

УДК 633.15:631.52

## БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ СЕЛЕКЦИОННОЙ ГРУППЫ ЛАНКАСТЕР

©2013 Е.В. Деркач, О.Е. Абраимова, В.В. Борисова, В.Ю. Черчель, Т.Н. Сатарова

Институт сельского хозяйства степной зоны Национальной академии аграрных наук Украины,  
г. Днепрпетровск

Поступила 06.06.2013

В статье рассмотрены биотехнологические особенности линий кукурузы селекционной группы Ланкастер в культуре *in vitro*, представлен молекулярно-генетический анализ линий данной группы.

**Ключевые слова:** *Zea mays L.*, каллусная ткань, регенерационная способность, анализ однонуклеотидного полиморфизма ДНК.

Развитие и использование методов клеточной инженерии, культуры клеток, тканей, органов *in vitro* и ДНК-технологий является отличительной чертой современного этапа развития селекции и биотехнологии сельскохозяйственных культур, среди которых кукуруза занимает лидирующее положение в мире. Результаты исследований по таким направлениям биотехнологии кукурузы как гаплоидия *in vitro*, клеточная селекция, генетическая инженерия, маркер-ассоциированная селекция (MAS) привели к существенной оптимизации различных этапов селекционного процесса этой гетерозисной культуры [1].

Современный генофонд кукурузы представлен десятками тысяч линий и гибридов, которые по общности происхождения делятся на группы (типы зародышевой плазмы). Гибриды линий, относящихся к различным типам зародышевой плазмы, как правило, проявляют более значительный гетерозисный эффект, в том числе и по урожайности, чем гибриды близкородственных линий. Одним из типов зародышевой плазмы, который адаптирован к жестким экологическим условиям юго-востока Украины со значительным недобором осадков и повышенными температурами в период вегетации, является группа линий и гибридов, ведущих свое происхождение от американского сорта Lancaster. Линии группы Ланкастер активно используются в селекции на жаро- и засухоустойчивость, скороспелость, как доноры высокой комбинационной способности [1,2].

Каллусогенез и регенерация растений в культуре *in vitro* лежат в основе биотехнологий более высокого порядка – клеточной селекции, получения соматоклональных вариантов, агробактериальной и биолиственной трансформации. У кукурузы эти работы проводятся только на базе каллусной ткани

с обязательной последующей регенерацией растений, самоопылением растений-регенерантов и получением семян. Известно, что каллусогенный и регенерационный потенциал кукурузы в значительной мере определяется генотипом эксплантата, причем значительная часть коммерчески ценных генотипов оказываются неотзывчивыми в культуре *in vitro*. Поэтому расширение генетической базы каллусогенеза и регенерации, выяснение закономерностей распределения отзывчивых генотипов в генофонде перспективных зародышевых плазм кукурузы является основой для разработки и оптимизации методик клеточной и генетической инженерии по созданию улучшенных селекционных форм.

Молекулярно-генетические и биотехнологические особенности генотипов ценной в селекционном отношении зародышевой плазмы Ланкастер не изучены, что сдерживает применение новейших биотехнологических методов в прогнозировании комбинационной способности для оптимального подбора родительских компонентов гибридов, создании новых форм, устойчивых к стрессовым абиотическим факторам, в том числе и путем клеточной селекции *in vitro* и генетической инженерии.

Целью нашей работы было исследование молекулярно-генетических и биотехнологических характеристик линий кукурузы группы Ланкастер. В задачи работы входило определение каллусогенного и регенерационного потенциала линий данной группы в культуре *in vitro* и их анализ по маркерам однонуклеотидного полиморфизма ДНК (SNP-маркерам).

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

С целью изучения биотехнологических характеристик в культуре *in vitro* в течение вегетационных сезонов 2010-2012 г.г. исследовались 10 линий кукурузы плазмы Ланкастер: ДК267, ДК212, ДК680, ДК420-1 (подплазма Oh43); ДК633/266, ДК298 (подплазма Mo17/Oh43); ДК633, ДК3070, ДК236, ДК633/325 (подплазма Mo17mix) селекции ИСХСЗ НААНУ. Принадлежность линий к типу плазмы и типу подплазмы устанавливалась по родословным линий. Каллусную ткань получали из

Деркач Екатерина Викторовна, научный сотрудник, e-mail: katerina-d-d@yandex.ua; Абраимова Ольга Евгеньевна, старший научный сотрудник, e-mail: abraimovaolga@gmail.com; Борисова Виктория Викторовна, научный сотрудник, e-mail: assistant@maize.com.ua; Черчель Владислав Юрьевич, к.с.-х.н., старший научный сотрудник, зам. директора, e-mail: vlad\_cherch@mail.ru; Сатарова Татьяна Николаевна, д.б.н., проф., заведующая лабораторией, e-mail: satarova2008@yandex.ru

незрелых зародышей длиной 1-1,5 мм, изолированных из полевых донорных растений. Индукция морфогенного каллусогенеза I типа (компактный, короткоживущий каллус) и II типа (рыхлый, длительно пассируемый каллус) была выполнена по методике [3] с типизацией каллусов по [4]. Растения-регенеранты в культуре каллусной ткани были получены по методике [5].

Анализ однонуклеотидного полиморфизма ДНК проводили для 90 линий кукурузы селекции Института сельского хозяйства степной зоны НААНУ, компании Маис и других селекционных учреждений Украины с использованием панели из 384 SNP-маркеров на базе фирмы BioDiagnostics, Inc. (США). Для SNP-анализа использовали анализатор Illumina's BeadXpress Reader. SNP-анализ и обработку полученных результатов вели по протоколам, изложенным в [6-9].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку зародышевая плазма Ланкастер достаточно обширна, для биотехнологической харак-

теристики каллусогенеза и регенерации были отобраны линии, представляющие 3 основные ее подплазмы. Подплазма Oh43 ведет свое происхождение от линии Oh43 и в нашем эксперименте была представлена линиями ДК267, ДК212, ДК680, ДК420-1. Подплазма Mo17/Oh43 включает линии, полученные при объединении генетического материала линий Mo17 и Oh43 (ДК633/266, ДК298). Подплазма Mo17mix создавалась в селекционных программах для увеличения продуктивности и адаптационного потенциала путем сочетания комплексов генов линии Mo17 плазмы Ланкастер с генетическим материалом других зародышевых плазм – Европейский флинт, Миндзенпуста и других (ДК633, ДК3070, ДК236, ДК633/325).

Морфогенный каллусогенез I типа был получен у 90% изученных линий, а II типа – у 100%. В таблицах 1 и 2 представлена характеристика варьирования частоты морфогенного каллусогенеза у представителей трех подплазм зародышевой плазмы Ланкастер.

**Таблица 1.** Частота образования каллусной ткани I типа у линий кукурузы зародышевой плазмы Ланкастер

Показатель	Подплазмы плазмы Ланкастер		
	Oh43	Mo17/Oh43	Mo17mix
2010 год			
$\bar{x} \pm mt_{0,5}, \%$	31,58±2,80	19,87±2,91	–
Lim, %	0,00÷78,67	0,00÷54,55	–
V, %	105,6	93,4	–
2011 год			
$\bar{x} \pm mt_{0,5}, \%$	7,58±2,23	5,66±2,60	11,78±2,54
Lim, %	0,00÷20,00	0,00÷24,00	0,00÷45,28
V, %	82,2	162,5	127,8
2012 год			
$\bar{x} \pm mt_{0,5}, \%$	15,54±2,57	91,14±3,46	5,40±1,95
Lim, %	0,00÷64,00	84,00÷100,00	0,00÷36,00
V, %	162,5	7,1	209,4

Прим. V – коэффициент вариации

**Таблица 2.** Частота образования каллусной ткани II типа у линий кукурузы зародышевой плазмы Ланкастер

Показатель	Подплазмы плазмы Ланкастер		
	Oh43	Mo17/Oh43	Mo17mix
2010 год			
$\bar{x} \pm mt_{0,5}, \%$	19,28±2,37	61,72±3,54	–
Lim, %	1,33÷56,25	22,08÷91,09	–
V, %	86,72	36,50	–
2011 год			
$\bar{x} \pm mt_{0,5}, \%$	63,49±4,05	79,56±4,53	39,69±3,86
Lim, %	2,78÷100,00	50,00÷100,00	0,00÷100,00
V, %	44,75	19,82	91,06
2012 год			
$\bar{x} \pm mt_{0,5}, \%$	44,99±3,52	2,58±1,93	56,24±4,90
Lim, %	14,00÷73,17	0,00÷8,00	6,00÷94,74
V, %	42,85	142,25	59,82

Каллусы кукурузы I и II типов представляют собой образования, различные как с точки зрения морфогенетических потенций, так и по биотехно-

логическому потенциалу. Они различаются по способности поддерживаться в культуре, по времени наступления и интенсивности регенерации расте-

ний, частоте возникновения на их основе соматических вариантов. Эти и другие особенности позволяют каллусным тканям двух типов дополнять друг друга в биотехнологиях, которые в качестве базисного включают этап каллусогенеза и регенерации.

Известно, что способность к каллусогенезу зависит от физиологического состояния донорного растения и самих эксплантатов на момент введения их в культуру *in vitro*, что напрямую определяется погодными-климатическими условиями, складывающимися в год проведения исследований. Как видно из табл. 1 и 2, интенсивность каллусогенеза I и II типов у представителей различных подплазм в разные годы варьировала, причем размах варьирования по частоте образования каллусов I типа был больше (7,14-209,44%), чем каллусов II типа (19,82-142,25%). Из трех лет исследований, которые существенно различались по количеству осадков и температуре воздуха в период вегетации донорных растений, наиболее благоприятными для реализации каллусогенного потенциала были годы, не одинаковые, как для двух типов каллусной ткани, так и для трех подплазм плазмы Ланкастер. Этот факт еще раз подтверждает закономерность, согласно которой образование двух типов каллусной

ткани контролируется различными генетическими системами, а также подчеркивает роль, которую играет в развитии каллусогенной способности взаимодействие генотипических и экологических факторов. Значительное варьирование способности к каллусогенезу исследованных подплазм плазмы Ланкастер проявляется не только в величине средних, но и предельных значений признаков и коэффициентах их вариации. Наибольшую стабильность каллусогенной способности в различные годы обеспечивал генетический материал подплазмы Oh43, как самостоятельно, так и при добавлении его к Mo17.

Способность к регенерации среди исследованных подплазм проявили только Oh43 и Mo17/Oh43 (табл. 3), причем более стабильными в проявлении регенерационной способности были представители подплазмы Oh43. В среднем регенерационная способность находилась на уровне 13-16%, хотя у отдельных линий достигала 75%, что свидетельствует о значительном регенерационном потенциале зародышевой плазмы Ланкастер и необходимости дальнейшей оптимизации состава питательных сред и условий культивирования для его полной реализации.

**Таблица 3.** Регенерационная способность каллусной ткани кукурузы зародышевой плазмы Ланкастер

Показатель	Подплазмы плазмы Ланкастер		
	Oh43	Mo17/Oh43	Mo17mix
$\bar{x} \pm mt_{0,5}, \%$	16,67±5,48	13,57±7,02	0
Lim, %	0,00÷53,33	0,00÷75,00	0
V, %	105,28	182,02	0

Все исследованные нами подплазмы плазмы Ланкастер были в целом отзывчивы на культивирование *in vitro* и сформировали каллусы обоих типов, однако линии внутри каждой подплазмы различались по каллусогенной способности, поэтому мы выделили лучшие линии, которые в дальнейшем могут служить базовыми для своих подплазм в экспериментах по генетической инженерии и соматическому варьированию. В подплазме Oh43 это линии ДК267 и ДК420-1 для получения каллусов I типа и линии ДК212 и ДК680 для получения каллусов II типа, в подплазме Mo17/Oh43 – ДК298 для каллусов I типа и ДК633/266 для каллусов II типа. Способность к регенерации проявили линии ДК267, ДК680, ДК420-1 и ДК298.

Анализ биотехнологических характеристик тех или иных генотипов в культуре *in vitro* является длительным, трудоемким и, как показали проведенные исследования, в значительной степени зависит от условий внешней среды. В связи с этим представляет интерес выявление линий кукурузы, которые по генотипу будут наиболее близкими к типичным линиям зародышевой плазмы Ланкастер, формирующим основные подплазмы, – линиям Oh43 и Mo17. Специфический для этих и других линий набор нуклеотидов ДНК является независи-

мым от экологических факторов среды. Оценка полиморфизма ДНК различных популяций молекулярно-генетическими методами в последние годы приобрела широкую популярность из-за возможности точного определения аллельного состояния маркерных локусов и использования полученной информации в паспортизации и кластеризации селекционных образцов, картировании генов и маркировании фенотипических признаков. Существуют различные типы маркеров, среди которых для выявления генетического полиморфизма ДНК применяются RFLP-, PCR- и SNP-маркеры. SNP-маркеры в последнее время для кукурузы используются наиболее широко из-за их значительной распространенности в геноме и возможности автоматизированной массовой оценки образцов. Мы использовали SNP-анализ (анализ однонуклеотидного полиморфизма) для генотипирования 90 перспективных в селекционном отношении линий кукурузы, которые характеризовались высокой комбинационной способностью и устойчивостью к абиотическим факторам, складывающимся в период вегетации в степной зоне Украины.

Анализ однонуклеотидного полиморфизма ДНК линий украинской селекции, выполненный по 384 биаллельным SNP-маркерам, расположенным на

всех 10 хромосомах гаплоидного набора, показал, что чаще всего в маркерных локусах встречается дезоксиаденозинмонофосфат и дезоксигуанозинмонофосфат, а наиболее распространенным типом однонуклеотидных замен являются транзиции пуриновых нуклеотидов. Проанализированный набор линий характеризовался гомозиготностью маркерных локусов на уровне 99,8% и генным разнообразием в пределах 0,1634-0,1921 при максимально возможном диапазоне 0,0001-0,5000. Для проанализированного набора линий доля SNP-маркеров с частотой пропущенных данных >20% составила 5,2%, а выявивших диморфное состояние – 98,6%. Частота минорного аллеля (MAF) в исследованном наборе линий в среднем составила 0,3147, модальным классом MAF был класс 0,4000-0,4999. MAF<0,05 имели 1,7% маркеров, MAF>0,2 (нормальную частоту минорного аллеля) – 79,3% маркеров, а 1,4% маркеров выявили равновесные частоты аллелей. Индекс полиморфизма (PIC) для использованных маркеров в данном наборе линий кукурузы в среднем составил 0,3114, к модальному классу PIC 0,350-0,375 принадлежали 47,5% маркеров. Высокоинформативными маркерами, то есть теми, которые имели показатель смещения генного разнообразия >0,32 и PIC>0,25, оказались 83,4% SNP-маркеров. Обобщение характеристик проявля-

ния маркеров в наборе линий украинской селекции позволило отобрать информативные маркеры высокого качества для дальнейшего использования в генотипировании, кластерном и компонентном анализе.

Анализ генетической структуры популяции из 90 линий кукурузы с использованием пакета программного обеспечения STRUCTURE по [10] позволил оценить разнообразие генетического материала в генофонде рассмотренных линий и разделить их на  $k=5$  подгрупп. По каждой из исследованных линий были рассчитаны коэффициенты участия ( $Q$ -коэффициенты) для оценки степени принадлежности линии к той или иной подгруппе по аллельному состоянию SNP-локусов. Принадлежащими к определенной подгруппе считаются линии с  $Q \geq 0,600$ . Для I подгруппы наиболее типичной является линия В73 ( $Q=0,998$ ), для II подгруппы – Oh43 ( $Q=0,989$ ), для III подгруппы – Мо17 ( $Q=0,998$ ), для IV подгруппы – МС3 ( $Q=0,998$ ), для V подгруппы – В14 ( $Q=0,997$ ). К плазме Ланкастер относятся II и III подгруппы. В проанализированном наборе из 90 линий украинской селекции ко II подгруппе (Oh43) принадлежали 35 линий с диапазоном  $Q=0,600-0,984$ , а к III подгруппе (Мо17) – 7 линий с диапазоном  $Q=0,774-0,997$ . Первые 5 линий II и III подгрупп как наиболее типичные приведены в таблице 4.

**Таблица 4.** Линии украинской селекции, принадлежащие к подгруппам Oh43 и Мо17 по результатам SNP-анализа

Подгруппа Oh43		Подгруппа Мо17	
Линия	$Q$	Линия	$Q$
<b>Oh43</b>	<b>0,989</b>	<b>Мо17</b>	<b>0,998</b>
МС17С	0,984	АЦ17МВ	0,997
Дн2	0,981	ВК387МВ	0,997
АЦ151	0,968	МС236С	0,991
К325МВ	0,968	ДК231зС,зМ	0,785
МС48ВС	0,952	ДК370МВ	0,774

В дальнейшем в биотехнологических программах с участием зародышевой плазмы Ланкастер необходимо применять дифференцированный подход к выбору генотипов эксплантатов с учетом каллусогенного и регенерационного потенциала, выявленного нами у подплазм Oh43, Мо17/Oh43 и Мо17mix.

Для расширения числа генотипов плазмы Ланкастер, способных к формированию каллусной ткани, следует привлекать новые, коммерчески ценные линии, адаптированные к условиям степной зоны Украины, наиболее близкородственные линиям Oh43 и Мо17 по результатам SNP-анализа. Результаты оценки генетической структуры современных линий кукурузы необходимо учитывать в селекционных программах при подборе родительских компонентов гибридов для получения максимального эффекта гетерозиса как по продуктивности, так и по способности к адаптации к росту, развитию и формированию урожая в условиях недос-

таточного увлажнения и жесткого температурного режима в период вегетации.

Линии кукурузы селекционной группы Ланкастер характеризуются высоким потенциалом образования основных типов каллусной ткани в культуре *in vitro*, тогда как их регенерационная способность находится на среднем уровне. Частота морфогенного каллусогенеза в значительной степени варьирует в зависимости от генотипа эксплантата и почвенно-климатических условий выращивания донорных растений. Наибольшую экологическую стабильность каллусогенной способности обеспечивает генетический материал подплазмы Oh43, как самостоятельно, так и при добавлении его к Мо17. Анализ однонуклеотидного полиморфизма ДНК линий кукурузы украинской селекции позволил разделить их на 5 подгрупп в зависимости от аллельного состояния SNP-маркеров и выявить новые, коммерчески ценные линии, наиболее близкие по генетической структуре к Oh43 и Мо17.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сатарова Т.Н., Черчель В.Ю., Черенков А.В. Кукуруза: биотехнологические и селекционные аспекты гаплоидии // Днепропетровск: Новая идеология, 2013. 552 с.
2. Дзюбецкий Б.В., Черчель В.Ю. Современная зародышевая плазма в селекции кукурузы в Институте зернового хозяйства УААН // Селекция и семеноводство. 2002. Вып. 86. С. 11-19.
3. Деркач Е.В., Абраимова О.Е., Сатарова Т.Н. Каллусогенный потенциал линий кукурузы группы Ланкастер в условиях *in vitro* // Вестник ДНУ. Серия Биология. Экология. 2011. Вып. 19, Т.1. С. 16-21.
4. Green C.E., Phillips Y.L. Plant regeneration from tissues cultures of maize // Crop Sci. 1975. Vol. 15. P. 417-421.
5. Пиралов Г.Р., Байдак Л.А., Абраимова О.Е. Влияние нитрата серебра на каллусогенез и регенерацию растений кукурузы в культуре незрелых зародышей кукурузы // Физиология и биохимия культурных растений. 1994. Т. 26. № 6. С. 567-572.
6. URL: <http://www.biodiagnosics.net/>.
7. Fan J.B., Gunderson K.L., Bibikova M. et al. Illumina universal bead arrays // Methods Enzymol. 2006. V. 410. P. 57-73.
8. Lu Y., Yan J., Guimarães C. T. et al. Molecular characterization of global maize breeding germplasm based on genome wide single nucleotide polymorphism // Theor. Appl. Genet. 2009. V. 120. P. 93-115.
9. Ganai M W. et al. Review SNP identification in crop plants // Curr. Opin. Plant. Biol. 2009. V. 12. N 2. P. 211-217.
10. Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies // Genetics. 2003. V. 164. P. 1567-1587.

## BIOTECHNOLOGICAL AND MOLECULAR AND GENETIC CHARACTERISTICS OF MAIZE LINES OF LANCASTER BREEDING GROUP

©2013 E.V. Derkach, O.E. Abraimova, V.V. Borysova, V.Ju. Cherchel, T.N. Satarova

Agricultural Steppe Zone Institute of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Dnepropetrovsk

In the article biotechnological properties of maize lines of Lancaster breeding group *in vitro* culture are described and the analysis of molecular and genetic characteristics of inbreds of given group is represented.

**Keywords:** *Zea mays L., callus tissue, regenerative potential, single nucleotide polymorphism analysis.*

---

Ekaterina Derkach, researcher, e-mail: katerina-d-d@yandex.ua; Olga Abraimova, senior researcher, e-mail: abraimovaolga@gmail.com; Viktoriya Borysova, researcher, e-mail: assistant@maize.com.ua; Vladyslav Cherchel, Candidate of Agriculture, senior researcher, vise-director, e-mail: vlad\_cherch@mail.ru; Tatyana Satarova, Doctor of Biology, professor, head of laboratory, e-mail: satarova2008@yandex.ru