

7. Люси́ков, О.М. Создание ржано-пшеничных амфидиплоидов с цитоплазмой ржи – секалотритикум (RRAABB, $2n=42$): Специфичность мейоза у ржано-тритикальных гибридов F_1 (RRABR, $5x=35$) / О.М. Люси́ков, Н.Б. Белько, И.С. Щетько, И.А. Гордей // Генетика. – 2005. – Т. 41, №7. – С. 902-909.

**DEVELOPMENT OF NEW TERTRAPLOID RYE FORMS
(*SECALE CEREALE* L., $4X = 28$) INVOLVING WHEAT
(*TRITICUM AESTIVUM* L.) GENETIC MATERIAL BASED ON
INTROGRESSIVE HYBRIDIZATION WITH TRITICALE
(*TRITICOSECALE WITTM.*, $6X=42$)**

S.I. Grib, N.B. Belko, I.S. Gordej

The method for developing tetraploid rye (*Secale cereale* L., $4x = 28$) involving wheat (*Triticum aestivum* L.) genetic material has been experimentally substantiated. The research results of introgressive hybridization of tetraploid rye with hexaploid triticale (*Triticosecale* Wittm., $6x = 42$) – an intermediate species and source of wheat genome chromosomes are described. The data on the karyotypic composition of rye-triticale hybrids F_1BC_1 produced by the chromosome differential staining method (C-banding) are presented.

УДК 633.14«324».631.55(476)

**ОСОБЕННОСТИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ
ФЕРТИЛЬНОСТИ ПЫЛЬЦЫ У ГЕТЕРОЗИСНЫХ
ГИБРИДОВ F_1 ОЗИМОЙ РЖИ
(*SECALE CEREALE* L.)**

С.И. Гордей, кандидат биол. наук, **Э.П. Урбан**, доктор с.-х. наук
Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию

(Поступила 30.09.2014 г.)

Аннотация. В статье изложены основные результаты изучения индекса восстановления фертильности у гетерозисных гибридов F_1 с использованием разных типов цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС). Установлен относительно низкий уровень восстановления фертильности пыльцы для ЦМС «Ратра»-типа у большинства экспериментальных гибридов F_1 . Показано, что использование гена восстановления фертильности от Иранской ржи может существенно повысить индекс восстановления, но эффект гена разный при использовании раз-

личных материнских МС-форм. Изучение индекса восстановления у гетерозисных гибридов F_1 на основе G-ЦМС показало, что все инцухт-линии, используемые в качестве отцовского компонента, являются надежными восстановителями фертильности независимо от материнского компонента.

Введение. В течение последних десятилетий после открытия в конце 60-х–начале 70-х годов прошлого столетия нескольких типов цитоплазматической мужской стерильности («Рапра»-тип, R-тип, позже G-тип) у озимой ржи в ряде стран западной и восточной Европы интенсивно велись исследования по использованию гетерозиса у данного злака [1, 2]. 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, Аскари, Фугато (Германия), ЛоБел-103, Галинка (Германия-Беларусь), Плиса (Беларусь) [3].

Основными преимуществами гетерозисных гибридов F_1 перед популяционными сортами являются: более высокая экологическая пластичность, устойчивость к основным видам болезней, выравненность стеблестоя, урожайность зерна, что обусловлено эффектом гетерозиса при скрещивании генетически дивергентных родительских форм [4]. Вместе с тем 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. В результате недостаток пыльцевых зерен приводит к череззернице, сильному поражению спорыньей и, как результат, к снижению урожайности [5]. Последняя проблема труднопреодолима и актуальна. Ее решение позволит существенно облегчить и расширить производство гибридных сортов ржи.

Нами в течение ряда лет проводились исследования по изучению формирования фертильности пыльцы экспериментальных гетерозисных гибридов F_1 ржи.

Материал и методика исследований. Материалом для исследований служили экспериментальные гибриды F_1 , полученные на генетической основе мужски стерильных форм, закрепителей стерильности и восста-

новителей фертильности озимой диплоидной ржи ($2n=14$) западноевропейского и местного происхождения. В исследованиях использовано два типа цитоплазматической мужской стерильности: «Рапра» и G-тип. 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». Кроме того, в исследованиях использована инцухт-линия с геном восстановителем фертильности от Иранской ржи – IRAN IX.

В поле уровень фертильности пыльцы у гибридов F_1 оценивался в баллах по шкале Гейгера (от 0 до 9) визуальнo по степени выброса пыльников из цветков и «облаку» пыльцы во время цветения: 0-3 балла – стерильные, 4-5 – полуфертильные, 6-9 – фертильные. Для лабораторной оценки фертильности пыльцы во время цветения фиксировали цветки ржи в 70%-м 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 нами предложена 5-ти 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 – средние редуцированные (1/2 от длины нормальных) и 1 – сильно редуцированные (менее 1/3 длины нормально развитых пыльников).

Результаты и обсуждение. Оценка фертильности (индекса восстановления) по степени выброса пыльников и «облаку» пыльцы у гибридов на основе ЦМС «Рапра» показала, что из 100 изученных гибридов 2 имели балл 2-3 (стерильные), 32 гибрида – 4-5 (полуфертильные), 66 гибридов были фертильные (балл 6-8). Однако среди фертильных форм ни один гибрид не имел балл 9, т.е. не произошло полного восстановления фертильности. Цитологическое изучение уровня фертильности пыльцы тех же гибридов показало, что только у 5 гибридов данный показатель был более 80%, 52 гибрида имели 60-80% фертильных пыльцевых зерен, остальные гибриды были полустерильны и стерильны (таблица 1). Установлено, что при уровне фертильности пыльцы менее 50% пыльники, как правило, не растрескиваются, что приводит к полной стерильности растения.

Изучение индекса восстановления у 40 гетерозисных гибридов F_1 на основе G-ЦМС показало, что все инцухт-линии, используемые в качестве отцовского компонента, являются надежными восстановителями

Таблица 1 – Уровень фертильности пыльцы гетерозисных гибридов F₁ озимой ржи (*Secale cereale* L.) с использованием Р-ЦМС

№ гибрида	Фертильность визуально, балл	Фертильность при микроскопировании, %	№ гибрида	Фертильность визуально, балл	Фертильность при микроскопировании, %	№ гибрида	Фертильность визуально, балл	Фертильность при микроскопировании, %
1	4	50,3	35	6	64,7	69	4	5,6
2	7	82,4	36	5	0,0	70	7	70,1
3	6	63,7	37	5	0,0	71	6	74,3
4	2	35,2	38	6	68,1	72	5	0,0
5	5	0,0	39	5	0,0	73	6	65,0
6	5	45,9	40	4	48,6	74	6	62,7
7	6	68,9	41	7	60,5	75	5	60,6
8	8	83,2	42	7	50,9	76	3	0,0
9	6	43,2	43	7	38,6	77	7	79,5
10	6	73,7	44	4	0,0	78	7	60,9
11	7	65,4	45	7	61,2	79	5	28,9
12	6	66,9	46	7	62,3	80	4	15,5
13	6	50,3	47	6	66,9	81	6	72,4
14	7	78,5	48	5	0,0	82	7	70,3
15	6	38,9	49	7	75,2	83	7	67,3
16	6	20,9	50	7	70,5	84	7	60,8
17	6	50,7	51	8	81,3	85	5	0,0
18	4	0,0	52	7	64,4	86	7	72,5
19	7	39,4	53	6	68,1	87	6	48,0
20	8	80,4	54	5	0,0	88	6	65,3
21	5	0,0	55	6	79,6	89	5	0,0
22	7	75,8	56	6	72,3	90	5	23,3
23	7	79,4	57	6	70,6	91	6	69,0
24	5	0,9	58	5	0,0	92	6	64,1
25	7	68,6	59	7	70,0	93	4	5,9
26	4	0,0	60	6	61,8	94	7	60,1
27	7	70,1	61	5	52,4	95	8	86,7
28	4	0,0	62	7	70,0	96	7	77,7
29	5	0,0	63	7	64,1	97	7	62,7
30	6	60,1	64	6	71,6	98	4	28,1
31	6	39,6	65	6	62,8	99	6	71,8
32	4	37,4	66	4	0,0	100	5	0,0
33	6	69,8	67	5	1,9	В среднем		47,6
34	7	75,3	68	7	60,1			

фертильности независимо от материнского компонента (таблица 2). Как видно из таблицы, у всех гибридов F_1 фертильность пыльцы была от 80% до 100%.

Таблица 2 – Уровень фертильности пыльцы гетерозисных гибридов F_1 озимой ржи (*Secale cereale* L.) с использованием G-ЦМС

№ гибрида	Фертильность визуально, балл	Фертильность при микроскопировании, %	№ гибрида	Фертильность визуально, балл	Фертильность при микроскопировании, %
1	7	98,4	21	7	90,2
2	8	86,7	22	8	85,3
3	6	97,8	23	8	97,8
4	9	88,4	24	9	86,2
5	8	100,0	25	8	99,0
6	8	89,1	26	8	100,0
7	9	95,0	27	7	88,9
8	9	91,7	28	8	86,5
9	8	95,4	29	8	90,8
10	7	90,5	30	9	97,3
11	8	89,9	31	8	99,2
12	8	80,6	32	8	80,9
13	8	90,8	33	9	88,9
14	9	95,3	34	8	86,7
15	8	96,8	35	8	89,2
16	8	95,1	36	8	88,4
17	7	93,0	37	9	95,3
18	8	93,7	38	8	96,1
19	8	88,0	39	8	85,6
20	8	99,5	40	8	89,2
В среднем					87,2

Существенные различия по уровню формирования фертильности пыльцы у гибридов с использованием «Рамра»-ЦМС и G-ЦМС обусловлены разным генетическим контролем. Установлено, что G-ЦМС контролируется митохондриальным геномом и одним основным ядерным ms1 (rf) геном, локализованным на хромосоме 4RL, также описаны гены-модификаторы на хромосомах 3R (ms2) и 6R (ms3) [6]. Р-ЦМС имеет более сложный контроль, который до конца не изучен. По одним данным этот тип контролируется «стерильной» цитоплазмой и двумя ядерными генами. Другие исследователи утверждают, что ms генов не

два, а четыре. Согласно результатам исследований с использованием технологии ПДРФ, Р-ЦМС контролируется двумя основными ядерными *ms* генами, локализованными на хромосомах 1R и 4R, а также тремя *ms* генами с меньшим эффектом, локализованными на хромосомах 3R, 5R и 6R [7, 8]. Кроме того, частота генов восстановления фертильности в популяциях ржи для данного типа ЦМС крайне низка – 3-10% в зависимости от популяции. Относительно недавно выявлены новые источники генов восстановителей для ЦМС «Рамра»-типа в примитивной популяции Иранской ржи – IRAN IX и Аргентинской ландрасе Pico Gentario [10]. Считается, что данные источники проявляют значительно более высокий уровень восстановления, чем используемые в настоящее время инцухт-линии, и более высокую средовую стабильность. Для создания линий восстановителей с высоким индексом восстановления на основе этих генов с использованием методов «маркер-сопутствующего отбора» (MAS) немецкой фирмой «KWS LOCHOW GmbH» разработана технология, названная «Pollen plus» и уже получены гибридные сорта ржи с высоким уровнем фертильности пыльцы: Brasetto, Palazzo, Guttino, Visello, KWS Bono, KWS Dellgano.

Однако на основании результатов последних исследований удалось установить, что эффект гена восстановителя фертильности от Иранской ржи во многом зависит от материнского компонента (таблица 3). Инцухт-линия ржи (Л-502) с данным геном получена путем неоднократного принудительного самоопыления образца западноевропейского происхождения. Наличие гена восстановителя у конкретного образца выявлено с использованием ПЦР-анализа, проведенного в лаборатории молекулярной генетики института генетики и цитологии НАН Беларуси.

Таблица 3 – Фертильность пыльцы гетерозисных гибридов F₁ (♀МС-линия Ч ♂Л-502) озимой ржи с использованием генов восстановителей Иранской ржи, %

№ линии	♀ 1	♀ 2	♀ 3	♀ 4	♀ 5	♀ 6	♀ 7	♀ 8	♀ 9	♀ 10
♂ Л-502	69,7	82,3	27,6	81,5	79,4	58,6	82,4	66,7	35,1	78,4
№ линии	♀ 11	♀ 12	♀ 13	♀ 14	♀ 15	♀ 16	♀ 17	♀ 18	♀ 19	♀ 20
♂ Л-502	55,0	28,9	45,7	79,5	87,3	78,6	81,4	83,6	79,9	76,7

Как видно из таблицы, четыре из двадцати изученных гибридов имели фертильность пыльцы ниже 50%. При таком уровне фертильности гибриды были стерильны. Следовательно, при использовании вышеуказанного гена следует иметь в виду, что не для всех мужски стерильных форм он является надежным восстановителем фертильности.

Более сложный характер взаимодействия ядерных генов восстановителей и системы ЦМС типа «Рапра» во многом является причиной низкого уровня формирования фертильной пыльцы в результате множественных нарушений на разных стадиях микроспорогенеза у гибридов [9]. При нарушениях микроспорогенеза на ранних стадиях пыльцевые зерна, как правило, вообще не формируются, при нарушениях этого процесса на более поздних стадиях в пыльниках часто формируется стерильная пыльца. У изученных нами гибридов на основе «Рапра»-ЦМС с редуцированными и сильно редуцированными пыльниках процесс дегенерации начинается, вероятно, до мейоза, т.к. в поле зрения микроскопа пыльцевых зерен вообще не было. У отдельных генотипов наблюдались конгломераты одноядерных микроспор, отдельные из которых были без оболочек. Здесь дегенерация микроспор произошла, видимо, вскоре после распада тетрад. Наличие у некоторых МС-линий пустых пыльцевых оболочек указывает на то, что дегенерация произошла после первого митотического деления, в результате чего не произошел синтез цитоплазмы и ядра разрушились. У отдельных линий наблюдалась асинхронность процесса дегенерации микроспор, в связи с чем пыльцевые зерна были «разного возраста»: от тетрад до двуядерной стадии.

Сравнительный анализ визуальной оценки фертильности пыльцы в полевых условиях и результатов цитологического изучения показывает, что метод оценки фертильности пыльцы по степени выброса пыльников во время цветения в большинстве случаев согласуется с цитологическими исследованиями, однако линии, имеющие промежуточный тип выброса пыльников при цветении (балл 4-5), можно достоверно оценить только на основе данных цитологического анализа. Кроме того, полевая оценка является в большой степени субъективной и требует от исследователя высокой квалификации и опыта работы в данной области.

Цитологический анализ фертильности пыльцы позволил определить также ряд закономерностей, связанных с уровнем дегенерации пыльников и пыльцы. Полностью мужски стерильные растения имеют средне редуцированные и сильно редуцированные (балл 1-2) пыльники, что может являться надежным критерием выявления стерильных форм без цитологического анализа. Растения со слабо редуцированными (балл 3) пыльниками могут в ряде случаев формировать некоторый процент фертильной пыльцы, однако пыльники при этом не растрескиваются, в связи с чем их также можно отнести к стерильным. Аналогичная закономерность в свое время была установлена В.Д. Ко-

белянским при изучении ЦМС R-типа в экологических условиях северо-запада России [10].

Заключение

Несмотря на то, что существуют проблемы с восстановлением фертильности у ЦМС типа «Рапра», данный тип является более пригодным для селекции гибридных сортов ржи, т.к. высокая частота генов закрепления стерильности позволяет без труда создавать, поддерживать в поколениях и размножать стерильные материнские компоненты, которые являются основой гибридного сорта. Использование генов восстановителей для ЦМС «Рапра»-типа из примитивной популяции Иранской ржи – IRAN IX и Аргентинской ландрасы Pico Gentario позволяет существенно повысить индекс восстановления у гибридных сортов ржи. Вместе с тем в связи со сложным характером взаимодействия генов восстановителей со «стерильной» цитоплазмой не для каждого материнского компонента гибрида эти гены высокоэффективны.

Для G-ЦМС из-за низкой частоты генов закрепления стерильности в популяциях крайне затруднено создание и семеноводство мужски стерильных форм. В наших исследованиях в большинстве случаев после 2-3 циклов размножения стерильных материнских компонентов происходило массовое выщепление фертильных генотипов, что делало невозможным получение гетерозисных гибридов F_1 . Причина заключается в частичном опылении мужски стерильной формы пыльцой другого диплоидного сорта ржи, несмотря на то, что изоляция питомников размножения материнских компонентов составляла не менее 1000 м от других сортов. Попадание даже нескольких чужеродных пыльцевых зерен приводило к быстрому размножению фертильных форм в течение 2-3 поколений из-за высокой частоты генов восстановителей фертильности в популяциях ржи.

Литература

1. 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.
2. 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.
3. Урбан, Э.П. Использование ЦМС Р- и G-типов в селекции и семеноводстве гетерозисных гибридов F_1 озимой ржи (*Secale cereale* L.) /

- Э.П. Урбан, С.И. Гордей // Земледелие и селекция в Беларуси: сб. науч. тр. / НАН Беларуси, Науч.-практ. центр НАН Беларуси по земледелию; редкол.: Ф.И. Привалов (гл. ред.) [и др.]. – 2013. – Вып. 49. – С. 349-358.
4. *Гордей, С.И.* Селекционно-генетические аспекты использования эффекта гетерозиса у озимой ржи (*Secale cereale* L.) / С.И. Гордей // Весці Нацыянальнай Акадэміі Навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2002. – №1. – С. 103-108.
 5. *Madej, L.* Ocena plodnosci mieszcancow zyta / L. Madej, R. Osinski, J. Jagodinski // Biuletyn Inst. Hodowli i Aklimat. Roslin. Radzikow, Poland. – 1995. – №195/196. – P. 283-290.
 6. *Melz, Gi.* Genetics of a male-sterile rye of «G-type» with results of the first F₁ hybrids / Gi. Melz, Gu. Melz, F. Hartmann // In proc. Int. Symp. on rye breed. and gen. EUCARPIA. – Radzikow, 2001. – P. 43-50.
 7. *Geiger, H.H.* Heterosis of factorial inter-pool-single cross among elite winter rye inbred lines / H.H. Geiger, P. Wilde, M. Erfurt, J. Pakas // Proceedings of the Eucarpia Rye Meeting, Juli 4-7, 2001. – Radzikow, 2001. – P. 19-22.
 8. Genes, markers and linkage data of rye (*Secale cereale* L.) [Electronic resource] / ed. R. Schlegel & V. Korzun – Lochow-Petkus, 6th updated inventory, 2006. – Электрон. опт. диск (CD-ROM).
 9. *Даниленко, Н.Г.* Миры геномов органелл / Н.Г. Даниленко, О.Г. Давыденко. – Минск, 2003. – 780 с.
 10. *Кобылянский, В.Д.* Рожь / В.Д. Кобылянский. – Москва, 1982. – 289 с.

Features of Pollen fertility Restoration in winter rye F₁ heterosis hybrids (Secale cereale L.)

S.I. Hardzei, E.P. Urban

In the article, the basic results of a restoration index studying in F₁ heterosis hybrids with the use of different types of cytoplasmatic male sterility (CMS) are stated. Rather the low level of pollen restoration for “Pampa” type CMS at the majority of F₁ experimental hybrids is established. It is shown that the use of the gene of fertility restoration from the Iranian rye can essentially raise the restoration index, but the effect of the gene is different at the use of various parent ms-forms. Studying of the restoration index in F₁ heterosis hybrids on the basis of G-CMS has shown that all inbred-lines used as a male component are reliable restorers irrespective of a female component.