

В.П. ДОМЕНЮК¹,
А.О. БЕЛОУСОВ², Ю.М. СИВОЛАП¹

¹Південний біотехнологічний центр в рослинництві
УААН та МОН України

²Селекційно-генетичний інститут — Національний
центр насінництва та сортовицтва, Одеса
e-mail: yuri@genome.intes.odessa.ua

ЕФЕКТИВНІСТЬ ДОБОРУ ЗА ДНК-МАРКЕРАМИ ЛОКУСІВ КІЛЬКІСНИХ ОЗНАК В ПОПУЛЯЦІЯХ КУКУРУДЗИ



Основою представленої роботи є використання ДНК-маркерів локусів деяких господарсько-цінних кількісних ознак, детектованих методами SSR- та ISSR-PCR. Пропонується методика генетичного поліпшення вихідної популяції за комплексом полігенних ознак шляхом прямого добору рослин за маркерним профілем генотипу. Проведено експериментальне моделювання маркерного добору в популяціях (ГК26 × Мо17) F₃–F₄. Обґрунтовано критерії інформативності маркерів та вимоги до формування маркерних тестових систем. Демонструється висока ефективність маркерного добору у порівнянні з традиційними методами селекції кукурудзи.

© В.П. ДОМЕНЮК, А.О. БЕЛОУСОВ, Ю.М. СИВОЛАП, 2004

Вступ. Залучення ДНК-маркерів до певних ланок селекційного процесу з метою скорочення термінів та підвищення його ефективності є вирішальним завданням сучасного біотехнологічного дослідження. Основою представленої роботи є припущення щодо прогнозуючих властивостей зв'язку ДНК-маркерів з локусами, що обумовлюють мінливість кількісних ознак. Ця ідея є подальшим розвитком наряду, відомого в літературі як MAS [1], а саме — добору за генотипом. Передумовами, що сприяли розробці теми, були деякі теоретичні досягнення в генетиці кількісних ознак і в галузі ДНК-технологій, зокрема було показано: 1) існування полігенів, об'єднаних у єдині за функцією хромосомні блоки, значно звужує коло пошуку маркерів [2, 3]; 2) існує ієрархія локусів кількісних ознак за розміром внесків у мінливість ознаки, яка обмежує потенційні обсяги маркування декількома «сильними» локусами [4]; 3) фенотипова нейтральність ДНК-маркерів за умов їх тісного зчеплення з QTL дозволяє уникнути впливу факторів зовнішнього середовища [5].

Ці теоретичні передумови були використані при плануванні досліджень з генетичного поліпшення вихідних популяцій з метою подальшої гетерозисної селекції. У сучасній селекційній практиці основним засобом зміни генотипової структури за кількісними ознаками є традиційний добір за фенотиповими ознаками. Маркерний добір (МД), як відомо, повинен базуватися перш за все на статистично достовірному зчепленні маркерних локусів з QTL, що дозволяє розраховувати на можливість добору кількісних ознак за їх генотипом. Досягнення світової практики щодо застосування ДНК-маркерів для добору QTLs у більшості складають приватну інформацію біотехнологічних центрів. Отже, країнам СНД, зокрема Україні, потрібно розробляти власні ДНК-технології, зокрема маркерного добору в популяціях, і впроваджувати їх в селекційну практику.

Задача даної роботи полягає у розробці селекційної технології, яка поєднувала б традиційні методи добору і новітні ДНК-технології з метою значного прискорення селекційного процесу у кукурудзи і підвищення його ефективності.

Матеріал та методи. Матеріал — вихідні лінії GK26, Мо17, гібрид F₁, сегрегуюча популяція (ГК26 × Мо17) F₂ (2000 р.) та інбредні популяції на її основі F₃ (2001 р.) і F₄ (2002 р.). Батьківські

інбредні лінії різняться за основними морфологічними ознаками і належать до різних гетерозисних груп — Iodent та Lancaster відповідно.

Детальний опис методик оцінки вивчених фенотипових ознак, виділення ДНК, ПЛР з SSR- та ISSR-праймерами, фракціонування та візуалізації продуктів ампліфікації викладені в попередніх роботах [6–8].

Матеріал для дослідження наданий лабораторією генетико-біотехнологічних методів селекції кукурудзи Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення (Одеса).

Результати досліджень та їх обговорення.

Принцип маркерного добору в популяціях кукурудзи. Основні результати по детекції ДНК-маркерів до локусів кількісних ознак та перевірці істотності їх зв'язку представлені у попередніх роботах [6–9]. Маркери, отримані в процесі дослідження, розглядали як індикатори генотипів, які контролюють потрібні ознаки. З цієї точки зору інтерес представляла спроба включити у традиційну схему добору сучасну технологію ДНК-маркування.

Моделювання маркерного добору показало, що при визначенні оптимальної кількості маркерів, а також для отримання ефективного варіанта поєднання маркерів у тестову систему доцільно користуватися наступними критеріями: 1) інформація одного маркера вважається недостатньою у зв'язку з полігенним контролем вивчених ознак; 2) при визначенні типу маркера перевага надається SSR-послідовностям; 3) найкращий алельний стан маркерного локуса — лише гомозиготний, оскільки гетерозиготні локуси у наступному поколінні розщеплюються, «захоплюючи» також і небажані рівні значень певної ознаки; 4) бажано зчеплення маркерних локусів; 5) результативно працююча кількість маркерів в тестовій системі: в нашому дослідженні для вибірки в 200 рослин корисну інтегровану інформацію давали не більше чотирьох ISSR- чи RAPD-маркерів (домінантні), не більше трьох в комбінації SSR- та ISSR-маркерів (RAPD) (кодомінантні + домінантні), не більше двох SSR-маркерів (кодомінантні). За таких умов зберігається можливість знаходження всіх кросоверних класів маркерних генотипів в популяції.

Добір починали з покоління F_3 після перевірки маркуючої здатності поліморфних локусів ДНК у двох генераціях.

Завдання дослідження реалізували за наступною схемою.

1. Отримання вихідних даних з ДНК-маркерів, що виявилися інформативними у популяціях F_2 – F_3 .

2. Формування маркерної тестової системи за наведеними критеріями.

3. Маркерний добір кращих генотипів у вихідній популяції F_3 (популяція нульового циклу добору — C_0). Відібрану групу рослин ми позначили як F_3 доб.

4. Отримання популяції першого циклу добору (C_1) шляхом розмноження групи рослин (F_3 доб.), добраних за розробленою тестовою системою маркерів.

5. Визначення результативності добору.

Маркерний добір в популяції F_3 та перевірка його ефективності. За представленою схемою було проведено експериментальне моделювання маркерного добору в популяції F_3 на підвищення рівня розвитку низки важливих кількісних ознак. Маркерний добір проводили з трьох наступних ознак, для яких у F_3 було отримано більше одного маркера і які задовольняли б наведеним інформаційним критеріям: 1) «висота рослини» (ВР) — детектовано два гомозиготних SSR-маркери — *nc030_108* (назва праймера з молекулярною масою поліморфного продукту в п.н., що характерний для генотипів з більшим рівнем розвитку ознаки) і *phi061_88*; 2) «глибина зерна» (ГЗ) — підбрано три гомозиготних ISSR-маркери — *isp5_950*, *isp5_378* і *isp13_525*; маркерні локуси не зчеплені; 3) «індивідуальна продуктивність» (ІП) — визначено два гомозиготних SSR-маркери — *nc030_108*, *phi061_88* і один ISSR-маркер — *isp5_950*; локуси *nc030_108* та *isp5_950* зчеплені.

Як видно з табл. 1, для ознаки ВР залучено два SSR-маркери, для ГЗ — три ISSR-маркери, для ІП залучено також два SSR-маркери, щоб вирівняти умови моделювання з ознакою ВР. Треба відзначити, що тестову систему ознаки ІП складали ті ж самі маркери, що були інформативними для ознаки ВР. Як показують отримані дані, групи добраних за маркерами рослин (F_3 доб.) за середніми значеннями всіх ознак

Таблиця 1
Статистична характеристика вихідної популяції C_0 і популяції добору (F_3 доб.), добраної за маркерними тестовими системами (модель 1)

Статистичні показники	C_0	F_3 доб.	Селекційний диференціал (S)
Висота рослини (см). TC: nc030, phi061			
$\bar{x} \pm S\bar{x}$	142,7 $\pm$ 1,65	149,9 $\pm$ 1,17	7,2**
Ліміти	135–151	144–159	
s	16,2	15,2	
Глибина зерна (см). TC: isp5_950, isp5_378, isp13_525			
$\bar{x} \pm S\bar{x}$	1,34 $\pm$ 0,03	1,48 $\pm$ 0,03	0,14**
Ліміти	1,2–1,5	1,4–1,6	
s	0,27	0,23	
Індивідуальна продуктивність (г). TC: nc030, phi061			
$\bar{x} \pm S\bar{x}$	40,1 $\pm$ 3,36	56,9 $\pm$ 2,80	16,8***
Ліміти	30,2–59,0	44,0–76,1	
s	31,7	29,6	

Примітка. **Достовірно при $P < 0,01$; *** при $P < 0,001$.

Таблиця 2
Ефективність маркерного добору у популяціях першого циклу C_1 у порівнянні з вихідною C_0 (модель 1)

Статистичні показники	C_0	C_1	Зсув за добром, R	Генетичний ефект добору, ΔG , %
Висота рослини (см). TC: nc030, phi061				
$\bar{x} \pm S\bar{x}$	123 $\pm$ 1,65	135,1 $\pm$ 1,23	12,1***	9,1
Ліміти	115–131	130–140		
s	16,2	13,6		
Глибина зерна (см). TC: isp5_950, isp5_378, isp13_525				
$\bar{x} \pm S\bar{x}$	1,4 $\pm$ 0,03	1,46 $\pm$ 0,02	0,06	3,9
Ліміти	1,2–1,5	1,4–1,5		
s	0,27	0,23		
Індивідуальна продуктивність (г). TC: nc030, phi061				
$\bar{x} \pm S\bar{x}$	48,4 $\pm$ 3,36	57,2 $\pm$ 1,37	8,8**	16,1
Ліміти	30,2–59,0	47,0–64,3		
s	29,6	21,9		

Примітка. **Достовірно при $P < 0,01$; *** при $P < 0,001$.

достовірно різняться з вихідною популяцією. Судячи по лімітах (табл. 1), у всіх ознак змістився і розмах мінливості в бік більшого значення. В результаті максимальний рівень ознак у F_3 доб. становив: ВР — 159 см порівняно з 151 см (у C_0), ГЗ — 1,6 см порівняно з 1,5 см, ІП — 76,1 г порівняно з 59 г.

В табл. 1 представлено результати маркерного добору за ознаками ВР, ГЗ, ІП на основі вказаних тестових систем (ТС) (модель 1).

Порівняння стандартного відхилення отриманих вибірок з вихідною (C_0) свідчить про деяке звуження дисперсії ознаки в групах рослин, добраних за маркерами. Аналіз селекційного диференціалу (S) з кожної ознаки свідчить про досить високу і достовірну інтенсивність маркерного добору у межах вихідної популяції. Для перевірки ефективності добору з кожної ознаки у 2002 р. добрані за маркерами (F_3 доб.) були висіяні як популяції першого циклу добору з кожної ознаки: C_1 — ВР, C_1 — ГЗ, C_1 — ІП для порівняння з вихідною популяцією C_0 .

Значення ознак ВР та ІП в популяціях C_1 у порівнянні з C_0 свідчать про їх істотну відповідь на маркерний добір (табл. 2). Для ознаки ГЗ зсув у популяції виявився статистично неістотним, а генетичний ефект добору становив лише 3,9 %. Порівняння середніх та лімітів підтверджує значне поліпшення селекційної якості популяцій C_1 — ВР і C_1 — ІП: зсув за маркерним добром (R) для ознаки ВР складає 12,1 см ($P < 0,001$), а для ІП — 8,8 г ($P < 0,01$). При цьому генетичний ефект добору з цих ознак становить 9,1 і 16,1 % відповідно (табл. 2), в той час коли ефективність поліпшення популяції за традиційним качанорядковим добром становить в середньому 2,6 % за рік [10], а за рекурентно-реципрокним добром — 4,9 % за рік [11]. Отже, можна вважати, що для ознак «висота рослини» і «індивідуальна продуктивність» марковано досить впливові QTLs, що і забезпечило результативний добір за ДНК-маркерами.

Для ознаки ГЗ зсув за добром (R) не набув достовірного значення, кращі генотипи з C_1 мали однакоє значення з аналогічним показником у популяції C_0 , а генетичний ефект добору складав лише 3,9 % (табл. 2). Ці показники свідчать про низьку ефективність вибраної тестової системи для підвищення значень ознаки

ГЗ. Пошук можливих причин щодо некоректної роботи моделі призвів до вилучання з тестової системи маркера *isp13_525* з огляду на значні відхилення у розщепленні за цим локусом. Решта маркерів ТС ознаки ГЗ склали другий варіант тестової системи, застосованої як модель 2.

Ознака «індивідуальна продуктивність» — єдина, яку маркували локуси, зчеплені між собою: локуси *nc030_108* та *isp5_950* розташовані у хромосомі 3 генома кукурудзи на відстані 36 сМ. У другому варіанті моделі розглянуто можливість впливу зчеплення маркерних локусів на ефективність добору (табл. 3).

Для кожної з ознак ГЗ і ІП за таких умов отримано достовірний селекційний диференціал (S) за добором у популяції C_0 груп рослин F_2 доб., безпосередньо утворених за маркерною моделлю 2. Аналіз субпопуляцій добору C_1 — ГЗ і C_1 — ІП моделі 2 показав, що зсув за добором (R) для ознаки ГЗ складає 0,16 порівняно з 0,06 в моделі 1, а генетичний ефект добору перевищує 10 %, тоді як у моделі 1 був менше 4 % (табл. 4).

Для ознаки ІП також отримано задовільні результати добору: середнє її значення у популяції C_1 моделі 2 складає 58,0 г проти 48,4 г у C_0 , а генетичний ефект добору 17,6 % (у C_1 моделі 1 відповідно 16,1 %). Можна припустити, що зчеплені маркери, *nc030_108* та *isp5_950*, можливо, пов'язані з QTL, розташованим між ними, що дає змогу тестовій системі більш ретельно добирати певні генотипи.

Як наслідок, ефективність добору зростає.

Таким чином, показано ефективність добору у популяціях кукурудзи за ДНК-маркерами локусів кількісних ознак та його переваги порівняно з традиційними методами селекції. Обґрунтовано теоретичні вимоги до залучення маркерів у тестову систему маркерного добору. За умов дотримання наведених критеріїв інформативності при утворенні маркерних тестових систем істотну результативність однорічного циклу добору виявила двомаркерна тестова модель. Ще більшу надійність забезпечує двомаркерна модель зчеплених локусів. Розроблені принципи маркерного добору рекомендуються до використання в селекційній практиці для генетичного поліпшення вихідних популяцій за господарсько-цінними (полігенними) ознаками і передбачають підвищен-

Таблиця 3
Статистична характеристика вихідної популяції C_0 і популяцій добору (F_2 доб.), добраних за маркерними тестовими системами (модель 2)

Статистичні показники	C_0	F_2 доб.	Селекційний диференціал, Sd
Глибина зерна (см). ТС: <i>isp5_950</i> , <i>isp5_378</i>			
$\bar{x} \pm S\bar{x}$	1,31 $\pm$ 0,02	1,41 $\pm$ 0,02	0,1***
Ліміти	1,2–1,4	1,3–1,5	
s	0,27	0,23	
Індивідуальна продуктивність (г). ТС: <i>nc030-isp5_9501</i> , <i>phi061</i>			
$\bar{x} \pm S\bar{x}$	38,5 $\pm$ 3,45	56,5 $\pm$ 2,87	18,0***
Ліміти	22,2–59,0	44,3–76,1	
s	29,7	29,5	

Примітка. Локуси *nc030-isp5_950* зчеплені. ***Достовірно при $P < 0,001$.

Таблиця 4
Ефективність маркерного добору у популяціях першого циклу C_1 у порівнянні з вихідною C_0 (модель 2)

Статистичні показники	C_0	C_1	Зсув за добором, R	Генетичний ефект добору, ΔG , %
Глибина зерна (см). ТС: <i>isp5_950</i> , <i>isp5_378</i>				
$\bar{x} \pm S\bar{x}$	1,4 $\pm$ 0,03	1,56 $\pm$ 0,01	0,16**	10,3
Ліміти	1,2–1,5	1,5–1,6		
s	0,27	0,20		
Індивідуальна продуктивність (г). ТС: <i>nc030-isp5_9501</i> , <i>phi061</i>				
$\bar{x} \pm S\bar{x}$	48,4 $\pm$ 3,36	58,0 $\pm$ 1,72	9,6***	17,6
Ліміти	30,2–59,0	48,7–63,2		
s	29,6	13,3		

Примітка. **Достовірно при $P < 0,01$; *** при $P < 0,001$.

ня результативності та скорочення термінів створення вихідного матеріалу для селекції кукурудзи на гетерозис.

Робота частково підтримана грантом президента України для обдарованої молоді.

SUMMARY. DNA-markers of some agronomically valuable quantitative trait loci were detected by SSR- and ISSR-PCR. Method of genetic improvement of initial population for polygenic trait complex is proposed basing on direct selection of plants according to their genotype marker profiles. Experimental modelling of marker selec-

tion within populations (ГК26 × Мо17) F₃–F₄ has been carried out. Requirements of marker combination in test systems and criteria of marker informativity have been grounded. Significant effectiveness of marker selection in comparison with traditional methods of selection in maize breeding has been demonstrated.

РЕЗЮМЕ. Методами SSR- и ISSR-ПЦР детектированы ДНК-маркеры к локусам некоторых хозяйственно-ценных количественных признаков. Предлагается методика генетического улучшения исходных популяций по комплексу полигенных признаков путем прямого отбора растений по маркерному профилю генотипа. Проведено экспериментальное моделирование маркерного отбора в популяциях (ГК26 × Мо17) F₃–F₄. Обоснованы критерии информативности маркеров, а также требования к формированию маркерных тестовых систем. Демонстрируется значительное преимущество маркерного отбора над традиционными методами селекции кукурузы.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Stam P. Marker-assisted breeding // Proc. Ninth Meeting of the EUCARPIA Section Biometrics and Plant Breeding, 6–8 July. — Wageningen, 1994. — P. 32–44.
2. Tanksley S. Mapping polygenes // Annu. Rev. Genet. — 1993. — 27. — P. 206.
3. Khavkin E., Coe E. Mapped genomic location for developmental functions and QTLs reflect concentered groups in maize (*Zea mays* L.) // Theor. Appl. Genet. — 1997. — 95, № 3. — P. 343–352.
4. Mather K., Jinks J. Biometrical genetics. — Cambridge: Univ. Press, 1982. — 396 p.
5. Wu K., Tanksley S. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice // Mol. Gen. Genet. — 1993. — 241. — P. 225–235.
6. Доменюк В.П., Вербицька Т.Г., Сиволап Ю.М. Оптимізація методики RAPD-анализу для детекції поліморфізму послідовностей ДНК у ліній кукурудзи // Вісн. Одес. нац. ун-ту. — 2001. — 6, вип. 1. — С. 51–59.
7. Доменюк В.П., Вербицкая Т.Г., Белоусов А.А., Сиволап Ю.М. Маркерный анализ количественных признаков кукурузы при помощи ISSR-ПЦР // Генетика. — 2002. — 38, № 10. — С. 1370–1378.
8. Доменюк В.П., Белоусов А.А., Сиволап Ю.М. ДНК-маркирование количественных признаков кукурузы // Цитология и генетика. — 2002. — 38, №6. — С. 12–19.
9. Доменюк В.П., Сторчеус Н.І., Белоусов А.О., Сиволап Ю.М. ДНК-маркування ознак продуктивності кукурудзи методом SSR-ПЦР // Вісн. Одес. нац. ун-ту. — 2003. — 8, вип. 1. — С. 59–67.
10. Darrah L., Eberhard S. A maize breeding method study in Kenya // Crop Sci. — 1972. — 12. — P. 605–608.
11. Hallauer A., Miranda J. Quantitative genetics in maize breeding. — Iowa State Univ. Press, 1982. — P. 468.

Надійшла 19.05.03