

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНОВ-ВОССТАНОВИТЕЛЕЙ ФЕРТИЛЬНОСТИ ИЗ ПОПУЛЯЦИИ «IRAN IX» (*SECALE IRANICUM L.*) ПРИ СОЗДАНИИ ГЕТЕРОЗИСНЫХ ГИБРИДОВ F_1 ОЗИМОЙ РЖИ

С.И. Гордей, кандидат биол. наук

РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию»

(Поступила 28.02.2017)

Рецензент: канд. с.-х. наук Я.Э. Пилюк

Аннотация. В статье изложены основные результаты создания восстановителей фертильности с использованием генофонда самофертильных линий культурной ржи (*Secale cereale L.*) и популяции иранской ржи (*Secale iranicum L.*). Показан более высокий уровень восстановления фертильности пыльцы у гибридов F_1 при использовании инцухт-линий – носителей генов восстановления фертильности Иранской ржи. Выделены селекционно-ценные генотипы отцовских компонентов гибридных сортов озимой диплоидной ржи.

Введение. Использование эффекта гетерозиса является наиболее перспективным направлением повышения урожайности озимой ржи. Создание гетерозисных гибридов F_1 позволяет повысить урожайность этой культуры на 15 – 20 % по сравнению с лучшими популяционными сортами. Рядом исследователей установлено, что при уровне урожайности более 40 ц/га использование гибридных сортов экономически оправдано уже при 10%-ном уровне конкурсного гетерозиса.

В течение последних десятилетий после открытия в конце 60-х – начале 70-х гг. прошлого столетия нескольких типов цитоплазматической мужской стерильности («Рапра»-тип, R-тип, позже G-тип) [1 – 3] у озимой ржи, в ряде стран западной и восточной Европы интенсивно ведутся исследования по использованию гетерозиса у данного злака. К настоящему времени гибридные сорта ржи широко возделываются в таких странах как Германия, Дания, Швеция, Норвегия, Нидерланды, более чем на половину вытеснив популяционные сорта. Некоторую долю гетерозисные гибриды ржи занимают также в Польше, Венгрии; за пределами Европы – в Канаде, Новой Зеландии и юге Австралии. В Беларуси также зарегистрирован ряд сортов немецкой и местной селекции: *Пикассо*, *3У Драйв*, *КВС Бона*, *КВС Раво* (Германия), *Лобел-103*, *Галинка* (Германия-Беларусь), *Плиса* (Беларусь) [4].

Существует несколько ограничений при возделывании коммерческих гибридов F_1 ржи. На низкоплодородных почвах и при уровне урожайности ниже 35 ц/га выращивание гибридных сортов нерентабельно, поскольку эффект гетерозиса в данной ситуации нивелируется. Кроме того, в подавляющем большинстве зарегистрированных гибридных сортов ржи по генетическим причинам не происходит полного восстановления фертильности пыльцы. Частота эффективных генов-восстановителей фертильности в популяциях ржи не превышает 5 % и, кроме того, их эффективность сильно подвержена влиянию среды [5]. В результате недостаток пыльцевых зерен приводит к череззернице, сильному поражению спорыньей и, как

результат, к снижению урожайности. Последняя проблема труднопреодолима и актуальна.

Как выход из положения, для обеспечения достаточного количества пыльцы в семена гибридного сорта производители вынуждены добавлять семена популяционного диплоидного сорта в соотношении: 90 % семян гибрида F_1 + 10 % семян популяционного сорта ржи. Такой подход используется при возделывании подавляющего большинства гибридных сортов в странах Западной Европы. Основным требованием при этом является подбор синхронно цветущих сортов, что не всегда успешно в связи с фактором года. Также рекомендуется подбирать сорта либо одинаковые по высоте, либо популяционный сорт может быть несколько выше по сравнению с гибридным сортом для обеспечения полноценного опыления при цветении. Все вышеуказанные требования требуют дополнительных затрат, не всегда успешны, а урожайность при использовании смеси семян, как правило, снижается.

Решение проблемы полного восстановления фертильности пыльцы у гетерозисных гибридов F_1 селекционно-генетическими методами позволит существенно облегчить селекцию и расширить производство гибридных сортов ржи.

Относительно недавно открыты новые эффективные источники генов-восстановителей в примитивной популяции Иранской ржи – IRAN IX и Аргентинской ландрасы – Pico Gentario. Использование этих генов при селекции гибридных сортов ржи названо технологией «Pollen-plus». Найдены молекулярные маркеры. Есть в наличии линии – носители генов-восстановителей. Интродукция этих генов в родительские компоненты с использованием ДНК-типирования позволяет эффективно вести селекцию гибридных сортов ржи. Данный подход актуален и необходим для Республики Беларусь. Этой проблеме посвящена данная статья.

Материал и методика исследований. Материалом для исследований служили самофертильные линии, мужски стерильные тестеры и экспериментальные гибриды F_1 , полученные на генетической основе разных популяций озимой диплоидной ржи ($2n=14$) западноевропейского и местного происхождения. В исследованиях использован тип цитоплазматической мужской стерильности «Рапра». В качестве восстановителей фертильности (отцовских компонентов гибридов) использовали инцухт-линии селекции РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» и ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», фирмы «КВС-Лохов» (Германия) и инцухт-линии с геном восстановителем фертильности от Иранской ржи – IRAN IX.

В поле индекс восстановления (в последующем «ИВ») фертильности пыльцы у гибридов F_1 оценивался в баллах по шкале Гейгера (от 0 до 9) визуально по степени выброса пыльников из цветков и «облаку» пыльцы во время цветения: 0 – 3 балла – стерильные, 4 – 5 – полуфертильные, 6 – 9 фертильные [5]. Для лабораторной оценки фертильности пыльцы во время цветения фиксировали цветки ржи в 70 %-ном этиловом спирте по 8 – 10 цветков с колоса, с 3 – 4 растений каждого генотипа, после чего изучали фертильность под микроскопом на ацетокарминовых препаратах по стандартной методике. В случае наличия на препаратах достаточного количества фертильной пыльцы учитывалось до 500 пыльцевых зерен.

Помимо шкалы Гейгера предложена 5-балльная оценка степени редукции пыльников: 5 баллов – сильно развитые пыльники, аналогичные популяционным сортам, 4 балла – нормальные пыльники; 3 – слабо редуцированные (2/3 от длины нормальных); 2 – средне редуцированные (1/2 от длины нормальных) и балл 1 – сильно редуцированные (менее 1/3 длины нормально развитых пыльников).

Закладка опытов проводилась на дерново-подзолистой легкосуглинистой и рыхло-супесчаной почве с содержанием гумуса 2,02 – 2,53 %, фосфора 153 – 257 мг/кг почвы, калия 242 – 289 мг/кг и рН почвы 5,86 – 6,2. Обеспеченность микроэлементами составила: Ca (1282 мг), Mg (272 мг), B (0,51 мг), Cu (1,6 мг), Zn (2,1 мг). Предшественник – озимый рапс на зерно. Обработка почвы, посев и уход за посевами осуществлялись в соответствии с агротехникой, принятой для возделывания озимой ржи в Беларуси.

Результаты исследований и их обсуждение. В результате проведенных исследований (2008 – 2016 гг.) получен ряд самофертильных линий – носителей генов-восстановителей от Иранской ржи. Данные линии были созданы путем скрещивания Иранской популяции (♀) с донорами генов самосовместимости ржи (♂) из коллекции РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию», принудительного самоопыления гибридных сортов западноевропейской селекции и последующим отбором самосовместимых форм ржи в поколениях I₁ – I₄ с высоким индексом восстановления фертильности пыльцы у гибридов F₁. Присутствие генов от IRAN IX у созданных линий было также выявлено с помощью ДНК-типирования. Молекулярно-генетические исследования были проведены в лаборатории молекулярной генетики ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» в рамках совместного проекта.

Созданные восстановители фертильности в течение нескольких лет использовали в качестве отцовских компонентов экспериментальных гетерозисных гибридов F₁. Проведено сравнительное изучение индекса восстановления (ИВ) фертильности пыльцы гибридов, созданных с использованием ранее выделенных восстановителей фертильности (линии, популяции) и вновь созданных опылителей с интродуцированными генами от IRAN IX. В качестве материнских компонентов использованы линии на генетической основе белорусских и западноевропейских популяций ржи (таблицы 1, 2).

Результаты показали, что интродукция генов от Иранской ржи (IRAN IX) в отцовские компоненты гибридных сортов позволяет повысить уровень восстановления фертильности пыльцы. Согласно данным таблиц, при использовании в качестве опылителей линий с геном-восстановителем от IRAN IX (НГ-124; НГ-502 и НГ-508) гибриды во всех случаях имели более высокий индекс восстановления по сравнению с гибридами, где использованы линии без вышеуказанного гена (ЛВ-2 и ЛВ-18), но также являющиеся восстановителями фертильности. Для всех использованных в данных исследованиях материнских компонентов популяционный сорт ржи *Зарница* не пригоден как опылитель: максимальный ИВ не превысил 30 %, а во многих случаях пыльники вообще были стерильны и средние значения ИВ составили только 8,0 и 13,5 %

для материнских форм белорусского и западноевропейского происхождения соответственно.

Таблица 1 – Индексы восстановления фертильности пыльцы (%) гетерозисных гибридов F₁ при использовании материнских компонентов из белорусских популяций ржи и разных отцовских компонентов

Селекционный номер гибрида	Отцовские компоненты гибридов						Среднее, %
	Сорт Зарница	ЛВ-2	ЛВ-18	НГ-124 (IRAN IX)	НГ-502 (IRAN IX)	НГ-508 (IRAN IX)	
2014-2	5,0	45,0	50,0	65,0	75,0	60,0	50,0
2014-5	0,0	35,0	25,0	30,0	80,0	65,0	39,2
2014-6	0,0	50,0	30,0	40,0	85,0	50,0	42,5
2014-9	15,0	65,0	60,0	40,0	85,0	75,0	56,7
2014-12	0,0	30,0	30,0	50,0	70,0	70,0	41,7
2014-13	10,0	50,0	30,0	60,0	80,0	65,0	49,2
2014-14	25,0	60,0	50,0	65,0	80,0	65,0	57,5
2014-18	5,0	55,0	55,0	70,0	75,0	65,0	54,2
2014-19	0,0	40,0	65,0	60,0	70,0	60,0	49,2
2014-21	20,0	60,0	65,0	60,0	85,0	75,0	60,8
Среднее, %	8,0	49,0	46,0	54,0	78,5	65,0	50,1

Таблица 2 – Индексы восстановления фертильности пыльцы (%) гетерозисных гибридов F₁ при использовании материнских компонентов из Западноевропейских популяций ржи и разных отцовских компонентов

Селекционный номер гибрида	Отцовские компоненты гибридов						Среднее, %
	Сорт Зарница	ЛВ-2	ЛВ-18	НГ-124 (IRAN IX)	НГ-502 (IRAN IX)	НГ-508 (IRAN IX)	
2015-1	10,0	60,0	50,0	65,0	85,0	70,0	56,7
2015-2	15,0	40,0	40,0	70,0	80,0	70,0	52,5
2015-4	0,0	45,0	40,0	60,0	80,0	70,0	49,2
2015-5	20,0	50,0	60,0	70,0	90,0	65,0	59,2
2015-6	25,0	55,0	65,0	75,0	80,0	70,0	61,7
2015-7	5,0	55,0	55,0	65,0	80,0	65,0	54,2
2015-10	5,0	65,0	50,0	60,0	75,0	75,0	55,0
2015-11	20,0	70,0	55,0	80,0	85,0	80,0	65,0
2015-12	30,0	40,0	40,0	60,0	70,0	70,0	50,0
2015-16	5,0	35,0	45,0	55,0	85,0	70,0	49,2
Среднее, %	13,5	51,5	50,0	66,0	81,0	70,5	55,3

Установлено, что из трех линий-опылителей с генами от IRAN IX наибольшим ИВ характеризовалась линия под селекционным номером НГ-502, несмотря на то, что ДНК-анализ показал наличие этого гена и в двух других линиях. Данный факт объясняется разным уровнем экспрессии гена в разных генотипах. В свою очередь, характер экспрессии генов – это невероятно сложный механизм, зависящий от разного рода рекомбинаций, генных и хромосомных взаимодействий, физиологических, биохимических и других процессов, происходящих в каждом конкретном генотипе. Кроме того, как описывалось в пре-

дыдущих публикациях, ИВ зависит не только от отцовского, но также и материнского компонента гибрида F₁ [6, 7]. Данная генотипическая специфичность прослеживается и в настоящих исследованиях. Вместе с тем, при использовании восстановителя фертильности НГ-502 вариация ИВ в зависимости от материнского компонента была незначительна в сравнении с другими отцовскими компонентами.

Линия-восстановитель НГ-502 включена в селекционный процесс создания системы ЦМС и новых гибридных сортов ржи.

Проведена оценка *per-se* (микроиспытания) использованных в данных исследованиях отцовских компонентов гибридов F₁, за исключением популяционного сорта *Зарница*, с целью изучения основных хозяйственно-полезных признаков, так как только признак «ИВ» не может быть окончательным основанием для признания селекционной ценности родительских компонентов.

Результаты сравнительного изучения уровня самосовместимости пяти отцовских компонентов показали более высокий уровень озерненности колоса при принудительном самоопылении у линий с генами от IRAN IX по сравнению с линиями без данного гена (рисунок).

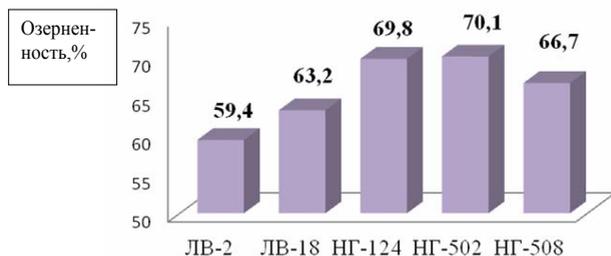


Рисунок 1 – Озерненность колоса линий ржи

Следует отметить, что все 5 изученных линий ржи созданы на генетической основе одного и того же источника самосовместимости. Следовательно, можно сделать вывод, что повышение озерненности колоса, хотя и незначительное, обусловлено присутствием гена от Иранской ржи, благодаря которому в пыльниках формируется большее количество фертильных пыльцевых зерен, чем у линий без данного гена. Общеизвестно, что из-за проявления в той или иной степени инбредной депрессии, инцухт-линии ржи, за исключением редких случаев, не формируют 100% фертильных зерен в своих пыльниках.

Также изучены следующие признаки линий ржи при свободном опылении: урожайность с 1 м², масса 1000 зерен, высота, выравненность по высоте (таблица 3).

Как видно из таблицы, не наблюдается существенной вариации между линиями ржи по урожайности и МТЗ. Присутствие гена от IRAN IX не оказывает влияния на данные признаки. Следовательно, основная функция данного

гена – восстановление фертильности у гибридов F_1 , а также сопутствующий этому более высокий уровень самофертильности при принудительном само-

Таблица 3 – Характеристика самофертильных линий ржи по селекционно-ценным признакам

Селекционный номер	Урожайность, г/1 м ²	Масса 1000 зерен, г	Высота, см	Выравненность, балл
ЛВ-2	783	27,6	65,0	8
ЛВ-18	729	28,2	70,0	8
НГ-124 (IRAN IX)	750	28,4	80,0	9
НГ-502 (IRAN IX)	775	27,5	80,0	8
НГ-508 (IRAN IX)	804	29,0	75,0	7

опылении. Однако следует отметить более высокую длину соломины у линий НГ-124, НГ-502 и НГ-508, которые получены на основе существующих короткостебельных форм и более высокорослой (80-85 см) Иранской дикой ржи. В поколениях I_1 - I_2 от комбинаций с IRAN IX наблюдалось выщепление форм высотой до 100 см. Несмотря на рекуррентный отбор по высоте в течение ряда поколений, пока не удалось получить линии-восстановители фертильности с генами от IRAN IX с высотой растений на уровне и ниже ранее созданных селекционно-ценных форм.

Заключение

В результате проведенных исследований созданы самофертильные линии, обеспечивающие достаточно высокий уровень восстановления фертильности пыльцы у гибридов F_1 ржи, благодаря присутствию в их составе генов-восстановителей от Иранской примитивной ржи (IRAN IX). Выделена линия-восстановитель (НГ-502), где наиболее ярко выражена экспрессия этих генов. Несмотря на ранее проведенные молекулярно-генетические исследования, наличие ДНК-маркеров, пока не определено точное количество генов-восстановителей фертильности. Можно предполагать, что по аналогии с популяциями культурной ржи их может быть от 2-х до 4-х. Не выяснено также, почему гены-восстановители, присутствующие в популяции Иранской ржи, более эффективны по сравнению с таковыми в других популяциях (видах), почему они лучше подавляют действие митохондриальных химерных генов, обуславливающих проявление мужской стерильности у ржи.

На последующих этапах работы необходимо размножение полученных линий-восстановителей, а также лучших материнских компонентов до объемов, достаточных для получения и изучения экспериментальных гетерозисных гибридов F_1 ржи в контрольном, ПСИ и КСИ питомниках по комплексу морфологических и хозяйственно-полезных признаков с перспективой передачи нового гибридного сорта ржи с высоким индексом восстановления фертильности.

Литература

1. Geiger, H.H. Cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.) / H.H. Geiger, F.W. Schnell // Crop. Sci. – 1970. – Vol. 10. – P. 56-60.
2. Кобылянский, В.Д. Рожь / В.Д. Кобылянский. – Москва, 1982. – 289 с.

3. *MelzGi*. Genetics of a male-sterile rye of “G-type” with results of the first F₁ hybrids. / MelzGi., MelzGu., HartmannF. // In proc. Int. Symp. on rye breed. and gen. EUCARPIA. – Radzikow, Poland, 2001. – P.43 – 50.

4. Государственный реестр сортов / ГУ «Государственная инспекция по испытанию и охране сортов растений». – Минск, 2016. – 287 с.

5. *Geiger, H.H.* Hybrid rye and Heterosis / H.H. Geiger, T. Miedaner // Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops. – Madison, Wisconsin, USA, 1999. – P. 439-450.

6. *Madej, L.* Ocena plodnosci mieszanow zyta / L. Madej, R. Osinski, J. Jagodinski // Biuletyn Inst. Hodowli i Aklimat. Roslin. Radzikow, Poland. – 1995. – №195/196. – P. 283-290.

7. *Гордей, С.И.* Особенности экспрессии генетических систем ЦМС Р-типа («Пампа») при закреплении стерильности и восстановлении фертильности у озимой диплоидной ржи (*Secale cereale L.*) / С.И. Гордей, И.А. Гордей // Вести НАНБ, сер.биол.наук. – 2006. – №2. – С. 59-62.

FERTILITY RESTORER GENES OF «IRAN IX» POPULATION (*SECALE IRANICUM L.*) USING F₁ HETEROISIS HYBRIDS IN WINTER RYE DEVELOPMENT

S.I. Hardzei

*The article presents the main results of fertility restorers development with the use of the gene pool of cultural rye (*Secale cereale L.*) self-fertile lines and Iranian population (*Secale iranicum L.*). A higher restoration level of pollen fertility in F₁ hybrids using inbred lines which are the carriers of Iranian rye restorer genes is shown. Breeding valuable genotypes of male components of winter diploid rye hybrid varieties have been selected.*