

СОЗДАНИЕ САМООПЫЛЕННЫХ ЛИНИЙ ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ ГИБРИДНЫХ СОРТОВ ОЗИМОЙ РЖИ (*SECALE CEREALE L.*)

С.И. Гордей, кандидат биол. наук, **Э.П. Урбан**, доктор с.-х. наук,
К.Г. Мельничук

Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию

(Поступила 18.02.2016 г.)

Аннотация. В статье изложены основные результаты создания самофертильных линий озимой диплоидной ржи с использованием разных методов. Описан метод интродукции генов самофертильности в популяции ржи, метод создания инцухт-линий с использованием гетерозисных гибридов F_1 . Отмечена необходимость разработки технологии культуры пыльников *in vitro* для создания удвоенных гаплоидов ржи. Описано практическое использование созданных самофертильных линий в селекции ржи на гетерозис.

Введение. Успех селекции гибридных сортов ржи определяется наличием широкого генофонда родительских компонентов и в первую очередь самоопыленных линий с высоким уровнем самофертильности и слабым проявлением инбредной депрессии в поколениях.

Ранее выдающиеся результаты, достигнутые путем межлинейной гибридизации кукурузы, породили обоснованные надежды на успех аналогичной работы и у других культур. Многие исследователи и у озимой ржи пытались использовать самоопыленные линии с целью получения гетерозисных гибридов. Однако позже пришли к выводу, что при селекции, применяемой в отношении кукурузы и ряда других культур, у ржи особого успеха достичь нельзя, так как из-за низкой самосовместимости наблюдается сильная инбредная депрессия, а гетерозис, проявляющийся при гибридизации инбредных линий, не очень высок и гетерозисные гибриды F_1 , как правило, по продуктивности ниже стандарта. В связи с этим ряд исследователей стали разрабатывать методологию создания высокопродуктивных гибридов специально для ржи. Преодолеть проявление инбредной депрессии в некоторой степени удалось путем использования источников самофертильности, найденных в ряде популяций ржи. На основе таких источников в настоящее время создаются коллекции селекционно-ценных линий с высоким уровнем самосовместимости и слабым проявлением инбредной депрессии.

Успеху создания инцухт-линий ржи во многом поспособствовала локализация генов самофертильности с использованием молекулярно-генетических методов исследований. В настоящее время локализован ряд генов самофертильности: $Sf_1(1R)$; $Sf_2(2R)$; $Sf_3(4R)$; $Sf_5(5R)$; $Sf_4(6R)$ [1]. Картированы 3 мутации, определяющие самофертильность в локусах S, Z и S5 самонесовместимости на хромосомах 1R; 2R и 5R соответственно. Определены 1 белковый и 3 ДНК-маркера для этих локусов [2].

Материал и методика исследований. Материалом для исследований являлись популяционные сорта озимой диплоидной ржи белорусской селекции: Зарница, Ясельда, Юбилейная, Офелия, Алькора, Павлинка; 10 гибридных сортов немецкой селекции с использованием Р-ЦМС («Рампра»), 3 гибридных сорта и 6 гибридных образцов немецкой селекции с использованием G-ЦМС («Guelzower-1») и 5 доноров генов самофертильности из коллекций РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» и ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси».

Опыты проводили по методике Б.А. Доспехова [3]. Для создания инцухт-линий на генетической основе популяционных сортов проводили кастрацию сорта, после чего его опыляли инцухт-линией – донором генов самофертильности (Sf). В последующих поколениях принудительно самоопыляли отдельные растения, колосья и отбирали инцухт-линии по уровню самофертильности, продуктивности и инбредной депрессии. Для создания инцухт-линий на генетической основе гетерозисных гибридов F_1 проводили принудительное самоопыление этих гибридов с последующей оценкой уровня самофертильности по проценту завязываемости зерен в изолированных колосьях.

Период исследований – 2001-2015 гг.

Результаты исследований и их обсуждение. Принудительное самоопыление популяционных сортов диплоидной ржи Зарница, Ясельда, Юбилейная, Офелия, Алькора, Павлинка показало, что они не являются носителями генов самосовместимости. У Зарницы из двадцати опыленных колосьев только на двух завязалось по одному зерну и одном колосе три зерновки, у сорта Офелия – на четырех колосьях по одному зерну, одном колосе – три зерна и на двух колосьях – по два зерна из двадцати самоопыленных колосьев. На остальных сортах не завязалось ни одной зерновки.

С целью определения эффективности ранее выделенного донора генов самофертильности, изучения особенностей экспрессии Sf генов и создания новых инцухт-линий, проведена гибридизация вышеперечисленных сортов (♀) с донорами Sf генов (♂). В таблице 1 на примере комбинации скрещивания *Юбилейная* $\times$ *Л-353* представлен уровень самофертильности самоопыленных растений. Видно, что уже в I_1 выражена экспрессия генов самофертильности независимо от генотипа материнского и отцовского компонента. Все растения I_1 комбинации «Юбилейная $\times$ Л-353 (источник генов самофертильности)» имели высокий уровень самофертильности при относительно низкой вариации данного признака. Изученные формы характеризовались также высокой массой 1000 зерен (таблица 1).

Аналогичные результаты по эффекту генов самофертильности получены при использовании остальных вышеуказанных популяционных сортов.

Для создания константных форм проводилось последовательное самоопыление выделенных по высокому уровню самосовместимости генотипов с одновременным изучением по восстанавливающей и закрепляющей способности. Данным методом создана коллекция инцухт-линий, с которой проводилась работа по выделению форм с высокой комбинационной способностью, высокой

Таблица 1 – Уровень самофертильности и элементы продуктивности поколения I₁ от скрещивания Юбилейная х Л-353 (2003 г.)

Комбинация скрещивания	Количество цветков в колосе	Количество зерен в колосе	Уровень самофертильности, %	Масса зерна с колоса, г.	Масса 1000 зерен, г.
Юбилейная – контроль	82	0	0	0	43,2 (При свободном опылении)
Юбилейная х Л-353/1	76	55	72,4	2,1	38,2
Юбилейная х Л-353/2	76	55	72,4	1,9	34,5
Юбилейная х Л-353/3	76	44	57,9	1,8	40,9
Юбилейная х Л-353/4	92	72	78,3	2,85	40,0
Юбилейная х Л-353/5	72	42	58,3	1,8	42,9
Юбилейная х Л-353/6	72	42	58,3	1,75	41,7
Юбилейная х Л-353/7	76	33	43,4	1,4	42,4
Юбилейная х Л-353/8	76	40	52,6	1,4	35,0
Юбилейная х Л-353/9	72	37	51,4	1,7	45,9
Юбилейная х Л-353/10	76	48	63,2	2,2	45,8
Юбилейная х Л-353/11	76	31	40,8	1,3	41,9
В среднем			59,0	1,8	40,8

продуктивностью, слабым проявлением инбредной депрессии в поколениях. Выделено более 300 селекционно-ценных форм, которые служили родительскими компонентами экспериментальных гетерозисных гибридов F₁ ржи.

С использованием инцухт-линии под селекционным номером МС-2, которая является закрепителем стерильности для большинства ЦМС-форм «Рапра», создан и включен в Государственный реестр Республики Беларусь гибридный сорт озимой ржи Плиса.

Следует отметить, что несмотря на эффективность данного метода создания инцухт-линий, процесс кастрации, гибридизации и отбора форм по уровню самофертильности трудоемок. Кроме того, как показывает практика, после последующего отбора инцухт-линий по морфологическим, хозяйственно-полезным признакам, комбинационной способности, уровню инбредной депрессии, закреплению стерильности и восстановлению фертильности, только 3-5% генотипов могут быть использованы в качестве родительских компонентов гетерозисных гибридов F₁.

Для создания инцухт-линий большой интерес представляет использование уже существующих гибридных сортов, в которых присутствуют гены самофертильности. К настоящему времени в Европе создан достаточно большой генофонд гетерозисных гибридов F₁ различного экологического происхождения, который может служить ценным исходным материалом для создания новых инцухт-линий. Нами проведено принудительное самоопыление отдельных растений гибридных межлинейных (на генетической основе Р-ЦМС) и линейно-популяционных (с использованием G-ЦМС) сортов ржи западноевропейской, белорусской и украинской селекции. Из таблиц 2 и 3 видно, что подавляющее

большинство самоопыленных растений характеризовались высоким уровнем фертильности колоса.

Таблица 2 – Уровень самофертильности при принудительном самоопылении межлинейных гетерозисных гибридов F₁ ржи на основе Р-ЦМС (2008 г.)

Селекционный номер	Среднее количество цветков в колосе	Среднее количество зерен в колосе	Уровень самофертильности, %
LP-1	64	36	56,3
LP-2	60	44	73,3
LP-3	60	27	45,0
LP-4	64	45	70,3
LP-5	72	43	59,7
LP-6	72	46	63,9
LP-7	68	50	73,5
LP-8	64	53	82,8
LP-9	68	59	86,8
LP-10	56	41	73,2
LP-11	52	41	78,8
LP-12	60	38	63,3
LP-13	64	59	92,2
LP-14	56	44	78,6
LP-15	66	41	62,1
LP-16	76	71	93,4
LP-17	60	47	78,3
LP-18	52	33	63,5
LP-19	60	41	68,3
LP-20	64	3	04,7
LP-21	72	16	22,2
LP-22	64	17	26,6
LP-23	48	8	16,7
LP-24	76	18	23,7
LP-25	60	12	20,0
LP-26	64	4	06,3
В среднем			57,1

При этом следует отметить, что для линейно-популяционных гибридов на основе G-ЦМС средний уровень фертильности колоса на 18,1% выше по сравнению с гибридами Р-типа. Вариация данного признака также менее выражена у линейно-популяционных гибридов с использованием G-ЦМС: 34,6-100,0%, в то время как для гибридов на основе Р-ЦМС – 4,7-93,4%.

Различия по уровню самофертильности между гибридами систем ЦМС Р- и G-типов связано с разным индексом восстановления фертильности пыльцы.

Ранее установлено, что практически все современные гибридные сорта на генетической основе Р-ЦМС характеризуются относительно низким индексом восстановления, часто приводящим к черездзернице и большей восприимчивости к спорынье [4]. Для G-ЦМС, как известно, не возникает проблем с восстановлением фертильности пыльцы у гибридов [5].

Таблица 3 – Уровень самофертильности при принудительном самоопылении линейно-популяционных гетерозисных гибридов F₁ ржи на основе G-ЦМС (2010 г.)

Селекционный номер	Уровень самофертильности, %	Селекционный номер	Уровень самофертильности, %	Селекционный номер	Уровень самофертильности, %
M-1	55,0	M-38	78,3	M-75	89,7
M-2	42,2	M-39	87,5	M-76	83,8
M-3	82,1	M-40	78,6	M-77	65,6
M-4	80,0	M-41	76,8	M-78	73,3
M-5	94,7	M-42	30,6	M-79	65,0
M-6	87,5	M-43	85,9	M-80	79,4
M-7	46,9	M-44	84,4	M-81	93,4
M-8	63,3	M-45	83,3	M-82	42,3
M-9	73,3	M-46	58,3	M-83	65,6
M-10	73,8	M-47	57,1	M-84	60,3
M-11	82,4	M-48	91,1	M-85	56,7
M-12	97,5	M-49	95,6	M-86	79,7
M-13	87,5	M-50	64,7	M-87	61,7
M-14	76,6	M-51	89,1	M-88	81,3
M-15	73,4	M-52	95,3	M-89	63,9
M-16	91,2	M-53	88,3	M-90	69,1
M-17	91,5	M-54	94,1	M-91	41,7
M-18	89,1	M-55	89,7	M-92	93,3
M-19	68,8	M-56	94,1	M-93	53,6
M-20	76,7	M-57	83,3	M-94	68,3
M-21	48,3	M-58	82,0	M-95	85,0
M-22	89,7	M-59	78,6	M-96	65,3
M-23	60,7	M-60	86,7	M-97	59,4
M-24	88,3	M-61	81,3	M-98	83,3
M-25	76,7	M-62	76,6	M-99	80,0
M-26	92,9	M-63	88,2	M-100	83,3
M-27	81,7	M-64	76,4	M-101	96,9
M-28	87,5	M-65	72,2	M-102	80,6
M-29	61,7	M-66	92,2	M-103	85,3
M-30	73,3	M-67	73,4	M-104	56,5
M-31	84,4	M-68	71,9	M-105	100,0
M-32	83,3	M-69	86,7	M-106	83,3
M-33	36,7	M-70	85,7	M-107	94,1
M-34	83,3	M-71	73,4	M-108	86,7
M-35	89,1	M-72	90,6	M-109	80,0
M-36	93,3	M-73	92,2	M-110	89,6
M-37	76,7	M-74	39,5	M-111	34,6
В среднем:					75,2

Результаты наших исследований подтверждают эффективность метода получения инцухт-линий с использованием гибридных сортов ржи с целью расширения генофонда исходного материала для создания гетерозисных гибридов

F₁. Применение данного подхода сокращает сроки и трудоемкость создания новых самоопыленных линий. Кроме того, учитывая, что родительскими компонентами гибридных сортов являются селекционно-ценные генотипы, следует ожидать, что последующее использование таких инцухт-линий облегчит процессы выделения закрепителей стерильности, восстановителей фертильности, выявления высококомбинационных форм, создания селекционно-ценных систем ЦМС и гетерозисных гибридов F₁. Однако следует иметь в виду, что использование межлинейных гибридных сортов ржи ограничивает создание широкого генофонда линий, поскольку такие гибриды состоят из трех-четырех инцухт-линий. Более широкий генофонд самоопыленных линий может быть создан с использованием линейно-популяционных гибридных сортов, где их отцовскими компонентами являются популяционные сорта ржи.

При принудительном самоопылении четырех гибридных сортов ржи (по 20 растений каждого) селекции Института растениеводства им. В.Я. Юрьева Национальной академии аграрных наук Украины только на одном колосе сорта Слобожанец завязалась одна зерновка (таблица 4), что указывает на отсутствие генов самосовместимости в данных сортах. Данный факт объяснить не представляется возможным, так как методы создания этих гибридных сортов ржи неизвестны. Возможно они представляют собой сорта-синтетики или композиционные сорта, где не требуется использования генов самосовместимости, а эффект гетерозиса проявляется при переопылении в F₁, подобранных по одинаковому морфотипу образцов ржи (линий, гибридов, популяций).

Таблица 4 – Уровень самофертильности при принудительном самоопылении гибридных сортов ржи селекции Украины (2012 г.)

Селекционный номер	Среднее количество цветков в колосе	Количество зерен в колосе	Уровень самофертильности, %
Хамарка	66	0	0,000
Юрвец	64	0	0,000
Первисток	68	0	0,000
Слобожанец	68	1	1,470
В среднем			0,004

На основании вышеизложенного, не принимая во внимание результаты, полученные на гибридах селекции Украины, можно сделать вывод, что использование гетерозисных гибридов F₁ на 1-2 года сокращает сроки создания новых инцухт-линий. Вместе с тем, применение доноров генов самофертильности для получения инцухт-линий на генетической основе популяционных сортов более эффективно с точки зрения адаптивности местных популяций ржи по сравнению с гибридными сортами западноевропейской селекции.

В 2014-2015 гг. проведены исследования по использованию технологии андрогенеза *in vitro* для создания гомозиготных линий ржи. Однако получить удвоенные гаплоиды на генетической основе диплоидных образцов ржи не удалось. В первую очередь, это обусловлено биологией данной зерновой культуры.

Также летальный эффект в 100% случаев имел место при обработке колхицином для полиплоидизации гаплоидных растений-регенерантов [6]. Использование данного метода дополнительно усложняется тем, что для создания гомозиготных инцухт-линий как родительских компонентов гибридных сортов, необходима предварительная интродукция генов самофертильности в популяции, либо использование существующих гетерозисных гибридов ржи, где уже присутствуют эти гены. Без генов самофертильности невозможно размножение инцухт-линий в поколениях, т.к. при принудительном самоопылении зерновки не завязываются из-за высокого уровня самонесовместимости.

Заключение

Результаты настоящих исследований показали возможность использования двух методов создания самофертильных линий озимой диплоидной ржи:

1. Интродукция генов самофертильности в популяции с последующим принудительным самоопылением и отбором селекционно-ценных генотипов.

2. Принудительное самоопыление гетерозисных гибридов F_1 – носителей генов самосовместимости с последующим отбором в поколениях селекционно-ценных инцухт-линий.

С использованием этих методов в течение 2000-2015 гг. создана коллекция самофертильных линий с высоким уровнем ($\geq 80\%$) самосовместимости и слабым проявлением инбредной депрессии в поколениях. На их основе созданы системы ЦМС Р- и G-типов (закрепитель стерильности, мужски стерильный аналог, восстановитель фертильности) и ряд экспериментальных гетерозисных гибридов F_1 , в том числе первый гибридный сорт белорусской селекции Плиса.

Получение удвоенных гаплоидов ржи также заслуживает внимания. Однако в настоящее время в мире не разработано эффективной методики культуры пыльников *in vitro*. По сравнению с другими зерновыми культурами (ячмень, пшеница) рожь характеризуется крайне слабой регенерационной способностью при использовании культуры пыльников. Разработка данной методики позволила бы существенно ускорить (на 3-5 лет) создание гомозиготных самофертильных форм.

Литература

1. Schlegel, R. Selffertility genes in rye / R. Schlegel, G. Melz, V. Korzun // Euphytica, 1998. – No.101. – P. 23-67.
2. Voylokov, A.V. DNA markers of selffertility genes in rye / A.V. Voylokov, V. Korzun, A. Borner // Theor. Appl. Genet., 1998. – V.97. – No.1-2. – P. 147-153.
3. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) // Москва, Агропромиздат. – 1985. – 351 с.
4. 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.
5. Melz, G. Genetics of female-sterility of “G-type” with results of the first F_1 hybrids. / G. Melz, G. Melz, F. Hartmann // In proc. Int. Symp. on rye breed. and gen. EUCARPIA. – Radzikow, Poland, 2001. – P.43-50.
6. Гордей, С.И. Результаты создания удвоенных гаплоидов ржи (*Secale cereale* L.) с использованием технологии культуры пыльников *in vitro* / С.И. Гордей, В.С. Гурецкая, В.В. Морозова // Земледелие и селекция в Беларуси: сб. науч. тр.; редкол.: Ф.И. Привалов (гл. ред.)

DEVELOPMENT OF SELF-POLLINATED LINES FOR WINTER RYE (*SECALE CEREALE* L.) HYBRID CULTIVARS BREEDING
S.I. Hardzei, E.P. Urban, K.G. Melnichuk

In the article, the basic results of self-fertile winter rye lines development with the use of different methods are stated. The method of self-fertility genes introduction into rye populations, the method of inbred lines development with the use of F_1 heterosis hybrids are described. The necessity of working out of anther technology culture in vitro for the development of rye double haploids is noted. The practical use of the developed inbred lines in rye breeding for heterosis is described.

УДК 633.11»324»:631.523

**КАЛЛУСОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO НЕЗРЕЛЫХ СОЦВЕТИЙ
ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ**

Е.Н. Куликович, канд. с.-х. наук, **С.Н. Куликович**, канд. с.-х. наук,
Н.Л. Ермоленко, Е.Ф. Барчевская

Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию

(Поступила 05.02.2016 г.)

Аннотация. Проведено изучение каллусогенеза в культуре *in vitro* незрелых соцветий озимой пшеницы. Установлено, что между длиной колоса и размером каллуса существует положительная взаимосвязь: $r=0,46$ (Т-62) – $r=0,78$ (Fenda). Размер каллуса у озимой пшеницы обусловлен не сортовыми различиями, а генетическими особенностями культуры, поскольку нет различий как между максимальной величиной каллуса (5,6-5,9 мм), так и по размаху варьирования данного признака внутри каждого изученного образца озимой пшеницы. Оптимальной длиной незрелого колоса, обеспечивающей максимальное и стабильное количество хорошо развитых, высокоморфогенных каллусов является диапазон 2,1-2,5 см.

Введение. В настоящее время традиционными методами селекции не всегда удается успешно решать поставленные перед ней задачи. В связи с этим все более активно используются другие направления исследований – физиологические, биохимические, генетические и др. Применение биотехнологии, основанной на технологии рекомбинантной ДНК и культуре *in vitro* открывает возможности для решения самых разнообразных задач, таких как: отбор на селективных средах генотипов, устойчивых к биотическим и абиотическим факторам среды, стабилизация гибридных геномов, преодоление прогамной и постгамной несовместимости при межвидовой гибридизации и так далее. Несмотря на имеющиеся ограничения самого подхода на уровне клеток и, зачастую, недостаток фундаментальных знаний, перечень положительных примеров селекции *in vitro* с каждым годом увеличивается. Так, в культуре *in vitro* получены растения регенеранты с различной степенью устойчивости к болезням у картофеля