Національна академія аграрних наук України
Державна установа Інститут зернових культур

«СЕЛЕКЦІЙНІ ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ СТВОРЕННЯ НОВИХ ГЕНОТИПІВ КУКУРУДЗИ, АДАПТОВАНИХ ДО ЗОНИ СТЕПУ УКРАЇНИ»

ГАЙДАШ Олександр Леонідович, к. с.-г. н., в. о. завідувача лабораторії фізіології рослин та методів селекції
АБЕЛЬМАСОВ Олексій Вікторович, к. с.-г. н., в. о. завідувача лабораторії селекції кукурудзи середньостиглих та середньопізніх гібридів
ДЕНИСЮК Катерина Вікторівна, к. б. н., науковий співробітник лабораторії біотехнології

Дніпро, 2020

ДУ Інститут зернових культур НААН

Матеріали дослідження:

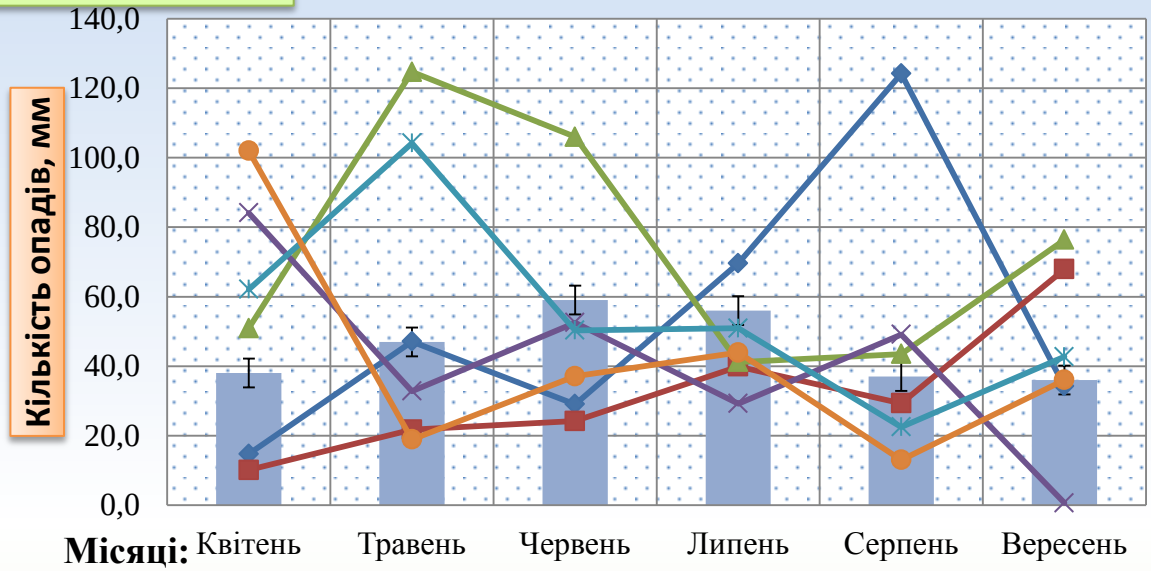
Лінії та гібриди F_1 кукурудзи (*Zea mays* L.) зародкових плазм Айодент, Змішана, Ланкастер, Рейд, Лаукон тощо.

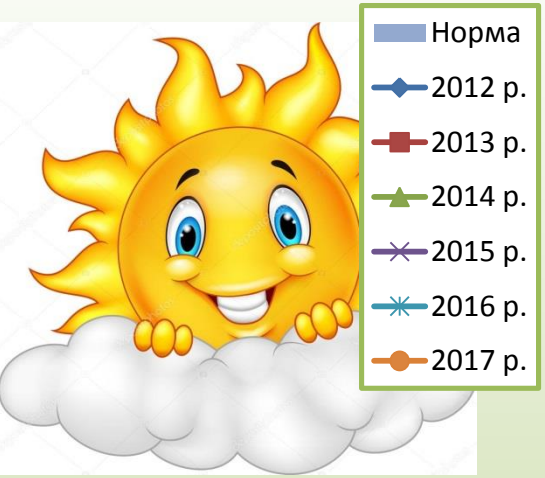
Методи дослідження:

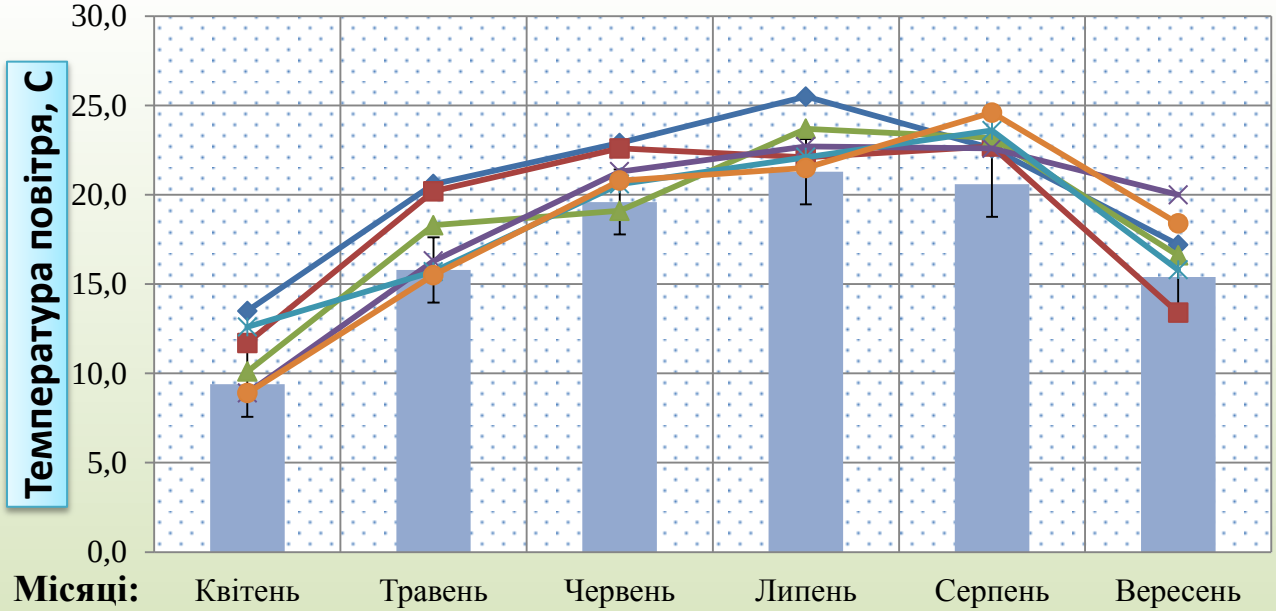
загально-селекційні: самозапилення, тесткросні схрещування;
вимірювально-вагові: фенологічні та біометричні спостереження, визначення рівня врожайності;
лабораторно-польові: оцінка комбінаційної здатності, параметрів пластичності та стабільності;
молекулярно-генетичні: широкогеномний SNP-аналіз;
методи клітинної інженерії: метод культури клітин, тканин та органів *in vitro*;
методи і програми статистичного аналізу: ANOVA, PCA, Structure, Tassel, Statistica10 та ін.

ДУ Інститут зернових культур НААН

Метеорологічні умови в роки дослідження







Тривалість періоду «сходи – цвітіння 50 % качанів та волотей» вихідних ліній, сестринських гібридів та самозапилених сімей кукурудзи протягом років досліджень

Параметри		Вихідні лінії			Сестринські гібриди			Самозапилені сім'ї		
		2013 р.	2014 р.	2015 р.	2013 р.	2014 р.	2015 р.	2013 р. S_1	2014 р. S_2	2015 р. S_3
Тривалість періоду сходи – цвітіння 50 % качанів, діб	N	8	8	8	28	28	28	92	101	124
	$\bar{x}\pm s\bar{x}$	51,4±0,71	52,0±0,33	55,1±0,92	50,0±0,34	48,8±0,32	54,2±0,53	52,6±0,29	51,4±0,43	52,5±0,38
	V,%	3,88	1,78	4,64	3,58	3,49	5,16	3,47	5,15	5,02
	Lim (min - max)	48,0-54,0	51,0-53,0	53,7-56,0	47,0-55,0	46,0-51,0	49,0-63,0	49,0-56,0	47,0-58,0	47,0-58,0
	ДК744st	48	51	54	-	-	-	-	-	-
Тривалість періоду сходи – цвітіння 50 % волотей, діб	N	8	8	8	28	28	28	92	101	124
	$\bar{x}\pm s\bar{x}$	50,6±0,63	51,6±0,32	54,1±0,79	49,0±0,43	48,9±0,29	51,5±0,51	50,7±0,39	49,8±0,41	51,2±0,38
	V,%	3,49	1,77	4,12	4,65	3,12	5,25	4,89	5,13	5,14
	Lim (min - max)	48,0-54,0	51,0-53,0	52,0-56,0	44,0-55,0	46,0-51,0	46,0-60,0	46,0-55,0	46,0-56,0	46,0-56,0
	ДК744st	48	51	53	-	-	-	-	-	-

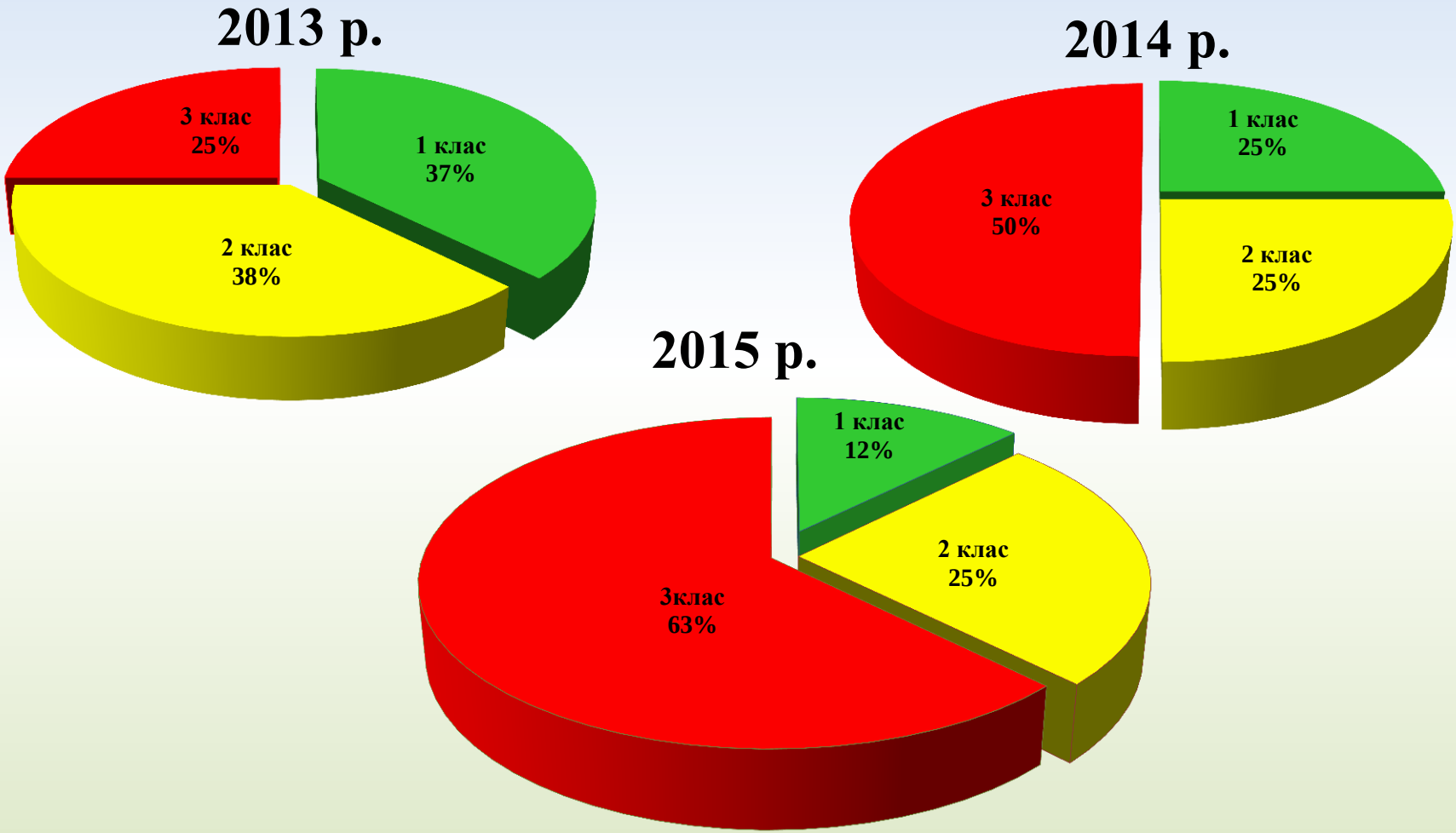
Варіювання ознак «врожайність зерна» та «вологість зерна» у вихідних ліній та сестринських гібридів кукурудзи

Показники		Вихідні лінії			Сестринські гібриди		
		2013 р.	2014 р.	2015 р.	2013 р.	2014 р.	2015 р.
Врожайність зерна, т/га	N	8	8	8	28	28	28
	x̄±sx̄	4,44±0,45	3,36±0,54	3,75±0,29	7,84±0,26	6,96±0,20	7,22±0,27
	V,%	28,71	24,61	33,89	16,81	14,26	17,43
	Lim (min-max)	2,84-6,37	2,23-4,40	2,29-5,56	5,83-10,17	3,67-8,46	5,11-8,79
	ДК744st	6,37	3,86	5,44	-	-	-
Вологість зерна, %	N	8	8	8	28	28	28
	x̄±sx̄	16,4±0,23	13,2±0,32	13,5±0,09	17,2±0,19	12,6±0,16	14,2±0,13
	V,%	3,89	6,86	1,97	5,80	7,01	5,08
	Lim (min-max)	15,5-17,7	12,4-15,3	13,2-13,9	15,5-20,2	10,5-14,3	12,8-15,9
	ДК744st	16,1	13,2	13,9	-	-	-

Варіювання ознак «висота рослин» і «висота прикріплення качана» вихідних ліній, сестринських гібридів та самозапилених сімей кукурудзи протягом років досліджень

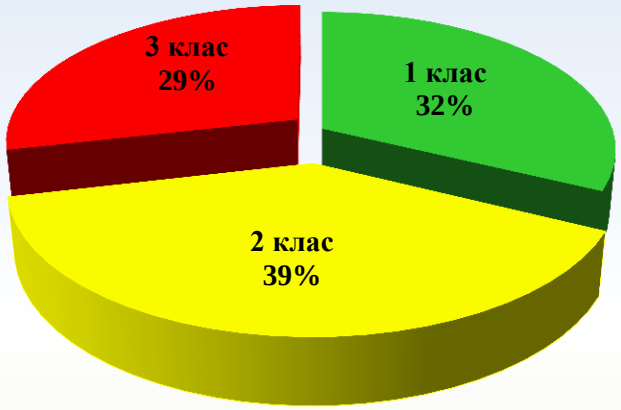
Параметри		Вихідні лінії			Сестринські гібриди			Самозапилені сім'ї		
		2013 р.	2014 р.	2015 р.	2013 р.	2014 р.	2015 р.	2013 р. S_1	2014 р. S_2	2015 р. S_3
Висота рослин, см	N	8	8	8	28	28	28	92	101	124
	$\bar{x}\pm s\bar{x}$	159,0±2,86	178,8±3,74	139,4±4,37	189,2±1,98	215,0±3,48	168,6±2,78	156,2±1,53	178,9±3,39	161,4±2,11
	V,%	5,08	5,92	8,87	5,54	8,55	8,72	6,20	12,3	8,06
	Lim (min-max)	140,5-171,5	165,0-192,0	126,0-162,0	171,5-209,5	179,5-250,0	126,5-203,0	138,0-175,5	150,0-190,0	135,0-189,5
	ДК744st	140,5	169,0	138,5	-	-	-	-	-	-
Висота прикріплення качана, см	N	8	8	8	28	28	28	92	101	124
	$\bar{x}\pm s\bar{x}$	48,8±3,11	54,4±5,30	44,4±2,76	59,2±1,42	64,8±1,66	57,1±1,58	50,7±1,29	55,3±2,04	48,0±1,39
	V,%	18,05	27,56	17,62	12,70	13,58	14,67	16,10	24,35	17,88
	Lim (min-max)	36,0-66,0	35,0-80,0	33,0-57,5	45,0-79,0	47,0-80,0	33,0-71,5	35,5-67,5	30,0-75,5	31,0-65,0
	ДК744st	41,0	42,0	40,0	-	-	-	-	-	-

Розподіл за класами оцінок ефектів загальної комбінаційної здатності стосовно ознаки «врожайність зерна» вихідних ліній кукурудзи

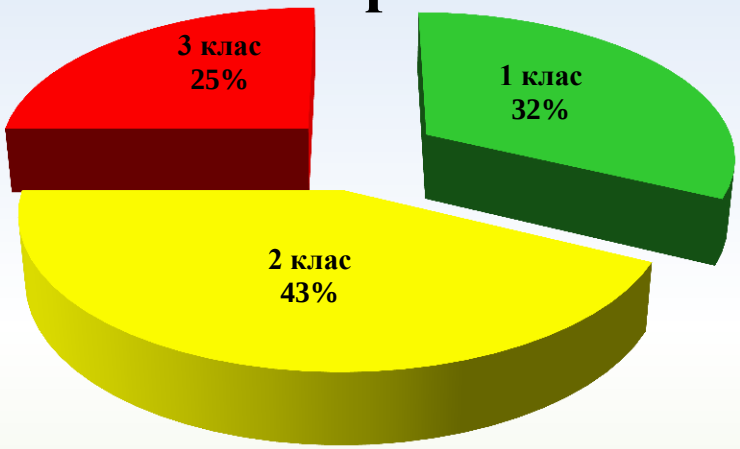


Розподіл за класами оцінок ефектів загальної комбінаційної здатності стосовно ознаки «врожайність зерна» сестринських гібридів кукурудзи

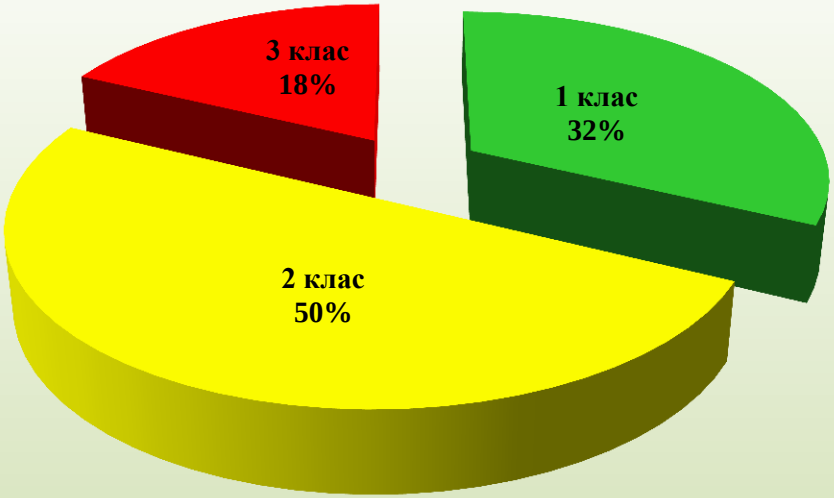
2013 р.



2014 р.

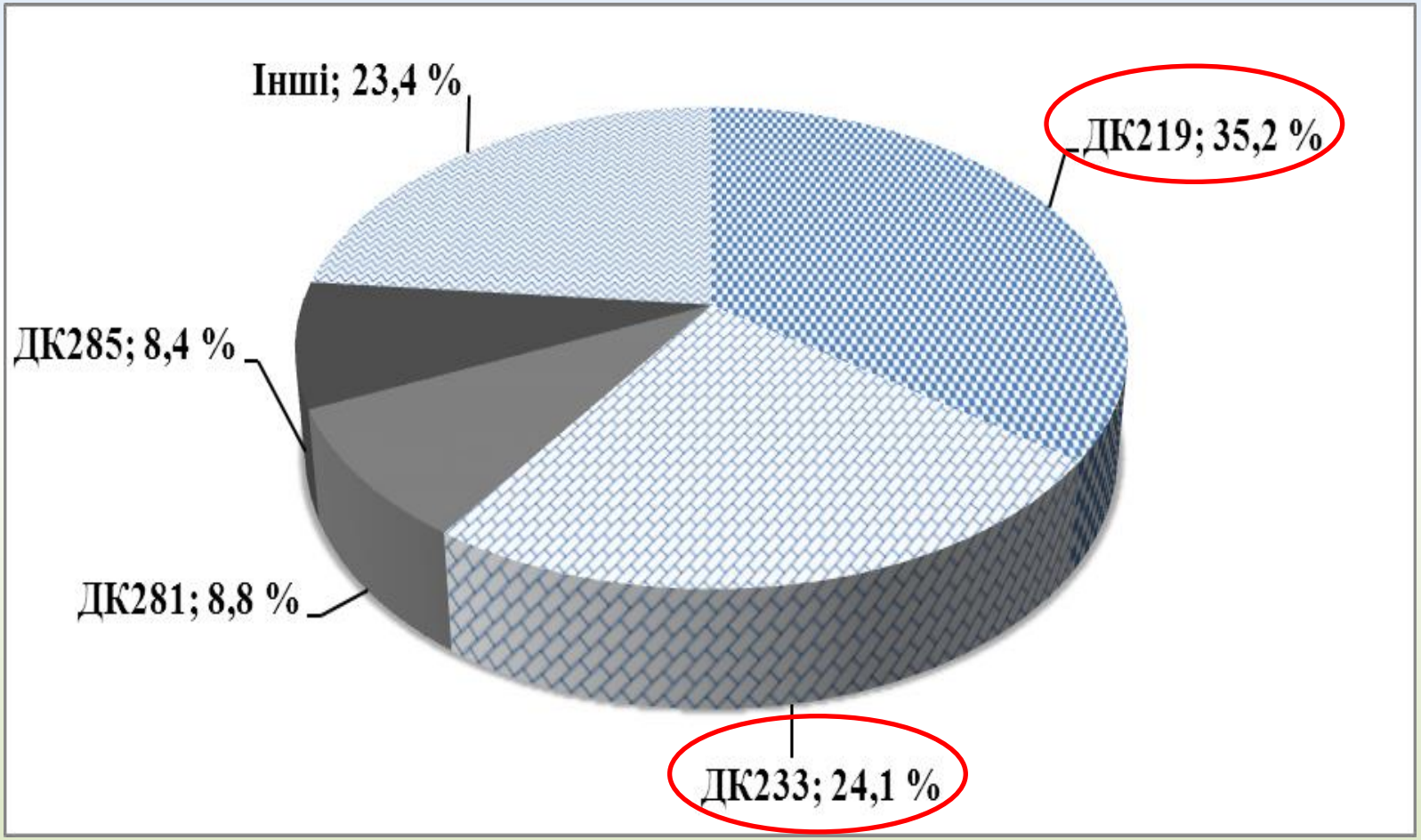


2015 р.

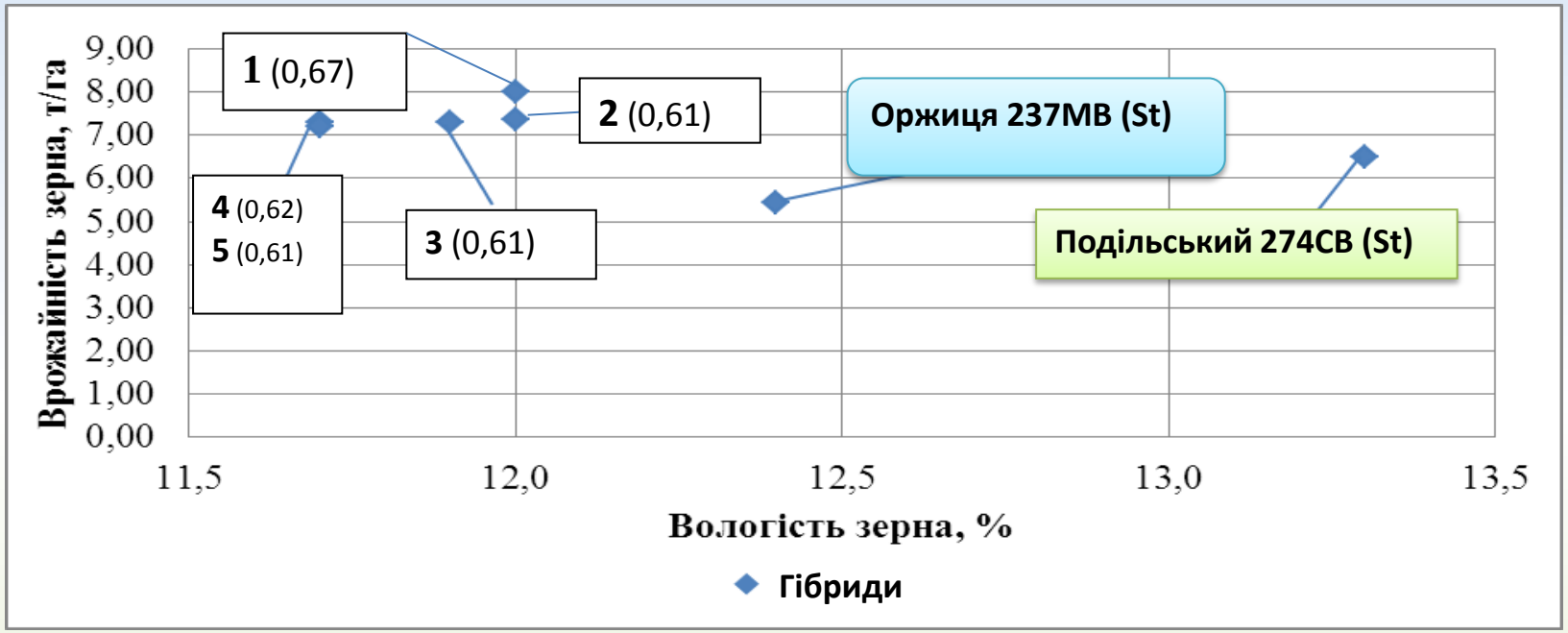


ДУ Інститут зернових культур НААН

Кількість самозапилених сімей S_6, адаптованих до зони Степу України, з високою комбінаційною здатністю, отриманих за участі різних вихідних ліній кукурудзи, %



Найкращі тесткроси S_6 кукурудзи, адаптовані до зони Степу України, за співвідношенням урожайності зерна до його збиральної вологості (2014-2015 рр.)

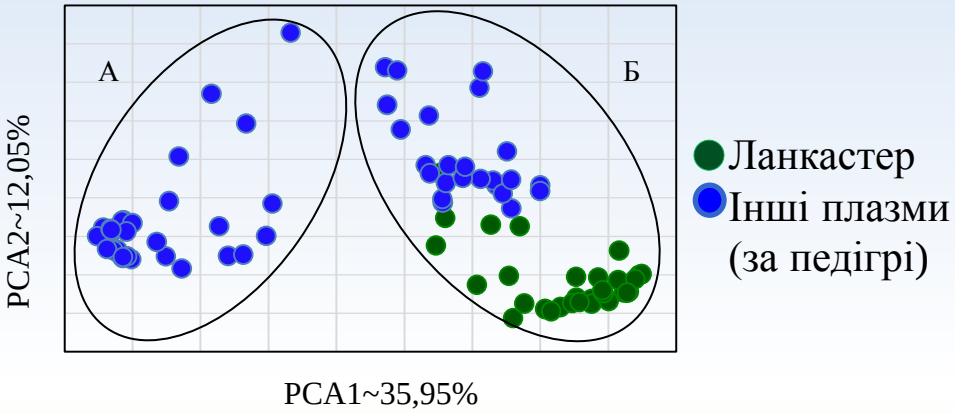


Примітка: 1* – Крос 267 С×ДК305 121142
2* – Крос 267 С×ДК2109 233121
3* – ДК 247МВ×ДК2064 223112
4* – ДК 247МВ×ДК2285 131111
5* – ДК 247МВ×ДК2831 113111

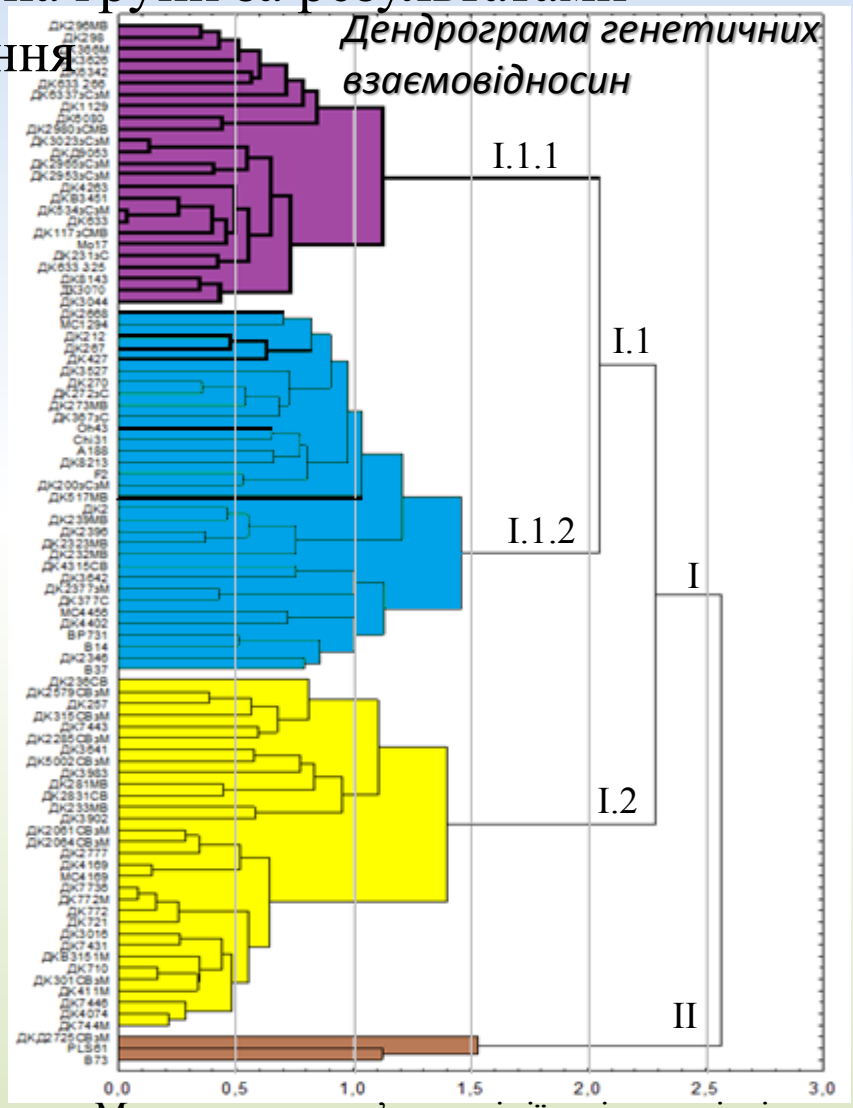
Молекулярно-генетична характеристика зародкової плазми Ланкастер у кукурудзи

Розподіл досліджених ліній кукурудзи на групи за результатами SNP-генотипування

Принциповий компонентний аналіз



Дендрограма генетичних взаємовідносин

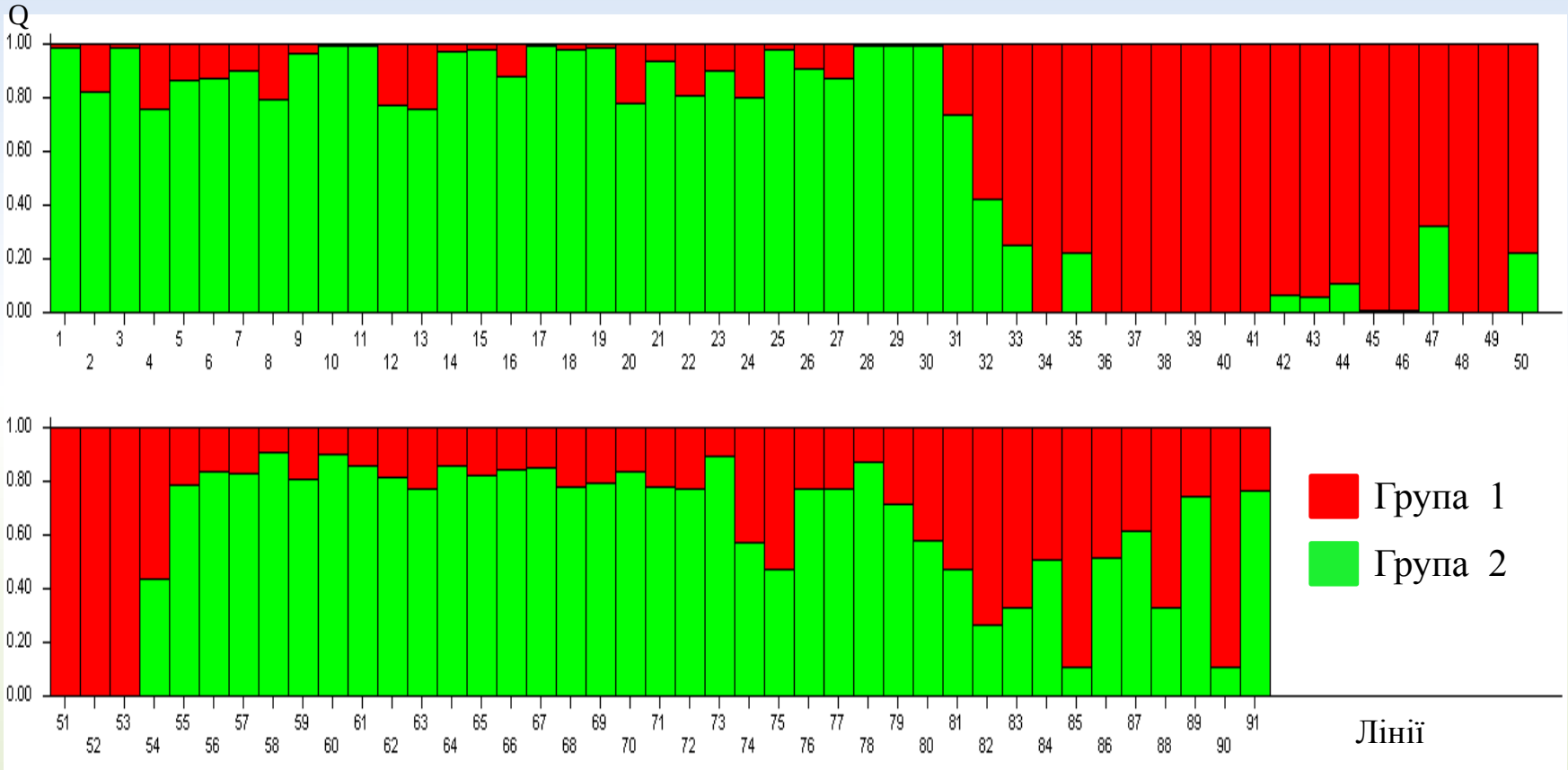


Метод повного зв'язку; лінії, які за педігрі відносяться до Ланкастер, показано **жирними рисками**

Дисперсійний аналіз попарних генетичних SNP-дистанцій між лініями кукурудзи

Джерело варіювання	***df***	**SS**	**MS**	**F**	**P**	**$F_{0,05}$**
Між групами L- та NL-ліній	1	2,95	2,95	231,7	7,50E-50	3,9
Випадкове	2233	28,46	0,01			
Разом	2234	31,42				

Кількісний кластерний аналіз генетичної структури ліній кукурудзи за результатами SNP-генотипування (*Structure*, *k*=2)



Кожен стовпчик відповідає одній лінії кукурудзи; частка кожної групи в генотипі лінії показана часткою забарвлення певним кольором: група 1 позначена червоним кольором, група 2 – зеленим кольором. Розподіл ліній за педігрі: 1-31 – лінії зародкової плазми Ланкастер (L), 32-91 – NL-лінії, де 32-54 – Айодент, 55 – A188, 56 – Chi31, 57 – PLS61, 58-64 – Лакон, 65-79 – Рейд, 80-91 – Мікс.

Зміна частот алелей SNP-маркерів у ліній кукурудзи плазми Ланкастер порівняно з лініями інших плазм

SNP-маркер панелі BDI-III	Номер хромосоми. Номер біна	Частота мажорного алеля в групі ліній неланкастерівських плазм	Частота однойменного алеля в групі ліній плазми Ланкастер	D	$\chi^2_{факт.}$
332АГ	9.04	А=0,84±0,17	А=0,10±0,20	0,74	41,5
151АГ	4.05	Г=0,75±0,20	Г=0,06±0,16	0,69	34,4
256АГ	6.06	Г=0,88±0,15	Г=0,22±0,27	0,66	32,9
331АТ	9.04	А=0,76±0,20	А=0,10±0,20	0,66	30,9
335АЦ	9.04	А=0,72±0,21	А=0,06±0,16	0,66	30,2
185АЦ	5.01	А=0,68±0,22	А=0,03±0,11	0,65	30,3
343АГ	10.01	Г=0,83±0,19	Г=0,19±0,28	0,64	26,0
181АЦ	5.01	А=0,70±0,21	А=0,07±0,17	0,63	27,9
288АЦ	8.01	Ц=0,81±0,18	Ц=0,19±0,26	0,62	28,0
190АТ	5.03	Т=0,85±0,16	Т=0,23±0,28	0,62	28,2

Примітка. $\chi^2_{0.001}$=10,83

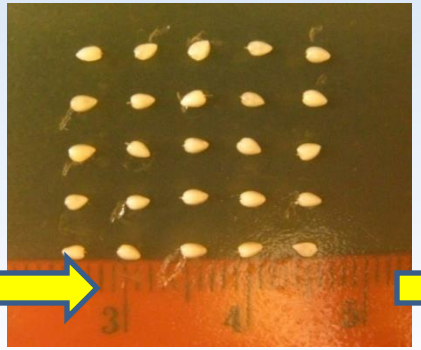
Гаплотип ліній кукурудзи плазми Ланкастер, визначений за панеллю BDI-III, становить: 151А, 181Ц, 185Ц, 190А, 256А, 288А, 331Т, 332Г, 335Ц, 343А (назви дезоксирибонуклеотидів поряд з номером маркера подано за скороченими назвами азотистих основ: А – аденін, Т – тимін, Г – гуанін, Ц – цитозин).

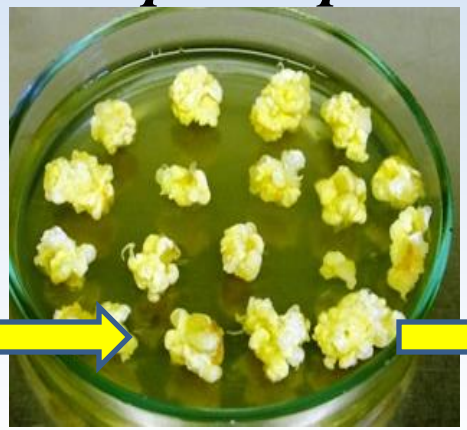
Варіювання показників однонуклеотидного поліморфізму ДНК у ліній кукурудзи:

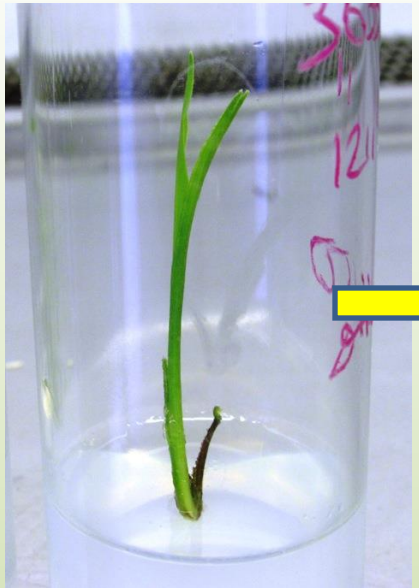
Характеристика	Група ліній	
	L	NL
Попарні генетичні дистанції, частка одиниці	0,34±0,01	0,42±0,01
Спорідненість ліній між собою, %	66,2±4,4	57,7±2,4
в т.ч. з лінією Mo17	70,4±5,4	-
з лінією Oh43	52,9±5,9	-

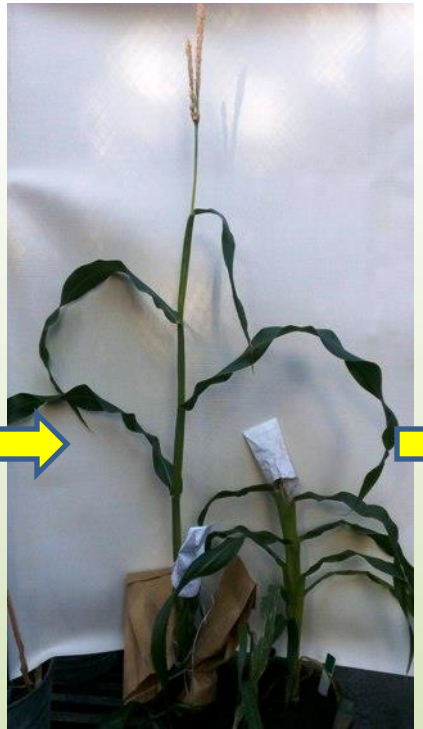
Клітинно-інженерна характеристика зародкової плазми Ланкастер у кукурудзи

Схема отримання рослин-регенерантів кукурудзи





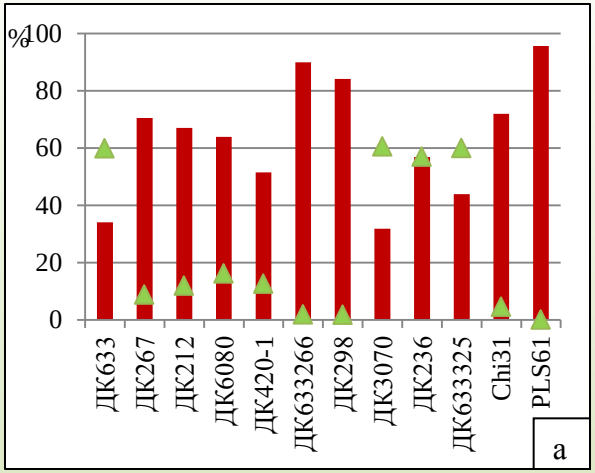


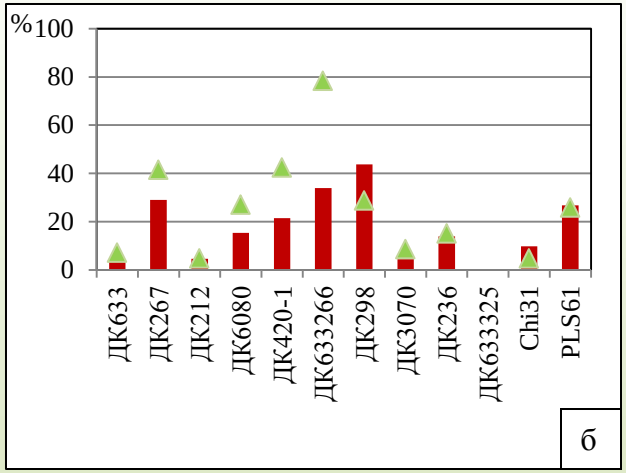


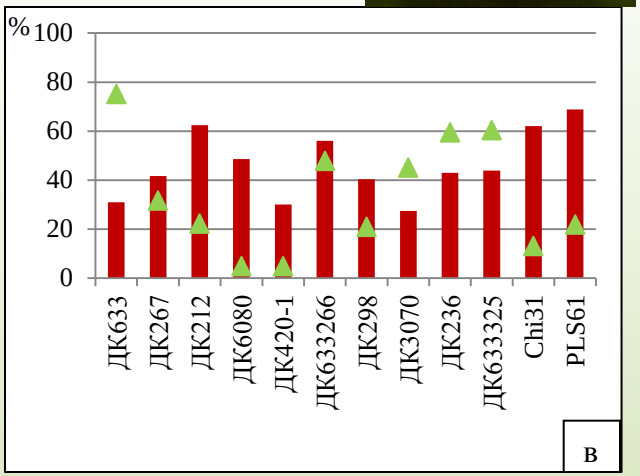
Сила впливу генотипу, умов року та їхньої взаємодії на індукцію калусогенезу у ліній кукурудзи плазми Ланкастер, %

Фактор впливу	Сила впливу фактора на ознаки, % (η^2 x±$\Delta\eta^2 x_{0,01}$)			
	Загальна частота калусогенезу	Частота утворення		
		морфогенних калусів	калусів I типу	калусів II типу
Генотип	8,9±0,2	8,1±0,2	5,9±0,2	4,6±0,2
Умови року	0,2±0,1	2,3±0,1	5,9±0,2	10,4±0,04
Генотип × умови року	6,9±0,5	11,3±0,4	24,2±0,4	23,4±0,3

Взаємозв’язок показників індукції калусогенезу та сили впливу умов року для частоти утворення морфогенних калусів (а), частоти утворення калусів I типу (б) і частоти утворення калусів II типу (в) у ліній кукурудзи плазми Ланкастер та ліній-стандартів



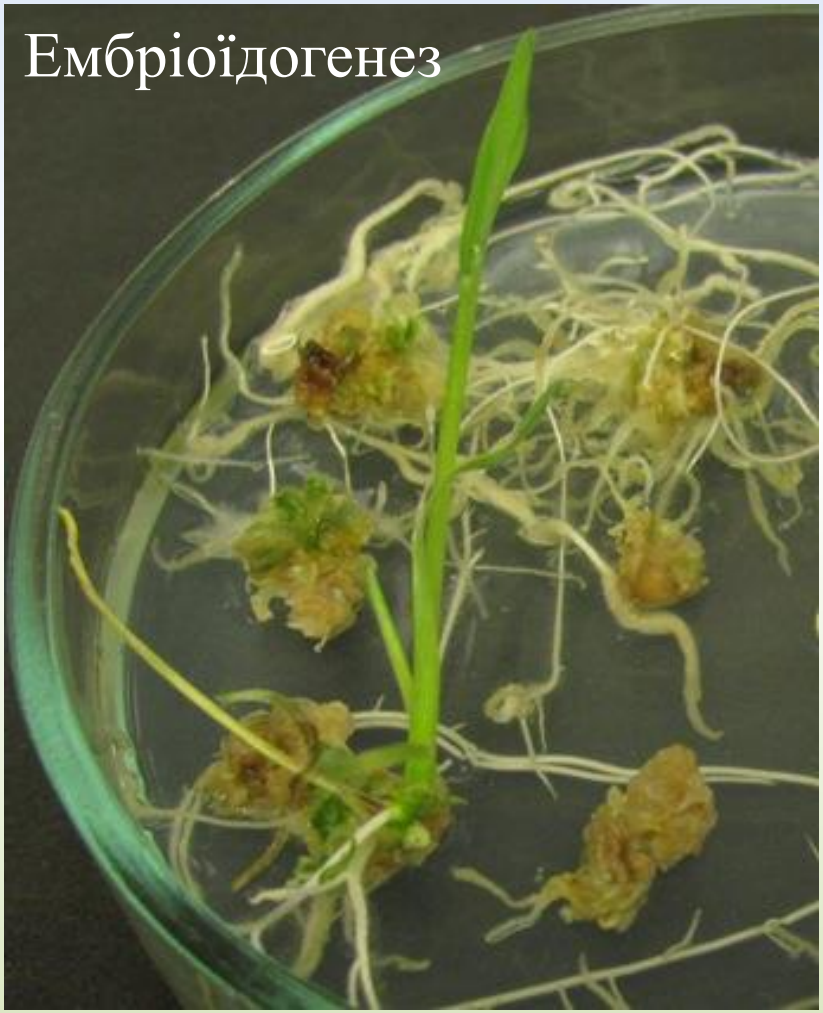




Червоними стовпчиками позначено рівень показників індукції калусогенезу (%), зеленими трикутниками – рівень сили впливу умов року (%)

РЕГЕНЕРАЦІЯ РОСЛИН В КУЛЬТУРІ *IN VITRO* У ГЕНОТИПІВ ЗАРОДКОВОЇ ПЛАЗМИ ЛАНКАСТЕР

Морфогенез *in vitro* відбувався шляхом органогенезу та ембріоїдогенезу



Регенерація рослин *in vitro* з калусної тканини **I типу** у кукурудзи

Генотипи	1/2*	R/100Ca**	Частота морфогенезу,%	
			Органо-генез	Ембріоїдо-генез
Лінії Ланкастер	242/60	24,8±5,6	60,0±12,8	40,0±12,8
Лінії-стандарти	199/308	154,8±13,1	86,0±4,0	14,0±4,0
Гібриди ліній Ланкастер з A188	117/79	67,5±8,7	93,4±5,5	6,6±5,5
Гібриди ліній Ланкастер з Chi31	61/10	16,4±9,6	80,0±26,7	20,0±26,7
Гібриди ліній Ланкастер з PLS61	367/203	55,3±5,2	87,2±4,7	12,8±4,7
Середнє для гібридів ліній Ланкастер з лініями-стандартами	545/292	53,6±4,3	86,9±2,1	13,1±2,1

Регенерація рослин *in vitro* з калусної тканини **II типу** у кукурудзи

Генотипи	1/2*	R/100Ca**	Частота морфогенезу,%	
			Органо-генез	Ембріоїдо-генез
Лінії Ланкастер	150/6	4,0±3,2	33,3±42,2	66,7±42,2
Лінії-стандарти	262/108	41,2±6,1	94,4±4,4	5,6±4,4
Гібриди ліній Ланкастер з A188	54/17	31,5±12,8	29,4±22,8	70,6±22,8
Гібриди ліній Ланкастер з Chi31	61/19	31,1±12,0	57,9±23,3	42,1±23,3
Гібриди ліній Ланкастер з PLS61	262/124	47,3±6,2	90,3±5,3	9,7±5,3
Середнє для гібридів ліній Ланкастер з лініями-стандартами	377/160	42,4±5,1	59,2±5,1	40,8±5,1

Примітка. *1 – кількість досліджених калусів, шт. 2 – кількість отриманих рослин-регенерантів, шт.; **R/100Ca – кількість рослин-регенерантів, отриманих на 100 калусів, шт./100 калусів.

Висновки

В результаті проведених досліджень представлені селекційні та біотехнологічні аспекти створення нових генотипів кукурудзи, адаптованих до умов Степу України.

1. За результатами ідентифікації, оцінки та добору вихідного матеріалу за тривалістю періоду «сходи – цвітіння 50 % качанів» відібрано 15сімей S_6, які вирізняються більш раннім цвітінням, в середньому на 4-5 діб, ніж їх вихідні лінії батьківські форми гібридів на базі яких вони створені та найбільш скоростигла лінія-стандарт ДК281 (54 доби).

2. Найкращі селекційні результати отримані на базі вихідних ліній ДК219, ДК233, ДК265, ДК281 та ДК285, які забезпечили високий вихід кращих самозапилених сімей.

3. У екстремальних умовах північного Степу України лінії $ДК2109_{223112}$, $ДК9512_{111311}$, $ДК305_{121142}$, $ДК2285_{131111}$, $ДК2831_{113111}$, характеризувались стабільним проявом висоти рослин у стресовому та сприятливому році, що опосередковано може вказувати на кращу їх адаптивну стійкість.

4. Аналіз ефектів комбінаційної здатності за показником «збиральна вологість зерна» уможливило виділити 15 ліній S_6, які мали стабільно низькі ефекти ЗКЗ, що вказує на можливість їх використання в селекційних програмах для отримання гібридних комбінацій з інтенсивною втратою вологи зерном при дозріванні.

5. Добір на скорочення тривалості періоду «сходи – цвітіння 50 % качанів» серед тесткросів самозапилених сімей S_6 уможливило відібрати 10 кращих гібридних комбінацій за врожайністю зерна, які зацвітали на 6-5 діб раніше за гібрид-стандарт Оржиця 237 МВ при вищій на 8,9-23,5 % врожайності зерна.

6. Оцінка 8 скоростиглих константних ліній зародкової плазми Айодент за селекційними ознаками дозволила виявити кращі з них (ДК555 та ДК1274) за комбінаційною здатністю в порівнянні із контролем лінією ДК744.

7. Вивчення сестринських гібридів плазми Айодент виявило форми із значним проявом гіпотетичного гетерозису. Найбільшим в середньому він був у схрещуваннях ліній ДК234 (137,0 %), ДК714/195 (122,7 %) та ДК216 (101,1 %), а найменшим у гібридів ліній – ДК555 (58,5 %), ДК1274 (65,8 %) та ДК744 (75,0 %). Сестринські комбінації з лініями ДК1274 та ДК237 характеризувались найбільшою сталістю їх врожайності за роки досліджень.

8. Поступові циклічні покращення ліній дозволили сформувати ядро генетичного різноманіття скоростиглих зразків ФАО 150-250, конкурентних в гетерозисній селекції. Створено базову основу вихідних ліній скоростиглих зразків споріднених з плазмою Айодент, що зумовлює можливість подальшого синтезу скоростиглого вихідного матеріалу для селекції ранньостиглих гібридів кукурудзи адаптованих до умов степової зони України.

9. Виділені лінії ДК7443, ДК7455 та ДК7421, які за оцінками ефектів ЗКЗ відносно ознаки «врожайність зерна» перевищили лінію-стандарт ДК744.

10. Молекулярно-генетичний аналіз генотипів кукурудзи генетичної плазми Ланкастер показав, що результати принципового компонентного, кластерного, дисперсійного аналізу та аналізу генетичної структури ліній за алельним станом маркерів однонуклеотидного поліморфізму ДНК засвідчують відокремленість групи ліній, які за родоводом відносяться до зародкової плазми Ланкастер. Специфічний набір алелів SNP-маркерів за панеллю BDI-III для плазми Ланкастер становить 332Г, 151А, 256А, 331Т, 335Ц, 185Ц, 343А, 181Ц, 288А та 190А.

11. Генетична плазма Ланкастер характеризується середніми значеннями частоти мажорного алеля SNP-маркерів на рівні 0,7678 ± 0,0159 і показника генного різноманіття ліній – 0,1774 ± 0,0015. Розмір SNP-дистанцій між лініями Ланкастер в середньому становить 0,3377 ± 0,0099, це свідчить про значне генетичне різноманіття усередині даної плазми.

12. У генетичної плазми Ланкастер спостерігається значне варіювання за калусогенною здатністю в культурі *in vitro*. Середні рівні ознак загальної частоти калусогенезу, частоти утворення морфогенних калусів, зокрема I та II типів, пропорційно збільшуються в досліджених групах у напрямку Mo17 → $Mo17_{mix}$ → Oh43 → Mo17/Oh43 разом з насиченням неспорідненим генетичним матеріалом.

13. У ліній плазми Ланкастер і гібридів між лініями Ланкастер та лініями-стандартами співвідношення типів морфогенезу (органогенез / ембріоїдогенез) залежить від генотипу, типу та тривалості періоду культивування калусної тканини до трансплантації на регенераційне середовище. Регенераційна здатність ліній кукурудзи плазми Ланкастер визначається генотипом, типом і віком калусної тканини, а також складом живильних середовищ для індукції калусогенезу та індукції регенерації.

За результатами роботи **опубліковано 15 статей**. Згідно бази даних Google Shcolar загальна кількість посилань на публікації авторів, представлені в роботі, складає 39, h-індекс (за роботою) = 3; згідно бази даних Web of Science загальна кількість посилань складає 3, h-індекс = 1. Новизну та конкурентоспроможність технічних рішень **захищено 1 патентом**, **21 авторським свідоцтвом на сорт рослин**. За даною тематикою **захищено 3 кандидатські дисертації**.