

КЛАСТЕРНИЙ АНАЛІЗ РЕКОМБІНАНТНИХ ЛІНІЙ КУКУРУДЗИ ЦУКРОВОЇ ЗА СУКУПНІСТЮ СЕЛЕКЦІЙНИХ ОЗНАК

О. Є. Клімова, кандидат сільськогосподарських наук
Інститут сільського господарства степової зони НААН України

Наведені результати кластерного аналізу генетичної структури рекомбінантних ліній кукурудзи цукрової, який уможливує проведення багатомірної класифікації лінійного матеріалу, його диференціацію за генетичними дистанціями, встановлення ступеня гетерогенності зародкової плазми окремих груп та з'ясування рівня спорідненості конкретних генотипів для забезпечення раціонального їх використання в різних програмах селекції кукурудзи цукрової.

Ключові слова: кукурудза цукрова, лінії, ознаки, геноплазма, генетичні дистанції, дендрограми, різноякісність, спорідненість.

Головну роль у гетерозисній селекції кукурудзи цукрової відіграє вихідний матеріал – інбредні лінії з генетичною різноякісністю. При створенні нових ліній кукурудзи використовуються кращі на даному етапі елітні та оригінальні, як інтродуковані, так і власної селекції, зразки. Незважаючи на цілеспрямований добір впродовж ряду генерацій інбри-дингу, новостворені константні нащадки можуть успадковувати низку ознак одного з компонентів схрещування, що деякою мірою зумовлює їхню схожість з батьківськими формами за генотипом. Це призводить до створення різною мірою спорідненого генетично матеріалу.

Оцінка генетичної різноякісності та визначення ступеня спорідненості лінійного матеріалу потребують використання надійних і ефективних методів його ідентифікації та диференціації. Виявлення різноманіття ліній за фенотипом ознак разом з інформацією про їхній родовід є об'єктивною основою для опису генотипів, їх реєстрації та формування різних колекцій [1]. Однак даний підхід не враховує впливу рекомбінації генів при гібридизації батьківських форм та їхніх трансгресій в поколіннях добору. За даними С. І. Мустяци [2], виявлення різноманіття ліній за проявом гетерозису та індексами генетичної різноякісності уможливує надійність їх ідентифікації. Це підтверджено також і С. Н. Новосьоловим [3] при постановці дослідів з кукурудзою цукровою. В той же час класифікація лінійного матеріалу кукурудзи цукрової за цими показниками не повною мірою відображає об'єктивність його розподілу за гетерозисними групами, а виявляє лише тенденції щодо наявних зв'язків [4, 5].

Ефективними методами генотипової диференціації ліній кукурудзи визнано електрофоретичний аналіз білків зеїнової фракції та молекулярних маркерів – RFLP, PARD, ARLP, SSP і SNP-аналізи [6]. За рахунок останніх можливо виявляти поліморфізм ДНК у популяціях селекційного матеріалу та мінімальні зміни в молекулярних послідовностях і на цій основі з'ясовувати спорідненість ліній, проводити їхню класифікацію та оптимізувати добір пар при синтезі високогетерозисних гібридів. Проте ці методи ідентифікації зародкової плазми доступні лише обмеженій кількості селекційних установ [2].

Вирішення проблеми комплексної оцінки селекційних зразків за сукупністю ознак здійснюється також за системним статистичним аналізом, в тому числі кластерним системним, який уможливує проведення багатомірної класифікації, змістовність і цінність якої у вирішенні конкретних завдань визначається сукупністю обраних для аналізу ознак [7]. Його ціль – розгрупування селекційного матеріалу на відмінні типи (кластери). Аналіз є засобом кількісного подання робочих гіпотез відносно різноякісності зразків за проявом біологічних ознак у різних одиницях виміру.

Мета даної роботи – з'ясування рівня дивергенції нових ліній кукурудзи цукрової, створених останніми роками в Інституті сільського господарства степової зони у результаті комбінаційно-трансгресивної селекції між зразками кукурудзи цукрової та носіями специфічних генів біосинтезу вуглеводів.

Матеріалом для досліджень слугували 11 рекомбінантних ліній та їхні вихідні форми – лінії кукурудзи цукрової. Польові дослідження проводили в зоні північного Степу на Синельниківській селекційно-дослідній станції протягом 2012–2013 рр. Агротехнічні заходи у досліджах – загальноприйняті для зони вирощування кукурудзи. Густота стояння рослин на момент збирання у контрольному розсаднику становила 40 тис./га. Площа ділянок 4,9 м² при 3-разовому повторенні. Шляхом моніторингу встановлено контрастність погодних умов у період вегетації кукурудзи в роки досліджень. 2012 р. згідно з коефіцієнтом гідротермічного забезпечення (ГТК = 1,01) характеризувався оптимальними для розвитку рослин умовами, а 2013 р. – посушливими (ГТК = 0,73).

У ході досліджень керувались методичними рекомендаціями [8]. Параметри комбінаційної здатності обчислювали за методикою В. Г. Вольф і П. П. Літуна [9]. Детекцію ліній та кластерний аналіз цих зразків здійснювали за мінімумом генетичних дистанцій середнього зв'язку за врожайністю качанів технічної стиглості, висотою рослин, висотою прикріплення качана, тривалістю періодів "сходи – цвітіння качанів", "сходи – технічна стиглість зерна", ефектами загальної (g_i) і варіансами специфічної (σ^2s_i) комбінаційної здатності з використанням пакету комп'ютерних програм "Statistica 6.1". Генетичні дистанції зв'язків між лініями представлені Евклідовими відстанями.

За оцінками морфобіологічних ознак серед 53 зразків обрано для аналізу 11 кращих новостворених рекомбінантних ліній та їхніх родоначальних форм. Родовід цих зразків свідчить про певну генотипову різноякісність: всі вони характеризуються відмінними від вихідних форм показниками врожайності, структурними елементами та параметрами комбінаційної здатності (табл. 1).

За врожайністю качанів технічної стиглості (3,36–4,33 т/га) виділялись лінії РКЦ17, РКЦ18, РКЦ38, РКЦ49, РКЦ21, які за показники істотно перевищували вихідні форми. У родоводі цих зразків поєднано плазму ліній кукурудзи цукрової (КЦ346-21, КЦ27-2, КЦ26-1, КЦ502-1), восковидної (ВК37, ВК38) та крохмалистої (АС13). Решта ліній була у межах достовірних значень врожайності вихідних форм. Створені вони на основі ліній кукурудзи цукрової, крохмалистої (АС28, АС69, АС64) та восковидної (ВК36, ВК37).

Лінії значно різнилися за висотою рослин і висотою прикріплення качана. Практично всі лінії у різних умовах вирощування формували більш високорослі рослини (на 15,0–62,0 см вищі в 2012 р. та на 9,0–36,0 см – в 2013 рр.), ніж цукрові компоненти схрещування. За висотою прикріплення качана кращі результати в ці роки показали лінії РКЦ17, РКЦ18, РКЦ34, РКЦ38, РКЦ49, РКЦ88. Низка ліній за цим показником була на рівні імовірних значень форм, що поліпшувалися. Лише у лінії РКЦ83-2 були достовірно нижчі значення.

Виділені генотипи з більш коротким, ніж у вихідних форм, вегетаційним періодом – РКЦ18, РКЦ21, РКЦ47, РКЦ49 і РКЦ83-2. Їх віднесено до ранньостиглих та середньоранніх. Більшість новостворених ліній належать до групи середньостиглих, в зв'язку з цим у них був тривалішим міжфазний період порівняно з лініями першого циклу селекції.

За параметрами комбінаційної здатності такі родоначальні лінії кукурудзи цукрової, як КЦ346-21, КЦ502-1, КЦ26-1, віднесено до групи з низькою генетичною цінністю. Ефекти

1. Морфобіологічні ознаки та параметри комбінаційної здатності ліній кукурудзи цукрової

Лінії	Родовід	Врожайність, т/га		Висота, см				Діб від сходів до				2012 р.		2013 р.	
		2012 р.	2013 р.	рослин		прикріплення качанів		цвітіння качанів		технічної стиглості		g _i *	σ ² s _i	g _i	σ ² s _i
				роки											
				2012	2013	2012	2013	2012	2013	2012	2013				
КЦ346-21	P346 su ₁	3,25	2,32	126	123	34	27	57	54	78	75	-3,63	1,05	-0,77	0,63
РКЦ17	КЦ346-21 x BK37	4,09	3,74	180	159	50	49	59	53	79	73	1,21	1,43	2,07	1,04
РКЦ18	КЦ346-21 x BK38	4,33	3,80	188	170	57	54	56	50	75	69	0,40	4,18	0,17	5,36
КЦ502-1	P502 su ₁	3,57	3,10	135	129	42	36	56	53	77	74	-1,86	0,77	-2,91	0,13
РКЦ21	КЦ502-1 x AC13	3,68	3,52	150	138	34	30	54	50	74	70	0,45	1,99	0,98	0,32
РКЦ28	КЦ502-1 x BK38	3,32	3,22	160	136	36	33	57	53	76	72	2,38	0,33	1,14	0,12
КЦ27-2	Трофі su ₁ F ₁	3,36	3,16	124	120	27	26	60	56	82	78	1,48	2,69	2,48	1,52
РКЦ34	КЦ27-2 x AC69	3,42	3,04	144	138	37	33	59	55	80	76	1,53	1,65	1,51	0,68
РКЦ35	КЦ27-2 x AC28	3,62	3,11	150	144	40	39	62	57	84	79	0,02	5,36	1,44	6,31
РКЦ38	КЦ27-2 x BK37	3,96	3,50	155	138	50	45	54	52	73	71	0,41	9,38	6,59	0,32
КЦ26-1	Кэндл su ₁ F ₁	3,18	2,74	120	109	30	28	61	58	81	78	-0,55	2,14	-1,18	4,71
РКЦ47	КЦ26-1 x BK36	3,16	2,84	139	128	32	28	54	50	73	69	1,32	2,23	-1,75	3,09
РКЦ49	КЦ26-1 x BK38	3,79	3,36	159	144	39	34	49	47	68	66	1,51	11,90	0,78	0,49
MC58	339a su ₁ x R879	3,35	2,90	150	136	41	36	59	56	80	78	0,45	1,01	-0,12	1,38
РКЦ88	MC58 x BK37	3,36	3,08	150	144	46	39	60	55	82	77	-1,60	0,82	1,40	9,55
РКЦ83-2	MC58 x AC64	3,28	2,96	136	128	30	24	58	54	78	74	0,88	0,28	0,44	10,66
HIP _{0,05}		0,21	0,16	11,6	9,4	8,6	4,3	-	-	-	-	0,19	3,04	0,17	2,16

* $\sum g_i \neq 0$, оскільки параметри комбінаційної здатності представлених ліній взяті із вибірки оцінки 30-ти ліній.

загальної комбінаційної здатності у них характеризувались негативними значеннями і лише лінія КЦ27-2 – високими позитивними і стабільними показниками ЗКЗ. Для лінії МС58 характерна значна мінливість генетичної цінності – від низької до високої.

Стабільно високі та середні параметри комбінаційної здатності встановлені для рекомбінантних ліній: РКЦ17, РКЦ18, РКЦ21, РКЦ28, РКЦ34, РКЦ35, РКЦ38, РКЦ49, РКЦ83-2. Лінії РКЦ47 та РКЦ88 відзначено як лабільні за параметрами, оскільки їхня селекційна цінність значною мірою визначалась як генотипом, так і умовами вирощування.

Кластерний аналіз лінійних зв'язків за комплексом селекційних ознак уможливило визначення генетичних дистанцій ліній, їх диференціювання та об'єднання у групи за спорідненістю зародкової плазми. У таблиці 2 наведено характеристику генетичних дистанцій зв'язків ліній за оцінюваними ознаками.

2. Генетичні дистанції зв'язків ліній та їхні відхилення

Лінія	Середнє значення				± від середньо-популяційного		Стандартне відхилення			
	2012 р.	ранг	2013 р.	ранг	2012 р.	2013 р.	2012 р.	група*	2013 р.	група*
КЦ346-21	42,38	16	40,29	14	-4,76	-3,27	47,98	4	46,66	3
РКЦ17	53,53	2	48,69	2	+6,45	+5,15	64,00	1	56,63	1
РКЦ18	54,98	1	50,33	1	+7,86	+6,80	66,11	1	59,70	1
КЦ502-1	44,64	12	41,76	12	-2,48	-1,77	48,36	3	50,20	2
РКЦ21	45,45	11	41,83	11	-1,67	-1,70	54,17	2	50,18	2
РКЦ28	47,96	7	44,07	6	+0,74	+0,54	57,89	2	52,93	2
КЦ27-2	42,93	14	41,02	13	-4,19	-2,51	47,52	4	45,71	4
РКЦ34	46,66	9	43,89	8	-0,46	-0,36	52,86	2	50,76	2
РКЦ35	49,29	4	46,69	4	+2,17	+3,16	54,83	2	51,12	2
РКЦ38	49,39	3	44,34	5	+2,27	+0,81	54,46	2	50,12	2
КЦ26-1	42,39	15	38,47	16	-4,73	-5,06	46,57	4	41,48	4
РКЦ47	43,53	13	39,88	15	-3,59	-3,65	50,73	3	47,11	3
РКЦ49	47,47	8	42,23	9	+0,35	-1,30	55,09	2	51,61	2
МС58	47,91	6	44,02	7	+0,79	+0,49	54,78	2	50,77	2
РКЦ88	49,00	5	47,00	3	+1,88	+3,47	55,00	2	51,39	2
РКЦ83-2	46,55	10	42,00	10	-0,57	-1,53	48,13	3	46,73	3
Середнє	47,12	-	43,53	-	0,00	0,00	-	-	-	-

* Групи спорідненості: 1 – неспоріднені, 2 – віддаленоспоріднені,
3 – середньоспоріднені, 4 – близькоспоріднені.

Середні значення генетичних дистанцій коливались від мінімальних значень у ліній КЦ346-21, КЦ26-1 в 2012 та 2013 рр. до максимальних – у РКЦ18 при середньопопуляційному їх рівні 47,12 та 43,53. Мінімальні, але дещо вищі значення встановлені також у ліній КЦ502-1, РКЦ21, КЦ27-2 і РКЦ47. До генотипів з підвищеними середніми значеннями віднесено лінії РКЦ17, РКЦ35, РКЦ38, РКЦ88. Згідно з рангом генетичних дистанцій ліній з мінімальним проявом середніх значень посідали 12–16, а з максимальним – 1–5 місце у межах оцінюваної вибірки. Відхилення від середньопопуляційного показника у ліній першої групи були негативними і становили -1,67 – -4,76 та -1,70 – -5,06, а в другій – позитивними – 1,88 – 7,86 та 0,81 – 6,80 відповідно рокам досліджень. Вектори позитивних і негативних значень при цьому свідчать про значну віддаленість між лініями цих груп.

Середнє значення генетичних дистанцій відображує внутрішньовидову специфічність ліній за генетичними властивостями. Важливу інформацію надає і параметр "стандартне відхилення", який характеризує різноякісність ліній у генотиповому середовищі вибірки.

Аналіз значень стандартного відхилення виявив значну дивергентність ліній РКЦ17 та РКЦ18 порівняно з іншими зразками в роки досліджень. Характеризувались вони найбільшими (56,63–66,11) значеннями. Ці лінії різноякісні за дистанціями зв'язку відносно інших генотипів і їх віднесено до групи неспоріднених з ними. Віддалену в межах вибірки спорідненість відзначено у ліній РКЦ21, РКЦ28, РКЦ34, РКЦ35, РКЦ38, РКЦ49, МС58, РКЦ88 протягом двох років – у них оцінюваний показник коливався від 50,12 до 57,89. Лінії РКЦ47 і РКЦ83-2 із значеннями стандартного відхилення 46,66–50,73 виокремились у групу середньоспоріднених, а КЦ27-2 і КЦ26-1 – близькоспоріднених порівняно з іншими оцінюваними лініями з найменшими параметрами значень стандартного відхилення – 41,48–47,52. Лінія КЦ346-21 за рівнем відхилення переходила з групи близькоспоріднених у 2012 р. до групи середньоспоріднених у 2013, а лінія КЦ502-1 – з групи середньоспоріднених до групи віддалених. У даному випадку проявлялась модифікаційна мінливість організації морфогенезу ознак і генетичної системи продуктивного процесу як у цих ліній, так і в їхніх тесткросів за дії різних факторів навколишнього середовища.

Побудова та аналіз дендрограм деталізує інформацію про характер зв'язків між лініями на рівні кластерів і конкретизує зв'язки між генотипами у їхніх межах. Дендрограма являє собою одномірний граф кластерів, побудованих за відстанями генетичних дистанцій. Вони розташовані за ієрархічними рівнями і підкреслюють схожість генотипів при обраній для аналізу сукупності ознак.

На дендрограмах (рис.) виділено два основних кластера. Перший з них об'єднує лінії РКЦ17 і РКЦ18 з внутрішньокластерними відстанями мінімальних дистанцій – $D = 12,0$ та $15,0$ відповідно в 2012 і 2013 рр. У них проявляється значна спорідненість ($D = 16,0$) з вихідною формою лінією КЦ346-21 ($D = 10,0$ у 2012 р. та $D = 6,0$ у 2013 р.). При цьому міжкластерні дистанції ($D = 24,9$ і $20,5$) в 2,07 та 1,66 і 1,37 та 1,28 рази перевищували внутрішньокластерні ($D = 12,0$ та $15,0$ і $15,0$ та $16,0$) відповідно рокам досліджень. Очевидно при рекомбіногенезі батьківських компонентів схрещування у цих ліній з'явилися нові полігенні комплекси, які з високою експресивністю вплинули на формування нового генетичного коду, відмінного від вихідної форми та інших оцінюваних ліній. Їх об'єднано в окрему гетерозисну групу, базовою лінією якої визнано РКЦ18 з максимальним проявом морфобіологічних ознак і її рекомендовано як еталон для характеристики типових ознак у інших ліній та новостворених зразків наступних циклів селекції.

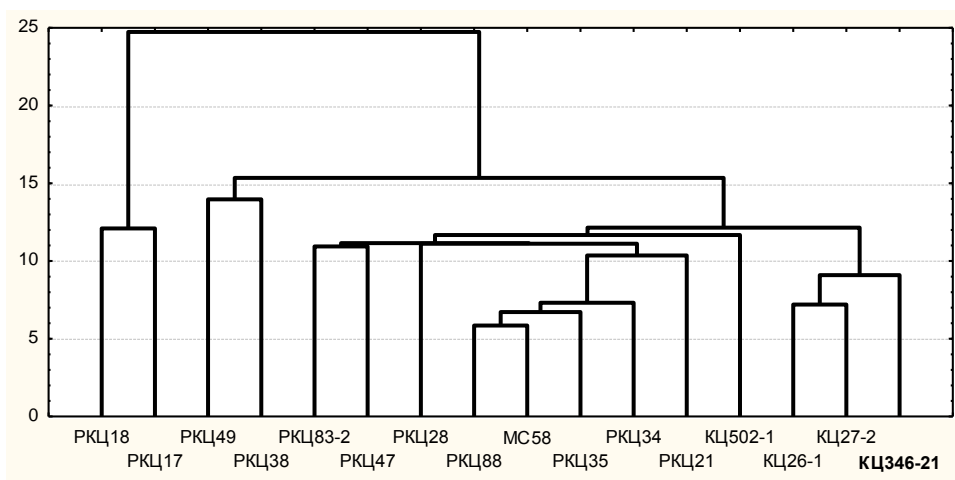
Другий кластер поєднував в собі достатньо широкий набір ліній. Його розподілено на чотири підкластери. У 2012 р. за довжиною генетичних дистанцій ($D = 14,0$) лінії РКЦ49 та РКЦ38 об'єднано в I-й підкластер другого кластера. Ці лінії визначались значною спорідненістю за геноплазмою в межах своєї групи і віддаленістю її відносно інших груп даного кластера та своїх вихідних форм – КЦ26-1 та КЦ27-2. Еталоном даної групи ліній обрано РКЦ38.

До II-го підкластера віднесено лінії РКЦ83-2, РКЦ47, РКЦ28 і РКЦ21, які за ієрархією зв'язків генетичних дистанцій ($D = 11,0$ та $10,5$) з високою силою консолідується між собою і середньою ($D = 6,0$ та $7,0$) – з лініями РКЦ88, РКЦ34, РКЦ35 III-го підкластера. Лінії II-го підкластера, що посідають проміжне місце між генотипами I та III-го підкластерів, ідентифіковано як близькоспоріднені, а III-го – як середньоспоріднені порівняно з іншими групами. Найбільш об'єктивно лінії II-го підкластера репрезентує лінія РКЦ28 з комплексом господарсько- і селекційно-цінних ознак, а лінія РКЦ34 дублює генотипи III-го підкластера. Між лінією КЦ502-1 та лініями II-го підкластера існує близький зв'язок, а в лінії МС58 – з лініями III-го. Очевидно в геномах ліній цих груп міститься висока і середня частка зародкової плазми кукурудзи цукрової попередніх циклів селекції, що зумовлює змішаний тип їхньої геноплазми та спорідненості.

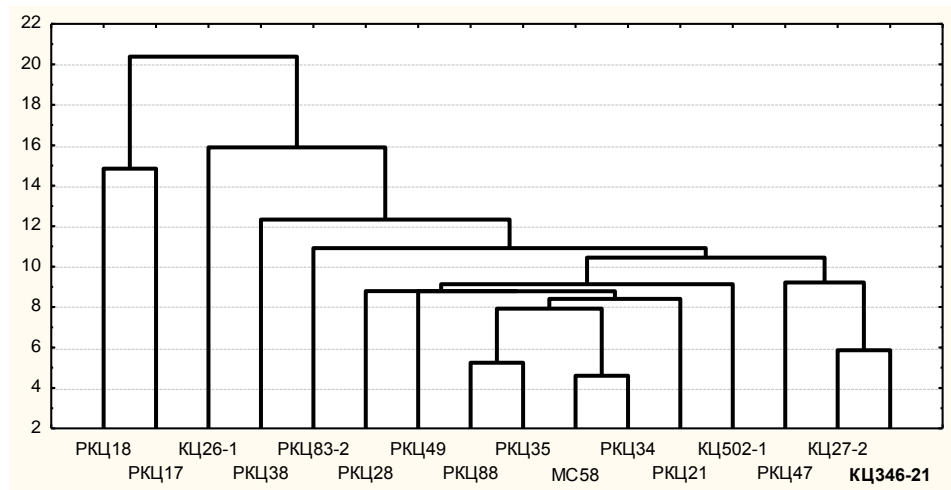
Четвертий підкласстер другого кластера сформували вихідні форми кукурудзи цукрової: КЦ26-1, КЦ27-2 і КЦ346-21. Згідно з розташуванням у дендрограмі вони є генетично близькоспорідненими між собою та знаходяться на різних міжкластерних і внутрішньокластерних відстанях від інших ліній вибірки.

На дендрограмі 2013 р. у більшості випадків розподіл ліній за групами був тотожним розподілу 2012 р. Але при цьому виявлено різномірність складу окремих підкластерів, що пояснюється неадекватною реакцією окремих генотипів на погіршення погодних умов.

Виявлені зв'язки генетичної віддаленості ліній свідчать про наявність диверсифікації у цих зразків на рівні окремих груп, що уможливорює з'ясування характеру спорідненості рекомбінантних ліній в їхніх межах. Це дає підстави для найбільш ефективного використання даних ліній у різних програмах гетерозисної селекції кукурудзи цукрової. Генетично дивергентні лінії РКЦ17, РКЦ18 та віддалено споріднені з іншими зразками РКЦ49, РКЦ38 слід широко використовувати у різних варіантах схрещування для отримання високого ефекту гетерозису за врожайністю качанів технічної стиглості та одержання нових цінних за даною ознакою ліній наступних циклів селекції. Лінії РКЦ34, РКЦ35, РКЦ88 з середнім консолідуванням геноплазми відносно інших генотипів краще залучати для модифікації гібридів простої структури з метою підвищення рентабельності насінництва та подальшого їх комбінування з неспорідненими із ними і генетично віддаленими формами для створення конкурентоспроможних комерційних гібридів. Крім того, близькоспоріднені лінії можуть слугувати як джерелом, так і донором господарсько-цінних ознак при створенні вихідних популяцій наступного циклу добору та нового лінійного матеріалу з заданими параметрами ознак.



2012 р.



2013 р.

Рис. Дендрограми дистанційних відстаней рекомбінантних ліній та їхніх батьківських форм.

Кластерний аналіз уможливує визначення генетичної структури рекомбінантних ліній, диверсифікацію лінійного матеріалу за групами спорідненості та виявлення найбільш результативних шляхів його використання у селекційній роботі з кукурудзою цукровою. Дослідженнями встановлено наявність позитивних зрушень при поліпшенні лінійного матеріалу даного підвиду кукурудзи за використання спонтанно модифікованих мутацій ендосперму. Це розширює генетичний ресурс та підвищує генетичний потенціал цієї культури. Кластерний аналіз селекційного матеріалу слід проводити за даними, що отримані в оптимальних умовах вирощування з метою підвищення його об'єктивної оцінки.

Бібліографічний список

1. Гур'єва І. А. Проблеми інтродукції, систематизації та збереження колекційних зразків кукурудзи / І. А. Гур'єва, Н. В. Кузьмишина // Генетичні ресурси рослин. – 2004. – № 1. – С. 32–42.
2. Мустяца С. И. Сравнительный анализ критериев определения отличимости у родственных линий кукурузы / С. И. Мустяца, С. И. Мистерец, С. Г. Брума // Кукуруза и сорго. – 2009. – № 6. – С. 18–24.
3. Новосёлов С. Н. Рекуррентный реципрокный отбор: теоретические основы и практическое использование (на примере сахарной кукурузы): автореф. дис. на соискание ученой степени доктора с.-х. наук: спец. 06.01.05 "Селекция и семеноводство" / С. Н. Новосёлов. – Краснодар, 2008. – 48 с.
4. Клімова О. Є. Дослідження генетичної спорідненості ранньостиглих ліній цукрової кукурудзи / О. Є. Клімова // Бюл. Ін-ту зерн. госп-ва УААН. – Дніпропетровськ, 2006. – № 28–29. – С. 43–49.
5. Дзюбецький Б. В. Генотипова класифікація ліній цукрової кукурудзи плазми Бентам / Б. В. Дзюбецький, О. Є. Клімова // Вісн. аграр. науки. – 2009. – № 7. – С. 47–51.
6. Кожухова Н. Е. Геном кукурудзи та його поліпшення / Н. Е. Кожухова, Ю. М. Сиволап, Б. Ф. Вареник // Вісн. аграр. науки. – 2011. – № 2. – С. 26–29.
7. Системний аналіз в селекції польових культур: [навч. посіб.] / П. П. Літун, В. В. Кириченко, В. П. Петренко [та ін.]. – Х., 2009. – 351 с.
8. Методичні рекомендації польового та лабораторного вивчення генетичних ресурсів кукурудзи / І. А. Гур'єва, В. К. Рябчун, П. П. Літун [та ін.]. – Х., 1993. – 29 с.
9. Методические рекомендации по применению математических методов анализа экспериментальных данных по изучению комбинационной способности / В. Г. Вольф, П. П. Литун, А. В. Хавелова [и др.]. – Х., 1980. – 76 с.

