

БИОЛОГИЯ

УДК 635.342:631.523

М. Н. ШАПТУРЕНКО¹, А. В. ЯКИМОВИЧ², Ю. М. ЗАБАРА², академик Л. В. ХОТЫЛЁВА¹ВКЛАД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИВЕРГЕНЦИИ
КАПУСТЫ БЕЛОКОЧАННОЙ
В РЕАЛИЗАЦИЮ ПРОДУКТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА ГИБРИДОВ F₁¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск²Институт овощеводства НАН Беларуси, Минск

Поступило 22.09.2014

Введение. В мировом овощеводстве капуста белокочанная (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. f. *alba* DC) занимает важное место как ценный источник питательных и биологически активных компонентов [1; 2]. К настоящему времени селекция этой культуры сконцентрирована на использовании феномена гетерозиса, который обуславливает значимое превосходство гибридов F₁ над родителями по ряду показателей (продуктивность, скорость роста, экологическая пластичность, устойчивость к стрессу и др.) за счет более эффективного гомеостаза и сбалансированного метаболизма гибридных растений [3]. Существует несколько гипотез относительно природы гетерозиса, однако ни одна из них не объясняет этот феномен в полной мере [4; 5].

Ключевым моментом при селекции на гетерозис является отбор комбинаций с высоким гетеротическим потенциалом. Однако даже при умеренном числе исходных линий, осуществить полевые испытания всех потенциальных гибридных комбинаций не представляется возможным [6]. И если в F₁ простые признаки можно предсказать на основе средней величины родителей, эффективность предсказания полигенных признаков значительно снижается из-за неаддитивных эффектов генов [7].

Теоретически вероятность получения гетерозиса в F₁ увеличится, если в скрещиваниях используются генетически отдаленные формы, так как число сегрегирующих локусов оптимизируется [8]. Основываясь на этом предположении, предприняты попытки поиска прогностического критерия, который мог бы обеспечить альтернативный подход использования геномной информации в селекционном решении. В результате таких исследований были предложены некоторые методические подходы для предсказания гетерозисного преимущества и создания гетеротических групп [9–11].

В настоящем исследовании изучены перспективы предсказания продуктивного потенциала гибридов F₁ на основе скрининга полиморфизма анонимных последовательностей ДНК у капусты белокочанной.

Материалы и методы исследования. Для отбора пар скрещиваний оценивали молекулярно-генетическую разнородность капусты белокочанной различного эколого-географического происхождения (28 образцов из коллекции Института овощеводства НАН Беларуси) на основе RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) и ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). Использовали 40 произвольных (RAPD) праймеров, синтезированных по аналогам фирмы Oregon Technology: OPA (n 01–03, 06–20), OPB (n 03, 04, 06, 08, 20), OPC (n 01, 03), OPW (n 01, 03, 05–07, 09, 11–13, 15, 17–20), OPE01; и 9 ISSR праймеров к микросателлитным повторам: (AC)₈AG, (AC)₈TA, (AC)₈AA, (AC)₈TC, (ATG)₆, (CTC)₆, (CTC)₆AA, (GAA)₆, (GACA)₄. Праймеры отбирали по способности выявлять межлинейный полиморфизм *Brassica oleracea* L. Полимеразную цепную реакцию проводили в стандартном режиме.

Анализ ДНК полиморфизма включал составление бинарных матриц, в которых отмечали присутствие (1) или отсутствие (0) фрагментов с одинаковой молекулярной массой. Генетические дистанции (GD) рассчитывали по Nei and Li (1979) [12]:

$$GD_{ij} = 1 - 2N_{ij} / (N_i + N_j),$$

где N_{ij} – число общих фрагментов i -го и j -го образцов; N_i и N_j – число фрагментов каждого из образцов. Кластеризацию экспериментального материала осуществляли методом UPGMA с помощью программного пакета Treeconw (версия 1.3b).

Отобранные линии капусты белокочанной изучали в системе полного диаллельного скрещивания (5×5). Опыление осуществляли вручную. Оценивали гибридное потомство F_1 и родительские линии в открытом грунте опытного поля Института овощеводства. Анализировали основные количественные признаки: вегетативную массу растения, массу наружной кочерыги, среднюю массу, плотность и объем кочана, отношение массы кочана к массе розетки.

Оценку общей (ОКС) и специфической (СКС) комбинационной способности проводили по методу I Griffing [13]. Относительный гипотетический гетерозис рассчитывали как превышение F_1 над средней величиной обеих родительских линий, истинный – как превышение F_1 над лучшим родителем. Если показатель гибрида F_1 оказывался хуже худшего родителя, гетерозис считали как отклонение гибрида от худшего родителя. В этом случае величина истинного гетерозиса была отрицательной [14].

Результаты и их обсуждение

Оценка молекулярно-генетической дивергенции образцов капусты белокочанной. При изучении молекулярно-генетической разнородности коллекции образцов капусты белокочанной различного происхождения рассмотрено 333 RAPD ампликона в диапазоне распределения 200–1500 п. н. Полиморфизм выявлен при амплификации с 37 из 40 использованных произвольных праймеров. Рассмотрено 230 полиморфных ДНК-фрагментов, в т. ч. уникальные. Уровень детектируемого полиморфизма составил 69,1 %.

На основе полученных данных подсчитаны генетические дистанции и выполнена иерархическая дифференциация образцов посредством кластерного анализа (рис. 1, а). В результате обнаружено значительное генетическое разнообразие среди экспериментальных форм. Большинство генотипов (21 из 28) топологически объединены в общий кластер с тремя субкластерами и диапазоном дистанций 7,05–19,0. Остальные 7 образцов составляют иерархию более высокого порядка (GD 15,1–21,3), поскольку характеризуются наличием набора уникальных и полиморфных ДНК-локусов, не свойственных основной части коллекции.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой генетической разнородности коллекции и хороших перспективах использования представленного разнообразия для селекции капусты белокочанной.

По результатам молекулярно-генетической оценки отобраны как потенциальные компоненты гибридизации 5 образцов (Alfredo, Rotonda, Rd4, Invento, Semko) с различным уровнем GD (7.11–17.01) и отвечающих селекционным требованиям (наличие комплекса ценных признаков, сходные сроки цветения, высокая перекрестная совместимость).

После размножения для отбора генетически выровненного материала в самоопыленном потомстве образцов Alfredo, Rotonda, Semko, Invento, Rd4 и оценки межлинейного полиморфизма дополнительно проведен ISSR-скрининг (рис. 1, б). Исследование аллельного состава индивидуальных растений выявило высокий уровень внутрисортного полиморфизма только в потомстве Alfredo, Rotonda, Semko, тогда как Invento и Rd4 характеризовались высоким генетическим сходством. Основываясь на полученных данных, отобраны и включены в гибридизацию по схеме диаллельного скрещивания растения, выровненные по фенотипу и аллельному составу ISSR-локусов.

В целом использование ISSR подхода оказалось высокоэффективным для идентификации внутри- и межлинейной гетерогенности капусты белокочанной, так как воспроизводимый результат был получен при использовании небольшого набора информативных маркеров с применением малозатратного протокола. Из рассмотренных 47 ISSR-локусов, 23 являются специфичными и могут использоваться для типирования генотипов капусты белокочанной.

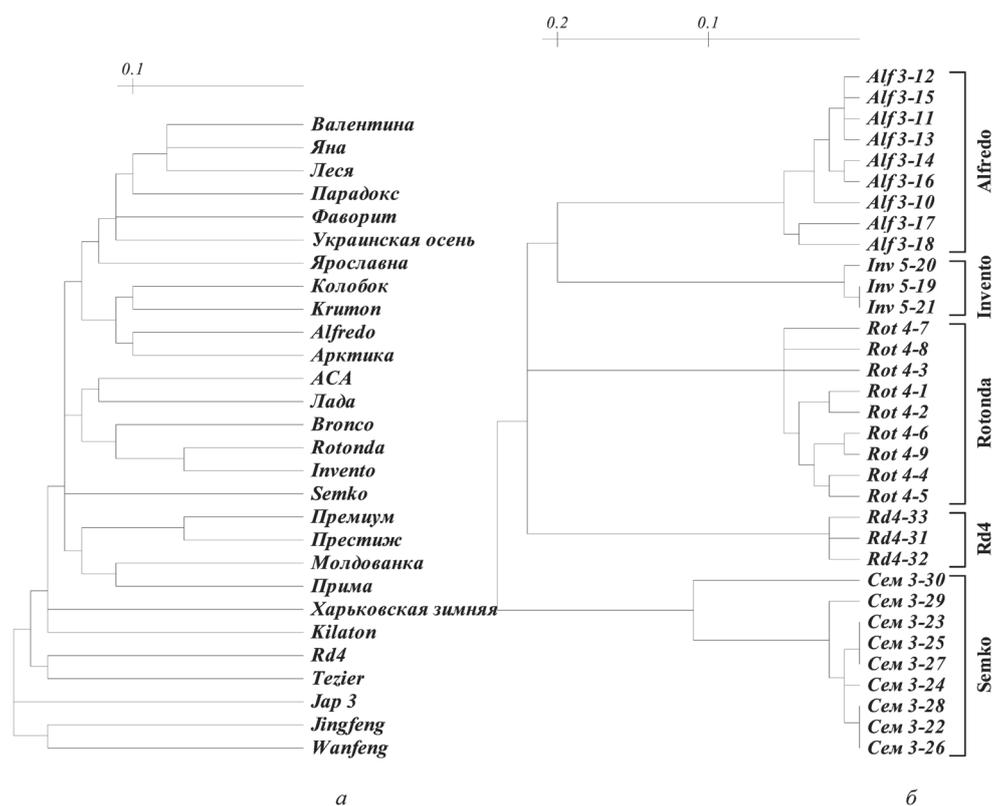


Рис. 1. Кластерный анализ, выполненный по результатам скрининга RAPD- (а) и ISSR-полиморфизма (б) образцов капусты белокочанной

Анализ гибридов F_1 и их родительских линий. При проведении дисперсионного анализа основных количественных признаков гибридов F_1 и их родительских линий были обнаружены достоверные различия между генотипами по всем анализируемым показателям.

Испытания показали, что большинство гибридов значимо превосходят родителей и стандарт Белорусская 85 по основным компонентам продуктивности (табл. 1). Гибриды, полученные в комбинации Alf3×Rot4, обладали наибольшими показателями значений вегетативной массы, массы и объема кочана. Гибрид Сем3×Rot4 при высоких показателях массы маточника и товарного кочана имел наибольшее отношение массы кочана к массе розетки и характеризовался высокой плотностью кочана.

В целом по абсолютным значениям выражения признаков лучшими оказались гибриды F_1 от комбинаций скрещивания линий Alf3 и Rot4, Alf3 и Сем3, Rot4 и Сем3.

Испытания в системе диаллельных скрещиваний 5×5 также позволили выявить комбинации с высокой степенью гетерозиса по элементам продуктивности (табл. 1). Так, по признаку вегетативная масса растения, гибриды показали высокие (>12 %) эффекты гипотетического гетерозиса в 17 комбинациях. Наибольшее превосходство над средней родителей отмечено в F_1 Inv5×Rd4 (89,9 %) и Rot4×Rd4 (70,8 %). Значения гипотетического гетерозиса превышали 50 % в 8 гибридных комбинациях (Alf×Inv, Alf×Rot4, Inv×Alf, Inv×Rd, Inv×Rot4, Rd4×Alf, Rd4×Inv, Rot4×Rd4). Значимое превосходство над лучшим родителем на 17,2–48,3 % по вегетативной массе растения выявлено также в восьми комбинациях скрещивания.

По признаку средняя масса кочана, который определяет урожайную ценность селекционных форм, выделены комбинации с высоким уровнем гетерозиса. Величина гипотетического гетерозиса была положительной и превосходила среднюю обоих родителей во всех комбинациях скрещивания за исключением Сем3×Alf3. Восемь гибридов из двадцати превосходили родителей более чем на 50 %. Наибольшая величина гетерозиса отмечена у Inv5×Rd4, родительские формы которого характеризуются невысокими значениями средней массы кочана.

Т а б л и ц а 1. Характеристика диаллельных гибридов капусты белокочанной и их родительских форм по некоторым селекционно-значимым признакам, уровню генетической дивергенции (GD), истинного (ИГ) и гипотетического (ГГ) гетерозиса

Генотип	Признак																	
	GD			Вегетативная масса растения			Масса кочана, кг			Объем кочана			Плотность кочана, г/см ³			Отношение масса кочана/масса розетки		
	общая	RAPD	ISSR	х, кг	ГГ, %	ИГ, %	х, кг	ГГ, %	ИГ, %	х, куб.л.	ГГ, %	ИГ, %	х, куб.л.	ГГ, %	ИГ, %	х	ГГ, %	ИГ, %
Alf3				3,88			2,47			2,77			0,89			0,685		
Alf3×Inv5	14,5	11,7	14,7	5,26	62,8*	48,9*	3,68	62,8*	48,9*	4,34	76,7*	56,1*	0,85	-5,03	-4,5	0,73	2,1	-
Alf3×Rd4	18	17,1	9,37	4,51	46,0*	11,7	2,76	63,3*	11,8	3,39	45,7*	22,2*	0,81	-3,8	-	0,659	13,8	2,9
Alf3×Rot4	17,9	13,8	23,9	7,01	67,0*	41,5*	5,01	66,8*	41,3*	5,83	53,4*	20,7*	0,86	0,1	-	0,744	8	7,2
Alf3×Сем3	19,5	15,7	26,1	5,13	26,0*	6,78	3,78	26,0*	6,8	4,42	31,2*	11,6	0,86	-3,4	-3,4	0,784	9,9	5,4
Inv5				2,9			2,05			2,27			0,9			0,745		
Inv5×Alf3	14,5	11,7	14,7	4,77	52,6*	39,7*	3,45	52,7*	39,6*	4,09	62,0*	47,4*	0,84	-5,6	-5,6	0,758	62,9*	1,3
Inv5×Rd4	16,6	13,8	12,9	5,49	89,9*	75,1*	3,59	113,7*	75,1*	4,15	99,8*	82,8*	0,86	-8,7	-	0,69	11,3	-
Inv5×Rot4	14	7,1	15,9	5,01	51,5*	-	3,39	21,1*	-	4,12	16,0	-	0,82	1,2	-	0,707	-1,4	-
Inv5×Сем3	17	14,9	17,5	4,28	12,9	11	3,15	12,9	-	3,55	13,8	-	0,89	-0,6	-	0,773	3,3	2,7
Rd4				2,98			1,32			1,88			0,7			0,488		
Rd4×Alf3	18	17,1	9,4	5,68	60,3*	22,7*	3,03	60,3*	22,5*	3,8	63,2*	36,9*	0,8	1,3	-	0,583	0	-
Rd4×Inv5	16,6	13,8	12,9	4,54	60,8*	48,3*	3,04	80,9*	48,2*	3,68	77,2*	61,8*	0,83	3,7	-	0,715	14,5	-
Rd4×Rot4	16,3	11	23,1	5,24	30,4*	-	3,17	30,5*	-	3,77	12,4	-	0,84	17,5*	15,1	0,646	10,2	-
Rd4×Сем3	20,7	17	18,6	5,3	38,7*	-	3,37	38,8*	-	4,23	44,9*	6,8	0,8	5,2	-	0,699	13,8	-
Rot4				5,33			3,54			4,83			0,73			0,689		
Rot4×Alf3	17,9	13,8	23,9	5,36	29,3*	9,6	3,88	29,3*	9,6	6,16	62,1*	27,5*	0,63	-22,2*	-13,7	0,761	10,9	10,1
Rot4×Inv5	14	7,1	15,9	5,62	44,1*	13,6	4,02	43,6*	13,5	4,77	34,3*	-	0,84	3,7	-	0,747	4,2	-
Rot4×Rd4	16,3	11	23,1	6,47	70,8*	17,2	4,15	70,8*	-	4,99	48,9*	3,3	0,83	16,1*	13,7	0,677	15,2	-
Rot4×Сем3	17,6	12	15,1	5,77	3,1	3,11	4,22	19,2	19,1	5,25	19,4*	8,7	0,8	-1,23	-	0,769	3,5	-
Сем3				5,1			3,54			3,96			0,89			0,739		
Сем3×Alf3	19,5	15,7	26,1	4,04	1,0	-	3,03	1,01	-	3,41	1,2	-	0,89	0	-	0,798	12,7	8,1
Сем3×Inv5	17	14,8	17,5	4,61	26,2*	-	3,52	28,5*	-	4,64	48,7*	17,2	0,76	-15,1	-14,6	0,795	6	5,3
Сем3×Rd4	20,7	17	18,6	4,92	37,9*	-	3,35	37,9*	-	4,25	45,5*	7,3	0,79	4,6	-	0,741	4,1	-
Сем3×Rot4	17,6	12	15,1	5,84	38,1*	38,1*	4,89	38,1*	38,2*	5,91	34,4*	22,4*	0,83	2,5	6,8	0,877	23,1*	18,9
Ошибка средней				0,05			0,05			0,07			0,01			0,03		

Пр и м е ч а н и е: «-» промежуточное наследование; * – значимо при $P < 0,05$.

Статистически значимые и положительные значения истинного гетерозиса по признаку средняя масса кочана обнаружены в восьми комбинациях скрещивания и их величина варьирует от 13,5 до 75,1 %.

По большинству анализируемых признаков наилучшими оказались гибридные комбинации, в которых в качестве одного из компонентов гибридизации была использована линия Alf3 (за исключением Сем3×Alf3).

Оценка линий на комбинационную способность выявила существенную изменчивость ОКС (\hat{g}_i) и СКС (σ_{si}^2) по большинству изученных признаков. Положительные значения ОКС по анализируемым признакам характеризуют Сем3 и Alf3, что говорит о высокой ценности этих линий во всех гибридных комбинациях, полученных с их участием (табл. 2).

По признаку средняя масса кочана эффекты ОКС линий Rot4, Сем3, Alf3 превосходили варианты СКС, следовательно, в реализации генетического потенциала этих генотипов при гибридизации основное значение имели аддитивные взаимодействия генов. Для линий Inv5 и Rd4 значения σ_{si}^2 превосходили \hat{g}_i , что свидетельствует о преимущественном значении доминирования и эпистатических эффектов.

По признаку плотность кочана положительной ОКС при низких значениях σ_{si}^2 обладали Inv5, Alf3, Сем3, что подтверждает стабильную передачу данного признака потомству F_1 .

Т а б л и ц а 2. Эффекты общей (\hat{g}_i) и варианты специфической (σ^2_{si}) комбинационной ценности селекционных линий капусты белокочанной по основным компонентам урожая

Линия	Признак					
	Средняя масса кочана		Плотность кочана		Отношение массы кочана к массе розетки	
	\hat{g}_i	σ^2_{si}	\hat{g}_i	σ^2_{si}	\hat{g}_i	σ^2_{si}
Rot4	0,864	0,613	-0,74	1,094	0,153	0,326
Sem3	0,239	-0,434	0,058	-0,702	0,946	-0,852
Alf3	0,105	-1,003	0,458	-0,287	0,04	0,447
Inv5	-0,472	0,805	0,729	0,494	0,232	0,347
Rd4	-0,737	0,023	-0,505	-0,601	-1,372	-0,266

Важным селекционным признаком является соотношение массы кочана к массе розетки, который отражает эффективность протекания процессов фотосинтеза – генотипы с высоким индексом соотношения формируют крупный кочан при относительно небольшой листовой массе розетки. Наибольшей ценностью при селекции на данный признак обладает Сем3, которая характеризуется высокой общей комбинационной способностью.

Связь генетической дивергенции родительских линий с продуктивным потенциалом F_1 . Идентификация высокоурожайных гетерозисных гибридов требует проведения многочисленных скрещиваний. После испытания большинство комбинаций выбраковываются. Применение молекулярных маркеров может повысить результативность отбора комбинаций с высоким потенциалом для селекции [15].

В нашем исследовании анализ сопряженности генетических дистанций с абсолютными значениями хозяйственно важных признаков гибридов F_1 позволил обнаружить тесные связи для ряда показателей (табл. 3, рис. 2). Так, общая GD, оцененная на основе двух подходов (ISSR, RAPD), была позитивно ассоциирована с массой, объемом и плотностью кочана. Наиболее тесные связи обнаружены для признака отношение массы кочана к массе розетки, в формирование которого вклад дивергенции родительских форм ($R = r^2$) составил 38,4 %. При этом наибольшее значение для реализации генетического потенциала F_1 имела дивергенция RAPD-локусов, тогда как ISSR полиморфизм не оказывал статистически значимого влияния (табл. 3). Вероятно, формирование высокопродуктивного гетерозисного генотипа не настолько связано с общей гетерогенностью гибридного генома, как с полиморфизмом в отдельных специфических локусах, которые обуславливают высокую экспрессию признаков в F_1 .

Т а б л и ц а 3. Коэффициенты корреляции между GD родительских линий капусты белокочанной и показателями продуктивности их диаллельных гибридов F_1

GD		Признак			
		Вегетативная масса растения	Масса кочана	Объем кочана	Масса кочана/ масса розетки
общая GD	все гибриды	0,42	0,56**	0,54*	0,62**
	прямые гибриды	0,64*	0,82**	0,75**	0,84**
	реципрокные гибриды	0,16	0,22	0,26	0,29
RAPD GD	все гибриды	0,41	0,51*	0,50*	0,55*
	прямые гибриды	0,65*	0,80**	0,74*	0,79**
	реципрокные гибриды	0,09	0,1	0,14	0,15
ISSR GD	все гибриды	0,11	0,23	0,21	0,32
	прямые гибриды	0,08	0,21	0,16	0,32
	реципрокные гибриды	0,06	0,12	0,16	0,18

П р и м е ч а н и е. * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$.

Поскольку при анализе F_1 были выявлены значимые реципрокные эффекты, которые свидетельствуют о влиянии цитоплазматических факторов материнского генотипа на реализацию продуктивного потенциала F_1 , мы провели раздельную оценку связи генетической дивергенции

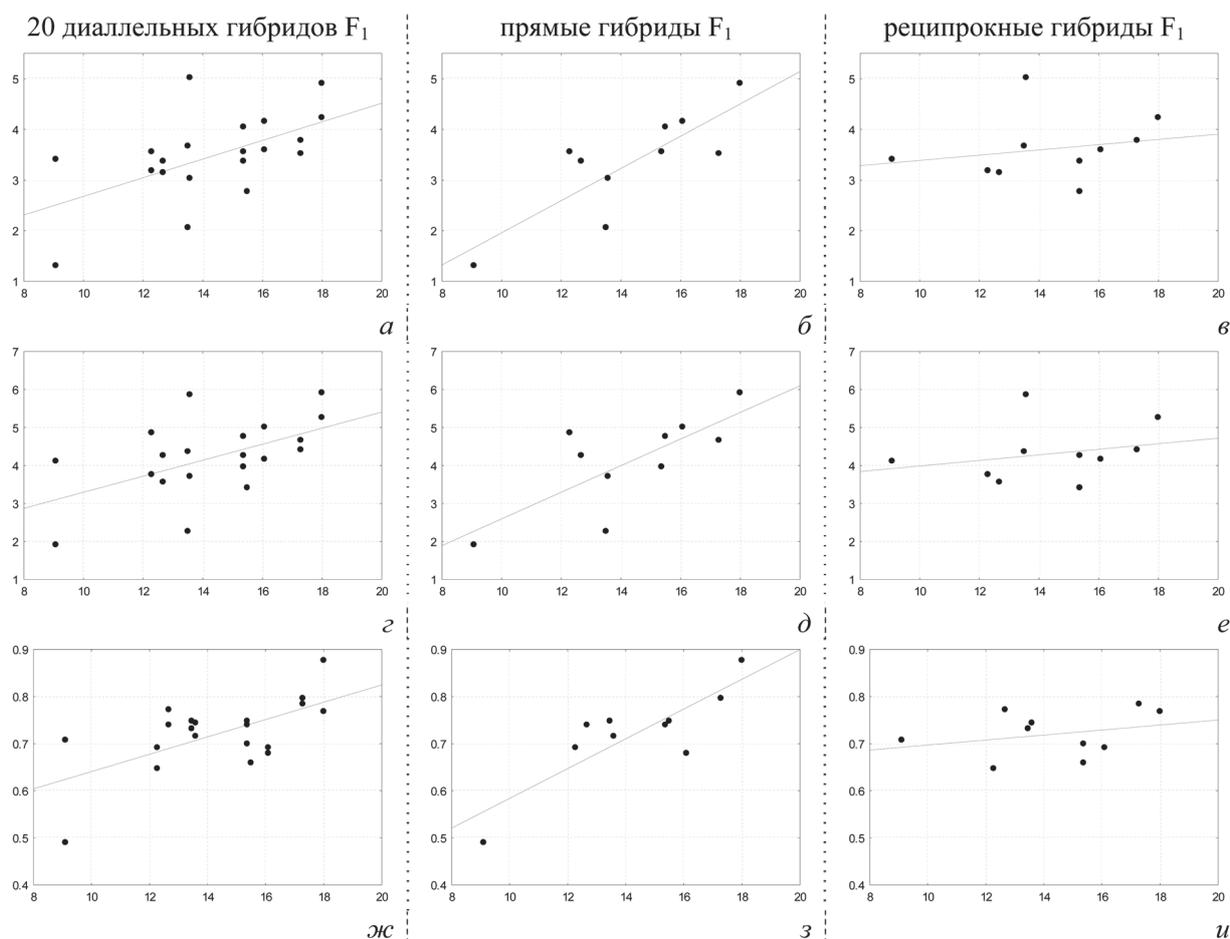


Рис. 2. Регрессионный анализ связи общей генетической дивергенции линий капусты белокочанной, оцененной на основе ISSR и RAPD подходов, с некоторыми показателями продуктивности их гибридов F_1 : ось OX – генетические дистанции (GD); ось OY – показатели продуктивности, выраженные в абсолютных величинах: а–в – масса кочана, г–е – объем кочана, ж–и – масса кочана/масса розетки

с показателями продуктивности прямых и реципрокных гибридов. В результате было обнаружено, что характер связи общей GD значительно изменяется для всех исследованных признаков. Сила сопряженности возрастает у прямых гибридов в сравнении с реципрокными (табл. 3). Тесные связи ($r > 0,7$) выявлены между величиной GD и признаками масса кочана, объем кочана, отношение массы кочана к массе розетки. Коэффициент детерминации (R^2) перечисленных признаков достигает 67,2, 56,2, 70,6 % соответственно. Достоверные корреляции существуют между величиной общей дивергенции и вегетативной массой растений. В данном случае RAPD-полиморфизм также имеет преимущественное значение для реализации генетического потенциала прямых гибридов F_1 в сравнении с ISSR GD, предопределяя продуктивность растений на 64 % (табл. 3).

Заключение. Полученные данные свидетельствуют, что анализ молекулярно-генетической дивергенции исходного материала капусты белокочанной, наряду с классическими селекционными подходами, может быть полезен, так как позволяет выделить ту часть изменчивости в селекционных коллекциях, которая не имеет фенотипического проявления, но может быть использована при создании перспективных гибридов F_1 . Вместе с тем применение молекулярных подходов требует доработки для широкого применения в селекционных программах, так как потенциальные ДНК-маркеры должны предоставлять объективную информацию при подборе исходного материала, независимо от используемого генетического пула. Предъявляя требования к ДНК-маркерам как прогностическому инструменту для гибридной селекции, следует также учитывать сложную природу количественных признаков и, собственно, феномена гетерозиса, в связи с полигенным контролем, многосторонними аспектами жизненного цикла растений и условиями среды.

Литература

1. Snowdon R. J. // Chromosome Research. 2007. Vol. 15. P. 85–95.
2. Cardoza V., Stewart C. N. // *In Vitro* Cellular and Developmental Biology. 2004. Vol. 40. P. 542–551.
3. Milborrow B. V. // J. Exp. Botany. 1998. Vol. 49. P. 1063–1071 (doi: 10.1093/jxb/49.324.1063).
4. Kaeppler Sh. // ISRN Botany. 2012. Article ID 682824 (doi: 10.5402/2012/682824).
5. Sanghera G. S., Wani Sh. H., Hussain W. et al. // Nature and Science. 2011. Vol. 9(11). P. 42–53.
6. Longin F. H., Liu W., Ranc N. et al. // Maydica. 2011. Vol. 56. P. 227–232.
7. Reif C. R., Zhao Y., Würschum T. et al. // Plant Breeding. 2013. Vol. 132. P. 107–114.
8. Melchinger A. E. // The genetics and exploitation of heterosis in crops. Madison, 1999. P. 99–118.
9. Frisch M., Thiemann A., Fu J. et al. // Theor. Appl. Genet. 2010. Vol. 120. P. 441–450.
10. Gärtner T., Steinfath M., Andorf S. et al. // PLoS ONE. 2009. Vol. 4(4). e5220.
11. Schrag T. A., Möhring J., Melchinger A. E. et al. // Theor. Appl. Genet. 2010. Vol. 120. P. 451–461.
12. Nei M., Li M. H. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1979. Vol. 76. P. 5269–5273.
13. Турбин Н. В., Хотылёва Л. В., Тарутина Л. А. Диаллельный анализ в селекции растений. Минск, 1974.
14. Мазер К., Джинкс Дж. // Биометрическая генетика. М., 1985. С. 156–163.
15. Crossa J., Campos G., Pérez P. et al. // Genetics. 2010. Vol. 186. P. 713–724 (doi: 10.1534/genetics.110.118521).

M. N. SHAPTURENKO, A. V. YAKIMOVICH, Y. M. ZABARA, L. V. KHOTYLEVA

M.Shapturenko@tut.by

THE CONTRIBUTION OF MOLECULAR-GENETIC DIVERGENCE TO F₁ HYBRID PERFORMANCE OF WHITE CABBAGE

Summary

The prediction efficiency of white cabbage F₁ hybrid performance based on ISSR and RAPD markers was carried out. In result molecular-genetics evaluation of white cabbage collection, five divergent lines were selected and tested by full diallel (5×5) mating design. Through analysis relationship genetic divergence of parental lines and F₁ hybrid performance the significant correlations ($r > 0.5$) were found for the main yield components. Yield potential of half-diallel F₁ hybrids was predetermined total GD by 67.2 % ($R = r^2$), whereas no significant associations were found for reciprocal F₁. Consequently, heterotic response does not simply result from the overall genetic diversity within a hybrid, but is likely only diversity at some specific loci causing the formation of superior F₁ genotype with high expression of the traits.