

УДК:633.16:631[523+527]

**СОЗДАНИЕ НОВОГО СЕЛЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА  
ЯЧМЕНЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МУТОРЕКОМБИНОГЕННЫХ  
И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ**

**И.А. Епшико**

ОАО «БрестАгроинторг».  
г. Брест. Республика Беларусь

*(Поступила в редакцию 08.07.2014 г.)*

***Аннотация.** Проведены исследования, направленные на создание оригинального исходного материала ячменя для селекции на продуктивность, иммунитет и качество, с применением индуцированного мутагенеза и рекомбинагенеза, воздействие которых привело к увеличению в среднем массы 1000 зерен более, чем на 10,3 грамма или на 22%, продуктивной кустистости с 2 до 6 стеблей на растение, длины колоса на 2,8 см или на 32% по сравнению с контрольным вариантом.*

***Summary.** Studies aimed at creation of original source material of barley for breeding for productivity, immunity and quality with the use of induced mutagenesis and recombination have been conducted. The impact of induced mutagenesis and recombination has led to an increase in average of weight of 1000 grains by more than 10.3 per gram, or 22%, productive bushiness from 2 to 6 stems of the plant, the length of the ear by 2.8 cm or by 32% in comparison with the control variant.*

**Введение.** Ячмень является одной из важнейших зерновых культур в мире, обеспечивающей продовольственную безопасность стран такой продукцией, как крупа, концентрированные корма (животноводческая и птицеводческая продукция) и безалкогольно-алкогольные напитки.

Несмотря на широкое использование интенсивных технологий возделывания, в последнее время наметилась тенденция стабилизации роста урожайности, снижение устойчивости растений к абиотическим и биотическим факторам.

В связи с этим жизненную актуальность приобретает вопрос более широкого использования новейших достижений генетики и биотехнологии в селекции ячменя на адаптивность и продуктивность.

Интенсивная селекция сельскохозяйственных культур на продуктивность, в частности ячменя, привела к резкому сужению генетического разнообразия создаваемых сортов [1]. Поэтому возникла настоятельная потребность в расширении генофонда ячменя за счет использования новых генетических источников и новых методов селекции, генетики и биотехнологии. В селекции ячменя на устойчивость к болезням перспективным является использование MAS метода (markerassistedselection), например, для детекции гена *mlo* как маркера устойчивости к данной болезни.

**Цель работы** – создание высокопродуктивных и адаптивных генотипов ячменя.

**Материал и методика исследований.** Для исследований были взяты районированные в Республике сорта ячменя и генетические источники ячменя с геном *Mlo*, характеризующиеся устойчивостью к мучнистой росе из коллекции ВИР им. Н.И. Вавилова.

Для реализации первого этапа исследования – создание высокопродуктивных и адаптивных генотипов ячменя – была проведена гибридизация, где в качестве материнских компонентов использовали высокопродуктивные сорта ячменя Дивосны, Гонар и Поспех, а в качестве отцовских образцы – К-24600, К-2930, К-24641 и ММС, обладающие, отдельными хозяйственно-ценными признаками и высоким качеством зерна. По каждой комбинации получали не менее 150 ги-

бридных зерновок, из 2/3 которых на 12-14 день после опыления извлекали незрелые зародыши и эксплантировали в условиях *invitro* на модифицированную питательную среду Гамборга Р-8-Б-5 (вариант эксперимента – V). Высаженные зародыши культивировали в темноте при  $t=25^{\circ}\text{C}$  в термостате до появления проростков, затем – в световой комнате при освещенности 10-12 клк. до появления 2-3 листьев и хорошо развитой корневой системы. Эмбриокультуру *invitro* использовали для ускорения сроков получения гибридного поколения  $F_2-R_2$ . Одну треть зерновок оставляли на материнских колосьях до полного созревания. Растения, полученные из этих зерновок без экспериментальных воздействий, представляли контрольный вариант – К.

Половина проростков, полученных в культуре *invitro* и находящихся на стадии двух листочков (высота 6-9 см), подвергалась сенсibilизации с последующим облучением ультрафиолетом – УФ (вариант эксперимента – VC). Для сенсibilизации использовали композиционный состав: 5-БУ, БудР, аминобензосульфамид и ДМСО. Проростки длиной 6-9 см извлекали из пробирок и помещали на 1/3 их длины корнями вниз в сенсibilизирующий раствор на 22 часа при комнатной температуре. Затем их переносили в чашки Петри и облучали один час на лабораторной УФ-облучательной установке [2].

После облучения проростки отмывали 10 минут в проточной воде с последующей их высадкой в стаканчики с искусственной почвой «Биона 112» и дальнейшей культивацией в тепличных условиях. Гибель проростков при этом составила 5-8% в зависимости от генотипа.

Для выполнения второго этапа исследования была проведена гибридизация между лучшими УФ-рекомбинантами  $F_3$ , созданными на генетической основе сорта ячменя Дивосны и генетическими источниками устойчивости к мучнистой росе K-30930-*mlo*, (Saloon) и K-30224-*Imlo*<sub>10</sub>. Оценку их устойчивости к мучнистой росе проводили при искусственном заражении по методу M. Newton и V. Cherewick [3].

В фазу полной спелости был проведен биометрический анализ растений гибридных растений  $F_1$   $F_2$   $F_3$  и их родительских форм по высоте и элементам продуктивности. Влияние факторов и генотипическую специфичность оценивали по депрессивно-стимуляционному действию на развитие (DSX) и изменчивость ( $DS\delta^2$ ) количественных признаков: высоту растений и элементы продуктивности [4]. Для гибридных и рекомбинантных популяций рассчитывали показатели вариационного ряда [5], величину истинного гетерозиса или депрессии  $\Gamma$ -Д<sub>ист.</sub> % в  $F_1$  поколении [6], а также частоту проявления в  $F_2$  поколении положительных трансгрессий и степень выраженности у них количественных признаков [7].

Параллельно с этим идентифицировали наличие гена *mlo* при помощи ПЦР диагностики в ген-источниках и устанавливали факт передачи этого гена созданным рекомбинантным формам методом ПЦР анализа. Выделение тотальной ДНК из индивидуально взятых растений проводили по методу Edwards [1] в модификации Дорохова [2]. Анализ материнских форм и гибридных комбинаций F<sub>1</sub> показал, что культура *invitro* и УФ-облучение оказали достоверное депрессивно-стимуляционное действие, в зависимости от анализируемых признаков и генетического материала.

Биометрический анализ комбинаций по вариантам эксперимента показал, что самой высокорослой (95,3 см) была комбинация (Дивосны × К-24641)-V, а самой низкорослой (59,5 см.) – (Поспех × MMC), вариант VC. По общей кустистости (7,3 стебля) выделилась комбинация Поспех × К-24641, а по продуктивной кустистости (6,7 стебля) – (Дивосны × MMC), вариант VC. По длине колоса (9,0 см.) выделилась комбинация (Поспех × К-24641), вариант V, по числу зерен с колоса (26,9 шт.) – (Дивосны × К-24641)-V. По массе зерна с колоса (1,6 г.) выделилась комбинация (Поспех × К-24600)-VC, а по массе зерна с растения (7,1 г.) – (Дивосны × MMC)-VC. По массе 1000 зерен выделилась комбинация Дивосны × К-2930 (68,1 г).

Генотипическая специфика проявления гетерозисно-депрессивных эффектов у гибридов ячменя в F<sub>1</sub> поколении. Истинный гетерозис гибридов F<sub>1</sub> является наиболее объективным и корректным показателем селекционной ценности гибридов, по сравнению с гипотетическим и конкурсным гетерозисом. если, как в нашем случае, в качестве материнских форм берутся лучшие по урожайности, районированные и перспективные сорта.

Оценка уровня развития количественных признаков у гибридов F<sub>1</sub>, созданных на генетической основе сорта Дивосны, показала, что генотипическая специфика их выраженности проявилась как в гетерозисных, так и в депрессивных эффектах, в зависимости от анализируемого признака и генетического материала.

Так, интегрирующая оценка гетерозисно-депрессивных эффектов, рассчитанная как усредненное значение по всем признакам в пределах каждого блока комбинаций с сортом Дивосны, показала наличие слабой депрессии: от 1,1% по блоку VC и 5,7% в контрольном блоке, до 8,5% по блоку V.

Интегрирующая оценка отрицательного гетерозиса (депрессии) по всем комбинациям с сортом Гонар в пределах каждого блока показала наличие средней величины депрессии от 8,7 и 9,5% по блоку V и VC, до сильной депрессии 25,2% в контрольном блоке.

Интегрирующая оценка гетерозисно-депрессивных эффектов в комбинациях с сортом Поспех в пределах каждого блока показала, что по контрольному и VC блоку наблюдалась депрессия 6,4 и 2,9% соответственно, а по блоку V – гетерозис 2,3%.

Интегрирующая оценка гетерозисно-депрессивных эффектов у гибридов  $F_1$  в пределах контрольного блока показала, что лучшими компонентами скрещиваний были сорта Дивосны и Поспех, так как у гибридов с ними отмечена минимальная депрессия элементов продуктивности, а по крупности – значимый гетерозис. Сорт Гонар оказался не лучшим компонентом для создания гибридов, так как у них отмечена сильная депрессия по высоте растений и по элементам продуктивности.

Культура *invitro* оказала стимулирующее влияние на высоту растений, длину и массу зерна колоса, крупность зерна. На остальные признаки она оказала депрессивное влияние, а в целом показала интегрирующую легкую депрессию в развитии количественных признаков.

Среди гибридных комбинаций в блоке V, по интегрирующему показателю стимуляции-депрессии высоты растений и элементов продуктивности, в порядке очередности (возрастания) расположились комбинации, созданные с участием сорта Поспех ( $SX=2,3\%$ ), а затем – с сортами Дивосны и Гонар.

Наиболее благоприятное влияние культура *invitro* оказала на гибриды, созданные на генетической основе сорта Поспех. Относительно контрольного варианта, она оказала ингибирующее действие только на кустиность растений, все остальные признаки были стимулированы, и в целом данная культура вызвала довольно значимую их стимуляцию ( $\Sigma SX=8,8\%$ ).

Сенсибилизация и УФ-облучение гибридных комбинаций вызвало сильную депрессию числа зерен ( $D=21,3\%$ ) и, вероятно, вследствие этого, сильную стимуляцию крупности зерна ( $S=16,3\%$ ). В целом наиболее сильной депрессии подверглись комбинации, созданные с сортом Гонар ( $\Sigma DX=9,5\%$ ), а минимальной – с сортом Дивосны ( $\Sigma DX=1,1\%$ ).

Относительно контрольного варианта сенсибилизация и УФ-облучение оказали ингибирующее действие только на продуктивную кустиность растений, все остальные признаки были стимулированы, и в целом они вызвали довольно значимую их стимуляцию ( $\Sigma SX=9,1\%$ ). По сравнению с культурой *invitro* сенсибилизация практически не оказала никакого влияния ( $\Sigma SX=0,4\%$ ), однако в отношении признаков специфичности влияние было достаточно значимым: от депрессии 15,2% по числу зерен, до стимуляции 11,3% по крупности зерен.

Среди комбинаций в блоке ВС минимальную депрессию количественных признаков имели комбинации, созданные с участием сортов Дивосны и Поспех, и существенную депрессию – комбинации с участием сорта Гонар.

Ультрафиолетовое облучение сенсibilизированных ювенильных растений не оказало существенного влияния на выраженность количественных признаков у гибридных растений по сравнению с вариантом *invitro*. В отношении конкретных признаков облучение привело к увеличению длины колоса при снижении его озерненности и к значительному возрастанию крупности зерна.

В селекции новых форм растений наиболее важным является второе гибридное поколение, так как в этом поколении реализуются все возможности и весь потенциал формообразовательного процесса. Интенсивность формообразовательного процесса может определяться средними значениями анализируемых признаков, еще более информативно – их дисперсией, но наиболее важным показателем для практической селекции является трансгрессивная изменчивость. Определяли трансгрессии только по основным элементам продуктивности, так как определение положительных и отрицательных трансгрессий по высоте для современных сортов ячменя не имеют смысла.

Анализ влияния культуры *invitro* на уровень развития и изменчивость признаков у сорта Дивосны показал, что под влиянием культуры *invitro* практически не произошло существенного изменения средних значений элементов продуктивности, но их изменчивость увеличилась на 20-44%. Максимальную вариационную изменчивость имели такие признаки, как продуктивная кустистость и масса зерна с растения, а минимальную – высота растений и масса 1000 зерен, причем культура *invitro* усиливала изменчивость этих признаков.

Сенсibilизация и УФ-облучение проростков ячменя сорта Дивосны привела к незначительному снижению средних значений изученных признаков, что можно объяснить физиологически депрессивным действием применяемых факторов. Однако при этом существенно возросла дисперсия признаков, что является очень важной предпосылкой для проведения эффективного отбора по улучшению селективируемых признаков.

Биометрический анализ сенсibilизированной популяции ячменя сорта Дивосны выявил наличие положительно-измененных форм. В популяции, полученной после культуры *invitro*, частота измененных по количественным признакам форм была крайне низка (0,3%), в то время как в облученной популяции частота и степень их была значима и достигала соответственно 6 и 5%.

Анализ гибридных популяций  $F_2$ , созданных на материнской основе сорта Дивосны с использованием культуры *in vitro*, показал, что средние значения признаков в популяциях от лучших родительских форм достоверно не отличались, хотя их дисперсия в ряде случаев существенно превышала аналогичный показатель контроля (таблица).

В результате анализа и оценки 4 гибридных популяций  $F_2$  установлено, что культура *in vitro* незначительно меняет генетическую структуру гибридных популяций ни в отношении средних значений признаков, ни в отношении их изменчивости. Это является методической основой для использования эмбриокультуры *in vitro* как важного элемента селекционного процесса в целях его ускорения.

Таблица – Частота и степень проявления положительных трансгрессий в популяциях  $F_2$

| Комбинация<br>и вариант<br>опыта | Трансгрессий,<br>% | Признаки        |                |                          |                            |                        | $\Sigma X$ по<br>признакам |
|----------------------------------|--------------------|-----------------|----------------|--------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|
|                                  |                    | длина<br>колоса | число<br>зерен | масса<br>зерна<br>колоса | масса<br>зерна<br>растения | масса<br>1000<br>зерен |                            |
| Дивосны×<br>К-24641, V           | Tч                 | 5,6             | 4,77           | 5,7                      | 3,8                        | 5,7                    | 5,12                       |
|                                  | Tс                 | 2,76            | 5,88           | 12,87                    | 5,13                       | 4,86                   | 6,3                        |
| Дивосны×<br>К-24641, VC          | Tч                 | 7,47            | 8,41           | 9,35                     | 5,6                        | 8,4                    | 7,86                       |
|                                  | Tс                 | 4,55            | 8,96           | 15,67                    | 5,17                       | 6,24                   | 8,14                       |
| Дивосны×<br>К-24600, V           | Tч                 | 2,83            | 2,83           | 2,83                     | 1,88                       | 2,83                   | 2,6                        |
|                                  | Tс                 | 3,42            | 6,47           | 10,28                    | 6,45                       | 6,54                   | 6,6                        |
| Дивосны×<br>К-24600, VC          | Tч                 | 5,1             | 4,03           | 4,2                      | 3,45                       | 4,31                   | 4,2                        |
|                                  | Tс                 | 4,52            | 7,78           | 11,46                    | 7,73                       | 7,45                   | 7,8                        |
| Дивосны×<br>К-2930, V            | Tч                 | 3,77            | 3,78           | 3,78                     | 3,78                       | 4,72                   | 4,0                        |
|                                  | Tс                 | 4,11            | 7,76           | 13,88                    | 7,76                       | 7,12                   | 8,12                       |
| Дивосны×<br>К-2930, VC           | Tч                 | 6,69            | 7,7            | 6,7                      | 5,76                       | 8,65                   | 7,3                        |
|                                  | Tс                 | 6,82            | 11,55          | 18,14                    | 10,26                      | 10,73                  | 12,5                       |
| Дивосны×<br>ММС, V               | Tч                 | 5,11            | 4,07           | 4,17                     | 2,81                       | 4,21                   | 4,1                        |
|                                  | Tс                 | 3,98            | 6,52           | 7,69                     | 7,7                        | 5,26                   | 6,24                       |
| Дивосны×<br>ММС, VC              | Tч                 | 8,25            | 6,17           | 6,26                     | 6,42                       | 6,34                   | 6,7                        |
|                                  | Tс                 | 7,45            | 9,07           | 10,15                    | 10,88                      | 10,86                  | 9,7                        |

Более значительные изменения отмечены в популяциях, полученных после сенсibilизации. Средние значения признаков в этих популяциях были на уровне или ниже контрольных, причем депрессия варьировала от незначительных величин до существенных – 10 и более процентов, что можно объяснить физиологическим последствием экспериментальных воздействий. Самое важное заключалось в том, что дисперсия по изученным признакам возросла от 8 до 88%, что является важной предпосылкой для проведения эффективного отбора по улучшению признаков.

Для верификации выявленного эффекта были определены частота и степень положительных трансгрессий в изученных гибридных

популяциях  $F_2$ . Частота трансгрессий в популяциях, полученных через культуру *invitro*, как правило, существенно от контроля не отличалась, а в популяциях, полученных после сенсibilизации, резко возросла. Например, в популяции Дивосны×К-24641 максимальное значение частоты трансгрессий достигло 47%, а степени – 48%.

В целом интегрирующий показатель частоты и степени всех трансгрессий был максимальным в сенсibilизирующей популяции и превышал аналогичные показатели контроля в 1,4 и 1,6 раза.

Так, если в популяции  $F_2$  Дивосны×К-24600, полученной через культуру *invitro*, интегрирующая частота положительных трансгрессий практически идентична контролю, а их степень более, чем на 10% выше, то в сенсibilизированной популяции частота трансгрессий возросла на 60,6%, а степень на 39,7%, что соответственно больше в 1,7 и 1,3 раза, чем в контроле.

Анализ контрольной популяции  $F_2$  Дивосны×ММС показал, что интегрирующая частота и степень положительных трансгрессий составила соответственно 3,9 и 7,6% (таблица). В популяции, полученной через культуру *invitro*, частота трансгрессий была практически идентична контролю, но степень их выраженности возросла на 6,6%, в то время как в сенсibilизированной популяции частота положительных трансгрессий была выше аналогичного показателя контроля на 87,2%, а степень выраженности – на 50,4%.

Если интегрирующее значение частоты и степени выраженности положительных форм в популяции, полученной через культуру *invitro*, существенно не отличается от контрольного варианта, ( $SD_{T_4, T_6} = 0,9 - 4,6\%$ ), то в сенсibilизировано-облученной популяции эти значения соответственно составляют 60,4 и 47,0%, что в 1,6-1,5 раза выше аналогичных значений контрольного варианта.

**Заключение.** В результате исследований выявлены родительские формы (Дивосны и Песпех) и гибридные комбинации  $F_1$  (Дивосны×К-24641, Дивосны×К-2930, Песпех×К-24641 и Песпех×К-24600), представляющие селекционную ценность, как обладающие минимальными депрессивными и максимальными гетерозисными эффектами по высоте растений и основным элементам продуктивности.

Использование эмбриокультуры *invitro* позволяет ускорить получение гибридов  $F_1$  и зерен  $F_2$  в два раза.

Сенсibilизация и УФ-облучение гибридов  $F_1$  является эффективным способом усиления генетического разнообразия и индукции положительных трансгрессий, родоначальников новых селекционных форм.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Литун, П.П. Принципы селекции гибридов кукурузы // Экологическая генетика, растений, животных, человека. Тез. докл. 2 науч. конф. – Кишинев, 1984. – 209–210 с.
2. Шишлов, М.П. Индуцированный мутагенез и рекомбинаогенез сельскохозяйственных растений / М.П. Шишлов // Наука и инновации. – 2009. – №7. – 29–33 с.
3. Ригина, С.И. Изучение устойчивости ячменя к инфекционным заболеваниям / С.И. Ригина // Автореф. дисс. на соиск. уч. степени к.б.н. Л. – 1996. – 19 с.
4. Шишлов, М.П. Индуцированный мутагенез и рекомбинаогенез ячменя и овса / М.П. Шишлов – Минск: «ИВЦ Минфина», 2004. – 179 с.
5. Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий. – Минск: Наука и техника, 1973. – 229 с.
6. Гуляев, Г.В., Мальченко, В.В. Словарь терминов по генетике, цитологии, селекции и семеноводству / Г.В. Гуляев. – М. Россельхозиздат, 1975. – 216 с.
7. Воскресенская, Г.С., Шпота, В.И. Трансгрессия признаков у гибридов Brassica и методы количественного учета этого явления / Г.С. Воскресенская // Доклады ВАСХНИЛ. – 1967. – № 7. – 18–20 с.