

УДК 683.15:631.524:575.113:542.1

А. А. БЕЛОУСОВ, д-р биол. наук, зав. лаб.,
В. М. СОКОЛОВ, чл.-кор. НААН, дир. ин-та,
Ю. М. СИВОЛАП, акад. НААН, д-р биол. наук, зав. отд.
СГИ–НЦНС, Одесса
e-mail: belanat@ukr.net

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДНК-МАРКЕРОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ САМООПЫЛЕННЫХ ЛИНИЙ И ГИБРИДОВ КУКУРУЗЫ

Освещены разработанные в Селекционно-генетическом институте принципы отбора в популяциях кукурузы локусов ценных количественных признаков с помощью ДНК-маркеров. Показано, что 2-локусная система SSR-маркеров оказалась наиболее эффективной для генетического улучшения популяции по важным агрономическим признакам — продуктивности и высоте растения, длине зерновки. На основе генетически улучшенной популяции разработан метод прогнозирования важных фенотипических параметров популяции следующей генерации, сформирован генофонд маркированных линий. На их основе созданы первые в Украине гибриды кукурузы с использованием технологии молекулярных маркеров: один из них — гибрид Диалог, зарегистрирован в 2009 году, второй — Диалог 300 проходит государственное сортоиспытание с 2012 года.

Ключевые слова: кукуруза, ДНК-маркеры, линии, популяции, гибриды.

Введение. Потребности современного агрорынка гибридных семян кукурузы ставят перед селекционерами задачи значительного ускорения селекционного процесса и повышения его эффективности. Выведение большого количества новых линий, создание на их основе гибридов, их последующая оценка требуют затрат значительных ресурсов. Важным шагом на пути ускорения селекционного процесса и частичного решения других поставленных задач стало использование гаплоидной технологии создания новых линий и коммерческих гибридов кукурузы [1, 2].

Одним из путей повышения эффективности селекционного процесса является улучшение популяций, в том числе и дигаплоидных, по частоте локусов ценных количественных признаков (QTL) [3, 4, 5]. На основе таких генетически улучшенных в короткий срок популяций можно создавать ценные инбредные линии с улучшенными агрономическими признаками и высокопродуктивные гибриды кукурузы [6].

Задача нашего исследования — показать, что: 1) маркерный отбор в популяции инбредных рекомбинантных линий (ИРЛ) позволяет обес-

печить за один цикл отбора значительное ее генетическое улучшение; 2) обосновать разработанный метод прогнозирования уровня важных фенотипических параметров в популяции последующей генерации; 3) представить фенотипические параметры инбредных линий, созданных на основе улучшенной популяции; 4) охарактеризовать гибриды кукурузы, впервые созданные в Украине с использованием современных MAS-технологий, которые уже зарегистрированы или проходят государственное испытание.

Материалы и методы. Исходным материалом служила расщепляющаяся гибридная популяция (ГК26 x Мо17) F_2 , исходные родительские линии ГК 26 и Мо 17, а также линии-тестеры: Од308 МВ, Од329 и Од221 МВ. При отборе в популяции целевыми служили в частности такие признаки: зерновая продуктивность растения, высота растения, длина зерновки. Для детекции полиморфизма ДНК использовали маркеры SSR-типа. Методика выделения ДНК, амплификации SSR-локусов и все последующие алгоритмы описаны в ранее опубликованных исследованиях [6, 7].

Результаты исследования. Обобщающим результатом многолетних исследований являются сформулированные положения об эффективности отбора на основе разработанной маркерной системы: 1) лучшим типом является кодоминантные SSR-маркеры; 2) маркер в наибольшей степени выполняет свои функции, когда находится в гомозиготном состоянии; 3) сцепленные маркерные локусы являются хорошим инструментом для решения данной задачи; 4) залогом успешного функционирования всей маркерной системы является корректное определение селекционной ценности маркерных аллелей путем вычисления и сравнения их «селективного веса» [7]. Отбор QTL в популяциях F_2 – F_3 на основе SSR позволил получить значительный генетический эффект в популяции 1-го цикла отбора, в особенности по признакам: продуктивность растения, высота растения и длина зерновки (табл. 1).

После 7–8 лет инбридинга в маркерной популяции первого цикла отбора С1-М было получено около 200 инбредных рекомбинантных линий с хорошими агрономическими признаками и высокой комбинационной способностью. Характеристика лучших из них представлена в таблице 2.

Фенотипические и генотипические параметры лучших маркированных линий превышают аналогичные показатели исходных родительских форм, которые отличаются хорошими агрономическими свойствами и высокой комбинационной способностью. Генофонд маркированных линий был тщательно оценен в топкроссных скрещиваниях с тестерами разных гетерозисных групп. В течение нескольких лет ежегодно изучали 450–500 тестерных гибридов в разных почвенно-климатических зонах. На завершающем этапе — экологическом испытании лучшие гибриды изучали в 8 экологических точках страны (табл. 3).

Таблица 1

Сдвиг и генетический прирост маркерной популяции (С1-М) после одного цикла маркерного отбора по признакам «высота растения», «длина зерновки», «продуктивность растения», 2003–2004 гг.

Статистический показатель	Популяция		Ответ популяции	
	Со	С1-М	R	ΔG , %
Высота растения, см				
$X \pm S\bar{x}$	123 \pm 1,65	135,1 \pm 1,23	12,1 ^{***}	9,1
S	16,2	13,6		
Lim	115–131	130–140		
Длина зерновки, см				
$X \pm S\bar{x}$	1,4 \pm 0,03	1,46 \pm 0,02	0,06	3,9
S	0,27	0,23		
Lim	1,2–1,5	1,4–1,5		
Продуктивность растения, г				
$X \pm S\bar{x}$	48,4 \pm 3,36	57,2 \pm 1,37	8,8 ^{**}	16,1
S	29,6	21,9		
Lim	30,2–59,0	47,0–64,3		
, * — существенно при $P \leq 0,01$ и $P \leq 0,001$ соответственно				

Таблица 2

Гено-фенотипическая характеристика лучших маркированных линий (ЛМ), 2010–2011 гг.

Линия	Высота раст., см	Урожайность, т/га	Диаметр початка, см	Длина зерновки, см	Урожайность зерна	
					ОКС	варианса СКС
ГК 26	158	1,76	3,0	1,92	2,18	3,28
Мо17	173	2,01	3,0	1,45	1,99	3,65
ЛМ245/113	161	1,59	2,83	1,51	1,78	3,98
ЛМ268/111	170	1,67	3,02	1,8	3,19	3,47
ЛМ326/122	159	1,89	3,01	1,99	1,33	3,28
ЛМ163/113	172	1,92	3,12	2,0	2,29	3,10
ЛМ282/114	174	2,11	3,41	1,96	1,01	4,72
ЛМ45/412	176	2,17	3,02	2,01	3,19	6,34
НСР ₀₅	5,5	0,09	0,11	0,08		

Лучшим гибридом в зоне Степи оказался ОБМ 377, который по урожаю зерна превысил национальный стандарт и другие тесткроссы. В благоприятных условиях Лесостепи почти все изученные гибриды существенно превысили стандарт. Однако по всем 8 точкам Степи и Лесостепи только 3 гибрида (ОБМ 377, ОБМ 383, ОБМ 380) в среднем достоверно превысили стандарт по урожайности зерна.

На базе лучшего из изученных в широком экологическом испытании простого гибрида ОБМ 377 получен простой модифицированный ги-

брид, который под названием Диалог был передан в государственное сортоиспытание. В 2008 году Диалог — первый в Украине гибрид, полученный с использованием технологии ДНК-маркеров, был занесен в Государственный реестр сортов растений [8].

Таблица 3

Средний (по 8 экологическим точкам) урожай зерна гибридов кукурузы, полученных на основе отбора линий в популяции С1-М с использованием молекулярных маркеров, 2010–2011 гг.

Гибрид	Урожай зерна, т/га		Среднее		
	Степь (5 пунктов)	Лесостепь (3 пункта)	урожай зерна, т/га	отклонение от стандарта	
				т/га	%
ОБМ 377	6,22	9,06	6,93	0,5	7,2
ОБМ 378	5,87	8,59	6,55	0,12	1,8
ОБМ 379	5,56	10,0	6,67	0,24	3,6
ОБМ 380	5,92	9,24	6,75	0,32	4,7
ОБМ 381	5,64	9,23	6,53	0,1	1,5
ОБМ 382	5,67	7,88	6,22	-0,21	-3,4
ОБМ 383	6,05	9,38	6,88	0,45	6,5
ОБМ 384	5,88	8,76	6,60	0,17	2,6
ОБМ 385	5,93	8,15	6,48	0,05	0,8
ОБМ 386	6,04	8,59	6,67	0,24	3,6
Хмельницкий, стандарт	6,12	7,38	6,43	–	–
НСР ₀₅	0,3	0,69		0,32	

Таблица 4

Характеристика гибрида кукурузы Диалог по данным государственного сортоиспытания при занесении его в Государственный реестр, 2008 г.

Признак, показатель	Гибрид Диалог	Национальный стандарт
Урожайность, т/га	8,09	6,65
Гарантированная прибавка:	–	–
т/га	1,44	–
%	21,2	–
НСР ₀₅	0,48	–
Вегетационный период, дней	133	134
Уборочная влажность, %	26,7	27,6
Выход зерна, %	78,6	78,9
Высота растения, см	226	242
Устойчивость к засухе, балл	8,8	8,3
Устойчивость к полеганию, балл	9,0	8,5
Устойчивость к пузырчатой головне, балл	9,0	9,0
Содержание белка, %	9,6	10,1
Содержание крахмала, %	73,5	73,7

Представленные данные свидетельствуют о том, что новый гибрид, полученный с использованием инновационной MAS-технологии, значительно (на 21,2 %) превышает стандарт по урожайности зерна, а также по устойчивости к засухе и болезням. Кроме того, у него более низкая уборочная влажность зерна — важная составляющая энергосберегающей технологии.

Последующая работа по селекционному использованию генетического потенциала созданных маркированных линий позволила получить серию новых высокопродуктивных гибридов. Лучший из них под названием Диалог 300 был передан на государственное испытание в 2012 году.

Обсуждение. Результаты проведенного исследования, как и работы других авторов, показывают, что современные MAS-технологии могут успешно использоваться для генетического улучшения популяций как одного из наиболее важных источников современных исходных селекционных материалов. В нашем исследовании с использованием системы микросателлитных маркеров наибольший селекционный сдвиг популяции оказался по признакам «высота» и «продуктивность растения» — 9,1 и 16,1 % при малом объеме популяции ($N=200$) и, что особенно важно, при относительно низких значениях коэффициента наследуемости в узком смысле, $h^2=0,29$ и $0,37$ соответственно. Эти данные согласуются с результатами Hospital et al. [9], Moreau et al. [10] и Moreno-Gonzales [11], которые путем компьютерного моделирования показали зависимость эффективности маркерного отбора от соотношения таких параметров, как размер популяции, уровень коэффициента наследуемости и др.

Выводы. Несмотря на определенные успехи, применение MAS-технологий в селекционной практике весьма ограничено, особенно в Украине. Stromberg et al. [12] сообщил о положительных результатах сравнения продуктивности обычных тесткроссов и аналогичных MAS-продуктов. Представленные результаты исследования показывают, что использование ДНК-маркеров может быть эффективным для генетического улучшения популяций как наиболее важного источника создания инбредных или дигаплоидных линий кукурузы. Популяции, улучшенные даже в результате одного цикла маркерного отбора, могут успешно использоваться для получения ценных линий и создания на их основе высокопродуктивных гибридов. Практические результаты наших исследований — первые в Украине гибриды кукурузы, созданные с использованием молекулярных маркеров, Диалог и Диалог 300, первый из которых зарегистрирован, а второй успешно проходит государственное сортоиспытание, — подтверждают эту возможность.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРЫ

1. Schmidt W. Hybridmaiszucht bei der KWS SAAT AG. Bericht über die 54. Tagung der Vereinigung der Pflanzzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 2003, Gumpenstein. — 2004. — P.1–6.
2. Seitz G. The use of doubled haploids in corn breeding. In; Proceedings of the 41st annual Illinois corn Breeders' School, 2005. Urbana-Champaign. — 2005. — P. 1–7.
3. Доменюк В. П., Белоусов А. А., Сиволап Ю. М. Маркерний аналіз кількісних ознак кукурудзи при допомозі ISSR-ПЦР // Генетика. — 2002. — Т. 38, № 10. — С.1370–1378.
4. Белоусов А. О., Сиволап Ю. М., Соколов В. М., Доменюк В. П. Спосіб прогнозування рівня розвитку кількісних ознак у популяціях злакових культур. — Патент на винахід № 86180. Бюл. Держреєстра пат. України. — 2009. — № 7. — 9 с.
5. Букреева Н. І., Белоусов А. О., Сиволап Ю. М. Кластерно-кореляційний аналіз популяцій рекомбінантних ліній і гібридів кукурудзи на основі SSR-ПЛР// Вісник ОНУ. — 2011. — Т.16, вип. 6. — С. 21–31.
6. Belousov A. A., Sokolov V. M., Sivolap Yu. M., Domennyuk V. P., Storcheus N. I. Heterosis level of maize hybrids developed by using DNA technologies // Acta Agronomica Hungarica 54. — 2006. — P. 389–396.
7. Сиволап Ю. М., Соколов В. М., Белоусов А. О., Доменюк В. П. Генетичне поліпшення популяцій кукурудзи шляхом добору за ДНК-маркерами локусів кількісних ознак: Методичні рекомендації. — Одеса, 2003. — 12 с.
8. Державний реєстр сортів рослин, придатних до поширення в Україні. — 2009.
9. Hospital F., Moreau L., Lacoudre F., Charcosset A., Gallais A. More on the efficiency of marker-assisted selection // Theor. Appl. Genet., 95. — 1997. — P. 1181–1189.
10. Moreau L., Charcosset A., Hospital F., Gallais A. Marker-assisted selection efficiency in populations of finite size // Genetics. — 1997. — 148. — P. 1353–1365.
11. Moreno-Gonzales J. Molecular marker and heterosis. In: Melchinger A. E., Coors J. G.(eds), The Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops. Proc. of an intern. Symp., CIMMYT, Mexico, 1997. — 1999. — P. 257–268.
12. Stromberg L. D., Dudley J. W., Rufener G. K. Comparing conventional early generation selection with molecular marker assisted selection in maize // Crop Sci. — 1994. — 34. — P.1221–1225.

Поступила 13.11.2013 г.

UDC 683.15:631.524:575.113:542.1

Belousov A. O., Sokolov V. M., Sivolap Yu. M. Collected scientific articles of PBGI-NCSCI (in Russian). 2013. Issue 22 (62).

USING DNA-MARKERS FOR DEVELOPING OF THE MAIZE INBRED LINES AND HYBRIDS

In the paper the principles for selection of the valuable QTL in maize population by DNA markers have been presented. The task was to estimate the efficiency of DNA-marker technology for intrapopulation selection and study the hybrid performance, produced from marker-derived inbreds. Marker assisted selection and subsequent selfing of selected progenies were conducted for 17 quantitative traits on the base of F₂(GK 26 x Mo 17) population. Among the different kind of DNA markers simple sequence repeat (SSR) markers have been used to identify QTL, responsible, in particular, for plant productivity, plant height, grain height. The DNA extraction, SSR genotyping and QTL analysis were conducted in accordance with the procedure, described by Sivolap et al. (2003), Belousov et al. (2006).

Some models of marker systems were developed. Two locus system on the base of linked SSR-markers in homozygous condition proved to be the most effective. The genetic improvement population effect (ΔG) on the base of this marker system type ranged from 9.1 up to 17.6 % depends on phenotypic trait, h^2 level and some other conditions. On the base of the proposed selection model the foretell method of population QTL level development was elaborated. It will be able to predict the level development of the evaluable traits in the next generation (Белоусов и др., 2009).

After six cycles the best marker genotypes inbreeding in the C1-M population, nearly 200 recombined inbred lines (RILs) were derived and tested for general and specific combining ability. For this purpose they were crossed with 3 testers unrelated to the genotype of the initial population and belonging to varies heterotic gropes. About 500 hybrids were estimated for grain productivity and the heterosis level. On the final stage — ecological trials, the best hybrids were tested in 8 ecological locations, which covered through the Steppe (5 locations) and Forest steppe (3 locations) zones of Ukraine. Only one testcross hybrid — ОБМ 377 outyielded significantly standard in Steppe zone. However, in the Forest-Steppe 6 hybrids significantly exceeded the check on average over all testing locations. The maximum yield was exhibited by two hybrids — ОБМ 386 (10.61 t/ha) and ОБМ 383 (10.38 t/ha). Nevertheless, on average over all locations of both zones the best testcross was ОБМ 377. It proved to be the most adaptable hybrid and showed the highest level of competitive heterosis (7.2 %).

On the base of the testcross ОБМ 377 the single modified hybrid was made and submitted to the state variety tasting. As a result of the success-

ful trial new hybrid under commercial name «Dialog» was put into the State Register in 2008 year as the first hybrid of maize in Ukraine, created by using the DNA-marker technology. The subsequent work on breeding applying of the elaborated MAS-procedure and created the marker line genetic potential gave it possible to breed a variety of the new high productive hybrids. The best of them under the title «Dialog 300» was passed to the state variety testing in 2012 year.

Tables — 4. Bibliography — 12.

УДК 683.15:631.524:575.113:542.1

Белоусов А. О., Соколов В. М., Сиволап Ю. М. Збірник наукових праць СГП–НЦНС. 2013. Вип. 22 (62).

ВИКОРИСТАННЯ ДНК-МАРКЕРІВ ДЛЯ СТВОРЕННЯ САМОЗАПИЛЕНИХ ЛІНІЙ І ГІБРИДІВ КУКУРУДЗИ

Висвітлені розроблені в СГП–НЦНС принципи добору в популяціях кукурудзи локусів цінних кількісних ознак за допомогою ДНК-маркерів. Показано, що 2-локусна система SSR-маркерів виявилась найбільш ефективною для генетичного поліпшення популяції ($\Delta G = 9,1-16,1\%$) за основними агрономічними ознаками - продуктивністю і висотою рослини, довжиною зернівки. На основі генетично поліпшеної популяції розроблено метод прогнозування важливих фенотипових параметрів популяції наступної генерації, сформовано генофонд маркованих інбредних ліній. На їхній основі створені перші в Україні гібриди кукурудзи з застосуванням технології молекулярних маркерів: один з них - гібрид Діалог, зареєстрований у 2008 році, другий - Діалог 300, проходить державне сортовипробування з 2012 року.

Таблиці — 4. Бібліографія — 12.