозування їхнього рівня розвитку у популяціях кукурудзи.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Guimaraes E. P., Ruane J., Schert B. D., Sonnino A., Dargie J. D. Marker-assisted selection. Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish // Food and agriculture organization of the united nations. — Rome, 2007. — 471 p.
2. Schrag T. A., Melchinger A. E. et al. Molecular marker-based prediction of hybrid performance in maize using unbalanced data from multiple experiments with factorial crosses // Theor. Appl. Genet. — 2009. — 118. — P. 741–751.
3. Schaeffer L. R. Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle // J. Anim. Breed. Genet. — 2006. — V. 123. — P. 218–223.
4. Jannink J., Lorenz A., Iwata H. Genomic selection in plant breeding: from theory to practice // Brief Funct Genomics. — 2010. — V. 9. — P. 166–177.
5. Albrecht T., Wimmer V., Auinger H.-J., Erbe M., Knaak C., Ouzunova M., Schön C.-C. Genome-based prediction of testcross values in maize // Theor. Appl. Genet. — 2011. — V. 123. — P. 339–350.
6. Tanksley S. Mapping polygenes // Annu. Rev. Genet. — 1993. — V. 27. — P. 205–233.
7. Животовский Л. А. Интеграция полигенных систем в популяциях. — Москва: Наука, 1984. — С. 27–46.
8. Belousov A. A., Sokolov V. M., Sivolap Y. M., Domenjuk V. P., Storcheus N. I. Heterosis of maize hybrids developed using DNA technologies // Acta Agronomica Hungarica. — Budapest, 2006. — P. 391–396.
9. Доменюк В. П., Белоусов А. А., Сиволап Ю. М. ДНК-маркирование количественных признаков кукурузы // Цитология и генетика. — 2002. — № 6. — С. 12–19.
10. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. — М.: Колос, 1973. — С. 156–163.
11. Burmeister M., di Sibio G., Cox D. R., Myers R. M. Identification of polymorphism by genomic denaturing-gradient-gel electrophoresis: application to the proximal region of human chromosome 21 // Nucleic Acids Res. — 1991. — V. 19. — P. 1475–1481.
12. Лакин Г. Ф. Биометрия. — Москва: Высшая школа, 1990. — С. 23–92.
13. Mather K., Jinks J. Biometrical genetics. — Cambridge: Univ. Pres, 1982. — 396 p.
14. Созинов А. А., Попереля Ф. А. Полиморфизм проламинов и селекция // Вести с.-х. науки. — 1979. — Т. 10. — С. 21–34.
15. Mackay T. F. C. The genetics of quantitative traits: challenges and prospects / T. F. C. Mackay, E. A. Stone, J. F. Ayroles // Nature Rev. — 2009. — V. 10. — P. 565–577.



UDC 633.15:631.524:575.113:542.1

**Bukreyeva N. I., Belousov A. O., Sivolap Yu. M.** Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

### **SSR-MARKING QTL OF MAIZE GRAIN YIELD**

SSR-analysis method was used for marking quantitative trait loci (QTL) that determined a development of maize «grain yield» trait. Specific marker alleles were established to be related with certain levels of polygenic trait phenotype evincement. Criteria of marker loci informative ability are discussed. Determining of marker alleles linked with necessary for breeding trait value allowed a possibility of selection of valuable genotypes. Marker ability was established in different environmental conditions.

УДК 633.15:631.524:575.113:542.1

**Букреева Н. И., Белоусов А. А., Сиволап Ю. М.**

### **SSR-МАРКИРОВАНИЕ QTL ПРИЗНАКА «УРОЖАЙНОСТЬ ЗЕРНА» У КУКУРУЗЫ**

Для маркирования локусов количественных признаков (QTL), отвечающих за развитие признака «урожайность зерна» кукурузы, использован метод SSR-анализа. Установлена специфичность аллелей маркерных локусов для определенных уровней фенотипического проявления полигенного признака. Обсуждаются критерии информативности маркерных локусов. Показана возможность отбора ценных генотипов на основе определения аллелей маркерных локусов, связанных с необходимыми для селекции значениями признаков. Маркирующая способность проверена в разных условиях выращивания кукурузы.