

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ СЕЛЕКЦИИ САМООПЫЛЕННЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ

Паритов А.Ю., Тхагапсоева Р.В., Кажарова О.С., Бозиева С.К.

ФГБОУ ВО Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова, Нальчик, e-mail: Paritov@mail.ru

Проведена оценка количественных признаков, имеющих сложную наследственную основу, контролирующиеся большим числом генов и в значительной степени подверженные модифицирующему воздействию внешней среды. Также проведена работа по определению генетического потенциала гетерозисных гибридов в процессе онтогенеза, что позволит расширить представления о самой природе гетерозиса и прогнозировать его степень на ранних стадиях онтогенеза. Применение молекулярных маркеров открывает широкие перспективы для изучения генетической природы количественных признаков путем маркирования локусов (Qtl's), что определяют их развитие, и на этой основе практического повышения эффективности методов селекции. Проведен RAPD анализ линий кукурузы селекции КБГУ с использованием коротких праймеров длиной 10 нуклеотидов. При проведении анализа использованы самые современные методы генетики и селекции.

Ключевые слова: геном, кукуруза, количественные признаки, коэффициент наследуемости, полиморфизм, ДНК-маркеры, ПЦР, RAPD.

MODERN METHODS OF BREEDING SELF-POLLINATING LINES OF CORN

Paritov A.Y., Thagapsoeva R. V., Kazarova O. S., Bozieva S. K.

Kabardino-Balkarian state University. H. M. Berbekova, Nalchik, e-mail: Paritov@mail.ru

The estimation of quantitative traits with complex inheritance basis, controlled by a large number of genes and are highly susceptible to the modifying effects of the environment. Work was carried out to determine the genetic potential of heterotic hybrids in the process of ontogenesis, which will allow to expand understanding of the nature of heterosis and to predict its extent in the early stages of ontogenesis. The use of molecular markers opens up broad prospects for studying the genetic nature of quantitative traits by marking loci (Qtl's) that determine their development, and on this basis, practical efficiency enhancement methods of selection. Conducted RAPD analysis lines of maize breeding, Kabardino-Balkarian state University with the use of short primers with a length of 10 nucleotides. The analysis used the most modern methods of genetics and breeding.

Keywords: genome, maize, quantitative traits, heritability coefficient, polymorphism, DNA markers, PCR, RAPD.

Успешные работы по расшифровке геномов многих организмов сделали возможным переход к масштабному изучению крупных и сверхкрупных геномов растений [1]. Изучение геномов растений – задача значительно более сложная, чем исследование генома человека и других животных [2]. Это связано с огромными размерами геномов, достигающими для отдельных видов растений десятков и даже сотен миллиардов пар нуклеотидов: геномы основных хозяйственно важных растений (кроме риса, льна и хлопка) по размерам либо близки к геному человека, либо превышают его во много раз. Расшифровка геномов растений открывает перед наукой и практикой широкие перспективы. Обнаружение, выделение, размножение (клонированием) и секвенирование генов, отвечающих за такие важнейшие функции растительного организма, как размножение и продуктивность, процессы изменчивости, устойчивости к воздействию неблагоприятных факторов среды, связаны с выходом селекционных работ на качественно новый уровень. Полное секвенирование генома дает близкие к истинным сведения об общем количестве генов

данного организма, позволяет поместить в банки данных более или менее подробные и достоверные сведения об их структуре, облегчает работу по выделению и изучению индивидуальных генов.

Цель исследования

Целью работы является оценка генетических параметров самоопыленных линий кукурузы селекции КБГУ и применение современных молекулярных маркеров для изучения генетической природы количественных признаков путем маркирования локусов.

Количественные признаки имеют сложную наследственную основу, проявляющуюся в непрерывной фенотипической изменчивости в расщепляющихся гибридных потомствах. Они контролируются большим числом генов и в значительной степени подвержены модифицирующему воздействию внешней среды.

Материал и методы

Уже более сорока лет на кафедре общей генетики, селекции и семеноводства КБГУ ведутся исследования, посвященные изучению комбинационной способности и генетического контроля количественных признаков самоопыленных линий кукурузы. Самоопыленные линии были заложены на гибридах и местных популяциях белозерной кукурузы. Семена обрабатывали мутагенами (нитрозоэтилмочевинной и нитрозометилмочевинной в концентрациях 0,01 и 0,025). После многократного инбридинга и строгой браковки были выделены константные, сравнительно продуктивные многопочатковые самоопыленные линии [3, 4]. Характеристика 6 линий по некоторым количественным признакам дается в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика мутантных самоопыленных линий кукурузы
селекции КБГУ

Линии	Обработка мутагенами (конц.%)	Вегетационный период	Количество початков на растении	Масса початка с растения, г	Высота растений, см
4	НЭМ-0,025	128-135	2,2	81-85	200-210
6	НММ-0,025	130-145	1,9	82-85	100-108
8	НЭМ-0,01	125-130	1,9	77-85	130-135
23	НЭМ-0,025	130-140	2,0	76-79	180-185
28	НЭМ-0,025	128-130	1,8	78-82	205-210
30	НЭМ-0,025	128-130	2,1	85-90	185-192

Выделяли ДНК тризольным методом. Для RAPD анализа применялись короткие праймеры длиной 10 нуклеотидов. Разделение фрагментов ДНК проводили с помощью

электрофореза в 1,5 % агарозном геле на TAE буфере. Окрашивали бромистым этидием с последующей детекцией в ультрафиолетовом свете.

Результаты и обсуждение

Информацию о генетической структуре изучаемого количественного признака в конкретном наборе самоопыленных линий получали, используя схему диаллельных скрещиваний методом Хеймана [5].

Коэффициенты наследуемости ряда количественных признаков самоопыленных многопочатковых линий кукурузы по некоторым хозяйственно-ценным признакам представлены в таблице 2. Значительная вариабельность большинства из них объясняется, прежде всего, нормой реакции генотипа на условия выращивания.

Таблица 2

Коэффициенты наследуемости количественных признаков самоопыленных многопочатковых линий кукурузы (многолетние данные)

Признак	Коэффициенты наследуемости	
	В широком смысле	В узком смысле
Число початков	0,98	0,63
Масса зерна с растения	0,99	0,60
Высота растения	0,97	0,52
Масса 1000 зерен	0,99	0,63
Число рядков	0,95	0,54
Число зерен в рядке	0,96	0,72
Урожай зерна	0,99	0,69
Длина первого початка	0,99	0,68
Высота прикрепления верхнего початка	0,88	0,79

Величины коэффициентов наследуемости, как в узком, так и в широком смысле, как показали исследования, близки (таблица 2), что свидетельствует о том, что отбор по фенотипу будет близок отбору соответствующих им генотипов [6].

Также дополнением данных работ являются работы по определению генетического потенциала гетерозисных гибридов кукурузы в процессе онтогенеза, что имеет теоретическое и практическое значение, так как позволяет расширить представления о природе гетерозиса и прогнозировать его степень при подборе родителей. Нами за последние 10 лет заложены полевые опыты с целью выяснения формирования гетерозисного эффекта в процессе онтогенеза у простых гибридов кукурузы, полученных с участием 6 самоопыленных линий селекции кафедры генетики КБГУ и подвергавшиеся диаллельному

скрещиванию по схеме $p(p-1)/2$. Прирост растений кукурузы в высоту учитывали через два дня, а затем суммировали за этап. Результаты регулярных промеров свидетельствуют о том, что прирост стебля в высоту завершается во время цветения метелки, то есть на IX этапе, а не на XII этапе формирования початка. При этом абсолютные цифры становятся минимальными и значительно отличаются от прироста за VI, VII и VIII этапы органогенеза метелки. Початки в это время находятся на VII–VIII этапах развития. Таким образом, наши данные подтвердили результаты исследователей о зависимости темпов ростовых процессов стебля, а затем и листьев разных ярусов от прохождения этапов органогенеза метелки у растений кукурузы.

В нашем анализе коэффициент регрессии по высоте растений на разных этапах органогенеза метелки оказался близок к 1 и, следовательно, неаллельное взаимодействие генов не является определяющим в гетерозисе по этому признаку. В таблице 3 представлены полученные данные по характеристике генетических компонентов непрерывной вариации по высоте растений и ее приростов в онтогенезе.

Таблица 3

Генетические компоненты вариации по высоте растений в онтогенезе самоопыленных линий кукурузы

Генетический параметр	Этапы органогенеза						
	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
V_r	-	3.38	5.83	6.55	13.59	4.44	1.24
V_p	2.71	9.23	12.36	24.30	33.50	17.19	3.11
D	2.57	8.40	11.46	24.30	30.45	16.09	2.90
H_1	1.38	31.86	48.72	91.71	65.81	26.30	11.03
H_2	0.89	35.71	46.33	93.18	64.71	26.50	9.91
F	9.66	23.13	31.60	53.07	66.13	33.40	9.00
h^2	1.27	141.62	241.00	489.22	369.22	123.49	53.75
H_1 / D	0.54	3.79	4.25	3.77	2.16	1.63	3.80
h^2 / H_2	1.43	3.96	5.21	5.25	5.71	4.66	5.42
$H_2 / 4H_1$	0.16	0.28	0.24	0.25	0.25	0.25	0.22

Как аддитивный показатель D , так и доминантный H_1 больше 1 на всех этапах органогенеза метелки, а, следовательно, имеет место доминирование, оно увеличивается от III этапа к VII (так на III этапе D и H_1 равны 2,57 и 1,38 соответственно, на V этапе эти величины составляют 11,46 и 48,72 и к VII этапу достигают максимальных значений: D – 30,45, H_1 – 65,81), а затем к завершению роста главного стебля уменьшается. Отношение H_1/D оценивает среднюю степень доминирования по всем локусам. На III этапе оно меньше

1, что указывает на неполное доминирование. На последующих этапах H_1/D больше 1 и, следовательно, имеет место сверхдоминирование. Показатель h^2/H_2 оценивает число сцепленных групп генов или эффективных факторов, контролирующих изучаемый признак и проявляющих доминирование. По нашим данным, таких генов или групп генов может быть от 2 до 6 и более, при этом число таких групп увеличивается от III к VII этапу органогенеза метелки (на III этапе h^2/H_2 равно 1,43, на V – 5,21, на VII – 5,71).

Результаты анализа генетических компонентов указывают и на то, что разность между средней всего потомства F_1 и средней родительских линий отражает среднее направление доминирования, которое определяет увеличение высоты растений. Величина $H_2/4H_1$ дает оценку симметрии в распределении доминантных и рецессивных аллелей. Как видно из данных, представленных в таблице, на III этапе наблюдается сдвиг в сторону увеличения доминантных аллелей, а затем на последующих этапах соотношение становится одинаковым (произведение доминантных и рецессивных аллелей равно 0,25) и сохраняется до IX этапа органогенеза метелки.

Определение генетических компонентов, контролирующих становление количественных признаков у кукурузы в онтогенезе, убедительно доказало, что высота растений контролируется сложной системой, составные которой могут переопределяться в процессе индивидуального роста. Наряду с аддитивными эффектами в онтогенезе могут проявляться доминирование и сверхдоминирование. Доминирование у гибридов F_1 направлено на увеличение высоты растений и очевидно, чем более высокорослая самоопыленная линия, тем больше у нее доминантных аллелей. Учитывая результаты наших данных и результаты других исследователей, следует подчеркнуть, что генетический контроль количественных признаков корректируется в значительной мере средовыми факторами, а также физиологическим состоянием организма. Это и должно определить дальнейшие поиски тестов для прогнозирования гетерозиса и выделение основных этапов развития в формировании хозяйственно ценных признаков и более полной реализации потенциальной продуктивности гибридов кукурузы.

В настоящее время накопленный в результате многолетней работы на кафедре селекционный материал используется для изучения молекулярно-генетического полиморфизма методом полимеразной цепной реакции и детекции ДНК-маркеров к хозяйственно-ценным признакам.

Селекция при помощи маркеров это новая, развивающаяся наука. Экстенсивное развитие сельского хозяйства приводит к глобальному уничтожению природы, а применение новых методов селекции позволит перейти на интенсивное хозяйство, получить растения гораздо более устойчивых к различным негативным факторам среды. Без увеличения

посевных площадей и числа применяемых удобрений и пестицидов возможно значительное повышение продуктивности сельскохозяйственных культур.

В селекции при помощи маркеров используются только природные комплексы генов, характерные для данного вида. Эти комплексы отобраны в результате длительного эволюционного процесса, поэтому их присутствие в геноме является естественным и безопасным как для самого растения, так и в качестве продуктов питания для человека [7].

ДНК-маркеры используются для решения вопроса о наличии, отсутствии или состоянии той или иной генетической системы – гена, хромосомы (целой или ее части), генома. Полиморфизм ДНК широко применяют для идентификации и анализа генетической дифференциации биоразнообразия. На полиморфизме нуклеиновых кислот основано ДНК маркирование [8].

Применение ПЦР расширило возможности изучения полиморфизма геномной ДНК. Вариантов использования полимеразной цепной реакции при выявлении полиморфизма множество.

Для амплификации различных участков ДНК с неизвестной локализацией в геноме может использоваться RAPD анализ (Random Amplified Polimorphic DNA), основанный на использовании одного или более произвольных олигонуклеотидных праймеров. Функцию прямого и обратного праймеров выполняет один и тот же олигонуклеотид. В результате ПЦР с произвольными праймерами образуются воспроизводимые фингерпринты, представляющие собой спектр уникальных (представленных в геноме по своей общей структуре в единичном числе) продуктов, часто полиморфных. ПЦР с произвольными праймерами пригодна для детального анализа геномов любых организмов.

Различные варианты ПЦР с произвольными праймерами различаются по количеству продуктов амплификации, длине используемых праймеров, условиям амплификации и способу электрофоретического разделения продуктов.

В пробной амплификации на 2 линиях селекции КБГУ (8 и 23) очень хорошо прослеживается разница по паре праймеров.

Была проведена повторная амплификация тех же образцов вместе с другими самоопыленными линиями по этой же паре праймеров. Анализируемые линии четко разделились на две группы по молекулярной массе амплифицированных участков. Линии 6, 28, 30 характеризуются сходными результатами амплификации (110 п.н.), подобная картина и по другим линиям (140 п.н.).

Заключение

Выявляемый с помощью ПЦР с произвольными праймерами генетический полиморфизм может быть использован при исследованиях видовой идентификации, для

генетического картирования и паспортизации генотипов [9]. Также данные о локализации RAPD могут применяться для создания генетических маркеров локусов количественных признаков сельскохозяйственных культур.

Проблемы исследования генома сельскохозяйственных растений – одно из ведущих направлений научно-исследовательских работ, поскольку перед лицом ожидаемого громадного увеличения населения продовольствие становится важнейшим стратегическим ресурсом.

Список литературы

1. Зеленин А.В., Бадаева Е.Д., Муравенко О.В. Введение в геномику растений // Молекулярная биология. – 2001. – Т. 35. – С. 339-348.
2. Паритов А.Ю. Селекция на многопочатковость как один из методов повышения урожайности кукурузы // Известия Самарского научного центра РАН. – 2010. – Т. 12, № 1(3). – С. 791-795.
3. Паритов А.Ю., Шогенова С.Х. Изучение гетерозиса у кукурузы в системе диаллельных скрещиваний // Научная конференция аспирантов и студентов агрономического факультета КБГСХА, посв. 95 летию К.Н. Керефова: сб. ст. – 2007. – С. 24-26.
4. Паритов А.Ю., Керефова М.К. Методы определения генетических параметров на основе диаллельных скрещиваний // Вестник КБГУ, серия биологические науки. – 2006. – Вып. 8. – С. 109-111.
5. Федин М.А. Кукуруза: монография. – Орел: Орловское кн. изд-во, 1963. – С.28-51.
6. Изучение стабильности признака многопочатковости у самоопыленных линий кукурузы селекции КБГУ Паритов А.Ю., Керефова М.К. Материалы III международной заочной научной конференции «Проблемы сохранения рационального использования биоразнообразия Прикаспия и сопредельных регионов». – Элиста, 2005. – С. 55-56.
7. Харченко П.Н., Глазко В.И. ДНК-технологии в развитии агробиологии. – М.: Воскресенье, 2006. – 480 с.
8. Weising K., Nybom H., Wolff K., Meyer W. DNA fingerprinting in plants and fungi. – CRC Press, 1995. – 322 p.
9. Link W., Dixkens C., Singh M., Schwall M., Mrlchinger A.E. Genetic diversity in European and Mediterranean Faba bean germ plasm revealed br RAPD markers // Theor. Appl. Genet. – 1995. – V.90. – P.27-32.