

УДК 633.15:631.527.51

RAPD-ПОЛИМОРФИЗМ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ (*ZEA MAYS* L.) ХАРЬКОВСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

В. В. КИРИЧЕНКО, Л. Н. ЧЕРНОБАЙ, С. С. КИТАЁВА

Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева НААН
 Украина, 61128 г. Харьков, проспект Московский, 142
 e-mail: kitayova@bk.ru

Цель. Целью данной работы было оценить генетическое разнообразие инбредных линий кукурузы харьковской селекции. **Методы.** Были использованы полевые методы оценки, лабораторный RAPD-анализ, статистический кластерный анализ 58 инбредных линий кукурузы. **Результаты.** Доля полиморфных ампликонов в исследуемой выборке линий варьировала от 63,64 % для праймера OPU-01 до 84,21 % для праймера OF-10 и в среднем составила 75,93 % по всем праймерам. Генетические дистанции, рассчитанные по Нею и Ли варьировали от 0,0020 между образцами Харьковская 155 и UKY 27 до 0,0370 между образцами CM 7 и UKY 14. В среднем генетическая дистанция по всей выборке составила 0,0099. **Выводы.** Был выявлен высокий уровень полиморфизма изучаемых инбредных линий кукурузы харьковской селекции. Было установлено, что группировка линий на основании матрицы генетических дистанций в известной мере объясняет не только общность происхождения линий, но и их биологические характеристики.

Ключевые слова: *Zea mays* L., инбредные линии, полиморфизм, RAPD-анализ.

Введение. Кукуруза (*Zea mays* L.) является одной из наиболее распространенных и продуктивных злаковых культур в мировом земледелии, в том числе и в Украине [1]. Длительность сроков отбора исходного материала и ресурсозатратность является важной проблемой в гибридной селекции кукурузы [2 – 4]. Новые возможности в селекции и семеноводстве возникли благодаря разработке новых молекулярно-генетических методов анализа [5 – 7]. В практику растениеводства введен отбор с помощью маркеров (Marker Assisted Selection – MAS), что свидетельствует о прямом влиянии достижений молекулярной генетики на повышение эффективности решения экономически важных проблем народного хозяйства [2, 7 – 10].

Отбор родительских компонентов для создания гибридов ранее проводился с использованием трудоемких селекционных приемов. Применение же генетических маркеров для оценки генетических взаимоотношений направлено на ускорение селекционного процесса.

В Украине подобная проблематика широко разрабатывается в Селекционно-генетическом институте – Национальном центре семеноведения и сортоизучения под руководством А.А. Белоусова и в Южном биотехнологическом центре растениеводства (г. Одесса) под руководством Ю.М. Сиволапа. Основные направления работ – это прогнозирование уровня развития хозяйственно ценных признаков в популяциях кукурузы на основе связи между молекулярными маркерами и локусами количественных признаков (QTL); и разработка

ДНК-прогнозирования подбора родительских генотипов для получения высокопродуктивных гибридов кукурузы. В ходе данных работ были проанализированы местные популяции, линии чистых зародышевых плазм и инбредные линии кукурузы собственной селекции [2, 7 – 9].

Поскольку ранее молекулярно-генетический полиморфизм линий харьковской селекции не был изучен, целью данной работы было оценить генетическое разнообразие инбредных линий кукурузы харьковской селекции с использованием RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) праймеров.

Материалы и методы

В качестве материала для исследований были использованы 58 инбредных линий кукурузы (*Zea mays* L.) из рабочей коллекции лаборатории селекции и генетики кукурузы Института растениеводства им. В.Я. Юрьева НААН (табл. 1).

Выделение ДНК проводили цетавлонным методом из смеси 6–10 зрелых семян кукурузы каждого образца [11].

Аmplификацию проводили в 20 мкл буферной смеси, которая включала 20 нг геномной ДНК, 0,2 мкл соответствующего праймера, а также наборы для ПЦР GenePak™ PCR Core.

Аmplификацию проводили на четырехканальном программируемом термостате ТП4-ПЦР-01-«Терцик» при следующих условиях: 1 цикл – денатурация при 94 °С – 5 мин.; 45 циклов: 94 °С – 1 мин., отжиг – 36 °С – 1 мин., элонгация – 72 °С – 2 мин; 1 цикл – дорепликация, 72 °С – 7 мин. Разделение продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 1,5 % агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Как буферную среду геля использовали трис-ЭДТА-боратную буферную систему – 0,09 М Трис, 0,09 М H₃BO₃, 0,003 М ЭДТА (рН 8,3) [11].

В работе было использовано 8 праймеров, разработанных фирмой Operon Technologies (табл. 1). Праймеры были отобраны по литературным данным. Основным критерием отбора был высокий уровень полиморфизма [4, 10, 12, 13].

Визуализацию продуктов амплификации осуществляли с помощью трансиллюминатора TCP-20 MC с последующим фотографированием гелей с использованием красного светофильтра. Как маркер для определения размеров амплифицированных фрагментов использовали 1 kb DNA ladder.

Статистическая обработка молекулярных данных: вычисление молекулярной массы продуктов амплификации проводили с помощью программного пакета «TotalLab TL120».

Таблица 1. Праймеры использованные в работе

Праймер	Нуклеотидная последовательность
OAC-20	ACGGAAGTGG
OF-10	GGAAGCTTGG
OP-04	AATGCGGGAG
OPA-11	CAATCGCCGT
OPP-10	TCCGCGCTAC
OPU-01	ACGGACGTCA
OPW-04	CAGAAGCGGA
OPZ-04	AGGCTGTGCT

По результатам анализа были составлены бинарные матрицы по каждому праймеру, в которых указывалось присутствие (1) или отсутствие (0) фрагментов с одинаковой молекулярной массой на электрофореграмме. Каждый ампликон рассматривался как отдельный генетический локус.

Кластеризацию и построение дендрограммы, демонстрирующей близкородственность линий, проводили методом Варда с помощью пакета программ Statistica 6.0 на основании матрицы генетических дистанций, рассчитанных по Нею и Ли.

Результаты и обсуждения

Использованные в работе инбредные линии кукурузы характеризовались изменчивостью по признакам: тип зерна, время от всходов до цветения и принадлежали к пяти группам спелости (табл. 2)

Обобщение приведенных в таблице данных свидетельствует о том, что по продолжительности вегетационного периода исследуемые инбредные линии распределились следующим образом: раннеспелая группа – 9,5 % линий, среднеранняя –

Таблица 2. Биологические характеристики инбредных линий, использованных для исследования

№ в эксперименте	Название линии	Тип зерна	Время до цветения, сутки	Группа спелости
1	Харьковская 125 МВ	Полузубовидный	57	Среднеранняя
2	УКУ 1	Зубовидный	68	Среднепоздняя
3	УКУ 2	Полузубовидный	68	Среднепоздняя
4	Харьковская 523 МВ	Полузубовидный	59	Среднеранняя
5	УКУ 3	Кремнистый	68	Среднепоздняя
6	ОС 3	Зубовидный	55	Раннеспелая
7	УКУ 4	Кремнистый	58	Среднеранняя
8	УКУ 5	Зубовидный	69	Среднепоздняя
9	УКУ 6	Зубовидный	69	Среднепоздняя
10	УКУ 7	Кремнистый	63	Среднеспелая
11	УКУ 8	Кремнистый	61	Среднеспелая
12	УКУ 9	Кремнистый	62	Среднеспелая
13	УКУ 10	Полузубовидный	64	Среднеранняя
14	УКУ 11	Зубовидный	60	Среднеспелая
15	УКУ 12	Полузубовидный	60	Среднеранняя
16	УКУ 13	Полузубовидный	60	Среднеранняя
17	УКУ 14	Зубовидный	58	Среднеранняя
18	УКУ 16	Кремнистый	72	Позднеспелая
19	УКУ 17	Полузубовидный	59	Среднеранняя
20	УКУ 18	Кремнистый	64	Среднеспелая
21	УКУ 19	Зубовидный	63	Среднеспелая
22	УКУ 20	Кремнистый	64	Среднеспелая
23	УКУ 21	Кремнистый	58	Среднеранняя
24	УКУ 22	Кремнистый	57	Среднеранняя
25	УКУ 23	Кремнистый	70	Среднепоздняя
26	УКУ 24	Полузубовидный	60	Среднеранняя
27	УКУ 25	Зубовидный	73	Позднеспелая
28	Со 148	Зубовидный	58	Среднеранняя
29	Пр 14	Кремнистый	60	Среднеранняя
30	IG 341	Зубовидный	67	Среднепоздняя
31	IG 421	Полузубовидный	63	Среднеспелая
32	Куш	Зубовидный	55	Раннеспелая
33	Харьковская 215 зМ	Зубовидный	59	Среднеранняя

Продолжение табл. 2

№ в эксперименте	Название линии	Тип зерна	Время до цветения, сутки	Группа спелости
34	ХА 402	Кремнистый	67	Среднепоздняя
35	ХА 408	Зубовидный	70	Среднепоздняя
36	ХА 418	Кремнистый	69	Среднепоздняя
37	Харьковская 152	Полузубовидный	63	Среднеспелая
38	УКУ 26	Зубовидный	51	Раннеспелая
39	Харьковская 144	Кремнистый	59	Среднеранняя
40	Харьковская 233	Кремнистый	54	Раннеспелая
41	Харьковская 242	Зубовидный	56	Среднеранняя
42	Харьковская 246	Полузубовидный	56	Среднеранняя
43	ХА 410	Кремнистый	67	Среднепоздняя
44	Харьковская 212 Мс	Полузубовидный	58	Среднеранняя
45	ГК 26 МВ	Зубовидный	59	Среднеранняя
46	Харьковская 126 МВ	Полузубовидный	59	Среднеранняя
47	Харьковская 164	Полузубовидный	60	Среднеранняя
48	Харьковская 210	Зубовидный	59	Среднеранняя
49	Харьковская 174	Полузубовидный	58	Среднеранняя
50	См 7	Кремнистый	50	Раннеспелая
51	S 61	Полузубовидный	54	Раннеспелая
52	Харьковская 297	Зубовидный	63	Среднеспелая
53	УКУ 27	Кремнистый	64	Среднеспелая
54	Харьковская 155	Кремнистый	59	Среднеранняя
55	ХА 412	Полузубовидный	62	Среднеспелая
56	УКУ 28	Зубовидный	58	Среднеранняя
57	Харьковская 203	Кремнистый	56	Среднеранняя
58	ДС 103	Кремнистый	58	Среднеранняя

Таблица 3. Результаты исследований с использованием RAPD праймеров

Праймер	Доля полиморфных амплионов, %	Кол-во полиморфных полос, шт	Общее кол-во полос, шт	Размер амплифицированных фрагментов, п.н.
ОАС-20	72,73	8	11	656 – 2 703
OF-10	84,21	16	19	126 – 2763
OP-04	80,00	8	10	440 – 3 288
OPA-11	72,73	8	11	376 – 2 896
OPP-10	77,78	7	9	317 – 2 369
OPU-01	63,64	7	11	574 – 2 610
OPW-04	78,57	11	14	574 – 2 987
OPZ-04	77,78	7	9	668 – 2 618

40,5%, среднеспелая группа – 19,5 %, среднепоздняя – 26,15 % и позднеспелая группа спелости – 4,8 % (табл. 2).

Оценка типа зерна показала, что кремнистый тип зерна был у 36,2 %, зубовидный – у 34,5 %, полузубовидный – у 29,3 % исследуемых образцов (табл. 2).

Доля полиморфных ампликонов в исследуемой выборке линий варьировала от 63,64 % для праймера OPU-01 до 84,21 % для праймера OF-10 и в среднем составила 75,93 % по всем праймерам (табл. 3). Это значение согласуется со значениями, наблюдавшимися в других современных исследованиях [4, 12, 13].

В ходе исследования установлено наличие 94 локусов. Амплифицировались от 9 (для праймеров OPP-10, OPZ-04) до 19 локусов (для праймера OF-10). Молекулярный вес амплифицированных фрагментов варьировал от 126 до 3288 пар нуклеотидов (табл. 3).

Были обнаружены мономорфные ампликоны, которые отмечены на рисунке 1.

Также были найдены уникальные компоненты. Например, ампликон с длиной 3203 пар нуклеотидов был идентифицирован у образца UKY 20 при использовании праймера OAC-20.

Генетические дистанции, рассчитанные по Нею и Ли варьировали от 0,0020 между образцами Харьковская 155 и UKY

27 до 0,0370 между образцами CM 7 и UKY 14. В среднем генетическая дистанция по всей выборке составила 0,0099.

Дендрограмма, построенная методом Варда по матрице генетических расстояний инбредных линий, представлена двумя кластерами.

Первый кластер состоит из четырех групп. Второй кластер содержит только 1 группу линий (рис. 2).

При более детальном рассмотрении кластеров можно отметить группировку линий относительно их филогенетического происхождения.

В группе 1 первого кластера рядом расположились линии, имеющие общего предка из США BS 16 – это образцы UKY 5 и UKY 16, а также сестринские линии, имеющие в качестве предка польскую линию S 61 плазмы Vigor и линию из США Mo 17 – это образцы UKY 11 и UKY 12. В этой группе в основном расположились линии с зубовидным типом зерна среднеранней группы спелости с показателем суток до цветения в среднем 58 суток.

Вторая группа первого кластера наиболее многочисленная. Она включает сестринские линии, имеющие в качестве предка экзотическую линию Wofo. Это образцы UKY 3, UKY 6, UKY 17 и UKY 18. Также рядом на дендрограмме находятся линии, имеющие в качестве общего предка линии

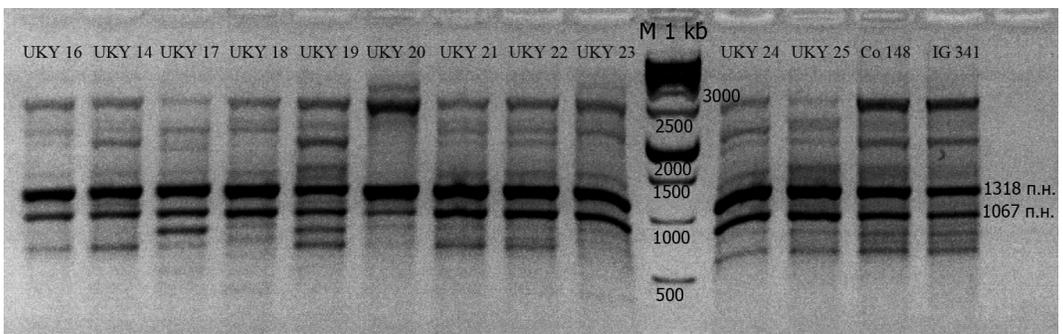


Рис. 1. Электрофореграмма RAPD-спектров 13 образцов кукурузы, полученная при использовании праймера OAC-20. Цифрами обозначена длина компонентов (пар нуклеотидов)

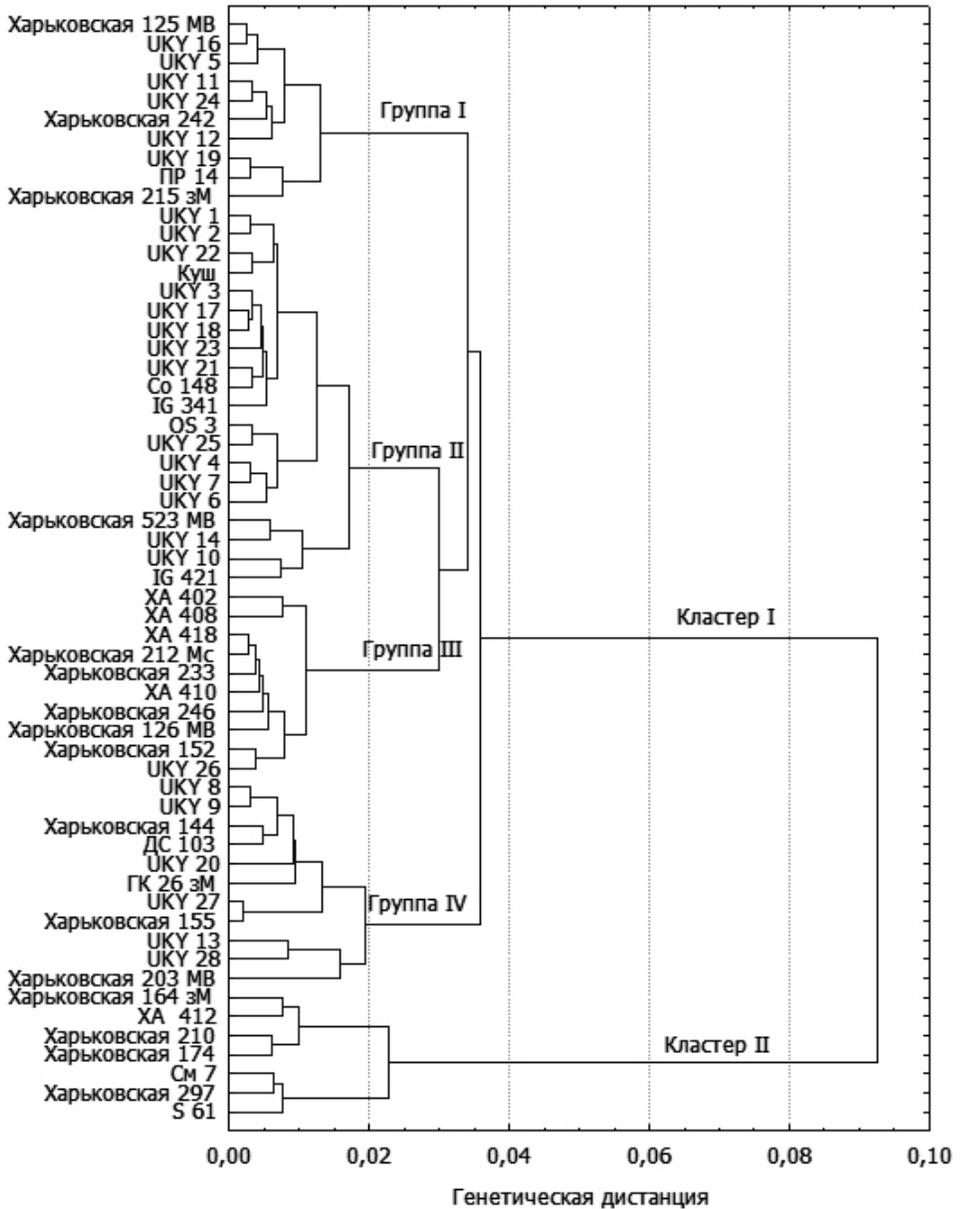


Рис. 2. Дендрограмма 58 инбредных линий кукурузы, построенная методом Варда на основании матрицы генетического сходства

из США BSSS – это образцы UKY 22 и UKY 23. В пределах одной группы также расположились линии, которые в качестве предка имеют линию Ух 408 плазмы Iodent – UKY 1, UKY 21 и UKY 3, из них первые две

являются сестринскими. Также в этой группе находятся линии, которые имеют в качестве общего предка линию из США В 73, которую относят к плазме Reid – это линии UKY 1 и UKY 21. В одной группе рас-

Таблица 4. Распределение линий внутри кластеров

№ кластера, группы	Линии	Распределение линий				
		группа спелости		тип зерна		
		доля образцов	χ^2	доля образцов	χ^2	
Кластер 1	Группа 1	1, 8, 14, 15, 18, 21, 26, 29, 33, 41	60 % раннеспелые и среднеранние	4,0	90 % зуб. и п/зуб.	64,0*
	Группа 2	2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 13, 17, 19, 20, 23, 24, 25, 27, 28, 30, 31, 32	55 % среднеспелые и среднепоздние	1,0	65 % зуб. и п/зуб	9,0*
	Группа 3	34, 35, 36, 37, 38, 40, 42, 43, 44, 46	40 % среднеранние	4,0	70 % зуб. и п/зуб.	36,0*
	Группа 4	11, 12, 16, 22, 39, 45, 53, 54, 56, 57, 58	54,5 % раннеспелые и среднеранние	0,8	72,7 % кремн.	20,6*
Кластер 2	47, 48, 49, 50, 51, 52, 55	71,4 % раннеспелые и среднеранние	18,3*	85,7 зуб. и п/зуб	51,0*	

* – наличие существенных различий при критическом значении $\chi^2 = 7,88$

положились линии UKY 2, UKY 3, UKY 14 с общим компонентом из США Bs 16. Общий родительский компонент, польская линия S 72, присущ линиям UKY 2, UKY 10 и UKY 14.

В третьей группе расположились линии, которые относятся к среднепоздней и среднеспелой группам спелости и характеризуются эректоидным расположением листьев. Это линии ХА 402, ХА 408, ХА 410 и ХА 418.

В четвертой группе первого кластера на дендрограмме располагаются линии, полученные из популяций – это линии UKY 8, UKY 9 и UKY 27. В этой группе также рядом расположились две сестринские линии – это линии ДС 103 и Харьковская 203. В данной группе сгруппировались линии с кремнистым типом зерна среднеспелой и среднеранней группами спелости с показателем дней до цветения 62 суток.

При рассмотрении второго кластера закономерность расположения линий относительно их филогенетических отношений не выявлена. Можно отметить, что в данном кластере в основном расположились линии ранней и среднеранней групп

спелости и с зубовидным и полузубовидным типом зерна.

Кластеры имеют различную наполненность образцами с различным типом зерна и группами спелости (табл. 4).

С помощью критерия χ^2 -квадрат была проверена гипотеза случайности распределения образцов с известным типом зерна и группой спелости для подтверждения формирования кластеров относительно биологических характеристик линий.

По признаку тип зерна гипотеза независимости распределения отвергается для каждой группы соответствующих кластеров. Аналогичная нулевая гипотеза для признака группа спелости принимается для всех групп первого кластера и отвергается для второго кластера.

Следовательно, группировка линий на основании матрицы генетических дистанций в известной мере объясняет не только общность происхождения линий, но и их биологические характеристики.

Выводы

Таким образом, при помощи RAPD-анализа был выявлен высокий уровень по-

лиморфизма изучаемых инбредных линий кукурузы харьковской селекции, что указывает на их широкую генетическую базу. Также с помощью молекулярно-генетического анализа определены филогенетические взаимоотношения между изучаемыми образцами, что соответствует данным родословных линий.

Полученные генетические дистанции между образцами в дальнейшем будут использованы в селекционной программе для максимального использования генетических ресурсов и для получения гибридов с высоким уровнем гетерозиса.

Список литературы

1. Циков В. С. Кукуруза: технология, гибриды, селекция. – Днепропетровск: Зоря. – 2003. – 296 с.
2. Календарь Р. Н., Глазко В. И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиология и биохимия культурных растений. – 2002. – Т. 34, № 4. – С. 279–296.
3. Якушева Н. В. Проблема подбора родительских пар для скрещиваний // Научно-информационный бюллетень ВНИИР им. Н.И.Вавилова. – СПб, 2001. – Вып. 240. – С. 26–29.
4. Heun M., Helentjaris T. Inheritance of RAPDs in F1 hybrids of corn // Theoretical and Applied Genetic. – 1993. – Vol. 85. – P. 961–968.
5. Гостимский С. А., Кокаева З. Г., Коновалов Ф. А. Изучение организации и изменчивости генома растений с помощью молекулярных маркеров // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 4. – С. 480–492.
6. Малышев С. В., Картель Н. А. Молекулярные маркеры в генетическом картировании растений // Молекулярная биология. – 1997. – Т. 31, № 62. – С. 197–208.
7. Сиволап Ю. М. Геном рослин і молекулярна селекція // Селекція і насінництво. – 2008. – Вип. 96. – С. 34–40.
8. Кожухова Н. Э., Сиволап Ю. М. Молекулярные маркеры в генетико-селекционных исследованиях кукурузы // Цитология и генетика. – 2006. – № 5. – С. 82–93.
9. Сиволап Ю. М., Кожухова Н. Е. ДНК-технології у дослідженні генетичного потенціалу кукурудзи // Селекція і насінництво. – 2008. – Вип. 96. – С. 113–120.
10. Warburton M., Xianchun X., Ambriz S. Use of molecular markers in maize diversity at cimmyt // Seventh Eastern and Southern Africa Region

Maize Conference 11th-15th February, 2001. – P. 130–133.

11. Ausubel P.M., Brent R., Kingston R. E. et al. Current protocols in molecular biology– New York: Wiley, 1997. – 630 p.
12. Lanza L.B., De Souza C. L. Jr, Ottoboni L. M., Vieira L. C. et al. Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers // Theoretical and Applied Genetic. – 1997. – Vol. 94. – P.1023–1030.
13. Carvalho V. P., Ruas C. F., Ferreira J. M., Moreira R. M. P. et al. Genetic diversity among maize (*Zea mays* L.) landraces assessed by RAPD markers // Genetics and Molecular Biology. – 2004. – Vol. 27, №2 – P. 228–236.

Представлена Е.Н. Бублик

Поступила 22.12.2011

RAPD-ПОЛІМОРФІЗМ ІНБРЕДНИХ ЛІНІЙ КУКУРУДЗИ (*ZEa MAYS* L.) ХАРКІВСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

В.В. Кириченко, Л.М. Чернобай, С.С. Китаєва

Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН
Україна, 61128 м. Харків, проспект Московський,
142
e-mail: kitayova@bk.ru

Мета. Метою даної роботи було оцінити генетичне різноманіття ліній харківської селекції. **Методи.** Були використані польові методи оцінки, лабораторний RAPD-аналіз, статистичний кластерний аналіз 58 інбредних ліній кукурудзи. **Результати.** Частка поліморфних ампліконів в досліджуваній вибірці ліній варіювала від 63,64 % для праймера OPU-01 до 84,21 % для праймера OF-10 і в середньому склала 75,93 % за всіма праймерами. Генетичні дистанції, розраховані за Неєм і Лі варіювали від 0,0020 між зразками Харківська 155 і UKY 27 до 0,0370 між зразками CM 7 і UKY 14. В середньому генетична дистанція по всій вибірці склала 0,0099. **Висновки.** Був встановлений високий рівень поліморфізму досліджуваних інбредних ліній кукурудзи харківської селекції. Було встановлено, що угруповання ліній на підставі матриці генетичних дистанцій певною мірою пояснює не тільки спільність походження ліній, а й їхні біологічні характеристики.

Ключові слова: *Zea mays* L., інбредні лінії, поліморфізм, RAPD-аналіз.

RAPD-POLYMORPHISM IN MAIZE (*ZEA MAYS L.*) INBRED LINES OF KHARKOV BREEDING

V. V. Kirichenko, L. N. Chernobay, S. S. Kitayova

Plant Production Institute nd.a. V.Ya.Yuriev of NAAS
Ukraine, 61128, Kharkov, Moskovsky ave, 142
e-mail: kitayova@bk.ru

Aim. The purpose of this study was to evaluate the genetic diversity of Kharkov-selected inbred lines of maize, because the molecular-genetic polymorphism of these lines has not been studied before. **Methods.** 58 inbred lines of maize were investigated. The methods of field estimation, laboratory RAPD-analysis, statistic cluster analysis were used. **Results.** The percentage of polymorphic amplicons in the studied sample

lines varied from 63.64 % (OPU-01 primer) to 84.21 % (OF-10 primer) at the average 75.93 %. The genetic distances measured by Nei and Li varied from 0.0020 between Kharkovskaya 155 and UKY 27 specimens to 0.0370 between SM 7 and UKY 14 ones and averaged 0.0099 in the sample. **Conclusions.** High level of polymorphism in Kharkov-selected inbred lines of maize was revealed. We established that grouping of the lines based on the genetic distances array may explain in a sense not only the generality of lines origin, but their biological characteristics as well.

Key words: *Zea mays L.*, inbred lines, polymorphism, RAPD-analysis.