

СТВОРЕННЯ САМОЗАПИЛЕНИХ ЛІНІЙ КУКУРУДЗИ (*ZEA MAYS L.*) КОМБІНОВАНИМ МЕТОДОМ

Б. В. Дзюбецький, доктор сільськогосподарських наук;

М. М. Федько, Н. А. Боденко, кандидати сільськогосподарських наук

ДУ Інститут зернових культур НААН України

Наведені результати розробки і впровадження в селекційну практику нового методу отримання та оцінки вихідного матеріалу кукурудзи, за рахунок якого можливо прискорити селекційний процес і більш ефективно використовувати земельні і трудові ресурси без звуження генетичного різноманіття селекційних зразків.

У результаті досліджень встановлено можливість суміщення двох методів одержання селекційного матеріалу кукурудзи: модифікованого MSSD та стандартного. Такий підхід прискорює процес отримання інбредних ліній за рахунок використання зимового розсадника на початкових етапах самозапилення, широкої основи генетичної плазми, ефективного залучення робочої сили, економії часу і можливості працювати з великою кількістю зразків.

Ключові слова: кукурудза, самозапилена лінія, генетична плазма, комбінований метод, гете-розис, тесткрос.

За останнє десятиріччя методи селекції кукурудзи зазнали значних змін і модернізації. Сьогодні неможливо уявити ефективний селекційний процес без методів гаплоїдії, генетичного маркування, SNP аналізу та ін. Найбільша їхня ефективність проявляється у процесі створення гібридів кукурудзи для сприятливих нелімітованих умов вирощування. Проте, незважаючи на успіхи сучасних генетичних і методологічних підходів, створення нового вихідного матеріалу для стресових кліматичних умов потребує інших комбінованих або модифікованих методів.

Одним з нових оригінальних методів є modified single seed descent (модифікований метод однонасінного покоління – MSSD), який можна використовувати при селекції як самозапильних, так і перехреснозапильних культур. Базується він на доборі окремих насінин від кожної рослини з наступним їх об'єднанням для висіву на окремій ділянці для одержання наступного покоління.

Вперше цей метод запропонував С. Н. Goulden (без назви SSD) для селекції самоза-пилених злаків, виходячи з зацікавленості селекціонерів у швидкому інбридингу популяцій до початку оцінки одержаних ліній [1]. Він відзначав, що селекційна програма по пшениці може бути поділена на дві частини: отримання чистих ліній в процесі розщеплення популяцій і добір кращих з них. С. Н. Goulden вказував, що при методі педігрі для збереження генетичного різноманіття в процесі добору ліній їх потрібно вирощувати в певному навко-лишньому середовищі та обмежуватися однією генерацією щорічно [1]. Крім того, метод педігрі базується на передумові, що одержувати лінії з необхідними характеристиками можливо одночасно з просуванням до гомозиготності. Метод SSD повинен був відокремити інбридинг і генерації добору, щоб прискорити процес просування вперед.

Оригінальний метод single seed descent (SSD) підтримує загальне генотипове різноманіття. Тобто кожна окрема насінина покоління F_5 веде свій родовід від окремої насінини S_2 . Теоретично, якщо вести добір серед великої кількості сімей S_2 можна мати дуже широку внутрішньопопуляційну мінливість. При цьому більшість з них вибраковується через відсутність бажаних позитивних характеристик. Щоб усунути або принаймні зменшити зміни в генотипових частотах об'єднаної популяції, С. А. Brim запропонував модифікувати метод SSD (MSSD) шляхом проведення певного добору під час інбридингу [2].

За повідомленням М. Jumbo та ін., добір ліній за модифікованим методом MSSD, який базується на оцінці рослин за зовнішнім виглядом, призвів до створення гібридів з більшою вологістю зерна, ніж у зразків, отриманих з участю ліній відселектованих

іншими методами [3]. Тому просування випадкових ліній без добору на адаптацію або за іншими спадковими ознаками значно зменшує ефективність даного методу, особливо при роботі з екзотичною генетичною плазмою.

Модифікований метод MSSD має менші можливості щодо добору в межах сімей порівняно зі стандартним, але дає змогу одержувати інбредні лінії швидше і з меншими потребами в площі земельних ділянок, що особливо важливо при використанні для цих цілей зимових розсадників або оранжерей [4].

Безумовно, враховуючи низку позитивних переваг даного методу, його можна широко застосовувати при створенні нових ліній без принципових змін, проте через деякий час виникає потреба в проведенні комплексної селекційної оцінки отриманого матеріалу. Як свідчать результати багаторічних досліджень, більш ефективною вона буває при використанні стандартного методу.

Мета наших досліджень полягала у розробленні та впровадженні в селекційну практику нового методу одержання і оцінки вихідного матеріалу кукурудзи, який би поєднав в собі вищеописані методи і дав можливість прискорити селекційний процес за менших земельних і трудових ресурсів без звуження генетичного різноманіття отриманих зразків.

Розробку та впровадження у селекційну практику комбінованого методу створення самозапилених ліній кукурудзи проводили в ДУ Інститут сільського господарства степової зони протягом 2004–2015 рр. Для цього було відібрано низку популяцій різних за структурою та генетичним походженням. Їх попередньо оцінювали за комбінаційною здатністю відносно елітних ліній базових геноплазм для визначення майбутніх гетерозисних пар стосовно створюваних ліній. Самозапилення та добір розпочинали з генерації S_0 і проводили до S_8 . Для узагальнення результатів було відібрано 5 вихідних популяцій: ДКП63, ДКП18, ДКП26, ДКП19-7, ДКП03, в яких проводився добір як стандартним, так і поліпшеним нами методом. Інбредні лінії та їхні тесткроси висівалися у селекційному і контрольному розсадниках з розміром ділянок відповідно 4,0 та 4,9 м². Як стандарти використані середньостиглі гібриди: Солонянський 298СВ (ФАО 300) та ДН Гетера (ФАО 380).

Досліди проводились згідно з методиками дослідної справи [9–10]. Статистичну достовірність експериментальних даних визначали за допомогою дисперсійного аналізу за методикою Б. О. Доспехова, 1985, параметри варіювання згідно з методикою Г. Ф. Лакіна, 1990.

У результаті досліджень встановлено можливість суміщення двох методів отримання селекційного матеріалу кукурудзи – модифікованого MSSD та стандартного. На початкових етапах самозапилення (генерації S_1 – S_4) використовували схему модифікованого методу MSSD, за якою відбирали 3–5 зерен з кожного качана для отримання нової популяції з наступним їх об'єднанням і проведенням в подальшому самозапилення та добору за фенотипом бажаних рослин. З генерації S_4 оцінку і добір самозапилених сімей проводили за схемою стандартного методу з посімейною оцінкою ліній, їх тестуванням та формуванням бажаного типу рослин. Такий підхід дає можливість прискорити процес одержання інбредних ліній, особливо при використанні зимового розсадника на початкових етапах самозапилення.

Принципова схема запропонованого нами комбінованого методу створення самозапилених ліній кукурудзи (КМССЛ) має наступний вигляд:

Сезон 1. Вирощування рослин F_1 вихідної популяції в селекційному розсаднику, їх самозапилення та одержання насіння покоління S_1 . Кількість самозапилень залежить від генетичної складності вихідної популяції. Для простих гібридів достатньо 5–6 качанів, для більш складних форм – від 20 до 100. Формування об'єднаної проби – 3–5 насінин з кожного качана для наступного висіву, а також резервного зразка – 3–5 насінин з рослини.

Сезон 2. Вирощування рослин генерації S_1 у селекційному розсаднику; самозапилення 100–300 качанів і отримання насіння генерації S_2 . Проведення фенотипової

вибраковки за селекційно-важливими ознаками. З кожної рослини відбирається і об'єднується 3–5 насінин. Створюється резервний зразок.

Сезон 3. Виконуються ті ж самі роботи відносно генерації S_2 .

Сезон 4. Вирощування рослин покоління S_3 у селекційному розсаднику. Самозапилюється 100–300 качанів для одержання насіння покоління S_4 . Проведення жорсткої фенотипової вибраковки за комплексом селекційно-цінних ознак. Кожен качан збирається окремо, реєструється і зберігається.

Сезон 5. Вирощування сімей S_4 окремими рядами в селекційному розсаднику і самозапилення 4–5 рослин у кожному з них для отримання насіння генерації S_5 . Проведення фенотипової вибраковки сімей, що не відповідають вимогам селекціонера, а також посімейне тестування з двома тестерами альтернативних генетичних плазм. Качани збираються окремо.

Сезон 6. Випробування тесткросів сімей S_4 у контрольному розсаднику і оцінка їх за господарсько-цінними показниками (врожайність зерна, збиральна вологість зерна, стійкість до вилягання, дата цвітіння волоті і качана та ін.). За результатами випробування добирається 20–25 кращих сімей.

Вирощування окремими рядами в селекційному розсаднику сімей S_5 , відібраних за фенотипом в попередні роки та самозапилення 3–4 качанів для отримання насіння генерації S_6 . Вибракування небажаних сімей і проведення внутрішньосімейного добору рослин за селекційно-цінними ознаками та посімейне тестування з 2–3 тестерами альтернативних генетичних плазм. Збираються качани посімейно.

Сезон 7. Випробування тесткросів ліній S_5 , виділених за результатами попереднього випробування в контрольному розсаднику. Оцінка гібридів за основними господарсько-цінними показниками. За результатами випробування проведення добіру кращих ліній.

Вирощування кращих ліній S_6 , відібраних за результатами випробування тесткросів та оцінками *per se* в попередні роки, окремими рядами в селекційному розсаднику; самозапилення 3–4-х качанів, одержання насіння ліній S_7 . Внутрішньосімейний добір рослин за комплексом селекційно-цінних ознак і посімейне тестування з 3–4 тестерами альтернативних генетичних плазм. Качани збираються окремо від кожної сім'ї.

Сезон 8. Випробування тесткросів ліній S_6 , виділених за результатами попереднього випробування в контрольному розсаднику. Оцінка гібридів за господарськими показниками.

Висівання ліній S_6 , відібраних за результатами випробування та оцінками попередніх років, у селекційному розсаднику. Розмноження перспективних ліній. Внутрішньосімейний добір рослин за селекційно-цінними показниками і фінальне тестування з 5–6 тестерами альтернативних генетичних плазм. Збираються качани посімейно.

Сезон 9. Випробування тесткросів виділених ліній у розсаднику попереднього або конкурсного випробування. Оцінка гібридів за комплексом показників (врожайність зерна, збиральна вологість зерна, стійкість до вилягання, дата цвітіння волоті й качана та ін.). За результатами випробування кращі лінії розмножуються на ділянках первинного насінництва.

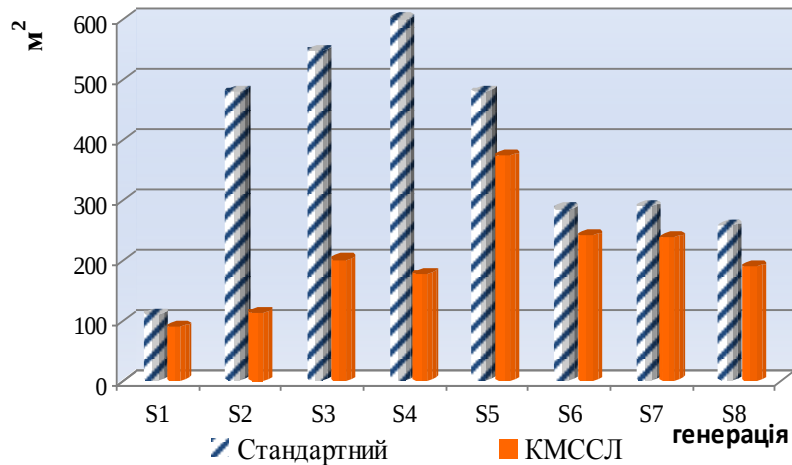


Рис. 1. Сумарна потреба в земельній площі для отримання ліній S₈ різними методами, м².

Порівняльна оцінка стандартного та комбінованого методів одержання інбредних ліній підтвердила значно більшу ефективність останнього, особливо щодо необхідної земельної площі для отримання самозапилених ліній, яка була в сумі на 1436 м² меншою (рис. 1).

Найбільша потреба в земельній площі для проведення досліджень відмічалась у генераціях S₂–S₄; за стандартного методу площа ділянки була на 63,7–76,7 % більшою. На кінцевих етапах самозапилення, починаючи з генерації S₅, ця різниця нівелювалась внаслідок переходу на посімейний добір і оцінку ліній S₅–S₈.

Аналізуючи кількість проведених самозапилень кожним методом та задіяну для виконання одного самозапилення (со) земельну площу, було встановлено, що за комбінованого методу вона варіювала в середньому від 0,2 м²/со у генерації S₁ до 0,84 м²/со у генерації S₅, що на 16,3–74,7 % менше порівняно зі стандартним методом (рис. 2).

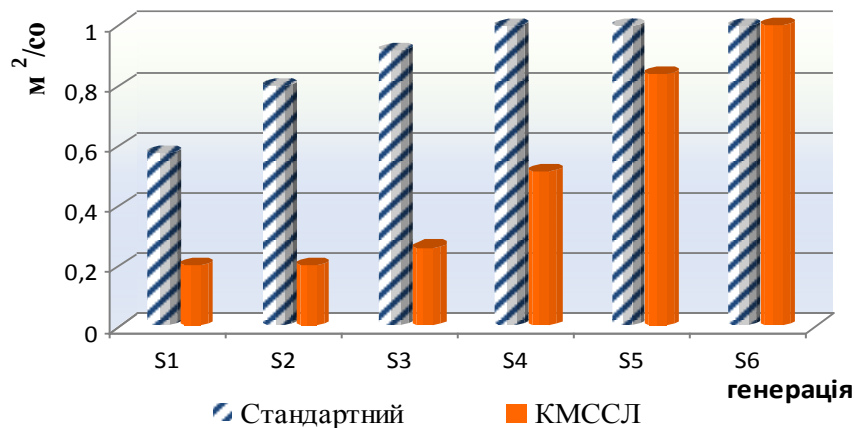


Рис. 2. Потреба в земельній площі для виконання одного самозапилення у різних поколіннях за стандартного та КМССЛ методів.

Починаючи з S₆, задіяна середня площа ділянки за обох методів була практично однаковою і становила 0,9–1,0 м² на 1 со. Об'єми виконаних робіт з одержання інбредних ліній обома методами були майже однаковими і становили щорічно в середньому по кожній популяції до 120 самозапилень, а різниця між ними у різних генераціях самозапилення не перевищувала 15 % (рис. 3).

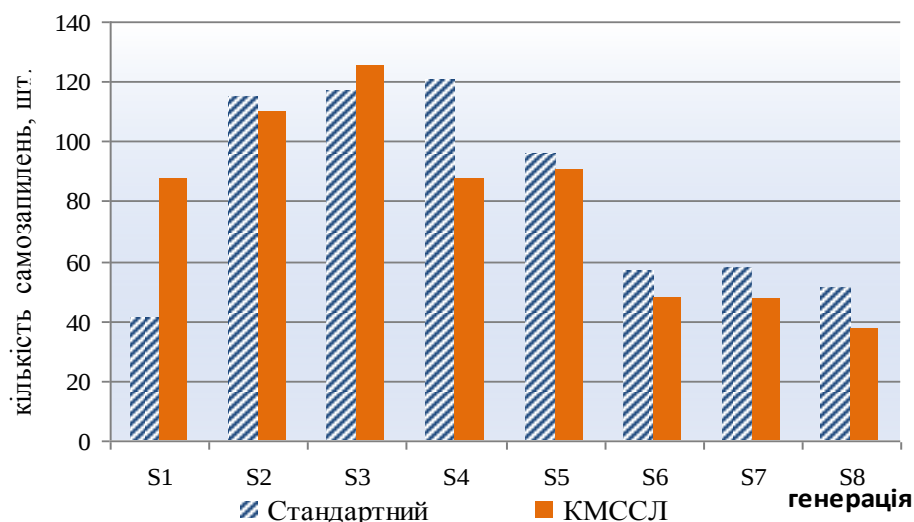


Рис. 3. Середня кількість самозапиленень в популяціях різними методами залежно від генерації.

Проте, слід звернути увагу на кількість самозапиленень, виконаних на початкових етапах інбридингу. Для визначення генотипової різноякісності популяції найбільш відповідальним етапом є кількість самозапилених рослин генерації S_1 , враховуючи, що на цьому етапі закладається базис добору та генетичне різноманіття популяції.

За стандартного методу різноманіття самозапилюваного матеріалу нарощується поетапно у вигляді «розтруба», а за комбінованого – фактична генетична різноякісність формується на старті інбридингу і зберігається до повної гомозиготності ліній з певним зростанням відсотка нащадків окремих відібраних генотипів. Проте величина популяції буде зменшуватися з кожною генерацією через погану схожість насіння, пошкодження його шкідниками, нестачу та ін. Отже, коли необхідно отримати 200 рослин S_4 , то слід враховувати, що тільки 70 % насіння у кожній генерації буде одержано на рослинах-потомках від однієї насінини [5]. Щоб попередити це, необхідно виростити 584 рослини генерації S_2 . Збільшення обсягу насіння з кожної рослини, які вирощуються до двох або більше, при комбінованому і MSSD методах допомагає уникнути втрат нащадків S_2 від окремих рослин, висіву нежиттєздатного насіння або загибелі посівів.

Загалом при комбінованому методі селекціонер опосередковано веде масовий добір на початковій стадії інбридингу, що певною мірою впливає на формування моделі загального розподілу. За повідомленнями деяких авторів, у разі можливості використання двох термінів зимових розсадників за один сезон для отримання сімей генерацій S_1 – S_3 з далішим вибіркою сімей S_3 перевага адитивної генетичної мінливості подвоєногаплоїдних ліній над лініями MSSD S_3 є не більш ніж в 1,14 раза [6, 7]. Тому одержання ліній за удосконаленим комбінованим методом може бути альтернативою за відсутності можливості використання методу гаплоїдії.

Загальна ефективність селекційної програми зумовлюється якістю вихідного матеріалу, об'ємами виконаних робіт, швидкістю отримання гомозиготного матеріалу та рівнем вибіркою самозапилених сімей на ранніх етапах інбридингу. Значне вибіркою інбредних сімей дає можливість селекціонеру сконцентрувати увагу на більш цінному вихідному матеріалі та мати сформований конкурентний продукт вже у поколінні S_6 – S_7 . А. Ф. Тро-уєв вказує на високу ефективність добору при 60–75 % вибіркою самозапилених сімей S_2 – S_4 та можливість вивільнення до 30 % земельної площі в подальшому [8].

При комбінованому методі рівень видалення матеріалу, який не відповідав нашим вимогам, досягав 50,8–74,8 % у S_2 – S_5 , що зумовлено значним генетичним різноманіттям отриманих рекомбінантів S_1 (рис. 4).

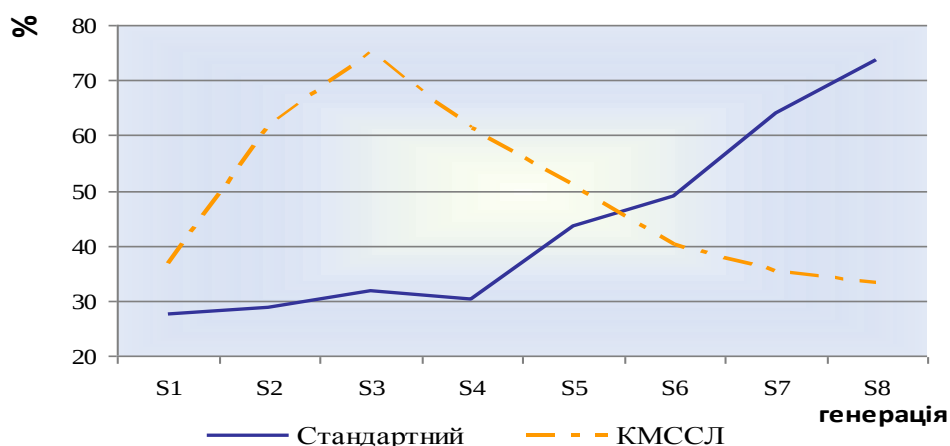


Рис. 4. Рівень вибракування селекційного матеріалу залежно від методу.

Слід відзначити, що максимальний відсоток вибракуваного селекційного матеріалу при комбінованому методі був у генераціях S_2 – S_4 , а при стандартному – у більш пізніх генераціях, починаючи з S_5 – S_6 . Це пов'язане, перш за все, з внутрішньосімейною різноякісністю самозапилених рекомбінантів, отриманих стандартним методом, і відповідно не завжди виправданою остаточною ліквідацією сім'ї до досягнення нею певного рівня гомозиготності та вирівняного стану за ознаками. Поліпшений нами метод виключає ці побоювання і забезпечує більш вільний добір завдяки міжсімейній різноякісності одержаних рекомбінантів S_2 – S_5 .

При комбінованому методі добору кращих рекомбінантів за комплексом морфобіологічних ознак надається дуже важливе значення. За стандартного методу завдяки качано-рядному принципу добору є можливість відбирати всередині сім'ї оптимально бажаний для селекціонера тип рослин і поступово формувати його в наступних генераціях самозаплення; за комбінованого – необхідно звертати увагу на фенотип конкретної рослини і робити добір більш прискіпливо, оскільки таким чином в майбутньому буде сформований фенотип гомозиготної лінії. Найбільш відповідально треба ставитись до оцінки за такими ознаками, як коренева та стеблова вилягання, синхронність цвітіння чоловічих і жіночих суцвіть, пилюкото-воруюча здатність, ступінь ураження хворобами і пошкодження шкідниками, висота рослин та висота прикріплення качана, щільність і довжина обгорток качана, інтенсивність їхнього всихання, ремонтантність та індивідуальна продуктивність рослини, вирівняність качанів.

1. Варіювання середньопопуляційної врожайності та вологості зерна у тесткросів ліній, отриманих різними методами (2013–2015 рр.)

Метод	Рік	Покі- ління	N	Врожайність зерна, т/га				Збиральна вологість зерна, %				Вро- жай/ волога
				$\bar{X}$	$S_{\bar{X}}$	Lim (min-max)	V, %	$\bar{X}$	$S_{\bar{X}}$	Lim (min-max)	V, %	
Стан- дарт- ний	2013	S_6	198	7,91	0,07	5,27–10,4	12,2	19,5	0,1	17,7–21,7	3,2	0,41
	2014	S_7	91	4,88	0,09	2,90–6,69	18,3	14,8	0,1	12,4–16,5	4,5	0,33
	2015	S_8	72	6,63	0,10	4,68–8,55	12,3	14,4	0,1	12,6–17,5	7,5	0,46
КМССЛ	2013	S_6	82	8,67	0,13	4,72–11,59	13,4	19,6	0,1	18,2–22,3	5,1	0,44
	2014	S_7	137	4,94	0,09	2,54–7,57	20,1	14,5	0,1	12,4–17,3	6	0,34
	2015	S_8	114	7,63	0,07	5,78–9,43	9,9	14,9	0,1	12,1–19,1	9,3	0,51

2. Врожайність та вологість зерна кращих тесткросів ліній, одержаних різними методами (2015 р.)

№ п/п	Назва		Покоління інбридингу		Середні значення			Метод
	♀	♂			врожай зерна, т/га	воло- гість зерна, %	врожай/ волога	
1	ДК410М × ДК7774	ДКП18	S4	10_131	9,43	14,0	0,67	Комбінований
2	ДК296С × ДК2966	ДКП26	S4	23_121	9,35	14,5	0,64	Комбінований
3	ДК296С × ДК2966	ДКП26	S4	5212	9,21	14,8	0,62	Комбінований
4	ДК216М × ДК7337	ДКП03	S4	7212	8,97	14,2	0,63	Комбінований
5	ДК365	ДКП26	S4	1211	8,87	15,2	0,58	Комбінований
6	ДК7457 × ДК257	ДКП19-7	S4	51_111	8,83	13,9	0,64	Комбінований
7	ДК445М × ДК4447	ДКП26		62223111	8,55	17,5	0,49	Стандартний
8	ДК742М × ДК7425	ДКП03	S4	11121	8,54	15,6	0,55	Комбінований
9	ДК216М × ДК7337	ДКП63	S4	23_121	8,52	15,7	0,54	Комбінований
10	ДК7457 × ДК257	ДКП03	S4	2231	8,40	15,9	0,53	Комбінований
11	ДК365	ДКП26		41221111	8,17	13,7	0,60	Стандартний
12	ДК410М × ДК7774	ДКП63	S4	7122	8,15	14,6	0,56	Комбінований
13	ДК365	ДКП18		43311111	8,09	14,3	0,57	Стандартний
14	ДК445М × ДК4447	ДКП19-7		44311111	8,06	15,1	0,54	Стандартний
15	ДК410М × ДК7774	ДКП18	S4	6211	8,06	13,3	0,61	Комбінований
Солонянський 298СВ			стандарт		7,42	17,4	0,43	—
ДН Гетера			стандарт		8,15	14,9	0,55	—
НІР ₀₅					0,78	0,5	—	—

За повідомленням М. Jumbo та ін., нижча вологість зерна і більш високе співвідношення «врожай/волога» у тесткросів ліній, створених стандартним методом, порівняно з тест-кросами ліній MSSD, вказують на те, що добір качанів з інтенсивною втратою вологи, заснований на їх оцінці per se в межах селекційних ліній за першого методу, був більш ефективним [3]. Добір сімей S₂ за методом MSSD, заснований на оцінці всієї рослини, був проведений пізніше на один сезон і призвів до більш високої вологості зерна у тесткросів. Отже, при доборі в самозапилених сім'ях треба одночасно приділяти увагу як оцінці фенотипу рослин, так і інтенсивності втрати вологи зерном в качанах. Остаточну ефективність даного селекційного циклу може підтвердити лише висока комбінаційна здатність отриманих ліній. Детальний аналіз продуктивності тесткросів ліній, одержаних різними методами, підтвердив можливість виділення зразків з високою комбінаційною здатністю при використанні методу КМССЛ, зокрема середня врожайність тесткросів ліній, створених стандартним методом в наших дослідженнях коливалась від 4,88 т/га у 2014 р. до 7,91 т/га у 2013 р., а одержаних комбінованим – від 4,94 до 8,67 т/га відповідно (табл. 1).

Вологість зерна у тесткросів ліній, створених обома методами, достовірно не відрізнялась за роки досліджень, а здебільшого залежала від умов року і коливалась у межах від 14,4 до 19,6 %. Підвищений показник співвідношення «врожай/волога» у тесткросів ліній, отриманих за поліпшеним нами методом, порівняно зі стандартним, вказує на ефективність даного підходу і методики добору при створенні інбредних ліній кукурудзи.

Серед конкретних гібридних комбінацій, виділених нами за результатами випробування в 2015 р., перевагу мали тесткроси ліній, одержаних комбінованим методом. Зокрема гібриди (ДК410М × ДК7774) × ДКП18 10_131 та (ДК296 С × ДК2966) × ДКП26 23_121 забезпечили врожайність на рівні 9,43 та 9,35 т/га відповідно, що на 1,28 та 1,20 т/га більше, ніж у кращого стандарту – ДН Гетера (див. табл. 2).

Слід відзначити, що 11 з 15 виділених нами кращих гібридів створені з участю ліній, отриманих комбінованим методом, що доводить перспективність впровадження його у селекційну практику.

Узагальнюючи отримані результати досліджень, можна відзначити наступні переваги запропонованого нового методу: пришвидшений процес генерації нового вихідного матеріалу, використання широкої основи генетичної плазми, можливість працювати з великою кількістю зразків, ефективно використання робочої сили і часу.

Бібліографічний список

1. *Goulden C. H.* Problems in plant selection / *C. H. Goulden* // In Proceedings 7-th international genetics congress. – Edinburgh, 1941. – P. 132–133.
2. *Brim C. A.* A modified pedigree method of selection in soybeans / *C. A. Brim* // Crop Sci. – 1966. – № 6 (2). – P. 220.
3. Comparison of Conventional, Modified Single Seed Descent, and Doubled Haploid Breeding Methods for Maize Inbred Line Development Using Germplasm Enhancement of Maize Breeding Crosses / [*M. Jumbo, T. Weldekidan, J. B. Holland, J. A. Hawk*] // Crop Sci. – 2011. – № 51. – P. 1534–1543.
4. *Fehr W. R.* Principle of Cultivars Development / *W. R. Fehr* // Macmillan publishing company. A division of Macmillan Inc. – New York, 1987. – P. 465.
5. *Chahal G. S.* Principles and procedures of plant breeding / *G. S. Chahal, S. S. Gosal* // Biotechnological and conventional approaches. – Narosa Publishing House, New Delhi, India, 2002. – P. 412.
6. *Bernardo R.* Breeding for quantitative traits in plants / *R. Bernardo* // Stemma Press, Woodbury, MN, 2002. – P. 369.
7. *Hallauer A. R.* Quantitative Genetics in Maize Breeding / *A. R. Hallauer, J. B. Miranda* // 2 nd ed. Iowa State University Press, Ames, IA. SB191. M2 H29. – 1988. – P. 393–466.
8. *Troyer A. F.* Temperate corn – Background, behavior, and breeding / *A. F. Troyer* // In *A. R. Hallauer* (ed.) Specialty corns. 2 nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL. – 2000. – P. 393–466.
9. Методика державного сорто випробування сільськогосподарських культур. Зернові, круп'яні та зернобобові. – К., 2001. – С. 4–65.
10. Методические рекомендации по проведению полевых опытов с кукурузой / Сост. [*Д. С. Филев, В. С. Циков, В. И. Золотов* и др.]. – Днепропетровск, 1980. – 55 с.