

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДУ ІНСТИТУТ СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА СТЕПОВОЇ ЗОНИ

БОРИСОВА ВІКТОРІЯ ВІКТОРІВНА

УДК 633.15:631.527.8

СЕЛЕКЦІЙНІ АСПЕКТИ
ЗАСТОСУВАННЯ SNP-АНАЛІЗУ У КУКУРУДЗИ

06.01.05 – селекція і насінництво

АВТОРЕФЕРАТ дисертації
на здобуття наукового ступеня
кандидата сільськогосподарських наук

Дніпропетровськ – 2014

Дисертацією є рукопис Робота виконана в Державній установі Інститут сільського господарства степової зони НААН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Сатарова Тетяна Миколаївна,
Державна установа Інститут сільського господарства
степової зони НААН України, завідувач лабораторії
біотехнології, фізіології та методів селекції

Офіційні опоненти: доктор сільськогосподарських наук, професор
Лавриненко Юрій Олександрович,
Інститут зрошуваного землеробства НААН України,
заступник директора з наукової роботи, завідувач
відділу селекції

кандидат сільськогосподарських наук, старший науко-
вий співробітник Чернобай Лариса Миколаївна,
Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН
України, завідувач лабораторії селекції і насінництва
кукурудзи

Захист дисертації відбудеться «30» січня 2015 р. о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 08.353.01 ДУ Інститут сільського господарства степової зони НААН України за адресою: 49027, м. Дніпропетровськ, вул. Дзержинського, 14.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ Інститут сільського господарства степової зони НААН України (м. Дніпропетровськ, вул. Дзержинського, 14).

Автореферат розісланий «___» _____ 201 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 08.353.01



М. Я. Кирпа

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ Актуальність

теми. На сучасному етапі в селекції кукурудзи широко

впроваджуються новітні методи оцінки та добору селекційного матеріалу, які базуються на аналізі молекулярно-генетичного поліморфізму ДНК. Такий підхід дозволяє проводити моніторинг генетичної структури селекційних зразків незалежно від впливу умов вирощування. В рамках нового напрямку селекції – маркер-асоційованої селекції (MAS) – використання молекулярних маркерів є перспективним для встановлення спорідненості селекційних зразків, прогнозування ступеня гетерозису, маркування цінних господарських ознак та оптимізації інших ланок селекційного процесу (Collard, Mackill, 2008). В селекції кукурудзи в Україні вже впроваджені такі молекулярно-генетичні методи як аналіз довжини фрагментів рестрикції та полімеразної ланцюгової реакції. Ці методи оцінюють різноманіття селекційного матеріалу, яке головним чином пов'язане з мутаційними перебудовами хромосомного типу. Тонкі зміни в структурі ДНК, а саме точкові нуклеотидні заміни, більш точно дозволяє контролювати інший молекулярно-генетичний метод – SNP-аналіз. Однонуклеотидний поліморфізм ДНК (single nucleotide polymorphism, SNP) широко розповсюджений у кукурудзи. Різні підвиди та типи зародкової плазми кукурудзи суттєво розрізняються за інтенсивністю та кінцевим обсягом однонуклеотидних заміни (Frascaroli et al., 2013), що є підґрунтям для використання SNP-аналізу в селекційному процесі.

Дослідження характеру однонуклеотидного поліморфізму селекційного матеріалу в світовій селекційній практиці знаходяться на початковій стадії і зовсім відсутні в Україні. Для розробки принципів застосування SNP-аналізу в селекції кукурудзи необхідним є генотипування значної кількості вітчизняних селекційних зразків. Нез'ясованими лишаються місце і роль методу SNP в схемі гетерозисної селекції, особливості його застосування у маркуванні цінних господарських ознак. У зв'язку з цим дослідження селекційних аспектів SNP-аналізу у кукурудзи та оцінка його потенційних можливостей для підвищення ефективності створення ліній і гібридів є актуальними.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана у 2010-2013 рр. в лабораторії біотехнології, фізіології та методів селекції ДУ Інститут сільського господарства степової зони НААН України у межах держбюджетної теми «Провести молекулярно-біологічну паспортизацію вихідного та елітного селекційного матеріалу для гетерозисної селекції кукурудзи та визначити закономірності зміни генетичних дистанцій в процесі штучного добору», номер держ. реєстрації 0111U004725.

Мета та задачі дослідження. Метою дослідження було розроблення методичних принципів застосування аналізу однонуклеотидного поліморфізму ДНК за SNP-маркерами для оптимізації селекційного процесу у кукурудзи. Для досягнення мети були поставлені наступні задачі:

- провести SNP-генотипування ліній кукурудзи та створити електронну базу даних одонуклеотидного поліморфізму селекційного матеріалу;
- визначити ступінь репрезентативності та інформативності SNP-маркерів у ліній кукурудзи вітчизняної селекції;
- оцінити можливості використання SNP-генотипування для паспортизації та реєстрації ліній кукурудзи;
- розробити принципи застосування SNP-аналізу для моніторингу генетичної структури селекційного матеріалу в процесі створення ліній кукурудзи;
- розрахувати генетичні дистанції за SNP-маркерами між лініями різних типів зародкової плазми та оцінити їх значення у прогнозуванні гетерозису;
- провести кластеризацію ліній кукурудзи за результатами SNP-аналізу;
- розробити принципи маркування селекційних ознак кукурудзи з використанням SNP-маркерів;
- на основі методологічних принципів аналізу одонуклеотидного поліморфізму ДНК оптимізувати схему селекційного процесу кукурудзи.

Об'єкт досліджень – оптимізація селекційного процесу у кукурудзи із застосуванням молекулярно-генетичних методів.

Предмет – розробка методичних принципів застосування аналізу одонуклеотидного поліморфізму ДНК в селекційному процесі кукурудзи.

Методи дослідження. При виконанні дисертаційної роботи використано такі методи: молекулярно-генетична оцінка селекційного матеріалу (для визначення алейного стану SNP-маркерів та генетичної структури селекційних зразків); методи традиційної селекції – гібридизацію, інбридинг, аналіз за діалельною схемою (для отримання та розмноження ліній, створення сестринських і простих гібридів, розрахунку показників гетерозису); метод польових досліджень (для вирощування селекційних зразків, фенологічних спостережень, реєстрації фенотипових ознак, обліку врожаю); методи маркер-асоційованої селекції (для пошуку SNP-маркерів альтернативного прояву селекційних ознак); статистичні методи (для статистичного оброблення результатів, розрахунку генетичних дистанцій, побудови дендрограм).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше в Україні доведено можливість використання одонуклеотидного поліморфізму ДНК у рослин для характеристики селекційного матеріалу. Проведено SNP-генотипування 450 ліній кукурудзи вітчизняної селекції, визначено репрезентативність та інформативність SNP-маркерів. Доведено, що моніторинг генетичної структури ліній кукурудзи в процесі їх створення доцільно проводити за зміною алейного стану маркерних локусів ДНК. Вперше встановлено характер зміни генетичних SNP-дистанцій між вихідними формами та створеними на їх базі лініями, сестринськими і простими гібридами. Розроблено методичні принципи SNP-маркування фенотипових ознак. Набула подальшого удосконалення на основі методологічних принципів аналізу одонуклеотидного поліморфізму ДНК загальна схема селекційного процесу кукурудзи.

Практичне значення одержаних результатів. Для використання в селекційному процесі складено молекулярно-генетичні SNP-паспорти 941 лінії кукурудзи, що сприятиме переходу від селекції за фенотипом до селекції за генотипом, охороні авторських прав. Визначено перелік SNP-маркерів, інформативних для вітчизняного селекційного генофонду кукурудзи, побудовано дендрограму взаємозв'язків між лініями та надані рекомендації щодо їх використання для добору батьківських пар гібридів. На основі аналізу SNP-дистанцій лінії ДК411, МС375, ДК5, К2048, ДК301, ДК744, ДК275, ДК257-7, ДК772, ДК257, ДК274-3, УГ-6, МС361 та ДК216 рекомендовано до використання в сестринських гібридах. Запропоновано рівняння регресії для прогнозування рівня гетерозису у гібридів за розміром SNP-дистанцій між батьківськими формами. Розроблено методику SNP-маркування селекційних ознак та визначено гаплотипи, які маркують аналоги-відновлювачі фертильності і альтернативний прояв ознак «колір стрижня качана» та «тип зернівки». Розроблено оптимізовану технологію селекційного процесу кукурудзи з використанням SNP-аналізу, в результаті впровадження якої за участю автора створено і передано на державне сортопробування гібриди ДМС1511, ДМ Вікторія, РедВайн, ДМ Нейтів та ДМ Вінсенте.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем особисто підготовлено огляд літератури, проведено польові та лабораторні дослідження, статистичну обробку, аналіз отриманих даних. Планування роботи та узагальнення результатів виконано разом з науковим керівником. Авторство в наукових працях, опублікованих у співавторстві, складає 15-70% і полягає в плануванні і виконанні експериментальної частини роботи, узагальненні результатів і написанні статей, тез та методичних рекомендацій. Частка авторства у переданих на держсортпробування гібридах кукурудзи становить по 5%.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень заслухано та обговорено на VI міжнародній конференції «Современная биотехнология сельскохозяйственных растений и биобезопасность (Геном растений VI)» (Одеса, 2010), III Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, 2014), Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених і спеціалістів «Стратегічні напрями сталого виробництва сільськогосподарської продукції на сучасному етапі розвитку аграрного комплексу України» (Дніпропетровськ, 2014), засіданнях науково-методичної ради ДУ Інститут сільського господарства степової зони НААН.

Публікації. Основний зміст дисертації викладений у 16 наукових працях, з яких 5 статей опубліковані у виданнях України, фахових для галузі сільськогосподарських наук, 2 статті надруковані в закордонних фахових виданнях, 5 тез доповідей та матеріалів наукових конференцій, 4 методичні видання.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 230 сторінках комп'ютерного тексту і складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів, 5 розділів результатів досліджень, висновків, практичних рекомендацій та 5 додатків. Список використаних джерел включає 196 найменувань, серед них 120 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ Огляд літератури.

Наведено характеристику інноваційних методів селекції на основі геномного аналізу, методів вивчення генетичного поліморфізму та їх використання в маркер-асоційованій селекції. Проаналізовано результати досліджень одонуклеотидного поліморфізму селекційного матеріалу кукурудзи.

Умови, матеріали та методи дослідження. Дослідження проводили у 2010-2013 рр. Дослідні ділянки були розташовані у Дніпропетровському та Синельниківському районах Дніпропетровської області, які знаходяться в північній підзоні Степу України. Найбільш сприятливими для вирощування кукурудзи виявилися 2011 та 2013 рр.

Матеріалом для дослідження слугували 450 ліній кукурудзи (*Zea mays* L.) селекції ДУ ІСГ СЗ НААН та НВФГ «Компанія «Маїс»». Лінії, відібрані для генотипування, були створені шляхом кумулятивної селекції в північній підзоні Степу України. Для SNP-аналізу також було використано відкриту інформацію, надану фірмою BioDiagnostics, Inc. (США), стосовно результатів генотипування 491 лінії північно-американської та європейської селекції. Для використання SNP-аналізу у прогнозуванні гетерозису в дослідженнях були включені сестринські гібриди, отримані від схрещування споріднених батьківських ліній (на основі плазми Айодент), та прості гібриди, створені на основі неспоріднених батьківських ліній (на основі плазми Айодент та інших зародкових плазм).

Польові дослідження проводили відповідно до Методичних рекомендацій для польового та лабораторного вивчення генетичних ресурсів кукурудзи (2003). SNP-генотипування ліній кукурудзи проводили з використанням GoldenGate тесту та системи зчитування результатів Illumina VeraCode (Fan, 2006; www.illumina.com) на базі фірми BioDiagnostics, Inc. (США). В роботі використано розроблену фірмою BioDiagnostics, Inc. панель BDI-III з 384 SNP-маркерів. SNP-генотипування зразків ДНК проведено в повністю автоматизованому режимі на обладнанні Illumina BeadStation 500 G. Повторність для кожного маркера – 30-разова. Аналіз генетичної структури ліній проводили згідно програми STRUCTURE (Pritchard et al., 2010) за змішаною моделлю походження особин та моделлю корельованої частоти алелів. Кластеризацію досліджених ліній та побудову дендрограм виконано за алгоритмом ієрархічного кластерного аналізу (Ward, 1963). Статистичну обробку експериментальних даних виконано за (Доспехов, 1985; Атраментова, Утєвська, 2007).

ХАРАКТЕРИСТИКА РЕПРЕЗЕНТАТИВНОСТІ SNP-МАРКЕРІВ У ЛІНІЙ КУКУРУДЗИ

Біоінформаційна характеристика геному кукурудзи у зв'язку з проведенням SNP-аналізу. Встановлено, що середня щільність локалізації SNP-маркерів панелі BDI-III в геномі кукурудзи становить 1 на 5,36 Mbp. Ідентифіковано зчеплені маркери, відстань між якими менша за 5 cM. Дослідження алейного стану тісно зчеплених маркерів у ліній української селекції засвідчило, що порушення співвідношення частот їх алелів починається з відстані 24-27 нуклеотидів. Однак, на більших відстанях, в діапазоні від 44 до 2013 нуклеотидів існують як тісно зчеплені маркери з абсолютним співпадінням частот алелів, так і пари маркерів з порушенням співпадіння більше, ніж на 20%, що є доказом інтенсивного рекомбінаційного процесу.

Репрезентативність та інформативність маркерів одонуклеотидного поліморфізму ДНК при характеристиці ліній вітчизняного селекційного генотипу кукурудзи. З 384 використаних

SNP-маркерів панелі BDI-III сигнал детекції достатньої сили при дослідженні всієї вибірки вітчизняних ліній отримано для 367 маркерів (95,6%), диморфний стан мали 98,6% маркерів. Середня «частота пропущених даних» становила лише 6,3 % на 1 маркер, що є достатнім для загальної характеристики набору ліній. Середнє значення частоти мінорних алелів (MAF) диморфних маркерів склало $0,3147 \pm 0,0127$. Значна кількість використаних маркерів виявила частоту мінорних алелів в діапазоні 0,4000-0,4999. $MAF > 0,2$, тобто нормальну частоту алелів мали 79,3 % маркерів. Показник зсуву генного різноманіття для досліджених SNP-маркерів варіює в межах $0 \div 0,5000$ з середнім значенням $0,3971 \pm 0,0120$, а індекс інформативності маркерів (PIC) – від 0 до 0,375 з середнім значенням $0,3114 \pm 0,0083$. 83,4% SNP-маркерів долають значення $PIC = 0,25$, критичне для високоякісних інформативних SNP-маркерів.

В маркерних локусах дослідженого набору ліній кукурудзи вітчизняної селекції домінують пуринові нуклеотиди, азотистими основами яких є аденін (А) та гуанін (Г). Значно меншу частку становлять нуклеотиди, азотистою основою яких є цитозин (Ц), та зовсім незначну – тимін (Т) (піримідинові нуклеотиди). Найбільш поширеними типами одонуклеотидних замін є транзиції пуринових нуклеотидів $A \leftrightarrow G$ (63,2%), тоді як транзиції піримідинових нуклеотидів $C \leftrightarrow T$ зовсім не зустрічаються. Серед трансверсій частіше реєструються трансверсії цитозину, ніж тиміну, причому для останнього заміни на гуанін у вітчизняному селекційному матеріалі взагалі не виявлені.

Комплексний аналіз інформації, наведеної в даному підрозділі, дозволив ідентифікувати 337 інформативних (91,8%) та 265 інформативних високоякісних (72,2%) SNP-маркерів та рекомендувати їх до використання для характеристики селекційного матеріалу кукурудзи в Україні (перелік наведено в дисертаційній роботі).

SNP-АНАЛІЗ ЛІНІЙ КУКУРУДЗИ

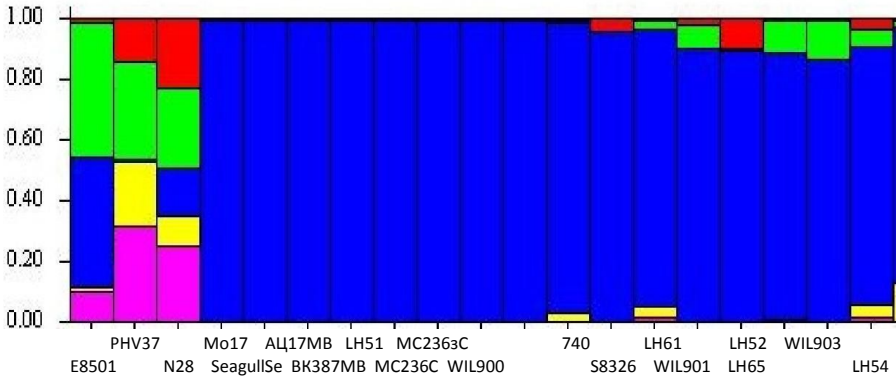
Використання SNP-аналізу для ДНК-паспортизації ліній кукурудзи.

Нами складено SNP-паспорти 941 лінії кукурудзи для використання в практичній селекції при оцінці ступеня новизни створених ліній, захисті авторських прав, а також для розробки методологічних принципів реєстрації ліній та гібридів кукурудзи за алельним станом маркерів однонуклеотидного поліморфізму.

Комплекс ліній кукурудзи вітчизняної селекції за результатами SNP-аналізу характеризується середнім ступенем генного різноманіття (0,1750) з варіюванням у вузьких межах (0,1634÷0,1974), суттєвою відмінністю за частотами маркерних SNP-алелів від ліній закордонної селекції і слабкішою, ніж останні, варіабельністю за діапазоном генетичних дистанцій між лініями.

Державна реєстрація ліній кукурудзи здійснюється згідно з Методикою проведення експертизи сортів кукурудзи звичайної (*Zea mays* L.) на відмінність, однорідність і стабільність (ВОС-тест) (2003). З генетичної точки зору однорідність та стабільність ліній кукурудзи визначається ступенем їх гомозиготності. Гетерозиготність вітчизняних самозапилених ліній за SNP-маркерами становила 0,20%, що є свідченням високої гомозиготності (99,80%) та правомірності реєстрації їх як ліній. При аналізі 36 ліній кореляційний зв'язок між попарними дистанціями за порівнянням морфологічних ознак, зазначених в «Описах ліній» ВОС-тесту, і SNP-дистанціями не було встановлено. Так, для лінії ДК273МВ, яка за балами ВОС-анкети значно, на 75,76%, відрізняється від лінії 274СВ, генетична дистанція становить 0,3966 (39,66%). Проте, лінія АЦ10МВ, яка найменше (на 32,35%) відрізняється від 274СВ морфологічно, за станом генетичних SNP-маркерів має з нею навіть більшу дистанцію в 0,4192 (41,92%). Отримані дані доводять, що визначення відмінності при ВОС-порівнянні ліній за морфологічними ознаками є надто умовним, і дозволяють рекомендувати для цього молекулярно-генетичні характеристики, зокрема алельний стан комплексу SNP-маркерів.

Аналіз внеску предкових популяцій в генетичну структуру ліній кукурудзи української селекції. Аналіз генетичної структури популяції досліджених ліній за алельним станом SNP-маркерів дозволив розділити їх на $k=5$ основних груп (рис. 1). Для кожної з досліджених ліній розраховані коефіцієнти приналежності (Q) для ідентифікації по відношенню до тієї чи іншої групи. Для групи 1 найбільш типовою виявилася лінія В73 ($Q=0,998$), для групи 2 – лінія Оh43 ($Q=0,989$), для групи 3 – Мо17 ($Q=0,998$), для групи 4 – Р165 ($Q=0,998$), для групи 5 – В14 ($Q=0,997$). Найбільш типові лінії одночасно представляють певні типи та підтипи зародкової плазми кукурудзи. З цієї причини їх SNP-профілі, подані у сформованій нами електронній базі SNP-паспортів, рекомендовано розглядати як стандарти для відповідних типів та підтипів зародкової плазми.



Примітка. Кожен стовпчик відповідає одній лінії; різні кольори представляють різні групи: група 1 (B73) позначена червоним, група 2 (Oh43) – зеленим, група 3 (Mo17) – синім, група 4 (P165) – жовтим, група 5 (B14) – рожевим кольором; частка кожної групи в генотипі лінії показана часткою забарвлення певним кольором.

Рис. 1. Генетична структура окремих ліній кукурудзи за коефіцієнтами приналежності (Q), розрахованими за результатами SNP-аналізу

Серед вивченого набору вітчизняних ліній найбільшою часткою алелів, характерних для групи 1 (B73), володіли лінії K4, K43C, BK759, для групи 2 (Oh43) – MC17C, Дн2, K325MB, для групи 3 (Mo17) – AC17MB, BK387MB, MC236C, для групи 4 (P165) – P165, MC165MB, ДК411М, для групи 5 (B14) – жодна.

Аналіз внеску предкових популяцій у генотип сучасних ліній на прикладі ДК2/427, ДК272, ДК296, ДК231 та ДК236 дозволив встановити різноспрямованість зміни генетичної структури селекційного матеріалу в процесі їх створення. Так, при самозапиленні гібридів, батьківські форми яких споріднені до групи 2 (Oh43) та групи 4 (P165), в лінії-нащадку суттєво (на 75,7-91,2%), превалюють генні комплекси групи 2 (Oh43). При інбридингу гібридів, створених на основі генетичного матеріалу, спорідненого до групи 3 (Mo17) та групи 4 (P165) в лінії-нащадку суттєво (на 78,5-99,1%) переважають генні комплекси групи 3 (Mo17). Разом з тим, при використанні як вихідного матеріалу гібридів, які поєднують форми, що походять від груп 2 (Oh43) і 3 (Mo17), відбувається змішування генних комплексів цих двох груп. Таким чином, оцінка генетичної структури ліній за результатами SNP-аналізу дозволяє контролювати напрямок зміни та співвідношення часток генетичного матеріалу різного походження в процесі створення ліній та рекомендувати цей метод для моніторингу процесу рекомбінації та доборів у селекції.

ПОПАРНІ SNP-ДИСТАНЦІЇ МІЖ ЛІНІЯМИ КУКУРУДЗИ ТА СЕЛЕКЦІЯ НА ГЕТЕРОЗИС

Загальна характеристика попарних генетичних дистанцій, визначених за SNP-маркерами, для ліній кукурудзи вітчизняної та зарубіжної селекції. Аналіз вибірки ліній кукурудзи української селекції не виявив суттєвих відмінностей від розширеного набору зарубіжних ліній за розподілом нуклеотидів ДНК в маркерних SNP-сайтах. Ліміти генетичних дистанцій обох наборів вкладаються в діапазон 0,0020-0,7999, але вибірка світових ліній більш варіабельна за цим параметром (0,0028-0,7549), ніж вітчизняні лінії (0,0028-0,7021). Модальним класом генетичних дистанцій для обох наборів є клас 0,4000-0,4999, куди потрапляють, відповідно, 58,13 та 60,67% проаналізованих ліній.

Кластеризація ліній і зародкових плазм кукурудзи на основі аналізу однонуклеотидного поліморфізму. Кластеризація набору українських та зарубіжних ліній кукурудзи за SNP-маркерами дозволила виділити 8 основних кластерів, які відповідають основним типам зародкової плазми. На рис. 2, як приклад, наведено фрагмент дендрограми кластера 1 (Mo17).

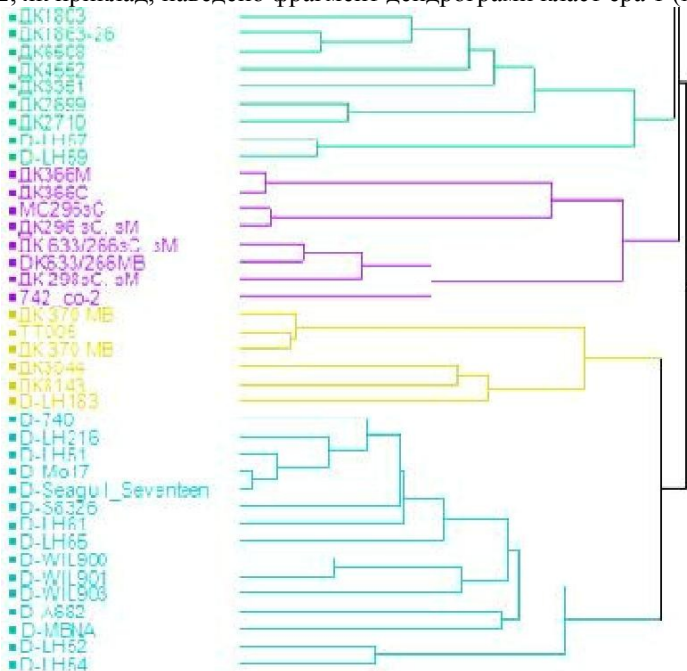


Рис. 2. Фрагмент дендрограми ліній кукурудзи в кластері 1 (Mo17)

Вітчизняний селекційний генофонд представлений: у кластері 1 (Мо17) 51 лінією, серед яких такі, широко представлені в робочих колекціях та перспективні для використання в гібридах, як ДК1803, ДК366М, ДК370МВ та ін.; у кластері 2 (Oh43) – 39 лініями, серед яких МС65, ДК680, Дн2 та ін.; у кластері 3 (F2) – 67 лініями, серед них МС48, ДК270, ДК272 та ін.; у кластері 4 (KG232) – 30 лініями, серед яких ДК232, ДК720МВ, МС814МВ та ін.; у кластері 5 (Дн3М) – 104 лініями, серед них – МС381СВ, ВІК3 та ін.; у кластері 6 (D_4722) – жодною українською лінією; у кластері 7 (В73) – 41 лінією, серед них МС1423, ДК2377зМ, ВК387 та ін.; у кластері 8 (D_207) – 111 лініями, серед яких ДК248зМСВ, ДК411зМ, ВІК16 та ін.

Результати кластеризації рекомендовано використовувати в селекційному процесі для визначення приналежності ліній до певного типу зародкової плазми.

Генетичні SNP-дистанції та врожайність сестринських і простих гібридів кукурудзи. В таблицях 1, 2 представлено результати аналізу генетичних дистанцій та врожайності: сестринських гібридів ліній, які ведуть свій родо-від виключно від плазми Айодент (позначені в таблицях як група 1); сестринських гібридів, отриманих від схрещування ліній, які в своєму геномі мали плазму Айодент і генетичний матеріал ліній В73, ДК247, PLS61, синтетика SSS і плазми Європейська кремениста (група 2); простих гібридів, в яких одна з батьківських ліній належала виключно до плазми Айодент, інша – до будь-якого іншого типу плазми (група 3); простих гібридів, в яких одна чи обидві батьківські форми – це лінії з певною часткою в родоводі плазми Айодент і генетичного матеріалу інших типів зародкових плазм (група 4). Сестринські гібриди кукурудзи, батьківські форми яких споріднені за генетичним походженням, характеризувалися значеннями попарних SNP-дистанцій на рівні 0,01-0,28, тоді як у простих гібридів даний показник зростав до 0,34-0,50 (табл. 1). Рівень гетерозису у гібридів за врожайністю зерна підвищувався при введенні в їх батьківські форми матеріалу з широкою генетичною основою (табл. 2).

Таблиця 1 – Варіювання попарних генетичних дистанцій, визначених за SNP-аналізом, у гібридів кукурудзи, створених на основі плазми Айодент

Показник	Сестринські гібриди		Прості гібриди	
	Група 1	Група 2	Група 3	Група 4
n	19	23	20	23
Середнє	0,19±0,03	0,43±0,02	0,43±0,01	0,43±0,02
Lim	0,01÷0,28	0,34÷0,50	0,38 ÷0,45	0,34÷0,50
V, %	37,4±12,7	12,4±3,7	4,3±1,4	12,4±3,7

Таблиця 2 – Гетерозис за врожайністю гібридів кукурудзи, отриманих за участі плазми Айодент

Показник	Істинний гетерозис, %		Гіпотетичний гетерозис, %		Конкурсний гетерозис, %	
Сестринські гібриди						
	Група 1	Група 2	Група 1	Група 2	Група 1	Група 2
n	19	26	19	26	–	–
Середнє	22,2±14,3	41,5±10,5	41,9±15,7	69,5±13,1	–	–
Lim	-24,7÷99,2	7,7÷110,6	-15,4÷84,6	16,1÷116,2	–	–
V, %	134,1±45,7	62,3±18,1	77,7±26,5	46,5±13,5	–	–
Прості гібриди						
	Група 3	Група 4	Група 3	Група 4	Група 3	Група 4
n	27	42	27	42	27	42
Середнє	84,1±28,1	65,0 ±8,1	122,6±33,2	92,4±9,5	-4,8±3,2	-7,5±2,6
Lim	12,7÷350,8	12,8÷158,3	37,9÷416,8	50,5÷183,9	-21,0÷11,3	-24,5÷10,4
V, %	84,5±23,0	39,9±8,7	68,5±18,6	33,1±7,2	170,6±46,4	110,7±24,2

На прикладі лінії P165 зародкової плазми Айодент та споріднених ліній ДК411, МС375, ДК5, К2048, ДК301, ДК744, ДК275, ДК257-7, ДК772, ДК257, ДК274-3, УГ-6, МС361, ДК216 було розглянуто зміну попарних SNP-дистанцій і визначено, що вони знаходилися в діапазоні 0,0724-0,2428, відрізнялись значною різноманітністю, але не виходили за межу 0,30. Це вказує на можливість використання даних ліній в селекції для отримання різних типів сестринських гібридів.

Встановлено, що в процесі створення ліній SNP-дистанції між самозапиленими сім'ями послідовних генерацій зменшуються від 0,40 до 0,20 та відрізняються для ліній, отриманих з однієї сім'ї, на відстань близько 0,11.

SNP-дистанції та прогнозування гетерозису. Встановлено, що детермінація таких селекційних ознак, як вологість зерна при збиранні, врожайність зерна, гіпотетичний та істинний гетерозис за врожайністю зерна залежно від генетичних дистанцій, визначених за SNP-маркерами панелі BDI-III, становила 59,3-81,7 %. Решта варіювання досліджуваних ознак пов'язана з іншими факторами як зовнішнього, так і внутрішнього генетичного середовища. На прикладі гібридів, отриманих за діалельною схемою від схрещування ліній 3737MB, K483M, ДК2963C, ДК2573M, ДК3773C та K43C, розраховано рівняння регресії, які дозволяють прогнозувати прояв селекційних ознак та гетерозис, виходячи з розміру SNP-дистанцій в діапазоні 0,25-0,50 (табл. 3).

Таблиця 3 – Рівняння регресії для прогнозування гетерозису за SNP-дистанціями

Ознака	Рівняння регресії	R^2
Вологість зерна, %	$y=25,0x+7,4$	0,65
Врожайність зерна, т/га	$y=8,0x+0,7$	0,82
Гіпотетичний гетерозис за врожайністю зерна, %	$y=1596,2x-238,7$	0,59
Істинний гетерозис за врожайністю зерна, %	$y=982,0x-80,2$	0,64

Встановлено, що на взаємозв'язок SNP-дистанцій і таких селекційних ознак, як вологість і врожайність зерна, гіпотетичний та істинний гетерозис за врожайністю зерна не впливає суттєво рівень ознаки у батьківських форм гібридів.

МАРКУВАННЯ ОЗНАК ОКРЕМИХ ГРУП ЛІНІЙ КУКУРУДЗИ ЗА РЕЗУЛЬТАТАМИ SNP-АНАЛІЗУ

SNP-аналіз стерильних аналогів та аналогів-відновлювачів фертильності ліній кукурудзи. При аналізі ліній P502, ДК411, ДК742, Дн2, ВК377, ДК2/427, К4, ДК257, ДК247 і МС236 встановлено, що генетичні дистанції за SNP-маркерами між вихідними лініями та їх стерильними аналогами досягають нуля при достатній кількості зворотних схрещувань (7-8). Аналоги-відновлювачі фертильності мають залишкові дистанції відносно вихідних ліній на рівні 0,55-4,83%. SNP-паспорти ліній, їх стерильних аналогів та відновлювачів фертильності рекомендовано використовувати для оцінки і контролю сортової чистоти в насінництві. Для попереднього скринінгу відновлювачів фертильності молдавського типу рекомендовано використання маркерів зі зміною алельного стану BD-III-93 Г→А та BD-III-94 А→Ц.

Маркування ознак за результатами SNP-аналізу. Нами розроблені методичні прийоми SNP-маркування ознак кукурудзи через визначення зв'язку між алельним станом SNP-маркерів панелі BDI-III та їх фенотиповим проявом на прикладі ознак «колір стрижня качана» та «тип зернівки». Ідентифіковано по 10 *top*-маркерів, які характеризуються найрізкішою зміною частоти мажорного алеля при переході від вихідної до похідної групи ліній.

Формула гаплотипу кукурудзи з ознакою червоного стрижня качана за переліком мажорних алелів SNP-маркерів панелі BDI-III визначена як 332А, 148А, 147А, 315Г, 261Г, 328Т, 15Г, 287Г, 282Г, 277Г, а формула гаплотипу з ознакою білого стрижня як 332Г, 148Г, 147Г, 315А, 261А, 328А, 15А, 287А, 282А, 277А. Визначені гаплотипи рекомендовано використовувати для розподілу сімей за кольором стрижня.

За результатами SNP-маркування формула гаплотипу кукурудзи з ознакою кременистого типу зернівки за переліком мажорних алелів визначена як 297А, 172Ц, 282А, 287А, 25Ц, 106Г, 229Г, 332Г, 168А, 20Г, а формула гаплотипу кукурудзи із зубоподібним типом зернівки як 297Г, 172А, 282Г, 287Г,

25Г, 106АГ, 229А, 332А, 168Г, 20А. В таблиці 4 наведено зміни частот мажор-ного алеля за десятима *top*-SNP-маркерами при переході від кременистої до зубоподібної кукурудзи через проміжну групу.

Таблиця 4 – Зміна частот *top*-SNP-алелів від кременистої до зубоподібної групи кукурудзи

SNP-маркер	Кремениста	Проміжна	Зубоподібна
297АГ	A=0,86±0,07 ^а	A=0,59±0,13 ^в	A=0,43±0,07 ^в
172АЦ	Ц=0,75±0,11 ^а	Ц=0,53±0,13 ^{ав}	Ц=0,35±0,07 ^в
282АГ	A=0,75±0,11 ^а	A=0,64±0,12 ^а	A=0,38±0,07 ^в
287АГ	A=0,74±0,11 ^а	A=0,64±0,12 ^а	A=0,38±0,07 ^в
25ГЦ	Ц=0,85±0,09 ^а	Ц=0,69±0,12 ^а	Ц=0,49±0,07 ^в
106АГ	Г=0,83±0,13 ^а	Г=0,50±0,18 ^в	Г=0,51±0,13 ^в
229АГ	Г=0,66±0,10 ^а	Г=0,43±0,13 ^в	Г=0,34±0,07 ^в
332АГ	Г=0,68±0,12 ^а	Г=0,37±0,12 ^в	Г=0,37±0,07 ^в
168АГ	A=0,53±0,10 ^а	A=0,31±0,12 ^{ав}	A=0,22±0,06 ^в
20АГ	Г=0,76±0,10 ^а	Г=0,62±0,13 ^{ав}	Г=0,45±0,07 ^в
Середнє	0,74±0,11 ^а	0,53±0,13 ^{ав}	0,39±0,08 ^в

Примітка. *Значення частот алелів за конкретним маркером з однаковою літерою недостатньо розрізняються на рівні значущості 0,05.

Як бачимо, частоти алелів у проміжній групі за *top*-маркерами займають перехідне положення між групами кременистої і зубоподібної кукурудзи, що підтверджує правильність обрання саме виділених маркерів і дозволяє використовувати виділені гаплотиби в селекції при відборах за типом зернівки.

УЗАГАЛЬНЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ СЕЛЕКЦІЙНИХ АСПЕКТІВ SNP-АНАЛІЗУ КУКУРУДЗИ

Сучасний рівень розвитку молекулярно-генетичних методів аналізу селекційного матеріалу дозволяє запропонувати не тільки його масове ДНК-генотипування, але і розробити прийоми і методи, які здатні забезпечити суттєве підвищення ефективності селекційного процесу. Проведений скринінг можливостей SNP-аналізу засвідчив ефективність його використання в гетерозисній селекції для таких технологічних операцій, як створення нових ліній; прогнозування ефективного добору батьківських компонентів гібридів; маркування цінних господарських ознак для прогнозування їх фенотипового прояву; паспортизація, ідентифікація та реєстрація ліній кукурудзи для захисту авторських прав; визначення відмінності, однорідності та стабільності ліній. Розробка селекційних аспектів SNP-аналізу дозволила провести оптимізацію загальної схеми гетерозисної селекції кукурудзи з використанням маркерів однонуклеотидного поліморфізму (рис. 3).

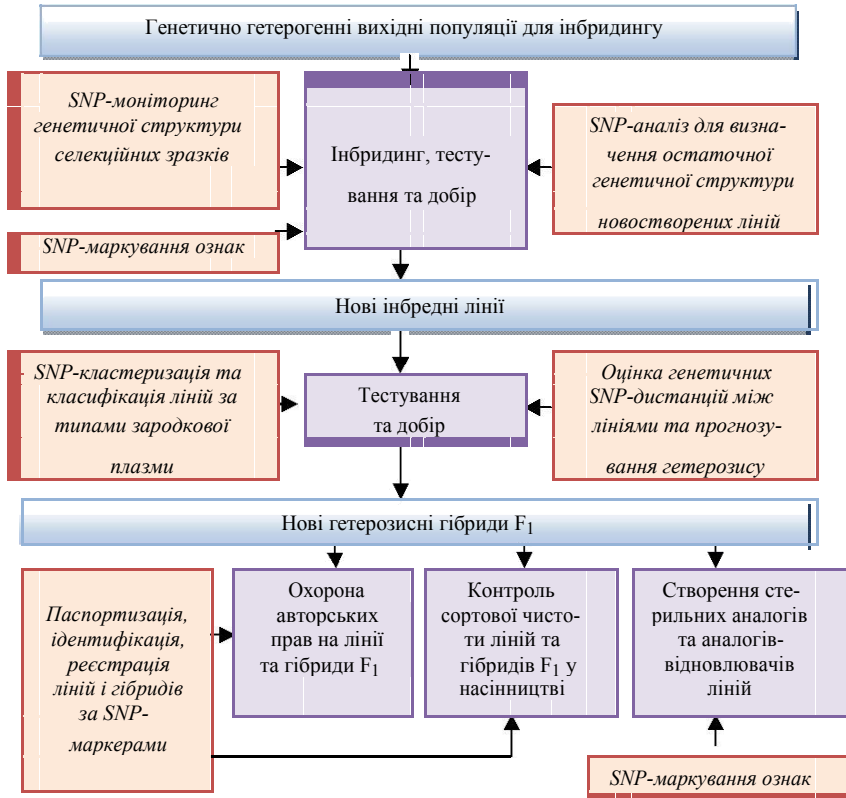


Рис. 3. Оптимізована схема селекційного процесу у кукурудзи із застосуванням SNP-аналізу

Результати досліджень свідчать, що включення SNP-аналізу в селекційний процес необхідно проводити при формуванні генетично гетерогенних вихідних популяцій, в процесі інбридингу, тестувань та доборів в поколіннях S_0 - S_5 для моніторингу напрямку процесу рекомбінації та зміни генетичної структури селекційних зразків, маркування цінних господарських ознак, визначення остаточної генетичної структури новостворених ліній. Після отримання інбредних ліній, на етапі добору батьківських компонентів гібридів і прогнозування гетерозису, гібридизації та тестувань необхідно використовувати оцінки генетичних дистанцій між лініями, інформацію про їх генетичну спорідненість, SNP-кластеризацію. В процесі тестування ліній необхідно враховувати результати SNP-маркування господарських ознак. Після створення нового гібрида кукурудзи, на етапі синтезу стерильних аналогів та ана-

логів-відновлювачів їх попередній скринінг рекомендовано вести за гаплотипами, які маркують дану ознаку. SNP-аналіз рекомендується використовувати також для охорони авторських прав на лінії-батьківські форми гібридів та гібриди F_1 через SNP-партиципацію і оцінку на відмінність, однорідність та стабільність. У виробництві насіння ліній і гібридів кукурудзи також рекомендується використовувати SNP-аналіз для ідентифікації генотипів та контролю сортової чистоти.

За результатами впровадження оптимізованої схеми селекційного процесу у кукурудзі із застосуванням SNP-аналізу на базі ліній, які належать до альтернативних зародкових плазм, створено і передано на держсортотипування гібриди ДМС1511, ДМ Вікторія, РедВайн, ДМ Нейтів та ДМ Вінсенте, частка авторства в яких складає по 5 %.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення і практичне вирішення важливого наукового завдання, яке полягає у виявленні закономірностей однонуклеотидного поліморфізму ДНК селекційного матеріалу кукурудзи, в результаті чого експериментально обґрунтовано методичні принципи застосування SNP-аналізу для оптимізації різних ланок селекційного процесу.

1. Розподіл нуклеотидів в маркерних SNP-сайтах у ліній кукурудзи вітчизняної селекції відповідає закономірностям їх розподілу у світовому селекційному генофонді: домінуючими в маркерних сайтах є дезоксиаденозинмонофосфат та дезоксигуанозинмонофосфат, а найрозповсюдженішим типом однонуклеотидних замінів в ДНК – транзиції пуринових нуклеотидів.

2. SNP-маркери панелі BDI-III при аналізі ліній кукурудзи вітчизняної селекції виявляють диморфний стан на рівні 98,6%, середні показники частоти мінорного алеля – 0,3147, зсуву генного різноманіття – 0,3971, індексу інформативності маркерів – 0,3114. Серед SNP-маркерів панелі BDI-III по відношенню до ліній кукурудзи вітчизняної селекції 91,8% є інформативними, а 72,2% – інформативними високоякісними.

3. Комплекс ліній кукурудзи вітчизняної селекції за результатами SNP-аналізу характеризується високою гомозиготністю (99,8%), середнім ступенем генного різноманіття (0,1750) з варіюванням у вузьких межах ($0,1634 \pm 0,1974$), суттєвою відмінністю за частотами алелів SNP-маркерів від ліній кукурудзи закордонної селекції та слабкішою, ніж у останніх, варіабельністю за діапазоном генетичних дистанцій між лініями.

4. Аналіз генетичної структури ліній кукурудзи за результатами SNP-генотипування дозволяє контролювати напрямок зміни та співвідношення часток генетичного матеріалу різного походження.

5. В процесі створення ліній SNP-дистанції між самозапиленними сім'ями послідовних генерацій зменшуються в середньому від 0,40 до 0,20 та

розрізняються для ліній, отриманих з однієї сім'ї, на залишкову дистанцію близько 0,11. SNP-дистанції між сестринськими лініями відрізняються значним варіюванням, але не виходять за межу 0,30.

6. Кластеризація за SNP-маркерами дозволила розподілити лінії кукурудзи вітчизняної та світової селекції за 8 кластерами, які відповідають основним типам зародкової плазми. Вітчизняний селекційний генофонд представлений у кластері 1 (Mo17) 51 лінією, у кластері 2 (Oh43) – 39 лініями, у кластері 3 (F2) – 67 лініями, у кластері 4 (KG232) – 30 лініями, у кластері 5 (ДнЗМ) – 104 лініями, у кластері 6 (D_4722) – жодною українською лінією, у кластері 7 (B73) – 41 лінією, у кластері 8 (D_207) – 111 лініями.

7. Залежність прояву селекційних ознак та рівня гетерозису гібридів від розміру SNP-дистанцій батьківських форм в діапазоні 0,25-0,54 описується рівняннями регресії: для збиральної вологості зерна $y=25,0x+7,4$; для врожайності зерна – $y=8,0x+0,7$; для гіпотетичного та істинного гетерозису за врожайністю зерна, відповідно, $y=1596,2x-238,7$ та $y=982,0x-80,2$.

8. Альтернативний прояв селекційних ознак забезпечується специфічним аallelним станом окремих SNP-маркерів, що є основою для маркер-асоційованої селекції кукурудзи.

9. Використання SNP-аналізу у паспортизації, встановленні спорідненості та генетичної структури ліній, тестуванні вихідного матеріалу та доборі батьківських форм гібридів у селекції на гетерозис, створенні стерильних аналогів та аналогів-відновлювачів фертильності забезпечує оптимізацію селекційного процесу кукурудзи. За результатами впровадження роботи створено і передано на держсортотипування гібриди кукурудзи ДМС1511, ДМ Вікторія, РедВайн, ДМ Нейтів та ДМ Вінсенте.

РЕКОМЕНДАЦІЇ ДЛЯ СЕЛЕКЦІЙНОЇ ПРАКТИКИ

1. Для паспортизації та ідентифікації ліній кукурудзи, тестування на відмінність, однорідність і стабільність разом з морфологічними ознаками використовувати SNP-аналіз за 337 ідентифікованими інформативними SNP-маркерами панелі BDI-III, а також створену електронну базу SNP-паспортів ліній.

2. Застосовувати як стандарти для відповідних типів та підтипів зародкової плазми кукурудзи SNP-профілі ліній: B73 для підплазми B73 плазми BSSS, Oh43 для підплазми Oh43 плазми Ланкастер, Mo17 для підплазми Mo17 плазми Ланкастер, P165 для плазми Айодент і B14 для підплазми B14 плазми BSSS.

3. На основі аналізу SNP-дистанцій рекомендувати до використання в сестринських гібридах лінії ДК411, МС375, ДК5, К2048, ДК301, ДК744, ДК275, ДК257-7, ДК772, ДК257, ДК274-3, УГ-6, МС361 та ДК216.

4. Використовувати SNP-паспорти ліній ДК257зМ, ДК742зМ, ВК377зМ, ДК744зМ, ДК411зМ, ДнЗзМ та їх стерильних аналогів М-типу, ДК2/427зС,

МС2363С, К43С та їх стерильних аналогів С-типу, ДК2473М, ВК3873М, Р165 та їх аналогів-відновлювачів фертильності у насінництві для контролю сортової чистоти.

5. Враховувати в селекції відновлювачів фертильності за молдавським типом зміну при відновленні аельного стану маркерів BDI-III-93 Г→А та BDI-III-94 А→Ц. При розподілі сімей за кольором стрижня качана враховувати формули гаплотипів кукурудзи за аельним станом маркерів панелі BDI-III для ознаки червоного стрижня 332А, 148А, 147А, 315Г, 261Г, 328Г, 15Г, 287Г, 282Г, 277Г і білого стрижня 332Г, 148Г, 147Г, 315А, 261А, 328А, 15А, 287А, 282А, 277А. У відборах за типом зернівки враховувати гаплотип кукурудзи з ознакою кременистого типу 297А, 172Ц, 282А, 287А, 25Ц, BDI-III-106Г, 229Г, 332Г, 168А, 20Г і зубоподібного типу 297Г, 172А, 282Г, 287Г, 25Г, 106АГ, 229А, 332А, 168Г, 20А.

Список основних опублікованих робіт за темою дисертації

Статті у фахових наукових журналах

1. Борисова В. В. Біоінформаційна характеристика геному кукурудзи у зв'язку із проведенням SNP-аналізу селекційного матеріалу / В. В. Борисова, В. Ю. Черчель, Б. В. Дзюбецький, Т. М. Сатарова // Зрошуване землеробство. – Міжвідомчий тематичний науковий збірник. – Херсон: Айлант, 2013. – Вип. 59. – С. 84-90 (частка авторства 70%, особистий внесок: пошук біоінформаційних характеристик геному кукурудзи та SNP-маркерів в біоінформаційних базах даних, аналіз та узагальнення отриманих результатів, обґрунтування висновків, підготовка матеріалів до друку).

2. Борисова В. В. Частоти SNP-алелів у лінії кукурудзи української селекції / В. В. Борисова, В. Ю. Черчель, Б. В. Дзюбецький, Т. М. Сатарова // Таврійський науковий вісник. – 2013. – Вип. 84. – С. 21-25 (частка авторства 70%, особистий внесок: генотипування ліній кукурудзи, розрахунок частот SNP-алелів, аналіз результатів, обґрунтування висновків, підготовка матеріалів до друку).

3. Деркач Е. В. Биотехнологические и молекулярно-генетические характеристики линий кукурузы селекционной группы Ланкастер / Е. В. Деркач, О. Е. Абраимова, В. В. Борисова, В. Ю. Черчель, Т. Н. Сатарова // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2013. – Т. 15, № 3 (5). – С. 1596-1600 (закордонна публікація) (частка авторства 30%, особистий внесок: виконання експериментів з SNP-генотипування ліній групи Ланкастер).

4. Деркач Е. В. Повышение генетического потенциала отзывчивости кукурузы в культуре in vitro / Е. В. Деркач, О. Е. Абраимова, В. Ю. Черчель, В. В. Борисова, Н. М. Черноусова, Т. Н. Сатарова // Кукуруза и сорго. – 2013. – № 3. – С. 21-26 (закордонна публікація) (частка авторства 15%, особистий внесок: визначення ступеня генного різноманіття ліній кукурудзи за SNP-маркерами).

5. Дзюбецький Б. В. Застосування SNP-генотипування для оцінки генетичної спорідненості селекційного матеріалу кукурудзи / Б. В. Дзюбецький, Т. М. Сатарова, В. Ю. Черчель, В. В. Борисова // Бюл. Інституту сільського господарства степової зони НААН України. – 2013. – № 4. – С. 3-7 (частка

авторства 25%, особистий внесок: проведення SNP-генотипування і польових дослідів, розрахунок Q -коефіцієнтів, аналіз генетичної спорідненості).

6. Сатарова Т. М. Генетичні дистанції ліній кукурудзи та їх цитостерильних аналогів за поліморфізмом SNP-маркерів / Т. М. Сатарова, В. В. Борисова, В. Ю. Черчель, К. В. Деркач, О. Є. Абраїмова // Селекція і насінництво. – 2013. – Вип. 103. – С. 124-134 (частка авторства 30%, особистий внесок: SNP-генотипування селекційних зразків, розрахунки генетичних дистанцій, аналіз, формулювання висновків і практичних рекомендацій).

7. Черчель В. Ю. Оцінка різних типів гібридів кукурудзи за генетичними дистанціями та ступенями гетерозису / В. Ю. Черчель, Б. В. Дзюбецький, В. В. Борисова, Т. М. Сатарова // Вісник аграрної науки. – 2013. – № 8. – С. 33-37 (частка авторства 30%, особистий внесок: планування схеми дослідження, польові досліді і SNP-генотипування батьківських форм гібридів, аналіз результатів, обґрунтування висновків та рекомендацій селекційній практиці).

Тези та матеріали наукових конференцій, методичні видання

8. Борисова В. В. Характеристика репрезентативності маркерів одноклеотидного поліморфізму ДНК в наборі ліній кукурудзи української селекції / В. В. Борисова, О. Є. Абраїмова, К. В. Деркач, Н. М. Черноусова, Т. М. Сатарова // Матеріали Міжнар. науково-практ. конф. «Актуальні питання біології, екології, медицини та фармакології». – Дніпропетровськ. – 26-27 вересня 2013. – Харків, 2013. – С. 16-17 (частка авторства 40%, особистий внесок: SNP-аналіз селекційних зразків, обґрунтування репрезентативності маркерів, підготовка до друку).

9. Борисова В. В. SNP-маркування ознаки «колір стрижня качана» у кукурудзи / В. В. Борисова, В. Ю. Черчель, О. Є. Абраїмова, Т. М. Сатарова // «Стратегічні напрями сталого виробництва сільськогосподарської продукції на сучасному етапі розвитку аграрного комплексу України». – Тези Всеукр. науково-практичної конференції молодих вчених і спеціалістів. – Дніпропетровськ, 22-23 травня 2014 р. – Дніпропетровськ: АкцентПІП, 2014. – С. 15-16 (частка авторства 50%, особистий внесок: польові та лабораторні досліді, розробка методики маркування, ідентифікація маркерів, обґрунтування висновків).

10. Печорная С. С. Порівняння частот SNP-маркерів ліній кукурудзи української та світової селекції / С. С. Печорная, В. В. Борисова, Т. М. Сатарова // «Біотехнологія: звершення та надії». – Тези III Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених. – Київ, 15-16 травня 2014. – К.: ВЦ НУБіП України, 2014. – С. 58-59 (частка авторства 45%, особистий внесок: планування дослідження, вибір специфічних груп ліній, SNP-генотипування, статистичний аналіз, обґрунтування висновків).

11. Сатарова Т. М. Електронна база даних: SNP-паспорти ліній кукурудзи, попарні генетичні SNP-дистанції, дендрограма взаємозв'язків між лініями [Електронний ресурс] / Т. М. Сатарова, В. В. Борисова. – Дніпропетровськ:

ДУ ІСГСЗ НААН, 2013. – 4 с. *(частка авторства 50%, особистий внесок: SNP-аналіз ліній кукурудзи, розрахунок генетичних дистанцій, побудова дентдрограм)*

12. Сатарова Т. М. Аналіз однонуклеотидного поліморфізму ДНК у ліній кукурудзи (методичні аспекти) / Т. М. Сатарова, В. В. Борисова, О. Є. Абраїмова, В. Ю. Черчель. – Дніпропетровськ: ДУ ІСГСЗ НААН, 2014. – 18 с. *(частка авторства 40%, особистий внесок: відпрацювання та модифікація методики аналізу однонуклеотидного поліморфізму у кукурудзи).*

13. Сатарова Т. М. Методичні вказівки до SNP-маркування селекційних ознак у кукурудзи / Т. М. Сатарова, В. В. Борисова, Ю. О. Гончаров, В. Ю. Черчель, О. Є. Абраїмова. – Дніпропетровськ: ДУ ІСГСЗ НААН, 2014. – 18 с. *(частка авторства 35%, особистий внесок: розробка методичних принципів SNP-маркування, ідентифікації гаплотипів, підготовка матеріалів до друку).*

14. Сатарова Т. М. Використання SNP-маркерів для моніторингу селекційного процесу у кукурудзи (методичні рекомендації) / Т. М. Сатарова, В. В. Черчель, О. Є. Абраїмова, В. В. Борисова. – Дніпропетровськ: ДУ ІСГСЗ НААН, 2014. – 22 с. *(частка авторства 25%, особистий внесок: розробка методичних рекомендацій з моніторингу селекційного процесу, підготовка до друку)*

АНОТАЦІЯ

Борисова В. В. Селекційні аспекти застосування SNP-аналізу у кукурудзи. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 06.01.05 – селекція і насінництво. – ДУ Інститут сільського господарства степової зони НААН, Дніпропетровськ, 2014.

Дисертаційна робота присвячена селекційним аспектам застосування аналізу однонуклеотидного поліморфізму ДНК у кукурудзи. Досліджено ступінь інформативності SNP-маркерів у вітчизняному селекційному ґенофонді. Складено електронну базу SNP-паспортів ліній кукурудзи. Розраховано рівняння регресії для прогнозування гетерозису за розміром SNP-дистанцій. Розроблено методику SNP-маркування фенотипових ознак у кукурудзи. Показано, що використання SNP-аналізу у паспортизації, встановленні спорідненості та генетичної структури ліній кукурудзи, тестуванні вихідного матеріалу та доборі батьківських форм гібридів в селекції на гетерозис, створенні стерильних аналогів та аналогів-відновлювачів забезпечує оптимізацію селекційного процесу. За результатами впровадження роботи створено і передано на держсортотипування 5 гібридів кукурудзи.

Ключові слова: кукурудза, однонуклеотидний поліморфізм, SNP-маркери, зародкова плазма, лінія, гібрид, гетерозис, аналоги-відновлювачі фертильності, маркер-асоційована селекція

АННОТАЦИЯ

Борисова В. В. Селекционные аспекты применения SNP-анализа у кукурузы. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 06.01.05 «Селекция и семеноводство». – ГУ Институт сельского хозяйства степной зоны НААН, Днепропетровск, 2014.

Диссертационная работа посвящена селекционным аспектам применения анализа однонуклеотидного полиморфизма ДНК у кукурузы (SNP-анализа).

Проведено SNP-генотипирование 450 линий украинской селекции и выявлены закономерности однонуклеотидного полиморфизма ДНК отечественного селекционного материала. Установлено, что характер распределения нуклеотидов в маркерных SNP-сайтах у линий кукурузы отечественной селекции соответствует закономерностям их распределения в мировом селекционном генофонде: доминирующими в маркерных сайтах являются дезоксиаденозинмонофосфат и дезоксигуанозинмонофосфат, а наиболее распространенным типом однонуклеотидных замен в ДНК – транзиции пуриновых нуклеотидов. Установлены основные характеристики репрезентативности и информативности 384 SNP-маркеров панели BDI-III в наборе линий, представляющих селекционный генофонд кукурузы, адаптированный к условиям зоны Степи Украины.

Показано, что изученный комплекс отечественных линий кукурузы по результатам SNP-анализа отличается высокой гомозиготностью, средней степенью генного разнообразия, существенным отличием по частотам аллелей SNP-маркеров от линий иностранной селекции и более слабой вариабельностью диапазонов генетических расстояний между линиями. Анализ вклада предковых популяций в генотип современных линий показал, что SNP-генотипирование позволяет проводить мониторинг направления изменений и соотношения доли генетического материала различного происхождения при создании инбредных линий.

Проведена кластеризация современных украинских и иностранных линий кукурузы по SNP-маркерам. Рассчитаны уравнения регрессии, которые позволяют прогнозировать гетерозис гибридов по урожайности зерна в зависимости от размера SNP-дистанций между родительскими формами. Установлено, что альтернативные проявления фенотипических признаков у кукурузы характеризуются специфическим аллельным состоянием определенных SNP-маркеров, что служит основой для маркер-ассоциированной селекции. Установлены формулы гаплотипов по SNP-маркерам для признаков «цвет стержня початка» и «тип зерновки», а также даны рекомендации по исполь-

зованию SNP-анализа при создании стерильных аналогов и аналогов-восстановителей.

Экспериментально обосновано использование методических принципов SNP-анализа для оптимизации различных звеньев селекционного процесса у кукурузы. Использование SNP-анализа в паспортизации, установлении близкородственности и генетической структуры линий, тестировании исходного материала, при подборе родительских форм гибридов в селекции на гетерозис, создании стерильных аналогов и аналогов-восстановителей обеспечивает оптимизацию селекционного процесса. В результате внедрения работы созданы и переданы на госсортоиспытание 5 гибридов кукурузы.

Ключевые слова: кукуруза, однонуклеотидный полиморфизм, SNP-маркеры, зародышевая плазма, линия, гибрид, гетерозис, аналоги-восстановители фертильности, маркер-ассоциированная селекция.

SUMMARY

Borisova V. V. Breeding aspects of application of SNP-analysis in maize.

– Manuscript.

Thesis for a PhD. degree for the specialty 06.01.05 – selection and seed production. – SE Institute of Agriculture of Steppe Zone of NAAS, Dnipropetrovsk, 2014.

The dissertation work is devoted to the breeding aspects of application of analysis of DNA single nucleotide polymorphism in maize. The degree of informativeness of SNP-markers in native breeding genofond has been investigated. The electronic database of SNP-certificates for maize inbreds has been constructed. The equations of regression for heterosis prediction depending on sizes of SNP-distances have been calculated. The technique of the marking of phenotypic traits in maize according to allele status of SNP-markers has been worked out. It has been shown that the application of SNP-analysis in certification, identification of familiarities and genetic structure of maize lines, testing of initial material and selection of parental forms of hybrids in heterotic selection, creation of sterile analogues and analogues-restorers ensures the optimization of breeding process. As a result of the given investigation 5 maize hybrids have been produced and directed for state variety testing.

Key words: maize, single nucleotide polymorphism, SNP-markers, germplasm, line, hybrid, heterosis, analogues-restorers of fertility, marker-associated selection.