<https://doi.org/10.15407/frg2019.06.529>

УДК 633.15: 575.174.015.3

ЗАСТОСУВАННЯ SSR МАРКЕРІВ ДЛЯ ОЦІНЮВАННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ КУКУРУДЗИ (*ZEА МАУS* L.) В ЕКСПЕРТИЗИ НА ВІДМІННІСТЬ, ОДНОРІДНІСТЬ, СТАБІЛЬНІСТЬ

Л.М. ПРИСЯЖНЮК, С.О. ЧЕРНІЙ, М.М. ТАГАНЦОВА, С.О. ТКАЧИК

Український інститут експертизи сортів рослин

03041 Київ, вул. Генерала Родімцева, 15

e-mail: prysiazhniuk_l@ukr.net

Наведено результати досліджень ліній кукурудзи за SSR і морфологічними маркерами. Визначено поліморфізм досліджених ліній кукурудзи за 8 SSR маркерами: phi064, umc1448, umc1792, bnlgl782, bnlgl1129, phi084, phi015, phi083. Відповідно до отриманих за результатами полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) алелів, розраховано їх частоти та індекс поліморфності локусу (PIC). У досліджених лініях ідентифіковано від 2 до 9 алелів відповідно до використаних маркерів. Частоти ідентифікованих алелів становили 0,01—0,72. Найбільш поліморфним виявився маркер umc1448 (PIC 0,83), найменш поліморфним — phi015 (PIC 0,46). Високий PIC мали маркери phi064 і bnlgl782. Встановлено наявність унікальних для досліджених ліній алелів за маркерами umc1448 — алель 132 пн, за маркером bnlgl782 — алелі 240 і 242 пн. За результатами кластерного аналізу на основі ступеня прояву морфологічних ознак визначено відмінності між 91 лінією. Однаковими за 36 ознаками виявились пари ліній із різним типом цитоплазми (фертильна лінія та її стерильний аналог). Генетичні дистанції, розраховані відповідно до наявності/відсутності ідентифікованих алелів, дали змогу виявити 88 відмінних ліній. Встановлено, що одна пара ліній — фертильна лінія та її стерильний аналог — не мають відмінностей за двома дослідженими маркерними системами, крім типу цитоплазми, що виявляється за наявністю пилку в польових умовах. Це означає, що необхідно залучати щонайменше ще один SSR маркер для визначення відмінностей у цій вибірці ліній. Лінії, які виявились однаковими за SSR маркерами, відрізняються за морфологічними ознаками, що вказує на ефективність комплексного підходу до визначення відмінності ліній у процесі кваліфікаційної експертизи на відмінність, однорідність і стабільність (ВОС).

Ключові слова: *Zea mays* L., SSR маркери, генетичні дистанції, відмінність ліній.

Кукурудза відіграє одну з провідних ролей у харчуванні людей та виробництві кормів [6]. Важливим завданням селекції є створення високопродуктивних гібридів кукурудзи, які відповідають сучасним вимогам щодо урожайності, вмісту білка, крохмалю тощо. Відомо, що отримання гібридів базується на доборі лінійного матеріалу кукуруд-

зи, який в Україні надається як батьківські компоненти разом із гібридом для державного сортовипробування або реєструється як самостійні лінії. Станом на 2019 р. у Державному реєстрі сортів рослин, придатних до поширення в Україні, знаходиться 1857 ліній кукурудзи, щорічно сортовипробування проходять близько 400 ліній [1].

Дослідження ліній кукурудзи на відмінність, однорідність та стабільність є необхідною умовою для їх реєстрації в Україні та в країнах-членах UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants) [21].

Відповідно до принципів UPOV, лінії та сорти рослин, які проходять експертизу на ВОС, описують на основі маркерних морфологічних ознак. Проте з початку 2000-х років деякі країни почали застосовувати додаткові методи оцінювання відмінності сортів на національному рівні. Зокрема, експертний орган Франції використовує аналіз кукурудзи на основі SNP маркерів у поєднанні з морфологічним описом для організації референсних колекцій і пришвидшення реєстрації ліній [8, 20]. Експертний орган Нідерландів застосовує SSR маркери для оцінювання генетичного різноманіття картоплі, квасолі, квітково-декоративних рослин [12, 14, 20]. Широко застосовують також ДНК маркування господарсько-цінних ознак кукурудзи та інших культур, зокрема стійкості до хвороб, підвищеного вмісту амінокислот, стану вуглеводно-амілазного комплексу тощо.

Організація ISTA (International Seed Testing Association) розробила й валідувала методики застосування SSR маркерів для оцінювання генетичного різноманіття пшениці та кукурудзи, веде розробки для ячменю, вівса, сої, гороху [13]. Чинними є також міжнародні стандарти ISO/TR 17623:2015 Molecular biomarker analysis — SSR analysis of maize та ISO/TR 17622:2015 Molecular biomarker analysis — SSR analysis of sunflower, в яких наведено методику використання SSR маркерів для оцінювання відповідності гібридів, генотипів, перевірки ідентичності ліній і гібридів. У працях [10, 18, 21] описано використання SSR маркерів в експертизі на ВОС у поєднанні з оцінюванням морфологічних маркерних ознак кукурудзи. Отже, зважаючи на значну кількість ліній, які щорічно проходять експертизу на ВОС, та обмежену кількість морфологічних характеристик, актуальним є залучення сучасних методів оцінювання відмінностей ліній і сортів на основі аналізу ДНК.

Метою наших досліджень було вивчення генетичного різноманіття ліній кукурудзи з використанням SSR маркерів і визначення відмінностей між ними на основі оцінювання генетичних дистанцій за морфологічними і ДНК маркерами.

Методика

Досліджували 100 ліній кукурудзи української та іноземної селекції протягом 2018—2019 рр. Морфологічні ознаки ліній кукурудзи описано за 36 маркерними ознаками відповідно до праці [9] для виду *Zea mays* L. Ступінь виявлення ознак позначено цифрами від 1 до 9.

ТАБЛИЦЯ 1. Нуклеотидні послідовності праймерів та їх характеристики

SSR	Послідовність праймерів 5'→3'	Бін/Хро- мосома	Мотив	Очіку- ваний розмір амплі- конів, пн
phi064	F-CCGAATTGAAATAGCTGCGAGAACCT R-ACAATGAACGGTGGTTATCAACACGC	1,11	(ATCC) _n	75–110
umc1448	F-ATCCTCTCATCTTTAGGTCCACCG R-CATATACAGTCTCTTCTGGCTGCTCA	2,04	(GCT) ₅	137–161
umc1792	F-CATGGGACAGCAAGAGACACAG R-ACCTTCATCACCTGCAACTACGAC	5,08	(CGG) ₅	115–134
bnlg1782	F-CGATGCTCCGCTAGGAATAG R-TGTGTTGGAATTGACCCAA	8,05	(AG) ₁₃	219–236
bnlg1129	F-GAGAGTATGCTACTCGCCGC R-GACGAGTTTGAGTGCCATT	9,08	(AG) ₁₂	179–202
phi084	F-AGAAGGAATCCGATCCATCCAAGC R-CACCCGTACTTGAGGAAAACCC	10,04	(GAA) ₄	154–157
phi015	F-GCAACGTACCGTACCTTTCCGA R-ACGCTGCATTCAATTACCGGGAAG	8,08	(GTT) ₇	82–103
phi083	F-CAAACATCAGCCAGAGACAAGGAC R-ATTCATCGACGCGTCACAGTCTACT	2,04	(AGCT) ₂	123–136

Примітка. F – прямий праймер, R – зворотний праймер.

Молекулярно-генетичні дослідження проводили на базі лабораторії молекулярно-генетичного аналізу Українського інституту експертизи сортів рослин. ДНК екстрагували з п'ятидобових проростків кожної лінії кукурудзи в п'яти повтореннях із використанням катіонного детергенту цетилтриметиламонійброміду (ЦТАБ), дворазовим очищенням суміші хлороформом і розчином етанолу. Отриману ДНК розчиняли в ТЕ буфері (*трис*-ЕДТА буферний розчин) [4].

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили відповідно до ISO/TR 17623:2015 Molecular biomarker analysis — SSR analysis of maize з використанням 8 SSR маркерів, які обирали за їхніми індексами поліморфності (PIC) [17], на ампліфікаторі T-CY (Creacon Technologies B.V., Нідерланди). Характеристики і нуклеотидні послідовності праймерів наведено в табл. 1.

Реакційна суміш (об'єм 10 мкл) складалася з 50 нг ДНК, 1×буфер (10 мМ *трис*-HCl, pH 9,0; 50 мМ KCl, 0,01 % Triton X-100), 3 мМ MgCl₂, 125 мкМ дезоксинуклеотидтрифосфатів (дНТФ), 0,25 мкМ кожного з праймерів, 0,25 одиниць Taq полімерази. Тип ПЛР — TouchDown. Для праймерів phi064, phi015, phi084, umc1448, bnlg1782, bnlg1129 застосовували такі параметри: початкова денатурація при 94 °C — 10 хв, денатурація при 94 °C — 30 с, гібридизація праймерів при 64–55 °C — 30 с, елонгація при 72 °C — 30 с, кінцева елонгація при 72 °C — 10 хв. Температуру гібридизації праймерів знижували від

64 до 55 °C з кроком 1 °C за 1 цикл (10 циклів), кількість циклів за температури 55 °C — 30. Для праймерів *umc1792* умови TouchDown ПЛР були такими: початкова денатурація при 94 °C — 10 хв, денатурація при 94 °C — 30 с, гібридизація праймерів при 62 — 53 °C — 30 с, елонгація при 72 °C — 30 с, кінцева елонгація при 72 °C — 10 хв. Температуру гібридизації праймерів знижували від 62 до 53 °C з кроком 2 °C по 2 цикли (10 циклів), кількість циклів за температури 53 °C — 30. Умови для праймерів *phi083*: початкова денатурація при 94 °C — 10 хв, денатурація при 94 °C — 30 с, гібридизація праймерів при 60 °C — 30 с, елонгація при 72 °C — 30 с, кінцева елонгація при 72 °C — 10 хв, кількість циклів за температури 60 °C — 30.

Продукти ампліфікації розділяли методом горизонтального електрофорезу в 2 %-му агарозному гелі у 0,5×ТБЕ (*трис*-боратному буферному розчині) з бромистим етидієм [4]. Електрофорез проводили протягом 1,5 год за напруженості електричного поля 5 В/см.

Відповідно до розмірів отриманих алелів розраховували РІС (polymorphism information content) [5] і будували матрицю, в якій наявність/відсутність певного амплікону позначали 1/0. З метою визначення відмінності між сортами проводили кластерний аналіз за допомогою комп'ютерної програми Statistica 12.0 (тестова версія). Генетичні дистанції за результатами SSR аналізу розраховували із застосуванням методу незваженого середнього попарно-групового методу (UPGA — Unweighted pair group average), за морфологічним описом — методом одиничних зв'язків (Single Linkage) з евклідовою мірою відстані [2, 3]. Філогенетичні дерева будували з використанням програмного середовища R.

Результати та обговорення

За допомогою ПЛР аналізу отримано амплікони очікуваних розмірів відповідно до досліджуваних SSR маркерів. Найбільш поліморфним виявився маркер *umc1448*, за яким ідентифіковано 8 алелів. Розміри алелів варіювали від 132 до 165 пн (рис. 1).

На рис. 1 наведено електрофореграму 16 ліній кукурудзи та вказано розміри алелів, ідентифікованих для цих ліній. Відповідно до от-

Рис. 1. Результати полімеразної ланцюгової реакції ліній кукурудзи за маркером *umc1448*:

М — маркер молекулярної маси 100 bp DNA Ladder O'GeneRuler (Thermo Scientific); 1–16 — лінії кукурудзи С77-С92

Рис. 2. Результаты полимеразной ланцюгової реакції ліній кукурудзи за маркером phi064:

М — маркер молекулярної маси 100 bp DNA Ladder O'GeneRuler (Thermo Scientific); 1—7 — лінії кукурудзи C80-C86

риманих даних визначено, що алель розміром 150 пн мав частоту 0,22, алель 144 пн — 0,08, алель 138 пн — 0,05. За дослідженими маркерами всі лінії були гомозиготними, крім phi064. За маркером phi064 у 6 ліній виявлено внутрішньолінійний поліморфізм (рис. 2).

Рис. 2 ілюструє електрофоретичний розподіл алелів, ідентифікованих за маркером phi064. Визначено, що в усіх ліній, які виявились гетерозиготними, ідентифіковано алель розміром 120 пн, інші алелі мали розмір 76, 88 та 108 пн.

Відповідно до отриманих даних, за дослідженими SSR маркерами визначено розміри й частоти алелів, виявлених у ліній кукурудзи. На основі частот алелів розраховано PIC (табл. 2).

Отже, за дослідженими маркерами ідентифіковано від 2 до 9 алелів. Найменше алелів виявлено за маркером phi084 — 2, найбільше за маркером bnlgl782 — 9. Для інших маркерів кількість ідентифікованих алелів становила 5—8. Індекс поліморфності локусу варіював від 0,46 до 0,83. Найменше значення PIC визначено для

ТАБЛИЦЯ 2. Алелі, ідентифіковані у ліній кукурудзи за SSR маркерами

SSR	Кількість алелів, шт.	Розмір алелів, пн	PIC
phi064	8	76; 88; 96; 100; 108; 112; 116; 120	0,79
umc1448	8	132; 138; 144; 147; 150; 156; 159; 165	0,83
umc1792	6	117; 120; 123; 129; 135; 138	0,71
bnlg1782	9	216; 220; 226; 228; 240; 242; 244; 250; 266	0,79
bnlg1129	7	148; 170; 178; 184; 188; 194; 200	0,71
phi084	2	153; 159	0,48
phi015	5	92; 96; 100; 104; 112	0,46
phi083	6	124; 128; 132; 136; 140; 148	0,73

Рис. 3. Розподіл частот алелів, виявлених за маркерами phi084 і phi015

маркера phi015, низьке значення цього індексу мав також маркер phi084 (0,48). Відомо, що величина PIS залежить не тільки від кількості ідентифікованих алелів, а й від їх розподілу всередині вибірки. Оскільки за маркером phi084 ідентифіковано 2 алелі, а за маркером phi015 — 5 алелів, зазначимо, що за маркером phi015 найбільшу частоту мав алель розміром 104 пн — 0,72, а частота інших алелів становила 0,01—0,11 (рис. 3).

За маркером phi015 алель розміром 96 пн траплявся лише в однієї зі ста досліджених ліній кукурудзи. Отже, отримане низьке значення PIS за маркером phi015 зумовлене нерівномірністю розподілу алелів серед досліджених ліній кукурудзи.

Визначено, що найбільш поліморфними виявились маркери umc1448, phi064 і bnlg1782 (рис. 4). Частоти алелів за цими маркерами варіювали від 0,01 до 0,32.

Алель розміром 100 пн, ідентифікований за маркером phi064, мав найвищу частоту — 0,32. Часто траплявся також алель розміром 216 пн, визначений за маркером bnlg1782. За маркером umc1448 частоти алелів варіювали від 0,01 до 0,25. Алель розміром 132 пн виявлено лише в одній із досліджених ліній. Унікальними для цієї вибірки ліній виявились також алелі розмірами 240 і 242 пн, ідентифіковані за маркером bnlg1782.

Рис. 4. Розподіл частот алелів, виявлених за маркерами umc1448, phi064 і bnlg1782

Отримані нами алелі та значення PIC узгоджуються з даними, наведеними в ISO/TR 17623:2015. Так, за маркерами phi084 і phi015 визначено найнижчі значення PIC 0,50 і 0,45. У наших дослідженнях PIC за цими маркерами були також низькими — 0,48 і 0,46. Найбільш поліморфним із досліджених маркерів за ISO/TR 17623:2015 є phi064 із PIC 0,78. Ми за цим маркером також розрахували високе значення PIC — 0,79. Проте найбільш поліморфним виявився маркер umc1448 із PIC 0,83. Автори праці [11] показали ефективність використання 30 SSR маркерів для дослідження генетичного різноманіття ліній кукурудзи. Відповідно до отриманих ними даних, найбільш поліморфним виявився маркер phi064 (PIC 0,83). За маркером phi083 отримано 5 алелів із PIC 0,71. Як і в наших дослідженнях, за маркером phi084 вони розрахували низьке значення PIC (0,47). Автори праці [16] дослідили різноманіття сучасних і давніх ліній кукурудзи на основі SSR маркерів. За дослідженими маркерами вчені ідентифікували від 2 до 12 алелів. Слід зауважити, що за маркером phi015 ідентифіковано від 4 до 6 алелів відповідно до статусу досліджених ліній. Ми за цим маркером також визначили 5 алелів, проте PIC становив 0,46. Отже, наші результати узгоджуються з даними, отриманими іншими авторами по SSR маркерах, які залучені в дослідження.

Для оцінювання ліній кукурудзи за генетичними дистанціями та визначення відмінності між ними проводили кластерний аналіз за матрицею кодів прояву морфологічних ознак і наявності/відсутності ідентифікованих алелів [7, 19]. Результати кластеризації представлені у вигляді філогенетичного дерева на рис. 5, а, б.

У результаті кластерного аналізу були розраховані генетичні дистанції між досліджуваними лініями за морфологічними маркерними ознаками. За ступенем генетичної близькості лінії розподілились на три групи кластерів. Визначено, що зі 100 досліджених ліній ідентичними за 36 морфологічними ознаками виявились чотири пари ліній. Проте слід зауважити, що ці пари ліній є фертильними лініями та їх стерильними аналогами. Відомо, що такі лінії подібні за морфологічними ознаками й більшістю ядерних генів і відрізняються лише за типом цитоплазми (стерильна або нормальна) [15].

У результаті оцінювання генетичного різноманіття ліній кукурудзи за SSR маркерами визначено генетичні дистанції між ними. За вісьмома SSR маркерами отримано чотири групи кластерів, сформованих відповідно до генетичних дистанцій між лініями кукурудзи. Встановлено, що зі 100 ліній за допомогою восьми SSR маркерів вдалося виявити 88 відмінних.

Ідентичними виявились три пари ліній. Не вдалось виявити відмінності в шести лініях, по три з яких є ідентичними за дослідженими маркерами.

Слід зазначити, що розподіл ліній за SSR маркерами відрізняється від розподілу за морфологічними ознаками. Так, у ліній, які за морфологічними ознаками були ідентичними, виявлено відмінності за SSR маркерами. Проте в одній парі ліній — фертильна лінія та її стерильний аналог — не виявлено відмінностей за жодною маркерною системою. За результатами досліджень встановлено, що для виз-

Рис. 5. Кластерний аналіз ліній кукурудзи на основі морфологічних ознак (а) та за SSR маркерами (б)

начення відмінностей між лініями кукурудзи необхідно залучити щонайменше ще один SSR маркер, зважаючи на те, що морфологічні особливості стерильних і фертильних ліній дають змогу виявити ці відмінності в польових умовах за наявності пилку.

Ефективність застосування ДНК маркерів для визначення відмінності сортів доведена у багатьох працях. Так, автори праці [10] застосовували SSR маркери в поєднанні з описом морфологічних ознак у рамках експертизи на відмінність, однорідність і стабільність. Результати подібних досліджень наведено у праці [21], де автори порівняли застосування різних типів ДНК маркерів і морфологічного опису ліній кукурудзи й зазначили ефективність поєднання двох маркерних систем.

Отже, за результатами досліджень алельного стану мікросателітних локусів та морфологічних ознак ліній кукурудзи встановлено наявність поліморфізму. За частотами ідентифікованих алелів розраховано PIC, значення якого за дослідженими маркерами становило 0,46—0,83. Відповідно до отриманих генетичних дистанцій за морфологічними ознаками встановлено, що ідентичними за ступенем вияву морфологічних ознак є фертильні лінії та їх стерильні аналоги. Визначено відмінності у 88 із проаналізованих ліній кукурудзи за вісьмома SSR маркерами. Встановлено, що 88 ліній кукурудзи мають унікальний набір алелів за дослідженими ДНК маркерами, що передбачає подальше застосування їх для ідентифікації. Оцінювання генетичних дистанцій доцільне для визначення відмінності та ідентифікації ліній у процесі експертизи на відмінність, однорідність і стабільність та формування референсних колекцій.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Державний реєстр сортів рослин, придатних до поширення в Україні. URL: <https://sops.gov.ua/reestr-sortiv-roslin> (01.10.2019)
2. Дроздов В.И. Инструкция по использованию пакета Statistica 6.0. Курск: Изд-во ЮЗГУ, 2010. 74 с.
3. Ермантраут Е.Р., Присяжнюк О.І., Шевченко І.Л. Статистичний аналіз агрономічних дослідних даних в пакеті Statistica 6.0. Київ: ПоліграфКонсалтинг, 2007. 55 с.
4. Методика проведення кваліфікаційної експертизи сортів рослин на придатність до поширення в Україні. Методи визначення показників якості продукції рослинництва. Ткачик С.О. (ред.). Вінниця: Нілан-ЛТД, 2015. 160 с.
5. Сиволап Ю.М., Календарь Р.Н., Вербицкая Т.Г. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях. Киев: Аграрна наука, 1998. 156 с.
6. Babu R., Nair S.K., Kumar A., Venkatesh S., Sekhar J.C., Singh N.N., Gupta H.S. Two-generation marker-aided backcrossing for rapid conversion of normal maize lines to quality protein maize (QPM). *Theoretical and Applied Genetics*. 2005. N 5. P. 888—897. <http://doi.org/10.1007/s00122-005-0011-6>
7. Everitt B.S., Landau S., Leese M., Stahl D. Cluster Analysis (5th ed.). Chichester: Wiley, 2011. 346 p.
8. Greveniotis V.A., Giourieva V.S., Bouloumpasi E.C., Sioki E.J., Mitlianga P.G. Morpho-physiological Characteristics and Molecular Markers of Maize Crosses Under Multi-location Evaluation. *Journal of Agricultural Science*. 2018. N 11. <http://doi.org/10.5539/jas.v10n11p79>
9. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. Mays. URL: <https://www.upov.int/edocs/tgdocs/en/tg002.pdf> (01.10.2019)
10. Gunjaca J., Buhinicek I., Jukic M., Sarcevic H., Vragolovic A., Kozic Z., Pejic I. Discriminating maize inbred lines using molecular and DUS data. *Euphytica*. 2008. N 1-2. P. 165—172. <http://doi.org/10.1007/s10681-007-9518-z>

11. Gurung D., George M., Dela Cruz Q. Analysis of genetic diversity within Nepalese maize populations using SSR markers. *Nepal J. Sci. Technol.* 2010. **11**. P. 1–8. <http://doi.org/10.3126/njst.v11i0.4082>
12. Hossain F., Muthusamy V., Pandey N., Vishwakarma A.K., Baveja A., Zunjare R.U., Gupta H.S. Marker-assisted introgression of opaque2 allele for rapid conversion of elite hybrids into quality protein maize. *Journal of Genetics*. 2018. N 1. P. 287–298. <http://doi.org/10.1007/s12041-018-0914-z>.
13. International Rules for Seed Testing 2019. URL: <https://www.seedtest.org/en/international-rules-for-seed-testing-content---1--1083.html> (01.10.2019)
14. Liu X., Zhang Y., Zheng Z., Li Z., He C., Liu D., Tan Z. QTL Mapping for Controlling Days to Pollen Shed under Different Nitrogen Regimes in Maize: 2010 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, 2010. <http://doi.org/10.1109/icbbe.2010.5518247>
15. Liu Z., Peter S.O., Long M., Weingartner U., Stamp P., Kaeser O.A. PCR assay for rapid discrimination of sterile cytoplasm types in maize. *Crop Science*. 2002. N 2. P. 566–569. <http://doi.org/10.2135/cropsci2002.0566>
16. Lu H., Bernardo R. Molecular marker diversity among current and historical maize inbreds. *Theoretical and Applied Genetics*. 2001. N 4. P. 613–617. <https://doi.org/10.1007/PL00002917>
17. Molecular biomarker analysis — SSR analysis of maize (E): ISO/TR 17623:2015. Geneva, 2015. 10 p.
18. Nagy E., Timar L., Hegyi Z., Spitko T., Marton L. C. SSR markers as tools in maize breeding for high starch content. *Maydica*. 2009. N 2. 253 p. <http://doi.org/10.3389/fpls.2016.00223>
19. Namorato H., Miranda G.V., de Souza L.V., Oliveira L.R., DeLima R.O., Eder E. Mantovani Comparing Biplot Multivariate Analyses with Eberhart and Russell' method for genotype x environment interaction Crop. *Breeding and Applied Biotechnology*. 2009. N 9. P. 299–307.
20. TGP/15 Guidance on the Use of Biochemical and Molecular Markers in the Examination of Distinctness, Uniformity and Stability (DUS). URL: https://www.upov.int/edocs/tgpdocs/en/tgp_15.pdf (01.10.2019)
21. Yadav V.K., Singh I.S. Comparative evaluation of maize inbred lines (*Zea mays* L.) according to DUS testing using morphological, physiological and molecular markers. *Agricultural Sciences*. 2010. N 3. 131 p. <http://doi.org/10.4236/as.2010.13016>

Отримано 01.10.2019

REFERENCES

1. State register of plant varieties suitable for distribution in Ukraine. URL: <https://sops.gov.ua/reestr-sortiv-roslin> (01.10.2019)
2. Drozdov, V.I. (2010). Manual for using the Statistica 6.0. Kursk: Izdatelstvo YuZGU [in Russian].
3. Ermantraut, E.R., Prisyazhniuk, O.I. & Shevchenko, I.L. (2007). Statistical analysis of agronomic study data in the software suite Statistica 6.0. Kyiv: PolihrafKonsaltnyh [in Ukrainian].
4. Tkachik, S.O. (Ed.) (2015). Methods of examination of plant varieties of cereals, cereals and legumes for suitability for distribution in Ukraine Vinnytsia: FOP Korzun D. Yu. [in Ukrainian].
5. Syvolap, Yu.M., Kalendar, R.N. & Verbytskaia, T.H. (1998). The use of PCR analysis in genetic selection studies. Kiev: Ahrarna nauka [in Russian].
6. Babu, R., Nair, S.K., Kumar, A., Venkatesh, S., Sekhar, J.C., Singh, N.N. & Gupta, H.S. (2005). Two-generation marker-aided backcrossing for rapid conversion of normal maize lines to quality protein maize (QPM). *Theoretical and Applied Genetics*, No. 5, pp. 888–897. <http://doi.org/10.1007/s00122-005-0011-6>
7. Everitt, B.S., Landau, S., Leese, M. & Stahl, D. (2011). Cluster analysis (5th ed.). Chichester: Wiley.
8. Greveniotis, V.A., Giourieva, V.S., Bouloumpasi, E.C., Sioki, E.J. & Mitlianga, P.G. (2018). Morpho-physiological Characteristics and Molecular Markers of Maize Crosses

- Under Multi-location Evaluation. Journal of Agricultural Science, No. 11. <http://doi.org/10.5539/jas.v10n11p79>
9. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. Mays. URL: <https://www.upov.int/edocs/tgdocs/en/tg002.pdf> (01.10.2019)
 10. Gunjaca, J., Buhinicek, I., Jukic, M., Sarcevic, H., Vragolovic, A., Kozic, Z. & Pejic, I. (2008). Discriminating maize inbred lines using molecular and DUS data. Euphytica, No. 1-2, pp. 165-172. <http://doi.org/10.1007/s10681-007-9518-z>
 11. Gurung, D., George, M. & Dela Cruz, Q. (2010). Analysis of genetic diversity within Nepalese maize populations using SSR markers. Nepal J. Sci. Technol., No. 11, pp. 1-8. <http://doi.org/10.3126/njst.v11i0.4082>
 12. Hossain, F., Muthusamy, V., Pandey, N., Vishwakarma, A.K., Baveja, A., Zunjare, R.U. & Gupta, H.S. (2018). Marker-assisted introgression of opaque2 allele for rapid conversion of elite hybrids into quality protein maize. Journal of Genetics, No. 1, pp. 287-298. <http://doi.org/10.1007/s12041-018-0914-z>
 13. International Rules for Seed Testing 2019. URL: https://www.seedtest.org/en/international-rules-for-seed-testing_content--1-1083.html (01.10.2019)
 14. Liu, X., Zhang, Y., Zheng, Z., Li, Z., He, C., Liu, D. & Tan, Z. (2010). QTL Mapping for Controlling Days to Pollen Shed under Different Nitrogen Regimes in Maize. Proceeding of 2010 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering. <http://doi.org/10.1109/icbbe.2010.5518247>
 15. Liu, Z., Peter, S.O., Long, M., Weingartner, U., Stamp, P. & Kaeser, O. (2002). A PCR assay for rapid discrimination of sterile cytoplasm types in maize. Crop Science, No. 2, pp. 566-569. <http://doi.org/10.2135/cropsci2002.0566>
 16. Lu, H. & Bernardo, R. (2001). Molecular marker diversity among current and historical maize inbreds Theoretical and Applied Genetics, No. 4, pp. 613-617. <https://doi.org/10.1007/PL00002917>
 17. Molecular biomarker analysis — SSR analysis of maize (E) : ISO/TR 17623:2015. Geneva, 2015.
 18. Nagy, E., Timar, I., Hegyi, Z., Spitko, T. & Marton, L. C. (2009). SSR markers as tools in maize breeding for high starch content. Maydica, No. 2, p. 253. <http://doi.org/10.3389/fpls.2016.00223>
 19. Namorato, H., Miranda, G.V., de Souza, L.V., Oliveira, L.R., DeLima, R.O. & Eder E. (2009). Comparing Biplot Multivariate Analyses with Eberhart and Russell' method for genotype x environment interaction Crop. Breeding and Applied Biotechnology, No. 9, pp. 299-307.
 20. TGP/15 Guidance on the Use of Biochemical and Molecular Markers in the Examination of Distinctness, Uniformity and Stability (DUS). URL: https://www.upov.int/edocs/tgdocs/en/tgp_15.pdf (01.10.2019)
 21. Yadav, V. K. & Singh, I. S. (2010). Comparative evaluation of maize inbred lines (*Zea mays* L.) according to DUS testing using morphological, physiological and molecular markers. Agricultural Sciences, No. 3, p. 131. <http://doi.org/10.4236/as.2010.13016>

Received 01.10.2019

ПРИМЕНЕНИЕ SSR МАРКЕРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПОЛИМОРФИЗМА КУКУРУЗЫ (*ZEА MAYS* L.) В ЭКСПЕРТИЗЕ НА ОТЛИЧИЕ, ОДНОРОДНОСТЬ, СТАБИЛЬНОСТЬ

Л.М. Присяжнюк, С.А. Черний, М.М. Таганцова, С.А. Ткачик

Украинский институт экспертизы сортов растений, Киев
e-mail: prysiazniuk_l@ukr.net

Представлены результаты исследований линий кукурузы по SSR и морфологическим маркерам. Определен полиморфизм исследованных линий кукурузы по 8 SSR маркерам: phi064, umc1448, umc1792, bnlgl782, bnlgl129, phi084, phi015, phi083. Согласно полученным по результатам полимеразной цепной реакции (ПЦР) аллелям, рассчитаны их частоты и индекс полиморфности локуса (PIC). В исследованных линиях идентифицировано от 2 до 9 аллелей в соответствии с использованными маркерами.

Частоты идентифицированных аллелей составляли 0,01—0,72. Наиболее полиморфным оказался маркер *umc1448* (PIC 0,83), наименее полиморфным — *phi015* (PIC 0,46). Высокий PIC имели маркеры *phi064* и *bnlg1782*. Установлено наличие уникальных для исследованных линий аллелей по маркерам *umc1448* — аллель 132 пн, по маркеру *bnlg1782* — аллели 240 и 242 пн. По результатам кластерного анализа на основе степени проявления морфологических признаков определены различия между 91 линией. Одинаковыми по 36 признакам оказались пары линий с различным типом цитоплазмы (фертильная линия и ее стерильный аналог). Генетические дистанции, рассчитанные в соответствии с наличием/отсутствием идентифицированных аллелей, позволили выявить 88 отличных линий. Установлено, что одна пара линий — фертильная линия и ее стерильный аналог — не имеют различий по двум исследованным маркерным системам, кроме типа цитоплазмы, который определяется по наличию пыльцы в полевых условиях. Это значит, что необходимо привлекать как минимум еще один SSR маркер для определения различий в данной выборке линий. Линии, которые оказались одинаковыми по SSR маркерам, отличаются по морфологическим признакам, что указывает на эффективность комплексного подхода к определению различия линий в процессе квалификационной экспертизы на отличие, однородность и стабильность (ООС).

Ключевые слова: *Zea mays* L., SSR маркеры, генетические дистанции, отличие линий.

APPLICATION OF SSR MARKERS FOR THE ESTIMATION OF MAIZE POLYMORPHISM (*ZEa MAYS* L.) IN EXAMINATION ON DISTINCTNESS, UNIFORMITY, STABILITY

L.M. Prisyazhniuk, S.O. Chernii, M.M. Tahantsova, S.O. Tkachyk

Ukrainian Institute for Plant Variety Examination
15 Henerala Rodimtseva St., 03041, Kyiv, Ukraine
e-mail: prisyazhniuk_l@ukr.net

The results of studies of maize lines by SSR and morphological markers are presented. The polymorphism of the studied maize lines was determined by 8 SSR markers: *phi064*, *umc1448*, *umc1792*, *bnlg1782*, *bnlg1129*, *phi084*, *phi015*, *phi083*. According to the PCR results obtained alleles were used to calculate their frequencies and the locus polymorphic information content (PIC). It was identified from 2 to 9 alleles in the studied lines in accordance with the used markers. The frequencies of the identified alleles were 0.01—0.72. It was determined that the *umc1448* marker (PIC 0.83) turned out to be the most polymorphic, the *phi015* (PIC 0.46) the least polymorphic. A high PIC value was noted for the *phi064* and *bnlg1782* markers. The presence of unique alleles in the studied lines was determined for the *umc1448* markers — the 132 bp allele, for the *bnlg1782* marker — alleles with sizes of 240 and 242 bp. As the results of cluster analysis, based on the degree of note of morphological traits, the differences between 91 lines were determined. The pairs of lines with a different type of cytoplasm (fertile line and its sterile analogue) turned out to be identical in 36 traits. It was determined that genetic distances calculated according to the presence/absence of identified alleles revealed 88 distinct lines. It was established that one pair of lines, the fertile line and its sterile analogue, have no differences in the two marker systems studied, except for the type of cytoplasm, which is determined in the field by the presence of pollen. This indicates the need to attract at least one more SSR marker to determine the differences in this sample of lines. It was determined that lines that turned out to be identical in terms of SSR markers are morphologically distinct, which shows the effectiveness of an integrated approach to determining the difference of lines in the process of qualification examination for distinctness, uniformity and stability (DUS).

Key words: *Zea mays* L., SSR markers, genetic distances, line difference.