

ISSN 1999-9127

Государственное научное учреждение
**«ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЛОГИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»**

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 8**

Издается с 2005 года
Выходит два раза в год

Минск
2008

УДК [577.21 + 575] (082)

ИЗДАНИЕ посвящено 80-летию НАН БЕЛАРУСИ

Редакционная коллегия:

А.В. Кильчевский — главный редактор, Л.В. Хотылева — зам. главного редактора;
К.У. Вильчук, С.И. Гриб, О.Г. Давыденко, А.Н. Евтушенков, А.П. Ермишин,
М.А. Кадыров, Н.В. Казаровец, Н.А. Картель, А.И. Ковалевич, Г.И. Лазюк,
В.А. Лемеш, С.А. Лихачев, Н.П. Максимова, С.Б. Мельнов, М.Е. Михайлова,
И.Б. Моссэ, М.Е. Никифоров, В.Е. Падутов, В.Н. Решетников, Е.А. Сычева,
В.В. Титок, И.П. Шейко, О.Н. Харкевич — члены редколлегии;
И.В. Широкая — ответственный секретарь.

Рецензенты:

Л.В. Хотылева, академик, д.б.н., проф.,
ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»;
Н.А. Картель, академик д.б.н., проф.,
ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»;
С.И. Гриб, академик д.с.-х.н., проф.,
РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию».

М75 Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редколл.: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. — Минск: Право и экономика, 2008. — 175 с. — ISBN 978-985-442-581-8.

В сборнике научных трудов публикуются обзорные и экспериментальные статьи в области молекулярной и прикладной генетики растений, микроорганизмов, животных, человека, отражающие исследования генетических процессов на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях. Особое внимание уделяется наиболее актуальным проблемам геномики, генетической и клеточной инженерии. Публикуются результаты изучения генетических основ селекции растений, животных и микроорганизмов, разработки эффективных биотехнологий для сельского хозяйства, здравоохранения, охраны окружающей среды, биобезопасности.

Текущий выпуск сборника посвящен, в частности, вопросам использования эффекта гетерозиса как средства повышения потенциала продуктивности сельскохозяйственных культур; ряд статей содержит обширный исследовательский материал, объясняющий генетическую основу гетерозиса.

Сборник предназначен для специалистов, работающих в области генетики, преподавателей, аспирантов и студентов ВУЗов биологического и сельскохозяйственного профиля.

УДК [577.21 + 575] (082)
ISSN 1999-9127

ISBN 978-985-442-581-8

© ГНУ «Институт генетики
и цитологии НАН Беларуси», 2008

СОДЕРЖАНИЕ

<i>А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева, Л.А. Тарутина, М.Н. Шаптуренко</i> Гетерозис в селекции сельскохозяйственных растений	7
<i>А.В. Кильчевский, М.М. Добродькин, В.В. Скорина, О.Г. Бабак, Л.Г. Коготько, Е.Ю. Иванцова, Л.В. Хотылева Л.А. Тарутина, Л.А. Мишин</i> Генетические основы селекции томата на гетерозис	25
<i>И.А. Гордей, С.И. Гордей, Э.П. Урбан</i> Генетические основы селекции гибридных сортов ржи (<i>Secale cereale</i> L.).....	40
<i>Т.А. Силкова, Н.С. Фомченко, О.Г. Давыденко</i> Основные результаты селекции гибридного подсолнечника <i>Helianthus annuus</i> L. в Республике Беларусь	52
<i>Л.П. Шиманский, С.И. Мустяца, В.Н. Туровец, Е.Л. Долгова</i> Зародышевая плазма самоопыленных линий кукурузы в селекции на гетерозис.....	58
<i>Я.Э. Пилюк, В.В. Зеленьяк, А.В. Бакановская</i> Использование гетерозиса в селекции рапса	65
<i>Д.В. Лужинский</i> Генетические основы и результаты практической селекции гибридов кормовой свеклы (<i>Beta vulgaris</i> L.) полусахарного типа в Беларуси	73
<i>В.В. Титок</i> Биоэнергетическая концепция гетерозиса	81
<i>В.А. Лемеш</i> Молекулярные маркеры в изучении генетических ресурсов льна	94
<i>Н.И. Дубовец, Е.А. Сычева, Л.А. Соловей, Т.И. Штык, Е.Б. Бондаревич</i> Рекомбинантный геном как источник внутривидовой дивергенции полиплоидных злаков	105
<i>О.Ю. Урбанович, Т.А. Гашенко, Е.А. Заблоцкая, З.А. Козловская, Н.А. Картель</i> Результаты отбора гибридных семян яблони на устойчивость к парше фитопатологическими и молекулярными методами	113
<i>Е.В. Исаенко, Н.А. Картель</i> Повышение устойчивости растений картофеля к колорадскому жуку путем трансгеноза ДНК-последовательностью <i>cry3Am</i>	120
<i>О.И. Зайцева</i> Образование андрогенных структур и растений-регенерантов в культуре пыльников <i>in vitro</i> ярового тритикале (\times <i>Triticosecale</i> WITTM) в зависимости от условий выращивания и способов обработки колосьев	127
<i>И.Б. Саук, В.С. Анохина, М.К. Тимошенко, И.Ю. Цибульская, Е.А. Брыль</i> Морфогенетические и биохимические исследования коллекции желтого и узколистного люпина	133

<i>В.С. Анохина, Л.Н. Каминская, И.Ю. Цибульская</i> Алкалоиды люпина: их фунгицидные эффекты	138
<i>Н.П. Максимова, Е.А. Храмова, И.Н. Феклистова, Ю.М. Кулешова,</i> <i>С.С. Жардецкий, Е.Г. Веремеенко</i> Генетические подходы к созданию штаммов-продуцентов биологически активных соединений на основе ризосферных бактерий <i>Pseudomonas</i>	143
<i>М.Е. Михайлова, Е.В. Белая, Н.М. Волчок, Н.А. Камыш, В.А. Машеро</i> Генетико-популяционные аспекты возникновения и распространения врожденных дефектов у крупного рогатого скота в Республике Беларусь	152
<i>М.Е. Михайлова, Е.В. Белая, Н.В. Казаровец, Н.М. Волчок, Н.А. Камыш</i> Генетическое маркирование признаков молочной продуктивности крупного рогатого скота	160
Рефераты	167
Правила оформления статьи	175

CONTENTS

<i>A. Kilchevsky, L. Khotyleva, L. Tarutina, M. Shapturenko</i> Heterosis in breeding of agricultural plants.....	7
<i>A. Kilchevsky, M. Dobrodkin, V. Skorina, O. Babak, L. Kogotko, E. Ivantsova, L. Hotyleva, L. Tarutina, L. Mishin</i> Genetic principles of tomato breeding for heterosis.....	25
<i>I. Hardzei, S. Hardzei, E. Urban</i> Genetic foundations of hybrid rye (<i>Secale cereale</i> L.) breeding.....	40
<i>T. Silkova, N. Fomchenko, O. Davydenko</i> Basic results of hybrid sunflower (<i>Helianthus annuus</i> L.) breeding in the republic of Belarus.....	52
<i>L. Shimansky, S. Mustyatsa, V. Turovets, E. Dolgova</i> Germ plasm of self-pollinated maize lines in breeding for heterosis.....	58
<i>Ya. Pilyuk, V. Zelianiak, A. Bakanoyskaya</i> Use heterosis in rape breeding.....	65
<i>D. Luzhinski</i> Genetic principles and practical breeding results of fodder sugar beet (<i>Beta vulgaris</i> L.) of semi-sugar type hybrids in Belarus.....	73
<i>V. Titok</i> Bioenergy heterosis conception.....	81
<i>N. Dubovets, Ye. Sycheva, L. Solovey, T. Shtyk, Ye. Bondarevich</i> Recombinant genome as a source of intraspecific divergence of polyploidy cereals.....	94
<i>V. Lemesh</i> Molecular markers in study on flax genetic resources.....	105
<i>O. Urbanovich, T. Hashenka, A. Zablotzkaya, Z. Kazlouskaya, N. Kartel</i> Results of screening among the hybrid apple seedlings for scab resistance by means of phytopathological and molecular methods.....	113
<i>I. Isayenko, N. Kartel</i> Improvement of potato resistance to colorado potato beetle by transfer of the <i>cry3aM</i> gene.....	120
<i>O. Zaitseva</i> Analysis of the effect of growth conditions and spike treatment methods on formation of androgenic structures and regenerant plants in anther culture <i>in vitro</i> in spring Triticale (\times <i>Triticosecale</i> WITTM).....	127
<i>I. Sauk, V. Anokhina, M. Timoshenko, I. Tsibulskaya, A. Bryl</i> Morphogenetic and biochemical studies of yellow lupin and blue lupine collection.....	133

<i>V. Anokhina, L. Kaminskaya, I. Tsibulskaya</i> Lupine alkaloids: their fungicidal effects	138
<i>N. Maximova, E. Khramtsova, I. Feklistova, Y. Kuleshova, S. Zhardzetski, E. Veremeenko</i> Genetics approaches to construction of the biological active compound overproducers on the base of rhizospheric bacteria <i>Pseudomonas</i>	143
<i>M. Mikhailova, E. Belaya, M. Volchok, N. Kamysh, V. Mashero</i> Genetic and population aspects of emergence and occurrence of hereditary defects in cattle in Belarus	152
<i>M. Mikhailova, E. Belaya, M. Volchok, N. Kazarovets, N. Kamysh</i> Genetic marking of milk productivity traits in cattl	160
Summuries	167
Instructions to authors	175

ГЕТЕРОЗИС В СЕЛЕКЦИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Гетерозис как феномен превосходства гибридов первого поколения над родительскими формами по степени развития какого-либо признака впервые был открыт членом Петербургской академии наук И.Г. Кельрейтером (1766 г.) при гибридизации различных видов табака. Классические работы Ч. Дарвина показали полезность перекрестного опыления и снижение продуктивности растений при самоопылении. Впервые термин «гетерозис» был введен Дж. Шеллом в 1911 г. Обычно выделяют понятия «истинный» и «гипотетический» гетерозис. Под «истинным» гетерозисом понимается превосходство гибрида над лучшим из родителей по изучаемому признаку; через «гипотетический» гетерозис выражается превосходство гибрида над средним значением признака у обоих родителей.

Практики используют также термин «конкурсный гетерозис» как превосходство гибрида в сравнении с другими гибридами при их испытании, но вряд ли это оправдано, поскольку природа такого превосходства не связана с преимуществом гибрида над исходными формами.

К. Мазер и Дж. Джинкс [1] считают целесообразным использовать термины «положительный» и «отрицательный» гетерозис. В первом случае разница между гибридом и родителем с максимальным значением признака – положительная величина ($F_1 - P_1 > 0$). Во втором случае разница между гибридом и родителем с минимальным значением признака – отрицательная величина ($F_1 - P_2 < 0$). Такое деление вполне оправдано, поскольку не всегда целью селекционера является увеличение значения признака. В ряде случаев хозяйственный интерес представляют гибриды с минимальным значением признака как следствием отрицательного гетерозиса. К числу таких признаков можно отнести длину вегетационного периода в селекции на скоро-

спелость, высоту растения в селекции на короткостебельность, накопление поллютантов (нитраты, радионуклиды, тяжелые металлы и др.) в селекции на экологически безопасное качество и т.д.

А. Gustafson [2] предложил различать три типа гетерозиса в зависимости от характера его проявления у гибридов: соматический – более мощное развитие вегетативных органов растения, репродуктивный – более интенсивное развитие репродуктивных органов, приводящее к повышенному урожаю семян, плодов, адаптивный – повышение приспособленности гибридов к условиям среды, их конкурентоспособность в борьбе за существование.

Th. Dobzhansky [3] на основании экспериментов с дрозофилой развил представление об эугетерозисе («настоящем» гетерозисе) и «пышности». Первый является результатом взаимодействия блоков генов, создаваемых в процессе естественного отбора в инвертированных участках хромосом. Под «пышностью» понимается ненормальный мощный рост гибридов, который может быть использован человеком, но не имеет адаптивного значения.

Существуют различные гипотезы, объясняющие генетическую основу гетерозиса (доминирования, сверхдоминирования, генетического баланса и др.).

Гипотеза доминирования была предложена С.В. Davenport [4], а затем развита D.F. Jones [5]. Н.В. Турбин [6, 7] обобщил концепцию доминантных благоприятных факторов в гетерозисном эффекте и выделил три возможных направления действия доминантных генов: подавляющее действие доминантных факторов в отношении вредных рецессивов, являющееся разновидностью аллельного взаимодействия, аддитивный эффект доминантных факторов, неаллельное взаимодействие (эпистаз). Такой

подход также не может объяснить ряд эффектов, сопутствующих гетерозису. К примеру, установлено, что между комбинационной способностью линий и их характеристикой *per se* не всегда существует тесная связь, что можно было бы предположить на основе теории доминирования.

Гипотеза сверхдоминирования, предложенная в начале 20-го века G. Shull [8] и E. East [9], объясняет явление гетерозиса преимуществом гетерозиготы A_1A_2 над гомозиготами A_1A_1 и A_2A_2 . Предполагается, что в этом случае обе аллели выполняют несколько различные функции и взаимно дополняют друг друга.

Таким образом, эффект сверхдоминирования можно рассматривать как комплементарное взаимодействие аллелей в пределах одного локуса. Такой взгляд получил подтверждение в экспериментах по моногибридному гетерозису при скрещиваниях двух линий, различающихся только в одном локусе [2, 10, 11]. Согласно гипотезе сверхдоминирования максимальный гетерозис достигается, как правило, при скрещивании неродственных особей при гетерозиготном состоянии большинства локусов, а степень проявления гетерозиса зависит от функциональных различий аллелей каждого локуса. K. Mather [12], а затем Н.В. Турбин [6] разработали теорию генетического баланса, согласно которой гетерозис – это суммарный эффект фенотипически сходного действия разнородных генетических процессов. Концепции доминирования и сверхдоминирования можно рассматривать как важные фрагменты общей теории гетерозиса, дополняющие друг друга.

В.А. Струнниковым [13] разработана концепция гетерозиса, согласно которой гетерозис возникает у гибридов от линий, обладающих достаточно большим числом аддитивно действующих благоприятных генов при погашении рецессивных леталей и полулеталей. При наличии у линий рецессивных полулеталей в процессе длительной селекции возникает комплекс благоприятных генов, уравновешивающий негативное действие рецессивного гена на жизнеспособность. При гибридизации таких линий проявляется положительное действие компенсационного комплекса генов и снимается отрицательное действие рецессивных генов, в результате чего возникает гетерозис.

Одной из возможных причин гетерозиса является межаллельное взаимодействие (эпи-

стаз). Как известно, существуют три основные формы эпистатического взаимодействия генов – аддитивно-аддитивный, аддитивно-доминантный и доминантно-доминантный эпистаз.

C.J. Goodnight [14] провел анализ роли эпистаза в проявлении гетерозиса и показал, что при аддитивно-доминантном и доминантно-доминантном эпистазе изменяется проявление гетерозиса в отдельном локусе, т.е. внутрислокусный гетерозис является функцией генетического фона.

Изучая связь гетерозиса с неаллельными взаимодействиями генов, нами было установлено, что, хотя и существует корреляция между этими двумя явлениями, тем не менее, гетерозис может проявляться и при отсутствии неаллельного взаимодействия. Убедительно подтверждают это результаты анализов компонентов гетерозиса по ряду количественных признаков у гибридов кукурузы [15]. Было показано, что в тех случаях, когда положительный гетерозис проявлялся в присутствии неаллельного взаимодействия, то оно было дубликатного типа. Комплементарный тип эпистаза не встречался ни у одного из проанализированных гибридов. Подобные закономерности встречаются крайне редко. В литературе, если и отмечается связь между высоким и положительным гетерозисом и неаллельным взаимодействием, то, как правило, это взаимодействие бывает комплементарного типа, что и нашло подтверждение при изучении диаллельных гибридов F_1 тепличного томата и перца сладкого [16, 17, 18]. В генетическом контроле признаков, определяющих урожай плодов, присутствовал эпистаз комплементарного типа, обусловленный одной или несколькими родительскими формами. Однако уровень гетерозиса, наблюдаемого у разных гибридов с участием этих форм, не всегда находится в прямой зависимости от эпистаза. Было показано, что высокие оценки доминирования, равно как и присутствие неаллельного взаимодействия, не всегда сопровождаются более высоким гетерозисом. Вероятно, все три типа генного действия (аддитивность, доминирование, эпистаз) совместно управляют конечным выражением гетерозисного эффекта, и гетерозис не может быть объяснен действием какой-либо одной генетической причины, каким-либо одним ти-

пом взаимодействия генов. Гетерозис следует рассматривать как суммарный эффект фенотипически сходного действия разнородных генетических процессов, и, по-видимому, в основе разных форм проявления гетерозиса лежат разные генетические причины [6, 7].

Важную роль в проявлении гетерозиса играет наличие генетической дивергенции между исходными формами. В настоящее время для анализа генетической дивергенции широко применяются методы молекулярного маркирования (RFLP, RAPD, AFLP, SSR), что позволяет сгруппировать изучаемый материал по степени генетического родства. А.Е. Melchinger [19] изучил возможность использования молекулярных маркеров для гетерозисной селекции на примере ряда культур (пшеница, рис, рапс, бобы) и показал, что ДНК маркеры эффективны в установлении генетических различий между изучаемыми генотипами, группировке и классификации исходного материала и выборе родителей для создания базовых популяций в гетерозисной селекции. Автором показано, что ДНК-маркеры могут применяться для идентификации групп генетически сходных генотипов, однако эффект гетерозиса не может быть предсказан на основе генетических расстояний с использованием ДНК-маркеров. Для этой цели необходимо применять полевые эксперименты.

Гетерозис, как феномен превосходства гибрида над родителями по изучаемому признаку, проявляется в конкретных условиях среды и подвержен явлению взаимодействия генотипа и среды. При изучении родителей и гибридов в различных условиях среды тип наследования в конкретной гибридной комбинации может изменяться в широких пределах. Причина этого – выявленное В.А. Драгавцевым [20, 21] явление переопределения генетической организации количественных признаков. Автором показано, что при смене лимитирующих факторов происходит смена спектра локусов, детерминирующих развитие признака, а также смена спектра модулей – элементарных единиц описания организации системы количественного признака. В связи с этим селекция на гетерозис, как и любая иная селекционная схема, должна быть экологически целенаправлена на конкретную совокупность сред (почвенно-климатические

и агротехнические условия возделывания в предполагаемом регионе использования сорта, специфика распространения патогенов и вредителей в регионе, а также чередование абиотических стрессов в онтогенезе).

R.E. Comstock [22] разработал концепцию целевой популяции (совокупности) сред (target population of environments–TPE), которая является реализацией принципа экологической целенаправленности селекционного процесса. Автор высказал предположение о том, что каждая программа периодического отбора должна соответствовать определенной TPE. Австралийские исследователи М. Соорег и D.W. Podlich [23] развили методологию гетерозисной селекции в TPE и провели компьютерное моделирование такой селекции в зависимости от уровня доминирования (неполное, полное, сверхдоминирование) и типа взаимодействия. Ими развито представление о многосредовых испытаниях (multi-environment trials–MET) как выборке сред из TPE для оценки генотипов и показана связь эффективности отбора для TPE в MET

$$\Delta G_T = i_m h_m h_t r_{g(MT)} \sigma_{p(m)},$$

где h_m и h_t – квадратные корни наследуемости в MET и TPE соответственно; $r_{g(MT)}$ – генетическая корреляция между результатами MET и TPE, $\sigma_{p(m)}$ – квадратный корень средней фенотипической дисперсии при оценке каждой из них в MET, i_m – стандартизированный селекционный дифференциал.

Таким образом, эффективность отбора для TPE зависит от правильности выбора MET, что определяется теснотой связи по $r_{g(MT)}$. Авторами показано, что при сильном взаимодействии генотип–среда эффективность селекции на гетерозис для TPE снижается, а при ограниченной выборке MET может происходить дизруптивная селекция (специфическая адаптация к определенным наборам сред). Последнее выгодно только в предсказуемых условиях среды (почвенные условия региона и т.п.). Если взаимодействие генотип–среда связано с непредсказуемыми условиями, то целесообразно создавать гибриды с широкой адаптацией. Авторы развили концепцию «взвешенной селекционной стратегии», суть которой сводится к тому, что MET должна обе-

спечивать максимальное приближение к ТРЕ, что приводит к максимальной эффективности селекции на гетерозис. Последнее особенно важно в ранних поколениях, когда испытание большого количества генотипов проводится в небольшом количестве сред.

Для оценки адекватности условий МЕТ относительно ТРЕ можно использовать предложенную А.В. Кильчевским [24] концепцию основных совокупностей сред в селекционном процессе:

1) совокупность сред должна моделировать разнообразие предсказуемых и непредсказуемых условий производства в том регионе, для которого ведется отбор;

2) схема селекционного процесса должна позволять вести оценку не только среднего значения генотипа, но и его экологической стабильности, а также давать возможность анализировать и оптимизировать параметры среды как фона для отбора;

3) в селекционном процессе должен быть реализован принцип экологической направленности на конечную совокупность сред – производственные условия региона, где будет возделываться сорт. Для этого можно использовать 3-4 сорта-тестера на всех этапах селекции.

По мере изучения явления гетерозиса накапливалась информация о механизмах его проявления на различных уровнях (молекулярном, биохимическом, физиологическом, клеточном, организменном). Рядом авторов показано, что гетерозисные гибриды получают при гибридизации родителей, разнокачественных по биохимическим показателям: содержанию жира, общего и белкового азота, минерального и органического фосфора, сахара, декстринов, крахмала [25].

Важным процессом, обеспечивающим реализацию гетерозиса у гибридов, является снижение уровня метилирования ДНК у гибридных организмов, что обеспечивает активизацию генов [26, 27]. А.С. Tsiftaris et al. [27] установили, что в стрессовых условиях уровень метилирования может повышаться, подавляя экспрессию генов в геноме, однако действие стресса на метилирование ДНК сильнее сказывается у инбредных организмов, чем у гибридов.

Возможный механизм проявления гетерози-

са на молекулярном уровне – межallelная комплементация и образование молекулярной гетерогенности ферментов растений. Одним из первых сделал предположение о связи между сверхдоминантностью и межallelной комплементарностью Дж. Финчем [28]. Гипотеза предполагала преимущество «гибридных» белков в гетерозиготе в сравнении с гомомультимерами гомозигот. По современным представлениям многие ферменты состоят из нескольких полипептидов, кодируемых отдельными аллельными и неаллельными генами. Такие полипептиды могут соединяться в гомополимеры и гетерополимеры, и отдельные ферменты могут существовать в виде серии полимеров разного размера, например, ди-, тетрамеров и т.д. [29]. В результате образуется ряд изоферментов, отличающихся физико-химическими свойствами.

Рядом авторов обнаружен молекулярный гетерозис в одном локусе, связанный с активностью ферментов: алкогольдегидрогеназы у кукурузы [30], глутаматдегидрогеназы у кукурузы [31], алкогольдегидрогеназы у дрожжей [32].

Н.К. Srivastava [33] считал, что гибриды в сравнении с инбредными организмами отличаются более сбалансированным метаболизмом на клеточном и органельном уровне, главная причина которого – неаллельная комплементация генов. Согласно D.de Vienne, F. Rodolphe [34] межallelная комплементация обеспечивает образование гетерополимеров, которые обладают повышенной активностью. G.C. Leonardi et al. [35] связали полиморфизм по сумме протеинов с полевой характеристикой простых гибридов кукурузы и показали, что такая связь существует, причем степень полиморфизма может использоваться как молекулярный индикатор гетерозиса.

На первой Международной конференции по гетерозису в 1952 г. в Мексике G.G. Mangelsdorf [36] предложил для объяснения физиологических причин гетерозиса концепцию лимитирующих факторов или физиологических «узких мест» (bottleneck – горлышко бутылки). Согласно этой концепции в каждый момент жизни физиологические процессы любого, даже наиболее жизнеспособного организма ограничены

лимитирующими факторами (физиологическими узкими местами). Такие узкие места возникают в результате взаимодействия конкретных локусов генотипа со средой. Узкие места могут быть ослаблены или устранены путем оптимизации лимитирующих факторов среды или путем замены аллеля в локусе на более эффективный аллель. Гибриды превосходят инбредные линии потому, что у них уменьшается число узких мест. Поскольку инбредные линии различаются по наличию узких мест, при гибридизации может происходить их взаимная компенсация и проявляется эффект гетерозиса. Эта концепция хорошо объясняет гетерозис как эффект проявления взаимодействия гибридного генотипа с конкретной средой.

R.H. Nageman et al. [37] предложили концепцию метаболического баланса для объяснения эффекта гетерозиса. Согласно этой концепции, признаки развиваются как результат биохимических реакций, каждая из которых управляется одним или более специфическими ферментами. Эффект гетерозиса проявляется в координации всех реакций и систем для эффективного роста в данной среде. Концепция дополняется следующими элементами:

1) инбредные линии у кукурузы могут иметь несбалансированные метаболические системы с ферментами, контролирующими различные уровни активности (от высокого до низкого);

2) у высокоинбредных линий некоторые важные ферментативные реакции могут сильно подавляться;

3) инбредные линии могут различаться по ограничениям, связанным с эффективностью ферментов и при успешном выборе комплементарных родительских линий может быть получен гибрид со сбалансированной системой метаболизма.

Концепция R.H. Nageman et al. близка к концепции A.G. Mangelsdorf.

Концепция комплементации биохимических систем связывает воедино гипотезы доминирования и сверхдоминирования, поскольку она основана на взаимодействии множественных аллелей и межгенной комплементации, в результате чего происходит усиление биохимических процессов.

Белорусскими генетиками [38, 39] предложен биоэнергетический подход к анализу явления гетерозиса. В.В. Титок [39] сформулировал основные положения биоэнергетической концепции гетерозиса, согласно которой гетерозис обусловлен биоэнергетическим балансом, возникающим в гетерозиготном состоянии при снятии генетического блокирования за счет компенсаторного действия геномов родительских форм, несущих сегрегированные локусы «узких мест» энергетического метаболизма. Положительная комплементация между фотосинтезом и различными звеньями дыхательного метаболизма обуславливает увеличение эффективности энергообмена, его стабильности и приводит к гетерозису. Автором выявлена взаимосвязь между активностью биоэнергетических процессов на ранних этапах онтогенеза и эффектами общей комбинационной способности по продуктивности у кукурузы, томата, люпина желтого и льна-долгунца. Показано, что гетерозис обусловлен высокой сбалансированностью активности функционирования основных энергообразующих систем (фотосинтез, фосфорилирование, окислительное фосфорилирование, гликолиз, пентозофосфатный путь, цикл трикарбоновых кислот) и ростовых процессов в ходе онтогенеза.

Рядом авторов выявлено, что гетерозисные гибриды отличаются от исходных форм по митотической активности [40, 41, 42], активности фотосинтеза [43, 44, 45, 46, 47, 48], активности митохондрий и пластид [49, 50, 51], содержанию эндогенных регуляторов роста [52, 53].

Исследована эффективность использования биохимических характеристик в предсказании генетического потенциала исходного материала у перца сладкого на основе термогравиметрического анализа запасных компонентов семян [54]. Одним из критериев, позволяющих оценить гетерогенность химического состава запасных компонентов семян служила энергия активации. Оценивали потерю массы образцов и энергию активации на этапах сгорания: 230-300°C (деструкция протеинов), 350-450°C (деструкция жирных кислот), 470-600°C (деструкция свободных нуклеотидов и нуклеиновых кислот).

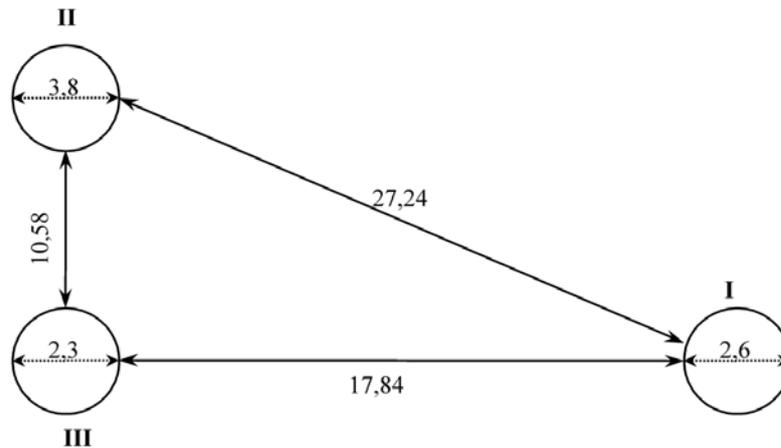


Рис. 1. Трёхкластерная модель гетерогенности коллекции перца сладкого, построенная по данным анализа К-средних с минимизацией внутригрупповых дистанций (*Statistica*, 99).

На основе полученных данных коллекции селекционных образцов перца сладкого была расклассифицирована методом Ward и разделена на три группы на основе минимизации внутрикластерной изменчивости с использованием программного пакета Statistica (Рис. 1). Оценка эффекта гетерозиса у гибридов, полученных в межгрупповых скрещиваниях, показала, что использование

в гибридизации одной из линий первой группы позволяет получать высокогетерозисное потомство. При межкластерных скрещиваниях линий второй и третьей групп, в которых дистанции не превышают 10 геометрических величин (евклидовы расстояния) значимых положительных эффектов не обнаружено. Полученные данные подтверждены корреляционным анализом (Рис. 2).

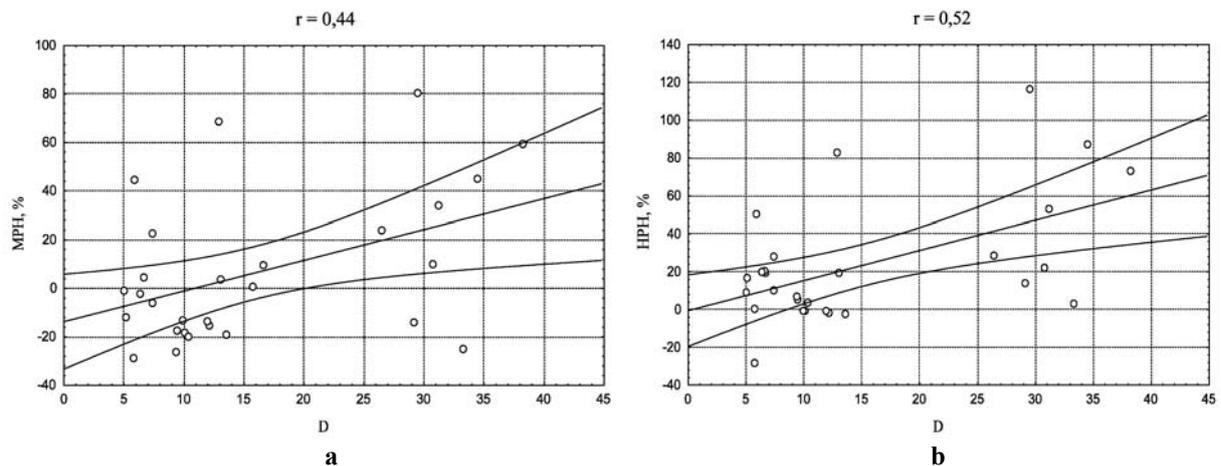


Рис. 2. Геометрическое изображение линейной корреляционной связи величины генетических дистанций родительских форм перца сладкого и эффекта гетерозиса гибридов F_1 , рассчитанных на основе данных термогравиметрического анализа для: (a) гипотетического (МРН – mid parents heterosis), (b) истинного (НРН – high parents heterosis) гетерозиса.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу возможности использования кинетических показателей термодеструкции семян перца сладкого для анализа гетерогенности исходного селекционного материала и создания гетеротических групп.

Новые перспективы в исследовании эффекта гетерозиса раскрывают современные методы молекулярной генетики, которые позволяют изучать вариабельность отдельных участков ДНК и исследовать структурную и неструктурную зоны

генома. Изменчивость на этом уровне во много раз выше, чем ее фенотипическое проявление.

В настоящее время ведутся обширные исследования, направленные на поиск марке-

ров, сцепленных с гетерозисом. На различных культурах с использованием разных типов ДНК-маркеров получены разноречивые результаты (Табл. 1).

Таблица 1

Сопряженность генетической дивергенции (GD) с величиной гипотетического гетерозиса (МРН – mid-parent heterosis) для некоторых сельскохозяйственных культур.

Вид	N*	r	DNA маркер	Исследователи
Кукуруза	123	0,87	RFLP	Smith O. et al., 1990
	148	0,6	RFLP	Benchimol L. et al., 2000
	40 ⁺⁺	0,83	RFLP	
	80 ⁺	0,19	RFLP	
Перец сладкий	21	-0,14	AFLP	Geleta L.F et al., 2004
Рапс	21	0,58	RFLP	Diers B. et al., 1996
	178	0,36 – 0,49	AFLP	Shen J. et al., 2006
Горчица	24 ^{+/++}	0,42	RAPD	Jain A. et al., 1994
Капуста белокочанная	42	0,3	RAPD	Шаптуренко М. и др., 2008 (не опубликовано)
Рис	70	0,33	SSR	Renming Z. et al., 2005
	28 ^{+/++}	0,47	RFLP+SSR	Maroof S. et al., 1997
	21 ⁺	-0,15	RFLP+SSR	
	45	0,56	SSR	Cho Y. et al., 2004
	45	0,02	RAPD	
99	0,57 (для ОКС)	SSR	Xiao C.Liu & J.L.Wu, 1998	
Соя	48	0,08	RFLP	Cerna F. et al., 1997
Сорго	162	0,42	RFLP	Jordan D. et al., 2003
Подсолнечник	42	0,21	AFLP	Cheres M. et al., 2000
	81	0,76	AFLP	
	36	0,21	RAPD	Сиволап Ю. и др., 1998
Пшеница	21	0,33	RFLP	Martin J. et al., 1995
	42	-0,20	RFLP	Perenzin M. et al., 1998
	42	0,18	RAPD	
	100	0,07	RFLP	
	100	0,12	RAPD	
	56	0,35	RAPD	
	63	-0,3	RAPD	Шаптуренко М. и др., 2004

Примечание. * N – число гибридных комбинаций;

⁺ скрещивания между неродственными линиями, принадлежащими одному генному пулу / гетеротической группе;

⁺⁺ скрещивания между линиями, принадлежащими разным генным пулам / гетеротическим группам.

Основываясь на опубликованных данных по кукурузе, А. Melchinger [55] суммировал взаимодействие величины генетических дистанций (GD)

и гипотетического гетерозиса (МРН) и заключил, что их сопряженность (GD–МРН) уменьшится, если маркеры, используемые для вычисления GD,

не связаны с QTL (quantitative trait loci). Следовательно, GD оценка, основанная исключительно на произвольном наборе DNA маркеров не перспективна для предсказания продуктивности гибридов F_1 или любого из ее компонентов.

Н. Becker & W. Link [56], обсуждая вопрос оптимизации гетерозисной селекции,

модифицировали схему предложенную А. Melchinger (Рис. 3) и заключили, что: (1) существуют максимальные внутрипуловые дистанции, которые должны быть идентифицированы, (2) существует оптимум межпуловых дистанций, который не должен быть превышен.

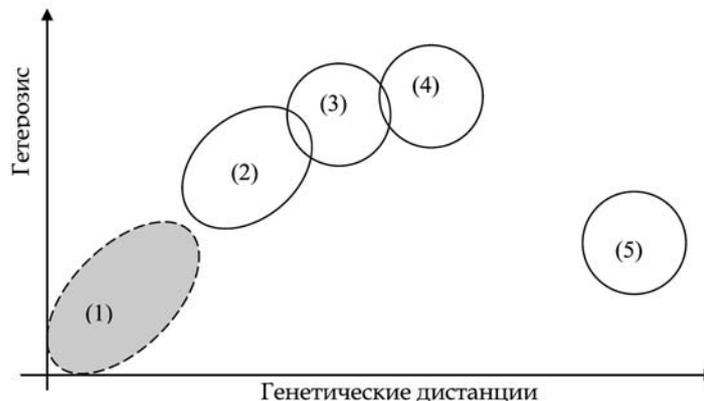


Рис. 3. Схематическое представление связи между гипотетическим гетерозисом для урожая и генетической дивергенцией, оцененной с помощью неселективных DNA маркеров: (1) скрещивания между родственными линиями; (2) внутригрупповые скрещивания между неродственными линиями, принадлежащими к одному генному пулу; (3) – (5) скрещивания между линиями, принадлежащими разным генным пулам (Н. Becker & W. Link, 2000).

Следовательно, гетерозис при отдаленной гибридизации и большом генетическом расстоянии родительских форм может и не проявляться в связи с несбалансированным функционированием геномов в гибридном генотипе.

В настоящее время в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси проводятся исследования ДНК-гетерогенности коллекций перца сладкого, капусты белокочанной и брюссельской для оптимизации их селекции на гетерозис. Разностороннее изучение образцов капусты белокочанной методами молекулярной и классической генетики позволило выделить перспективные образцы для селекции на гетерозис.

На основе маркерной селекции перца сладкого отобраны высокополиморфные линии, при использовании которых в гибридизации в качестве одного из компонентов скрещивания возможно получение высокогетерозисного потомства [57].

Одно из важных проявлений гетерозиса – стабилизация урожайности в различных средах. Согласно теории генетического гомеостаза

И.М. Lerner [58] преимущество гетерозигот над гомозиготами выражается в двух аспектах: 1) онтогенетическая саморегуляция, основанная на общей способности гетерозигот оставаться в норме канализированного развития; 2) саморегуляция популяций, базирующаяся на естественном отборе наиболее приспособленных форм. Автор считал, что селективное преимущество гетерозигот базируется на аддитивном действии генов со сверхдоминированием в отношении приспособленности, на что указывает большая инцухт-депрессия признаков, связанных с приспособленностью. Если рассматривать среднее значение признака и средовую чувствительность как относительно самостоятельно наследуемые слагаемые фенотипического проявления признака, можно выяснить, как проявляется эффект гетерозиса по этим слагаемым фенотипа.

Дж.Д. Джинкс [59] предлагает рассматривать средовую чувствительность признака, целиком или частично находящегося под контролем той же самой генетической системы, которая определяет среднее значение фенотипа. Автор считает в связи с этим возмож-

ным определять гетерозис по средовой чувствительности любого признака. Он будет положительным, если F_1 проявляет большую средовую чувствительность, чем его наиболее чувствительный родитель P_1 . Такой гетерозис выгоден в контролируемых условиях среды. Гетерозис может быть и отрицательным при более низкой чувствительности F_1 в сравнении с наименее чувствительным родителем.

Общая теория гетерозиса должна охватывать различные уровни организации живого (от молекулярного до организменного). В то же время еще недостаточно изучены эффекты гетерозиса на более высоком уровне – популяционном и

биогеоценотическом, хотя они представляют несомненный интерес, поскольку гетерозис как явление поддерживается эволюцией и обеспечивает преимущество гетерозигот в природных экосистемах. Г.В. Филатов [60] предложил схему формирования гетерозиса на разных уровнях организации организма. Однако ее целесообразно дополнить средовым аспектом, так как гетерозис – явление, возникающее в конкретных условиях среды и может не проявляться в других в результате специфического взаимодействия генотип × среда. Такая схема позволяет объяснить и адаптивные преимущества гетерозигот (Рис. 4).

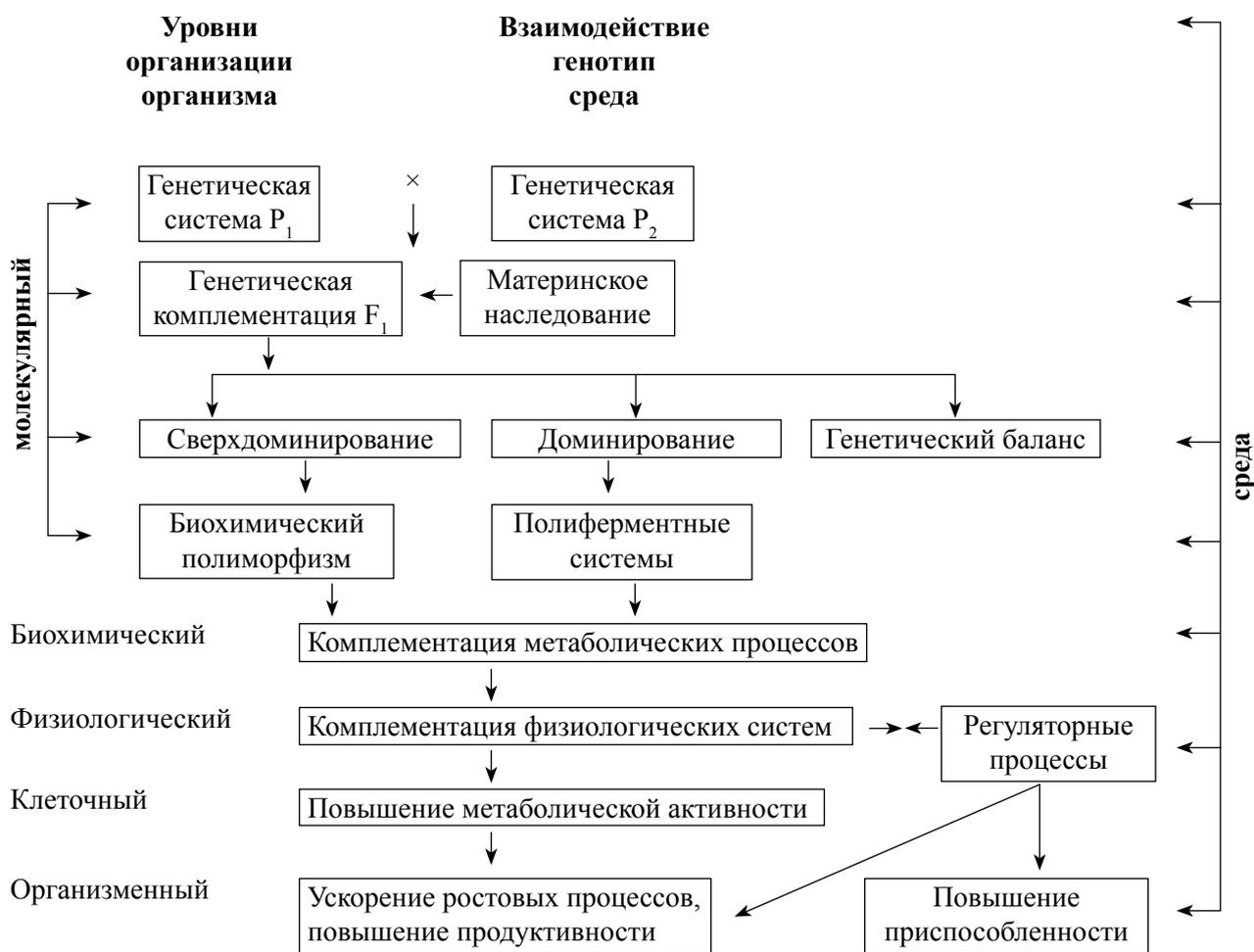


Рис. 4. Формирование гетерозиса на разных уровнях организации организма (по Филатову, 1988 г., с дополнениями).

Практическое использование эффекта гетерозиса зависит от биологических особенностей растения, и в первую очередь от биологии цветения. Для самоопылителей, у которых можно

получить достаточное количество гибридных семян (томат, перец, баклажан и др.), а также ряда перекрестников (кукуруза), наиболее приемлемым является создание межсортовых или

межлинейных гибридов. Для перекрестников, у которых технически сложно получить гибридные семена при скрещивании лучших линий (рожь, многолетние травы), целесообразно создавать синтетические сорта, состоящие из ряда линий. Для вегетативно размножаемых культур эффект гетерозиса, выявленный в различных типах скрещиваний, может быть закреплен при вегетативном размножении (картофель, плодовые, ягодные культуры). В любом случае необходима система скрещиваний для оценки способности линий давать при гибридизации с другими сортами или линиями гетерозисное гибридное потомство, обладающее повышенной жизнеспособностью и урожайностью, – комбинационной способности [61, 62].

G.F. Sprague, L.A. Tatum [63] выделили понятия общей (ОКС) и специфической (СКС) комбинационной способности. ОКС выражает среднюю ценность родительской формы в гибридных комбинациях с ее участием и измеряется средним значением отклонения признака у всех ее гибридов F_1 от общего среднего

по всем гибридам диаллельной схемы. Понятие СКС используется для характеристики отдельных гибридных комбинаций, когда они оказываются хуже или лучше, чем предполагалось на основании только ОКС изучаемых родительских форм. СКС каждой гибридной комбинации определяют отклонением величины признака для этой комбинации от суммы ОКС двух родителей [61, 62, 64].

Схемы скрещиваний для оценки комбинационной способности можно подразделить на би-, три- и полипарентальные (Табл. 2). Бипарентальные скрещивания производят между двумя родителями, трипарентальные – между тремя, а полипарентальные – между испытуемой линией, опыленной другими сортами, линиями или клонами. Бипарентальные скрещивания делятся на диаллельные (гибридизация в пределах одного набора линий) и факториальные (гибридизация между двумя неодинаковыми наборами линий). По такому же признаку трипарентальные скрещивания подразделяют на трипарентальные и трифакториальные.

Таблица 2

Схемы скрещиваний, используемые для оценки комбинационной способности

Число родителей гибрида	Бипарентальные – А × В					Трипарентальные (А × В) × С		Полипарентальные А × В, С, Д ... К	
	Диаллельные		Факториальные (топкроссы)			Триаллельные	Трифакториальные	Поликросс	Свободное опыление
Число наборов генотипов	Полные	Неполные	С реципрокными комбинациями	Без реципрокных комбинаций	Метод реципрокных тестеров				
Число гибридных комбинаций	Метод 1 – m^2 Метод 2 – $\frac{1}{2} m(m+1)$ Метод 3 – $m(m-1)$ Метод 4 – $\frac{1}{2} m(m-1)$	$n \times m$	$m_1 \times m_2 + m_2 \times m_1$	$m_1 \times m_2$	$2K + (m_1 \times m_2)$	$\frac{1}{2} m(m-1) \times (m-2)$	$m_1 \times m_j \times m_k$	m	m
Авторы	Б. Гриффинг Н.В. Турбин Л.В. Хотылева Л.А. Тарутина	К.Хинкельман В.Г. Вольф	О. Кемпсорн		А.В. Кильчевский	Дж. Раулингс Я. Вожда К. Кокерхам	К. Франдсен О.О. Кедров-Зихман	Н.В. Турбин, Л.В. Хотылева	

Для самоопылителей наиболее часто используют факториальные и диаллельные скрещивания (полные и неполные). К факториальным скрещиваниям относятся топкроссы и сетпросы. Топкросс – метод оценки комбинационной способности линий, при котором все линии набора скрещивают с одним или несколькими тестерами.

В.К. Савченко [65] предложил модификацию топкросса – сетпрос (сетевые пробные скрещивания). В этом варианте факториальных скрещиваний изучаемый набор линий ранжируется по продуктивности или другому селективируемому признаку, после чего линии с нечетными номерами рангов включают в первый набор, а линии с четными номерами – во второй. Линии одного набора скрещиваются с линиями другого набора по принципу «каждый с каждым».

Матрица скрещиваний топкросса (при нескольких тестерах) имеет квадратный или прямоугольный вид. При обратных гибридных комбинациях наборы родителей в матрице меняются местами. Назначение топкроссов – предварительная оценка комбинационной способности линий перед их включением в диаллельные скрещивания, а также детальный анализ общей и специфической комбинационной способности. Топкроссы незаменимы при работе с двумя наборами генетически разнокачественных генотипов (стерильные и фертильные формы, генотипы разного уровня плоидности и др.).

О. Kempthorne [66] разработал статистический аппарат для оценки комбинационной способности линий в топкроссах.

Заключительным этапом анализа комбинационной способности генотипов в селекционном процессе являются диаллельные скрещивания. При этом различают 4 метода, когда в исследование включают:

- 1) m родительских форм, а также гибриды от прямых и обратных скрещиваний – m^2 генотипов;
- 2) m родительских форм и прямые гибриды – $m(m+1)/2$ генотипов;
- 3) только прямые и обратные гибриды – $m(m-1)$ генотипов;
- 4) только прямые гибриды – $m(m-1)/2$ генотипов.

Статистический аппарат для оценки эффектов и вариантов ОКС и СКС разработан австра-

лийским генетиком В. Griffing [67] и детально изложен в работах [62, 67].

Обычно оценка комбинационной способности линий проходит в два этапа. На первом этапе комбинационная способность большого количества материнских и отцовских линий оценивается методом топкроссов с одним или несколькими тестерами. При этом главный интерес представляет общая комбинационная способность. На втором этапе лучшие отобранные линии скрещиваются между собой по диаллельной схеме по принципу «каждый с каждым» и отбор ведется как по ОКС, так и по СКС.

Такой подход позволяет проработать большой объем селекционного материала на первом этапе (топкросс) и существенно его уменьшить на заключительном. К примеру, анализ 100 линий в диаллельных скрещиваниях потребовал бы испытания 10000 образцов, а ступенчатая оценка в топкроссах и диаллельных скрещиваниях позволяет оценить на первом этапе 100-300 комбинаций (1-3 тестера) и на втором при отборе 10 лучших форм – 100 комбинаций.

Однако эта схема имеет и недостатки. Генетическая природа гетерозиса, как известно, предполагает возможность использования гетерозигот и эффекта сверхдоминирования. Отбор на общую комбинационную способность методом топкроссов не обеспечивает выделения локусов, в которых действует сверхдоминирование, играющее важную роль в проявлении эффекта гетерозиса. В топкроссах ведется отбор линий, несущих идентичные аллели (доминантные либо рецессивные), но не происходит перераспределение доминантных и рецессивных аллелей между испытываемыми линиями. Отбор сверхдоминантных локусов начинается только на стадии диаллельных скрещиваний, когда число изучаемых форм значительно сокращается. В результате теряется возможность эффективного отбора по локусам, проявляющим сверхдоминирование, среди всех испытываемых линий.

В связи с этим А.В. Кильчевским [68] предложен новый метод оценки комбинационной способности сортов (линий) с целью максимального использования эффекта сверхдоминирования в селекции на гетерозис. Метод основан на принципе реципрокности, который

обеспечивает отбор сверхдоминантных локусов. Для оценки комбинационной способности испытываемых сортов (линий) предлагается использовать два тестера А и В, гибрид между которыми дает эффект гетерозиса. Экспериментальная проверка метода реципрокных тестеров была проведена А.В. Кильчевским, М.М. Добродькиным в селекции партенокарпических гибридов томата на основе функциональной мужской стерильности для пленочных теплиц. Лучшие отцовские и материнские формы скрещивались по схеме топкроссов, их испытание позволило выделить и передать в ГСИ перспективный гибрид F_1 для пленочных теплиц Даша, районированный в Беларуси в 2004 году.

Предложенная схема отбора генотипов в селекции на гетерозис превосходит классическую схему топкроссов с последующими диаллельными скрещиваниями при отборе по генам, проявляющим эффект сверхдоминирования и не уступает ей при отборе по аддитивным и доминантным генам.

Гетерозисная селекция позволяет повысить не только урожайность и другие хозяйственно-ценные признаки, но и приспособленность гибридов. J.M. Lerner [58] в развитой им теории генетического гомеостаза показал, что преимущество гетерозигот выражается в онтогенетической саморегуляции, основанной на общей способности гетерозигот оставаться в норме канализированного развития. В монографии Л.В. Хотылевой, Л.А. Тарутиной [69] обобщены сведения о больших адаптивных возможностях гибридов по сравнению с родительскими формами. В. Griffing, G. Langridge [70] в модельном эксперименте с арабидопсисом установили, что гетерозиготы имеют преимущество перед гомозиготами именно в неблагоприятных для роста условиях и могут его не иметь при оптимальных условиях. В.А. Rojas, G.F. Sprague [71] показали, что эффекты специфической комбинационной способности взаимодействуют со средой сильнее, чем эффекты общей комбинационной способности. А.А. Жученко [72] выделил среди основных преимуществ гибридной селекции по сравнению с традиционными методами возможность лучшего сочетания высокой общей и специфической адаптивности растений.

Сокращение длительности цикла гетерозисной селекции, а также необходимость оценки комбинационной способности линий в опытах с повторностями создают хорошие предпосылки для использования экологических подходов в селекционном процессе. К их числу следует отнести оценку приспособленности исходных форм и полученных на их основе гибридов в различных условиях среды. При этом необходимо использовать два экологических подхода:

1) оценивать общую и специфическую адаптивную способность генотипов в различных условиях среды на каждом этапе селекции;

2) экологически организовать селекционный процесс, подбирая среды для параллельного (в течение года) и последовательного (в течение ряда лет) испытания генотипов таким образом, чтобы средовые условия канализировали генетическую изменчивость в направлении максимальной продуктивности в будущем регионе возделывания гибридов (TPE-target population of environments – целевая совокупность сред).

Существуют различные подходы к оценке адаптивной способности генотипов. Подробное их рассмотрение представлено в работах Л.В. Хотылевой, Л.А. Тарутиной [69], А.В. Кильчевского, Л.В. Хотылевой [73, 74], C.S. Lin, M.R. Binns [75] и др.

H.G. Oka [76] определил общую адаптивную способность (ОАС) как способность культур давать постоянно высокий урожай в различных условиях произрастания, а специфическую адаптивную способность (САС) – как способность реагировать и быть устойчивыми к специфическим условиям (засуха, холод или вредители).

А.В. Кильчевским, Л.В. Хотылевой [73, 74, 77] разработан метод генетического анализа, основанный на испытании генотипов в различных средах и позволяющий выявить общую и специфическую адаптивную способность генотипов, их стабильность, селекционную ценность генотипа и вести отбор по адаптивной способности в зависимости от поставленной селекционной задачи. Наряду с оценкой ОАС и САС метод позволяет дать информацию о средах как фонах для отбора.

Под адаптивной способностью понимается способность генотипов поддерживать свойственное ему фенотипическое выражение

признака в определенных условиях среды. Общая адаптивная способность генотипа (ОАС) характеризует среднее значение признака в различных условиях среды, специфическая адаптивная способность (САС) – отклонение от ОАС в определенной среде.

Предлагаемый метод оценки ОАС и САС основан на испытании популяции из n генотипов в m средах. Число повторений равно s . Тогда

$$X_{ikr} = u + v_i + d_k + (vd)_{ik} + e_{ikr},$$

где X_{ikr} – фенотипическое значение i -того генотипа, выращенного в k -той среде в r -том повторении; u – общая средняя всей совокупности фенотипов; v_i – эффект i -того генотипа; d_k – эффект k -той среды; $(vd)_{ik}$ – эффект взаимодействия i -того генотипа с k -той средой; e_{ikr} – эффект, обусловленный случайными причинами и отнесенный к ikr -тому фенотипу [69].

Для установления существенности вкладов генотипов, сред и взаимодействия между ними в фенотипическую изменчивость популяции используется двухфакторный дисперсионный анализ [69, 78].

Интерпретация результатов дисперсионного анализа зависит от предположений относительно изучаемого материала. Если генотипы и среды являются неслучайными выборками, их эффекты считаются фиксированными и можно получить информацию о конкретных генотипах и средах. В этом случае используется модель I, в которой все эффекты, кроме независимо варьирующей e_{ikr} , рассматриваются как постоянные величины. Величина e_{ikr} распределена нормально с нулевым средним и дисперсией, равной σ_e^2 . Если генотипы являются случайной выборкой из популяции, а среды – случайной выборкой из совокупности сред, используется модель II. В этом случае можно получить информацию о параметрах популяции генотипов в определенной совокупности сред. Изложение методик оценки ОАС, САС и экологической стабильности приведено в работах [73, 74].

Предлагаемая методика оценки стабильности основана на объединении линейной и нелинейной части реакции генотипа на среду и этим отличается от метода R.W. Finlay, G.N. Wilkinson [79], где мерой стабильности является линейная реакция, метода G. Wricke

[80], где стабильность оценивается по нелинейной реакции и методов S.A. Eberhart, W.A. Russell [81], G.C.C. Tai [82], где введены соответствующие параметры линейной и нелинейной реакции генотипа.

Введем понятие относительной стабильности генотипа:

$$S_{gi} = [\sigma_{CASI} / (u + OAC_i)] \times 100 \%$$

Этот показатель позволит сравнивать результаты опытов, проведенных с различным набором культур, генотипов, сред и изучаемых признаков. По существу, относительная стабильность генотипа аналогична коэффициенту вариации при изучении его в ряде сред.

Реакцию генотипа на улучшение условий среды можно определить по величине коэффициента регрессии генотипа на среду [79, 81]

$$B_i = \sum_k x_{ik} d_k / \sum_k d_k^2$$

Окончательная оценка селекционного материала зависит от поставленной селекционной задачи.

Основными можно считать следующие направления адаптивной селекции:

- 1) отбор на САС к определенной среде;
- 2) отбор на ОАС к ряду сред;
- 3) отбор на ОАС с учетом стабильности [77].

Последнее направление предполагает наряду с ОАС контролировать стабильность и по существу является попыткой получения селекционной аналогии двух форм естественного отбора – движущей и стабилизирующей [83], т.е. того совершенного механизма, который создала природа для выделения наиболее приспособленных форм.

Отбор на OAC_i с учетом стабильности требует определенного селекционного критерия, позволяющего сочетать в генотипе продуктивность и стабильность.

Предлагается определить селекционную ценность генотипа $СЦГ_i$ следующим образом: $СЦГ_i = u + OAC_i - r\sigma_{CASI}$. Обычный селекционный критерий $r = 2,3$ вряд ли применим, так как при большой σ_{CASI} возможны отрицательные значения $СЦГ_i$. В качестве первого приближения к достижению оптимального баланса при отборе

по продуктивности и стабильности предлагается использовать среднее значение $СЦГ_i$ в популяции, примерно равное $0,5u$. Тогда нетрудно установить связь между относительной стабильностью генотипов в среднем для популяции

$$\bar{s}_g \left(\bar{s}_g = \frac{s_{g1} + \dots + s_{gn}}{n} \right) \text{ и числом } P \left(P = \frac{100}{2\bar{s}_g} \right).$$

Такой подход означает, что при низкой \bar{s}_g будет идти более интенсивный отбор на стабильность, а при высокой \bar{s}_g – на продуктивность.

Предлагаемой для вычисления $СЦГ_i$ формулой можно пользоваться только в том случае, если отбор идет в сторону увеличения значения признака. Если отбираются генотипы с наименьшим значением признака, формула имеет вид

$$СЦГ_i = u + ОАС_i + r\sigma_{САС_i}$$

Предложенный А.В. Кильчевским, Л.В. Хотылевой [77] метод анализа позволяет выявить ин-

дивидуальную реакцию генотипов на среды по эффектам САС, сводить оценку стабильности к выявлению дисперсии САС, а также показателя относительной стабильности s_{gi} , позволяет отбирать генотипы, сочетающие высокую продуктивность и средовую устойчивость по одному показателю – селекционной ценности генотипа.

Исходный материал для сортов интенсивного типа надо искать среди генотипов с положительной реакцией на улучшение условий выращивания ($b_i > 1$) и с высоким уровнем параметра $СЦГ_i$, обеспечиваемого высокой потенциальной продуктивностью.

Комплексные параметры $САС_i$, $ОАС_i$, $СЦГ_i$ должны служить как ориентиры при оценке исходного и селекционного материала при испытании созданных сортов и гибридов, а такие параметры как s_{gi} , b_i , x_i должны приниматься во внимание в первую очередь при оценке исходного материала для селекции на адаптивность [73, 74, 84, 85].

Заключение

Анализ литературы и результаты собственных исследований позволяют сделать вывод, что гетерозис – сложное биологическое явление, проявляющееся на различных уровнях организации (от молекулярного до ценогического). Генетической основой гетерозиса является благоприятное сочетание различных генетических эффектов (доминирования, сверхдоминирования, эпистаза), долевое участие которых в проявлении гетерозиса в каждом конкретном случае может быть различным. Эффект гетерозиса зависит от степени генетической дивергентности родительских форм, которая может быть определена методами многомерной статистики на основе анализа количественных признаков и/или молекулярных маркеров. Для каждого объекта исследований существует свой оптимальный уровень дивергентности. Гетерозис является феноменом, зависящим от условий среды. В связи с этим выбор методических подходов к гетерозисной селекции должен основываться на нескольких принципах:

- изучении генетической природы количественного признака;
- анализе степени генетической дивергентности исходных родительских форм;
- совершенствовании методов отбора ценных исходных форм на основе молекулярных маркеров;

– анализе комбинационной способности родителей в соответствующих схемах скрещиваний;

– экологической организации селекционного процесса (выбор типичных сред испытания, оценка адаптивной способности и экологической стабильности родителей и гибридов и др.);

– использовании периодического отбора с целью аккумуляции и концентрации желательных аллелей в исходных популяциях и повышения эффекта гетерозиса в новых циклах селекции;

– оптимизации системы гибридного семеноводства, в том числе путем использования стерильных форм.

Большой вклад в развитие исследований по гетерозису внесли ученые Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Им принадлежат серьезные разработки в области генетики свойства комбинационной способности, методических проблем селекции на комбинационную способность, новых подходов к использованию периодического отбора в селекции на гетерозис, изучения генетики цитоплазматической мужской стерильности и ее использования при получении гибридных семян, изучения генетики полиплоидных

растений в связи с использованием гетерозиса на уровне триплоидных и тетраплоидных гибридов у сахарной свеклы, проблемы взаимодействия генотипа и среды при реализации потенциала гетерозисных гибридов и ряда других вопросов.

За разработку проблемы гетерозиса и путей его использования в селекции растений коллектив Института генетики и цитологии НАН Беларуси удостоен Государственной премии БССР в области науки и техники 1984 г.

Изучение проблемы гетерозиса учеными Института выполнялось на различных сельскохозяйственных культурах в разных географических зонах. Экспериментальная оценка комбинационной способности и анализ генетической природы гетерозиса проведены на гибридах F_1 и инбредных линиях кукурузы, сорго, подсолнечника, томата и перца, райграса пастбищного, картофеля, люпина желтого, хлопчатника, льна-долгунца, льна масличного в Беларуси, России, Украине, Молдавии,

Литве, Грузии, Азербайджане, Казахстане, Таджикистане.

Исследования по проблеме гетерозиса выполняются также в РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию» (кукуруза, рапс, кормовая и сахарная свекла, озимая рожь), РУП «НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодовоовощеводству» (томат, огурец, капуста и др.), БГСХА (томат). Результаты этих работ материализовались в созданных и районированных в Беларуси гибридах кукурузы, томата, огурца, рапса, ржи, подсолнечника, сахарной и кормовой свеклы.

Гетерозисная селекция стала классическим методом создания высокопродуктивных экологически стабильных гибридов с высоким качеством продукции. Со временем ее значимость в арсенале методов селекционера будет только возрастать. Использование современных молекулярных методов в селекционном процессе позволит повысить эффективность подходов к созданию гетерозисных гибридов растений.

Список использованных источников

1. Мазер, К. Биометрическая генетика / К. Мазер, Дж. Джинкс. – М.: Мир, 1985. – 463 с.
2. Gustafson, A. The effect of heterozygosity on variability and vigour / A. Gustafson // *Hereditas*. – 1946. – Vol. 32, № 2. – P. 263–286.
3. Dobzhansky, Th. Nature and origin of heterosis / Th. Dobzhansky // *Heterosis*: ed. G. Gowen. – Ames (Iowa): St. Coll. Press, 1952. – P. 218–223.
4. Davenport, C. B. Degeneration, albinism and inbreeding / C.B. Davenport // *Science*. – 1908. – Vol. 28. – P. 454–455.
5. Jones, D.T. Dominance of linked factors as a means of accounting for heterosis / D.T. Jones // *Genetics*. – 1917. – N 2. – P. 7.
6. Турбин, Н.В. Гетерозис и генетический баланс / Н.В. Турбин // *Гетерозис: теория и методы практического использования*. – Минск, 1961. – С. 3–34.
7. Турбин, Н.В. // *Гетерозис: теория и практика*. – Л., 1968. – С. 46–85.
8. Shull, G.H. The genotypes of maize / G.H. Shull // *Amer. Naturalist*. – 1911. – Vol. 45, № 2. – P. 232–252.
9. East, E.M. Heterozygosis in evolution and in plant breeding / E.M. East, H.K. Hayes // *USDA, Bar. Plant. Ind.* – 1912. – Bull. 58. – P. 243.
10. Stadler, L. J. Some observations on gene variability and spontaneous mutation / L.J. Stadler // *Spragg Memorial Lectures / Michigan St. Coll. Press*. – Michigan, 1939.
11. Stubbe, H. Uber mono- und digen bedinghe Heterosis bei *Antirrhinum majus* / H. Stubbe // *L.Z. Ind. Abstanum und Vererbungsl.* – 1953. – Vol. 85. – P. 450–478.
12. Mather, K. The genetical basis of heterosis / K. Mather // *Proc. Roy. Soc, ser. B.* – 1955. – Vol. 144. – P. 915.
13. Струнников, В. А. Новая гипотеза гетерозиса: ее научное и практическое значение / В.А. Струнников // *Вестник с.-х. науки*. – 1983. – № 1. – С. 34–40.
14. Goodnight, C.J. Epistasis and Heterosis. *Genetics and Exploitation of heterosis in crops / C.J. Goodnight*. – Madison (Wisconsin, USA), 1999. – P. 59–68.
15. Khotyleva, L.V. Nonallelic interactions and heterosis in corn / L.V. Khotyleva, L.A. Tarutina // *Book of abstracts of International symposium*

«The genetics and exploitation of heterosis in crops» (17-20 august 1997, Mexico city). – Mexico, 1997. – P. 146–147.

16. Тарутина, Л.А. Связь гетерозиса и неаллельного взаимодействия у гибридов первого поколения тепличных томатов / Л.А. Тарутина, Л.В. Хотылева, Л.А. Мишин, С.И. Посканная, И.Б. Капуста // Доклады АНБ. – 1996. – Т. 40, № 6. – С. 72–75.

17. Tarutina, L.A. Genetic control of the character fruit weight per plant in sweet pepper in the diallel cross / L.A. Tarutina, S.I. Poskannaya, I.B. Kapusta, L.I. Mishin, L.V. Khotyleva // Materials of International scientific conference «Plant genefund accumulation evaluation and protection in the botanical gardens» (1-2 july 1999, Vilnius). – Vilnius, 1999. – P. 157–159.

18. Хотылева, Л.В. Эпистаз и гетерозис у гибридов тепличного томата / Л.В. Хотылева, Л.А. Тарутина, И.Б. Капуста, Л.А. Мишин // Агроэкология. Сб. научн. тр. Вып. 2 «Экологические основы плодовоовощеводства». – Горки, 2005. – С. 143–146.

19. Melchinger, A.E. Genetic diversity and heterosis / A.E. Melchinger // Genetics and exploitation of heterosis in crops. – Madison (Wisconsin, USA), 1999. – P. 99–118.

20. Драгавцев, В.А. Генетика признаков продуктивности яровых пшениц в Западной Сибири / В.А. Драгавцев, Р.А. Цильке, Б.Г. Рейтер и др. – Новосибирск, 1984.

21. Драгавцев, В.А. Алгоритмы эколого-генетической инвентаризации генофонда и методы конструирования сортов сельскохозяйственных растений по урожайности, устойчивости и качеству. – СПб, 1993.

22. Comstock, R.E. // Proc. Int. Conf. Quant. – Ames (Iowa), 1977. – P. 705–718.

23. Cooper, M. Genotype x environment interactions, selection response and heterosis / M. Cooper, D.W. Podlich // Genetics and exploitation of heterosis in crops. – Madison (Wisconsin, USA), 1999. – P. 81–92.

24. Кильчевский, А.В. Комплексная оценка среды как фона для отбора в селекционной программе / А.В. Кильчевский // Доклады АН БССР. – 1986. – Т. 30, № 9. – С. 846–849.

25. Шмараев, Г. Е. Прогнозирование гетерозиса у гибридов сахарной кукурузы / Г.Е. Шмараев, Н.В. Говоров // Вестник с.-х. науки. – 1968. – № 5 (140). – С. 34–37.

26. Herburn, A.G. Methylation in plants / A.G. Herburn, F.S. Belanger, D.N. Mattheis // Developmental Genetics. – 1987. – N 8. – P. 475–493.

27. Tsiftaris, A.S. Epigenetic changes in maize DNA and heterosis / A.S. Tsiftaris, M. Kafka, A. Polidoris // Genetics, biotechnology and breeding of maize and sorghum / The Royal Society of Chemistry. – Cambridge (England), 1997. – P. 125–130.

28. Финчем, Дж. Генетическая комплементация / Дж. Финчем. – М.: Мир, 1968. – 84 с.

29. Филатов, Г. В. Гетерозис: физиолого-генетическая природа / Г.В. Филатов. – М.: Агропромиздат, 1988. – 96 с.

30. Schwarz, D. A molecular basis for heterosis / D. Schwarz, W.J. Langher // Science (Washington, D.C.). – 1969. – Vol. 166. – P. 626–627.

31. Pryor, A.J. Allelic glutamic dehydrogenase isozymes in maize—a single hybrid isozyme in heterozygotes / A.J. Pryor // Heredity. – 1974. – Vol. 32. – P. 397–401.

32. Hall, J.G. Conditional overdominance at an alcohol dehydrogenase locus in yeast / J.G. Hall, C. Wills // Genetics. – 1987. – Vol. 117. – P. 421–427.

33. Srivastava, H. K. Intergenomic interaction, heterosis, and improvement of crop yield / H.K. Srivastava // Adv. Agron. – 1981. – Vol. 34. – P. 117–195.

34. De Vienne, D. Biochemical and genetic properties of oligomeric structures: a general approach / D. De Vienne, F. Rodolphe // J. Theor. Biol. – 1985. – Vol. 116. – P. 527–568.

35. Leonardi, A. Association of protein amount polymorphism (PAP) among maize Lines with performances of their hybrids / A. Leonardi, C. Damerval, Y. Herbert, A. Gallais, De Vienne // Theor. Appl. Genet. – 1991. – Vol. 82. – P. 552–560.

36. Mangelsdorf, A.J. Gene interaction in heterosis / A.J. Mangelsdorf // Heterosis. – Ames: Iowa State College Press, 1952. – P. 321–329.

37. Hageman, R. H. Biochemical approach to corn breeding / R.H. Hageman, E.R. Leng, J.W. Dudley // Advan. Agron. – 1967. – Vol. 19. – P. 45–86.

38. Хотылева, Л.В. Биоэнергетические процессы при гетерозисе / Л.В. Хотылева, А.Н. Разумович, В.В. Титок и др. // Мн.: Навука і тэхніка, 1991. – 176 с.

39. Титок, В.В. Биоэнергетические основы формирования гетерозиса у сельскохозяйственных растений: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.15 / В.В. Титок ; ИООО «Право и экономика». – Минск, 2002. – 43 с.
40. Багрянская, Н.А. Митотическая активность у гибридов кукурузы и ее связь с явлением гетерозиса / Н.А. Багрянская, И.А. Рущкий // Вестник с.-х. науки. – 1974. – № 12. – С. 16–18.
41. Конарев, В.Г. Биохимические и молекулярно-генетические аспекты гетерозиса / В.Г. Конарев // Вестник с.-х. науки. – 1974. – № 12. – С. 1–10
42. Essad, S. Kinetic and instantaneous characteristics of mitosis related to heterosis and inbreeding in *Zea mays* / S. Essad, C. Maunory // J. Ann. Amelior. Plant. – 1979. – Vol 29, № 6. – P. 689–698.
43. Рубцова, М.С. Некоторые физиологические особенности гибридов и исходных самоопыленных линий кукурузы / М.С. Рубцова // Физиология растений. – 1960. – Т. 7, № 6. – С. 473–479.
44. Доровская, И.Ф. Формирование и фотосинтетическая деятельность ассимиляционной поверхности инбредной и гибридной кукурузы / И.Ф. Доровская // Физиология растений. – 1962. – Т. 9, № 5. – С. 635–638.
45. Филатов, Г.В. О причинах повышения фотосинтетической деятельности растений / Г.В. Филатов // Тез. докл. Всесоюз. совещ. «Физиолого-генетические основы повышения продуктивности зерновых культур». – М., 1973. – С. 89–91.
46. Loomis, R.S. Agricultural productivity / R.S. Loomis, W.A. Williams, A.E. Hall // Ann. Rev. Plant Physiol. – 1971. – Vol. 22. – P. 431–468.
47. Шереверя, Н. И. Сравнительная роль фотосинтеза и гетеротрофного питания за счет семян в гетерозисе гибридных поколений кукурузы / Н.И. Шереверя, В.С. Столяренко // Физиология и биохимия культурных растений. – 1974. – Т. 6, № 2. – С. 123–128.
48. Ерина, О.И. Изучение физиолого-биохимических особенностей томатов в связи с прогнозированием гетерозиса / О.И. Ерина // Гетерозис с.-х. растений, его физиолого-биохимические и биофизические основы. – М.: Колос, 1975. – С. 75–81.
49. Яковлев, А.П. Показатели энергетического обмена у гибридной и инбредной кукурузы / А.П. Яковлев, Н.В. Раськова, А.И. Брынза, Е.В. Бунарева // Науч. докл. высшей школы. биол. науки. – 1973, № 11. – С. 105–109.
50. Srivastava, H.K. Heterosis and complementation of isolated mitochondria from several wheat varieties / H.K. Srivastava // Indian J. Exp. Biol. – 1974. – Vol. 12, № 1. – P. 79–81.
51. Багрянская, Н.А. Гетерозис на клеточном и субклеточном уровнях у сортолинейного и межлинейных гибридов кукурузы / Н.А. Багрянская // Тез. докл. 4-го съезда ВОГИС. – М.: Наука, 1982. – Ч. 2. – С. 37–38.
52. Пашкаръ, С.И. Физиологически активные соединения в селекционно-генетических процессах / С.И. Пашкаръ. – Кишинев, 1970. – 172 с.
53. Пашкаръ, С.И. К биохимической диагностике гетерозиса, ЦМС и полиплоидии у кукурузы в процессе селекции / С.И. Пашкаръ // Физиология растений в помощь селекции. – М.: Наука, 1974. – С. 161–177.
54. Шаптуренко, М.Н. Потенциал продуктивности перца сладкого (*Capsicum annuum* L.) по кинетическим показателям термодеструкции семян / М.Н. Шаптуренко, Л.М. Шостак, Л.А. Тарутина, Л.А. Мишин, Л.В. Хотылева. // Доклады НАН Беларуси. – 2007. – Т. 51, № 4. – С. 65–70.
55. Melchinger, A.E. Prediction of testcross means and variances among F_3 progenies of F_1 crosses from testcross means and genetic distances of their parents in maize / A.E. Melchinger, R.K. Gumber, R.B. Leipert, M. Vuylsteke, M. Kuiper // Theor. Appl. Genet. – 1998. – V. 96. – P. 503–512.
56. Becker, H.C. Heterosis and hybrid breeding / H.C. Becker, W. Link // Vortr. Pflanzenzuchtg. Mendel Centenary Congress. – 2000. – V. 48. – P. 319–327.
57. Хотылева, Л.В. Использование RAPD-маркеров для оценки исходного материала перца сладкого (*Capsicum annuum* L.) в селекции на гетерозис / Л.В. Хотылева, М.Н. Шаптуренко, Л.А. Тарутина, Л.А. Мишин // Овощеводство. Сб. научн. тр. Т. 14. – Минск, 2008. – С. 214–221.
58. Lerner, I.M. Genetic homeostasis / I.M. Lerner. – N.-Y., 1954.

59. Джинкс, Дж.Л. Биометрическая генетика гетерозиса / Дж.Л. Джинкс // Гетерозис. – М.: Агропромиздат, 1987. – С. 17–70.
60. Филатов, Г. В. Гетерозис: физиолого-генетическая природа / Г.В. Филатов. – М.: Агропромиздат, 1988. – 96 с.
61. Турбин, Н.В. О принципах и методах селекции растений на комбинационную способность / Н.В. Турбин, Л.В. Хотылева // Гетерозис: теория и методы практического использования. – Минск, 1961. – С. 111–144.
62. Турбин, Н.В. Диаллельный анализ в селекции растений / Н.В. Турбин, Л.В. Хотылева, Л.А. Тарутина. – Минск: Наука и техника, 1974. – 181 с.
63. Sprague, G.F. General vs specific combining ability in single crosses of corn / G.F. Sprague, L.G. Tatum // J. Amer. Soc. Agron. – 1942. – Vol. 34. – P. 923–932.
64. Смиряев, А.В. Биометрия в генетике и селекции растений / А.В. Смиряев, С.П. Мартынов, А.В. Кильчевский. – М.: изд-во ТСХА, 1992. – 269 с.
65. Савченко, В.К. Генетический анализ в сетевых пробных скрещиваниях / В.К. Савченко. – Минск: Наука и техника, 1984. – 223 с.
66. Kempthorne, O. An introduction to genetics statistics / O. Kempthorne. – New York, 1957. – P. 468–472.
67. Griffing, B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems / B. Griffing // Australian J. Biol. Sci. – 1956. – Vol. 9. – P. 463–493.
68. Кильчевский, А.В. Эффективность первого цикла реципрокного периодического отбора у томатов: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / А.В. Кильчевский. – Горки, 1982. – 115 с.
69. Хотылева, Л.В. Взаимодействие генотипа и среды: методы оценки / Л.В. Хотылева, Л. А. Тарутина. – Минск: Наука и техника, 1982. – 176 с.
70. Griffing, B. Statistical genetics and plant breeding / B. Griffing, I. Langridge. – Washington, 1963. – Publ. 982. – P. 368–394.
71. Rojas, B. A. comparison of variance components in corn yield trials. III. General and specific combining ability and their interaction with location and years / B.A. Rojas, G.E. Sprague // Agron. J. – 1952. – Vol. 44. – P. 462–466.
72. Жученко, А.А. Экологическая генетика культурных растений / А.А. Жученко. – Кишинев: Штиинца, 1980. – 587 с.
73. Кильчевский, А.В. Генотип и среда в селекции растений / А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева // Минск: Наука и техника, 1989. – 191 с.
74. Кильчевский, А.В. Экологическая селекция растений / А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева // Минск: Технология, 1997. – 372 с.
75. Lin, C.S. / C.S. Lin, M.R. Binns // Theor. Appl. Genet. – 1991. – Vol. 82, № 4. – P. 505–509.
76. Oka, H. G. Breeding for wide adaptability / H. G. Oka // Adaptability in plants: use and management of biological resources. – Tokyo, 1975. – P. 177–185.
77. Кильчевский, А.В. Метод оценки адаптивной способности и стабильности генотипов, дифференцирующей способности среды. Сообщ. 1. Обоснование метода / А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева // Генетика. – 1985. – Т. 21, № 9. – С. 1481–1490.
78. Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий. – Минск: Высшэйшая школа, 1967. – 327 с.
79. Finlay, K. W. The analysis of adaptation in plant-breeding programme / K.W. Finlay, G.N. Wilkinson // Austral. J. Agric. Res. – 1963. – Vol. 14, № 6. – P. 742–754.
80. Wricke, G. Ubereine Methode zur Erfassung der okologischen Sfeubreite in Feldsuchungen / G. Wricke // 2. Pflanzenzuchtung. – 1962. – Bul. 47, № 1.-S. 92–96.
81. Eberhart, S.A. Stability parameters for comparing varieties / S.A. Eberhart, W.A. Russell // Crop Sci. – 1966. – Vol. 6, № 1. – P. 36–40.
82. Tai, G.C.C. Genotypic stability analysis and its application to potato regional trials / G.C.C. Tai // Grop. Sc. – 1971. – Vol. 11, № 2. – P. 184–194.
83. Шмальгаузен, И.И. Проблемы дарвинизма / И.И. Шмальгаузен. – Новосибирск, 1969.
84. Кильчевский, А.В. Селекция гетерозисных гибридов томата. Монография / А.В. Кильчевский, В.В. Скорина. – Минск, 2005. – 217 с.
85. Пивоваров, В.Ф. Экологическая селекция сельскохозяйственных растений / В.Ф. Пивоваров, Е.Г. Добруцкая, Н.Н. Балашова. – М., 1994. – 204 с.

Дата поступления статьи 4 декабря 2008 г.

А.В. Кильчевский¹, М.М. Добродькин², В.В. Скорина², О.Г. Бабак¹, Л.Г. Коготько²,
Е.Ю. Иванцова³, Л.В. Хотылева¹, Л.А. Тарутина¹, Л.А. Мишин⁴

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СЕЛЕКЦИИ ТОМАТА НА ГЕТЕРОЗИС

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

²УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»

Республика Беларусь, 213410, Могилевская обл., г. Горки, ул. Мичурина, 5

³УО «Могилевский государственный университет им. А.А. Кулешова»

Республика Беларусь, 212022, г. Могилев, ул. Космонавтов, 1

⁴РУП «Институт овощеводства»

Республика Беларусь, 223013, Минская обл., Минский р-н, пос. Самохваловичи, ул. Ковалева, 2

Введение

Селекция на гетерозис у томата является основным способом получения высокопродуктивных и устойчивых гибридов F_1 для закрытого и открытого грунта. В Беларуси селекция гетерозисных гибридов томата проводится в трех научных учреждениях: ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Белорусской государственной сельскохозяйственной академии и РУП «Институт овощеводства».

Основой эффективного селекционного процесса является генетический анализ наследования признаков, что позволяет правильно выбирать исходный материал и формировать оптимальную схему создания гибридов. Обязательное звено селекционного процесса – оценка комбинационной способности в системе топкроссов и/или диаллельных скрещиваний. Возможны и иные подходы к оценке этого свойства родительских форм гибридов. А.В. Кильчевский,

Л.В. Хотылева разработали метод реципрокного периодического отбора на основе межсортового гибрида, позволяющий создавать межлинейные гибриды, превосходящие межсортовые по скороспелости и урожайности [1, 2, 3, 4]. Основу метода составляет внутрисортный полиморфизм по комбинационной способности. А.В. Кильчевским теоретически разработан и проверен на генетических моделях и в реальном эксперименте метод реципрокных тестеров, который позволяет более эффективно использовать явления сверхдоминирования и эпистаза в селекции гетерозисных гибридов [5, 6].

В данной статье представлены результаты многолетних исследований, выполненных в Беларуси по оптимизации селекционного процесса и созданию гетерозисных гибридов томата для пленочных теплиц и открытого грунта.

Материалы и методы

Получение и испытание гетерозисных гибридов томата проводилось в БГСХА в 1978 – 2007 гг. в открытом грунте и пленочных теплицах, в Институте генетики и цитологии и Институте овощеводства НАН Беларуси в условиях необогреваемых пленочных и остекленных теплиц. Агротехника возделывания томата общепринятая [7, 8, 9].

В селекции на гетерозис использовали исходный материал, созданный за период работы с культурой, а также линии, сорта и гибриды, любезно предоставленные нам учеными се-

лекционерками России и Болгарии, содержащие гены хозяйственно полезных признаков.

Формы с функциональной мужской стерильностью получены от сотрудников Института генетики Болгарской АН Б. Атанасовой и Ж. Данаилова, формы, содержащие гены *rin*, *nor* и *alcobaca* – от сотрудницы ВНИИССОК Н.И. Бочарниковой (г. Москва), формы, содержащие ген *pat-2* – от сотрудницы ВНИИО (г. Москва) С.И. Игнатовой.

Генетический анализ наследования признаков проводили на диаллельных гибридах F_1 по

методу Б. Хеймана [10, 11], оценку комбинационной способности на диаллельных гибридах

F_1 – по методу В. Гриффинга [12], в топкроссах – по методу О. Кемпсона [13].

Результаты и обсуждение

Разработка реципрокного периодического отбора у томата

Нами [1, 2, 3] в БГСХА впервые у самоопыляющейся культуры (томат) выявлена внутрисортная изменчивость свойства комбинационной способности по ряду количественных признаков и подтверждена популяционная природа сортов томата. Доказана возможность успешного внутрисортного отбора линий этой культуры по комбинационной способности. Лучшие межлинейные гибриды, полученные при скрещивании линий, отобранных в топкроссах, превзошли исходный межсортной гибрид Талалихин × Бизон по ранней урожайности на 37,8 – 67,4 %, общей – на 8,7 – 19,6 %. Установлена также генетическая природа внутрисортной изменчивости у томата методом диаллельного анализа. Показано преобладание аддитивных факторов над неаддитивными в генетической вариации ряда количественных признаков. Определены генетические параметры сортов-популяций до и после отбора. Их сравнение показало, что в топкроссах отбор ведется главным образом по аддитивным эффектам, что приводит к уменьшению их доли в генетической вариации сортов. Близкие результаты были получены при изучении изменения компонентов генетической вариации сортов кукурузы в результате реципрокного периодического отбора. Это позволяет предполагать, что такое действие отбора в топкроссах носит общий характер.

Высокая эффективность первого цикла предлагаемой схемы отбора на гетерозис, а также сохранение изменчивости между гибридами лучших по комбинационной способности линий дают основание считать возможным заложение улучшенных популяций путем скрещивания отобранных линий в пределах каждого сорта. Эти популяции могут служить материалом для второго цикла реципрокного периодического отбора.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о высокой эффективности метода реципрокного периодического отбора в селекции такой самоопыляющейся культуры, как томат.

В дальнейшем исследовании эффективности реципрокного периодического отбора для самоопылителей были продолжены в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси совместно с Институтом овощеводства (Рис. 1). Изучена эффективность моделей внутри- и межпопуляционного периодического отбора в зависимости от уровня генетической изменчивости линий и гибридов тепличного томата. Применение разработанной методики позволило улучшить на 10 % урожайность районированного гибрида F_1 Старт, созданного совместно учеными Института овощеводства и Института генетики и цитологии НАН Беларуси и признанного стандартом для республики. Улучшенный гибрид используется для следующего цикла отбора. Предложенная модель улучшения исходного материала была апробирована на других гибридах F_1 томата и показала, что реципрокный периодический отбор с минимальным инбридингом и систематической гибридизацией является эффективным приемом не только сохранения, но и повышения уровня гетерозиса [14, 15].

Метод реципрокных тестеров

С целью создания исходного материала с оптимальной генетической структурой для реципрокного периодического отбора нами для отбора сортов (линий) по комбинационной способности был разработан метод реципрокных тестеров (Рис. 2) [5], нацеленный на максимальное использования эффекта сверхдоминирования в селекции на гетерозис. Метод основан на принципе реципрокности, который обеспечивает отбор сверхдоминантных локусов. Для оценки комбинационной способности испытуемых сортов (линий) предлагается использовать два тестера А и В, гибрид между которыми дает эффект гетерозиса. Последнее будет свидетельствовать об оптимальном распределении аллелей в локусах, обеспечивающих эффект гетерозиса между тестерами. Все изучаемые сорта (линии) скрещиваются с каждым из тестеров. По результатам испытания гибридов отбираются формы, выделившиеся при гибридизации с тестером А (m линий Ла)

и с тестером В (n линий Лв). Две отобранные группы сортов (линий) скрещиваются по принципу «каждый с каждым». В дальнейшем в пределах каждой группы сортов (линий) Ла и Лв выделяются лучшие по комбинационной

способности. Главное достоинство предлагаемой схемы – совпадение направления отбора по эффектам сверхдоминирования на начальном и заключительном этапах селекции на гетерозис за счет принципа реципрокности.



Рис. 1. Схема улучшения гибрида F₁ Старт в процессе реципрокного периодического отбора.

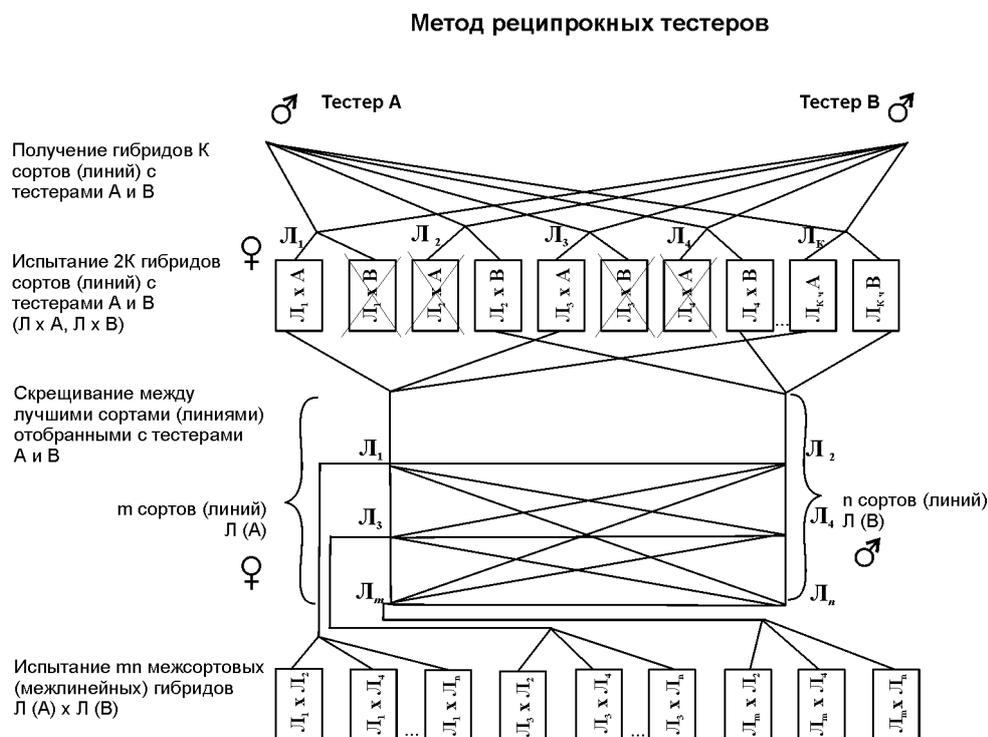


Рис. 2. Метод реципрокных тестеров.

Для оценки эффективности предложенного метода по сравнению с классической схемой топкроссов с последующим диаллельным скрещиванием при различном характере наследования признака были использованы 6 генетических двухлокусных моделей (аддитивная, доминантная, сверхдоминантная и 3 эпистатических), а также два типа реципрокных тестеров: ААВВ, аавв и ААвв, ааВВ. Тестером на общую комбинационную способность служил генотип АаВв, т.к. он дает все возможные типы гамет, что необходимо для соблюдения принципа широкой генетической основы. В результате моделирования установлено, что обе схемы селекции на гетерозис были равноценными при отборе по аддитивным генам. По генам, проявляющим эффект доминирования, предлагаемый метод с тестерами типа ААвв, ааВВ превосходит классическую схему, а с тестерами типа ААВВ, ааВВ – уступает ей. Наибольший эффект от применения метода реципрокных тестеров достигнут при сверхдоминантной модели, причем оба типа реципрокных тестеров равноценны. При различной интенсивности отбора по аддитивным и доминантным локусам по классической и предлагаемой схеме его результаты близки. Топкроссы с последующими диаллельными скрещиваниями не обеспечивают отбора по локусам, проявляющим сверхдоминирование при любой интенсивности отбора, в то время как эффективность метода реципрокных тестеров при повышении интенсивности отбора возрастает.

Таким образом, предложенная схема отбора генотипа в селекции на гетерозис превосходит классическую схему топкроссов с последующим диаллельным скрещиваниями при отборе по генам, проявляющим эффект сверхдоминирования и не уступает ей при отборе по аддитивным и доминантным генам. Лучшими оказались тестеры типа ААвв, ааВВ.

Экспериментальная проверка метода реципрокных тестеров была проведена А.В. Кильчевским, М.М. Добродькиным в селекции партенокарпических гибридов томата на основе функциональной мужской стерильности для пленочных теплиц [16]. При этом использовались две схемы гибридизации (3×9; 9×3), т.е. 54 гибридные комбинации, в то время как полная схема потребовала бы 81 комбинацию. Лучшие отцовские и материнские формы скрещивались по схеме топкроссов, их испытание позволило выделить и передать в ГСИ перспективный гибрид F₁ для пленочных теплиц Даша, районированный в Беларуси в 2004 году.

Наследование хозяйственно ценных признаков томата

Характер наследования хозяйственно-ценных признаков определяет выбор методов селекции гетерозисных гибридов. Нами изучено наследование основных признаков урожайности и партенокарпии в диаллельных скрещиваниях по методу Б. Хеймана (Табл. 1, 2) [16, 17, 18, 19].

Таблица 1

Параметры Хеймана по признакам урожайности томата

Признак	Фон	Годы	$\sqrt{H_1/D}$	$H_2/4H_1$	$\frac{\sqrt{4DH_1+F_1}}{\sqrt{4DH_1-F_1}}$	r	D _{max}	R _{max}	h ² /H ₂
О	1	1991	1,38	0,19	1,84	-0,62	703,5	13,5	0,51
		1992	0,99	0,22	1,16	-0,58	656,5	112,2	1,10
	2	1991	0,95	0,15	0,98	-0,31	771,6	375,1	1,45
		1992	1,35	0,17	1,91	-0,81	780,6	-88,7	2,48
	3	1991	0,79	0,18	2,04	-0,36	414,1	30,8	2,50
		1992	1,32	0,15	2,92	-0,89	805,8	28,3	1,66
Т	1	1991	1,79	0,21	1,85	-0,83	545,0	-41,1	0,56
		1992	1,27	0,23	1,12	-0,53	459,1	84,3	1,10
	2	1991	1,08	0,20	1,09	-0,30	489,0	168,9	1,24
		1992	1,54	0,17	1,44	-0,71	597,7	70,0	1,96
	3	1991	0,97	0,21	1,89	-0,91	289,5	-56,4	3,71
		1992	1,29	0,16	2,53	-0,86	742,0	-2,94	1,46

Примечание. О – общая урожайность; Т – товарная урожайность; 1 – контрольный фон; 2 – фон повышенного плодородия; 3 – стрессовый фон.

Таблица 2

**Параметры Хеймана по проявлению ранней урожайности
и партенокарпии в плодах томата**

Признак	Фон	Годы	$\sqrt{H_1/D}$	$H_2/4H_1$	$\frac{\sqrt{4DH_1+F_1}}{\sqrt{4DH_1-F_1}}$	r	Dmax	Rmax	h^2/H_2
Р	1	1991	1,29	0,19	0,40	0,91	-5,1	67,8	-0,01
		1992	0,82	0,20	0,86	0,69	17,5	97,0	0,03
	2	1991	1,26	0,18	2,19	0,87	-8,5	275,1	0,01
		1992	0,85	0,14	0,50	0,58	36,3	113,8	-0,11
	3	1991	1,06	0,25	0,69	0,50	-6,0	26,9	0
		1992	0,85	0,21	1,94	0,99	46,7	233,1	2,57
П	1	1991	1,00	0,13	5,30	0,98	0,5	41,34	1,36
		1992	1,86	0,14	3,97	0,90	0,6	63,89	1,46
	2	1991	1,01	0,12	6,12	0,98	3,0	69,69	1,55
		1992	1,88	0,16	4,10	0,99	2,9	66,91	1,68
	3	1991	0,92	0,13	5,00	0,97	3,4	69,79	1,81
		1992	1,67	0,15	3,94	0,96	-0,4	63,64	2,16

Примечание. О – общая урожайность; Т – товарная урожайность; 1 – контрольный фон; 2 – фон повышенного плодородия; 3 – стрессовый фон.

В наследовании таких признаков как завязываемость плодов, общая и товарная урожайность преобладает сверхдоминирование, партенокарпии – полное или неполное доминирование, ранней урожайности – неполное доминирование и сверхдоминирование. Доминантные гены усиливают проявление общей и товарной урожайности, завязываемости плодов, рецессивные – ранней урожайности и партенокарпии. Проявление партенокарпии отрицательно связано с общей урожайностью (слабые и средние по силе связи). Гены партенокарпии способствуют повышению завязываемости главным образом в стрессовых условиях среды. Анализ характера распределения по проявлению партенокарпии позволяет предположить наличие множественного аллелизма в детерминации этого признака.

В Институте генетики и цитологии НАН Беларуси установлено, что главными в генетическом контроле массы и количества плодов с растения являются аддитивное действие генов и доминирование [20–24]. Показано, что сверхдоминирование, направленное на увеличение признака «количество плодов с растения», благоприятно в селекции на получение форм с большим количеством плодов. Доминирование, контролирующее среднюю массу плода, направлено на уменьшение данного признака у гибридов F_1 , что делает селекцию новых форм томата с большим количеством крупных плодов

не эффективной. Установлены высокие (свыше 80 %) корреляции признаков родительских линий и эффектов их общей комбинационной способности, что позволяет упростить и ускорить отбор компонентов скрещивания в селекции на гетерозис. Обнаруженное в этих исследованиях отсутствие генетической сопряженности массы плодов с растения с большинством проанализированных компонентов продуктивности позволяет отнести данный признак к сложным полигенно наследуемым, в связи с чем отбор на его улучшение рекомендуется вести одновременно по двум или нескольким составляющим его компонентам.

Преобладание положительного доминирования и сверхдоминирования по признакам урожайности является основанием для успешного поиска высокопродуктивных гибридных комбинаций с высокой завязываемостью плодов, а также для использования схем селекции на основе принципа реципрокности, обеспечивающих отбор по эффектам сверхдоминирования и эпистаза.

Использование функциональной мужской стерильности в селекции гетерозисных гибридов томата

Применение стерильных форм в селекции и последующем семеноводстве гибридов позволяет уменьшить объем работ по кастрации, изоляции и маркировке семян. У томата наиболее

перспективно использование функциональной мужской стерильности (рецессивный ген *ps-2*) в сочетании с маркерными признаками для идентификации и браковки негибридных форм [25–29]. Нами получены от болгарских коллег Б. Атанасовой и Ж. Данаилова стерильные формы, несущие маркерный рецессивный ген *s* – «картофельный лист», некоторые формы имели ген партенокарпии *pat-2*. Для анализа возможностей их использования в селекции и семеноводстве были изучены биология цветения и размножения форм томата с ФМС [27, 28].

Использование партенокарпических линий с функциональной мужской стерильностью и партенокарпических фертильных линий позволило получить гибриды F_1 томата, превышающие в условиях необогреваемых пленочных теплиц стандарт Верлиока F_1 по товарной урожайности на 4,8–21,4 %, по общей урожайности – на 1,7–19,0 %, по ранней урожайности – 6,1–25,7 %. Исходные партенокарпические формы, а также гибриды, полученные на их основе, превысили стандарт Верлиока F_1 по завязываемости плодов на 4,6–38,7 %, что свидетельствует о целесообразности использования партенокарпических форм для стабилизации этого признака в условиях необогреваемых пленочных теплицах.

Гибриды томата имели высокий эффект истинного гетерозиса по товарной (16–70,3 %) и общей (3,3–85,7 %) урожайности. Разработана упрощенная технология получения гибридных семян партенокарпических гибридов томата на основе партенокарпических материнских форм с функциональной мужской стерильностью и маркерным признаком «картофельный лист», включающая лишь опыление цветков и позволяющая отказаться от традиционной технологии заблаговременной кастрации, изоляции и маркировки цветков. Установлены оптимальные сроки опыления без кастрации цветков для конкретных родительских форм при получении гибридов F_1 . Предложенная нами упрощенная технология производства гибридных семян позволяет сократить затраты ручного труда в сравнении с обычной технологией в 10,9 раз и обеспечивает экономию 103,1 чел./часов на производство одного килограмма гибридных семян.

При оценке комбинационной способности мужских стерильных форм одновременно осуществлялась проверка эффективности метода реципрокных тестеров, для чего были заложены две схемы топкроссов, которые испытывались в течение двух лет. На основе отбора лучших линий были созданы новые гибридные комбинации (Табл. 3).

Таблица 3

Товарная и ранняя урожайность лучших гибридов томата в пленочных необогреваемых теплицах

Наименование образца	Товарная урожайность, кг/м ²			Ранняя урожайность, кг/м ²		
	1996 г.	1997 г.	Среднее	1996 г.	1997 г.	Среднее
Б-2-2 × 96/2	12,06	1062	11,34	2,83	3,4	3,12
Б-2-2 × 97/1	13,97	9,62	11,80	3,48	3,22	3,35
С-3-1-3 × 96/2	15,53	9,25	12,39	3,45	2,61	3,03
С-3-1-3 × 97/1	16,02	10,26	13,14	2,5	2,53	2,52
С-3-1-3 × 98/1	14,68	9,30	11,99	3,21	3,32	3,27
С-3-1-3 × 23/1	14,07	10,24	12,16	1,36	3,25	2,31
№3 × 96/2	13,86	10,68	12,27	2,83	2,99	2,91
Б-2-5 × 99/1	12,63	11,38	12,01	2,67	3,17	2,92
№4 × 98/2	14,26	11,19	12,73	1,06	2,95	2,01
№4 × 18/3	11,87	13,44	12,66	1,35	3,21	2,28
Верлиока F_1	10,03	11,6	10,82	0,71	1,23	0,97
НСР _{0,05}	1,25	1,43		0,99	1,22	

Эффективность использования метода реципрокных тестеров оценивалась по результатам изучения 6 гибридов, полученных по реципрокной схеме

(Табл. 4). По товарной урожайности выделялись четыре гибрида из шести, превышающих стандарт до 34,7 % (Б-2-5 × 97/1). При повторном испытании

нии все шесть гибридов превысили стандарт на 5,5 – 19 %. В среднем за два года все гибриды по товарной урожайности превысили стандарт на 3,4 – 25,7 %.

По ранней урожайности за два года исследований все гибриды практически превос-

ходили стандарт. Максимальные значения этого признака отмечены у гибрида № 4 × 23/1. В среднем за два года все гибриды превзошли стандарт, причем наивысшей ранней урожайностью характеризовались гибриды с линией № 4.

Таблица 4

Урожайность гибридов F₁ томата, полученных по реципрокной схеме

Наименование образца	Товарная урожайность, кг/м ²			Ранняя урожайность, кг/м ²		
	1998 г.	1999 г.	Среднее	1998 г.	1999 г.	Среднее
Б-2-5 × 97/1	10,1	11,9	11,00	3,2	2,0	2,60
Б-2-5 × 98/1	7,4	11,9	9,65	2,5	1,3	1,90
Б-2-5 × 23/1	8,4	10,4	9,40	2,7	3,9	3,30
№4 × 97/1	8,7	10,3	9,50	3,0	4,3	3,65
№4 × 98/1	7,4	10,4	8,90	2,8	4,0	3,40
№4 × 23/1	7,6	10,5	9,05	4,3	2,5	3,40
Верлиока F ₁	7,5	10,0	8,75	1,2	1,8	1,50
HCP _{0,05}	1,93	1,82		1,25	1,21	

Таким образом, применение метода реципрокных тестеров позволило эффективно отобрать лучшие по комбинационной способности формы на первом этапе отбора по этому признаку и получить на их основе гибриды на втором этапе. При этом удалось существенно снизить объем скрещиваний у изученных гибридов. В применяемой нами схеме изучался 51 гибрид, что составляет 63 % от максимального по схеме топкроссов (81 гибрид).

Взаимосвязь эффекта гетерозиса и экологической стабильности F₁ гибридов

В ряде экспериментов [17] нами была установлена относительная независимость продуктивности гибридов F₁ и их экологической стабильности. Среди лучших гибридов по общей адаптивной способности встречались как пластичные (отзывчивые), так и стабильные формы, что свидетельствует о необходимости

контроля экологической стабильности в гетерозисной селекции растений. В связи с этим весьма важно выявить проявление экологической стабильности у родителей и гибридов F₁, а также изучить связь эффекта гетерозиса с экологической стабильностью гибридов. С этой целью анализировались результаты испытания в пленочных теплицах 18 родительских форм и 45 гибридных комбинаций F₁ томата индетерминантного и детерминантного типов роста по общей, товарной и ранней урожайности [17, 30].

Эффект гетерозиса оценивали по степени доминирования H_p, а экологическую стабильность – по коэффициенту регрессии на среду b_i и относительной стабильности генотипа S_{gi}.

После определения параметров относительной стабильности генотипов они были усреднены по родительским формам и гибридам (Табл. 5).

Таблица 5

Относительная стабильность (S_{gi}) родительских форм и гибридов томата, %

Генотипы	Урожайность		
	ранняя	товарная	общая
Материнские формы	12,92	14,38	13,86
Отцовские форма	18,95	15,60	13,24
Гибриды	9,05	4,89	4,37

Гибриды в сравнении с родителями отличались меньшей изменчивостью, что свидетельствует об их больших приспособительных возможностях. Реакции гибридов на среду по изучаемым признакам различались: по ранней урожайности гибриды менее стабильны, чем по товарной и общей урожайности. Однако полученные данные еще не дают основания считать, что причиной высокой стабильности гибридов является явление гетерозиса, поскольку он проявлялся не во всех гибридных комбинациях.

Представляет большой интерес вопрос о связи между степенью проявления гетерозиса и экологической стабильностью, а также характером реакции гибридов на среду. С этой целью изучаемые гибридные комбинации группировались по степени доминирования на три группы: $H_p > 1$ – положительное сверхдоминирование; $-1 \leq H_p \leq 1$ – промежуточное

наследование; $H_p < -1$ – отрицательное сверхдоминирование.

Кроме того, гибриды были сгруппированы по коэффициенту регрессии: $b_i > 1$ – нестабильные с положительной реакцией на улучшение условий среды; $-1 \leq b_i \leq 1$ – стабильные; $b_i < -1$ – нестабильные с отрицательной реакцией на улучшение условий среды.

По общей урожайности (Табл. 6) более половины гибридов (55,5 %) проявили эффект положительного гетерозиса, 40,0 % гибридов наследовали признак промежуточно и только у 4,5% наблюдался отрицательный гетерозис. Половина всех гибридов проявила нестабильность с положительной реакцией на среду и только третья часть (31,1 %) была стабильна. Среди 25 гетерозисных гибридов только третья часть (8) была стабильна. Среди 14 стабильных гибридов 8 проявили положительный гетерозис, 5 – промежуточное наследование и 1 – отрицательный гетерозис.

Таблица 6

Связь между степенью доминирования и экологической стабильностью гибридов томата по общей урожайности

Степень доминирования	Коэффициент регрессии на среду			Сумма гибридов	Доля, %
	$b_i < -1$	$-1 \leq b_i \leq 1$	$b_i > 1$		
$H_p > 1$	6	8	11	25	55,5
$-1 \leq H_p \leq 1$	2	5	11	18	40,0
$H_p < -1$	0	1	1	2	4,5
Сумма гибридов	8	14	23	45	100,0
Доля, %	17,8	31,1	51,1	100,0	

По товарной урожайности (Табл. 7) 57,8 % гибридов проявляли положительный гетерозис и 37,8 % – промежуточное наследование.

Только пятая часть всех гибридов была стабильна, а половина положительно реагировала на улучшение среды.

Таблица 7

Связь между степенью доминирования и экологической стабильностью гибридов томата по товарной урожайности

Степень доминирования	Коэффициент регрессии на среду			Сумма гибридов	Доля, %
	$b_i < -1$	$-1 \leq b_i \leq 1$	$b_i > 1$		
$H_p > 1$	9	5	12	26	57,8
$-1 \leq H_p \leq 1$	3	4	10	17	37,8
$H_p < -1$	1	0	1	2	4,4
Сумма гибридов	13	9	23	45	100,0
Доля, %	28,9	20,0	51,1	100,0	

Среди 26 гибридов с положительным гетерозисом только 5 (19,2 %) были стабильными, а среди 9 стабильных форм 5 были гетерозисными, 4 проявляли промежуточное наследование.

По ранней урожайности (Табл. 8) число форм с положительным эффектом гетерозиса составило 28,9 %, с отрицательным – 20,0 % и с промежуточным наследованием 51,1 %.

Таблица 8

Связь между степенью доминирования и экологической стабильностью гибридов томата по ранней урожайности

Степень доминирования	Коэффициент регрессии на среду			Сумма гибридов	Доля, %
	$b_i < -1$	$-1 \leq b_i \leq 1$	$b_i > 1$		
$H_p > 1$	3	5	5	13	28,9
$-1 \leq H_p \leq 1$	7	1	15	23	51,1
$H_p < -1$	3	1	5	9	20,0
Сумма гибридов	13	7	25	45	100,0
Доля, %	28,9	15,6	55,5	100,0	

Число стабильных форм значительно меньше, чем по общей и товарной урожайности, а большая часть гибридов (55,5 %) проявила положительную реакцию на улучшение условий среды. Среди 13 гетерозисных гибридов только 5 были стабильными, а среди 7 стабильных форм 5 проявляли положительный гетерозис, 1 гибрид – промежуточное наследование и 1 – отрицательный гетерозис.

Результаты анализа параметров степени доминирования и экологической стабильности гибридных комбинаций показали, что гибриды отличаются повышенной экологической стабильностью по признакам урожайности. Чем больше количество гибридных комбинаций проявляет гетерозисный эффект, тем больше среди них стабильных форм. Однако следует учитывать, что состояние гетерозиса не всегда обеспечивает стабильность и, наоборот, стабильность не всегда связана с гетерозисом. Стабильность может проявляться и при промежуточном наследовании признака и при отрицательном сверхдоминировании.

Знание закономерностей наследования и взаимосвязей количественных и качественных признаков в первом поколении гибридов – неперемное условие обоснованной селекционной программы по созданию стабильных гетерозисных гибридов, а также при разработке их агротехники.

Генетические основы селекции лежких гибридов томата

Селекция, направленная на повышение урожайности, скороспелости, устойчивости к болезням,

улучшение качества плодов томата ведется давно, однако имеются лишь немногочисленные работы по изучению исходного материала и генетических основ селекции на лежкость плодов [31–33]. В связи с этим весьма актуальной задачей является выявление характера наследования признака «лежкость плодов томата» и внутривидовой изменчивости генотипов по этому признаку, выделение доноров, установление корреляционных связей между лежкостью плодов и другими хозяйственно ценными признаками томата. Для изучения этих вопросов нами были испытаны две топкроссных и две диаллельных схемы скрещиваний в условиях открытого грунта и пленочных теплиц. В каждую схему скрещиваний входили три рецессивных лежких мутанта, несущих гены *rin*, *nor* и *alcobaca*. Результаты оценки лежкости форм, выращенных в различных условиях, представлены в таблицах 9, 10.

В результате анализа комбинационной способности в топкроссных и диаллельных скрещиваниях выявлены перспективные гибриды для пленочных теплиц, превосходящие стандарт по товарной урожайности на 2,5–30,7 %, по лежкости плодов – на 15–110 дней и гибриды для открытого грунта, превышающие стандарт по товарной урожайности на 20,3–46,6 %, по лежкости плодов – на 15–45 дней.

Характер наследования признака «лежкость плодов томата» у гибридов открытого и защищенного грунта соответствует неполному доминированию, что свидетельствует о целесообразности использования гетерозисной селекции в создании лежких гибридов. Между

лежкостью плодов и ранней урожайностью установлена отрицательная корреляционная связь, которая изменяется с сильной на среднюю в зависимости от условий выращивания. Выявлена средняя отрицательная корреляция между лежкостью плодов и содержанием сахара в плодах томата молочной степени зрелости, между лежкостью плодов и их средней

массой, средняя положительная связь между лежкостью плодов и общей кислотностью в плодах томата молочной степени зрелости.

Создан и передан в Государственную инспекцию по сортоиспытанию и охране сортов растений первый отечественный лежкий высокопродуктивный гибрид томата F₁ «Белорусский лежкий».

Таблица 9

**Лежкость плодов тепличных форм томата,
оцененная в диаллельных скрещиваниях, дни**

Наименование образца	Год		В среднем за 2 года
	2002	2003	
Мо 950 (<i>Alc</i>) × Б-2-6	60	60	60
Мо 950 (<i>Alc</i>) × Z-1-3	40	40	40
Мо 950 (<i>Alc</i>) × № 10	31	30	30
Мо 950 (<i>Alc</i>) × № 4	76	76	76
Мо 950 (<i>Alc</i>) × Мо 948 (<i>Nor</i>)	166	160	163
Мо 950 (<i>Alc</i>) × Мо 577 (<i>Rin</i>)	138	130	134
Б-2-6 × Z-1-3	17	17	17
Б-2-6 × № 10	14	15	14
Б-2-6 × № 4	17	17	17
Б-2-6 × Мо 948 (<i>Nor</i>)	68	66	67
Б-2-6 × Мо 577 (<i>Rin</i>)	34	34	34
Z-1-3 × № 10	13	13	13
Z-1-3 × № 4	18	17	17
Z-1-3 × Мо 948 (<i>Nor</i>)	129	120	124
Z-1-3 × Мо 577 (<i>Rin</i>)	42	40	41
№ 10 × № 4	15	15	15
№ 10 × Мо 948 (<i>Nor</i>)	113	111	112
№ 10 × Мо 577 (<i>Rin</i>)	37	35	36
№ 4 × Мо 948 (<i>Nor</i>)	132	125	128
№ 4 × Мо 577 (<i>Rin</i>)	59	55	57
Мо 948 (<i>Nor</i>) × Мо 577 (<i>Rin</i>)	168	160	164
Мо 950 (<i>Alc</i>)	159	150	154
Б-2-6	16	16	16
Z-1-3	16	17	16
№ 10	16	16	16
№ 4	18	18	18
Мо 948 (<i>Nor</i>)	162	155	158
Мо 577 (<i>Rin</i>)	161	160	160
Полымя	17	18	17
HCP _{0,05}	2,4	2,8	

Таблица 10

Лежкость плодов томата открытого грунта, оцененная в диаллельных скрещиваниях, дни

Наименование образца	Год		В среднем за 2 года
	2002	2003	
17К × Leana	21	19	20
17К × Спринт	17	14	15
17К × Дубок	20	18	19
17К × Мо 950 (Alc)	46	48	47
17К × Мо 577 (Rin)	32	30	31
17К × Мо 948 (Nor)	39	35	37
Leana × Спринт	23	21	22
Leana × Дубок	21	20	20
Leana × Мо 950 (Alc)	37	35	36
Leana × Мо 577 (Rin)	40	38	39
Leana × Мо 948 (Nor)	57	55	56
Спринт × Дубок	22	20	21
Спринт × Мо 950 (Alc)	53	51	52
Спринт × Мо 577 (Rin)	35	32	33
Спринт × Мо 948 (Nor)	43	41	42
Дубок × Мо 950 (Alc)	64	62	63
Дубок × Мо 577 (Rin)	48	45	46
Дубок × Мо 948 (Nor)	52	50	51
Мо 950 (Alc) × Мо 577 (Rin)	164	159	161
Мо 950 (Alc) × Мо 948 (Nor)	160	154	157
Мо 577 (Rin) × Мо 948 (Nor)	168	157	162
17К	18	16	17
Leana	17	15	16
Спринт	14	12	13
Дубок	17	15	16
Мо 950 (Alc)	152	150	151
Мо 577 (Rin)	153	146	149
Мо 948 (Nor)	143	136	139
Доходный	18	16	17
НСР _{0,05}	2,8	2,1	

Селекция на гетерозис в открытом грунте

Создание гетерозисных гибридов для условий открытого грунта является наиболее быстрым методом селекции, позволяющим сочетать в F₁ большое число полезных признаков (раннеспелость, устойчивость к заболеваниям и вредителям, повышенная завязываемость и

др.). А.В. Кильчевским и др. в БГСХА проведен цикл топкроссных и диаллельных скрещиваний для выделения перспективных гибридных комбинаций в условиях открытого грунта. В результате этой работы отобраны, а впоследствии районированы в условиях Беларуси, два скороспелых гибрида F₁ Мазурка и Горецкий (Табл. 11).

Таблица 11

Ранняя и товарная урожайность изучаемых форм томата в открытом грунте

Наименование образца	Ранняя урожайность, ц/га				Товарная урожайность, ц/га			
	1998 г.	1999 г.	2000 г.	Среднее за 3 года	1998 г.	1999 г.	2000 г.	Среднее за 3 года
Спринт × Арго	97,0	126,4	21,7	81,7	168,8	563,0	266,7	332,8
17К × Калинка (Горецкий F ₁)	104,0	79,0	23,3	68,7	175,3	796,7	266,8	412,9
Спринт × Резерв	113,4	65,4	28,7	69,1	159,0	579,4	187,1	308,5
17К × Atma	100,5	72,3	21,6	64,8	181,1	662,7	215,8	353,2
Спринт × Калинка (Мазурка F ₁)	87,8	93,6	17,5	66,3	188,1	726,0	260,4	391,5
17К × Арго	79,0	86,7	29,3	65,0	103,5	573,8	221,8	299,7
Калинка	0	25,2	16,7	13,9	130,2	758,4	131,6	340,0
Atma	0	21,5	17,5	13,0	97,0	444,0	241,7	260,9
Линия 17К	0	42,2	21,9	21,3	157,6	603,5	208,7	323,2
Спринт	73,7	148,3	80,3	100,7	122,2	416,7	161,2	233,3
Доходный	0	57,1	32,1	29,7	118,5	453,6	253,5	275,2
НСР _{0,05}	51,3	42,6	11,3	26,9	59,8	175,5	93,9	

Заключение

Цикл работ, выполненных по созданию гетерозисных гибридов томата для открытого грунта и пленочных теплиц, позволил получить важную научную информацию по частной генетике томата, усовершенствовать схемы селекции и семеноводства, а также получить ряд гибридов, районированных в нашей республике.

Впервые у самоопылителей разработан метод реципрокного периодического отбора на основе межсортового гибрида, позволяющий на основе внутрисортового полиморфизма по комбинационной способности повысить продуктивность исходного гибрида путем отбора лучших межлинейных комбинаций.

Разработан и апробирован на числовых моделях и в реальном эксперименте метод реципрокных тестеров, позволяющий максимально

использовать эффекты сверхдоминирования в гетерозисной селекции растений.

Выявлены особенности наследования признаков урожайности, партенокарпии, лежкости в системе диаллельных скрещиваний.

На основе изучения биологии цветения форм с функциональной мужской стерильностью разработана система семеноводства гетерозисных гибридов томата, исключаящая кастрацию, маркировку и изоляцию цветков, что позволяет уменьшить затраты при производстве гибридных семян в 11 раз.

Впервые в Беларуси созданы гибриды на основе ФМС и партенокарпии, а также лежкие гибриды.

Результативность селекции томата на гетерозис белорусских селекционеров отражена в таблицах 12, 13.

Таблица 12

Районированные сорта и гибриды томата, созданные при участии ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

Культура	Сорт	Авторы	Год районирования
Томат	Старт F ₁	ИО, ИГЦ	1997
	Польмия F ₁	БГСХА, ИГЦ	1998
	Зорка	БГСХА, ИГЦ	2001
	Гарант	БГСХА, ИГЦ	2001
	Шторм F ₁	ИО, ИГЦ	2003
	Горецкий F ₁	БГСХА, ИГЦ	2004
	Мазурка F ₁	БГСХА, ИГЦ	2004
	Даша F ₁	БГСХА, ИГЦ	2005
	Евро F ₁	ИО, ИГЦ	2006
	Александр F ₁	БГСХА, ИГЦ	2007

Таблица 13

Сорта и гибриды томата, находящиеся в Госсортоиспытании

Культура	Сорт	Авторы	Год передачи в ГСИ	Место испытаний
Томат	Соната F ₁	БГСХА, ИГЦ	2004	ГСИ Беларуси
	Пионер F ₁	БГСХА, ИГЦ	2004	ГСИ Беларуси
	Белорусский лежкий F ₁	БГСХА, ИГЦ	2006	ГСИ Беларуси
	Адапт F ₁	БГСХА, ИГЦ	2006	ГСИ Беларуси
	Капля F ₁	ИО, ИГЦ	2006	ГСИ Беларуси
	Эллипс F ₁	ИО, ИГЦ	2006	ГСИ Беларуси
	Бум F ₁	ИО, ИГЦ	2007	ГСИ Беларуси
	Глянец	БГСХА, ИГЦ	2007	ГСИ Беларуси
	Сторадж F ₁	ИГЦ, БГСХА	2007	ГСИ Беларуси

Всего районировано 8 гибридов томата для теплиц и открытого грунта, испытывается в Госсортоиспытании 8 гибридов. Кроме того, создано и районировано 2 сорта и один находится в Госсортоиспытании.

Таким образом, разработка генетических основ селекции гетерозисных гибридов томата и совершенствование селекционно-семеноводческого процесса обеспечили высокую результативность селекции.

Список использованных источников

1. Хотылева, Л.В. Повышение продуктивности межсортовых гибридов томата путем реципрокного отбора линий на комбинационную способность / Л.В. Хотылева, А.В. Кильчевский // Доклады АН БССР. – 1981. – Т. 25, № 5. – С. 463–465.

2. Кильчевский, А.В. Эффективность первого цикла реципрокного периодического отбора у томатов: автореф. дис... канд. биол наук: 03.00.15 / А.В. Кильчевский – Минск, 1982. – 18 с.
3. Хотылева, Л.В. Эффективность первого цикла реципрокного периодического отбора на основе межсортового гибрида томата / Л.В. Хотылева, А.В. Кильчевский // Генетика. – 1984. – Т. 20, № 9. – С. 1511–1518.
4. Хотылева, Л.В. Использование реципрокного периодического отбора в гетерозисной селекции томата / Л.В. Хотылева, А.В. Кильчевский // Генетика и селекция (НРБ, София) – 1985. – Т. 18, № 3. – С. 211–216.
5. Кильчевский, А.В. Эффективность первого цикла реципрокного периодического отбора у томатов: дис... канд. биол наук. – Бел. с.-х. акад., Горки, 1982. – 115 с.
6. Кильчевский, А.В. Разработка метода реципрокных тестеров с целью создания оптимального генофонда исходных популяций для реципрокного периодического отбора / А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева // Прогрессивные приемы агротехники овощных и плодовых культур. Сб. науч. тр.– Горки, 1985. – С. 12–18.
7. Методические указания по селекции сортов и гетерозисных гибридов овощных культур. Л.: ВИР, 1974. – 213 с.
8. Методические указания по селекции и семеноводству овощных культур, возделываемых в защищенном грунте (томаты, перцы). – М.: ВИР, 1976. – 85 с.
9. Методические указания по селекции сортов и гибридов томата для открытого и защищенного грунта. – М.: ВАСХНИЛ, 1986. – 113 с.
10. Hayman, B.I. The theory and analysis of diallel crosses: I. / B.I. Hayman // Genetics. – Vol. 39, 1954. – P. 789–809.
11. Мазер, К. Биометрическая генетика / К. Мазер, Дж. Джинкс. – М.: Мир, 1985. – С. 313–354.
12. Griffing, B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems / B. Griffing // Australian J. Biol. Sci. – Vol. 9, 1956. – P. 463–493.
13. Kempthorne, O. An introduction to genetic statistics / O. Kempthorne // N.Y., 1957. – P. 468 – 472.
14. Хотылева, Л.В. Реципрокный периодический отбор при создании гетерозисных гибридов тепличного томата / Л.В. Хотылева, Л.А. Тарутина, Л.А. Мишин // Тез. докл. научно-практич. конф. «Проблемы селекции овощных культур», 29–30 июля 1997 г., Минск. – С. 38–39.
15. Тарутина, Л.А. Использование методов периодического отбора для улучшения гибридов тепличного томата / Л.А. Тарутина, Л.А. Мишин, И.Б. Капуста, В.Н. Кавцевич, Л.В. Хотылева // Матер. докл., сообщ. Международного симпозиума «Современное состояние и перспективы развития селекции и семеноводства овощных культур», 9–12 августа 2005 г., Москва, 2005, ч. II. – С. 474–476.
16. Добродькин, М.М. Создание партенокарпических гетерозисных гибридов томата для пленочных теплиц на основе функциональной мужской стерильности: дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.05 / М.М. Добродькин. – Горки, 2004. – 156 с.
17. Кильчевский, А.В. Взаимодействие генотипа и среды в селекции растений (на примере овощных культур и картофеля): дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.15; 06.01.05 / А.В. Кильчевский. – Горки, 1993. – 325 с.
18. Коготько, Л.Г. Создание и оценка исходного материала для селекции сортов томата в открытом грунте с минимальным накоплением нитратов: дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.05 / Л.Г. Коготько. – Горки, 2003. – 133 с.
19. Джордж, Асмар Асмар. Анализ наследования признаков продуктивности и проявления партенокарпии у томата: дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.05 / Асмар Асмар Джордж. – Горки, 1993, – 163 с.
20. Хотылева, Л.В. Генетический контроль основных компонентов раннего и общего урожая тепличных томатов / Л.В. Хотылева, Л.А. Тарутина, С.И. Посканная, И.Б. Капуста, Л.А. Мишин // Весці АН Беларусі, сер. біял. навук. – № 4, 1994. – С. 29–33.
21. Тарутина, Л.А. Генетические компоненты изменчивости и их связь с гетерозисом у тепличных томатов (*Lycopersicon esculentum* М.) / Л.А. Тарутина, И.Б. Капуста, Л.В. Хотылева, С.И. Посканная, Л.А. Мишин // Весці НАН Беларусі, сер. біял. навук. – № 3, 1999. – С. 45–48.
22. Тарутина, Л.А. Влияние маркерных генов на генетические параметры полигенной

- изменчивости у гибридов тепличных томатов / Л.А. Тарутина, В.Н. Кавцевич, С.И. Посканная, Л.В. Хотылева, И.Б. Капуста // Доклады НАН Беларуси. – Т. 44, № 1, 2000. – с. 72–75.
23. Хотылева, Л.В. Эпистаз и гетерозис у гибридов тепличного томата / Л.В. Хотылева, Л.А. Тарутина, И.Б. Капуста, Л.А. Мишин // Агрэкологія. Сб.научн.тр. Вып. 2. «Экологические основы плодовоовощеводства». – Горки, 2005. – С. 143–146.
24. Тарутина, Л.А. Наследование признаков продуктивности у топкроссных гибридов F_1 сливовидных томатов (*Lycopersicon esculentum* Mill.) / Л.А. Тарутина, Л.А. Мишин, И.Б. Капуста, Л.В. Хотылева // Весці НАН Беларусі, сер. біял. навук. – № 1, 2008. – С. 34–38.
25. Kilchevskiy, A.V. Evaluation of the F_1 tomato hybrids on the basis of the forms with position male sterility in non heated plastic green houses / A.V. Kilchevskiy // Abstracts XIV EUCARPIA congress. Adaptation in Plant Breeding. Iyvascula (Finland), 1995. – P. 34.
26. Кильчевский, А.В. Создание партенокарпических гетерозисных гибридов F_1 помидоров для теплиц на базе функциональной мужской стерильности / А.В. Кильчевский, А.И. Новицкий // Селекция овощных и бахчевых культур на гетерозис. – Харьков, 1996. – С. 26.
27. Кильчевский, А.В. Изучение гетерозисных гибридов F_1 томата на основе форм с функциональной мужской стерильностью в пленочных необогреваемых теплицах / А.В. Кильчевский, А.И. Новицкий // Овощеводство. – Минск, 1996. – Вып. 9. – С. 34–37.
28. Кильчевский, А.В. Гетерозисная селекция томата на основе ФМС / А.В. Кильчевский, А.И. Новицкий, М.М. Добродькин // Гетерозис сельскохозяйственных растений. – Москва, 1997. – С. 47–48.
29. Кильчевский, А.В. Изучение партенокарпических гетерозисных гибридов F_1 томата на основе функциональной мужской стерильности в пленочных необогреваемых теплицах / А.В. Кильчевский, М.М. Добродькин // Состояние и перспективы развития плодородства и овощеводства в современных условиях. – Горки, 1998. – С. 23–28.
30. Кильчевский, А.В. Селекция гетерозисных гибридов томата. Монография / А.В. Кильчевский, В.В. Скорина. – Минск, 2005. – 217 с.
31. Кильчевский, А.В. Изучение гибридов томата с повышенной лежкостью плодов в топкроссных скрещиваниях в открытом грунте / А.В. Кильчевский, Е.Ю. Иванцова, М.М. Добродькин // Материалы международной научно-практической конференции «Приоритетные направления в селекции и семеноводстве сельскохозяйственных растений в XXI веке». – М., 2003. – С. 199–201.
32. Иванцова, Е.Ю. Оценка комбинационной способности генотипов томата по признаку «лежкость плодов» / Е.Ю. Иванцова, А.В. Кильчевский // Материалы докладов международного симпозиума «Современное состояние и перспективное развитие селекции и семеноводства овощных культур» Т. 2. – М., 2005. – С. 201–203.
33. Иванцова, Е.Ю. Наследование признаков урожайности и лежкости плодов у томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.) в открытом грунте / Е.Ю. Иванцова, А.В. Кильчевский // Весці НАН Беларусі, сер. біял. навук. – 2007. – № 2. – С. 36–40.

Дата поступления статьи 4 декабря 2008 г.

И.А. Гордей¹, С.И. Гордей², Э.П. Урбан²

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СЕЛЕКЦИИ ГИБРИДНЫХ СОРТОВ РЖИ (*SECALE CEREALE* L.)

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
² РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию»
Республика Беларусь, 222160, г. Жодино, ул. Тимирязева, 1

Введение

Использование эффекта гетерозиса как средства повышения потенциала продуктивности сельскохозяйственных культур в настоящее время является одним из наиболее приоритетных направлений исследований в области генетики и селекции. Превосходство поколения F_1 по ряду признаков от скрещивания генетически дивергентных форм одного вида описано еще в 19-ом веке Ч. Дарвиным и Г. Менделем. Это явилось началом последующей разработки теории гетерозиса учеными разных стран и практического его использования для разных видов культурных растений [1]. К началу 21-го столетия гетерозисные гибриды F_1 созданы для большинства культур. Установлено, что более высокий гетерозисный эффект дают перекрестноопыляющиеся виды. Рожь в этом отношении не является исключением.

История теоретических и практических разработок по генетике и селекции гетерозисных гибридов F_1 озимой ржи начинается с 50-х годов прошлого столетия, когда Путтом впервые были описаны мужски стерильные растения, найденные им в популяциях и выдвинута идея возможного их использования при создании новых сортов ржи. В настоящее время эта культура занимает лидирующее положение среди злаков с точки зрения практического использования эффекта гетерозиса. Уровень конкурсного гетерозиса (превосходство над стандартным сортом) современных гибрид-

ных сортов в условиях производства составляет 15–20 %.

Успех создания и внедрения гибридных сортов ржи был достигнут во многом благодаря решению ряда проблем, труднопреодолимых при работе с перекрестноопыляющейся и самонесовместимой культурой. Основные задачи при селекции гетерозисных гибридов F_1 озимой ржи следующие:

- Создание коллекций селекционно-ценных инцухт-линий с высокой комбинационной способностью и слабым проявлением инбредной депрессии в поколениях;
- Выявление закрепителей стерильности и восстановителей фертильности;
- Создание систем цитоплазматической мужской стерильности – ЦМС – (закрепитель стерильности + мужски стерильный аналог закрепителя стерильности / ♀/, восстановитель фертильности / ♂/);
- Разработка эффективной методики размножения материнских мужски стерильных (МС) компонентов гибридных сортов;
- Разработка экономически целесообразной схемы получения гибридных семян и системы семеноводства гибридных сортов.

Следует отметить, что с генетической точки зрения наибольший интерес представляют собой первые три задачи, решение которых является основой создания гибридного сорта ржи. Последние две задачи носят в большей степени методико-организационный характер.

Материалы и методы

Методическая схема создания систем ЦМС и гибридных сортов ржи представлена на рисунке 1 [2].

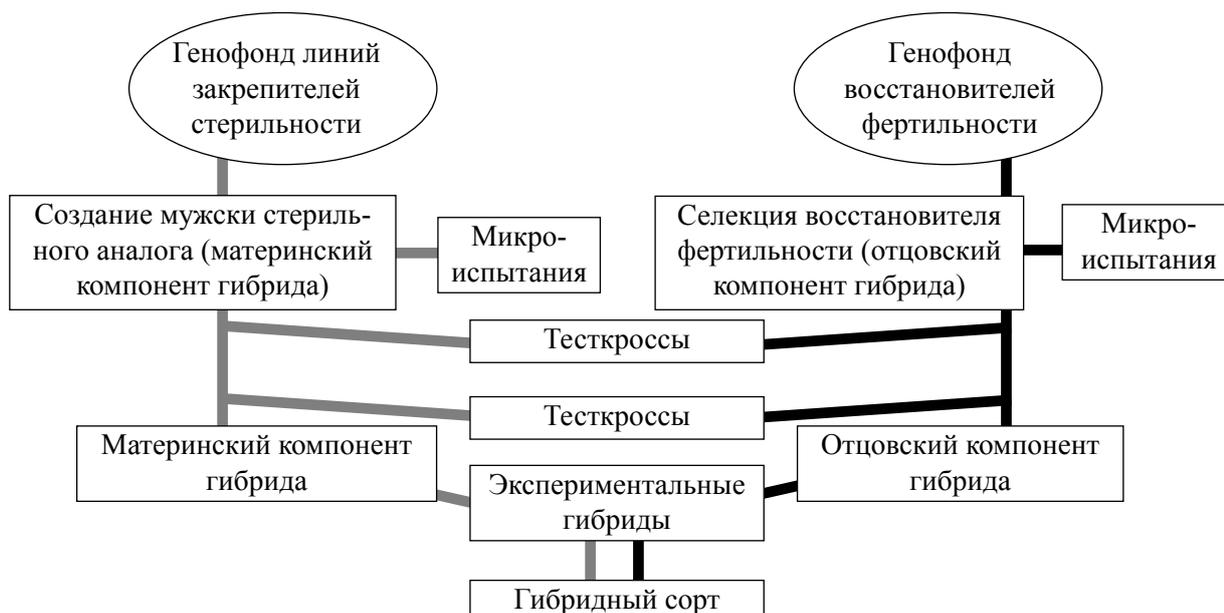


Рис. 1. Методическая схема создания гибридных сортов ржи.

Исходным материалом для исследований служили более 100 генотипов мужски стерильных форм (тип ЦМС – Рапра), 70 инцухт-линий озимой диплоидной ржи ($2n=14$) западноевропейского происхождения, предоставленные Институтом селекции и акклиматизации растений (Польша, 1994 г.). Мужски стерильные линии G-типа «Gülzower-1» предоставлены немецкой селекционной фирмой «Pflanzenzüchtung GmbH» (2001 г.). Для создания систем ЦМС использовали коллекцию самоопыленных линий ИГЦ НАН Беларуси, а также сорта и гибриды белорусской селекции.

При создании систем ЦМС одним из основных требований является оценка уровня стерильности/фертильности исходного материала, родительских компонентов и гибридов F_1 . Уровень фертильности оценивался в баллах по шкале Гейгера (от 0 до 9) визуально по степени выброса пыльников из цветков во время цветения: 0-3 балла – стерильные, 4-5 – полуфертильные, 6-9 фертильные [3]. Для оценки фертильности пыльцы, во время цветения фиксировали цветки ржи в 70 %-ном этиловом спирте по 8-10 цветков с колоса, с 3-4 растений каждой линии. Изучали фертильность под микроскопом на ацетокарминовых препаратах. Учитывали до 500 пыльцевых зерен.

Помимо шкалы Гейгера, нами предложена 4-х балльная оценка степени редукции пыльников: 4 балла – нормальные пыльники; 3 – слаборедуцированные (2/3 от длины нормальных); 2 – среднередуцированные (1/2 от длины нормальных) и балл 1 – сильноредуцированные (менее 1/3 длины нормально развитых пыльников).

При создании систем ЦМС выделение закрепителей стерильности и восстановителей фертильности проводили методом испытания по потомству. У гибридов F_1 от скрещиваний МС-тестера с инцухт-линией (сортом, гибридом) анализировали уровень фертильности пыльцы. Отцовский компонент фертильного гибрида является восстановителем фертильности, стерильного – закрепителем стерильности.

У линий, сортов и гибридов анализировали следующие количественные признаки: зимостойкость, устойчивость к основным грибным заболеваниям, устойчивость к полеганию, выровненность, высота растений, кустистость, урожайность, масса зерна с колоса и растения, масса 1000 зерен, озерненность колоса. Уровень гетерозиса (%) определяли по отношению к стандартному сорту (конкурсный гетерозис).

Результаты и обсуждение

1. Создание коллекций самоопыленных линий ржи

Основным барьером при создании самоопыленных линий ржи является самонесовместимость и проявление инбредной депрессии в поколениях. Преодоление данного барьера стало возможным за счет использования источников самофертильности, найденных в ряде популяций ржи. С использованием молекулярно-генетических методов исследований локализован ряд мутаций самофертильности: Sf1(1R); Sf2(2R); Sf3(4R); Sf5(5R); Sf4(6R). 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. На основе источников самосовместимости создаются коллекции селекционно-ценных линий с высоким уровнем самофертильности и слабым проявлением инбредной депрессии. Следует отметить, что за последние 25 лет, в процессе создания самоопыленных линий ржи, удалось существенно сократить разницу в продуктивности между родительскими компонента-

ми и гибридными сортами (Рис. 2). Если разница в продуктивности в середине 70-х годов составляла 207 %, то в начале текущего столетия она сократилась до 139 %.

Основные этапы создания самоопыленных линий ржи следующие:

- гибридизация с источником самофертильности (Sf, Zf) и самоопыление гибридных растений (S1-S5);
- отбор линий на продуктивность (начиная с F₂);
- оценка линий на ОКС и СКС;
- выявление закрепителей стерильности (S/rf) и восстановителей фертильности (N/Rf; S/Rf);
- маркирование созданных самофертильных линий функциональной частью генома (запасными белками – секалинами).

В ИГЦ НАН Беларуси селектирован источник самосовместимости «Л-353». На его основе создана коллекция самофертильных линий, характеризующихся высокой озерненностью при последовательном самоопылении и незначительной инбредной депрессией [4].

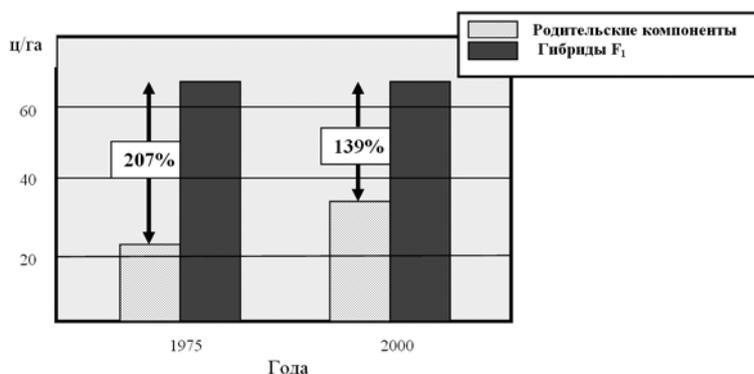


Рис. 2. Динамика урожайности родительских компонентов (инцухт-линий) и гетерозисных гибридов F₁ озимой ржи.

Актуальным направлением исследований является также использование уже созданных на самофертильной основе гибридных сортов ржи для получения новых инцухт-линий. Поскольку гетерозисные гибриды являются носителями генов самофертильности, отпадает необходимость кастрации и гибридизации с донором Sf генов, что сокращает сроки создания новых инцухт-линий. В Германии и Польше создан достаточ-

но большой генофонд гетерозисных гибридов F₁ различного экологического происхождения, который может служить исходным материалом для создания новых инцухт-линий. Нами проведено принудительное самоопыление отдельных растений поколения I₁ от скрещивания «Юбилейная × Л-353» и гибридных сортов ржи западно-европейской селекции на генетической основе ЦМС Р – и G-типов (Табл.1).

Видно, что уже в F_1 выражена экспрессия генов самофертильности комбинации скрещивания «Юбилейная × Л-353» при относительно низкой вариации озерненности колоса. Изученные формы характеризовались также высокой массой 1000 зерен. Аналогичные результаты получены при использовании ряда других популяционных сортов, опыленных донором генов самофертильности (Л-353): Зарница, Ясельда, Нива и Талисман.

Самоопыление гетерозисных гибридов F_1 также показало высокий уровень самосовместимости. 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: 30,6 % – 100,0 %; в то время как для гибридов на основе Р-ЦМС – от 4,7 % до 93,4 %.

Таблица 1

Уровень самофертильности линий F_1 (Юбилейная × Л-353) и гетерозисных гибридов F_1 Р- и G-типов озимой ржи при самоопылении

№ п/п	Комбинация скрещивания, гибриды	Кол-во линий, гибридов, шт	Проанализировано цветков, Σ	Кол-во зерен, Σ	Уровень самофертильности, %	
					Lim	Среднее
1.	Юбилейная – контроль		682	0	0 - 0	0
2.	Юбилейная × Л-353	11	840	496	40,8-78,3	59,0
3.	Гибриды F_1 (Пампа)	26	1642	938	4,7-93,4	57,1
4.	Гибриды F_1 (G-тип)	111	6882	5175	30,6-100,0	75,2

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 череззернице и большей восприимчивости к спорынье. Для G-ЦМС, как известно, не возникает проблем с восстановлением фертильности пыльцы у гибридов.

Результаты наших исследований подтверждают эффективность метода получения инцухт-линий с использованием гибридных сортов ржи с целью расширения генофонда исходного материала для создания гетерозисных гибридов F_1 . Применение данного подхода сокращает сроки и трудоемкость создания новых самоопыленных линий. Поскольку родительскими компонентами гибридных сортов являются селекционно-ценные генотипы, то последующее использование таких инцухт-линий облегчит процессы выделения закрепителей стерильности, восстановителей фертильности, выявления высококомбинаци-

онных форм, создания селекционно-ценных систем ЦМС и гетерозисных гибридов F_1 . 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.

На основании вышеизложенного следует вывод, что эффект генов самофертильности более выражен у гетерозисных гибридов F_1 G-типа. Их использование на 1-2 года сокращает сроки создания новых инцухт-линий. 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 селекции гибридных сортов важное значение имеет идентификация инбредных линий,

контроль их генетической чистоты и оценка на гибридность семян межлинейных гибридов F_1 . Для этого ранее использовали морфологические маркеры. Принципиально новые возможности открывают молекулярно-генетические (белковые и ДНК) маркеры. Молекулярно-генетические маркеры позволяют проводить:

- идентификацию инбредных линий;
- оценку инбредных линий на генетическую однородность;
- оценку на гибридность семян F_1 ;
- оценку гибридных сортов по критериям отличительности, однородности и стабильности (ООС);
- прогнозирование эффекта гетерозиса по степени дивергентности линий по белковым и ДНК-маркерам.

2. Создание систем цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) и гибридов F_1 озимой ржи

Практическая работа по селекции гетерозисных гибридов F_1 озимой ржи ведётся с начала 70-х годов прошлого века благодаря открытию генетических систем цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС), позволившими избежать ручной кастрации материнских компонентов гибридов F_1 [3].

Современные методы исследований позволили в большой степени изучить молекулярно-генетическую природу признака ЦМС. Установлено, что ЦМС связана с реорганизацией митохондриального генома. Множественные рекомбинации мтх-ДНК приводят к образованию химерных генов (или новых полицистронных транскриптов), которые обнаружены практически у всех исследованных ЦМС-форм. При ЦМС проявляется множественность сайтов инициации и терминации транскрипции, нарушается РНК-редактирование (эдитинг) и трансляция ЦМС-генов. В ряде случаев удалось выяснить происхождение всех фрагментов химерных генов, однако чаще всего источник ряда последовательностей неизвестен. Установлено, что мутантный митохондриальный геном корректируют ядерные *ms (rf)* гены – восстановители фертильности. Причем эта коррекция может происходить на разных этапах: от репликации ДНК до взаимодействия с ЦМС-белками. Гены восстановители фертильности влияют на: репликацию мтх-ДНК, транскрипцию аномальных мтх-генов, процессинг РНК мтх-генов, РНК-редактирование (эдитинг),

трансляцию аномальных мтх-генов, а также посттрансляционные процессы. Гены восстановители фертильности разных ЦМС-систем могут снижать количество полноразмерных транскриптов ЦМС-генов, влияя на РНК-процессинг и РНК-эдитинг, изменять число копий митохондриальных ДНК, несущих ЦМС-гены, и уменьшать количество продуктов ЦМС-генов, действуя посттрансляционно [5]. Неясно пока, какие механизмы лежат в основе взаимодействия мутантного митохондриального генома и ядерных *ms (rf)* генов, а также в целом генетических систем ЦМС и самофертильности у ржи.

Известен ряд типов ЦМС, найденных в различных популяциях ржи: P, R, G, C, A, V. Наиболее изученными с генетической точки зрения являются ЦМС P– («Пампа») и G– («Gülzower») типов. В настоящее время зарегистрировано 22 гибридных сорта с использованием ЦМС P-типа, 4 из которых (Marder, Picasso, Лобел-103 и Галинка) районированы в Беларуси. В ФРГ зарегистрированы гибридные сорта ржи Novus и Hellvus, созданные на генетической основе G-ЦМС. Остальные типы ЦМС не получили широкого распространения в практической селекции.

Широкое практическое использование ЦМС P-типа, открытой в своё время Гейгером, объясняется высокой частотой генов закрепления стерильности в популяциях ржи, в связи с чем MS-формы легко поддерживать в поколениях. Пока не установлено точное число ядерных генов, контролирующих P-ЦМС. Л. Мадей установил, что этот тип мужской стерильности представляет собой результат взаимодействия стерильной цитоплазмы и двух ядерных генов. Более сложную модель представил Рубенбауэр. Он утверждает, что данный тип ЦМС контролируется стерильной цитоплазмой и, по крайней мере, 4-мя ядерными генами мужской стерильности, которые он обозначил ms_1 ; ms_2 ; ms_3 ; ms_4 . Согласно результатам исследований с использованием технологии ПДРФ, P-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.

Л. Мадэй и Х. Гайгер установили, что восстановление фертильности происходит при доминантном состоянии *Ms* генов. Согласно результатам исследований Г. Мельца, восста-

новление фертильности происходит при рецессивном состоянии ms генов [6].

Недостатком Р-ЦМС является низкая частота генов восстановления фертильности. В настоящее время у известных коммерческих гибридов F_1 , как правило, индекс восстановления фертильности относительно невысок, что приводит к пониженной озерненности колоса и восприимчивости к спорынье, особенно при дождливой погоде во время цветения.

Проведенные нами исследования показали, что индекс восстановления фертильности у

гибридов F_1 зависит как от отцовского, так и материнского компонента (Табл. 2)

Видно, что в отдельных комбинациях при использовании популяционного сорта Калинка, уровень фертильной пыльцы был низким: 1,5 %, 30,6 %. При таком уровне фертильности пыльцы пыльники, как правило, не растрескиваются и процесс опыления не происходит. Полученные данные согласуются с результатами других исследователей, использовавших исходный материал из западноевропейских популяций [7].

Таблица 2

Уровень восстановления фертильности пыльцы (%) у гибридов F_1 озимой ржи

МС- Линия, ♀	Восстановитель фертильности, ♂				Среднее
	4-1	25-1	17-3	Калинка	
МС-7	97,0±1,2	96,3±1,3	81,5±2,5	91,0±1,8	91,5
МС-2	90,2±1,8	87,5±2,3	75,7±3,5	30,6±2,5	71,0
МС-13	76,2±2,7	65,5±2,8	62,6±4,4	68,6±2,7	68,2
МС-24	69,7±3,0	60,7±2,6	63,7±3,5	57,5±2,4	62,9
МС-5	22,4±2,8	24,3±2,3	18,6±2,7	1,5±0,5	16,7
Среднее	71,1	66,9	60,4	49,8	62,1

Установлено, что ЦМС G-типа контролируется одним основным ядерным геном восстановления фертильности ms_1 , локализованным на хромосоме 4RL и двумя генами-модификаторами на хромосомах 3R (ms_2), 6R (ms_3). Основным барьером при создании систем ЦМС G-типа является крайне низкая частота генов закрепления стерильности в популяциях ржи (не более 1 %).

Наиболее высокий эффект гетерозиса с использованием G-ЦМС достигается при создании линейно-популяционных гибридов. Высокая частота генов восстановления фертильности пыльцы в популяциях обеспечивает высокий индекс восстановления при использовании популяционных сортов в качестве отцовских компонентов гибридов независимо от материнского генотипа.

Результаты изучения 17 гибридов F_1 на основе G-ЦМС немецкой селекции в питомнике микроиспытания (пл. деланки – 1 м² без повторностей, 200 зерен/м²) показали, что боль-

шинство генотипов характеризовались слабой зимостойкостью, что явилось основной причиной их низкой зерновой продуктивности (Табл. 3).

Положительный эффект конкурсного гетерозиса первых четырех гибридов обусловлен повышенной продуктивной кустистостью при относительно высокой зимостойкости и устойчивости к основным грибным заболеваниям. Анализ фертильности пыльцы показал, что все гибриды характеризовались высоким индексом восстановления: 89,8 – 100 %.

Установлено, что основным барьером при создании гетерозисных гибридов ржи на генетической основе G-ЦМС является низкая частота генов закрепления стерильности в популяциях. Скрещивание МС-тестеров G-типа с 350 инцухт-линиями из коллекции ИГЦ НАН Беларуси позволило выделить только два закрепителя стерильности. Остальные линии оказались восстановителями фертильности с индексом восстановления от 72,5 % до 100 %.

Таблица 3

**Селекционно-генетическая характеристика гибридов F₁ на основе G-ЦМС
в условиях Беларуси**

№	Гибриды F ₁	Зимостой- кость, %	Поражение мучнистой росой, (1-9) 1-устойч. 9-воспр.	Поражение бурой ржавчиной, (1-9)	Урожай- ность, г/м ²	Уровень конкурсного гетерозиса, %
	Радзима – ст.	73,0	2	1	672	
1.	H1/Hell38	71,0	2	2	830	23,5
2.	D1/1361/00	67,0	2	2	720	7,1
3.	D1/1363/00	73,0	2	1	710	5,7
4.	D1/1365/00	68,5	1	1	700	4,2
5.	D1/1367/00	43,5	1	1	500	– 25,6
6.	D1/1380/00	59,0	2	1	630	– 6,2
7.	D1/1404/00	38,6	1	1	260	– 61,3
8.	D1/1476/00	34,8	3	1	190	– 71,7
9.	D1/1107/sp	42,4	1	2	480	– 38,6
10.	D1/1124/sp	33,3	4	1	220	– 67,3
11.	D1/1338/sp	36,7	2	3	210	– 68,6
12.	D1/1350/sp	39,5	2	2	375	– 44,2
13.	D1/1365/sp	51,0	2	1	435	– 35,3
14.	D1/1367/sp	53,4	2	2	450	– 33,0
15.	D1/1371/sp	63,5	1	3	550	– 18,2
16.	D1/1380/sp	62,5	1	1	570	– 15,2
17.	D1/1609/01	43,4	2	1	360	– 46,4

Установлено, что для МС-форм G-типа характерна сильная редукция пыльников независимо от генотипа. У МС-линий P-типа в зависимости от генотипа к моменту цветения пыльники формируются от слабо- до сильно-редуцированных. На основании результатов наших исследований можно сделать вывод, что для ЦМС G-типа характерны менее значимые функциональные нарушения в митохондриальном геноме по сравнению с P-типом, что способствует более легкому восстановлению фертильности пыльцы у гибридов F₁. Более сложный контроль P-ЦМС ядерными генами и более выраженные нарушения в митохондриальном геноме обуславливают относительно легкое закрепление стерильности в поколениях и затрудняют восстановление фертильности, что является причиной варьирования уровня редукции пыльников у МС-линий данного типа ЦМС.

Существенным недостатком при создании гибридных сортов с использованием G-ЦМС является слабая зимостойкость доноров ЦМС. Как правило, большинство популяций ржи западно-европейского происхождения характеризуются повышенной чувствительностью к низким температурам во время перезимовки. Крайне низкая частота генов закрепления стерильности для G-ЦМС в популяциях сдерживает создание нового генофонда МС-линий с высокой морозоустойчивостью. Проведенная нами гибридизация линий закрепителей стерильности с донорами высокой зимостойкости, выделенных из белорусских и восточно-европейских популяций ржи пока не позволила получить эффективные высокзимостойкие закрепители стерильности для G-ЦМС.

Исходя из вышеизложенного, нами выделены основные отличительные особенности систем ЦМС: P- и G-типов (Табл. 4).

Таблица 4

Отличительные особенности ЦМС G- и P-типов

№	G-тип	P-тип
1.	Низкая частота генов закрепления стерильности в белорусских популяциях ржи	Низкая частота генов восстановления фертильности в белорусских популяциях ржи
2.	Высокий индекс восстановления фертильности пыльцы у гибридов F ₁ независимо от родительских компонентов (85-100 %)	Варьирование индекса восстановления фертильности пыльцы у гибридов F ₁ в зависимости от материнского и отцовского компонентов (от 1,5 % до 92 %)
3.	Сильная редукция пыльников у MC-форм	Варьирование степени редукции пыльников у MC-форм от сильно- до средне- и слабoredуцированных
4.	Более высокий уровень гетерозиса достигается у линейно-популяционных гибридов F ₁	Более высокий уровень гетерозиса обеспечивают тройные гибриды F ₁ (MC-гибрид × сорт-синтетик)
5.	Гибриды F ₁ более устойчивы к спорынье благодаря высокому индексу восстановления фертильности пыльцы	Гибриды F ₁ менее устойчивы к спорынье из-за пониженного индекса восстановления фертильности пыльцы
6.	Более полная экспрессия генов ЦМС	Менее выраженная экспрессия генов ЦМС из-за более сложного генетического контроля признака ЦМС

3. Практические результаты

В результате проведенных исследований по использованию эффекта гетерозиса у ржи, нами создан ряд систем ЦМС P-, G-типов и гетерозисных гибридов F₁. Выделены селекционно-ценные генотипы

родительских компонентов гибридных сортов. По результатам испытаний новых гибридов F₁, был выделен высоко гетерозисный гибрид F₁ от скрещивания мужски стерильной линии (MC-2 – ♀) с популяцией: Валдай × Каупо – ♂ (Табл. 5).

Таблица 5

Селекционно-генетическая характеристика гибридов F₁ озимой ржи (2006-2007 гг.)

№	Гибриды	Поражение сн. плесенью, балл	Продуктивный стеблестой (шт/1 м ²)	Урожайность, ц/га	± ц/га
	Зарница – ст.	3,4	567	49,1	
1.	MC-2 × Каупо	3,6	538	49,6	0,5
2.	MC-2 × Лота	9,0	406	44,8	– 4,3
3.	MC-4 × Лота	8,8	388	42,2	– 6,9
4.	MC-4 × Каупо	2,0	424	47,6	– 1,5
5.	MC-2 × (Валдай × Каупо)	2,0	590	62,1	13,0
6.	MC-2 × PC-2	1,0	544	52,0	2,9
7.	MC-4 × (Валдай × Каупо)	2,0	522	51,9	2,8
8.	MC-4 × PC-2	1,8	612	56,0	6,9
	HCP _{0,05}			4,8 ц/га	

Как видно из таблицы, вышеуказанная комбинация показала достоверное превышение по продуктивности над стандартом. Эффект конкурсного гетерозиса составил 26,5 %.

Данный гибридный сорт, созданный совместно ГНУ «Институт генетики и цитоло-

гии НАН Беларуси» и РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию», в 2007 году передан в Госсортоиспытание Беларуси под названием Плиса F₁, методическая схема создания которого представлена ниже (Рис. 3).

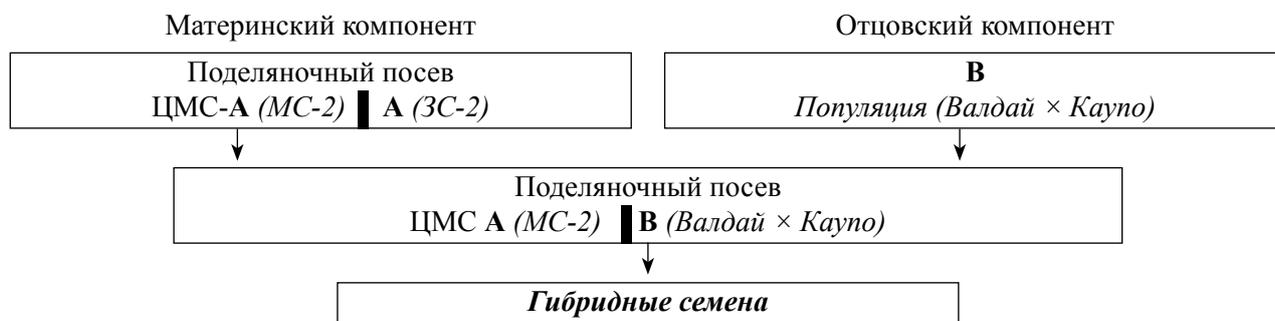


Рис. 3. Схема создания линейно-популяционного гибридного сорта Плиса F₁.

Результаты исследований показали, что конкурсный гетерозис у гибридных сортов проявляется по числу продуктивных стеблей на 1 м² и в меньшей степени по числу зерен в колосе и массе 1000 зерен (Табл. 6).

Таблица 6

Хозяйственно-биологическая характеристика нового линейно-популяционного сорта озимой диплоидной ржи Плиса F₁ (2007 г.)

Показатели	Лобел-103 F ₁ - стандарт	Плиса F ₁	+/- к ст.
Урожайность зерна, ц/га	70,7	74,3	+3,6
Перезимовка, %	80,8	83,1	+2,3
Устойчивость к снежной плесени, балл	4,0	4,6	+0,6
Высота растений, см	125	123	-2
Устойчивость к полеганию, балл	8,0	8,5	+0,5
Продуктивный стеблестой, стеб/м ²	492,4	518,8	+26,4
Число зерен в колосе, шт	50,4	54,7	+4,3
Масса зерна с колоса, г	1,49	1,51	+0,02
Масса 1000 зерен, г	28,4	29,0	+0,6
Натура зерна, г/л	738	745	+7
Высота амилограммы, ед.ам.	452	465	+13
Число падения, сек	210	228	+18
Общая оценка хлеба, балл	3,5	3,9	+0,4

Наши данные согласуются с данными В.Д. Кобылянского [8]. Противоречивые результаты получены Гайгером и Миданером. Они установили, что гетерозис в наибольшей степени проявляется по числу зерен в колосе

и массе 1000 зерен, в то время как плотность стеблестоя показывает небольшой или даже отрицательный гетерозис [2]. Противоречивость результатов объясняется тем, что авторы использовали материал разных экологических

групп, разные типы ЦМС (P, G и R), которые имеют различный генетический контроль. Для решения этого вопроса необходимо комплексное изучение характера проявления гетерозиса по ряду количественных признаков с использованием разных типов ЦМС и генотипов разных экологических групп.

4. Система семеноводства гибридных сортов ржи

Экономическая целесообразность и объемы внедрения созданных гибридных сортов ржи во многом определяются эффективной системой семеноводства. В отличие от семеноводства популяционных сортов ржи, методика размножения гетерозисных гибридов более сложна и ресурсозатратна. Основной задачей является раз-

множение материнских компонентов гибридных сортов. Основными требованиями при семеноводстве мужски стерильных компонентов является строгое соблюдение изоляции от других диплоидных форм и удаление опылителя после цветения. Установлено, что пространственная изоляция при семеноводстве МС компонентов Р-типа должна быть не менее 800 м, G-типа – не менее 1500 м [9]. Соблюдение данных требований исключит трудоемкий процесс удаления фертильных растений до цветения в питомниках размножения МС компонентов гетерозисных гибридов F_1 .

Нами разработана схема системы семеноводства гибридных сортов ржи применительно к эколого-экономическим условиям Республики Беларусь (Рис. 4.).



Рис. 4. Схема системы семеноводства гибридных сортов ржи.

В таблице 7 сформулированы основные преимущества и ряд недостатков гибридных со-

ртов озимой диплоидной ржи по отношению к популяционным сортам.

Таблица 7

Основные преимущества и недостатки (ограничения) гибридных сортов ржи по сравнению с популяционными сортами

Преимущества	Недостатки (ограничения)
Более высокая продуктивность за счет эффекта гетерозиса.	Высокие затраты при создании родительских компонентов гибридов.
Выровненность стеблестоя.	Более высокая стоимость семян.
Повышенное содержание белка в зерне (на 1-2 %)	Повышенная требовательность к почвенному плодородию и технологии возделывания.
Более высокие хлебопекарные качества	Восприимчивость к спорынье из-за недостаточного уровня восстановления фертильности пыльцы (Р-ЦМС)
Невозможность несанкционированного выращивания гибридного сорта	Экономическая нецелесообразность репродукции сорта после поколения F ₁ .
Монополия авторов при использовании сорта в коммерческих целях	Необходимость ежегодной покупки посевного материала

Известно, что основным и самым важным преимуществом гибридных сортов ржи является повышенная продуктивность за счет эффекта гетерозиса. Однако сле-

дует принимать во внимание и некоторые ограничения при использовании гибридной ржи в сельскохозяйственном производстве.

Заключение

Анализ литературных данных и результаты собственных исследований показали значимость использования эффекта гетерозиса у ржи как генетического механизма повышения продуктивности. Классические и современные молекулярно-генетические методы исследований во многом позволили разработать новые подходы для эффективной селекции гибридных сортов ржи:

- выделены источники и локализованы гены самофертильности, что дало возможность эффективно создавать коллекции инцухт-линий со слабым проявлением инбредной депрессии в качестве родительских компонентов гибридных сортов ржи;

- изучен генетический контроль ядерных генов восстановителей фертильности и закрепителей стерильности разных типов ЦМС, локализованы основные ms-гены на хромосомах ржи;

- выявлена молекулярно-генетическая природа изменений в митохондриальном геноме при проявлении цитоплазматической мужской стерильности у ржи;

- изучены основные закономерности взаимодействия цитоплазматических и ядерных генов, а также генетических систем ЦМС и самофертильности;

- разработаны методы создания систем ЦМС разных типов, определены наиболее эффективные типы ЦМС для практической селекции гибридных сортов;

- разработаны основные методические подходы воспроизводства родительских компонентов гибридных сортов, получения гибридных семян и семеноводства гетерозисных гибридов ржи.

Вместе с тем для повышения эффективности селекции гибридных сортов ржи и максимальной реализации эффекта гетерозиса, можно выделить наиболее приоритетные направления дальнейших генетических исследований:

- изучение особенностей и механизмов экспрессии и взаимодействия ядерных (ms) и митохондриальных генов при закреплении стерильности и восстановлении фертильности;

▪ разработка генно-инженерных методов создания линий закрепителей стерильности и восстановителей фертильности;

▪ выявление уровня генетической дивергентности родительских компонентов гибридных сортов для достижения максимального эффекта гетерозиса.

В настоящее время уровень проявления гетерозиса не может быть прогнозирован исходя только из общей генетической дивергентности между родительскими формами. Необходимо определение маркеров для конкретных количественных признаков. Испытание по по-

томству пока является наиболее точным методом определения комбинационной способности [10].

QTL (quantitative trait loci) представляют наибольший интерес современного молекулярно-генетического подхода к селекции количественных (полигенных) признаков, включая маркерсопутствующую селекцию (MAS – marker assisted selection) [11]. Поэтому одна из важнейших задач разработки генетических основ селекции гибридных сортов ржи – идентификация и картирование QTL, влияющих на величину и генетическое варьирование эффекта гетерозиса по количественным признакам.

Список использованных источников

1. Тарутина, Л.А. Взаимодействие генов при гетерозисе / Л.А. Тарутина, Л.В. Хотылева. – Минск: Наука и техника, 1990. – 176 с.

2. Geiger, H.H. Hybrid rye and Heterosis. / H.H. Geiger, T. Miedaner. – In: Coors, J.G. and S. Pandey (eds.). Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops. Hrsg.: \ Madison, Wisconsin, USA.: Crop Sci. Soc. America, 1999. – P. 439–450.

3. 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.

4. Гордей, С.И. Селекционно-генетические аспекты использования эффекта гетерозиса у озимой ржи (*Secale cereale* L.) // С.И. Гордей. – Весці НАНБ, сер. биял. навук, 2002. – № 1. – С. 103–108.

5. Даниленко, Н.Г. Миры геномов органелл / Н.Г. Даниленко, О.Г. Давыденко. – Минск, 2003. – 780 с.

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. 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.

8. Кобылянский, В.Д. Рожь. / В.Д. Кобылянский. – Москва, 1982. – 289 с.

9. Гордей, С.И. Особенности семеноводства материнских компонентов Р- и G-типов гетерозисных гибридов F₁ озимой диплоидной ржи (*Secale cereale* L.) / С.И. Гордей, Т.В. Бирюкович. Мат. Конф. «Современные технологии сельскохозяйственного производства», Гродно, 10–11 апреля 2008 г. – С. 36–37.

10. Конарев, В.Т. Природа гетерозиса и возможности его прогнозирования / В.Т. Конарев. – Сельскохозяйственная биология, 1991. – № 3. – С. 3–11.

11. Hochholdinger, F. Towards the molecular basis of heterosis. / F. Hochholdinger, N. Hoecker. – Trends in Plant Science, 2007. – Vol.12. – № 9. – P. 427–432

Дата поступления статьи 27 октября 2008 г.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ СЕЛЕКЦИИ ГИБРИДНОГО ПОДСОЛНЕЧНИКА *HELIANTHUS ANNUUS L.* В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Подсолнечник (*Helianthus annuus L.*) – одна из основных масличных культур в мире. Семена подсолнечника являются основой получения высококачественного растительного масла, технических масел и богатого белком корма, который в виде жмыха и шрота используется в животноводстве. На долю этой культуры приходится не менее 12 % всего мирового производства растительного масла [1].

В большинстве регионов мира подсолнечник выращивается как гибридная культура. Это стало возможным благодаря обнаружению Леклерком в 1969 году стабильного источника цитоплазматической мужской стерильности у подсолнечника [2] и открытия Кинманом доминантного гена восстановления фертильности пыльцы [3]. Восстановленные гибриды F_1 имеют ряд преимуществ по сравнению с сортами и характеризуются гетерозисом по элементам продуктивности, высокой выравненностью посевов по высоте, одновременностью созревания семян, что улучшает их качество.

Интерес к подсолнечнику масличному в нашей стране связан с возможностью перехода на собственные сырьевые ресурсы для отечественной маслоперерабатывающей промышленности и частичным решением проблемы импортзамещения ежегодно ввозимых в Республику Беларусь растительных масел и белка.

Подсолнечник не является традиционной культурой для Беларуси, однако первые экологические испытания сортов и гибридов зарубежной селекции в условиях нашего региона дали положительный результат и свидетельст-

вуют о возможности возделывания его в промышленных масштабах. В настоящее время в Государственный реестр сортов и пород Республики Беларусь внесены 17 гибридов зарубежной селекции, в том числе и гибриды F_1 Донской 962 и Фермер, созданные селекционерами Донского филиала ВНИИМК совместно с ИГЦ НАН Беларуси. Средняя урожайность семян сортов и гибридов подсолнечника зарубежной селекции по данным сортоиспытаний за период 1997–2007 гг. составила 25–36,3 ц/га, а сбор масла 12–15 ц/га [4].

Работа по созданию самоопыленных родительских линий, которые являются основой гибридной селекции подсолнечника, начата в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси с 1998 года в содружестве с Донским филиалом ВНИИМК при финансовой поддержке компании ООО «Соя-Север Ко». В настоящее время создана рабочая коллекция самоопыленных линий – закрепителей стерильности (I_5 – I_8) и их ЦМС – аналогов (BC_5 – BC_7), а также линий – восстановителей фертильности пыльцы (I_5 – I_7). Методами биометрического и молекулярного (RAPD) анализов установлен высокий уровень полиморфизма среди изученных линий подсолнечника [5, 6].

Целью данной работы являлась оценка основных хозяйственно важных признаков простых межлинейных гибридов F_1 подсолнечника, полученных на основе созданных нами родительских линий, выделение лучших по продуктивности комбинаций скрещивания, и исследование их изменчивости в зависимости от условий года выращивания растений.

Материалы и методы

Исследования проводились на биологической опытной станции Института генетики и цитологии НАН Беларуси в 2005–2007 годы (Степянка). Почвы на территории станции дерново-подзолистые, легкосуглинистые, с нейтральной реакцией среды. В работе использовались 160 гибридов подсолнечника F_1 , полученных от скрещивания стерильных линий на цитоплазме *Helianthus petiolaris* L. с линиями – восстановителями фертильности пыльцы, выделенных нами из простых межлинейных гибридов на основе ЦМС зарубежной селекции, путем многократного инцухта фертильных растений. Стандартом служил районированный в Беларуси гибрид F_1 Донской 22 (селекции Донского филиала ВНИИМК, Ростов-на-Дону).

Растения выращивали рендомизированными блоками в 3-кратной повторности. Площадь питания одного растения составляла 70×35 см. Согласно общепринятым методикам [7] анализировали признаки: высота растений, диаметр корзинки, масса 1000 семян и с одной корзинки, урожай семян, масличность семян и сбор масла с единицы площади, количество растений, не пораженных *Sclerotinia sclerotiorum*, на стадии физиологической спелости корзинок.

Величину гетерозиса и отклонение показателей исследуемых признаков у гибридов F_1 в сравнении со стандартом рассчитывали по формуле [8]. Полученные данные обрабатывались по программе ANOVA V:1.1 (многофакторный дисперсионный анализ).

Результаты и обсуждение

Одной из основных задач гетерозисной селекции подсолнечника является создание гибридов, обладающих высокой продуктивностью и комплексной устойчивостью к биотическим и абиотическим факторам. В целях интенсификация селекционного процесса в настоящее время ведутся исследования с использованием информации о генетических дистанциях (на основании результатов исследования полиморфизма ДНК инбредных линий) для подбора родительских пар высокопродуктивных гибридных комбинаций. Однако данные о корреляции между уровнем гетерозиса и генетической удаленностью родительских линий противоречивы [9]. Скрещивание родительских линий и оценка признаков у потомства F_1 до сих пор являются самым надежным способом выделения высокопродуктивных комбинаций. В течение 2005–2007 годов у 160 гибридов F_1 были изучены показатели хозяйственно-важных признаков и дана оценка «конкурсного гетерозиса».

В результате исследований выделены лучшие комбинации по основному показателю урожайности – выходу (урожаю) масла на гектар, который зависит от урожая семян и их масличности. Урожайность семян данных гибридов составляла 22,9–39,0 ц/га, масличность – 45,4–55,8 %, сбор масла – 11,8–19,9 ц/га (Табл. 1).

Родительские линии данных гибридов характеризовались или высокими положительными эффектами ОКС по указанным признакам, или низкой ОКС, но высокими значениями вариации СКС и высокими значениями констант СКС. Изучение эффектов взаимодействия генов в контроле исследуемых признаков (отношение вариации ОКС к вариации СКС) показало, что в наследовании масличности семян преобладали неаддитивные эффекты взаимодействия генов родительских линий. В наследовании урожайности семян – аддитивные эффекты генов материнских линий [10, 11]. Полученные результаты согласуются с литературными данными [12].

У всех исследуемых гибридов F_1 отмечен существенный гетерозис по урожайности семян. В некоторых случаях он достигал 300 %. Данное явление объясняется высоким уровнем депрессии некоторых родительских линий, создаваемых путем инбридинга [7]. Средняя урожайность семян материнских линий исследуемых гибридов находилась в пределах 12,5–25 ц/га, а содержание масла – 40,6–52,5 %. Гетерозис по содержанию масла у гибридов F_1 составлял 8–43,9 % [10, 11].

В практике большой интерес представляет конкурсный гетерозис, т.е. отклонение показателей признаков, определяющих продуктивность экспериментальных гибридов, в

сравнении со стандартом. Превышение показателя сбора масла у лучших гибридов по отношению к стандарту F₁ Донской 22 составило 11,8–82,6 %.

Таблица 1

Показатели продуктивности у гибридов F₁ подсолнечника и отклонения от стандарта (H_s)

Гибридные комбинации	Урожай семян, ц/га	H _s , %	Масличность, %	H _s , %	Сбор масла, ц/га	H _s , %
2005 год						
M279/05A × M737/04Rf	28,4	39,2	51,2	9,9	14,5	52,6
M328/04A × M791/04Rf	25,7	25,9	53,8	15,5	13,9	46,3
M279/05A × M791/04Rf	27,1	32,8	48,3	3,6	13,0	36,8
M461/04A × M791/04Rf	28,9	41,7	51,4	10,3	14,8	55,8
M204/04A × M818/04Rf	22,9	12,3	51,7	10,9	11,8	24,2
F ₁ Донской 22 (стандарт)	20,4		46,6		9,5	
HCP _{0,05}	5,1		1,7		3,2	
2006 год						
M517/05A × M798/05Rf	37,6	67,8	53,1	8,8	18,8	72,5
M517/05A × M868/05Rf	36,3	62,0	52,2	6,9	17,8	63,3
M517/05A × M879/05Rf	39,0	74,1	54,4	11,5	19,9	82,6
M303/05A × M868/05Rf	27,9	24,5	52,7	8,0	13,8	26,6
M303/05A × M879/05Rf	28,1	25,4	54,9	12,5	14,5	33,0
M471/05A × M798/05Rf	23,6	5,35	55,8	14,3	12,4	13,8
M659/05A × M834/05Rf	26,0	16,1	51,3	5,1	12,5	14,7
M659/05A × M798/05Rf	29,2	30,0	54,2	11,1	14,9	36,7
M719/05A × M868/05Rf	28,6	27,7	50,9	4,3	13,7	25,7
F ₁ Донской 22 (стандарт)	22,4		48,8		10,9	
HCP _{0,05}	8,1		1,5		4,0	
2007 год						
M285/05A × M800(1)/05Rf	28,0	8,9	47,6	9,2	13,1	19,1
M583/05A × M800(1)/05Rf	26,2	1,9	46,9	7,6	12,0	9,1
M491/05A × M800(1)/05Rf	29,9	16,3	46,0	5,5	13,5	22,7
M625/05A × M800(1)/05Rf	31,1	21,0	47,5	8,9	14,5	31,8
M735/05A × M800(1)/05Rf	27,8	8,2	45,4	4,6	12,4	12,7
M491/05A × M840(3)/05Rf	27,8	8,2	48,2	10,1	13,7	24,5
M625/05A × M840(3)/05Rf	28,9	12,5	46,4	6,4	13,1	19,1
M605/05A × M840(3)/05Rf	28,9	12,5	46,5	6,7	13,2	20,0
M675/05A × M840(3)/05Rf	30,2	17,5	47,2	8,3	13,9	26,4
M725/05A × M840(3)/05Rf	28,6	11,3	46,1	5,7	12,9	17,3
M735/05A × M840(3)/05Rf	30,1	17,1	46,5	6,7	13,7	24,5
M625/05A × M867(1)/05Rf	30,8	19,8	46,4	6,4	14,0	27,3
M605/05A × M867(1)/05Rf	32,3	25,7	45,3	3,9	14,3	30,0
M675/05A × M867(1)/05Rf	27,4	6,6	46,1	5,7	12,4	12,7
M735/05A × M867(1)/05Rf	26,9	4,7	46,3	6,2	12,2	10,9
F ₁ Донской 22 (стандарт)	25,7		43,6		11,0	
HCP _{0,05}	5,9		2,4		2,0	

Рассматривая уровень проявления конкурсного гетерозиса, необходимо заметить, что с точки зрения производства ценны те гибриды, которые устойчиво, из года в год, в конкретных условиях превосходят районированные стандартные гибриды. Средовые факторы, особенно температура и влажность, играют важную роль в изменчивости урожая сельскохозяйственных культур, в том числе гибридов и сортов подсолнечника [13]. Анализ результатов 2007 года, полученных при исследовании лучших по данным 2006 года 9-ти гибридов подсолнечника, обнаружил достоверное влияние генотипов родительских линий и условий года выращивания растений на изменчивость всех исследуемых признаков (Табл. 2). Доля фактора года была самой высокой для признаков «количество растений, не пораженных склеротинией», и «количество дней от всходов до цветения» и составляла 54,1 и 59,5 % соответственно.

2006 год характеризовался умеренными температурами и большим количеством осадков в периоды цветения – созревание семян, в результате чего сложились благоприятные условия для развития склеротинии на корзинках растений. Количество пораженных растений было разным, в зависимости от комбинации скрещивания и составляло 11–59 %. В то же время условия 2006 г. были более благоприятными в сравнении с 2007 годом по следующим признакам: масса 1000 семян, лузжистость, урожай и масличность семян. Недостаток влаги в почве и высокая температура воздуха в условиях 2007 года привели к сокращению межфазных промежутков всходы-цветение-созревание и снижению поражения растений гнилью. Отмечена закономерность сохранения высокого показателя урожайности и масличности семян некоторых исследуемых гибридов независимо от года исследования.

Таблица 2

Показатели хозяйственно-важных признаков гибридов F₁ в зависимости от комбинации скрещивания и года исследования

Комбинация скрещивания	Масса 1000 семян, г		Лузжистость, %		Урожай семян, ц/га		Масличность семян, %		Количество здоровых растений, %		Период всходы-цветение	
	2006	2007	2006	2007	2006	2007	2006	2007	2006	2007	2006	2007
M517/05A × M798/05Rf	54,2	50,2	19,3	23,4	37,6	33,3	53,1	45,3	78	96	67	62
M517/05A × M868/05Rf	51,9	50,8	22,5	26,5	36,3	29,9	52,2	44,5	81	100	72	64
M517/05A × M879/05Rf	67,2	52,7	18,3	22,0	39,0	27,8	54,4	47,1	89	98	67	59
M303/05A × M868/05Rf	48,0	44,4	21,6	25,3	27,9	23,3	52,7	45,0	65	95	70	62
M303/05A × M879/05Rf	62,2	47,6	19,6	25,1	28,1	27,5	54,9	44,9	67	97	68	60
M471/05A × M798/05Rf	45,1	48,9	17,6	20,8	23,6	24,8	55,8	46,9	63	98	64	55
M659/05A × M834/05Rf	47,0	52,9	22,5	22,9	26,0	25,1	51,3	47,4	56	87	67	54
M659/05A × M798/05Rf	46,7	47,5	22,5	23,2	29,2	24,4	54,2	47,4	79	98	69	56
M719/05A × M868/05Rf	53,8	39,2	23,6	26,1	28,6	25,5	50,9	45,6	76	100	65	60
F ₁ Донской 22 (стандарт)	51,5	55,2	26,4	26,8	22,4	25,7	48,8	46,6	41	97	65	57

Продолжение таблицы

Комбинация скрещивания	Масса 1000 семян, г	Лузжистость, %	Урожай семян, ц/га	Масличность семян, %	Количество здоровых растений, %	Период всходы-цветение
	2006	2007	2006	2007	2006	2007
НСР _{0,05} по фактору – гибрид	5,4	1,7	6,3	2,7	9,9	2,8
НСР _{0,05} по фактору – год	2,1	0,6	2,4	1,3	3,7	1,1

Заключение

В результате оценки показателей хозяйственно важных признаков гибридов F₁ подсолнечника, полученных на основе самоопыленных линий белорусской селекции, выделены перспективные комбинации скрещивания. Урожайность семян лучших гибридов F₁ составляла 22,9–39,0 ц/га, масличность семян – 45,4–55,8 %, сбор масла – 11,8–19,9 ц/га. Гибриды: M517/05A × M798/05Rf, M517/05A × M868/05Rf, M517/05A × M879/05Rf, M659/05A × M798/05Rf и M719/05A × M868/05Rf имели высокую толерантность к склеротинии независимо от года выращивания растений. Первый межлинейный гибрид F₁ Поиск передан в государственное учреждение «Государственная инспекция по испытанию и охране сортов растений». Средняя урожайность семян, по результатам двухлетних испытаний гибрида в шести регионах республики Беларусь, соста-

вила 38,4 ц/га, а масличность семян – 50,5 %. Второй гибрид подсолнечника F₁ Агат передан в 2007 году для включения в план закладки опытов на хозяйственную полезность в 2008 году.

Промышленное производство подсолнечника в условиях Беларуси возможно при строгом соблюдении комплекса научно-обоснованных мер: 1) проведении отбора наиболее толерантных к *Sclerotinia sclerotiorum* форм на всех этапах селекционного процесса; 2) строгом соблюдении севооборота (возврат не менее чем через 8 лет) и агротехники возделывания данной культуры; 3) для уменьшения поражаемости корзинок гнилями, необходимо проведение десикации через 35 – 40 дней от начала массового цветения растений и уборки в сжатые сроки с последующей досушкой семян.

Список цитированных источников

1. Шпаар, Д.О. Яровые масличные культуры / Д.О. Шпаар. – Минск: ФУА информ., 1999. – 288 с.
2. Leclerq, P. Une sterilité male cytoplasmique chez le tournesol / P. Leclerq // Ann. Amélior. Plant. – 1969. – Vol. 19 (2). – P. 99–106.
3. Kinman, M.N. New developments in the USDA and state experiment station sunflower breeding programs / M.N. Kinman // In Proc. 4th Int. Sunflower Conf. – Memphis, USA, 1970. – P. 181–183.
4. Результаты испытания сортов с/х культур в Республике Беларусь за 2004–2006 годы / Государственная инспекция по испытанию

и охране сортов растений при Министерстве сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь; редкол.: П.В. Николаенко [и др.]. – Минск, 2006. – Ч. 2. – 336 с.

5. RAPD анализ инбредных линий подсолнечника и гибридов F₁ как один из путей оптимизации селекционного процесса / Е.А. Аксёнова [др.] // Принципы и методы оптимизации селекционного процесса сельскохозяйственных растений: материалы междунар. науч.-практ. конф., Жодино, 14–15 июля 2005 г. – Минск УП «ИВЦ Минфина», 2005. – С. 164–169.

6. Волотович, А.А. Генетический потенциал линий подсолнечника (*Helianthus annuus* L.)

белорусской селекции / А.А. Волотович // Актуальные вопросы селекции, технологии и переработки масличных культур: материалы междунар. конф. мол. ученых и специалистов, Краснодар, 27–29 марта 2007 г. / ВНИИМК – Краснодар, 2007. – С. 52–57.

7. Биология, селекция и возделывание подсолнечника / О.И. Тихонов [и др.] – М.: Агропромиздат. – 1991. – 300 с.

8. Тарутина, Л.А. Изменчивость эффекта гетерозиса у диаллельных гибридов кукурузы в различных условиях среды / Л.А. Тарутина [и др.] // Изменчивость и отбор / Л. А. Хотылева [и др.]. – Мн.: Наука и техника. – 1980. – С. 20–28.

9. Исследование молекулярно-генетического разнообразия инбредных линий и уровня гетерозиса у гибридов подсолнечника / Ю.М. Сиволап [и др.] // Цитология и генетика. – 1998. – Т.32, № 6. – С. 5–10.

10. Комбинационная способность и гетерозис у подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) / А.А. Волотович [и др.] // Вес. Нац. акад. на-

вук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2005. – № 2. – С. 47–50.

11. Волотович, А.А. Анализ наследования основных хозяйственно ценных признаков у гибридов F_1 подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) белорусской селекции / А.А. Волотович // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2006. – № 4. – С. 64–68.

12. Петкович, И.П. Использование нерегулярных скрещиваний для оценки комбинационной способности гомозиготных линий подсолнечника и определение наследуемости некоторых признаков / И.П. Петкович // Современные проблемы научного обеспечения производства подсолнечника: материалы междунар. конф., Краснодар, 19–33 июля 2006 г. / ВНИИМК – Краснодар, 2006. – С. 43–49.

13. Влияние генетических факторов и среды на продуктивность гибридов F_1 белорусской селекции / Т.А. Силкова [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2008. – №1. – С. 39–44.

Дата поступления статьи 4 декабря 2008 г.

Л.П. Шиманский¹, С.И. Мустяца², В.Н. Туровец¹, Е.Л. Долгова³

ЗАРОДЫШЕВАЯ ПЛАЗМА САМООПЫЛЕННЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ В СЕЛЕКЦИИ НА ГЕТЕРОЗИС

¹Полесский филиал РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию»
Республика Беларусь, 247781, Мозырский р/н, пос. Криничный, ул. Школьная 1

²Институт Растениеводства «Порумбень», Республика Молдова

³РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию»
Республика Беларусь, 222160, г. Жодино, ул. Тимирязева, 1

Введение

Современная селекция кукурузы основывается исключительно на методе межлинейной гибридизации, и успех работы в значительной степени определяется ценностью генной плазмы родительских компонентов гибридов. Поэтому создание новых линий с высокой комбинационной способностью и получение на их основе продуктивных технологичных гибридов связаны с непрерывным поиском генетически разнообразного исходного материала и его улучшением [1]. Уже ранние исследования по кукурузе позволили установить четкую взаимосвязь между гетерозисом по урожаю зерна и генетическим разнообразием, которая позднее была трансформирована в представление о генетической дистанции между скрещиваемыми формами. Развитие этих исследований привело селекционную практику к дифференциации генофонда кукурузы на гетерозисные группы зародышевой плазмы и появлению в литературе термина «гетерозисная модель» (heterotic pattern), идентичного по смыслу с гетерозисными группами [2]. Гетерозисные группы обозначались как набор линий с общей родословной, созданных из родственного исходного материала и проявляющие в скрещиваниях с компонентами из других источников плазмы сходную комбинационную способность. Была показана целесообразность скрещивания менее родственных самоопыленных линий из различных гетерозисных групп [3]. Это обусловило широкие исследования по идентификации самоопыленных линий относительно существующих гетерозисных групп и определения наиболее продуктивных межгрупповых кроссов – гетерозисных типов [4].

Генная плазма гибридов кукурузного пояса США существенно не менялась до 1975 года, и только с 1979 года произошли значительные перемены. Тем не менее, несмотря на огромное количество приватных и публичных университетских линий, в производстве 80-90 годов доминировала плазма трех гетерозисных групп: Айовского синтетика BSSS – Рейда, Ланкастера и Айодента. Самое детальное описание гетерозисных групп приводится в работах американского селекционера Тройера, который приводит и список наиболее полезных гетерозисных моделей для селекции кукурузы, в т.ч. раннеспелой. Первой общепринятой и наиболее распространенной гетерозисной моделью явилось скрещивание Рейд × Ланкастер [5]. В последние годы селекционеры чаще прибегают к классификации линий на рабочие группы (подгруппы) путем обозначения базисной линии-индикатора. Например, в периодическом каталоге фирмы Майк Брайтон (MBS Genetics Handbook, USA), в 1994 году 532 линии различных учреждений классифицированы по происхождению в группы и подгруппы: Ланкастер (С 103) – 131 линия, БССС (В 73) – 130, БССС (В 14) – 89, БССС – 43, Ланкастер (ОН 43) – 42, БССС (В37) – 34, Вилсон Рейд (WF 9) – 24 Миннезота 13 (W 153R) – 20 и Батлер (Со 109) – 19 линий.

Исследования молекулярных маркеров установили довольно существенные изменения генома кукурузы, преобладающего в производстве США за 1930-2000 годы. Количество идентифицированных аллелей у современных гибридов составило 369 в сравнении с 599 у генотипов 1960 годов и 968 аллелей, присут-

ствовавших в плазме гибридов 1930 годов. Доля многих исторически важных источников зародышевой плазмы (Ланкастер, Лиминг, Круг, Мидлэнд и др.) снизилась, и наиболее весомыми стали гетерозисные группы БССС – 35,3 %, Айодент – 26 % и Рейд – 22,4 % [6].

Европейская селекция раннеспелой кукурузы базируется на плазме элитных зубовидных линий США – гетерозисные группы Рейд, Ланкастер, Айодент, полузубовидных и зубовидных линий канадского происхождения – группы Ранний Батлер, СМ 7 и европейских кремнистых линий групп Лакон (F 2) и Лизаргарат (EP 1). Например, самый популярный гибрид в 90-е годы прошлого столетия на европейском рынке Деа представляет со-

бой удачное сочетание американской плазмы Айодент и кремнистой гетерозисной группы Лакон. Эти гетерозисные пары используются и другими селекционными фирмами в различных модификациях [7].

При создании новых гибридных комбинаций подбор родительских форм для скрещиваний осуществляется таким образом, чтобы в родословной линии содержалась зародышевая плазма различных гетерозисных групп. Современные селекционные программы должны содержать структурно-генетическую организацию генофонда, предусматривающую разделение зародышевой плазмы на группы в разной степени родственных линий [4].

Материал и методика

Объектом исследований служили самоопыленные линии иностранной селекции из коллекции Полесского филиала, сформированной в конце прошлого столетия и постоянно пополняющейся новыми образцами. Большинство материала поступило из Молдавского НИИ кукурузы и сорго, Института кукурузы «Земун Поле» (Югославия), Кубанской опытной станции (Россия), Института зернового хозяйства (Украина). Часть линий получена из Словакии и Германии от селекционеров, испытывающих гибриды кукурузы в условиях Беларуси. Отметим, что интродуцированные образцы были представлены широким диапазоном по генетическому происхождению, консистенции зерна, вегетационному периоду. На протяжении 1996-2003 годов коллекционные образцы были изучены по комплексу хозяйственно-полезных признаков. Между линиями различных гетерозисных групп были проведены скрещивания для определения потенциала продуктивности различных гетерозисных моделей гибридов. Степень гетерозиса по урожайности зерна вычисляли в отношении среднего их показателя у родительских линий по классической формуле $H = (F_1 - P_{\text{сред}} / P_{\text{сред}}) \times 100 \%$.

Также был изучен компонентный состав спектров зеина в зерновках линий, относящихся к разным гетерозисным группам. Выделение и электрофорез зеина в 10 % полиакриламидном геле проводили по методике ВИР (2000 г., С-Пб.). Спектр зеино-

вой фракции белка, полученный электрофорезом в вертикальных пластинах оказался довольно полиморфным и содержал до 25 основных компонентов. При интерпретации результатов использовались величины относительной электрофоретической подвижности (gf), которая вычислялась по внутреннему стандарту (компонент с gf 60). Для идентификации линий имеет значение не только наличие или отсутствие компонентов спектра, но и интенсивность их проявления. При оценке интенсивности компонентов использовали трехбалльную шкалу: 1 – слабый компонент, 2 – средней интенсивности, 3 – интенсивный. В качестве метода математической обработки результатов электрофореза применялся коэффициент подобия (КП) при попарном анализе по Джаккарду. При анализе спектров запасного белка использовали формулу:

$S_j (КП) = m / m + (i + k + l)$, (Sapistein, Bushuk, 1985),

где: m – число пар полос сравниваемых спектров, одинаковых по подвижности и по плотности;

i – полосы, присутствующие в спектре В и отсутствующие в спектре А, k – полосы, присутствующие в спектре А и отсутствующие в спектре В,

l – пары полос, занимающие одинаковую позицию, но значительно различающиеся по плотности.

Результаты и обсуждение

Коллекция интродуцированных линий была дифференцирована по группам на основе данных о происхождении из литературных источников, личных сообщений селекционеров и по фенотипическим признакам. Сведения о родословной образцов различных центров по кукурузе из Канады, Франции, США, Польши и Югославии были взяты из периодических изданий Henderson C.B. (1972, 1984) и MBS Genetics Handbook (1980, 1989, 1994, 2001), опубликованных в США. С учетом анализа информации о происхождении (данные педигри) и фенотипической сходности морфологических признаков 80 линий были разделены на 12 гетерозисных групп (Табл. 1). Отметим, что часть линий со сложной родословной, а также группа БССС – В37, представленная единственным образцом МКР 3986/01, не были включены в данную работу.

Группа Кремнистая Оттава представлена 5-ю линиями, в т.ч. индикатором СМ 7, созданными с участием зародышевой плазмы одноименного канадского кремнистого сорта. Характерными признаками группы является раннеспелость, светло-зеленая окраска

листьев, отсутствие антоциановой окраски нитей и пыльников, белый цвет стержней початка, сбитые рядки зерен и развитие зерен из вторичных цветков, початки цилиндрической формы и удлиненные.

Кремнистая группа Лакон сохраняет название местного французского сорта, из которого в 1955 году путем самоопыления были созданы линии F 2 и F 7, впервые использованные в гибриде ИНРА 200, а затем в известных гибридах ИНРА 258, ИНРА 260, Лимагрэн 11, Деа Декалб 250 и Каргил Пример 170. Линия F 2 имеет конические початки с белой окраской стержня, 12 рядов зерен, короткую плодоножку прикрепления к стеблю, что создает трудности при отрыве початков. Растения среднерослые (около 150 см), с 4-5 листьями выше початка, сравнительно компактной метелкой с короткой (5-8 см) ножкой. Рыльца початков и чешуи пыльников имеют антоциановую, красноватую окраску. Большинство линий, перечисленных в таблице (Табл. 1), за исключением F 564, относятся к раннеспелой и среднеранней группам спелости.

Таблица 1

Гетерозисные группы интродуцированных линий

№ п/п	Гетерозисная группа	Линия-индикатор	Интродуцированные линии
1.	Кремнистая Оттава	СМ 7	В 126, СМ 48, ИК 226, МКР 126
2.	Лакон	F 2	F 7, F 238, F 564, МКР 2, МКР 4, МКР 14, МКР 16, МКР 18, СГ 26
3.	Лизаргарат	EP1	Ma 21, В 291, Со 255, F 83, F 120, 1086/88
4.	Зубовидная Канады	Со 72-75	BC 27Д4, BC 259, Со 113, PLS 72, МКР 41, МК 43, 1866/80, 1866/82
5.	Зубовидная Канады	Со 125	F 252, F 271, F 288, ИК 124-1, МК 24, МКР 38
6.	Зубовидная Канады	СГ 12	ZN 12, МКР 36, 224/88, 2987/96, 3947/96
7.	Батлер ранний	Со 109	Со 220, Со 252
8.	Вигор	PLS 61	СГ 14, СГ 15, F 250, F 478, ND 255, Poly 17, ZP 17/70, МК 17
9.	Миннезота 13	W 153R	BC 5, ND 203, F 115, W 117, W 401, ВИР 44
10.	БССС (В 14)	СМ 105	A 641, СМ 109, СМ 174, МBS 282, МBS 283, МКР 33, МКР 46
11.	Рейд Вилсон	A 654	A 638, LH 84, LH 85, P 346
12.	Рейд Айодент	326/94	MBS 847, МК 47, 170/88

Кремнистая группа Лизаргат, представленная линией первого цикла селекции EP 1, происходит из испанского среднепозднего сорта. Впервые была использована в коммерческом двойном межлинейном гибриде ИНРА 258 с формулой $(F 7 \times EP 1) \times (F 115 \times W33)$, из которого была выведена более ранняя версия Co 255, ставшая популярной в Канаде. В Европе, кроме Co 255, определенное значение имели родственные линии французского происхождения F 120 и Ma 21. Характерными признаками группы являются широкие темно-зеленые листья, сильная антоциановая окраска всех вегетирующих частей растений, даже зерна и колосовых чешуй белостержневого початка. У некоторых линий данной группы – F 120, Ma 21, 1086/88 наблюдаются глянцеvidные (отсутствие воскового налета) всходы, обусловленные рецессивным геном *glossy*.

Условная гетерозисная группа Зубовидная Канадская более разнообразна по генетическому происхождению и включает 3 подгруппы, хорошо комбинирующиеся между собой и с кремнистыми формами. По эталонным линиям Co 72-75 и Co 125, несмотря на их широкое использование в коммерческих гибридах FAO 190-210 (КВС 713, Форла, Ета), в литературе отсутствует информация об их родословной. Линия CG 12 была выведена в 1974 году в Гуелфском Университете, Канада из гибрида Прайд 4 и в Европе стала известной через западно-германский гибрид Бастион. Подгруппы Co 72-75 и Co 125 характеризуются сравнительно высокорослыми растениями, красной окраской стержней початков, хорошо развитой метелкой с богатым пыльцеобразованием. Обе линии обладают интенсивным стартовым ростом в начальных фазах развития и слабую корневую систему, что вызывает корневое полегание. Линия Co 125 в отдельные годы образует на метелках женские соцветия (рыльца) и для нее специфичен ускоренный темп потери влажности зерна после физиологического созревания. Отличительными признаками подгруппы CG 12 являются белостержневый початок, прочный лигнизированный стебель и длинная метелка с 3-5 боковыми веточками, а также закрепление C типа ЦМС. Из коллекционных линий данных групп более известны Co 113, F 252 и ИК 124-1, благодаря участию в коммерческих раннеспелых гибридах.

Зубовидные гетерозисные группы Батлер ранний (Канада) и Вигор (Польша) менее известны в мировой селекции, и гибриды, созданные с линиями Co 109 (Близард), Co 220 и PLS 61, занимали ограниченные площади. Зародышевая плазма линии PLS 61 в сочетании с более поздними элитными образцами 502, 343, ГК 26 и В 73 вошла в родословную линий селекции Краснодарского НИИСХ – Кр 703, Кр 707, Кр 709, Кр 714, Кр 730, Кр 752 и Кр 754, используемых, в перспективных гибридах [1]. Из интродуцированных линий, классифицированных в группу Вигор, в состав коммерческих гибридов (Молдавский 215 MB), занимающих существенные посевные площади, входит МК 17.

Последние 4 гетерозисные группы из зубовидного подвида кукурузы североамериканского происхождения объединяют линии FAO 250–660, и для селекционных работ были отобраны более ранние образцы, которые по принятой нами классификации относятся к среднепоздней и позднеспелой группам спелости с FAO 250–350.

Гетерозисная группа Миннезота 13 объединяет линии, созданные из одноименного, наиболее популярного в северной части США сорта, который в 1882 году занимал более 2 млн. га посевных площадей. Лучшие линии первого и последующих циклов селекции (W 153R, ND 203, W 117) вошли в список образцов с наибольшими объемами произведенных семян и продолжают использоваться в качестве зародышевой плазмы в современных линиях. В Европе линии W 153R, W 117, BC 5, F 115 и W 401 являлись отцовскими формами ряда раннеспелых гибридов, полученных в скрещиваниях с материнской формой $F 7 \times F 2$. Следует отметить, что W 401 имеет в родословной плазму сорта Оттава Кремнистая (менее 25 %) через линию W 85 и относится к группе Миннезота 13/Голден Глэу. В этой связи по фенологическим признакам растений и початков данная линия отличается от индикатора W 153R.

Линии из гетерозисной группы БССС созданы из синтетика Iowa Stiff Stalk Synthetic и по принятой международной классификации разделены на подгруппы В 14, В 37, В 73 и В 84. Для раннеспелой кукурузы огромное значение имели линии CM 105 и CM 174, со-

зданные на Опытной сельскохозяйственной станции Манитоба в Канаде. Линия МКР 33, имеющая в родословной плазму вышеуказанных образцов, использовалась в материнской форме Лаванда гибридов Бемо 181 СВ и Бемо 182 СВ с большим удельным весом в кукурузе северных регионов СССР, в т.ч. Беларуси.

В гетерозисную группу Рейд Вилсон отнесены 5 линий, в т.ч. Р 346, являющаяся материнской формой зубовидного гибрида Пионер 3978, возделываемого в Молдове и на Украине в конце прошлого столетия. Эта линия широко использовалась селекционерами СССР и вошла в состав многих гибридов северного типа ФАО 250-330. Отличительными признаками группы являются светлозеленая окраска листьев, белостержневость початков, желтая окраска рылец, колосковых чешуй и пыльников. Все линии данной группы фенотипически очень схожие, и только ЛН 84 цветет на 1–2 дня раньше индикатора А 654.

Последняя группа Рейд Айодент является исключительным селекционным достижением фирмы Пионер (США) и в СССР начала использоваться посредством сестринского скрещивания 343 × 101, являющегося материнской формой ряда закупленных гибридов. В настоящее время линии Рейд Айодент доминируют в производстве семян в США, и гетерозисная модель БССС × Айодент является самой перспективной для зубовидных гибридов южного типа (6). В северных регионах кукурузосеяния широко возделывались гибриды Деа, ДК 250 и другие с индексом ФАО 250-300 из гетерозисной модели Рейд Айодент × F 2. Индикатором группы является среднепоздняя экспериментальная линия НИИ кукурузы и сорго Республики Молдова – 326/94.

С учетом информации о классификации линий в гетерозисные группы и степени их генетических различий в пределах групп нами был поставлен опыт по выявлению продуктив-

ности разных гетерозисных моделей в условиях Беларуси. Из семи основных гетерозисных групп были отобраны по 3 образца, которые скрещивались в неполной диаллельной схеме скрещиваний. На основе 21 линии было получено 189 прямых гибридных комбинаций (линии внутри каждой группы не скрещивались), которые испытывались в Полесском филиале (п. Криничный) на зерно в течение 2006 – 2007 годов. Анализ данных, приведенных в таблице (Табл. 2), указывает, что по зерновой продуктивности лучшими были гибридные комбинации, у которых в качестве родительского компонента выступали линии гетерозисной группы Айодент. Средняя урожайность простых гибридов, созданных с участием линий Айодент составила 120,9 ц/га зерна с колебаниями в интервале 115,8–129,8 ц/га. Отметим, что данная гетерозисная группа лучше себя проявила в комбинациях с кремнистыми линиями группы F2, EP1 и CM7. Гетерозисные модели CM7 × Айодент и F2 × Айодент из-за сравнительно низкой уборочной влажности зерна являются перспективными для синтеза гибридов универсального использования в условиях Беларуси, т.е. на зерно и силос. Гибриды из модели Лизаргарат × Айодент, в целом, более продуктивны и характеризовались высокой уборочной влажностью зерна, хотя в единичных конкретных комбинациях отмечалось содержание сухих веществ в зерне на уровне модели F2 × Айодент. Самая низкая продуктивность выявлена у гетерозисной модели Со 72–75 × CM 7 – 66,6 ц/га, что указывает на возможно определенное генетическое родство ряда линий из данных гетерозисных групп. Высокий уровень гетерозиса (от 100,0 до 245,5 %) гибридов, полученных по диаллельной схеме, указывает на большие генетические различия между их родительскими формами, хотя величина этого показателя определяется и продуктивностью самих линий.

Таблица 2

Урожай зерна (ц/га) и степень гетерозиса (%) у гибридов из разных гетерозисных моделей

Гетерозисная группа	Лакон	Лизаргарат	CM7	Со 125	Со 72-75	CG 12	Айодент
Лакон		103,5	91,4	97,3	92,2	100,3	120,6

Продолжение таблицы

Гетерозисная группа	Лакон	Лизаргарат	СМ7	Со 125	Со 72-75	СГ 12	Айодент
Лизаргарат	220,4		90,0	104,1	104,3	93,7	129,8
СМ7	244,9	229,7		96,9	66,6	85,6	123,7
Со 125	189,6	202,6	240,0		81,0	97,8	118,9
Со 72-75	140,7	166,8	100,0	100,5		78,2	116,6
СГ 12	227,7	198,4	234,4	199,1	109,1		115,8
Айодент	195,6	212,0	245,5	177,8	145,0	190,2	

Примечание. Выше диагонали – урожай зерна, ниже (курсивом) – степень гетерозиса.

Анализ электрофоретических спектров зеиновой фракции зерна позволил подтвердить генетическую дивергенцию изученной зародышевой плазмы кукурузы. На основе электрофоретической подвижности белковых профилей было рассчитано генетическое сходство линий из семи гетерозисных групп. Изученные образцы распределились по кластерам согласно своей групповой принадлежности, причём проявили существенную связь внутри отдель-

ных кластеров – коэффициент подобия (КП) имел значения в группе Лакон 0,793-0,962, Лизаргарат – 0,484-0,778, СМ 7 – 0,825-0,895, Со 125 – 0,649-0,800, Со 72-75 – 0,684-0,750, СГ 12 – 0,688-0,818 и Айодент – 0,714-0,815. Генетические дистанции, рассчитанные для 21 гетерозисной модели, колебались от 0,092 для гибридных комбинаций СМ 7 × СГ 12 до 0,353 для комбинаций СМ 7 × Лизаргарат и Айодент × СМ 7 (Табл. 3).

Таблица 3

Коэффициенты генетического сходства по Nei

Гетерозисная группа	Лакон	Лизаргарат	СМ7	Со 125	Со 72-75	СГ 12	Айодент
Лакон	1,000						
Лизаргарат	0,262	1,000					
СМ7	0,154	0,353	1,000				
Со 125	0,285	0,297	0,228	1,000			
Со 72-75	0,212	0,229	0,130	0,250	1,000		
СГ 12	0,308	0,250	0,092	0,289	0,318	1,000	
Айодент	0,241	0,194	0,353	0,169	0,203	0,127	1,000

Обособление гетерозисных групп было очевидным, поскольку внутригрупповые дистанции генетического сходства превосходили межгрупповые в опытах в среднем в 3,2 раза. Таким образом, использованный нами метод белковых маркеров в целом подтверждает генетические различия между линиями, установленные на основе данных педигри и уровня ге-

тетерозиса в системных скрещиваниях. Отметим также, что линии из альтернативных групп зародышевой плазмы обладают специфическим распределением зеиновых маркеров в миграционной зоне электрофоретического спектра. Эти специфические маркеры могут быть использованы для генетической идентификации новых линий.

Заключение

Классификация исходного материала на гетерозисные группы позволяет правильно подобрать компоненты скрещивания и прогнози-

ровать получение высокогетерозисных гибридов. На основании проведенных исследований выделены наиболее продуктивные гетерозисные

модели гибридов, сочетающих плазму кремнистых групп Лакон, Лизаргат, СМ 7 и плазму зубовидной гетерозисной группы Айодент. Анализ электрофоретических спектров зеина позволил подтвердить генетическую дивергенцию изученной зародышевой плазмы кукурузы, определить родственность линий внутри гетеро-

зисных групп, благодаря чему линии распределились по кластерам согласно своей групповой принадлежности. Межгрупповые дистанции генетического сходства в 3,2 раза были ниже внутригрупповых, что указывает на значительную генетическую разнокачественность плазмы изученных самоопыленных линий.

Список использованных источников

1. Чумак, М.В. Селекция раннеспелых и среднеспелых гибридов кукурузы в Краснодарском НИИСХ / М.В. Чумак // Генетика, селекция и технология возделывания кукурузы. – Майкоп: РИПО «Адыгея», 1999. – С. 13–28.
2. Hallauer, A.R. Corn breeding / A.R. Hallauer, W.A. Russell // Corn and corn improvement. Third Edition. USA, 1988. – P. 463–564
3. Мустяца, С.И. Использование зародышевой плазмы гетерозисной группы Ланкастер в селекции раннеспелой кукурузы / С.И. Мустяца, С.И. Мистрец, Л.П. Нужная // Кукуруза и сорго. – 2001. – № 1. – С. 6–11.
4. Соколов, В.М. Селекционная оценка элитных самоопыленных линий кукурузы из основных гетерозисных групп зародышевой плазмы / В.М. Соколов, Б.Ф. Вареник, А.С. Пилюгин, Д.В. Гужва // Генетика, селекция и технология возделывания кукурузы. – Майкоп: РИПО «Адыгея», 1999. – С. 92–96.
5. Troyer, A. F. Temperate Corn. Background, behavior and breeding / A. F. Troyer // Specialty Corn. Second Edition. USA, 2000. – P. 395–466.
6. Duvick, D. Changes in performance, parentage and genetic diversity of successful corn hybrids, 1930-2000 / D. Duvick, J. Smith, M. Cooper // Corn origin, history, technology and production. USA, 2004. – P. 65–97.
7. Мустяца, С.И. Итоги создания раннеспелых линий кукурузы с зародышевой плазмой группы Рейд / С.И. Мустяца, С.И. Мистрец // Кукуруза и сорго. – 2003. – № 1. – С. 2–8.

Дата поступления статьи 27 октября 2008 г.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕТЕРОЗИСА В СЕЛЕКЦИИ РАПСА

РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию»
Республика Беларусь, 222160, г. Жодино, ул. Тимирязева, 1

Введение

Механизм гетерозиса объясняли различными гипотезами: доминирования, сверхдоминирования, генетического баланса, межallelной комплектации по Финчему, компенсационного комплекса генов по Струнникову [1, 2, 7, 8]. Однако, до сих пор гетерозис представляет собой сложнейшее явление в биологии и не вписывается ни в одну из предложенных моделей.

Первые результаты по созданию межсортовых гибридов рапса были получены в Германии в 20-х годах прошлого столетия [9]. Первоначально гетерозисный эффект у рапса был изучен на межсортовых гибридах. Большую урожайность семян, устойчивость к вредителям и патогенам межсортовых гибридов по сравнению с обоими родительскими сортами отмечали многие исследователи, по различным культурам [5, 9, 11, 14, 15].

В последние годы усилия селекционеров направлены на повышение урожайности высококачественных сортов рапса и на получение гибридов с высоким эффектом гетерозиса. До сих пор это явление не было использовано из-за отсутствия эффективной системы, контролирующей процесс перекрестного опыления, необходимого для производства гибридов.

Сегодня практически во всех селекцентрах мира по рапсу ведутся исследования по созданию и изучению гетерозисных гибридов F_1 . Многочисленные исследования по изучению эффекта гетерозиса у гибридов рапса указывают на существенное превышение их урожайности над родительскими формами или лучшим районированным сортом. Так, наибольший эффект гетерозиса по урожайности маслосемян был отмечен у межлинейных гибридов озимого рапса (от 22,4 до 109 %) в зависимости от происхождения инбредных линий, используемых для создания гибридов. Средний эффект гетерозиса по урожаю семян рапса во Франции составляет – 55 %, в Канаде – до 43 %, в Польше – 36 %, в России – у озимого рапса 20,7 % и 18,2 % – у ярового (Ничипоренко, 1991, Горлов, 1995).

Результаты исследований эффекта гетерозиса разными учеными не всегда удается сопоставить, так как данные сравниваются со средними родительскими формами, с лучшим из родителей или со стандартом, а материал для создания гибридов генетически различен. Однако приведенные данные ясно указывают на возможность использования эффекта гетерозиса для повышения урожайности семян масличного рапса.

Методика исследований

Основными методами исследований были самоопыление (инбридинг), межсортовая и отдаленная гибридизация с использованием культуры тканей *in vitro* (андрогенез).

Объектом исследований являлись высококачественные линии и гибриды ярового и сорта и сортообразцы озимого рапса, созданные в НПЦ НАН Беларуси по земледелию и полученные по договорам обмена селекционным материалом.

Скращивания проводились по полной диаллельной схеме на озимом и яровом рапсе с кастрацией пыльников у цветков рапса на VIII этапе органогенеза и опылением на 2-й день пылью из цветков IX этапа органогенеза [4]. Опыты закладывались в 3-х кратной повторности. Снопы для анализа брались с каждой из трех делянок по 10-15 растений. Гетерозис определяли по Д.С. Омарову [3]. Учитывались следующие признаки: высота рас-

тений, длина центральной кисти, количество стручков на растении, количество стручков на центральной кисти, масса семян с 1 стручка, масса семян с 1 растения.

Результаты и обсуждение

В настоящее время у рапса существуют различные способы использования гетерозисного эффекта на практике (Рис. 1).

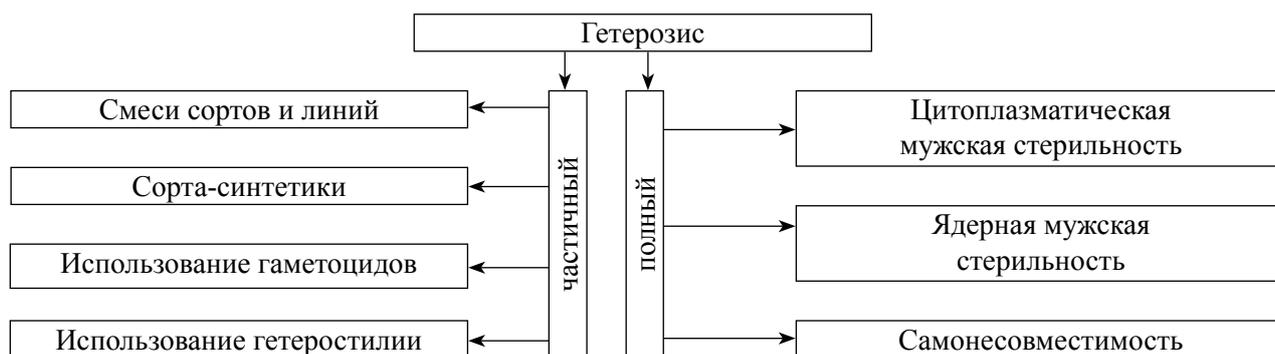


Рис. 1. Способы использования гетерозиса в селекции рапса.

Перекрестное опыление можно контролировать различными генетическими методами (использование самонесовместимости, стерильности, природная двудомность) или химическими методами (применение гаметоцидов), ручная кастрация. Использование двух последних способов у рапса невозможно, так как у рода *Brassica* двудомности, практически, нет, а механическая кастрация технически невыполнима из-за большого объема цветков на единицу площади. Использование гаметоцидов у рапса затрудняется относительно продолжительной фазой цветения, которая, в зависимости от погодных условий, может продлиться от 3 до 6 недель. Использование гаметоцидов у рапса мало изучено, нет сведений об их успешном применении. Опубликованные на эту тему исследования китайских ученых сообщают о получении после обработки гаметоцидами 60–80 % абсолютно стерильных растений, остальные растения были частично стерильными либо их бутоны опадали, а растения погибали.

Для получения гибридов в промышленных масштабах необходимы источники ЦМС, закрепители стерильности и восстановители фертильности (Rf). В Западной Европе этой проблемой занимаются с 1968 года, в нашей стране на два десятилетия позже.

Для гибридной, как и для традиционной селекции требуется создание самоопыленных ($I_{5,7}$) или гомозиготных линий, полученных на основе культуры пыльников или микроспор *in vitro*, они должны быть переведены на стерильную основу, путем 6–7 беккроссов на источник ЦМС. Примерно через шесть возвратных скрещиваний ЦМС – линий с фертильным аналогом получают все признаки отцовской формы и дополнительно признак ЦМС.

Для многих самоопыленных линий рапса свойственна инбредная депрессия – уменьшение размеров растений по сравнению со свободноцветущими сортами [9, 10, 12, 16]. В наших исследованиях самоопыленные линии уступали сортам, практически, по всем количественным признакам, кроме массы 1000 семян и длины носика стручка (Табл. 1).

Таблица 1

Изменение элементов продуктивности линий озимого рапса при самоопылении, %

Поколения	Высота растений	Длина		Количества семян в стручке	Масса 1000 семян
		стручка	носика		
I ₀	100	100	100	100	100
I ₁	96,5	105,2	112,4	97,8	98,4
I ₃	91,7	96,4	105,2	93,6	96,8
I ₅	88,4	89,6	102,3	87,4	95,4
I ₇	84,7	87,4	96,2	88,1	93,6

Примечание. Среднее по 10 инбредным линиям.

Многочисленными опытами с различным селекционным материалом было установлено что, с одной стороны, депрессия в инбредных линиях приводит к снижению урожайности семян, а с другой стороны, эффект гетерозиса у гибридов F₁ покрывает расходы на их создание и позволяет контролировать семеноводство культуры.

При исследовании эффекта инбредной депрессии была установлена сильная зависимость урожайности от инбридинга у озимого рапса. В некоторых случаях в инбредных поколениях наблюдалась тенденция к снижению масличности семян, уменьшению длины центральной кисти и числа семян в стручке. Однако, при более широком изучении этого явления как озимого, так и ярового рапса были получе-

ны инбредные линии, не только исключаящие депрессию, но даже превосходящие исходную популяцию по урожайности.

Следует отметить, что гомозиготность равную 6-7 беккроссам, необходимых в селекции рапса для получения выровненного исходного материала, можно получить на основе культуры пыльников или микроспор *in vitro* всего за 1-2 года. При интенсивном использовании фитотрона и поля для этого потребуются на яровом рапсе 2-2,5 года, а на озимом – 4-5 лет.

В наших исследованиях, с 9 отечественными сортами и 34 инбредными (I₅₋₇) линиями ярового рапса, полученными на основе культуры пыльников *in vitro*, средний урожай семян с 1 м² у них был на 62 г/м² меньше (или на 19,8 %), чем у сортов (Табл. 2).

Таблица 2

Характеристика сортов и инбредных линий ярового рапса по содержанию белка, жира и элементам структуры урожая

Показатель	Сорта				Линии			
	х	макс	мин	V, %	х	макс	мин	V, %
Содержание жира, %	43,7	44,7	41,3	2,3	41,5	48,7	35,8	7
Содержание белка, %	25,1	26,4	24,2	2,7	26,7	29,8	23,8	6,4
Содержание жир+белок, %	68,8	69,9	67,1	1,2	68,3	72,6	61,7	4,2
Урожай семян, г/м ²	375	425	225	97	313	500	175	132
Масса 1000 семян, г	3,1	3,7	2,8	9,8	4,1	5,3	2,8	14,8
Количество семян в стручке, шт	26,2	32	19,5	13,3	24,5	30	16	16,6
Длина стручка, см	6,5	7,5	5,3	9,8	6,0	7,2	4,6	19,7

Следует отметить, что содержание сырого жира в семенах инбредных линий на 2,2 % было ниже, чем у свободноцветущих сортов, а содержание сырого белка – на 1,6 % выше. Известно, что между содержанием масла и белка в семенах рапса имеется обратно-пропорциональная зависимость. Вариация этих показателей у сортов не превышала 2,3-2,7 %, у линий – 6,4-7,0 %. В процессе самоопыления были получены как высокомасличные формы (с содержанием жира 48,7 %), так и низкомасличные (35,8 % жира). Интересно,

что содержание сырого жира и белка в сумме оказалось наименее варьируемым показателем как у сортов (V %1,2), так и у инбредных линий (V %4,2).

В НПЦ НАН Беларуси по земледелию ведутся исследования по созданию гибридов F₁ озимого и ярового рапса, в основном, с использованием систем ЦМС *ogi* и ЦМС *pol*. Государственное испытание проходят два гибрида ярового (Алмаз, Рубин) и один озимого (НПЦ-2007) рапса, созданные с использованием ЦМС *ogi* по схеме (CHL) (Табл. 3).

Таблица 3

**Урожайность и хозяйственно – ценные признаки сортов и гибридов рапса
в конкурсном испытании (2006-2008 гг.)**

Сорт, гибрид	Урожайность маслосемян			Содержание эруковой кислоты, %	Масса 1000 семян, г
	ц/га	± κ(St), ц/га	± κ(St), %		
Озимый рапс					
Лидер (St)	39,3	–	–	0,2	3,49
м/л-п/с 2001	42,7	3,4	8,7	0	3,92
НПЦ 2007	55,7	16,4	41,7	0	5,0
Яровой рапс					
Явар	32,7	–	–	0,2	3,78
м/л-а/т 1998	30,2	–	–	0	3,60
Алмаз F ₁	38,8	6,1	18,6	0	4,96
м/л-г/с 2000	31,0	–	–	0	3,56
Рубин F ₁	39,2	6,5	19,9	0	4,90

Успех и продолжительность создания новых сортов и гибридов F₁ рапса во многом зависит от правильного подбора исходного материала. Одним из наиболее часто используемых методов оценки селекционного материала, дающим более полную генетическую информацию о признаках и свойствах растений, является диаллельный анализ, с помощью которого можно определить общую (ОКС) и специфическую (СКС) комбинационную способность сортов и линий и прогнозировать эффективность селекции [1, 6, 7, 9].

В настоящее время проводится много исследований генетики количественных признаков по схеме диаллельных скрещиваний [1, 8, 9, 13]. Однако рапс в генетическом отношении изучен еще недостаточно. В литературе имеются лишь единичные данные относительно ОКС и СКС этой культуры [4, 5].

Для получения информации об общей и специфической комбинационной способности сортов ярового и озимого рапса, различающихся по хозяйственно-полезным признакам, с целью оценки генотипов этой культуры с высоким потенциалом продуктивности, соответствующих мировому стандарту качества и для использования в селекции гибридов, нами ежегодно проводятся системные скрещивания.

Нами были проведены скрещивания по диаллельной схеме 6 линий ярового рапса с использованием метода 3 Гриффинга (1956). Анализу подвергались 12 хозяйственно-полезных признаков (высота растений, длина центральной кисти, количество семян в стручке, количество стручков на растении, масса семян с одного стручка и с одного растения и др.). В основу

создания схемы диаллельных скрещиваний был положен принцип признака.

Данные наших исследований свидетельствуют о существенных различиях между изучаемыми линиями ярового рапса, как по общей, так и по специфической комбинационной способности по всем анализируемым признакам. Установлено, что общая комбинационная способность определяется в основном аддитивными эффектами генов и той частью эпистатического эффекта, которая обусловлена взаимодействием генов аддитивного действия. Специфическая комбинационная способность обусловлена преимущественно неаддитивным взаимодействием генов – доминированием или эпистазом [6].

Анализ комбинационной способности каждой из 6 исследуемых линий ярового рапса выявил различия в генетических системах их контроля, определяющих продуктивность растений.

Нами проводилось также изучение комбинационной способности 4 сортообразцов озимого рапса по диаллельной схеме (метод 3 Гриффинга).

Ниже приводится краткая характеристика сортообразцов озимого рапса, включенных в диаллельные скрещивания.

Сортообразец Кт-205/1 раннеспелый, высококачественный по жирнокислотному составу,

образует высокое количество стручков на растении и семян в стручках. Зимостойкость ниже стандарта.

В-907/3 – один из наиболее низкорослых образцов, раннеспелый, обладающий высококачественным жирнокислотным составом. К недостаткам можно отнести повышенную восприимчивость к некоторым заболеваниям, слабую зимостойкость.

Кр-1005 – раннеспелый, зимостойкий, имеет хороший жирнокислотный состав масла. Характеризуется более интенсивным типом осеннего развития.

Св-2005/4 – наиболее продуктивный сортообразец из представленных в данной таблице. Зимостойкость выше стандарта. Образует крупные семена в стручках.

При вовлечении в скрещивание сортов и линий с высокой комбинационной способностью по отдельным или по комплексу хозяйственно-ценных признаков часто наблюдается эффект гетерозиса гибридов первого поколения. Полученные гибриды по некоторым показателям превосходят родительские формы (истинный гетерозис) и (или) стандарт (конкурсный гетерозис или гетерозис \pm к St) по селективируемым признакам. Результаты исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4

Гетерозис у гибридов озимого рапса F_1 по основным хозяйственно-ценным признакам

Сортообразец, комбинация	Высота растений, см	Длина центральной кисти, см	Количество, шт		Масса семян	
			стручков на растении	семян в стручке на центральной кисти	стручка на центральной кисти, мг	одного растения, г
Кт-205/1 \times В-907/3	170,4	41,4	414,1	27,5	110,1	39,4
Гетерозис истинный, %	2,9	1,1	-2,7	3,4	-4,9	74,3
Гетерозис \pm к St, %	4,8	3,8	32,9	20,6	-6,1	37,8
Кт-205/1 \times Кр-1005	158,4	45,3	283,4	18,4	66,9	6,6
Гетерозис истинный, %	-4,3	10,6	-30,7	-30,8	-42,2	-72,2
Гетерозис \pm к St, %	-2,6	13,5	-9,1	-19,3	-42,9	-76,9
Кт-205/1 \times Св-2005/4	162,0	45,5	317,2	27,9	109,9	25,3
Гетерозис истинный, %	-2,1	1,0	-22,4	-4,8	-20,2	-16,0
Гетерозис \pm к St, %	-0,4	14,0	1,8	22,4	-6,2	-11,5

Продолжение таблицы

Сортообразец, комбинация	Высота растений, см	Длина центральной кисти, см	Количество, шт		Масса семян	
			стручков на расте- нии	семян в стручке на центральной кисти	стручка на центральной кисти, мг	одного расте- ния, г
В-907/3 × КТ-205/1	158,6	39,8	499,8	27,0	103,0	41,4
Гетерозис истинный, %	-4,2	-2,8	17,4	1,5	-11,0	83,2
Гетерозис ± к St, %	-2,5	-0,3	60,4	18,4	-12,1	44,8
В-907/3 × Кр-1005	159,5	54,9	388,9	22,7	86,3	40,9
Гетерозис истинный, %	-3,3	36,7	-0,6	-13,0	-19,4	72,6
Гетерозис ± к St, %	-1,9	37,6	24,8	-0,4	-26,4	43,0
В-907/3 × Св-2005/4	150,8	47,8	623,6	24,3	97,3	21,9
Гетерозис истинный, %	-3,6	6,1	46,5	-17,1	-29,3	-27,2
Гетерозис ± к St, %	-7,3	19,8	100,1	6,6	-17,0	-23,4
Кр-1005 × КТ-205/1	157,4	34,3	188,8	28,5	119,8	12,4
Гетерозис истинный, %	-4,9	-16,2	-53,8	7,1	3,5	-47,7
Гетерозис ± к St, %	-3,2	-14,0	-39,4	25,0	2,2	-56,6
Кр-1005 × В-907/3	162,7	39,3	228,6	26,8	106,2	12,4
Гетерозис истинный, %	-1,4	-2,1	-46,3	2,7	-0,8	-47,7
Гетерозис ± к St, %	0,1	-1,5	-26,6	17,5	-9,4	-56,6
Кр-1005 × Св-2005/4	172,9	43,2	309,1	25,9	101,8	23,9
Гетерозис истинный, %	4,8	-4,1	-21,0	-11,6	-26,1	-20,6
Гетерозис ± к St, %	6,3	8,3	-0,8	13,6	-13,1	-16,4
Св-2005/4 × КТ-205/1	168,4	43,5	340,9	26,6	99,3	26,4
Гетерозис истинный, %	1,7	-3,4	-16,7	-9,2	-27,9	-12,3
Гетерозис ± к St, %	3,6	9,0	9,4	16,7	-15,3	-7,7
Св-2005/4 × В-907/3	169,0	42,4	498,4	27,5	120,3	40,8
Гетерозис истинный, %	8,1	-5,9	17,1	-6,1	-12,6	35,6
Гетерозис ± к St, %	3,9	6,3	60,0	20,6	2,7	42,7
Св-2005/4 × Кр-1005	156,5	42,4	257,1	27,0	109,5	23,4
Гетерозис истинный, %	-5,1	-5,9	-34,3	-7,9	-20,5	-22,3
Гетерозис ± к St, %	-3,8	6,3	-17,5	18,4	-6,6	-18,2
Лидер St	162,6	39,9	311,6	22,8	117,2	28,6
В-907/3	148,4	35,5	425,7	15,8	72,7	22,6
КТ-205/1	165,6	41,0	409,0	26,6	115,7	20,2
Кр-1005	165,0	40,2	391,4	26,1	107,0	23,7
Св-2005/4	156,4	45,1	360,3	29,3	137,7	30,1

Почти все использованные в скрещиваниях сортообразцы проявили слабый положительный или отрицательный гетерозис по высоте растений. Наибольшее количество комбинаций с отрицательным гетерозисом получено с участием сортообразца Кр-1005. Он может быть использован при селекции на снижение высоты растений. Наибольшая положительная степень гетерозиса по высоте получена при использовании сортообразца Св-2005/4 в качестве материнской формы (Св-2005/4 × В-907/3 и Св-2005/4 × Кт-205/1 – слабый положительный истинный и конкурсный гетерозис).

Использование некоторых сортообразцов в качестве отцовской формы привело к проявлению истинного и конкурсного гетерозиса по признаку длина центральной кисти (Кр-1005) или только конкурсного (Св-2005/4). При скрещивании с сортообразцом Кт-205/1 в F_1 почти во всех комбинациях был выявлен отрицательный гетерозис длины центральной кисти растений.

В прямых и обратных скрещиваниях сортообразцов Св-2005/4 и В-907/3 в наибольшей степени проявился эффект гетерозиса (17-46 % истинный и 60-100 % конкурсный) по признаку количества стручков на растении, который в значительной степени влияет на продуктивность. Гибриды, созданные с участием сортообразца Кр-1005, практически, во всех комбинациях имеют отрицательный гетерозис (до -39,4 и -53,8 % конкурсный и истинный гетерозисы) и, соответственно, он не может быть рекомендован для включения в селекционную работу по данному признаку.

По признаку количество семян в стручке на центральной кисти выделилось сразу несколько сортообразцов, причем, степень конкурсного гетерозиса достигает достаточно высоких значений. В комбинации Кт-205/1 × В-907/3 данный показатель составил 20,6 %, у Св-2005/4 × В-907/3 – 27,5 %, у Кт-205/1 × Св-

2005/4 – 27,9 %. Комбинация Кт-205/1 × Кр-1005 проявила наибольший отрицательный эффект по данному признаку (до -30,8 %).

Большинство комбинаций проявили в большей или меньшей степени отрицательный гетерозис по признаку масса семян одного стручка на центральной кисти (до -29,4 % истинный гетерозис и -42,91 % – конкурсный). Лишь в комбинации Кр-1005 × Кт-205/1 проявился слабый положительный истинный и конкурсный гетерозис (Табл. 4).

Из всех проанализированных признаков наиболее интегрированным является масса семян с одного растения. Наиболее высокие показатели гетерозиса проявились при использовании сортообразца В-907/3 как в качестве материнской формы (44,8 % – конкурсный гетерозис), так и отцовской (83,19 % истинный гетерозис), что позволяет рекомендовать его в качестве донора данного признака в селекционной работе. Четыре полученные гибридные комбинации с участием этого сортообразца в значительной степени превосходят по продуктивности стандартный сорт Лидер, что очень важно для практической селекции. Остальные сортообразцы проявили низкий либо отрицательный гетерозис по данному признаку, который является наиболее комплексным и важным.

Проявление гетерозиса по отдельным признакам зависит не только от подбора родительских пар, но и от направления скрещивания, а также от агрометеорологических условий. Благоприятное сочетание признаков, имеющих доминантное или сверхдоминантное проявление, обуславливает их превосходство над родительскими формами и стандартом.

Таким образом, включение в скрещивания сортов и линий и получение высокогетерозисных гибридов F_1 – один из перспективных методов повышения эффективности селекционного процесса.

Выводы

1. Исследованиями установлен высокий максимальный эффект гетерозиса (истинный 83,2 % и конкурсный 44,6 %) по признаку продуктивности и до 100 % (конкурсный) по признаку количество стручков на растении у изучаемых сортообразцов озимого рапса, что

указывает на возможность использования этого явления в селекции высокогетерозисных гибридов на основе ЦМС.

2. Отбор селекционного материала по фенотипу может быть эффективен у рапса по признакам: высота растения, высота ветвле-

ния и количество семян в стручке на центральной кисти, в то время как изменчивость по некоторым другим признакам продуктивности зависит от внешних условий и носит модификационный характер.

3. Включение в скрещивания сортов и линий озимого и ярового рапса и получение высокогетерозисных гибридов F_1 – один из перспективных методов повышения эффективности селекционного процесса.

Список использованных источников

1. Кильчевский, А.В. Экологическая селекция растений. / А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева – Мн.: «Тэхналогія», 1997. – 372 с.
2. Коба, М.Г. Взаимосвязь и изменчивость хозяйственно-ценных признаков у сортов и гибридов ярового рапса и их использование в селекции / М.Г. Коба // Автореф. на соиск. уч. ст. кандидата с.-х. наук. – Краснодар, 1996. – 22 с.
3. Омаров Д.С. К методике учета гетерозиса у растений / Д.С. Омаров // С.-х. биология Т.Х, № 1, 1975 – С. 123–128.
4. Пилюк, Я.Э. Дисперсионный анализ как метод оценки селекционного материала рапса / Я.Э. Пилюк // Земледелие и растениеводство. – Сборник научных трудов ИЗиС. – Вып. – 41. – Минск, 2005. – С. 192–198.
5. Рапс / Д. Шпаар [и др.] – Мн. ФАУинформ, 1999. – 208 с.
6. Турбин, Н.В. Генетика гетерозиса и методы селекции растений на комбинационную способность. / Н.В. Турбин // Генетические основы селекции растений / под ред. Н.П. Дубинина М, 1971, С. 565, С. 112–155.
7. Федин, М.А. / Статистические методы генетического анализа / М.А. Федин, Д.Я. Силис, А.В. Смирняев – М.: Колос, 1980. – 207 с.
8. Турбин, Н.В. Диаллельный анализ в селекции растений. / Н.В. Турбин, Л.В. Хотылева, Л.Р. Таругина – Мн.: «Наука и техника», 1974.
9. Bartowiak-Broda, I. Investigation of two kinds of cytoplasmic male sterility in rapeseed / I. Bartowiak-Broda, P. Rosselen, M. Renard. – *Genetica Polonica*, 1979. – S. 50-65.
10. Fu, T. D. Production and research of rapeseed in the Peoples Republic of China / T. D. Fu. – *Cruciferae Newsletter* 6. – 1981. – S. 6–7.
11. Fu, T.D. Rapeseed and improvement in China / T.D. Fu, G.S. Yang // GCIPC Unepublication: Du croupe consultatif international de recher chesur le colza.– 1997, Gottingen NH. – S. 90–95.
12. Hinata, K. Studies on a male sterile strain having the *Brassica campestris* nucleus and the *Diplotaxis muralis* cytoplasm. On the breeding procedure and some characteristics of the male sterile strain / K. Hinata, N. Konno. – *Japan. J. Breed.* 29 (4). – 1979. – S. 305–311.
13. Horner, H.T. A comparative light and electron microscopic study of microsporogenesis in male fertile and male-sterile pepper (*Capsicum annuum*) / H.T. Horner, M. Rogers – *Can. J. Bot.* 52 (3), 1974. – P. 435–441.
- 14 Kaul, M. Male sterility in higher plants / M. Kaul. – Springer Verlag Berlin Heidelberg, RFN. 1988. – S. 336–348.
15. Thompson, K.F. Cytoplasmic male-sterility in oil-seed rape / K.F. Thompson. – *Heredity* 29 (2), 1972. – S. 253–257
16. Wos, H. Hodowla mieszanowa rzepaku w Borowie / H. Wos // XXVI Konferencja Naukowa «Rosliny Oleiste» Poznan, 27–28 kwetnia 2004. – S. 30–31.

Дата поступления статьи 27 октября 2008 г.

Д.В. Лужинский

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ И РЕЗУЛЬТАТЫ ПРАКТИЧЕСКОЙ СЕЛЕКЦИИ ГИБРИДОВ КОРМОВОЙ СВЕКЛЫ (*BETA VULGARIS* L.) ПОЛУСАХАРНОГО ТИПА В БЕЛАРУСИ

РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию»
Республика Беларусь, 222160, г. Жодино, ул. Тимирязева, 1

Введение

В последние годы в мире был достигнут значительный прогресс в области создания новых высокопродуктивных сортов и гибридов кормовой и сахарной свеклы [8, 12]. Предпочтение отдается последним, в связи с использованием явления гетерозиса. В 1914 году George H. Shull определил гетерозис как «проявление увеличения размеров растений, скорости их развития, устойчивости к болезням и насекомым или к всевозможным неблагоприятным проявлениям климата, у гибридных растений по сравнению с родительскими формами, основанное на различии гамет родителей их составляющих». Впервые предложил использовать гетерозис у свеклы J. de Vilmoren в 1919 г. Однако первые исследования по гетерозису у сахарной свеклы были проведены не во Франции, а в США при скрещивании линий, полученных с помощью самоопыления. Гибриды были идентифицированы или с помощью исполь-

зования маркерного гена красной окраски гипокотыля, или по размеру проростков, или по форме листьев.

Гибриды F_1 обладают кроме того, лучшей выравненностью морфологических признаков (особенно те, которые получены при скрещивании 2-х чистых линий) и нередко повышенной относительно сортов-популяций продуктивностью. Современные сорта являются в основном триплоидными гибридами. За последние годы в Европе среди вновь зарегистрированных сортов было: 87 % триплоидов, 7 % диплоидов и 6 % полиплоидов. В основном речь идет гибридах между стерильными и фертильными линиями с большой гомогенностью [10, 14]. По данным многочисленных авторов [1, 2, 7] известно, что по продуктивности триплоиды превосходят как диплоиды, так и тетраплоиды. Однако наши данные свидетельствуют, что в условиях Беларуси уровень продуктивности триплоидных гибридов иностранного происхождения не всегда выше.

Материалы и методы

Исходным материалом для исследований служили диплоидные односемянные ЦМС формы сахарной свеклы Межотненского (Латвия) происхождения, тетраплоидные многосемянные популяции кормовой свеклы полусахарного типа, созданные в РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию».

Оценку комбинационной способности ЦМС-форм и опылителей проводили тестерным методом без реципроков по Кемпсону по двум признакам: урожайности корнеплодов и сбору сухого вещества с гектара. В качестве тестеров использовали районированные сорта

Даринка, перспективный сортообразец Лада и популяцию сформированную из гибридной комбинации Юбилейная × Рубин. Сортоиспытание проводили общепринятым методом на трехрядной делянке учетной площадью 18 м² с трехкратной повторностью. Статистическую обработку проводили по Доспехову [6].

У исходных форм и гибридов анализировали следующие признаки: цвет корнеплода, погруженность корнеплода в почву, содержание сухого вещества в корнеплоде, урожайность корнеплодов. Уровень урожайности определяли по отношению к сорту-стандарту.

Результаты и обсуждение

Подбор родительских компонентов и их подготовка представляют важнейшую составную часть работы по созданию гетерозисных гибридов свеклы. В результате скрещивания заранее подобранных, контрастных по генотипическим и физиологическим признакам сортов, линий и популяций возникает повышенная жизнеспособность гибридов по сравнению с исходными формами, а зачастую и с лучшими районированными сортами. Однако многими исследователями установлено, что не всегда при скрещивании двух хороших сортов потомство получается лучше родителей [3, 4, 5]. Поэтому прежде чем использовать конкретные формы и линии в качестве исходных компонентов гибридов необходимо оценить их комбинационную способность.

Лучшим методом оценки комбинационной способности является метод диаллельных скрещиваний. На практике его чрезвычайно трудно реализовать вследствие необходимости проведения очень большого числа скрещиваний. Поэтому более рациональным является применение тестерного анализа комбинаци-

онной способности, когда в качестве тестера выступает один или несколько сортов или линий (Табл. 1).

В наших исследованиях тестер № 2 (сорт Лада) показал достоверный положительный эффект общей комбинационной способности. Это дает основание сделать вывод, что данный сорт в скрещиваниях с другими будет оказывать по формированию уровня урожайности корнеплодов значительное влияние. А так как он, на данный момент, является самым высокоурожайным сортом, то гибриды, полученные с его участием, будут также высокоурожайными.

В противоположность сорту Лада тестер № 3 (сорт Даринка) и тестер № 1 (популяция сформированная из гибридной комбинации Юбилейная × Рубин) оказались плохими общими комбинаторами, с достоверным отрицательным эффектом ОКС. Следовательно, использование данных сортов в качестве опылителя при получении гибридов на основе ЦМС и в качестве исходной формы при создании нового исходного материала по признаку урожайность корнеплодов нецелесообразно.

Таблица 1

Эффекты ОКС и СКС по урожайности корнеплодов

№ линии ЦМС	Номера тестеров			ОКС
	1	2	3	Линий ЦМС
Mc 2301	-9,817	10,561		-2,571
Mc 2306	-4,371	0,320	4,064	5,879
Mc 2362	1,392	-2,350	0,971	-8,334
Mc 2307		-4,349	4,302	-7,058
Mc 2371	2,248	-2,128	-0,107	3,524
Mc 2309	-4,728		4,058	-1,891
Mc 2372		6,409	-6,456	8,637
Mc 2300		5,746	-5,793	-8,423
Mc 2360	-0,398	-0,107	0,518	6,079
Mc 2353	13,019	-6,073	-6,932	0,389
ОКС тестеров	-2,764	13,772	-11,622	
Варiances СКС	24,062	3,098	-6,349	

НСР_{0,05}ОКС тестеров
ОКС линий10,73
5,30

СКС

19,68

Среди материнских форм также были выявлены 4 линии, обладающие высокой общей комбинационной способностью по урожайности корнеплодов. Это – мс2306, мс2371, мс2372 и мс2360.

В общей сложности, из 25 комбинаций скрещиваний 12 комбинаций показали положительный эффект комбинационной способности по урожайности корнеплодов для каждой отдельной комбинации скрещиваний.

Формы, показавшие высокую комбинационную способность по урожайным качествам, можно также улучшить при помощи реципрокно-рекуррентной селекции так как у испытанных линий ЦМС и опылителей-тестеров при наследовании урожайности корнеплодов и сбора сухих веществ с единицы площади преобладает аддитивное действие генов.

Лучшие гибридные комбинации, полученные при использовании форм с высокой комбинационной способностью, превышали стандарт по урожайности с гектара до 26-36 % по отношению к стандарту (Табл. 2). Изучение гибридов F_1 показало, что содержание сухого вещества у них занимает промежуточное положение между показателями родителей, и то, что увеличение продуктивности является результатом увеличения веса корнеплода. Как правило, гибриды, полученные при скрещивании кормовой свеклы с сахарной, сухого вещества имеют на 6-8 % больше, чем кормовой компонент и по этому показателю находятся ближе к сахарному родителю.

Несмотря на многообещающие результаты полученные при оценке пробных гибридов, в процессе создания гетерозисных гибридов свеклы, практически, все селекционеры столкнулись с рядом проблем: во-первых, с трудностью получения самоопыленных линий вследствие генетически обусловленной самонесовместимости, во-вторых, с невозможностью контролировать опыление материнского компонента отцовским.

Оуэн, основываясь на работах М. Lawtence и Е. East, впервые изучил систему несовместимости у свеклы в 1942 г. и установил, что она обусловлена действием двух независимых аллельных серий S и Z. Аллели S1 и Z1, S2 и Z2 гомологичны и обладают одинаковым действием. Достаточно различия у пыльцы и пестика только по одному гену, чтобы опыление проходило нормально. Именно этот механизм и препятствует получению самоопыленных линий. В результате большинство селекционеров перешли на использование в качестве исходных компонентов гибридов синтетических популяций, прошедших длительный отбор на выравнивание хозяйственно-полезных признаков и свойств. Это в значительной степени снизило величину гетерозиса и степень выравнивания морфологических признаков полученных гибридов (особенно у кормовой свеклы), что в свою очередь привело к невозможности получения положительного результата при оценке на ООС (отличимость, однородность, стабильность) по цвету корнеплода, погруженности в почву и т. д.).

Таблица 2

Результаты предварительного испытания гибридов F_1 2003-2004 гг.

Сорт	Урожайность, ц/га	Сбор сухих веществ, ц/га	Содержание сухих веществ, %	в % к стандарту		
				Урожайность	Сбор сухих веществ	Содержание сухих веществ
Смолевичская (St)	724,6	97,20	13,5	100,0	100,0	100,0
2611 × Эк. кр.	602,2	110,7	18,4	83,1	113,9	136,3
2625 × Эк. кр.	575,3	110,0	19,1	79,4	113,2	141,5
2601 × Даринка	593,1	115,6	19,5	81,9	118,9	144,4
2635 × Даринка	549,8	115,8	21,0	75,9	119,1	155,6
Смолевичская (St)	728,37	97,87	13,4	100,0	100,0	100,0

Продолжение таблицы

Сорт	Урожайность, ц/га	Сбор сухих веществ, ц/га	Содержание сухих ве- ществ, %	в % к стандарту		
				Урожай- ность	Сбор сухих веществ	Содержание су- хих веществ
2601 × Лада	695,30	134,0	19,3	95,5	136,9	144,0
2625 × Лада	648,87	123,6	19,1	89,1	126,3	142,5
2635 × Лада	648,90	126,5	19,5	89,1	129,3	145,5
2634 × (Циклоп по- ли × Смолевичская)	628,63	123,5	19,6	86,3	126,2	146,3
Милана F ₁	662,70	125,9	19,0	84,5	123,6	146,2
2356 × (Циклоп × Смолевичская)	638,53	116,3	18,2	81,4	114,1	140,0
2606 × Лада	660,73	115,6	17,5	84,3	113,4	134,6
Смолевичская (St)	784,17	101,9	13,0	100,0	100,0	100,0
2627 × Лада	680,00	126,7	18,6	91,9	125,0	135,8
2626 × Лада	618,27	118,2	19,1	83,6	116,6	139,4
2632 × Лада	636,53	118,4	18,6	86,0	116,8	135,8
2608 × (Циклоп × Смолевичская)	644,43	120,6	18,7	87,1	118,9	136,5
2360 × Лада	729,60	136,6	18,7	98,6	134,7	136,5
Смолевичская (St)	739,77	101,4	13,7	100,0	100,0	100,0

НСР_{0,05}

68,3

12,6

В наших исследованиях, наряду в высокой продуктивностью, полученные гибриды также имели несколько отрицательных показателей, которые препятствуют их регистрации как сорта. Во-первых, все испытуемые образцы в качестве матери имели популяцию или гибрид F₁ сахарной свеклы не выровненные по цвету гипокотилия. Это привело к тому, что корнеплоды у полученных гибридов расщеплялись по цвету в различных пропорциях. Этому недостатка лишены лишь гибриды, в которых в качестве опылителя использовался сорт Лада, имеющий белые корнеплоды. Попытки использовать выровненные по цвету гипокотилия ЦМС формы постоянно приводят к потере эффекта гетерозиса у получаемых гибридов. Во-вторых, большинство гибридов имели корнеплоды, заглубленные в почву на 70 % и более, что осложняет их ручную уборку и повышает загрязненность при механизированной уборке. В-третьих, разветвленность корнеплодов сахарной материнской популяции доминирует в полученных гибридах, повышая потери при уборке.

Решение данной проблемы за рубежом было найдено после того, как была обнаружена аллель самосовместимости Sf, независимая от серии S и тесно сцепленная с геном односемянности американского типа. Эта аллель является доминантной и передает признак самосовместимости всем своим потомкам при контролируемыми условиях опыления. При использовании самоопыления под изоляторами растений с генотипом SfSa получают самофертильные потомства двух типов SfSa и SfSf. Основным недостатком самофертильных форм является то, что после 3-4 циклов инцухта линии с геном Sf перестают опыляться чужеродной пыльцой и переходят к самоопылению. Использование форм с геном Sf, таким образом, представляет определенный интерес для получения чистых линий у свеклы, но препятствует получению гибридов [9]. В таких условиях для получения гибридов необходимо использовать стерильные линии.

Впервые наследование мужской стерильности изучил Оуэн в 1945 г. [13]. Он показал, что у

американских сортов US1 и US33 все стерильные и полустерильные растения имели фактор S стерильности в цитоплазме, и, наоборот, все фертильные растения имели в цитоплазме фактор N. Кроме того, было установлено, что для возникновения стерильности необходимо наличие двух рецессивных генов в гомозиготном состоянии xx и zz в присутствии цитоплазмы S [13]. Использование этой системы позволяет получать 100 % гибридных семян, однако необходимость иметь кроме ЦМС формы еще и закрепитель стерильности приводит к значительному усложнению и удлинению селекционного процесса по созданию материнского компонента и невозможности создания отцовского.

В 1952 г. Owen открыл стерильность, наследуемую исключительно ядерными генами, в американском сорте US 22-3. Эта стерильность проявляется при наличии рецессивного гена $a1$, независимого от генов x и z . Аналогичный ген $a2$ был описан Эллертоном в 1948 г.

Популяция с геном $a1$ представлена 50 % фертильных с генотипом $A1a1$ и 50 % стерильных с генотипом $a1a1$ растений. Удаляя механически фертильные растения, можно получить 100 % гибридных растений. Таким образом, была получена возможность получать не только выровненные исходные компоненты гибридов, но и значительно упростить селекционный процесс.

Таким образом, современные программы селекции свеклы ставят своей целью получение высокопродуктивных гибридов за счет использования эффекта гетерозиса на основе цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС), а также за счет эффекта в потомстве родителей, различающихся уровнем пloidности – кратностью повтора набора хромосом. Необходимыми компонентами гибридных комбинаций в этом случае являются три формы: МС-форма односемянной свеклы, закрепитель ее стерильности – односемянный О-тип и многосемянный опылитель (Рис. 1).



Рис. 1. Схема селекционного процесса по созданию гетерозисных гибридов F_1 на основе ЦМС.

Однако, большинство селекционных учреждений Европы и Америки, занимающихся селекцией свеклы, не создают чистые линии, а

ограничиваются получением популяций на близкородственной основе, что в значительной мере снижает проявление эффекта гетерозиса.

В «НПЦ по земледелию» также, не используются самоопыленные чистые линии. Причиной этого, является то, что ген самосовместимости Sf, обеспечивающий возможность самоопыления, сцеплен с геном односемянности m_1 . Односемянные формы советского и восточноевропейского происхождения имеют гены односемянности m_2 и m_3 , дающие в гомозиготном состоянии раздельноплодные растения. Все компаунды по рецессивным генам m_1 , m_2 и m_3 приводят к появлению растений с многоростковыми плодами, что делает невозможным использование напрямую западноевропейских форм как источников закрепления стерильности и самосовместимости.

Тем не менее, используя в качестве исходных компонентов популяции, мы в своих исследованиях смогли получить и передать в ГСИ 2 гибрида на основе ЦМС.

Гибрид F_1 **Милана** – первый белорусский одноростковый, триплоидный, **полусахарного** типа. Создан путем скрещивания сорта **Лада** с односемянной стерильной формой сахарной свеклы.

Гибрид малоцветушный, устойчив к церкоспорозу во время вегетации и кагатной гнили

при хранении, пригоден к механизированному возделыванию и уборке.

Гибрид F_1 **Милана** высокоурожайный, характеризуется быстрым ростом в начальный период. Продуктивность его соответствует показателям лучших зарубежных гибридов. Максимальная урожайность была зафиксирована в 2003 г. – 917,4 ц/га корнеплодов и сбор сухого вещества 151,4 ц/га.

Одноростковость семян 98–100 %.

Гибрид F_1 **Купава** – одноростковый, триплоидный, **полусахарного** типа. Создан путем скрещивания сорта **Лада** с односемянной стерильной формой сахарной свеклы.

Гибрид малоцветушный, устойчив к церкоспорозу во время вегетации и кагатной гнили при хранении, пригоден к механизированному возделыванию и уборке.

Гибрид F_1 **Купава** высокоурожайный, характеризуется быстрым ростом в начальный период. Продуктивность его соответствует показателям лучших зарубежных гибридов. Максимальная урожайность в конкурсном сортоиспытании была зафиксирована в 2005 г. – 914,7 ц/га корнеплодов и сбор сухого вещества 145 ц/га. (Табл. 3).

Таблица 3

Результаты конкурсного сортоиспытания кормовой свеклы 2003–2006 гг.

Сорт	Урожайность, ц/га					Содержание сухого вещества, % 2006 г.
	2003	2004	2005	2006	среднее	
Милана F_1	917,43	770,5	656,9	1028,4	843,3	12,16
Арина	1066,7	1018,6	844,0	1022,5	987,9	11,57
Юбилейная × Рубин	1050,8	880,6	723,6	997,6	913,2	11,18
Смолевичская (St)	1024,2	931,3	780,9	849,4	896,5	10,45
Эккендорф желтая	1006,8	928,7	816,9	949,5	925,5	10,08
Купава F_1	914,73	784,2		806,3	835,1	13,78
Лада	1113,8	983,8	848,9	1012,9	989,7	11,08
НСР _{0,05}	103,8	93,8	61,5	89,6		
	Сбор сухого вещества, ц/га					
Милана F_1	151,4	120,7	109,1	124,1	126,3	
Арина	147,3	134,0	110,1	116,4	126,9	
Юбилейная × Рубин	141,1	111,5	92,4	112,0	114,3	
Смолевичская (St)	134,4	114,9	107,5	93,6	112,6	
Эккендорф желтая	125,2	107,5	105,6	101,8	110,0	
Купава F_1	145,7	117,8		104,3	122,6	
Лада	156,3	121,7	97,4	112,2	121,9	
НСР _{0,05}	14,8	12,6	8,3	9,6		

Одноростковость семян 98–100 %.

По результатам оценки гибридов в ГСИ было установлено, что гибрид Милана превзошел по сбору сухого вещества не только гибриды являющиеся стандартами, но и находился на одном уровне с лучшими гибридами ино-

странной селекции (Табл. 4). Однако потенциал сортов-популяций в условиях Беларуси еще не превзойден гетерозисными гибридами. По прежнему самым продуктивным остается сорт Лада, обеспечивающий сбор сухого вещества до 190 ц/га.

Таблица 4

Результаты испытания гибрида Милана в ГСИ, 2001-2004 гг.

Сорт	Урожайность корнеплодов, ц/га			Сбор сухих веществ, ц/га			Содержание сухих веществ, %
	средняя	Max	Min	средняя	Max	Min	
Лада	953	1718	643	132,2	189,4	97,1	13,9
Милана F ₁	878	1373	455	158,3	244,3	94,1	18,0
Средний стандарт гибридов F ₁	894	1198	543	128,3	192,3	88,2	14,4
Абондо	928	1202	544	133,4	191,7	84,0	14,4

Выводы

Исходя из вышесказанного можно сделать вывод, что создание гетерозисных гибридов полусахарного типа в селекции кормовой свеклы является перспективным направлением. Продуктивность и технологические качества гибридов в условиях Беларуси находятся на уровне или несколько превосходят лучшие сорта-популяции.

Для повышения уровня гетерозиса необходимо перейти от использования в качестве исходных компонентов популяций к чистым ли-

ниям. Для этого необходимо изучение способов преодоления облигатного самоопыления у самосовместимых форм свеклы, выявление возможности использования западноевропейских одноростковых форм в селекции на гетерозис совместно с материалом белорусского, украинского и российского происхождения. Разработка методики получения выровненных самоопыленных чистых линий свеклы с использованием генной стерильности может значительно повысить эффективность этой работы.

Список использованных источников

1. Балков, И.Я. Состояние селекционно-генетических исследований по сахарной свекле / И.Я. Балков // Вестник сельскохозяйственной науки. – 1982. – № 3. – С. 94–98.
2. Бережко, С.Т. Создание полиплоидных гибридов сахарной свеклы / С.Т. Бережко // Пути повышения продуктивности односемянной сахарной свеклы: сб. ст. ВНИС. – Киев, 1968. – С. 44–51.
3. Бороевич, С. Принципы и методы селекции растений / С. Бороевич. – М.: Колос, 1984. – 344 с.
4. Грицюк, В.Н. Оценка комбинационной способности некоторых сортов кормовой свеклы поликросс методом / В.Н. Грицюк // Се-

лекция и семеноводство: сб. науч. тр. – 1975. – Вып. 29. – С. 66–69.

5. Долгой, Л.А. Изучение общей комбинационной способности самоопыленных линий сахарной свеклы: Автореф. дисс.... канд. биол. наук / Л.А. Долгой. – Киев, 1984. – 20 с.

6. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – М.: Колос, 1979. – 420 с.

7. Культурная флора СССР. Корнеплодные растения. – Ленинград: Колос, 1971. – Т. XIX. – 435 с.

8. Малецкий, С.И. Перспективы селекции гибридных сортов сахарной свеклы / С.И. Малецкий // Сельскохозяйственная биология. – 1981. – Т. 16. – С. 394–401.

9. Burenin, V.I. Использование белковых маркерных генов для идентификации генетических ресурсов свеклы / V.I. Burenin, I.P. Gavriilyuk // Russian-Agricultural-Sciences. – 1994. – № 5. – P. 21-26.
10. Desprez, M.F. Evolution des methodes de selection de la betterave sucriere des origines a nos jours / M.F. Desprez, B.F. Desprez // Comptes-Rendus-de-l'Academie-d'Agriculture-de-France. – 1993. – V. 79. – P. 71-84.
11. Le Coche, F. Les possibilites d'amelioration de la betterave fourragere (Beta vulgaris L.). / Le F. Coche // Ann. Amelior. Plantes. – 1969. – Vol. 19. – № 2. – P. 169-211.
12. Li, G.Q. Selection of a new polyploid cv. Huyu 302 / G.Q. Li, S.H. Jia, G.F. Zhang // China-Sugarbeet. – 1994. – № 4. – P. 10-12.
13. Owen, F.V. Cytoplasmically inherited male sterility in sugar beets / F.V. Owen // J. Agric. Res. – 1945. – Vol. 71. – P. 423-440.
14. Stolle, M. Futterruben liefern lukratives Grundfutter. Mehr Wirtschaftlichkeit mit neuen Sorten // Neue-Landwirtschaft. – 1992. – № 4. – P. 53-54.

Дата поступления статьи 27 октября 2008 г.

БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКАЯ КОНЦЕПЦИЯ ГЕТЕРОЗИСА

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»,
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Получение высокопродуктивных гибридов сельскохозяйственных растений предполагает привлечение для скрещиваний ценного в селекционном отношении исходного материала. Одним из наиболее важных критериев его селекционной ценности является оценка комбинационной способности [1, 2]. Однако прогресс в селекции может быть достигнут не только на основе развития генетических исследований, но и благодаря изучению молекулярных и физиолого-биохимических факторов, определяющих продуктивность и гибридную мощь растений. Несмотря на пристальное внимание к изучению этой проблемы, пока еще нет единой генетической концепции гетерозиса. Медленный прогресс в теории гетерозиса можно объяснить недостаточным учетом вклада отдельных составляющих полигенных систем, формирующих гибридную мощь в процессе фенотипического проявления качественных и количественных признаков.

Для объяснения механизмов гетерозиса было предложено несколько гипотез. Наиболее общепризнанными являются гипотезы сочетания благоприятных факторов или доминирования [3], сверхдоминирования, или гетерозиготности [4]. Эти концепции объединила гипотеза генетического баланса, согласно которой при перекрестном оплодотворении естественный отбор в популяциях действует, прежде всего, на гетерозиготы, в результате чего у них складывается оптимальный генный баланс [5, 6]. Согласно этой гипотезе, гетерозисный эффект является результатом суммарного эффекта сходного действия разнородных генетических процессов и объясняется сохранением структурного единства блока генов посредством инверсий и локализацией хиазм во время мейоза.

Изучение молекулярных основ наследственности дало толчок к появлению новых физиолого-генетических концепций гетерозиса. Показано, что специфика гетерозисного эффекта определяется событиями, происходящими на уровне генетического материала клетки и регуляции элементарных

генетических процессов [7]. Особое внимание в оценке общей активности генома при гибридизации уделяется содержанию и структурному состоянию ДНК и РНК. Однако данные литературы о закономерностях взаимосвязи между проявлением гетерозиса, инбредной депрессией и содержанием нуклеиновых кислот неоднозначны. Наряду с многочисленными работами, указывающими на снижение содержания нуклеиновых кислот при инбридинге и повышении при гетерозисе, есть сообщения об отсутствии такой зависимости [8, 9]. Существует мнение, что один из механизмов, обеспечивающих на молекулярном уровне проявление гетерозисного эффекта, является активация процессов транскрипции и трансляции [10, 11]. Показано, что гетерозисные гибриды, как правило, превосходят негетерозисные и родительские формы по интенсивности репликации ДНК, причем наибольшая интенсивность клеточных делений наблюдается в темновой период суток. Такая активность, вероятно, сопряжена с активацией транскрибирующей и репликативной функций ДНК. Большее накопление ДНК, увеличение содержания тРНК, числа повторов рибосомальных цистронов (рРНК), а также интенсивное повышение активности транскрипции в соматических клетках гибридных форм по сравнению с родителями являются предпосылками проявления гетерозиса [7, 12, 13].

Проблема гетерозиса – прежде всего проблема продуктивности, и эти два феномена необходимо рассматривать во взаимосвязи и взаимозависимости. На наш взгляд, важно знать не только специфические особенности гетерозисных гибридов и структурно-функциональную организацию родительских форм, но и проследить изменения, происходящие при гибридизации и приводящие к формированию гетерозисного организма. Результаты таких работ позволяют существенно углубить представления о природе гетерозиса и могут быть использованы для создания системы критериев прогнозирования гетерозисного преимущества.

Цель исследования состояла в разработке генетических принципов концепции формирования гетерозиса, основанной на взаимодействии физиолого-биохимических и

биоэнергетических механизмов, обуславливающих реализацию генетического потенциала продуктивности сельскохозяйственных растений.

Материалы и методы

В качестве материала для исследований были использованы покоящиеся семена, этиолированные и зеленые проростки, листья и стебли растений на различных этапах онтогенеза линий, сортов и F_1 -гибридов кукурузы, люпина желтого, томатов и льна-долгунца (*Zea mays* L., *Lupinus luteus* L., *Lycopersicon esculentum* Mill., *Linum usitatissimum* L. spp. *usitatissimum*).

Для решения поставленной задачи был использован многотестовый физиолого-биохимический подход, базирующийся на оценке биоэнергетических характеристик, особенностей роста и развития у исходных форм, различающихся по комбинационной способности и урожайности, и F_1 -гибридов с неодинаковой степенью гетерозиса по продуктивности [14]. При определении активности биоэнергетических процессов использовали: 1) интегральные показатели энергетического метаболизма (ИПЭМ) – содержание и соотношения никотинамидных коферментов и адениловых нуклеотидов (NAD, NADH, NADP, NADPH, AMP, ADP, ATP); 2) активность мультиферментного комплекса ключевых ферментов – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФД), 6-фосфофруктокиназы (6-ФФК), цитохром-С-оксидазы (ЦО) – отдельных звеньев дыхательного метаболизма клетки (пентозофосфатный путь, гликолиз и электрон-транспортная цепь митохондрий). Особенности ростовых процес-

сов оценивали по величинам морфологических признаков и физиологическим показателям (высота растений, число и масса семян, динамика биомассы и количественные параметры роста органов проростков и целых растений, содержание пигментов и др.).

Содержание никотинамидных коферментов и адениловых нуклеотидов определяли методом высокоэффективной ион-парной жидкостной хроматографии высокого давления [15], активность ферментов и количество пигментов – спектрофотометрически [16, 17], электрофорез проводили по [18]. Величины окислительно-восстановительных зарядов рассчитывали по формулам: аденилатный энергетический заряд (АЭЗ) = $[ATP] + 0,5[ADP] / [ATP] + [ADP] + [AMP]$ [19]; катаболический восстановительный заряд (КВЗ) = $[NADH] / [NAD] + [NADH]$ [20]; анаболический восстановительный заряд (АВЗ) = $[NADPH] / [NADP] + [NADPH]$ [20]; общий восстановительный заряд (ОВЗ) = $[NADH] + [NADPH] / ([NAD] + [NADPH]) + ([NADP] + [NADPH])$ [20]. Полученные результаты обрабатывали статистически, используя методы дисперсионного, корреляционного и регрессионного анализов. Достоверность генотипических различий оценивали по наименьшей существенной разнице при $P \leq 0,05$ (НСР₀₅).

Результаты и обсуждение

Сложность наследования количественных признаков у растений при наличии гетерогенных структур фотосинтетических и дыхательных систем и другие особенности клеточного метаболизма позволили прийти к заключению, что знание генетики растительного организма может служить лишь отправной точкой познания фундаментальных основ формирования продуктивности. При создании и отборе форм растений необходимо изучение физиолого-биохимических основ продукционного процесса. Анализ генетических особенностей селекционного мате-

риала на этом фоне позволит более предметно говорить об их взаимообусловленности с физиологическими и биохимическими проявлениями. Связь данных факторов крайне сложна, так как их интеграция и регуляция происходят на разных уровнях структурно-функциональной организации, поэтому для понимания их взаимодействия необходимы комплексные исследования.

Применение многотестового физиолого-биохимического подхода в исследованиях количественных признаков роста, развития и продуктивности у различных сельскохозяйственных культур

позволило сформулировать основные положения биоэнергетической концепции гетерозиса:

1. Гетерозисный эффект реализуется только при обеспеченности клетки макроэргическими и восстановительными эквивалентами. Высокие уровни макроэргических соединений в виде ADP и ATP, а также восстановительных эквивалентов – NADH, NADPH – в клетке снимают конкуренцию между процессами, направленными на новообразование и поддержание элементов структуры организма, субклеточных компонентов, рост и продуктивность растений. Согласованность скоростей генерации и потребления биоэнергетических эквивалентов у гетерозисных F_1 -гибридов служит примером сбалансированности в системе энергетического метаболизма.

В регуляции метаболической активности процесса прорастания семян важная роль принадлежит фитину – основному запасному фосфорсодержащему компоненту (на его долю приходится 60-90 % общего фосфора [21]). Исследования, проведенные на кукурузе, люпине и льне-долгунце, выявили достоверное превос-

ходство гетерозисных F_1 -гибридов над родителями по содержанию фитина в семенах [22, 23]. Количество неорганического фосфата (Pi) в покоящемся зерне значительно ниже, чем фитина, при этом очевидна следующая тенденция – уровень Pi выше у низкогетерозисных гибридов по сравнению с гетерозисными, содержание Pi у которых было ниже, чем у худшей по этому показателю родительской формы [24]. Низкий уровень Pi у гетерозисных комбинаций, который является аллостерическим ингибитором фитазы – фермента, осуществляющего гидролиз фитина, по-видимому, служит предпосылкой для активного гидролиза фитина на ранних этапах прорастания и соответственно накопления биомассы растущими органами проростка и всего растения на начальных этапах онтогенеза.

Анализ величин соотношения фитин/Pi показал, что низкогетерозисные формы по этому показателю были на уровне худшего родителя, а гетерозисные гибриды превышали лучшую родительскую форму [24]. Регрессионный анализ величины соотношения фитин/Pi в семенах и массы зерна с початка у линий и F_1 -гибридов кукурузы выявил достоверную положительную корреляцию между ними (Рис. 1).

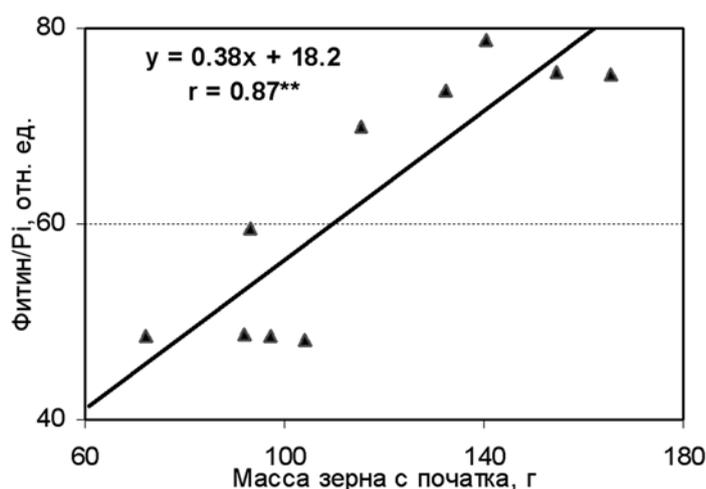


Рис. 1. Регрессионная зависимость между величиной соотношения фитин/Pi в покоящихся семенах и продуктивностью самоопыленных линий и F_1 -гибридов кукурузы. Примечание: r – коэффициент парной корреляции при $** P \leq 0.01$.

В связи с тем, что фитаза в семенах локализована в непосредственной близости от субстрата (миоинозитгексафосфата [25]), логично предположить, что при высоком соотношении фитин/Pi в глобоидах алейроновых зерен создаются благоприятные условия для активного ее функционирования. Полученные данные подтверждают это положение и свидетельствуют, что величина отношения фитин/Pi может

косвенно указывать на способность семян к скорейшему прорастанию и накоплению биомассы проростками, что является одной из предпосылок проявления гетерозиса по продуктивности [22].

При гидролизе фитина, кроме Pi, образуется миоинозитол, 3-фосфоглицериновая кислота и катионы металлов, которые, наряду с адениловыми нуклеотидами, обеспечивают

проращение семян. Анализ полученных результатов показал, что ускоренный рост проростков гетерозисных F_1 -гибридов сопровождается интенсивным гидролизом фитина, который приводит к накоплению метаболитически активных соединений и их эффективному вовлечению в процессы энергообмена и биосинтеза нуклеиновых кислот [22, 23]. Преимущество гибридов над родителями по активности биоэнергетических процессов создает условия для их интенсивного роста и развития при переходе к автотрофному типу питания, что в дальнейшем может способствовать проявлению гетерозисного эффекта по продуктивности.

Изучение активности функционирования энергетических процессов на стадии этиолированных проростков линий и сортов кукурузы, люпина и льна-долгунца, различающихся по комплексу хозяйственно-ценных признаков, позволило обнаружить достоверные генотипические различия по величинам исследуемых показателей [22, 23, 26, 27]. На основании полученных результатов были выделены высокопродуктивные формы, этиолированные проростки которых опережали остальные анализируемые линии и сорта по содержанию энергетических и восстановительных эквивалентов и, как следствие, по интенсивности накопления биомассы. Для проростков этих форм характерен сбалансированный и активный метаболизм. Малоурожайные линии и сорта кукурузы, люпина и льна-долгунца отличались низкими эффективностью и мощностью энергообмена вследствие недостаточной активности систем генерации энергии. Положительная корреляция между со-

держанием АТФ в этиолированных проростках и массой зерна с початка кукурузы, массой семян с соцветия и числом бобов люпина, массой волокна с растения льна-долгунца показывает, что продуктивность может быть детерминирована содержанием макроэнергетических соединений и восстановительных эквивалентов не только в семенах, но и в проростках на начальных этапах роста растений.

При формировании урожая интегрируются результаты координированного протекания основных процессов жизнедеятельности растений – фотосинтеза, дыхания, транспорта метаболитов, роста и развития. Сведения о механизмах генерации энергии в клетке и путях ее использования позволяют выявлять основные точки взаимодействия различных метаболитических систем, представляющих собой отдельные этапы внутриклеточного энергетического метаболизма. Принцип сопряжения между процессами генерации и использования энергии в виде никотинамидных коферментов и адениловых нуклеотидов имеет важное биологическое значение, так как создается гибкая система распределения энергии по различным метаболитическим путям [28].

Сравнение родительских и гибридных форм томатов и льна-долгунца выявило гетерозисный эффект по содержанию суммарного хлорофилла в листьях и стеблях, которое обусловлено одновременным возрастанием $X_{\text{л а}}$ и $X_{\text{л б}}$ [17]. Сравнительная оценка площади листовой поверхности у томатов не выявила преимуществ гибридных форм над сортами и линиями. Напротив, по удельной поверхностной плотности листа (УППЛ) гибридные комбинации превосходили родителей (Рис. 2).

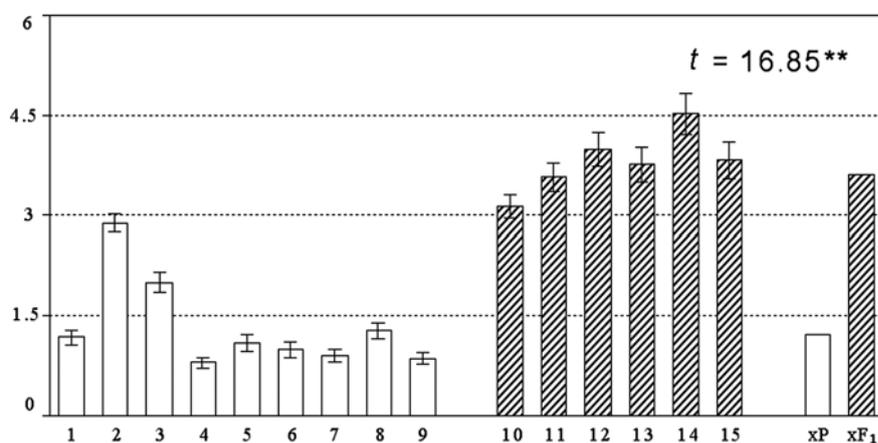


Рис. 2. УППЛ (мг/см²) сортов, линий (1 – Тропсон, 2 – Эдит, 3 – Полусет, 4 – Премьер, 5 – В-82, 6 – Виолент, 7 – Сон, 8 – Кар, 9 – Сократ) и F_1 -гибридов томатов (10 – Сон × Тропсон, 11 – Кар × Тропсон, 12 – Кар × Сон, 13 – Сон × Премьер, 14 – Премьер × Тропсон, 15 – Сократ × Премьер); × Р и F_1 – среднее исходных форм и гибридов первого поколения соответственно; t – критерий Стьюдента при $P \leq 0,01$.

Следует отметить, что F_1 -гибриды, наряду с высоким содержанием фотосинтетических пигментов, обладали плотным мезофиллом, о чем свидетельствует удельная поверхностная плотность листа. Это создает оптимальные условия для интенсивной ассимиляции CO_2 , в результате чего повышается производительность листового аппарата и накопление биомассы растением [29].

Основываясь на том, что продуктивность как один из наиболее энергоемких процессов в значительной степени зависит от функционирования энергообразующих систем клетки, выявленные различия между родителями и гибридами растений томатов и льна-долгунца по содержанию макроэргических соединений и восстановительных эквивалентов могут быть обусловлены различной интенсивностью протекания отдельных реакций, обеспечивающих клетку энергией, а также характером их взаимодействия [17, 30, 31]. Анализ функционирования отдельных звеньев дыхательного метаболизма в зеленых тканях исследуемых форм томатов и льна-долгунца показал, что активность окислительного пентозофосфатного пути и гликолиза по сравнению с таковой в этиолированных проростках ингибирована в различной степени. У F_1 -гибридов лимитирование этих циклов более выражено, чем у родителей [18]. Однако в зеленых листьях гетерозисных генотипов обнаружена более высокая по сравнению с родительскими формами активность цитохром-С-оксидазы – ключевого фермента электрон-транспортной цепи митохондрий, т.е. существенный вклад в образование макроэргических соединений помимо фотосинтеза вносит митохондриальное дыхание [32, 33]. Из этого следует, что гетерозисные F_1 -гибриды обладают более мощным биоэнергетическим потенциалом, создающим в клетке благоприятные метаболические условия для функционирования ростсинтетических процессов, которые способ-

ствуют формированию высокой продуктивности. Полученные результаты подтверждаются данными морфофизиологического анализа (сырая и сухая масса, величина ассимиляционной поверхности листьев и стеблей, высота растений и др.) линий, сортов и F_1 -гибридов томатов и льна-долгунца [22-24, 30, 32-34].

2. В гибридном организме благодаря гетерозиготности формируется большее биохимическое разнообразие (увеличение вариантов сборки мультиферментных комплексов, расширение условий протекания метаболических реакций и т.д.), чем у родителей. Присутствие в геноме гибридов гетерозиготных аллелей предполагает возникновение различных форм ферментов, отличающихся по кинетическим и регуляторным свойствам. Образование динамичных мультиферментных ассоциаций в клетках гибридных форм растений и повышение активности функционирования биоэнергетических путей способствуют реализации гетерозисного преимущества.

Исследования, проведенные с помощью изоферментного анализа линий, сортов и гибридов томатов, кукурузы и льна-долгунца, позволили выявить полиморфизм по различным ферментным системам (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, 6-фосфоглюконатдегидрогеназа, глутаматдегидрогеназа, шикиматдегидрогеназа, кислая фосфатаза, аспаратаминотрансфераза, цитохром-С-оксидаза и др.) [18, 35]. Сопоставление изоферментных спектров гибридных генотипов, полученных при скрещивании сортов, не различающихся между собой по числу, электрофоретической подвижности и интенсивности окрашивания изоформ исследуемых ферментов, показало, что их энзимограммы аналогичны исходным формам, например, аспаратаминотрансфераза (Рис. 3).

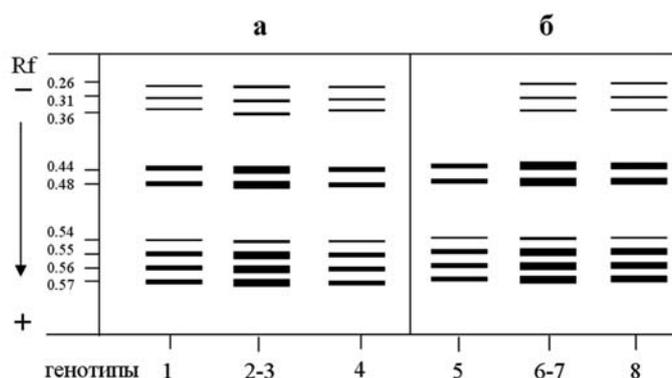


Рис. 3. Схемы электрофореграмм изоферментов аспаратамино-трансферазы родительских сортов и гибридов льна-долгунца. **а:** 1 – Балтучая, 2 – Белинка × Балтучая, 3 – Балтучая × Белинка, 4 – Белинка; **б:** 5 – Викинг, 6 – Викинг × Белинка, 7 – Викинг × Балтучая, 8 – Белинка × Викинг.

Однако активность их проявления в геле у гибридов значительно выше. Это может быть обусловлено тем, что у гибридных организмов локусы, контролирующие синтез исследуемых ферментов, как одного, так и другого родителя имеют одинаковую активность, т.е. наблюдается аддитивное наследование (Рис. 3а). Такие гибриды по сравнению с родителями характеризуются большим количеством ферментного белка, благодаря чему происходит изменение условий протекания различных метаболических реакций в клетках тканей растений. Изоферментные спектры гибридных комбинаций, образованных сортами, энзимограммы которых различаются по числу или электрофоретической подвижности фракций исследуемых ферментов, могут включать изоферменты обоих родителей, т.е. спектр гибрида будет состоять из большего числа изоформ (Рис. 3б). Следует отметить, что наибольшее биохимическое разнообразие характерно для ферментов с широкой субстратной специфичностью или выполняющих в организме регуляторные функции. Ферменты, субстраты которых являются специфическими метаболитами, менее полиморфны. Полученные результаты показывают, что гибридные генотипы, благодаря присутствию в их геноме гетерозиготных аллелей, обладают большим биохимическим разнообразием, чем исходные сорта [36]. Биохимическая обогащенность F_1 -гибридов за счет взаимодействия аллельных и неаллельных генов обеспечивает стабильность и, возможно, большую скорость метаболических процессов, что приводит к увеличению первичного синтеза нуклеиновых кислот и белков, усиливает гомеостаз развития и т.д. Образование у гибридов изоформ ферментов, различающихся по кинетическим и регуляторным свойствам, может приводить к увеличению вариантов сборки мультиферментных комплексов, активизации альтернативных путей отдельных звеньев метаболизма и в конечном итоге к реализации гетерозисного преимущества.

3. Гибридная мощность обусловлена изменением регуляторных механизмов функционирования энергетического метаболизма благодаря присутствию в гетерозиготе различных аллелей, способствующих снятию строгого ограничения активности ростовых процессов.

Комбинированный эффект множества таких изменений приводит к увеличению интенсивности процессов роста и продолжительности фаз онтогенеза у гетерозисных гибридов сельскохозяйственных растений.

При изучении функциональной активности генетического аппарата у F_1 -гибридов и их родительских форм было показано, что гетерозисное потомство обладает более совершенной регуляцией метаболизма благодаря комплементации свойств исходных генотипов, различающихся по функциональной активности локусов [37, 38]. Такое сочетание родительских геномов вызывает модификацию метаболической активности у F_1 -гибридов. При этом эффект гетерозиса на уровне организма зависит от вклада отдельных генетических систем клетки (геномы ядра, хлоропластов и митохондрий) и их межгеномной комплементации [14]. Анализ связи гетерозиса с активностью ферментов, участвующих в процессах переноса энергии, показал, что при прорастании семян наблюдается более высокое потребление веществ эндосперма и накопление биомассы гибридами, однако активность ферментов у гетерозисных форм характеризуется промежуточной величиной либо приближается к лучшему из родителей [22, 27, 39]. По-видимому, активность ферментов контролируется несколькими кодоминантными аллелями, что подтверждает идею о комплементарном взаимодействии геномов родительских форм при формировании гетерозисного состояния. Поэтому гетерозис по одной отдельно взятой метаболической реакции не может являться преимуществом, так как более высокий, чем оптимальный уровень нескольких биохимических реакций приведет к несбалансированности всей генетической системы [40].

Взаимодействие ядерного генетического материала с геномом цитоплазматических оргanelл во многом определяет интенсивность метаболических процессов в растительной клетке, направленных на образование пластических веществ. Было показано, что гетерозиготное состояние влияет на функционирование энергообразующих систем хлоропластов, вызывая изменения в составе функциональных групп, окружающих каталитический центр и определяющих его конформацию и активность [41]. По скорости электронного транспорта у F_1 -гибридов обнаружено «доминирование» и лишь в единич-

ных случаях «сверхдоминирование» [42, 43], а реакции фотофосфорилирования показали промежуточный характер наследования [42]. При анализе фотохимической активности изолированных хлоропластов мезофилла и содержания светособирающих комплексов тилакоидных мембран у инбредных линий и F_1 -гибридов кукурузы выявлены статистически достоверные различия между родителями и гибридами, а также между гибридными генотипами с разной степенью выраженности гетерозисного эффекта [14, 44]. По-видимому, у гетерозисных гибридов имеется более высокая степень сопряжения в системе фотофосфорилирования и увеличение числа фосфорилирующих реакционных центров в электрон-транспортной цепи хлоропластов. Из этого следует, что хлоропласты гетерозисных генотипов обладают более эффективной системой генерации энергии по сравнению с негетерозисными гибридами и исходными формами.

Митохондрии наряду с хлоропластами являются ключевыми энергообразующими органеллами клетки. На гибридных комбинациях кукурузы показано, что митохондрии проростков F_1 -гибридов по форме и размеру более гетерогенны, чем у исходных линий [45]. В клетках листьев гибридных генотипов помимо родительских обнаружен промежуточный тип митохондрий [46]. У F_1 -гибридов с высоким эффектом гетерозиса по накоплению зеленой массы и урожаю зерна фосфорилирующая способность митохондрий выше, чем у родителей [47, 48]. Сравнительное изучение величин ИПЭМ в этиолированных проростках линейных и гибридных форм кукурузы выявило «положительное

сверхдоминирование» для признаков «содержание АТР» и «сумма адениловых нуклеотидов», что указывает на существенный вклад генетического материала митохондрий в реализацию гетерозисного преимущества [49]. Предполагается, что повышенная активность митохондрий гетерозисных F_1 -гибридов реализуется не только за счет комплементации их генетического материала, но и за счет взаимодействия с ядерным геномом [14].

Основным продуктом окислительно-восстановительных реакций и непосредственным донором энергии для большинства энергопотребляющих процессов является АТР. Сопоставление уровней адениловых нуклеотидов в листьях сортов, линий и F_1 -гибридов томатов выявило превосходство гетерозисных генотипов по этим признакам, что свидетельствует об энергообеспеченности последних, следствием которой, на наш взгляд, являются высокие величины сухой массы листьев. Полученные результаты показали, что активность биосинтетических процессов, направленных на накопление органических веществ в листьях растений томатов, определяется уровнем макроэргических соединений в клетке. Гетерозисные гибриды в отличие от родителей и негетерозисных форм томатов характеризовались высоким пулом АДФ и АТР, что свидетельствует об их обеспеченности энергетическими эквивалентами, которая является необходимым условием активизации пластических биосинтезов. Оценка степени фенотипического доминирования физиолого-биохимических признаков выявила дифференциальный характер их наследования (таблица).

Таблица

Степень фенотипического доминирования величин морфофизиологических и биоэнергетических признаков в листьях гибридов томатов первого поколения

Признак	Гибрид					
	Сон × Тростон	Кар × Тростон	Кар × Сон	Сон × Премьер	Премьер × Тростон	Сократ × Премьер
Продуктивность	+++	--	+++	+	--	+++
Сухая масса листа	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Сухая масса стебля	+++	+++	--	--	--	--
Площадь листа	--	+	--	--	+	--
УППЛ	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Хл а + в	+++	+++	+++	+++	+++	+++
АТР	+++	+++	--	+++	++	-
АМР+АДР+АТР	++	+	--	+++	+++	-

Продолжение таблицы

Признак	Гибрид					
	Сон × Тропсон	Кар × Тропсон	Кар × Сон	Сон × Премьер	Премьер × Тропсон	Сократ × Премьер
АЭЗ	+++	+++	+++	+	+++	++
NAD ⁺ +NADP ⁺	+	+	+++	+++	–	+++
NADH+NADPH	--	++	+++	+++	+	+++
NAD ⁺ +NADP ⁺ + NADH+NADPH	--	++	+++	+++	–	+++
NAD ⁺ +NADH	--	+++	+++	+++	--	+++
NADP ⁺ +NADPH	--	+	+++	+++	+	+++

Примечание. Знак (+++) – положительное сверхдоминирование; (++) – положительное доминирование; (+) – промежуточное наследование; (–) – отрицательное доминирование; (--) – отрицательное сверхдоминирование.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что эффект гибридизации наиболее благоприятно сказывается на накоплении биомассы, что предполагает высокую интенсивность процессов, направленных на обеспечение роста и развития. По содержанию АТФ для большинства гибридов отмечено «положительное сверхдоминирование». По другим биоэнергетическим показателям (АЭЗ, содержание АН, сумма окисленных и восстановленных форм НК и др.) у большинства гибридных комбинаций обнаружено «положительное сверх- и доминирование». Эти данные свидетельствуют о том, что в листьях гибридных генотипов с высокой активностью протекают восстановительные биосинтезы (накопление эквивалентов в виде NADH и NADPH), в реакциях которых используются макроэргические соединения в виде ADP и АТФ. Возможно, в гибридном организме складывается оптимальный уровень протекания биохимических реакций, который формирует тот или иной признак. Отмеченные особенности функционирования энергетического метаболизма и физиологических процессов у исследуемых гетерозиготных образцов дают основание полагать, что гетерозисные гибриды по сравнению с негетерозисными и родительскими формами обладают высоким энергетическим потенциалом и оптимумом его реализации, что обусловлено снятием генетического блокирования и устранением репрессивных факторов.

4. У гетерозиготных организмов сбалансированность и комплементарное сочетание разнокачественных регуляторных аллелей, детерминирующих функционирова-

ние отдельных звеньев энергетического метаболизма, снимают ограничение скорости потока биохимических субстратов по метаболическим путям, что в конечном итоге приводит к гетерозису. Размер пула биоэнергетических эквивалентов является чувствительным индикатором активности биосинтетических процессов, которые коррелируют с урожайностью гетерозисных F₁-гибридов.

Интеграция систем энергетического метаболизма заключается в том, что скорость генерирующей энергию реакции зависит от интенсивности эндэргонических систем, составляющих молекулярную основу различных клеточных функций. Биохимические исследования, проведенные на начальных этапах прорастания семян кукурузы (стадия этиолированных проростков), показали, что высокогетерозисные F₁-гибриды характеризуются более интенсивным функционированием энергообразующих систем по сравнению с низкогетерозисными [14]. Сравнительный анализ линейных и гибридных форм кукурузы выявил превышение по биомассе и величинам ИПЭМ, а именно содержанию АТФ и суммы адениловых нуклеотидов, над лучшим родителем в этиолированных проростках тех гибридных комбинаций, где в качестве материнской линии выступала линия с высокими мощностями биоэнергетических процессов и комбинационной способностью [49].

Комплексное изучение интегральных показателей биоэнергетики в проростках гетерозисных и негетерозисных форм дало возможность охарактеризовать вклад отдельных энергообразующих процессов и особенности перестройки

их функционирования при гетерозисе в F_1 , а также выявить их депрессию у гибридов F_2 при отсутствии гибридного преимущества по продуктивности [27]. Полученные результаты свидетельствуют о сложной полигенной генетической детерминации энергетических признаков, что, вероятно, обусловлено различным вкладом отдельных звеньев энергообразующей системы клеток этиолированных проростков в общий энергетический пул [50]. Поскольку гетерозис по продуктивности обеспечивается эффективным функционированием энергообразующих систем, можно полагать, что в зависимости от характера межгенных и ядерно-цитоплазматических взаимодействий могут возникать благоприятные условия для дискретного увеличения эффективности одной или нескольких энергообразующих систем. Это и обеспечивает высокую сбалансированность биоэнергетических и ростовых процессов, что в конечном итоге приводит к проявлению гетерозисного преимущества [22, 51]. Закономерности, отмеченные при сравнительном анализе изменчивости морфофизиологических и биоэнергетических показателей на начальных этапах онтогенеза гибридных и родительских форм кукурузы, проявились при изучении этиолированных проростков сортов и F_1 -гибридов люпина желтого и льна-долгунца [23, 33, 52, 53, 54].

5. У гомозиготных линий величины зарядов никотинамидных коферментов и адениловых нуклеотидов отражают метаболическую ситуацию, характерную для накапливающей энергию системы, что обусловлено разобщением энергогенерации и ростовых процессов. Нарушение регуляторного контроля энергообразующих и энергопотребляющих систем у инбредных форм вызывает высокую напряженность энергетического метаболизма, что отрицательно сказывается на степени накопления органических веществ и конечной продуктивности.

Одной из характеристик энергетического клеточного обмена является содержание отдельных форм никотинамидных коферментов (НК – NAD^+ , $NADP^+$, $NADH$, $NADPH$). Однако активность функционирования метаболических процессов в клетке зависит не столько от абсолютного содержания отдельных форм

никотинамидных коферментов, сколько от молярной концентрации компонентов во всей системе пиридиновых нуклеотидов [28], т.е. от восстановительных зарядов – КВЗ, АВЗ, ОВЗ [20]. Результаты, полученные на зеленых листьях большинства исследуемых линий и сортов томатов и льна-долгунца, показали значительное превышение величины АВЗ над КВЗ, что свидетельствует о большей восстановленности системы ($NADP^+$ - $NADPH$) по сравнению с (NAD^+ - $NADH$) и указывает на существенное накопление восстановительных эквивалентов в форме $NADPH$ [15]. У гибридных растений приблизительно равные значения КВЗ и АВЗ, отражающие равновесное протекание энергообразующих и энергопотребляющих процессов, могут быть обусловлены наличием более совершенной системы регуляции окислительно-восстановительных процессов. Сравнение средних значений ОВЗ по линиям, сортам и гибридам F_1 показало достоверное превышение величины этого показателя у последних. Это может свидетельствовать о том, что гибридные генотипы по сравнению с родительскими формами обладают более высокой степенью восстановленности метаболических систем клеток, что предполагает повышенную интенсивность различных биосинтетических процессов [15].

Анализ данных по активности физиолого-биохимических процессов в зеленых листьях линий и сортов томатов, полученных методом микроклонального размножения, и продуктивностью этих же образцов, выращенных в условиях закрытого грунта, выявили положительную связь между ними [17, 29]. Продуктивные формы, обладали достаточно высокой мощностью и эффективностью метаболических процессов и, как следствие, – быстрым накоплением биомассы растениями. Низкопродуктивные формы характеризовались пониженными величинами показателей биоэнергетики клетки и относительно невысокой урожайностью. Для этих линий и сортов отмечена высокая напряженность энергетического метаболизма, приводящая к нарушению регуляторного контроля энергообразующих и энергопотребляющих систем, что отрицательно сказывается как на степени накопления органических веществ у растений, выращенных в лабораторных условиях, так и на конечной продуктивности. Дисбаланс между генерацией

энергии и накоплением пластических веществ растениями может быть обусловлен повышенными энергозатратами на процессы обновления и поддержания клеточных структур в активном состоянии. Однако у низкопродуктивных линий и сортов не обнаружено нарушения всех функций организма, а имеет место обусловленная генотипическими особенностями исследуемых форм большая или меньшая степень депрессии одних метаболических процессов по отношению к другим. Аналогичная тенденция выявлена и для сортов льна-долгунца [53].

6. Гетерозис обусловлен биоэнергетическим балансом, возникающим в гетерозиготном состоянии при снятии генетического блокирования за счет компенсаторного действия геномов родительских форм, несущих сегрегированные локусы «узких мест» энергетического метаболизма. Положительная комплементация между фотосинтезом и различными звеньями дыхательного метаболизма способствует увеличению стабильности и эффективности энергообмена, что приводит к гетерозису.

Изучение гибридных форм кукурузы, полученных с участием линии, обладающей высокой мощностью биоэнергетических процессов, показало, что при ее скрещивании с неродственными линиями образуются гетерозисные гибриды, характеризующиеся уже на ранних этапах онтогенеза растений высоким содержанием адениловых нуклеотидов и никотинамидных коферментов, а с близкородственной – негетерозисные

формы с низким уровнем макроэнергетических соединений и восстановительных эквивалентов [27, 49]. Это может быть связано с тем, что у близкородственных линий в системе энергетического метаболизма имеется так называемое «узкое место». По особенностям изменений в системе энергетического метаболизма в этиолированных проростках этих линий можно предположить, что инбредная депрессия затрагивает в первую очередь систему окислительного фосфорилирования [55]. Причем, ингибирование активности этого процесса у линии, обладающей высоким биоэнергетическим потенциалом, менее выражено, чем у линии с низкой активностью энергетического метаболизма, что может быть обусловлено более высокой степенью инбредной депрессии у последней. У гетерозисных гибридов, по-видимому, благодаря комплементарному сочетанию разнокачественных регуляторных аллелей снимается ограничение скорости потока биохимических субстратов по метаболическим путям, что приводит к гетерозисному эффекту по продуктивности.

Известно, что величина АЭЗ через опосредованное влияние на активность функционирования различных метаболических систем может регулировать интенсивность процессов роста и развития растений [56-58]. Сравнительный анализ данных, полученных на сортах и гибридах льна-долгунца, показал, что гетерозисные комбинации на всех этапах онтогенеза превосходили по этому показателю родителей и негетерозисные формы, что указывает на их более высокую энергетическую обеспеченность (Рис. 4).

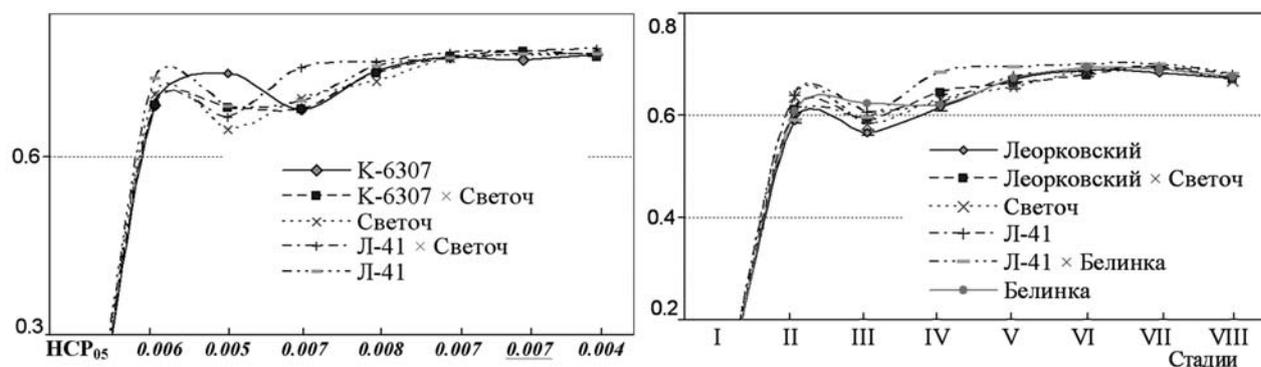


Рис. 4. Динамика АЭЗ (отн. ед.) у родительских форм и F_1 -гибридов льна-долгунца на стадиях: I – «покоящиеся семена», II – «этиолированные проростки», III – «зеленые проростки», IV – «елочка», V – «быстрый рост», VI – «бутонизация», VII – «цветение», VIII – «зеленая спелость».

Негетерозисные гибриды по величине АЭЗ занимали промежуточное положение между исходными сортами, за исключением фазы «цветение», на которой они превышали родителей. Относительно низкие значения АЭЗ у исходных сортов льна-долгунца на стадиях «елочка», обусловленные пониженной интенсивностью функционирования энергообразующих систем, могут являться результатом влияния так называемых «лимитирующих факторов», которые могут ограничивать взаимодействие и активность отдельных звеньев энергетического метаболизма. По-видимому, гетерозисный эффект по продуктивности у исследуемых гибридных комбинаций – следствие компенсаторного изменения активности биохимических реакций по сравнению с родителями. Это можно объяснить тем, что для скрещивания были использованы сорта льна-долгунца, имеющие «узкие места» на разных этапах биоэнергетического метаболизма (активность реакций гликолиза в хлоропластах и цитоплазме или окислительного фосфорили-

рования в митохондриях на стадии «елочка»). Соответственно, реализация генетического потенциала у F_1 -гибридов благодаря более сбалансированному метаболизму обеспечивает формирование повышенной продуктивности у растений, т.е. приводит к гетерозису.

Таким образом, использованный многотестовый физиолого-биохимический анализ наиболее эффективно может быть использован в селекционном процессе для отбора форм растений, характеризующихся значительной генетической вариабельностью по ключевым ферментным системам биоэнергетического метаболизма. Использование биоэнергетических маркеров в качестве критериев оценки исходного селекционного материала на гетерозис позволит осуществлять отбор генотипов, обладающих физиологической и биохимической комплементацией и балансом, что обеспечит эффективность общего метаболизма и, как следствие, высокую продуктивность гетерозисных F_1 -гибридов сельскохозяйственных культур.

Список использованных источников

1. Турбин, Н.В. Диаллельный анализ в селекции растений / Н.В. Турбин, Л.В. Хотылева, Л.А. Тарутина. – Минск: Наука і тэхніка, 1974. – 181 с.
2. Prediction of maize hybrid silage performance using marker data: Comparison of several models for specific combining ability / A. Charcosset [et al.] // *Crop Sci.* – 1998. – Vol. 38, № 1. – P. 38–44.
3. Jones, D.F. Heterosis resulting from degenerative changes / D.F. Jones // *Genetics.* – 1945. – Vol. 30, № 6. – P. 527–542.
4. East, E.H. Heterosis / E.H. East // *Genetics.* – 1936. – Vol. 21, № 4. – P. 375–391.
5. Турбин, Н.В. Гетерозис и генетический баланс / Н.В. Турбин // Гетерозис: теория и методы практического использования / Н.В. Турбин [и др.]; под ред. Н.В. Турбина. – Минск, 1961. – С. 3–34.
6. Mather, K. The genetical basis of heterosis / K. Mather // *Proc. Roy. Soc. Biol. Sci. Ser. B.* – 1995. – Vol. 144, № 915. – P. 143–150.
7. Tsafaris, A. Molecular aspects of heterosis in plants / A. Tsafaris // *Physiol. Plant.* – 1995. – Vol. 94, № 2. – P. 362–370.
8. Титок, В.В. Молекулярно-генетические и биохимические маркеры при гетерозисе (обзор) / В.В. Титок // *Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сербіял. навук.* – 2004. – № 3. – С. 103–107.
9. Milborrow, B.V. A biochemical mechanism for hybrid vigour / B.V. Milborrow // *J. Exp. Botany.* – 1998. – Vol. 48, № 324. – P. 1063–1071.
10. Hollick, J.B. Epigenetic allelic states of a transcriptional regulatory locus exhibit overdominant gene action / J.B. Hollick, V.L. Chandler // *Genetics.* – 1998. – Vol. 150, № 6. – P. 891–899.
11. Differential gene expression patterns in leaves between hybrids and their parental inbreds are correlated with heterosis in a wheat diallel cross / Q. Sun [et al.] // *Plant Science.* – 2004. – Vol. 166, № 3. – P. 651–657.
12. Song, R. Gene expression of a gene family in maize based on noncollinear haplotypes / R. Song, J. Messing // *PNAS.* – 2003. – Vol. 100, № 15. – P. 9055–9060.
13. Bretting, P.K. Genetic markers and plant genetic resource management / P.K. Bretting, M.P. Widrlechner // *Plant Breed. Rev.* – 1995. – Vol. 13. – P. 11–86.
14. Биоэнергетические процессы при гетерозисе / Л.В. Хотылева [и др.]; под общей ред.

Л.В. Хотылевой. – Минск: Навука і тэхніка, 1991. – 176 с.

15. Titok, V.V. Changes of nicotinamide coenzymes and adenylate energy charge in leaves of hybrid and parental tomato forms in an *in vitro* culture / V.V. Titok, O.V. Rusinova, L.V. Khotyljova // *Biologia Plantarum*. – 1995. – Vol. 37, № 4. – P. 507–513.

16. Титок, В.В. Энергетический метаболизм в листьях сортов и F_1 -гибридов томатов / В.В. Титок, С.И. Юренкова, Л.В. Хотылева // *Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук*. – 1998. – № 2. – С. 37–41.

17. Leaf area, chlorophyll content and biomass of tomato plants and their heterotic hybrids under *in vitro* culture / V.V. Titok [et al.] // *Photosynthetica*. – 1994. – Vol. 30, № 2. – P. 255–260.

18. Юренкова, С.И. Онтогенетический полиморфизм изоферментных систем у льна-долгунца / С.И. Юренкова, В.В. Титок, Л.В. Хотылева // *Доклады Нац. акад. наук Беларусі*. – 2001. – Т. 45, № 1. – С. 79–82.

19. Atkinson, D.E. Adenosine triphosphate concentration in metabolic regulation / D.E. Atkinson, G.M. Walton // *J. Biol. Chem.* – 1967. – Vol. 242, № 137. – P. 3239–3242.

20. Quebedeaux, B. Adenylate and nicotinamide nucleotides in developing soybean seeds during seed-fill / B. Quebedeaux // *Plant Physiol.* – 1981. – Vol. 68, № 1. – P. 23–27.

21. Loewus, F.A. myo-Inositol metabolism in plants / F.A. Loewus, P.N. Murthy // *Plant Sci.* – 2000. – Vol. 150, № 1. – P. 1–19.

22. Хотылева, Л.В. Динамика фосфорсодержащих компонентов при прорастании кукурузы в связи с гетерозисом / Л.В. Хотылева, В.В. Титок // *Физиол. раст.* – 1994. – Т. 41, № 3. – С. 92–96.

23. Физиолого-биохимические особенности проростков сортов и гибридов люпина желтого при селекции на кормовую ценность / Л.В. Хотылева [и др.] // *С.-х. биол. Сер. биол. жив.* – 1993. – № 4. – С. 112–117.

24. Ціток, У.У. Колькасць фіціну ў спачываючым і прарастаючым зерні гетерозісных форм кукурузы / У.У. Ціток // *Вес. Акад. навук БССР. Сер. біял. навук*. – 1986. – № 5. – С. 53–56.

25. Азаркович, М.И. Мобилизация белка и фитина в алейроновых зернах семян клешевины при прорастании / М.И. Азаркович, М.И. Дмитриева, А.М. Соболев // *Физиол. раст.* – 1999. – Т. 46, № 3. – С. 410–418.

26. Сравнительная оценка активности биоэнергетических процессов в проростках сортов льна-долгунца / В.В. Титок [и др.] // *Доклады Нац. акад. наук Беларусі*. – 1997. – Т. 41, № 2. – С. 84–87.

27. Хотылева, Л.В. Особенности проявления гетерозиса по продуктивности и интегральным показателям энергетического метаболизма у F_1 и F_2 гибридов кукурузы / Л.В. Хотылева, В.В. Титок // *Цитология и генетика*. – 1994. – Т. 28, № 4. – С. 31–34.

28. Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants / Stasolla C. [et al.] // *J. Plant Physiol.* – 2003. – Vol. 160, № 11. – P. 1271–1295.

29. Морфофизиологические признаки при гетерозисе у томатов в культуре *in vitro* / В.В. Титок [и др.] // *Доклады Нац. акад. наук Беларусі*. – 1998. – Т. 42. – № 1. – С. 93–98.

30. Титок, В.В. Интегральные показатели энергетического метаболизма при формировании продуктивности льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) / В.В. Титок, С.И. Юренкова // *Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук*. – 2005. – № 3. – С. 50–55.

31. Titok, V.V. Energy metabolism in fibre flax ontogenesis at heterosis / V.V. Titok, S.I. Yurenkova, L.V. Khotyljova // *Agriculture*. – 2004. – Vol. 86, № 2. – P. 76–85.

32. Титок, В.В. Дыхание и продукционный процесс у льна-долгунца / В.В. Титок, С.И. Юренкова, Л.В. Хотылева // *Физиол. и биох. культ. раст.* – 2004. – Т. 36, № 5. – С. 403–409.

33. Titok, V.V. Dynamics of bioenergetic processes in early stages of flax growth / V.V. Titok, S.I. Yurenkova // *Horticulture Vegetable Growing*. – 2000. – Vol. 19, № 3. – P. 77–85.

34. Характеристика энергетического метаболизма в онтогенезе льна-долгунца при гетерозисе / В.В. Титок [и др.] // *Генетика*. – 2005. – Т. 41, № 2. – С. 1–7.

35. Юренкова, С.И. Изоферментный анализ генетического полиморфизма у льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) / С.И. Юренкова // *Вес. Акад. навук БССР. Сер. біял. навук*. – 2003. – № 1. – С. 35–40.

36. Титок, В.В. Биоэнергетическая концепция гетерозиса / В.В. Титок // *Доклады Нац. акад. наук Беларусі*. – 2003. – Т. 47, № 4. – С. 84–89.

37. Birchler, J.A. In search of the molecular basis of heterosis / J.A. Birchler, D.L. Auger,

- N.C. Riddle // *The Plant Cell*. – 2003. – Vol. 15, № 10. – P. 2236–2239.
38. Tsaftaris, A.S. Mechanisms of heterosis in crop plants / A.S. Tsaftaris, M. Kafka // *J. Crop. Prod.* – 1998. – Vol. 1, № 1. – P. 95–107.
39. Юренкова, С.И. Кинетические характеристики глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы у линий и гибридов кукурузы / С.И. Юренкова, А.Н. Разумович // *Вес. Акад. навук БССР. Сер. біял. навук.* – 1986. – № 4. – С. 63–65.
40. Plant metabolism and heterosis / D.Rhodes [et al.] // *Plant Breed. Rev.* – 1992. – Vol. 10. – P. 53–91.
41. Genetically based differences in photochemical activities of isolated maize (*Zea mays* L.) mesophyll chloroplasts / D. Hola [et al.] // *Photosynthetica*. – 1999. – Vol. 36, № 1/2. – P. 187–197.
42. Фотохимические реакции хлоропластов и активность рибулозодифосфаткарбоксилазы у гетерозисных проростков кукурузы и их родительских форм / Л.В. Хотылева [и др.] // *Доклады Акад. наук БССР.* – 1984. – Т. 28, № 8. – С. 756–759.
43. Körnerová, M. The effect of low growth temperature on hill reaction and photosystem 1 activities and pigment contents in maize inbred lines and their F₁ hybrids / M. Körnerová, D. Hola // *Photosynthetica*. – 2000. – Vol. 37, № 3. – P. 477–488.
44. The development of chloroplast ultrastructure and Hill reaction activity during leaf ontogeny in different maize (*Zea mays* L.) genotypes / J. Kutik [et al.] // *Photosynthetica*. – 1999. – Vol. 36, № 4. – P. 497–507.
45. Показатели энергетического обмена у гибридной и инбредной кукурузы / А.П. Яковлев [и др.] // *Науч. докл. высш. школы. Биол. науки.* – 1973. – № 11. – С. 105–109.
46. Яковлев, А.П. Фосфорный обмен в генеративных органах инбредной и гибридной кукурузы / А.П. Яковлев, М.Ф. Овчинникова // *С.-х. биол.* – 1972. – Т. 7, № 1. – С. 77–80.
47. Яковлев А.П. Окислительная и фосфорилирующая активность митохондрий кукурузы в связи с гетерозисом / А.П. Яковлев, М.И. Тукеева, Н.В. Раськова // *Физиол. раст.* – 1971. – Т. 18, вып. 4. – С. 772–776.
48. McDaniel, R.G. Biochemical and physiological basis of heterosis / R.G. McDaniel // *Crit. Rev. Plant Sci.* – 1986. – Vol. 4, № 3. – P. 228–246.
49. Титок, В.В. Особенности наследования интегральных показателей энергетического метаболизма в проростках гибридных форм кукурузы / В.В. Титок, А.Н. Разумович, Л.В. Хотылева // *Генетика.* – 1989. – Т. XXV, № 7. – С. 1223–1229.
50. Ціток, У.У. Асаблівасці наследавання колькасці АТФ у праростках кукурузы / У.У. Ціток // *Вес. Акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 1989. – № 4. – С. 35–37.
51. Титок, В.В. О наследовании интегральных показателей энергетического метаболизма в зерновках гибридов кукурузы F₁ / В.В. Титок, А.Н. Разумович, Л.В. Хотылева // *С.-х. биол. Сер. биол. раст.* – 1991. – № 1. – С. 105–111.
52. Титок, В.В. Содержание компонентов адениловой системы в семенах льна-долгунца / В.В. Титок, О.В. Русинова, Л.В. Хотылева // *Доклады Акад. наук Беларуси.* – 1994. – Т. 38, № 3. – С. 63–66.
53. Титок, В.В. Активность дыхательного метаболизма в зеленых проростках льна-долгунца / В.В. Титок, С.И. Юренкова, Л.В. Хотылева // *Физиол. и биох. культ. раст.* – 2000. – Т. 32, № 3. – С. 184–188.
54. Titok, V.V. Dynamics of energy metabolism parameters in fiber flax ontogenesis / V.V. Titok, S.I. Yurenkova, L.V. Khotyljova // *Natural Fibres.* – 1998. – № 2. – P. 241–243.
55. Хотылева, Л.В. Интегральные показатели энергетического метаболизма в этиолированных проростках самоопыленных линий кукурузы / Л.В. Хотылева, А.Н. Разумович, В.В. Титок // *Физиол. раст.* – 1987. – Т. 34, вып. 2. – С. 101–108.
56. Титок, В.В. Биоэнергетические процессы в онтогенезе льна-долгунца (*Linum usitatissimum*) при гетерозисе / В.В. Титок // *Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2002. – № 3. – С. 45–49.
57. Титок, В.В. Использование биоэнергетических показателей для оценки селекционной ценности сортов льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) / В.В. Титок, С.И. Юренкова, Л.В. Хотылева // *Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2002. – №4. – С. 37–41.
58. Титок, В.В. Использование интегральных показателей энергетического метаболизма для диагностики селекционной ценности льна-долгунца / В.В. Титок, С.И. Юренкова, Л.В. Хотылева // *Вестник Фонда ФФИ.* – 2005. – № 3. – С. 37–49.

Дата поступления статьи 4 декабря 2008 г.

В.А. Лемеш

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ В ИЗУЧЕНИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ ЛЬНА

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Генетические ресурсы культивируемых растений состоят из генетического разнообразия культур и примитивных образцов (ландрас), а также из разнообразия диких близкородственных популяций. Выявление этого разнообразия путем исследования полиморфизма молекулярно-генетических маркеров, вне зависимости от его селективной значимости, является важным направлением для сохранения генетической пластичности представителей культивируемых видов, ее использования и накопления. В ряде исследований описаны различия по уровню генетически детерминированного полиморфизма у диких видов, ландрас и культурных растений. Для сохранения генетического разнообразия особое значение имеет сохранение генофонда ландрас и предковых форм. В связи с этим важно разработать методы наиболее полноценного использования генного пула диких и культурных растений в селекции. Наиболее обогащенным генным пулом, пригодным для этих целей, обладают дикие популяции растений.

Объектом наших исследований является экономически важная для республики сельскохозяйственная культура лен – одна из древнейших и ценных прядильных и масличных культур, волокно которой по прочности превосходит хлопок, джут и шерсть, а льняное масло находит применение в различных областях промышленности. Наблюдаемое сужение генетического базиса культивируемых сортов льна является следствием использования в селекционных программах ограниченного спектра исходного материала. Необходимо расширение генофонда льна введением новых ценных генов, связанных с устойчивостью к болезням, низкой температурой, засухе и дру-

гим неблагоприятным факторам окружающей среды, источником которых могут служить дикие родственные виды.

Новым этапом в исследовании льна является прямой анализ его генома и связанный с этим поиск молекулярных маркеров, позволяющих проводить дифференциацию, идентификацию и генотипирование различных образцов льна. В решении этих задач важная роль принадлежит молекулярно-генетическим маркерам. Используемые маркеры должны обладать определенными свойствами и отвечать ряду требований [1]. Вместе с тем, очевидно, что не существует такого стандартного набора маркеров, который удовлетворял бы всем этим требованиям. Как правило, наиболее широко для описания генофондов используют: а) полиморфизм структурных генов (в частности, электрофоретические варианты белков); б) полиморфизм анонимных последовательностей ДНК.

Исходя из задачи полноценного использования генного пула диких и культурных растений в селекции для изучения генетического разнообразия генофонда рода *Linum* L. и эволюционных отношений среди его представителей нами применен метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) [2, 3], который предполагает использование праймеров и получение дискретных ДНК-продуктов амплификации отдельных участков геномной ДНК. Метод амплификации ДНК при помощи ПЦР обозначил новое направление в методологии установления специфичности геномов. ПЦР анализ отличается технологичностью и высокой разрешающей способностью, что делает его незаменимым при идентификации и дифференциации генотипов и позволяет выявлять

полиморфизм ДНК, который может быть использован для анализа меж- и внутривидовой изменчивости.

Один из вариантов ПЦР – RAPD-PCR технология [4, 5] основана на анализе произвольно амплифицированной полиморфной ДНК. ДНК-профили могут быть получены без знания нуклеотидной последовательности при использовании ограниченного набора праймеров. Для более точного выявления полиморфизма близкородственных генотипов используется метод микросателлитного анализа (SSR-PCR) [6]. Используя эти методы, можно достаточно бы-

стро выявить вариабельность большого числа локусов по всему геному в целом. Применение ДНК-маркеров открывает широкие возможности картирования хромосом, идентификации генов, контролирующих хозяйственно ценные признаки растений, их клонирования и генетического конструирования новых сортов. Молекулярное маркирование геномов делает возможным установление видовой и сортовой специфичности растений, а также определение филогенетических взаимоотношений между отдельными представителями таксонов и внутри различных систематических групп.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили: 17 диких видов рода *Linum*, полученные из Генетического банка растений (г. Гатерслебен, Германия), а также разновидности вида культурного льна *L. usitatissimum*, включая 17 белорусских сортов льна-долгунца современной селекции (Оршанский 2, Могилевский, Дашковский, Родник, Нива, К – 65, Е – 68, М – 12, Лира, Весна, Вита, Прамень, Василек, Пралеска, Старт, Згода Блакит); 11 белорусских ландрас, заложенных в коллекцию Всесоюзного института растениеводства им. Н.И.Вавилова в 20–60-е годы XX века (к-37, к-594, к-790, к-1042, к-4219, к-5330, к-5453, к-5451, к-5991, к-6212, к-6601), 12 сортов масличного льна различного происхождения: Лирина (Германия), Ручеек (Россия), Linola (США), Шафир (Польша), Gold Flax (Канада), Bison (США), Небесный (Россия), Bukoz (Польша), Eole (Франция), Lola (Чехия), Oliver (Франция), Alaska (Франция).

Выделение ДНК и RAPD-анализ проводили по методике, описанной нами ранее [7] с незначительными модификациями. Статистический анализ включал составление бинарных матриц по каждому из праймеров, в которых отмечалось «присутствие» (1) или «отсутствие» (0) фрагментов с одинаковой молекулярной мас-

сой на электрофореграмме. Характер и степень RAPD-изменчивости анализировали в отношении праймера и образца. На основании суммарной матрицы RAPD-спектров с помощью программного пакета PhylTools были определены генетические дистанции между исследуемыми образцами.

SSR-анализ проводили по стандартной методике [6]. Анализ полученных ПЦР продуктов выполняли на автоматическом лазерном флуоресцентном секвенаторе ALFexpress II (Amersham Biosciences) с использованием коротких гелекассет (дистанция разделения 9 см). Такое разделение позволяет обнаружить разницу в длине фрагментов с точностью до одного нуклеотида. Результаты электрофореза продуктов амплификации документировались в виде фрагментов или пиков. Длина фрагментов или пиков соответствует длине аллелей исследуемых образцов. Размер фрагментов вычисляли путем сравнения со стандартами при использовании программы Fragment Manager 1.2 (Pharmacia). Для построения дендрограмм, демонстрирующих филогенетические отношения между изученными образцами льна применили метод невзвешенного парно-группового кластерного анализа с арифметическим усреднением (UPGMA) с использованием программы PhylTools.

Результаты и обсуждение

RAPD-PCR позволяет быстро определять вариабельность большого числа локусов по всему геному, сопоставлять значительные участки генома, что повышает точность сравнительно-

го анализа и степень выявляемого генетического полиморфизма. По наборам продуктов реакции, представляющим собой фрагменты ДНК разной длины, регистрируются разли-

чия между геномами близкородственных организмов. Такие фрагменты служат специфическими геномными маркерами и позволяют находить полиморфные состояния в большом количестве локусов генома.

Межвидовое генетическое разнообразие оценивали с помощью 26 эффективных произвольных декамерных праймеров. Основная зона разделения фрагментов находилась в пределах 2000 пн – 200 пн. В целом учитывалось 2458 амплифицированных фрагментов. Четыре праймера установили наличие мономорфных фрагментов у исследуемых образцов (UBC 209 – около 500 пн, UBC 448- около 700 пн, UBC 499 – около 1600 пн, UBC 556 – около 500 пн). Данные мономорфные фрагменты могут считаться RAPD-маркерами для представителей рода *Linum*. Чем больше генетическая дистанция между исследуемыми видами, тем меньше у них общих продуктов амплификации. Выявляемые при электрофорезе мономорфные полосы у близких видов предпо-

лагают общность структурно-функциональной организации геномов этих видов. Каждый из видов имел свой определенный спектр амплифицируемых RAPD-продуктов, отличающийся от других количеством фрагментов, их размером и степенью выраженности. Некоторые праймеры выявили присущие только одному конкретному виду ампликоны и, следовательно, являются видоспецифичными.

Число суммарных зон, полученных при амплификации ДНК 18-ти изученных видов льна с каждым из праймеров, варьирует от 1 до 11. Отмечены существенные различия по количеству RAPD-фрагментов между изученными видами. Исследуемые образцы различались также по числу уникальных, характерных только для одного вида ампликонов. Наибольшее их количество присутствует у *L. usitatissimum* – 16 (8,7 %) и *L. grandiflorum* – 11 (6,0 %). У некоторых видов уникальных фрагментов не отмечено (Табл. 1).

Таблица 1

Виды льна, число хромосом и полученных RAPD-фрагментов

Виды	Число хромосом	RAPD-фрагменты	
		Общее количество	Уникальные
<i>L. grandiflorum</i> Desf.	2n = 16	169	11
<i>L. austriacum</i> L.	2n = 18	166	0
<i>L. perenne</i> L.	2n = 18	161	1
<i>L. tenuifolium</i> L.	2n = 16	138	7
<i>L. suffruticosum</i> L.	неизвестно	125	7
<i>L. thracicum</i> Degen	неизвестно	134	0
<i>L. lewisii</i> Pursh	2n = 18	103	3
<i>L. capitatum</i> Kit. ex Schultes	2n = 34	42	0
<i>L. altaicum</i> Ledeb.	2n = 18	151	0
<i>L. hirsutum</i> L.	2n = 16	101	0
<i>L. nodiflorum</i> L.	2n = 26	164	5
<i>L. narbonense</i> L.	2n = 20	94	5
<i>L. stelleroides</i> Planch.	неизвестно	148	6
<i>L. tauricum</i> Willd.	неизвестно	144	2
<i>L. komarovii</i> Juss.	2n = 16	152	2
<i>L. leonii</i> F. W. Schultz	2n = 18	139	5
<i>L. campanulatum</i> L.	2n = 16	143	5
<i>L. usitatissimum</i> L.	2n = 30	184	16

Для количественной оценки RAPD-полиморфизма и определения уровня дивергенции между изученными видами льна по-

лученные данные были представлены в виде матрицы состояний бинарных признаков, в которых наличие или отсутствие в RAPD-

спектрах одинаковых по размеру ампликонов рассматривалось как состояние 1 и 0 соответственно. По матрицам состояний были рассчитаны матрицы различий с использованием коэффициента Жаккарда [8]. Исходя из этой матрицы, невзвешенным парно-групповым методом кластерного анализа с арифметиче-

ским усреднением (UPGMA) была построена дендрограмма генетического подобия между изученными образцами льна (Рис. 1). Уровень различий по величине расстояния Жаккарда между исследуемыми образцами варьирует от 0,171 (между *L. austriacum* и *L. perenne*) до 0,867 (между *L. narbonense* и *L. altaicum*).

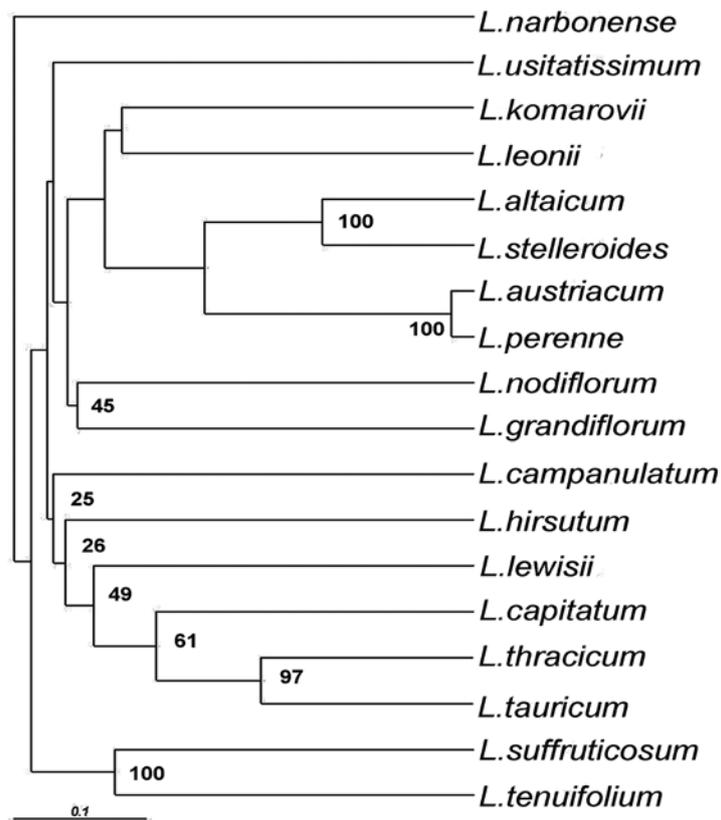


Рис. 1. Дендрограмма филогенетических взаимоотношений между видами льна.

Виды *L. tenuifolium* и *L. suffruticosum*, *L. perenne* и *L. austriacum* слабо морфологически обособлены друг от друга и иногда на основании морфологических данных отождествляются. По данным RAPD-анализа (значения бутстрепа 100 %) виды дифференцированы, несмотря на некоторую степень гомологии как по количеству, так и по размерам фрагментов.

Как следует из представленной дендрограммы, правомерно объединить в одну секцию виды *L. tauricum*, *L. thracicum*, *L. capitatum*. Виды *L. grandiflorum*, *L. nodiflorum*, *L. perenne*, *L. austriacum*, *L. stelleroides*, *L. altaicum*, *L. leonii*, *L. komarovii* группируются вместе и наи-

более близки в генетическом отношении к возделываемому виду *L. usitatissimum*. Наиболее удален в генетическом отношении вид *L. narbonense*. Следует отметить, что в один кластер попадают виды, резко отличающиеся хромосомным набором (Табл. 1). Возможно, специализация в пределах рода *Linum* L. шла двумя путями: в развитии групп с разным набором хромосом сыграла роль полиплоидия, внутри групп обособление видов происходило за счет хромосомных перестроек. Можно полагать, что хромосомный набор $n=8$ у *L. grandiflorum* и *L. hirsutum* произошел от $n=9$ путем нисходящей анеуплоидии, $n=10$ у *L. narbonense* – путем восходящей анеуплоидии, $n=15$

у культурного вида *Linum usitatissimum* является результатом полиплоидизации. Вероятно также, что $n=15$ и $n=16$ произошли от предка с $n=9$. Хромосомный набор *L. capitatum* ($n=17$) может быть объяснен происхождением от $n = 8 - 9$ хромосом.

Оценку генетического полиморфизма белорусских сортов льна-долгунца и белорусских ландрас проводили с использованием 19-ти полиморфных праймеров. Основная зона разделения фрагментов находилась в пределах

2000 пн – 200 пн. В целом учитывалось 135 амплифицированных фрагментов (среднее число локусов на праймер 7,1), из них 60 были полиморфными (в среднем 3,1 полиморфные полосы на праймер) (Рис. 2). Праймеры UBC 290, UBC 336 и UBC 586 генерировали только 1 полиморфную полосу, а праймеры UBC 292 и UBC 542 проявили 6 полиморфных полос. Из 60 выявленных полиморфных полос некоторые обнаруживались с большей частотой (Рис. 3).

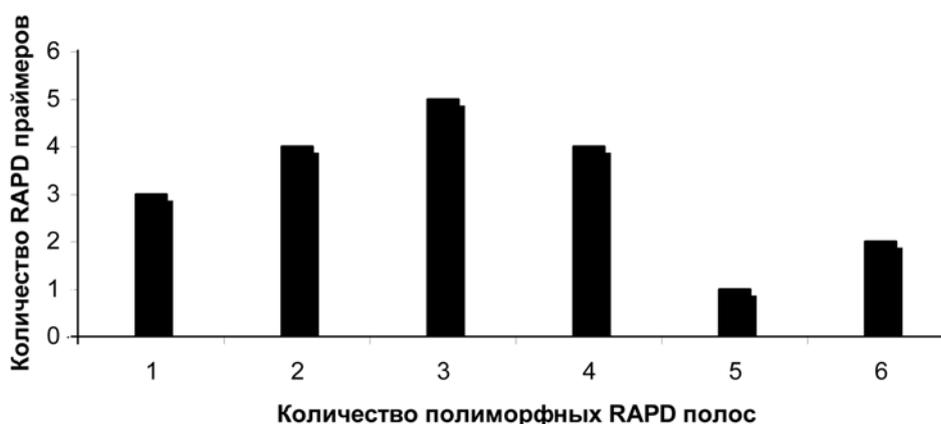


Рис. 2. Степень RAPD-изменчивости исследованных белорусских сортов в зависимости от праймера.

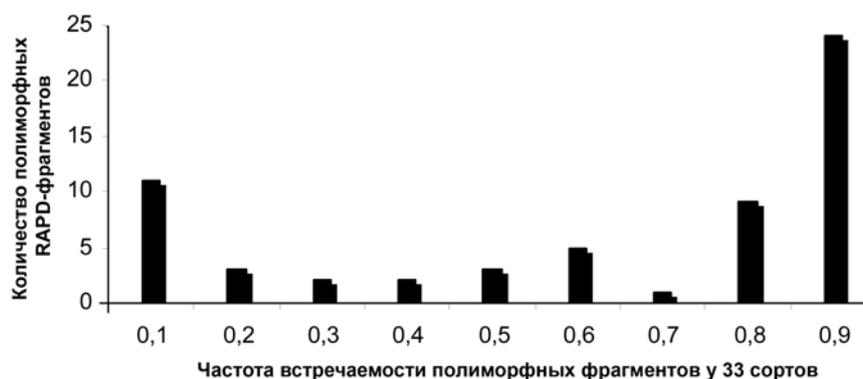


Рис. 3. Степень RAPD-изменчивости исследованных белорусских сортов относительно полиморфизма.

Так, например, 24 полиморфные полосы (40 %) встречались в большинстве образцов (частота появления 0,9 и выше), а 11 полиморфных полос (18 %) обнаруживались лишь в нескольких сортах (частота появления 0,1 и ниже). Такой характер изменчивости RAPD-локусов преимущественно наблюдается в культурных сортах, поскольку в результате селекции фиксируются как доминантные, так и рецессивные аллели [9].

Некоторые праймеры выявили уникальные, присущие только одному конкретному образцу ампликоны: у сортов Блакит – UBC 180₆₀₀, Старт – UBC 292₁₆₀₀, Прамень – UBC 365₉₀₀, UBC 365₆₅₀, к-5451 – A12₁₈₀₀. Эти уникальные ампликоны могут использоваться, чтобы отличать эти сорта от других сортов льна-долгунца, т.е. для идентификации данных генотипов. Наблюдалось широкое варьирование генетического полиморфизма в зависимости от праймера – от

14,3 до 85,7 % (в среднем 41,7 %). Пропорцию

считывали отдельно для сортов современной селекции и для ландрас (Рис. 4).

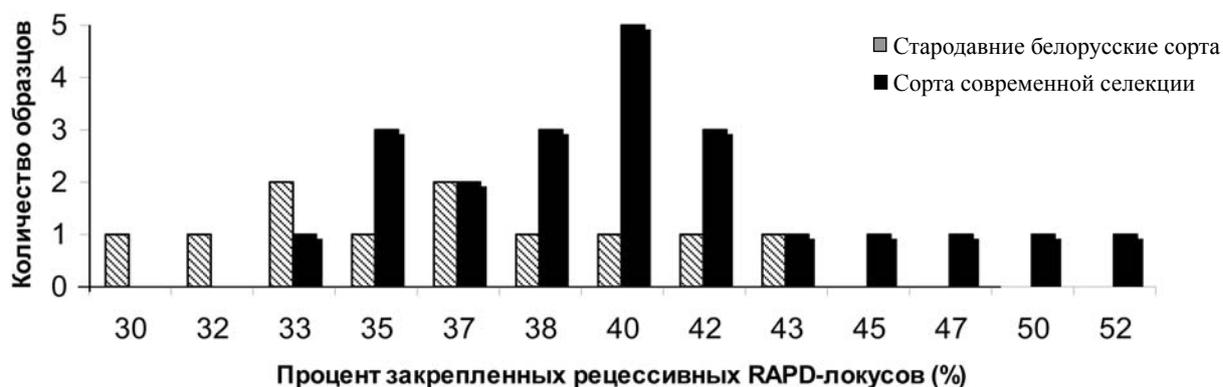


Рис. 4. Степень RAPD-изменчивости исследованных белорусских сортов в зависимости от образца.

У современных сортов эта пропорция варьировала от 33,0 % до 51,7 % (в среднем 40,4 %), у ландрас – от 30 до 43,3 % (в среднем 36,3 %). Аналогичные данные приведены в литературе для 54 американских сортов льна. Доля закрепленных рецессивных RAPD-локусов в образцах колебалась от 36,9 % до 59,2 % и составляла в среднем 45,3 %. Она была ниже, чем в растениях сортов льна из

коллекции канадского льна (51,2 % у сортов льна-долгунца), но выше, чем у североамериканских ландрас (42,7 %) [10,11]. Регрессия доли закрепленных рецессивных RAPD-локусов у белорусских образцов льна за годы выращивания (Рис. 5) характеризуется коэффициентом линейной регрессии 0,087 (доля локусов на год) и статистически достоверно не отличается от нуля ($P > 0,26$).

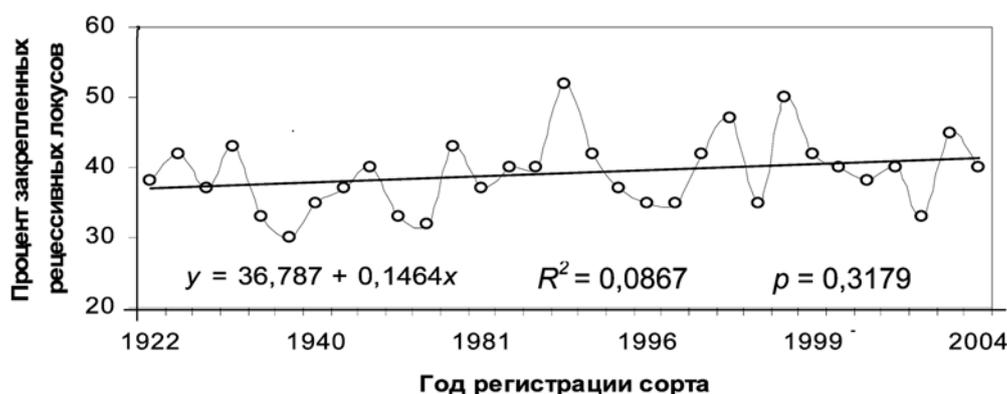


Рис. 5. Взаимосвязь между пропорцией закрепленных рецессивных RAPD-локусов и годом регистрации сорта льна.

Линейная зависимость между долей фиксированных рецессивных RAPD-локусов и годом регистрации белорусских современных сортов и ландрас в период с 1922 по 2004 годы была недостоверна.

Наибольшее значение коэффициента генетической дистанции Жаккарда среди белорусских форм льна было найдено между стародавним белорусским образцом к-1042 и современным сортом Старт, и составило 0,622.

Традиционно в Беларуси возделывался лен-долгунец для получения волокна. В небольших масштабах высевались сорта льна народной селекции для получения масла. В настоящее время, несмотря на возрастающую потребность промышленности в льняном масле, лен масличный в Беларуси вообще не высевается из-за отсутствия белорусских высокоурожайных сортов. Только один сорт белорусской селекции передан в Госсортоиспытание Институтом льна

НАН Беларуси [12]. С целью создания сортов, адаптированных к условиям Беларуси и не уступающих по урожайности лучшим зарубежным аналогам, необходимо изучать генетическое разнообразие как льна масличного, так и льна-долгунца для выбора исходного селекционного материала. Узкая генетическая база современных сортов льна-долгунца требует привнесения новых аллелей, источником которых могут стать сорта льна масличного. Для проведения анализа сортов льна масличного было отобрано 30 эффективных произвольных праймеров, позволяющих получить наибольшее количество полиморфных фрагментов. Основная зона разделения фрагментов находилась в пределах 2000-200 п.н. В целом учитывалось 280 амплифицированных фрагментов (среднее число локусов на праймер 9,3), из них 134 были полиморфными (в среднем 4,5 полиморфные полосы на праймер). Количество полиморфных полос в зависимости от праймера варьировало от 1 до 15. Максимальное количество (15 полиморфных полос) получено в результате амплификации с праймером UBC249. Восемнадцать праймеров выявили уникальные ампликоны у 8 сортов льна масличного. Сорт Eole имел в RAPD-спектрах 8 уникальных ампликонов (UBC248₃₀₀, UBC248₇₀₀, UBC403₁₅₀₀, OPW17₆₅₀, OPW17₅₅₀, UBC249₁₅₀₀, UBC180₇₀₀, UBC569₈₀₀); сорт Шафир – 3 (UBC337₆₀₀, OPW08₁₂₀₀, OPX20₈₅₀); сорт Ручеек – 3 (UBC348₃₅₀, UBC348₃₀₀, UBC790₅₅₀); сорт Bukoz – 2 (OPT08₁₂₀₀, UBC542₈₅₀); сорт Lola – 1 (UBC365₉₀₀); сорт Bison – 1 (UBC292₈₅₀);

сорт Небесный – 1 (UBC548₃₅₀); сорт Лирина – 1 (UBC396₁₆₀₀). Эти уникальные ампликоны могут использоваться для идентификации данных генотипов.

Для льна, как для самоопыляющейся культуры, характерен довольно низкий уровень полиморфизма (18 %). Было показано, что сорта льна-долгунца весьма сходны по генетическим маркерам и составляют гомогенную группу [13]. Нами установлено широкое варьирование генетического полиморфизма исследованных сортов льна масличного в зависимости от праймера – от 12,5 до 88,8 % (в среднем 45,3 %). Выявленная доля фиксированных рецессивных локусов была умеренно низкой; варьировала от 16,5 до 25,6 % и в среднем составила 21,1 %. Показано, что селекция масличного льна в Канаде привела к большей потере генетического разнообразия, чем селекция в США. Это заключение основано на значительной части фиксированных локусов в канадских селекционных программах. Установлено также, что генетическое разнообразие льна из Европы и Восточной Азии значительно выше по сравнению с образцами из Африки и Индии, которое характеризуется низкой степенью генетической изменчивости [14].

На основе данных о генетических дистанциях изученные сорта были кластеризованы с помощью программы TREECONW. Дендрограмма генетического подобия исследованных генотипов льна масличного, построенная по данным RAPD-анализа, приводится на рисунке 6.

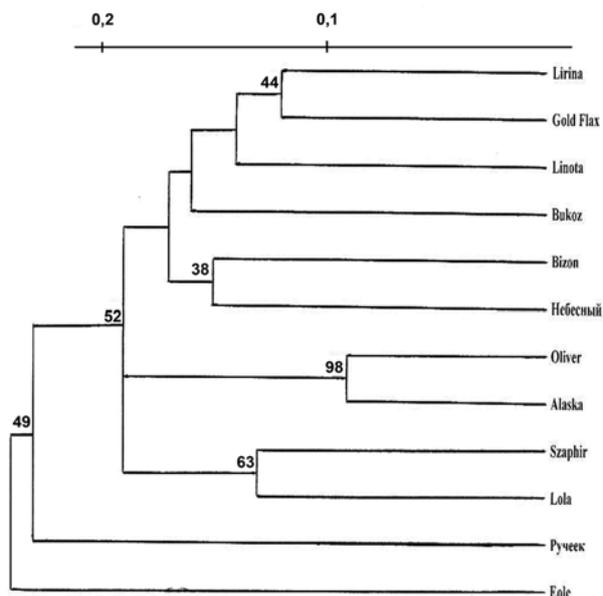


Рис. 6. Дендрограмма генетического подобия исследованных генотипов льна масличного.

Из представленных данных видно, что сорта не сформировали четких кластеров. Это подтверждает предположения о сохраненном генетическом разнообразии льна масличного. С минимальной генетической дистанцией в пару объединены только озимые сорта Oliver (Франция) и Alaska (Франция), что, по видимому, можно объяснить их общим происхождением.

Лен принадлежит к числу видов, для которых характерен достаточно низкий уровень полиморфизма, что является следствием самоопыления и ограниченного числа источников, используемых при создании современных сортов. RAPD-маркеры дают возможность достоверно идентифицировать дикие виды [7, 10, 15, 16] и сорта масличного льна [11, 17],

но возникают трудности с идентификацией сортов льна-долгунца.

Анализ 47 образцов льна различного географического происхождения (Беларусь, Литва, Польша, Россия, Нидерланды, Франция, США) был выполнен по 23 микросателлитным маркерам. Все 23 пары праймеров дали четкую картину амплификации и были использованы для создания SSR-базы данных. Идентифицировано 77 аллелей.

В соответствии с таблицей 2 число обнаруженных аллелей колебалось от 1 (Lu29) до 9 (Lu8). В среднем наблюдалось по 3,3 аллели на маркер. Индекс информативности колебался от нуля для маркера Lu29 до 0,774 для Lu23. В среднем, он составлял 0,462 и его значение соответствует среднему значению среди изученных видов [6].

Таблица 2

Число аллелей и индекс информативности (PIC) SSR маркеров льна

п/п	Праймер	Количество локусов	Аллели	PIC
1	Lu 1	2	177, 235, 239 237	0,651
2	Lu2	2	212, 214	0,298
3	Lu3	1	155, 157	0,480
4	Lu4	2	166, 170, 180	0,530
5	Lu8	1	198, 200, 204, 206, 208, 210, 212, 216, 218	0,654
6	Lu11	2	300, 302, 304, 313	0,553
7	Lu12	2	246, 251, 254	0,296
8	Lu13	1	374, 376, 378, 380, 382, 384	0,670
9	Lu15	2	195, 204, 207	0,562
10	Lu17	1	285, 287, 289, 291	0,475
11	Lu19	1	142, 143	0,059
12	Lu20	2	199, 212, 214	0,616
13	Lu21	1	214, 216, 212, 234	0,439
14	Lu23	1	247, 249, 251, 253, 255	0,774
15	Lu27	2	139, 174, 181	0,514
16	Lu28	1	175, 184	0,326
17	Lu29	1	182	0,000
17	Lu31	1	135, 137, 140	0,554
18	Lu32	1	121, 151, 147, 153	0,354
19	Lu35	2	119, 126	0,500
20	Lu36	1	178, 187	0,234
21	Lu37	1	257, 260	0,432
22	Lu38	2	140, 142, 146, 158	0,686

Полученная SSR-база данных белорусских и иностранных сортов льна позволила провести анализ их генетического сходства (Рис. 7). Кластерный анализ дифференцировал все проанализированные сорта. Несмотря

на низкий уровень обнаруженного полиморфизма данные SSR-анализа могут быть использованы для идентификации генотипов и создания уникальных ДНК-паспортов данных образцов.

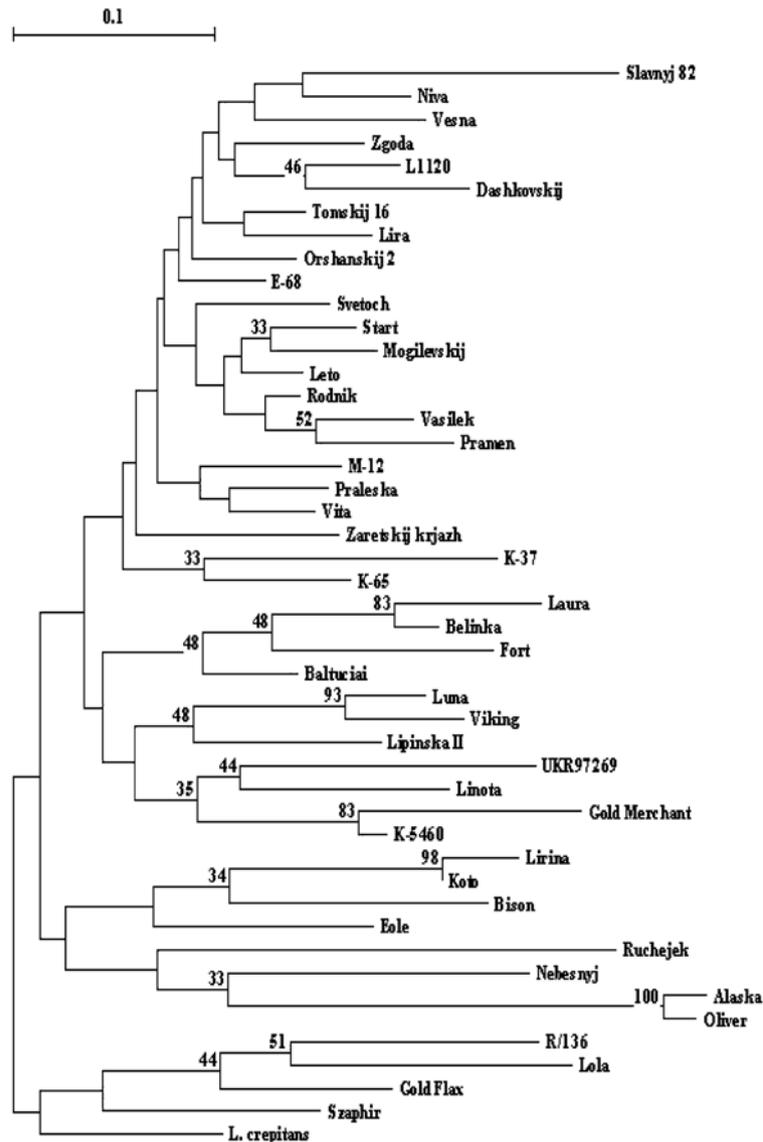


Рис. 7. Дендрограмма генетического сходства 47 сортов льна.

Все проанализированные сорта четко разделились на две группы долгунцового и масличного типа, хотя это разделение характеризуется невысокими значениями бутстрепа. Причем генетические дистанции между сортами льна-долгунца существенно меньше в сравнении с сортами льна масличного.

Сорта льна-долгунца в свою очередь подразделяются на два подкластера. В один из них входит ряд сортов западноевропейской селекции, такие как Laura и Belinka, а также литовский сорт Baltuciai. Другой подкластер формируют стародавние и современные сорта белорусской селекции. При этом современные сорта белорусской селекции формируют еще более узкий подкластер.

Выводы

1. Молекулярно-генетический анализ дает возможность выявить специфические геномные маркеры, которые могут использоваться для видовой и внутривидовой идентификации

генотипов. Показано, что метод молекулярного маркирования генома на основе RAPD-PCR позволяет определить таксономический статус представителей рода *Linum* и установить

филогенетические взаимоотношения между различными видами льна.

2. При изучении внутривидового разнообразия культурного льна обнаружено, что молекулярно-генетические изменения в геноме масличного льна, как правило, выше, чем льна-долгунца. Следовательно, геном масличного льна может рассматриваться как источник генетической изменчивости при селекции новых сортов как масличного льна, так и льна двойного назначения – для получения масла и льноволокна.

3. Показано, что с помощью SSR-маркеров (микросателлитный анализ) возможна более эффективная идентификация сортов, чем с помощью наиболее информативных RAPD маркеров. Микросателлитный анализ можно успешно использовать для изучения изменчивости и установления филогенетических связей внутри вида *Linum usitatissimum*. Более того, уровень изменчивости, выявляемый с помощью микросателлитных маркеров льна, позволяет использовать SSR анализ как для работы с генетическими коллекциями, так и для паспортизации образцов. Целенаправленное использование видоспе-

цифичных праймеров позволит исследователям сократить затраты труда и средств, необходимые для анализа коллекционных образцов.

4. Полиморфизм микросателлитных маркеров, обнаруженный в результате наших экспериментов, может послужить основой для системы идентификации сортов льна. Достоверная дифференциация сортов достигнута в результате генотипирования по 23 SSR маркерам. Анализ SSR локусов и построение на их основе базы данных может стать основой для общедоступной централизованной системы, в которую поступают данные из различных лабораторий. Существование такой базы данных ДНК позволит проводить тестирование новых сортов относительно всех существующих, что сократит затраты на поддержание коллекций стандартов. Помимо идентификации сортов и защиты авторских прав селекционеров, создание базы данных может служить интересам Государственной инспекции по испытанию и охране сортов растений, поскольку в базе данных будет содержаться информация о совокупности генов, представленных в современных районированных сортах льна.

Список использованных источников

1. Harris, H. Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics / H. Harris, D.A. Hopkinson. – Amsterdam: North-Holland Publ. Comp., 1976. – 680 p.

2. Mullis, K.B. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction / K.B. Mullis, F. Faloona // Meth. Enzymol. – 1987. – Vol. 155. – P. 335-350.

3. Полимеразная цепная реакция с универсальными праймерами для изучения геномов / С.А. Булат [и др.] // Генетика. – 1992. – Т. 28, № 5. – С. 19–28.

4. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers / J.G.K. Williams [et al.] // Nucl. Acids Res. – 1990. – Vol. 18, № 22. – P. 6531–6535.

5. Welsh, J. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers / J. Welsh, M. McClelland // Nucleic Acids Research. – 1990. – Vol. 18, № 24. – P. 7213–7218.

6. Polymorphic microsatellite loci in *Linum usitatissimum* / C. Roose-Amsaleg [et al.] // Mol. Ecol. Not. – 2006. – N 6. – P. 796–799.

7. Лемеш, В.А. RAPD-анализ межвидового полиморфизма льна (род *LINUM* L.) / В.А. Лемеш, М.В. Шут, Л.В. Хотылева // Информационный вестник ВОГиС. – 2005. – Т. 9, № 4. – С. 490–494.

8. Jaccard, P. Nouvelles Recherches sur la distribution florale / P. Jaccard // Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat. – 1908. – Vol. 44, №1. – P. 223–270.

9. Bartish, I.V. Combined analyses of RAPDs, cpDNA and morphology demonstrate spontaneous hybridization in the plant genus *Chaenomeles* / I.V. Bartish, K. Rumpunen, H. Nybom // Heredity. – 2000. – Vol. 85, № 1. P. 383–392.

10. RAPD analysis of genetic relationships of seven flax species in the genus *Linum* L. / Y.-B. Fu [et al.] // Genetic Resources and Crop Evolution. – 2002. – Vol. 49, № 1. – P. 253–259.

11. RAPD Analysis of 54 North American Flax Cultivars / Y.-B. Fu // Crop Sci. – 2003. – Vol. 43, № 4. – P. 1510–1515.

12. Ивашко, Л.В. Новые сорта льна – залог стабильного и качественного урожая / Л.В. Ивашко [и др.] // Могилев, 2006. – 27 с.

13. Lemesh, V. Use of RAPD and SSR Markers for Studying of Flax Genetic Resources in Belarus / V. Lemesh // Innovative Technologies for Comfort: Proceedings of the 4th Global Workshop (General Consultation) of the FAO/ESCORENA European Cooperative Research Network on Flax and Other Bast Plants, Arad, Romania, 7-10 October, 2007. / University of Arad. Arad, 2007. – P. 50–54.
14. Fu, Y.-B. Geographic patterns of RAPD variation in cultivated flax / Y.-B. Fu // Crop Science. – 2005. – Vol. 45, № 3. – P. 1084–1089.
15. Генетический полиморфизм рода *Linum* L. по данным RAPD-анализа / В.А. Лемеш [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: научные труды: материалы Междунар. науч. конф., Минск, 17-18 нояб. 2005 г. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; редколл.: А.В. Кильчевский [и др.]. – Минск, 2005. – Т. 1. – С. 176.
16. Генетическая изменчивость современных сортов и стародавних белорусских образцов льна-долгунца по данным RAPD-анализа / В.А. Лемеш [и др.] // Факторы экспериментальной эволюции организмов: сб. науч. тр. / Укр. об-во генетиков и селекционеров им Н.И. Вавилова; редколл.: В.А. Кунах [и др.]. – К.: Логос, 2006. – Т. 3. – С. 118–122.
17. ДНК полиморфизм современных сортов льна масличного / Гузенко Е.В. [и др.] // Достижения и проблемы генетики, селекции и биотехнологии: сб. науч. тр. / Укр. об-во генетиков и селекционеров им Н.И. Вавилова; / К.: Логос, 2007. – Т. 2. – С. 256–260

Дата поступления статьи 4 декабря 2008 г.

Н.И. Дубовец, Е.А. Сычева, Л.А. Соловей, Т.И. Штык, Е.Б. Бондаревич

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ГЕНОМ КАК ИСТОЧНИК ВНУТРИВИДОВОЙ ДИВЕРГЕНЦИИ ПОЛИПЛОИДНЫХ ЗЛАКОВ

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Исследования последних лет, проведенные на различных растительных системах как естественного, так и искусственного происхождения с применением молекулярных технологий, показали, что генезис аллополиплоидных форм сопровождается кардинальными геномными преобразованиями и модификациями [1–9]. Часть этих изменений происходит на ранних стадиях формирования аллополиплоида и обеспечивает его цитологическую и генетическую диплоидизацию. Другие изменения возникают спорадически на протяжении длительного периода жизни полиплоидных видов, и их роль сводится к повышению генетической изменчивости, пластичности и адаптивности таксона. К числу последних относится уникальная способность аллополиплоидных видов скрещиваться между собой с образованием рекомбинантных геномов, содержащих генетический материал двух или более диплоидных видов. [10, 11]. Появление таких геномов в ходе гибридизации тетраплоидных форм впервые было продемонстрировано Zohary и Feldman на примере рода *Aegilops* [12]. Авторами предложена модель «*pivotal-differential*» эволюции, согласно которой все многообразие полиплоидных видов *Triticum* и *Aegilops* возникло в результате скрещиваний небольшого числа первичных тетраплоидов, имевших один общий геном (A, U, или D) и различавшихся вторыми геномами. При этом общий (базовый) геном служил буфером, обеспечивающим возможность рекомбинаций между хромосомными наборами вторых (различных) геномов. В итоге формировался тетраплоидный гибрид, включающий исходный базовый геном и сильно модифицированный новый геном. Есть все основания полагать, что на ранних

этапах эволюция злаков была в значительной степени «перекрещивающейся» [13], и многие полиплоидные виды являются результатом аналогичных гибридизаций. Вследствие этого, изучение процесса формирования рекомбинантного генома представляется актуальной задачей.

Удобной экспериментальной моделью для подобного рода исследований являются тетраплоидные пшенично-ржаные амфидиплоиды. Гибриды F_1 этих форм содержат в кариотипе диплоидный набор хромосом ржи и гаплоидные наборы хромосом A и B геномов пшеницы, что по геномной структуре полностью соответствует упомянутой теоретической модели. В последующих поколениях тетраформ в каждой гомеологичной группе пшеничного компонента кариотипа происходит замещение одного из гомеологов на соответствующий гомолог. В результате формируется рекомбинантный геном, отличительной особенностью которого является огромная вариация хромосомного состава, обусловленная разными сочетаниями хромосом A и B геномов пшеницы. Теоретически возможны 128 таких сочетаний, однако в эксперименте число их значительно ниже, причем в материале из разных селекционных программ наблюдаются различия по частоте встречаемости отдельных хромосом пшеницы [14–17], что свидетельствует о неслучайном характере происходящих рекомбинационных событий. Исходя из этого, мы поставили перед собой задачу на созданном нами материале провести детальное исследование процесса стабилизации хромосомного состава тетраформ и на основе сопоставления полученных результатов с литературными данными выявить закономерности этого процесса.

Материалы и методы

Объектом исследований являлись яровые тетраплоидные пшенично-ржаные амфидиплоиды ПРАТ 12, ПРАТ16 и ПРАТ72, полученные в результате гибридизации 6х-тритикале с диплоидной аллоплазматической рожью [14]. Каждая из 3-х форм представляет собой потомство гибрида F_2 , репродуцируемое в условиях свободного опыления. Анализ хромосомного состава растений в ряду поколений (F_6 , F_{10} , F_{14} – F_{17}) выполнялся с помощью метода дифференциального окрашивания хромосом по Гимза [18]. В ходе исследования гибридов

F_6 цитологические препараты готовились из суспензии клеток, полученной при мацерации корешков нескольких растений, что не позволяет достоверно оценить частоту встречаемости различных вариантов кариотипа в гибридном материале (данные анализа не включены в таблицу). В последующих поколениях анализировался хромосомный состав индивидуальных растений – не менее 30 на каждую форму. Учет количества aberrантных хромосом пшеницы был проведен в гибридном материале F_{14} – F_{17} .

Результаты и обсуждение

Первый анализ хромосомного состава полученных нами тетраплоидных тритикале был проведен в F_6 гибридов. Было установлено, что каждая из трех форм представляет собой популяцию растений с различными вариантами кариотипа. В каждом варианте геном ржи был представлен полностью, а пшеничный компонент образован определенным сочетанием хромосом А и В геномов. Всего в исследованном материале было выявлено 30 вариантов таких сочетаний. Различия между ними главным образом обусловлены разным составом 2, 3 и 7-й гомеологичных групп. В этих же группах наряду с парами гомологов с высокой частотой встречались гетерологичные пары хромосом. Состав остальных гомеологичных групп практически полностью стабилизировался: 1-я группа в большинстве случаев (за исключением двух вариантов кариотипа) была представлена хромосомой 1В; 4-я и 5-я – у всех форм содержали хромосомы А генома; в 6-й также преобладали хромосомы А генома (6В отмечена в четырех вариантах кариотипа, в двух из них в моносомном состоянии). Поскольку первоначально предполагалось, что конечным этапом формирования хромосомного состава тетраплоидных тритикале является подбор пар гомологов во всех гомеологичных

группах, полученные данные свидетельствовали о незавершенности процесса стабилизации кариотипа исследованных форм. Полагая, что растения с несбалансированным кариотипом, как менее жизнеспособные, в ходе репродукции материала будут подвержены элиминации, мы ожидали скорого его завершения в одном из следующих поколений. Однако хромосомный анализ более поздних поколений 4х-тритикале не подтвердил наши ожидания. Так, в F_{10} из 33 выявленных вариантов кариотипа сбалансированными по хромосомному составу всех гомеологичных групп (стабильными) были лишь 10, остальные по-прежнему характеризовались гетерогенностью одной, двух или трех гомеологичных групп.

Частота встречаемости гетерологичных пар хромосом пшеницы в разных гомеологичных группах тетраформ представлена в таблице 1. Как видно из данных (Табл. 1), самой нестабильной у гибридов F_{10} была 2-я группа, затем в порядке возрастания стабильности следовали 3, 7, 1 и 6 группы. Следует отметить существенное снижение уровня стабильности 1-й гомеологичной группы, которая в F_6 преимущественно была представлена парой хромосом В генома, а в F_{10} в 13 вариантах кариотипа содержала 1А хромосому (Рис. 1).

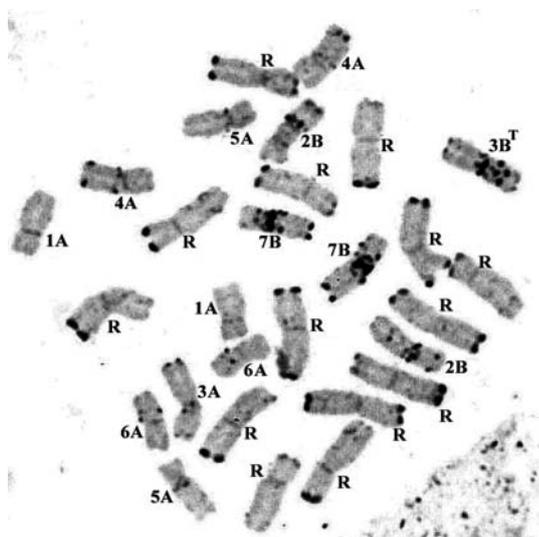


Рис. 1. С-окрашенная метафазная пластинка тетраплоидного пшенично-ржаного амфидиплоида F_{10}^T — обозначает транслоцированные хромосомы.

В целом по трем популяциям растения с нестабильным кариотипом составили 48,94 % от числа проанализированных. У гибридов F_{14} было выявлено 41 сочетание хромосом А и В геномов пшеницы, из которых 11 относились

к стабильным вариантам кариотипа. Растения с нестабильным кариотипом составили 55,0 %. Особого внимания заслуживает факт появления гетерологичных пар хромосом в 5-й гомеологичной группе, а в F_{15} — и в 4-й (Табл. 1).

Таблица 1

**Частота встречаемости гетерологичных пар хромосом пшеницы (АВ)
в кариотипах тетраплоидных тритикале F_{16} - F_{17}**

Форма	Гомеологичные группы	Поколение				
		F_{10}	F_{14}	F_{15}	F_{16}	F_{17}
ПРАТ 12	1	6,06	12,50	6,90	9,52	10,71
	2	15,15	12,50	17,24	23,81	17,86
	3	3,03	16,67	24,14	28,57	14,29
	4	0	0	0	0	0
	5	0	16,67	3,45	1,47	1,04
	6	6,06	0	0	0	0
	7	12,12	33,33	13,79	19,05	25,00
ПРАТ 16	1	6,45	24,32	23,33	34,78	37,50
	2	32,26	21,63	16,67	26,09	21,88
	3	29,03	8,11	16,67	13,04	31,25
	4	0	0	6,67	0	0
	5	0	0	6,67	0	0
	6	0	0	3,33	0	0
	7	9,68	32,43	16,67	39,13	37,50
ПРАТ 72	1	23,33	25,00	0	37,50	16,67
	2	13,33	12,50	13,33	4,17	22,22
	3	3,33	6,25	0	12,50	13,89
	4	0	0	0	0	0
	5	0	6,25	6,67	0	0
	6	3,33	0	0	0	0
	7	23,33	6,25	6,66	4,17	13,89

Увеличение числа нестабильных групп произошло вследствие спонтанной гибри-

дизации наших популяций с дагестанской линией ПРАТ 21, имеющей пшеничный компонент

кариотипа следующего состава – 1В2А3В4В5В6А7А.

На протяжении двух полевых сезонов эта линия высевалась рядом с популяциями тетраформ. Поскольку тетраплоидные тритикале являются перекрестноопыляющейся культурой, совместная репродукция материала привела к интрогрессии в популяции нетипичных для них 4В и 5В хромосом. Как следствие этого, в материале F_{15} гетерологичные пары хромосом были обнаружены во всех семи гомеологичных группах пшеничного компонента кариотипа. Из 44 выявленных вариантов кариотипа стабильными были 17. Растения с нестабильным кариотипом составили 47,3 %.

Дальнейшая пространственная изоляция линии ПРАТ 21 вызвала резкое сокращение в популяциях тетраплоидных тритикале численности растений с хромосомами В генома в 4 и 5-й гомеологичных группах. В проанализированном материале F_{16} растения с 4В хромосомой не были обнаружены вообще, а растения с 5В хромосомой составили только 2,94 %, из которых 1,47 % содержали в 5-й группе гетерологичную пару хромосом. Гетерологичные пары были отмечены также в 1, 2, 3 и 7-й группах. Из 35 выявленных в этом поколении вариантов кариотипа 9 были стабильными, растения с нестабильным кариотипом составили 55,88 %.

В материале F_{17} было выявлено 52 варианта кариотипа, из которых 14 имели стабильный хромосомный состав. Гетерологичные пары хромосом пшеницы были отмечены в тех же гомеологичных группах, что и в F_{16} , с той лишь разницей, что по уровню нестабильности 1-я и 7-я группы поменялись местами (Табл. 1). Частота встречаемости гетерологичной пары в 5-й группе была еще ниже, чем в F_{16} , что свидетельствовало о продолжающейся элиминации хромосом В генома из этой группы.

Таким образом, полученные в ходе хромосомного анализа данные свидетельствуют о том, что стабилизация хромосомного состава различных гомеологичных групп пшеничного компонента кариотипа 4х-тритикале происходит с различной скоростью. В одних группах (в нашем материале это 4, 5 и 6-я группы) подбор пар гомологов заканчивается довольно быстро, в других гетерологичные пары хромосом наблюдаются на протяжении очень большого числа поколений. Вследствие этого в популяциях постоянно поддерживается определенное количество растений (около 50 % с небольшими колебаниями в ту или другую сторону) с нестабильным кариотипом.

Другой характерной особенностью процесса формирования кариотипа тетраформ является появление хромосом пшеницы с модифицированной структурой (Рис. 2)

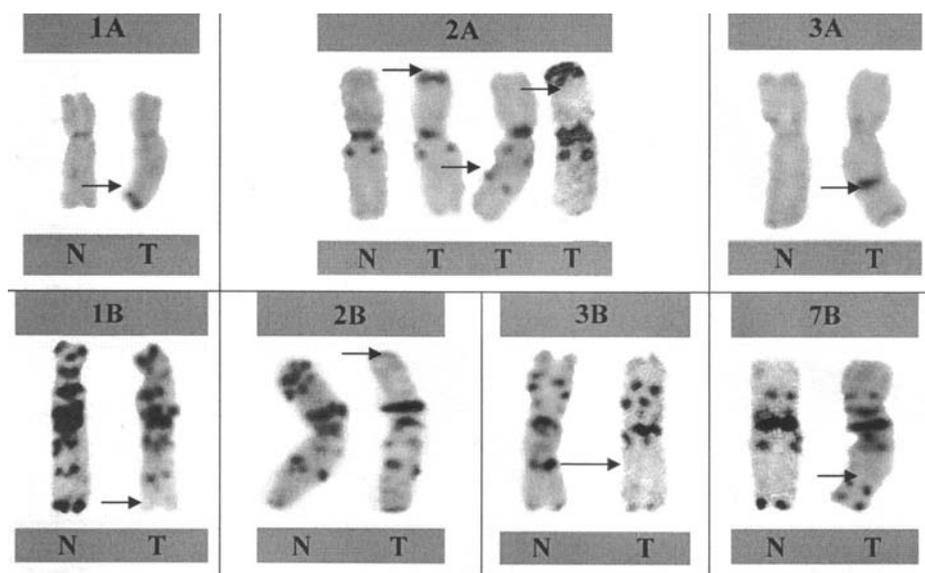


Рис. 2. Варианты межгеномных транслокаций хромосом, выявленные в кариотипах тетраплоидных тритикале F_{14} - F_{17} . N – нормальная хромосома, T – транслоцированная хромосома. Стрелкой обозначены места локализации перестроек.

Единичные растения 4х-тритикале с аберрантными хромосомами пшеницы были отмечены нами уже в ранних поколениях гибридов [19]. В дальнейшем их количество постоянно увеличивалось и в F₁₇ уже 84,4 % растений

от общего числа проанализированных амфидиплоидов характеризовалось наличием того или иного типа хромосомных aberrаций, а в ряде случаев и нескольких типов одновременно (Табл.2).

Таблица 2

Частота встречаемости (%) транслоцированных хромосом в популяциях тетраплоидных тритикале F₁₄ – F₁₇

Поколение	Транслоцированные хромосомы					
	1A ^T	1B ^T	2A ^T	2B ^T	3A ^T	3B ^T
F ₁₄	21,05	23,30	35,23	5,56	17,65	0
F ₁₅	39,02	28,97	26,83	18,18	25,00	4,63
F ₁₆	42,22	26,37	51,67	6,58	58,93	2,50
F ₁₇	59,82	47,50	54,10	6,38	33,00	9,78

Примечание. Надстрочный знак ^T обозначает транслоцированную хромосому.

При этом модификациям подвергались хромосомы тех гомеологичных групп, для которых характерно сохранение гетерогеномного состава в ряду поколений. Если сопоставить это наблюдение с выявленным характером структурных изменений, становится очевидным, что эти изменения представляют собой реципрокные транслокации, образовавшиеся в ходе спаривания гомеологов А и В геномов. Факт спаривания гомеологов пшеницы в мейозе тетраформ был подтвержден нами экспериментально в ходе анализа микроспорогенеза у линий с нестабильным кариотипом с использованием метода дифференциального окрашивания хромосом [20].

Полученные в ходе эксперимента данные свидетельствуют о том, что полная стабилизация кариотипа тетраформ по формальному признаку – наличию пар гомологов пшеницы во всех гомеологичных группах – не наступает никогда. В популяциях постоянно сохраняется определенное количество растений (около 50 %) с гетерогеномным составом ряда гомеологичных групп пшеничного компонента кариотипа (в нашем материале это 1, 2, 3 и 7-я группы). Выявленная особенность формирования хромосомного состава тетраплоидных тритикале присуща не только нашим гибридным формам. Различная скорость стабилизации гомеологичных групп была отмечена также в материале польской и немецкой селекции

[16,17], однако распределение групп по уровню нестабильности здесь выглядит иным образом.

Другой характерной особенностью процесса формирования рекомбинантного генома тетраформ является появление хромосом пшеницы с модифицированной структурой, причем модификациям подвергаются хромосомы лишь тех гомеологичных групп, для которых характерно сохранение гетерогеномного состава. Количество растений с рекомбинантными хромосомами в ходе смены поколений неуклонно растет, что свидетельствует об их большей жизнеспособности по сравнению с растениями, у которых сохранилась исходная структура хромосом пшеницы.

Таким образом, формирование рекомбинантного генома тетраплоидных тритикале происходит за счет межгеномных рекомбинаций двух типов – на уровне целых хромосом и на уровне их сегментов. Рекомбинации первого типа характерны для гомеологичных групп с высокой скоростью стабилизации хромосомного состава, а второго – с низкой, где длительное время сохраняются гетерологичные пары хромосом.

Возникает вполне закономерный вопрос: «Чем вызвано наблюдаемое у тетраформ сохранение гетерологичных пар хромосом?». Можно предположить, что растения с гетерогеномным составом групп образуются в каж-

дом очередном поколении тетраформ заново, как результат гибридизации особей, в кариотипах которых эти группы содержат пары хромосом из разных геномов пшеницы. Однако в таком случае, при исходном равенстве частот хромосом А и В геномов у гибридов F_1 , гетерологичные пары хромосом должны присутствовать во всех гомеологичных группах, и частота их образования должна быть сходной. Мы же этого не наблюдаем.

Возможно в ранних поколениях гибридов, когда эффективная численность популяций была низкой, произошли чисто случайные отклонения в соотношении частот генотипов, вызванные статистическими причинами, что и привело к быстрой стабилизации ряда групп при сохранении гетерологичных пар в остальных. Но тогда не поддается объяснению факт сходства хромосомного состава 4, 5 и 6-й гомеологичных групп, которые в нашем материале не только быстро стабилизировались, но и все содержат пары гомологов А генома. Вероятность случайного совпадения состава в трех группах у трех форм ($P=(1/2)^9$) очень мала. Из этого следует, что в ходе становления кариотипа 4х-тритикале как подбор пар гомологов в группах с высокой скоростью стабилизации, так и сохранение гетерогеномного состава остальных групп происходит не случайным образом.

Сопоставление результатов анализа поведения хромосом на стадии метафазы I мейоза у гибридов F_1 с результатами кариотипирования более поздних поколений свидетельствует о том, что существует корреляция между частотой спаривания гомеологичных хромосом и скоростью стабилизации соответствующей гомеологичной группы [21]. Исходя из этого, логично предположить, что именно синапсис гомеологов замедляет процесс подбора пар гомологов. Но в таком случае необъясним факт различия по набору гомеологичных групп с гетерогеномным составом между тетраплоидными тритикале из разных селекционных программ. Известно, что частота спаривания хромосом определяется их структурным сходством, которое для гомеологов различных субгеномов мягкой пшеницы является величиной постоянной, отражающей степень их эволюционной дивергенции. Поэтому сортовые различия включенного в гибридизацию исходного

материала не могут столь существенно влиять на синапсис гомеологов, чтобы обеспечить в гибридном материале различные наборы гомеологичных групп с гетерогеномным составом.

В итоге мы пришли к заключению, что в ходе стабилизации кариотипа тетраплоидных тритикале процесс взаимозамещения гомеологов А и В геномов определяется их селективными преимуществами, которые, как известно, являются результатом генотип-средовых взаимодействий. Когда гомеолог обладает явными селективными преимуществами, подбор пары гомологов в соответствующей гомеологичной группе происходит довольно быстро. Когда же конкурентоспособность гомеологов одинакова, скорость стабилизации группы замедляется. При этом доминирование генетических систем базового генома ржи обеспечивает синапсис гомеологов пшеницы с последующей рекомбинацией генетического материала.

Из этого следует, что в различных условиях среды отбор будет благоприятствовать сохранению в гибридном материале разных сочетаний хромосом А и В геномов пшеницы. Анализ собственных и литературных данных подтверждает эти ожидания. В нашем материале из 128 теоретически возможных стабильных вариантов кариотипа были обнаружены лишь 26, причем явное численное преимущество имели только два. В материале, проанализированном Lukaszewski et al. [16], предпочтительное сочетание хромосом А и В геномов выглядело иным образом, и частота встречаемости растений с таким кариотипом в 9 раз превышала теоретически ожидаемую. И, наконец, в материале дагестанской селекции явное численное преимущество имели выявленные у пяти форм из восьми три варианта кариотипа, различающиеся между собой лишь составом 2-й гомеологичной группы [22]. Все они были отличны от вариантов, преобладающих в материале других селекционных программ.

Но особенно яркой иллюстрацией справедливости выдвинутого нами положения является ситуация со спонтанной гибридизацией нашего материала с линией дагестанской селекции ПРАТ21, вызвавшая появление в 4 и 5-й гомеологичных группах нетипичных для популяций хромосом В генома. Тот факт, что дальнейшая пространственная изоляция да-

гестанской линии способствовала быстрой элиминации из кариотипов популяций 4В и 5В хромосом, бесспорно свидетельствует о се-

лективных преимуществах в наших условиях произрастания соответствующих гомеологов А генома.

Заключение

Результаты проведенного исследования дают основание полагать, что в ходе эволюционного становления полиплоидных видов злаков гибридизация на основе базового генома одних и тех же первичных тетраплоидных форм в разных экологических нишах могла привести к отбору различных вариантов формируемого рекомбинантного генома. Это способствовало быстрой дивергенции видов и возникновению на их основе новых таксономических единиц. Свойственная интрогрессивным гибридам низкая фертильность могла компенсироваться переходом к вегетативному размножению.

К тому же большинство полиплоидных видов злаков является многолетниками, а гибриды между многолетними видами бывают стерильными лишь при первом цветении, но в последующие годы могут полностью или хотя бы частично восстанавливать фертильность [13]. Нередко возникающие при проведении геномного анализа многолетних видов злаков проблемы с идентификацией диплоидных доноров геномов легко объясняются с позиции образования рекомбинантных геномов и являются косвенным подтверждением реальности этого пути видообразования у злаков.

Список использованных источников

1. Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploidy wheat: a possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes / M. Feldman [et al.] // *Genetics*. – 1997. – Vol. 147, № 3. – P. 1381–1387.
2. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. Changes in low-copy non-coding DNA sequences / B. Liu [et al.] // *Genome*. – 1998. – Vol. 41, № 2. – P. 272–277.
3. Liu, B. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. Changes in low-copy coding DNA sequences / B. Liu, J.M. Vega, M. Feldman // *Genome*. – 1998. – Vol. 41, № 4. – P. 535–542.
4. Ozkan, H. Allopolyploidy induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group / H. Ozkan, A.A. Levy, M. Feldman // *Plant Cell*. – 2001. – Vol. 13, № 8. – P. 1735–1747.
5. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat / H. Shaked [et al.] // *Plant Cell*. – 2001. – Vol. 13, № 8. – P. 1749–1759.
6. Kashkush, K. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid / K. Kashkush, M. Feldman, A.A. Levy // *Genetics*. – 2002. – Vol. 160, № 4. – P. 1651–1659.

7. Soltis, P.S. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids / P.S. Soltis, D.E. Soltis // *Proc. National Academy of Sciences USA*. – 2000. – Vol. 97, № 13. – P. 7051–7057.
8. Wendel, J.F. Genome evolution in polyploids / J.F. Wendel // *Plant Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 42, № 1. – P. 225–249.
9. Comai, L. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants / L. Comai // *Plant Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 43, № 2–3. – P. 387–399.
10. Levy A. A., Feldman M. The impact of polyploidy on grass genome evolution // *Plant Physiology*. – 2002. – Vol. 130, № 4. – P. 1587–1593.
11. Feldman M., Levy A.A. Allopolyploidy – a shaping force in the evolution of wheat genomes / M. Feldman, // *Cytogenet. Genome Res.* – 2005. – Vol. 109, № 1–3. – P. 250–258.
12. Zohary, D. Hybridization between amphidiploids and the evolution of polyploids in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group / D. Zohary, M. Feldman // *Evolution*. – 1962. – Vol. 16, № 1. – P. 44–61.
13. Цвелев, Н.Н. Система злаков (Poaceae) и их эволюция / Н.Н. Цвелев. – Л.: Наука, 1987. – 75 с.
14. Тетраплоидные тритикале (создание, цитогенетическое изучение и использование в селекции) / В.Е. Бормотов [и др.] – Минск: Наука и техника, 1990. – 136 с.

15. Gustafson, J.P. A tentative identification of chromosomes present in tetraploid triticales based on heterochromatin banding patterns / J.P. Gustafson, K.D. Krolow // *Can. J. Genet. Cytol.* – 1978. – V. 20, № 2. – P. 199–204.
16. Chromosome constitution of tetraploid triticales / A.J. Lukaszewski [et al.] // *Z. Pflanzenzuchtg.* – 1984. – Bd. 93, № 3. – S. 222–236.
17. Chromosome pairing and aneuploidy in tetraploid triticales. II. Unstabilized karyotypes / A.J. Lukaszewski [et al.] // *Genome.* – 1987. – V. 29, № 4. – P. 562–569.
18. Идентификация хромосом А и D геномов пшеницы с использованием замещений и перестроек между гомеологами у пшеницы и тритикале / Н.С. Бадаев [и др.] // *Докл. Акад. Наук СССР.* – 1983. – Т. 273, № 4. – С. 994–996.
19. Дубовец, Н.И., Структурные изменения хромосом пшеницы в кариотипе тетраплоидных тритикале / Н.И. Дубовец, В.Е. Бормотов // *Докл. АН БССР.* – 1989. – № 12. – С. 1125–1127.
20. Сычева, Е.А. Тетраплоидные тритикале как объект для цитогенетических исследований I. Изучение роли индивидуальных хромосом пшеницы в регуляции мейотического спаривания / Е.А. Сычева, Н.И. Дубовец // *Весті НАН Беларусі, Сер. біял. навук.* – 2003, № 2. – С. 52–55.
21. Сычева, Е.А. Цитогенетические особенности формирования и функционирования рекомбинантного генома тетраплоидных тритикале: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Е.А. Сычева. – Минск, 2005. – 163 с.
22. Цитогенетический анализ тетраплоидных тритикале / Е.Д. Бадаева [и др.] // *Докл. ВАСХНИЛ.* – 1989. – № 1. – С. 2–4.

Дата поступления статьи 4 декабря 2008 г.

О.Ю. Урбанович¹, Т.А. Гашенко², Е.А. Заблоцкая¹, Э.А. Козловская², Н.А. Картель¹

РЕЗУЛЬТАТЫ ОТБОРА ГИБРИДНЫХ СЕЯНЦЕВ ЯБЛОНИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ПАРШЕ ФИТОПАТОЛОГИЧЕСКИМИ И МОЛЕКУЛЯРНЫМИ МЕТОДАМИ

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072 г. Минск, Академическая, 27
²РУП «Институт плодородия»

Республика Беларусь, 223013, Минская обл., Минский р-н, пос. Самохваловичи, ул. Ковалева, 2

Введение

Самая распространенная и вредоносная болезнь яблони в Беларуси – это парша, которая в годы эпифитотий не только вызывает значительное снижение урожая и качество плодов в текущем году, но и отрицательно сказывается на закладке цветковых почек и, следовательно, урожае будущего года. Климатические условия нашей страны благоприятны для развития возбудителя болезни *Venturia inaequalis* (Ске.) Wint. Согласно многолетним исследованиям, сильное развитие парши наблюдается один раз в три года [1]. Широкому распространению, сохранению и развитию болезни способствует непрерывная изменчивость возбудителя и многообразие его форм. Условно, основываясь на соответствующих сортах-дифференциаторах, выделяют не менее 8 рас патогена [2, 3]. Хотя вполне вероятно, что физиологические расы патогена, определяемые с помощью сортов-дифференциаторов, не однородны и могут быть представлены различными генотипами [4]. Исследования популяции *V. inaequalis* с помощью молекулярных маркеров показали, что популяции патогена значительно различаются [5]. Различия наблюдаются как между популяциями, выделенными в разных регионах и странах, так и среди генотипов, представленных в одной популяции.

Широкое распространение парши приводит к необходимости разрабатывать методы защиты от этой болезни. В настоящее время для борьбы с паршой используют преимущественно химические методы защиты, которые включают до 15 обработок фунгицидами в год. Эти меры приводят к загрязнению окружаю-

щей среды и не радуют потребителей, предпочитающих экологически чистую продукцию. Альтернативой химической защите может служить выращивание сортов, обладающих естественной устойчивостью к патогену. Создание сортов с высокой стабильной устойчивостью к парше является приоритетной задачей селекции яблони в Беларуси [6]. Решением проблемы прочности сортового иммунитета может способствовать использование генетически и географически разнообразного исходного материала с применением различных методов отбора в гибридном материале, полученном в результате скрещиваний.

Современная селекция сортов яблони на устойчивость к парше ведется с привлечением как полигенных, так и олигогенных источников устойчивости. Высокоэффективным источником олигогенной устойчивости к парше в настоящее время в Беларуси, как и в других странах с похожим климатом, является ген *Vf*. Ген *Vf* был интрогрессирован в культурную яблоню (*Malus × domestica* Borkh.) из образца дикого вида яблони *Malus × floribunda* 821 благодаря селекционной программе, начатой в 1914 году [7]. Ген получил свое название от *V* – *Venturia* и *f* – *floribunda* [8]. Первый коммерческий сорт с этим геном, созданный в результате длительной селекционной работы, был представлен в 1970 г. [9]. Вслед за ним ген был перенесен в современные сорта, получившие широкое распространение во многих странах мира.

Процесс создания сортов, содержащих ген *Vf*, подразумевает обязательный этап выбора

родителей-доноров гена для скрещивания и дальнейший отбор генотипов с нужным признаком. В осуществлении этой работы большую помощь могут оказать молекулярные маркеры. Для гена *Vf* было разработано несколько молекулярных маркеров. Первые маркеры к гену были разработаны на основе RAPD-методов (random amplified polymorphic DNA) [10, 11, 12, 13, 14]. Затем появились более надежные и удобные в применении SCAR-маркеры (sequence characterized amplified regions), а также SSR-маркеры (simple sequence repeat) [15, 16, 17, 18, 19].

Детальная молекулярная карта 1 хромосомы, на которой расположен ген *Vf*, обеспечила возможность перейти непосредственно к клонированию гена [20]. Была создана библиотека ВАС-клонов (bacterial artificial chromosome), и затем идентифицирован и клонирован кластер рецептор-подобных генов, получивший название «*HcrVf* genes» (homologs to *C. fulvum* resistance genes of the *Vf* region) [21, 22]. Анализ первичной последовательности этих генов показал, что они содержат лейцин-богатый

повтор и трансмембранный домен. На основе исследования первичной последовательности гомологичных членов *HcrVf*-семьи был разработан маркер VfC, который позволяет непосредственно идентифицировать кластер генов [23]. Позже другая группа авторов клонировала четыре похожих гена, названных *Vfa1-Vfa4*, из *Vf* локуса, нуклеотидная последовательность которых гомологична последовательности *HcrVf*-семьи [24]. Предполагается, что один из этих генов может быть *Vf*. В пользу этого предположения говорит тот факт, что они экспрессируются в листьях яблони.

Создание удобных и эффективных молекулярных маркеров, позволяющих идентифицировать хозяйственно-ценные гены, открывает новые перспективы в селекции. В представленном исследовании оценена возможность и целесообразность использования молекулярных маркеров для тестирования и отбора *Vf*-содержащих растений среди селекционных образцов яблони, полученных от различных комбинаций скрещивания.

Материалы и методы

Объекты исследования. Объектом изучения служили гибридные семена яблони, полученные в РУП «Институт плодоводства» в результате скрещиваний 2005 г. с участием доноров иммунитета к парше, обладающих геном *Vf*: Имант, 86-39/105 (ВМ41497 × Антей), 86-54/133 (Антей × ВМ41497), Sir Prize, Надзейны; а также высокоустойчивые семена F_1 , полученные от скрещиваний с диким видом *M. sargentii*. Семена 2006 года посева выращивались в контролируемых условиях при температуре 18-22°C и относительной влажности воздуха 75-80 %.

Отбор на искусственном инфекционном фоне. Отбор высокоустойчивых к парше семян проводили в начальной фазе их роста и развития на искусственном инфекционном фоне. Первую инокуляцию проводили в возрасте 3-5 настоящих листьев и вторую – через 10-15 дней. Температура в момент заражения была 16-18°C, относительная влажность воздуха в течение 3 дней – 90-98 %. В качестве инокулянта использовали естественную инфекцию – консервированные конидии с инфицированных листьев различного сортового и

видового состава, собранные в коллекционном саду Института плодоводства. Инфекционная нагрузка инокулянта: 4×10^5 конидий/мл. Поражение учитывали по шкале качественных классов инфекции, где 0 – признаки поражения отсутствуют, а 5 – поражение свыше 50 % поверхности листа в виде обширных, обильно спороносящих пятен [25]. Недоразвитые и слабо развивающиеся растения из опыта исключали. Растения без признаков поражения и с поражением не более 2 баллов были высажены в открытый грунт, где находились под наблюдением в течение двух лет вплоть до тестирования молекулярным методом на предмет наличия гена *Vf*. Для тестирования молекулярным методом были отобраны 6 из 15 полученных потомств: Pinova × 86-39/105 (ВМ41497 × Антей); (*M. sargentii* × Ренет Симиренко) × Надзейны; Sir Prize × Иммант; 86-39/105 (F_1 ВМ41497 × Антей) × Sampion; Pinova × Иммант; (*M. sargentii* × Ренет Симиренко) × 86-54/133 (Антей × ВМ41497).

Выделение ДНК. Для получения препаратов ДНК использовали листовую материал, взятый от отдельного растения. Растительный матери-

ал замораживали в жидком азоте, гомогенизировали и выделяли ДНК с помощью Genomic DNA Purification Kit фирмы Fermentas согласно рекомендуемому протоколу. Выделенная ДНК была использована в реакции ПЦР.

Условия амплификации. Амплификацию проводили с маркером VfC и отдельно с комбинацией сцепленных с геном Vf маркеров AL07-SCAR и AM19-SCAR [23,18].

Реакционная смесь для ПЦР объемом 20 мкл содержала 40 нг ДНК, 75 мМ трис-HCl (pH 8.8 при 25°C), 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween 20, 20 нг ДНК, 0,2 мМ dНТФ, 200 нМ каждо-

го праймера, 1 ед. Taq-полимеразы. Реакцию с праймером VfC1F и VfC2R проводили в режиме: 94°C – 4 мин; 35 циклов 94°C – 1 мин, 58°C – 1 мин, 72°C – 1 мин; 72°C – 7 мин. Реакцию с праймерами AL07 и AM19 проводили в режиме: 94°C – 4 мин; 35 циклов 94°C – 30 сек, 60°C – 1 мин, 72°C – 2 мин; 72°C – 8 мин. Продукты амплификации разделяли в 1 % агарозном геле в трис-ацетатном буфере. Гели документировали с помощью фотографирования после окрашивания этидиум бромидом. В качестве маркера молекулярного веса использовали 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas).

Результаты и обсуждение

Во все комбинации скрещивания, взятые для исследования, были включены потомки диких видов яблони – *M. × floribunda* 821 и *M. sargentii*. Для них была отмечена низкая всхожесть семян (3-27 %) и значительная доля гибели всходов из-за слабой жизнеспособности. В гибридных семьях с участием *M. sargentii* гибель всходов была максимальной и составляла 29-69 % (Табл. 1).

В общей сложности было получено 554 сеянцев яблони. Они были подвергнуты заражению паршой на искусственном инфекционном фоне. В результате отбора 34 % растений были отбракованы как поражаемые. Наибольшее количество восприимчивых сеянцев отмечено в семьях Пинова × 86-39/105 (35 %) и 86-39/105 × Sampion (59 %) (Табл. 1). В гибридных семьях, в

получение которых был вовлечен высокоустойчивый сорт Имант, процент поражаемых сеянцев был наименьшим: Sir Prize × Имант – 6 %, Пинова × Имант – 7 %. Семья F₁ *M. sargentii* × 86-54/133 не имела восприимчивых сеянцев, что объясняется стойким иммунитетом обеих исходных форм к парше. К сожалению, из года в год очень трудно получить жизнеспособные гибридные растения от скрещиваний яблони домашней и яблони Саржента.

В мае 2006 г. в открытый грунт было высажено 317 растений 6 потомств, успешно прошедших отбор на искусственном инфекционном фоне. К августу 2007 г. сохранилось 168 хорошо развитых растений. Каждое из них было подвергнуто молекулярному анализу для установления наличия гена Vf.

Таблица 1

Результаты отбора сеянцев яблони на ранней стадии развития онтогенеза по признаку устойчивости к парше в 2006 г.

Гибридная семья	Всходы, шт.	Гибель по физиологическим причинам		Отбраковано восприимчивых к парше	
		шт.	%	шт.	%
Пинова × 86-39/105	420	90	21	148	35
F ₁ <i>M. sargentii</i> × Надзейны	68	20	29	14	21
Sir Prize × Имант	18	5	28	1	6
86-39/105 × Sampion	119	10	8	70	59
Пинова × Имант	61	11	18	4	7
F ₁ <i>M. sargentii</i> × 86-54/133	13	9	69	0	0
Всего:	699	145	21	237	34

Для идентификации гена *Vf* из описанных в литературе были выбраны маркер VfC и комбинация маркеров AL07-SCAR и AM19-SCAR [23,18]. Сцепленные с геном *Vf* маркеры AL07-SCAR и AM19-SCAR представляют интерес для практического использования. Маркер AL07-SCAR является кодоминантным, а маркер AM19-SCAR – доминантным. Применение маркеров AL07-SCAR и AM19-SCAR в реакции мультиплекса позволяет идентифицировать в геноме яблони гомозиготный и гетерозиготный устойчивый генотип. В результате ПЦП с комбинацией маркеров AL07-SCAR и AM19-SCAR амплифицируются фрагменты размером 466 н.п. и

526 н.п., которые свидетельствуют о наличии доминантного аллеля гена *Vf*, и фрагмент длиной 724 н.п., который соответствует рецессивному аллелю гена [18].

В качестве маркера, позволяющего идентифицировать непосредственно ген *Vf*, выбран маркер VfC, который охватывает консервативные последовательности генов *Vf*-семьи [23]. В результате амплификации с маркером VfC выявляется три фрагмента длиной 646, 484 и 286 н.п. Присутствие гена определяется наличием фрагмента длиной 286 н.п. Пример идентификации гена среди сеянцев яблони семьи 86-39/105 (F_1 BM41497 × Антей) × Sampion представлен на рисунке 1.

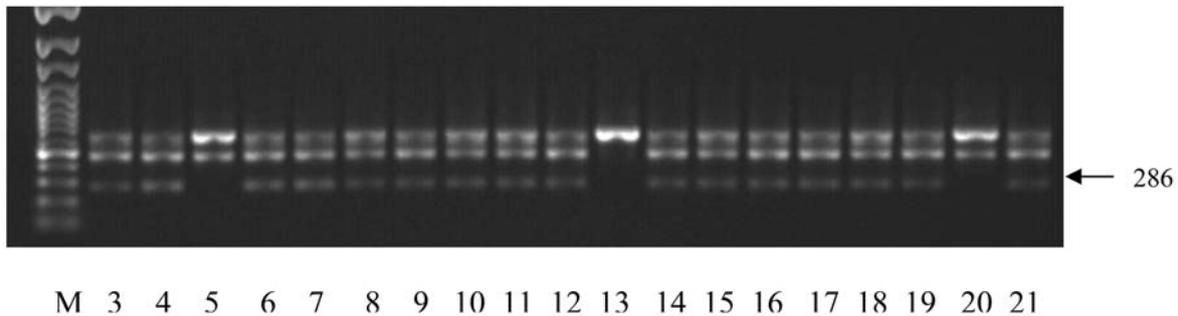


Рис. 1. Результаты разделения методом электрофореза в 1 % агарозном геле продуктов амплификации ДНК образцов яблони гибридной семьи 86-39/105 × Sampion с маркером VfC. В качестве маркера молекулярного веса использован 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas) Фрагмент длиной 286 п.н. определяет присутствие гена *Vf*. Цифрами обозначены номера индивидуальных растений.

Молекулярный анализ сеянцев яблони, включенных в комбинации скрещивания, как с использованием маркера VfC, так и с комбинацией маркеров AL07-SCAR и AM19-SCAR показал присутствие гена у 125 генотипов. Двойной контроль позволяет избежать ошибок при идентификации гена, связанных с процессами рекомбинации. Результаты анализа суммированы в таблице 2. Как видно из таблицы, селекционные образцы яблони, продемонстрировавшие устойчивость в ходе

искусственного инфицирования *V. inaequalis*, в большинстве содержат в составе генома ген устойчивости к парше *Vf*. Вместе с тем среди них выявлена доля растений, не имеющих гена *Vf*: 25,5 % среди потомков Pinova × 86-39/105; 10,7 % – 86-39/105 × Sampion; 34,4 % – Pinova × Имант. В общей сложности среди проанализированного материала 74,4 % растений имеют доминантный аллель *Vf* и 25,6 % растений являются рецессивными гомозиготами по данному гену.

Таблица 2

**Результаты молекулярно-генетического анализа сеянцев яблони
на наличие в геноме гена *Vf***

Гибридная семья	Количество образцов в гибридной семье	Образцы, содержащие ген <i>Vf</i>		Образцы, не содержащие ген <i>Vf</i>	
		Число	%	Число	%
Пинова × 86-39/105	94	70	74,5	24	25,5
F ₁ <i>M. sargentii</i> × Надзейны	6	1	16,7	5	83,3
Sir Prize × Имант	4	4	100	0	0
86-39/105 × Sampion	28	25	89,3	3	10,7
Пинова × Имант	32	21	65,6	11	34,4
F ₁ <i>M. sargentii</i> × 86-54/133	1	1	100	0	0
Итого:	168	125	74,4 %	43	25,6 %

Полученные результаты демонстрируют, что отбор устойчивых к парше растений, производимый традиционно на искусственном инфекционном фоне, не может гарантировать наследование доминантного аллеля гена *Vf* всеми, успешно его прошедшими. Существенная часть таких растений является рецессивными гомозиготами по данному гену, а проявленная устойчивость обусловлена иными факторами.

Так, например, П. Вежл с соавторами среди F₁ потомства от нескольких комбинаций скрещивания, прошедшего отбор на искусственном инфекционном фоне, были обнаружены рецессивные гомозиготные генотипы *vvf* [26]. Ими отмечено, что доля растений, не содержащих искомым ген, была выше, вплоть до 55 %, среди семей, полученных с привлечением Антоновки, сорта, обладающего высокой полигенной устойчивостью. Потомки этого сорта были вовлечены в скрещивание и в представленном исследовании.

Таким образом, вероятность отбора растений, проявляющих устойчивость на искусственном инфекционном фоне, но не содержащих ген *Vf*, повышается, если в скрещивание вовлекались сорта или формы, обладающие высокой устойчивостью к парше, обусловленной другими генами или носящей полигенную природу. Хотя следует отметить, что применение отбора на искусственном инфекционном фоне в фазе 3–5 листьев растений яблони эффективно при работе с донорами-олигогенами, в то время как только полигенная устойчивость трудно распознается на стадии всходов.

Сорта, содержащие в геноме ген *Vf*, до настоящего времени остаются устойчивыми, в том числе на территории Беларуси и в странах с похожими климатическими условиями [27, 28]. При этом гомозиготные *Vf*-содержащие растения обычно более устойчивые, чем гетерозиготные [29]. Отмечено, что некоторые *Vf*-содержащие растения могут в разной степени поражаться патогеном [30]. Вариации в реакции устойчивости/восприимчивости связывают с присутствием или отсутствием генов-модификаторов [31].

Вместе с тем появились данные, что *Vf*-обусловленная устойчивость преодолена расами 6 и 7 [32, 33]. В случае, если патоген преодолевает устойчивость гена, опасности подвергаются в первую очередь сорта, обладающие исключительно олигогенной устойчивостью. В связи с этим, в современных селекционных программах по созданию устойчивых к парше сортов яблони не рекомендуется использовать один олигогенный источник устойчивости [34]. Приоритетным является вовлечение в скрещивание образцов, обладающих разными генами и механизмами устойчивости, что позволит создать сорта с комплексной устойчивостью к парше. Такая тактика особенно важна в связи с тем, что расы *V. inaequalis* постоянно меняются и эволюционируют. Поэтому в представленном исследовании в скрещивании были использованы не только источники гена *Vf*, но и источники полигенной устойчивости, такие как *M. sargentii* и потомки сорта Антоновка.

Заключение

Прочностью иммунитета отличаются сеянцы, полученные в гибридных семьях, в которых одна из родительских форм содержит ген *Vf*, являющийся источником иммунитета к парше: Имант, Надзейны, Sir Prize, 86–39/105, 86–54/133.

Для повышения эффективности отбора в селекции, направленной на получение несущих ген *Vf* сортов яблони, целесообразно сочетать классический фитопатологический подход с использованием молекулярных маркеров. Это позволит значительно ускорить процесс селек-

ции за счет идентификации ценных генов на первых стадиях роста растений и при этом получить более точные результаты относительно содержания гена *Vf* в генотипе селекционного материала, поскольку анализ будет проводиться непосредственно на уровне ДНК, а не на уровне подверженного влиянию среды фенотипа. Молекулярные маркеры, как и отбор на искусственном инфекционном фоне, позволяют своевременно избавиться от селекционного брака на первых стадиях онтогенеза и сократить время селекционного процесса.

Список использованных источников

1. Бондарь, Л.В. Расовый состав возбудителя парши яблони в Белоруссии и селекция яблони на иммунитет к парше / Л.В. Бондарь // Селекция яблони в СССР: сб. статей / ВАСХ-НИЛ; редкол.: Г.Т. Казьмин [и др.]. – Орел, 1981. – С. 89–94.
2. MacHardy, W.E. Inheritance of resistance to *Venturia inaequalis* / W.E. MacHardy // In: Apple scab, biology, epidemiology and management. APS Press, St. Paul. – Minnesota, 1996. – P. 61–103.
3. *Venturia inaequalis* resistance in apple / C. Gessler [et al.] // Critical Reviews in Plant Science. – 2006 – Vol. 25. – P. 473–503.
4. Identification of three physiological races of *Venturia inaequalis* / J.R. Shay [et al.] // Phytopathology. – 1956. – Vol. 46. – P. 190–193.
5. Identification of microsatellite markers and their application to population genetics of *Venturia inaequalis* / I. Tenzer [et al.] // Phytopathology. – 1999. – Vol. 89. – P. 748–753.
6. Козловская, З.А. Совершенствование сортифта яблони в Беларуси / З.А. Козловская. – Минск, 2003. – 168 с.
7. Crandall, C.S. Apple breeding at the University of Illinois / C.S. Crandall // Illinois Agr. Expt. Sta. Bull. – 1926. – Vol. 275. – P. 341–600.
8. Dayton D.F., Williams E.B. 1968. Independent genes in *Malus* for resistance to *Venturia inaequalis*. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. Vol. 93. P. 89–94.
9. Prima: An early fall red apple with resistance to apple scab / D.F. Dayton [et al.] // Fruit Var. Hortic. Dig. – 1970. – Vol. 24. – P. 20–22.
10. DNA markers linked to *Malus floribunda* 821 scab resistance / B. Koller [et al.] // Plant Mol. Biol. – 1994. – Vol. 26. – P. 597–602.
11. Identification of a RAPD marker linked to the *Vf* gene for scab resistance in apples / H.Y. Yang [et al.] // Plant Breeding. – 1994. – Vol. 112. – P. 323–329.
12. Molecular markers for scab resistance (*Vf*) region in apple / M. Hemmat [et al.] // Horticulture. – 1995. – Vol. 30. – P. 850.
13. A detailed linkage map around an apple scab resistance gene demonstrates that two disease resistance classes both carry the *Vf* gene / S.E. Gardiner [et al.] // Theor. Appl. Genet. 1996. – Vol. 93. – P. 485–493.
14. Tartarini, S. RAPD markers linked to the *Vf* gene for scab resistance in apple / S. Tartarini // Theor. Appl. Genet. – 1996. – Vol. 92. – P. 803–810.
15. Molecular selection in apple for resistance to scab caused by *Venturia inaequalis* / L. Gianfranceschi [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 1996. – Vol. 93. – P. 199–204.
16. Screening apples for OPD20/600 using sequence specific primers / H.Y. Yang [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 1996. – Vol. 92. – P. 263–266.
17. A randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker tightly linked to the scab resistance gene *Vf* in apple / H.Y. Yang [et al.] // J. Amer. Soc. Hort. Sci. – 1997. – Vol. 122. – P. 47–52.
18. Development of reliable PCR markers for the selection of the *Vf* gene conferring scab resistance in apple / S. Tartarini [et al.] // Plant Breeding. – 1999. – V. 118. – P. 183–186.

19. Isolation of two microsatellite markers from BAC clones of the *Vf* scab resistance region and molecular characterization of scab-resistant accessions in *Malus* germplasm / B.A. Vinatzer [et al.] // Plant Breedind.–2004.–Vol. 123.–P. 321–326.
20. Multiple field and glasshouse assessment increase the reliability of linkage mapping of markers flanking the *Vf* source of scab resistance in apple / G.J. King [et al.] // Theor. Appl. Genet.–1998.–V. 96.–P. 699–708.
21. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of apple / B. Vinatzer [et al.] // Theor. Appl. Genet.–1998.–Vol. 97. – P. 1183–1190.
22. Apple contains receptor-like genes homologous to the *Cladosporium fulvum* resistance gene family of tomato with a cluster of genes cosegregating with *Vf* apple scab resistance / B. Vinatzer [et al.] // Molecular Plant–Microbe Interactions.–2001.– Vol. 14. – P. 508 – 515.
23. Linkage of *Vfa4* in *Malus x domestica* and *Malus floribunda* with *Vf* resistance to the apple scab pathogen *Venturia inaequalis* / M.R. Afunian [et al.] // Plant Pathology. – 2004. Vol. 53.– P. 461–467.
24. A cluster of four receptor-like genes resides in the *Vf* locus that confers resistance to apple scab disease / M. Xu M. [et al.] // Genetics.–2002 – Vol. 162. – P. 1995–2006.
25. Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур // ВНИИСПК; под общ. ред. Е.Н. Седова и Т.П. Огольцовой.– Орел, 1999.– С. 608.
26. PCR markers of apple resistance to scab (*Venturia inaequalis* СКЕ.) controlled by *Vf* gene in Czech apple breeding / P.Vejl [et al.] // Plant Soil Environ.–2003.–Vol. 49, № 9.– P. 427–432.
27. Identification of scab resistance genes in apple trees by molecular markers / O. Urbanovich [et al.] // Sodininkyste ir darzininkyste.–2008.– Vol. 27, № 2.–P. 347–357.
28. Resistance to fungal diseases of apple cultivars and hybrids in Lithuania / A. Sasnauskas [et al.] // Agronomy Research.–2006.–Vol.4.– P. 349–352.
29. Efficiency of marker assisted selection (MAS) for the *Vf* scab resistance gene / S. Tartarini S. [et al.] // ISHS. Acta Hort.–2000.– Vol. 538.–P. 549–552.
30. Evaluation of apple scab resistance in selections of *Malus* / J.R. Shay [et al.] // Am. J. bot.–1952.–Vol. 39. – P. 288–297.
31. Genetics of the interaction *Venturia inaequalis*–*Malus*; the conflict between theory and reality / Gessler [et al.] // Integrated control of pome fruit diseases II. OILb–PRS Bulletin XII.–1989. – V. 6. – P. 168–190.
32. A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the *Vf* gene / L. Parisi [et al.] // Phytopathology.–1993.–Vol. 83.– P. 533–537.
33. Benaouf G., Parisi L. 2000. Genetics of host–pathogen relationships between *Venturia inaequalis* race 6 and race 7 and *Malus* species. Phytopathology, 90: 236–242.
34. Genetic resources as basis for new resistant apple cultivars / M. Fischer [et al.] // J. Fruit Orn. Plant Res. – 2004.–Vol. 12. – P. 63–76.

Дата поступления статьи 4 декабря 2008 г.

ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ К КОЛОРАДСКОМУ ЖУКУ ПУТЕМ ТРАНСГЕНОЗА ДНК-ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ *cry3aM*

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Технология рекомбинантных ДНК нашла свое применение во многих областях науки, медицины, промышленности и сельского хозяйства. Ярким достижением в этой области явились работы по генетической трансформации растений, обеспечившие возможность контролируемого улучшения ряда агрономически полезных признаков. В отношении борьбы с опасным вредителем картофеля колорадским жуком эффективным является подход, основанный на введении генов, кодирующих инсектицидные белки, в геном растений. К таким белкам относятся токсины *Bacillus thuringiensis*, которые в настоящее время используются в составе биопрепаратов для борьбы с вредными насекомыми. Наиболее важными из них являются параспоровые кристаллические белки (*Cry*-токсины). В настоящее время идентифицировано около 150 *cry*-генов, продукты которых оказывают инсектицидное действие на различные группы насекомых (жесткокрылых, двукрылых, чешуекрылых), а также на нематод [1]. В настоящее время получены трансгенные растения многих видов (кукурузы, хлопка, риса и т.д.) экспрессирующие *cry*-гены, в том числе и картофеля. Этот метод борьбы с вредителями экономически оправдан, т.к. позволяет преодолеть нестабильность инсектицидных препаратов на основе *Bacillus thuringiensis* и/или их

метаболитов. Экспрессия нативных *cry*-генов *Bacillus* в растениях малоэффективна. Причина низкого уровня экспрессии этих генов в эукариотических системах обусловлена рядом факторов, в частности различным содержанием А+Т в нуклеотидных последовательностях, разными частотами использования кодонов в генах. При замене нуклеотидов в последовательностях *Bacillus* синонимичными кодонами растений экспрессия модифицированных генов в растениях значительно увеличивается. [2] Для получения растений, синтезирующих оптимальное количество генного продукта, важным является создание эффективных систем экспрессии, обуславливающих высокий уровень экспрессии исследуемого гена, возможность включения\выключения его транскрипции, направленная компартиментализация генного продукта как в органах и тканях растений, так и в растительной клетке. Для обеспечения высокого уровня экспрессии генов используются различные регуляторные элементы, такие как сильные промоторы, энхансеры. Для направленного синтеза и функционирования генных продуктов в различных органах и тканях и различных компартаментах растительной клетки (апопласт, вакуоли, хлоропласт, ядро) используются соответствующие тканеспецифичные регуляторные элементы и сигналы внутриклеточной локализации.

Материалы и методы

Процедуры молекулярного клонирования проводились согласно методическому руководству Маниатиса (1984) с использованием штамма *Escherichia coli* XL1-blue[3].

Получение агробактериальных трансконъюгантов, содержащих векторную конструкцию проводили посредством трехродительского скрещивания с использованием бактериально-

го штамма *E.coli* HB101, несущего плазмиду pRK2013. Ночные культуры бактериальных штаммов: *E.coli* XL1-blue, несущие созданные векторные конструкции, *E.coli* HB 101 с плазмидой pRK2013, и реципиентный штамм *Agrobacterium tumefaciens* AGL0, смешивали в соотношении 1:1:2 путем центрифугирования в течение 5 минут при 5 000 g и высевались на чашку Петри с агаризованной LB средой без селективных агентов. После культивирования в течение 16 часов при 28°C, клетки высевали на среду LB с селективными антибиотиками и культивировали в течение двух суток при 28°C. Выросшие агробактериальные трансформанты трехкратно пассировались на селективной среде. Наличие векторных плазмид в клетках *A. tumefaciens* AGL0 подтверждали методом ПЦР.

Растительный материал. В работе использовали растения картофеля сорта Скарб. Данный сорт является столовым и характеризуется высокой урожайностью, отличной лежкостью, содержанием крахмала 12,0-17,0 %.

Агробактериальную трансформацию растений проводили методом листовых дисков. Для трансформации использовалась асептическая культура картофеля сорта Скарб, выращиваемая на стандартных агаризованных средах MS (сахароза 20 г/л). Для инокуляции растительных эксплантов использовали жидкую среду MS с добавлением 150 мкмоль ацетосерингона, а также агаризованную (0,7 %) MS среду с добавлением БАП (1 мг/л), НУК (0,2 мг/л) и зеатина (2 мг/л). Для каллусообразования и инокуляции использовали агаризованную среду MS с добавлением сахарозы в концентрации 30 г/л и фитогормонов: БАП (1 мг/л), НУК (0,2 мг/л), зеатина (2 мг/л), кинетина (0,5 мг/л), гиббереллина (1 мг/л) и антибиотиков: тиментина (200 мг/л) и канамицина (50 мг/л). В эксперименте использовалась асептическая культура картофеля, возрастом 1-1,5 месяцев. Растения выдерживали в течение двух суток при температуре +4°C. В стерильных условиях листья отделяли от стеблей картофеля, вырезали срединную жилку и культивировали в суспензии агробактерий, подготовленных в жидкой MS среде в течение 40 минут. Далее листовые диски отмывали стерильной водой, и для дальнейшей инокуляции инкубировали на агаризованной MS-среде в течение двух-трех

суток в темноте при 20-24°C. После инокуляции листовые диски подсушивали на фильтровальной бумаге и помещали на селективные среды. Культивацию проводили при 20°C на свету. Экспланты переносили на свежую среду каждые 3 недели. Образовавшиеся каллусы вырезали и переносили на новые среды. Через 6-8 недель регенеранты растений срезали и помещали на агаризованную среду MS с добавлением канамицина (50 мг/л) и тиментина (200 мг/л) [4].

Регенеранты картофеля поколения T₀ анализировались на устойчивость к канамицину посредством их укоренения на селективной среде. Концентрация канамицина составляла 50 мг/л. В качестве контроля использовали регенеранты нетрансформированного картофеля. Первичные трансформанты, проявившие способность образовывать корневую систему в присутствии селективного агента, далее поддерживались в культуре *in vitro* с добавлением канамицина 50 мг/л.

ПЦР и RT-ПЦР анализ проводили с использованием праймеров специфических к нуклеотидной последовательности гена *cry3Aм*:

5'-ААТТССАТGCСТТСТТТГСААТСТ-3'

5'-ССТГСАТСААГААГСАТАААТААТАГ-3'

Для ПЦР-анализа использовалась плазмидная ДНК из клеток *A. tumefaciens* и *E. coli* и геномная ДНК растений картофеля. Для RT-ПЦР анализа использовалась кДНК растений картофеля, синтезированная на основе мРНК, выделенной посредством реагента TRIreagent (Sigma).

Адаптация растений к условиям открытого грунта осуществлялась с использованием ионитопонного подхода. Пробирочные растения весной (в апреле) черенковали и высаживали в емкости с ионитными смолами. Через 3-5 недель растения переносили в грунт в условиях закрытого полигона для проведения дальнейших исследований.

Изучение коллекции картофеля по показателю поврежденности растений колорадским жуком в полевых условиях проводили согласно методическим указаниям по оценке устойчивости картофеля к колорадскому жуку РАСХН [5]. Растения трансгенного картофеля высаживали полосками по 5-10 повторностей в условиях закрытого полигона и анализировали по показателю поврежденности

надземных частей растений личинками и имаго колорадского жука. Для оценки повреждений использовали международную фитопатологическую шкалу. Поскольку требования биобезопасности предписывают проведение такого рода исследований в условиях закрытых полигонов, где не может быть естественного фона

вредителя, заселение анализируемого участка картофеля колорадским жуком проводилось искусственно через 3 недели после высадки растений в грунт.

Статистический анализ данных (однофакторный дисперсионный анализ) проводили с помощью пакета Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

В нашей работе используется последовательность гена *cry3a* *B. thuringiensis*, белковый продукт которого проявляет инсектицидные свойства в отношении колорадского жука. С целью повышения уровня экспрессии в клетках растений нуклеотидная последовательность гена (*cry3aM*) была изменена и приближена по кодонному составу к ДНК генома растений [6, 7].

В результате молекулярного клонирования была создана система экспрессии гена *cry3aM*,

в которой модифицированный ген *cry3a* находится под контролем индуцируемого светом промотора малой субъединицы гена РБФК *Arabidopsis thaliana*, обеспечивающий преимущественную экспрессию контролируемого гена только в зеленых тканях растения. Для компартиментализации в растительных клетках белкового продукта в хлоропластах растений использовали слияние последовательности целевого гена с последовательностью лидерного пептида гена *rbcS* гороха (Рис. 1).



Рис. 1. Схема экспрессионной системы гена *cry3aM*; *rbcS* – светоиндуцибельный промотор малой субъединицы гена РБФК *Arabidopsis thaliana*; *Lch* – лидерный пептид гена *rbcS* гороха; *cry3aM* – модифицированный ген *cry3a*; *polyA* – область полиаденилирования.

Данная система экспрессии была введена в состав Т-ДНК векторной молекулы pC29 посредством расщепления ДНК эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI-*Apa*I и последующего лигирования. Для получения трансформирующего агробактериального штамма проведено трехродительское скрещивание бактериальных клеток *E. coli*, содержащих векторную молекулу, вспомогательного штамма *E. coli* HB101, несущего плазмиду pRK2013 и *A. tumefaciens* AGL0. После трехкратного пассирования на селективных средах отобранные клоны тестировались на присутствие в клетках последовательности гена *cry3aM* методом ПЦР с использованием специфических праймеров.

Агробактериальные клетки с векторной конструкцией использовались для введения Т-ДНК со вставкой целевого гена в геном растений картофеля. Методом агробактериальной трансформации листовых дисков растений картофеля сорта белорусской селекции

Скарб получено 126 независимых трансгенных линий.

Образовавшиеся на каллусных массах регенеранты помещали на культуральные среды, содержащие канамицин. После трехкратного пассирования на селективных культуральных средах растения, образующие корневую систему в присутствии канамицина, подвергали анализу методом ПЦР с использованием специфических праймеров к последовательности гена *cry3aM*.

В общей сложности получено 135 регенерантов из 69 исходных эксплантов после обработки суспензией агробактерий, содержащих векторную ДНК с целевым геном. В контрольном варианте, где листовые диски культивировались на гормональных средах, не содержащих селективный агент, из 50 эксплантов получено 85 регенерантов. Эффективности регенерации в условиях трансформации растительных клеток бактериальной ДНК и контрольном варианте соответственно равны 1,957 и 1,700 (Табл. 1).

Таблица 1

Основные показатели агробактериальной трансформации

	Количество исходных эксплантов	R общ	R KmR	<u>Rобщ.</u> R и.э.	<u>RKmR</u> R и.э.	<u>RKmR</u> R общ.
rbcS-Lch-cry3aM	69	135	126	1,957	1,826	0,933
контроль	50	85	-	1,700	-	-

Примечание.

R общ. – общее количество регенерантов;

R KmR – общее количество устойчивых к канамицину регенерантов;

Rобщ. – количество регенерантов в пересчете на один эксплант (эффективность регенерации);

R и.э.

RKmR – количество устойчивых к канамицину регенерантов в пересчете на один эксплант (эффективность трансформации);

R и.э.

RKmR – доля регенерантов, устойчивых к канамицину, в пересчете на общее число полученных регенерантов.
R общ.

С регенерирующих каллусных масс удаляли побеги, достигшие 1 см в длину и помещали на селективные MS среды для последующего отбора первичных трансформантов. Как видно из таблицы 1, было отобрано 126 независимых линий, дающих корни на селективных средах в присутствии канамицина (Рис. 2).

Укоренившиеся растения подвергали исследованию методом ПЦР (Рис. 3). Проанализирована совокупность из 85 образцов. Поскольку вставка обнаружена во всех исследованных линиях, отбор трансформантов картофеля по факту формирования корневой системы в селективных условиях признали эффективным и достаточным. В результате эффективность трансформации растений сорта Скарб ДНК векторной плазмиды pC29 со вставкой *cry3aM* составляет 1,826 регенеранта на 1 эксплант и доля регенерантов, устойчивых к канамицину, в пересчете на общее число полученных регенерантов – 0,933.

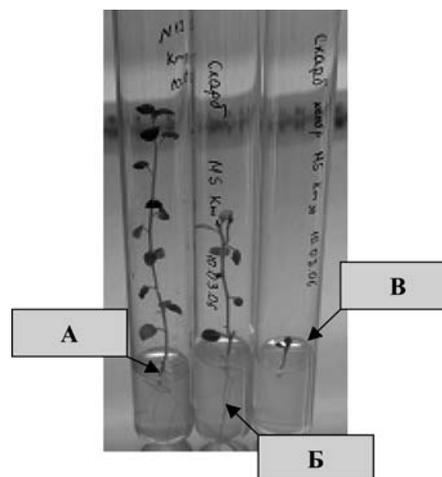


Рис. 2. Укоренение контрольных растений и трансформированных регенерантов. А. Регенерант-трансформант сорта Скарб, укоренившийся на селективной среде (канамицин 50 мг/л). Б. Контрольное растение сорта Скарб, укоренившееся на среде без канамицина. В. Контрольное растение сорта Скарб на селективной среде.

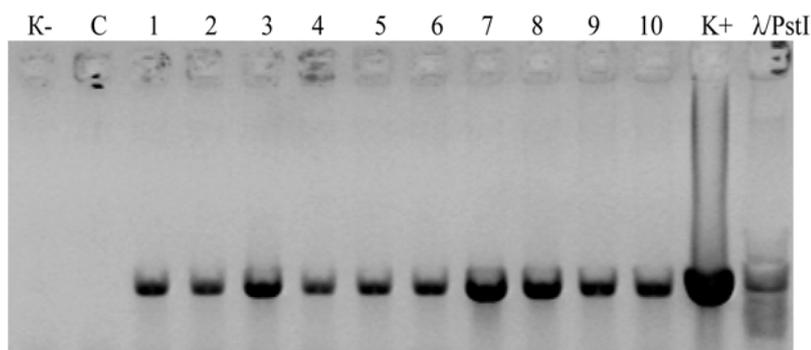


Рис. 3. ПЦР-анализ трансформантов картофеля. λ/PstI – маркер молекулярных весов. K+ – ДНК плазмиды 35S-суп. 1-10 – образцы тотальной ДНК картофеля, показавшие устойчивость к канамицину. С – тотальная ДНК растения сорта Скарб. K- – отрицательный контроль.

Для проведения испытаний полученных трансформированных растений картофеля на устойчивость к колорадскому жуку отобрано 22 случайные линии. Из черенков получили сеянцы, которые были высажены в условиях закрытого полигона. Проводили тестирование опытных растений на наличие экспрессии целевого гена

сru3aM методом РТ–ПЦР (Рис. 4). Выявлено, что только 11, т.е. половина растений в исследуемой выборке, содержит в клетках РНК исследуемого гена. Приведенные далее результаты однофакторного дисперсионного анализа получены для растительных линий с подтвержденной экспрессионной активностью целевого гена.

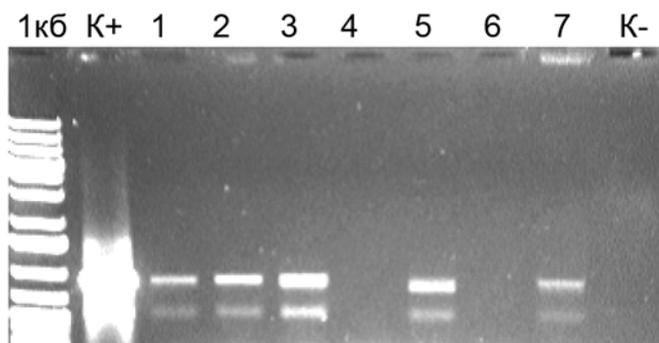


Рис. 4. РТ –ПЦР – анализ растений картофеля. 1 kb – маркер молекулярных весов. K+ – ДНК плазмиды pC29-L-syn. 1-7 – образцы кДНК картофеля. 6 – кДНК контрольного растения. K- – отрицательный контроль.

Проведены исследования устойчивости отобранных линий растений к колорадскому жуку с использованием критерия поврежденности листовых пластинок личинками и имаго колорадского жука. Для оценки поражения использовалась международная фитопатологическая шкала, включающая цифровые значения от 1 до 9 баллов, причем кустам исследуемых растений без повреждений соответствует значение 9, растениям, поврежденным свыше 80 % – значение 1. Следовательно, чем выше балл, тем меньше повреждены листья растения. В таблице 2 приведены средние значения поврежденности исследуемых линий картофеля колорадским жуком, а также отклонение среднего. Из таблицы 2 видно, что наибольшие повреждения листовой поверхности обнаружены у контрольных растений – около 65–80 % листовой поверхности (средний балл 3,5), трансгенные растения представляют собой спектр устойчивости к повреждениям вредителем. Это, вероятно,

объяснимо различными уровнями экспрессии целевой последовательности гена *сru3aM* в растительных тканях. Наименьшие повреждения после окончания цветения обнаружены у линий 17-1, 32-1, 53-1, 8-1, 152-1, у которых значения баллов устойчивости приближены к значению 7, что соответствует повреждениям растения на 11–25 %. Повреждения листовой поверхности линий 24-1 и 74-1 в период окончания цветения близки к значению 6, что соответствует повреждениям растений на 25–40 %. Линии 154-1 и 169-1 повреждены на 35–50 %, что выражается в средних баллах, близких к 5. Самый низкий балл повреждений ботвы среди трансгенных линий зафиксирован у линии 2-1 и составляет 4,75. По данным однофакторного дисперсионного анализа различия между исследуемыми линиями и контрольными растениями в вегетационной фазе окончания цветения по поврежденности листовой поверхности являются статистически значимыми.

Таблица 2

Средний балл повреждения листовых пластинок растений картофеля колорадским жуком (\pm отклонение среднего)

№	Линия	Фаза вегетации					
		Кущение	Начало бутонизации	Бутонизация – начало цветения	Массовое цветение	Цветение – окончание цветения	Окончание цветения
1	Скарб	9,00 \pm 0,00	7,90 \pm 0,54	7,50 \pm 0,50	7,60 \pm 0,48	6,60 \pm 0,48	3,50 \pm 0,80
2	17-1	8,67 \pm 0,44	9,00 \pm 0,00	9,00 \pm 0,00	8,67 \pm 0,44	8,00 \pm 0,00	7,00 \pm 0,00
3	32-1	8,80 \pm 0,32	8,80 \pm 0,32	8,00 \pm 0,00	8,00 \pm 0,00	7,80 \pm 0,32	6,75 \pm 0,88
4	24-1	8,25 \pm 0,38	8,50 \pm 0,50	7,50 \pm 0,50	7,50 \pm 0,50	6,75 \pm 0,38	5,67 \pm 1,11
5	53-1	9,00 \pm 0,00	8,50 \pm 0,50	8,17 \pm 0,28	8,00 \pm 0,00	7,50 \pm 0,50	7,00 \pm 0,00
6	74-1	8,80 \pm 0,28	8,60 \pm 0,48	8,25 \pm 0,38	8,00 \pm 0,00	7,33 \pm 0,44	5,83 \pm 0,56
7	8-1	9,00 \pm 0,00	8,75 \pm 0,38	8,25 \pm 0,38	7,50 \pm 0,50	7,50 \pm 0,50	7,00 \pm 0,00
8	154-1	8,80 \pm 0,32	8,20 \pm 0,32	7,80 \pm 0,32	7,60 \pm 0,48	7,60 \pm 0,48	5,33 \pm 0,44
9	152-1	8,75 \pm 0,38	8,50 \pm 0,50	8,50 \pm 0,50	8,50 \pm 0,50	8,33 \pm 0,44	7,00 \pm 0,67
10	161-1	9,00 \pm 0,00	9,00 \pm 0,00	8,80 \pm 0,32	8,20 \pm 0,32	7,40 \pm 0,48	6,50 \pm 0,75
11	169-1	9,00 \pm 0,00	9,00 \pm 0,00	8,20 \pm 0,64	7,80 \pm 0,32	7,40 \pm 0,48	5,25 \pm 0,38
12	2-1	9,00 \pm 0,00	8,40 \pm 0,48	8,00 \pm 0,00	7,80 \pm 0,32	6,80 \pm 0,64	4,75 \pm 0,75

Методом однофакторного дисперсионного анализа выявлены 3 тестируемые линии (17-1, 152-1, 161-1), значения поврежденности которых отличаются от контроля статистически

значимо во всех фазах вегетации, начиная с фазы бутонизации. Изменения в целостности листовой массы для линий 17-1, 152-1 и 161-1 представлено на рисунке 5.

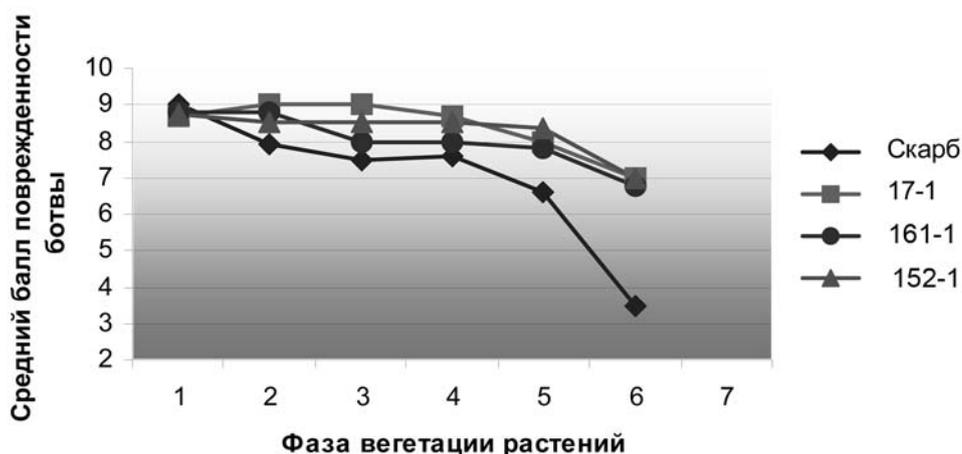


Рис. 5. Повреждения листовых пластинок колорадским жуком во время различных вегетационных фаз.

Как показано на графике (Рис. 5), средние баллы поврежденности листовых пластинок у линий 17-1, 152-1 и 161-1 до вегетационной фазы окончания цветения варьируют в

пределах 8–9, что соответствует 0–10 % повреждений, в то время как значения показателей контрольных растений снижаются до 20 % (7,5), а во второй половине периода цве-

тения опускаются до 6,5 (30–40 %) и после окончания цветения снижаются до 3,5, что соответствует 65–80 % повреждений. Более быстрое падение баллов поврежденности в

период завершения фазы цветения и после обуславливается появлением личинок III и IV возраста, характеризующихся повышенным потреблением биомассы.

Заключение

Получены растения картофеля с целевым геном и клубневое поколение белорусского сорта Скарб, экспрессирующие ген *Vt*-токсина *cry3aM*. Проведен молекулярный анализ растений методами ПЦР и RT–ПЦР, подтверждена вставка трансгена в геном картофеля, отобраны трансформанты, экспрессирующие

заданный белок. Проведено тестирование растений в полевых условиях, исследованы повреждения листовых пластинок. Показано, что трансгенные линии, экспрессирующие *Vt*-токсин, повреждаются личинками и имаго колорадского жука в достоверно меньшей степени, чем контрольные.

Список использованных источников

1. Rajamohan, F. *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action. / M.K. Lee, D.H. Dean // *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* – Academic Press, New York, 1998. – V. 60, P. 335–339.

2. Schnepf, E. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. / N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, D.H. Dean // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Sept., 1998. – P. 775–806.

3. Маниатис Т., Фрич Э.Д. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. с. 480.

4. Исаенко, Е.В. Перенос гена *cry3aM* в геном растений картофеля / Е.В. Исаенко, И.В. Голденкова-Павлова, Н.А. Картель // Сб. науч. тр. / Ин-т картофелеводства НАН Беларуси. – Минск, 2007. – Т. 12: Картофелеводство. – С. 14–21

5. Методические рекомендации по изучению и оценке форм картофеля на устойчивость к колорадскому жуку РАСХН / Н.А. Вилкова [и др.]; под ред. Вилковой Н.А. – Москва: Российская академия сельскохозяйственных наук, 1993.

6. Салехи, Дж. Сравнительный анализ экспрессии нативного и модифицированного генов *cry3a B. thuringiensis* в прокариотических и эукариотических клетках / Дж. Салехи, Р.А. Комахин, Э.С. Пирузян // *Генетика*. – 2005. – Т. 41, № 1, – С. 171–177.

7. Salehi Jozani, G.R. / Full modification of the coding sequence for enhancing potato expression of insect control protein *cry3a* gene. / Salehi Jozani, I.V. Goldenkova, E.S. Piruzian // *Proceeding book of XVII European Association for Research on Plant Breeding conference on «Genetic Variation for Plant Breeding»*. – 2004. – Tulln, Austria, – P. 239–245.

Дата поступления статьи 4 декабря 2008 г.

О.И. Зайцева

ОБРАЗОВАНИЕ АНДРОГЕННЫХ СТРУКТУР И РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ *IN VITRO* ЯРОВОГО ТРИТИКАЛЕ (\times *TRITICOSECALE* WITTM.) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ ВЫРАЩИВАНИЯ И СПОСОБОВ ОБРАБОТКИ КОЛОСЬЕВ

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Культивирование пыльников *in vitro* является важным биотехнологическим методом, позволяющим получить гомозиготные растения многих культур за одно поколение. Созданные дигаплоидные линии представляют интерес как для генетиков, так и для селекционеров, так как предоставляют возможность избежать многих трудностей с установлением сегрегации популяций. Широкое применение данный подход получил для представителей семейства Gramineae. Однако, несмотря на многолетние исследования, существует ряд трудностей при использовании данного метода, которые особенно характерны для тритикале (\times *Triticosecale* Wittm.): низкий выход эмбриоидов, высокая доля альбиносных регенерантов [1]. Успешное применение метода культуры пыльников определяет ряд факторов, наиболее важным из которых является генотип растения-донора пыльников [2, 3, 4]. К параметрам, позволяющим модулировать отзывчивость растений в культуре пыльников, также относятся стрессовая предобработка и условия выращивания донорных растений [5, 6, 7].

Одним из наиболее важных экзогенных факторов, позволяющих повысить эффективность пыльцевого эмбриогенеза, является предварительная обработка растений перед инокуляцией на питательную среду. Для злаков чаще всего применяется обработка колосьев донорных растений низкими положительными температурами (от +3 до +5°C) в течение 2–28 дней [3, 4]. Механизмы стрессовых воздействий на развитие микроспор до сих пор полностью не изучены. При воздействии пони-

женных температур в пыльниках замедляются обменные процессы, благодаря чему большая часть микроспор переходит на сильновакуолизированную стадию, которая является самой длительной фазой развития микроспор и оптимальной для индукции пыльцевого эмбриогенеза [7, 8]. Предполагается, что холодовая обработка замедляет процессы деградации в тканях пыльников, защищая, таким образом, микроспоры от формирующихся токсичных компонентов; повышает частоту эндоредупликаций, приводя к увеличению образования спонтанных дигаплоидных растений [5, 17]. Кроме того, воздействие пониженных температур изменяет положение ядра, которое перемещается в центр клетки, что впоследствии приводит к атипичному симметричному митозу и инициации пыльцевого эмбриогенеза. На культуре пыльников ячменя, риса, пшеницы, тритикале, кукурузы установлено, что низкотемпературный стресс ведет к образованию многоклеточных структур, дающих начало эмбриоидам [8].

Продолжительность холодовой обработки для различных видов обычно подбирается эмпирически. Так, для пшеницы наиболее эффективно воздействие пониженных температур в течение 7 дней. Именно при таком режиме предобработки отмечено как максимальное количество эмбриоидов (78 %), так и достаточно высокий процент образования зеленых регенерантов (70 %). При более продолжительном воздействии увеличивается количество альбиносных растений [8]. При культивировании пыльников ржи и тритикале чаще всего используется обра-

ботка в течение 21–28 дней. Увеличение экспозиции предобработки повышает выход зеленых растений-регенерантов у данных видов, однако в целом индукция эмбриогенеза, как правило, снижается и уменьшается количество новообразований, способных к регенерации [9, 10].

По имеющимся литературным данным положительное влияние на отзывчивость злаков в культуре пыльников может оказать и применение предобработок с физиологически-активными веществами [11]. Так, отмечено положительное влияние стрессовой предобработки с использованием 2-гидроксиникотиновой кислоты (2-ГНК) на выход эмбриоидов и зеленых растений-регенерантов у форм мягкой пшеницы и тритикале [12].

Донорные растения для культуры пыльников могут выращиваться в полевых условиях,

в теплицах, в вегетационных камерах, а также с использованием гидропоники [7, 13]. Единое мнение об оптимальных условиях выращивания отсутствует. Использование теплиц и вегетационных камер позволяет исключить сезонность в работе и обеспечить контролируемые условия, однако растения, полученные в открытом грунте, обычно характеризуются лучшим физиологическим состоянием и отзывчивостью в культуре пыльников [6, 14].

В связи с этим, целью настоящей работы являлось исследование влияния различных условий выращивания донорных растений и способов предобработки колосьев ярового тритикале на образование андрогенных структур и растений-регенерантов в культуре пыльников *in vitro* для усовершенствования технологии получения дигаплоидов.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили 2 сорта и 7 гибридов первого поколения ярового тритикале, любезно предоставленные академиком С.И. Грибом (НПЦ НАН Беларуси по земледелию). Исходный материал для исследования выращивался в полевых условиях БОС Института генетики и цитологии НАН Беларуси и в теплицах НПЦ НАН Беларуси по земледелию.

Растения для культивирования пыльников отбирали на стадии поздних вакуализированных микроспор, являющейся оптимальной для успешной индукции пыльцевого эмбриогенеза у злаков [7].

Срезанные колосья подвергались одному из трех видов предобработки:

1. +4°C, 7 дней;
2. +4°C, 21 день;
3. 100 мг/л 2-ГНК, +4°C, 7 дней.

Стерилизация материала проводилась в течение 10 минут 70 % спиртом либо в течение 20 мин 3 % гипохлоритом натрия с последующей трехкратной промывкой дистиллированной водой. Пыльники инокулировали для инициации эмбриогенеза на жидкую питательную среду С-17 [15], содержащую кинетин (0,5 мг/л) и

2,4–Д (2 мг/л), затем помещали в термостат на 7 дней при +31°C. На среду высаживали не менее 250 пыльников каждого генотипа. Последующее культивирование проводилось в темноте при температуре +26°C до образования эмбриогенных структур.

Эмбриоиды пересаживались на 40–50-й день культивирования на регенерационную среду Мурасиге-Скуга [16], содержащую ИУК (0,5 мг/л), кинетин (0,5 мг/л). В дальнейшем регенеранты выращивались на светоустановке при длине светового дня 16 ч и интенсивности освещения 1500–2000 Лк. Полученные растения высаживали в почву.

Характеристика эффективности индукции пыльцевого эмбриогенеза у исследованных генотипов проводилась по следующим параметрам: частота индукции эмбриогенеза, выход зеленых и альбиносных растений-регенерантов в пересчете на 100 инокулированных пыльников. Достоверность различий между показателями оценивали с помощью t-критерия Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа. Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета программ Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Способность к индукции пыльцевого эмбриогенеза и регенерации проявили все исследованные генотипы. Однако данные процессы

наблюдались только при некоторых сочетаниях изучаемых факторов (Табл. 1).

Таблица 1

Отзывчивость генотипов ярового тритикале в культуре пыльников *in vitro* в зависимости от способа предобработки и условий выращивания донорных растений

Генотип	Тип обработки	Выход новообразований		Выход регенерантов			
				Зеленых		Альбиносных	
		Теплица	Поле	Теплица	Поле	Теплица	Поле
(Аист × Згода) × Матейко	1	10,43*	19,49 ^{bc}	0 ^a	1,54 ^{bc}	1,30	2,05 ^{bc}
	2	10,60*	19,57	0,92	2,14	0,92	3,56
	3	–	3,52	–	0	–	0
(Матейко × Presto) × WS-102	1	5,88 ^{a*}	0 ^{ab}	0 ^a	0 ^{ab}	0	0 ^{ab}
	2	268,57*	30,63	14,29*	1,25	8,57	10,00
	3	–	0	–	0	–	0
Суме × Дублет	1	0 ^a	0 ^{bc}	0	0 ^{bc}	0	0
	2	30,08*	0	0,81	0	4,88*	0
	3	–	8,15	–	1,29	–	0,86
WS-102	1	35,21 ^{a*}	0 ^{abc}	0,94	0 ^{ab}	2,82*	0 ^{ac}
	2	15,88*	18,61	2,35	2,50	2,94	1,67
	3	–	10,49	–	1,24	–	3,09
WS-102 × Дублет	1	35,65 ^{a*}	0 ^{ab}	0	0 ^{ab}	3,48	0 ^{ab}
	2	34,34*	14,18	2,02	2,91	5,05	2,18
	3	–	0	–	0	–	0
Лотас × Матейко	1	21,43*	0 ^{bc}	0	0	2,92*	0
	2	16,17*	0	0,60	0	5,99*	0
	3	–	10,05	–	0	–	0,96
Матейко	1	17,39 ^{a*}	0 ^{ab}	0	0	0	0
	2	10,34	5,40	0	0,36	3,45	0,72
	3	–	0	–	0	–	0
Мешко × Vanti	1	50,19 ^{a*}	3,57 ^{bc}	0,77	0	3,86*	0,51 ^c
	2	13,51*	4,31	0	0,86	0	0,86
	3	–	18,82	–	1,08	–	3,76
Ульяна × Дарья	1	2,92 ^a	3,90 ^{bc}	0 ^a	0	0	0 ^{ab}
	2	11,02*	2,02	3,15*	0	0	0
	3	–	7,46	–	0,48	–	1,00

Примечание. * Достоверные различия между показателями при различных условиях выращивания ($P < 0,05$)
Буквами обозначены достоверные различия показателей для одного генотипа при различных условиях предварительной обработки:

a – между 1-м и 2-м типом предобработки;

b – между 2-м и 3-м типом предобработки;

c – между 1-м и 3-м типом предобработки, ($P < 0,05$).

Проведено исследование влияния условий выращивания донорных растений на отзывчивость к индукции пыльцевого эмбриогенеза. В культуру переводили растения, полученные в условиях закрытого и открытого грунта. Однофакторный дисперсионный анализ показал достоверное влияние условий выращивания на отзывчивость генотипов в культуре пыльников (при $P < 0,05$).

При попарном сравнении исследованных форм также были выявлены различия по индукции эмбриогенеза в зависимости от средо-

вых факторов. Семь из девяти исследованных генотипов показало достоверно более высокую отзывчивость при выращивании донорных растений в теплицах (при $P < 0,05$). Гибрид (Аист × Згода) × Матейко характеризовался большей андрогенетической способностью при выращивании в поле.

Способ предобработки срезанных колосьев также оказывал значимое воздействие на индукцию пыльцевого эмбриогенеза (Табл. 1, 2). При этом отзывчивость зависела от комбинации таких факторов, как тип обработки, усло-

вия выращивания и генотип. Так, в условиях закрытого грунта для четырех генотипов оптимальным оказался холодовой стресс в течение недели, в свою очередь на гибриды (Матейко × Presto) × WS-102, Cume × Дублет, Ульяна × Дарья положительное влияние оказало увеличение экспозиции предобработки до 21 дня. Для двух генотипов ((Аист × Згода) × Матейко, Лотас × Матейко) не было выявлено достоверных различий по отзывчивости в зависимости продолжительности холодового воздействия в данных условиях выращивания.

В полевых условиях было проанализировано воздействие трех способов обработки на андрогенетическую способность форм (+4°C, 7 дней; +4°C, 21 день; 100 мг/л 2-ГНК, +4°C, 7 дней). Холодовая обработка в течение недели оказалась малоэффективна в данных условиях. Шесть генотипов не проявили отзывчивость при таком способе воздействия. Для четырех форм более эффективной оказалась обработка +4°C, 21 день. Оптимальной для гибридов Cume × Дублет, Лотас × Матейко, Мешко × Vanti и Ульяна × Дарья была холодовая обработка в течение недели в сочетании с физиологически-активным веществом 2-ГНК. Среди исследованных генотипов только (Аист × Згода) × Матейко и (Матейко × Presto) ×

WS-102 проявили сходную реакцию на продолжительность обработки пониженными температурами как в условиях закрытого, так и открытого грунта.

Определяющим фактором отзывчивости в культуре пыльников является генотип. При парном сравнении отзывчивости исследованных форм тритикале выявлены значимые различия по параметру «частота новообразований» (Табл. 2) Также наблюдалась некоторая генотипически зависимая реакция на способ воздействия, что указывает на необходимость предварительного анализа эффективности предобработки для конкретного сорта или гибрида.

По литературным данным процесс андрогенеза *in vitro* включает несколько явлений, которые контролируются независимыми генетическими системами: индукция эмбриоидов или каллусов, общая регенерация растений и регенерация зеленых растений [4, 18]. Однако в наших исследованиях была выявлена устойчивая корреляция между параметрами «выход эмбриоидов» и «частота зеленых регенерантов» (0,93, при $P < 0,001$); «выход эмбриоидов» и «частота альбиносных растений» (0,62, при $P < 0,001$), а также между количеством зеленых и альбиносных растений-регенерантов (0,55, при $P < 0,001$).

Таблица 2

Выход новообразований у генотипов ярового тритикале в культуре пыльников *in vitro*

Условия выращивания	Теплица		Поле		
	+4°C, 7 дней	+4°C, 21 день	+4°C, 7 дней	+4°C, 21 день	100 мг/л 2-ГНК, +4°C, 7 дней
(Аист × Згода) × Матейко	10,43 ^{ab}	10,60 ^a	19,49 ^a	19,57 ^a	3,52 ^a
(Матейко × Presto) × WS-102	5,88 ^{bcde}	268,57 ^b	0 ^b	30,63 ^b	0 ^b
Cume × Дублет	0 ^d	30,08 ^{cd}	0 ^b	0 ^c	8,15 ^{cd}
WS-102	35,21 ^e	15,88 ^{ad}	0 ^b	18,61 ^a	10,49 ^d
WS-102 × Дублет	35,65 ^{ec}	34,34 ^c	0 ^b	14,18 ^{ad}	0 ^b
Лотас × Матейко	21,43 ^f	16,17 ^{de}	0 ^b	0 ^{ce}	10,05 ^{de}
Матейко	17,39 ^{af}	10,34 ^{ae}	0 ^b	5,40 ^f	0 ^b
Мешко × Vanti	50,19 ^g	13,51 ^{ae}	3,57 ^c	4,31 ^{df}	18,82 ^g
Ульяна × Дарья	2,92 ^d	11,02 ^{ae}	3,90 ^c	2,02 ^{fe}	7,46 ^{cde}

Примечание. Одинаковыми буквами обозначены недостоверные, разными – достоверные различия показателей между генотипами тритикале в одной колонке, ($P < 0,05$).

Исследованные генотипы показали невысокую способность к регенерации зеленых растений, за исключением гибрида (Матейко × Presto) × WS-102 который характеризовался

значительной частотой развития зеленых растений (14,29) в условиях закрытого грунта при холодовом воздействии в течение трех недель. Регенерационная активность находилась в

меньшей зависимости от экзогенных факторов, по сравнению с выходом эмбриоидов. Так, статистически значимое влияние условий выращивания на регенерационную активность было показано только для гибридов (Матейко × Presto) × WS-102 и Ульяна × Дарья. При этом в обоих случаях исследуемый параметр был значимо выше в условиях закрытого грунта. Продолжительность холодной обработки также оказала воздействие только на часть генотипов. Так, в условиях закрытого грунта достоверно выше был выход зеленых растений регенерантов у генотипов (Аист × Згода) × Матейко, (Матейко × Presto) × WS-102 и Ульяна × Дарья при стрессовом воздействии в течение трех недель. В свою очередь при выращивании донорных растений в поле генотип (Аист × Згода) × Матейко показал сходную

отзывчивость вне зависимости от продолжительности холодового воздействия, гибрид Cume × Дублет характеризовался достоверно более высокой способностью к регенерации при воздействии 2-ГНК. Генотипы (Матейко × Presto) × WS-102, WS-102 × Дублет и WS-102 формировали значимо больше зеленых растений при воздействии пониженных температур в течение 21 дня. Если же проанализировать соотношение зеленых и альбиносных растений-регенерантов, полученных при различных способах воздействия внешних факторов, то наиболее продуктивным было использование пониженных температур в течение 3 недель. Исключение составил гибрид Cume × Дублет, который формировал зеленые растения только при холодной обработке в сочетании с 2-ГНК.

Заключение

Полученные данные показывают, что генотип, способ предварительной обработки срезанных колосьев, условия выращивания донорных растений, а также взаимодействие данных факторов оказывают достоверное влияние на параметры пыльцевого эмбриогенеза ярового тритикале.

Исследованные генотипы проявили большую отзывчивость в культуре пыльников *in*

vitro при выращивании донорных растений в условиях закрытого грунта.

Применение холодового воздействия в течение 21 дня оказывает, в основном, положительное воздействие на индукцию эмбриогенеза, выход зеленых растений.

Выбор типа обработки зависит от механизма ее действия на конкретный генотип растения.

Список использованных источников

1. Immonen, S. Stress treatments and ficoll for improving green plant regeneration in triticale anther culture / S. Immonen, J. Robinson // *Plant Science*. – 2000. – Vol. 150. – P. 77–84.

2. Effect of 5-azacytidine on callus induction and plant regeneration potential in anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) / I. Belchev [et al.] // *Bulg. J. Plant Physiol.* – 2004. – Vol. 30, № 1/2. – P. 45–50.

3. Влияние низких положительных температур на индукцию эмбриогенеза и формирование регенерантов в культуре *in vitro* пыльников пшеницы / Э.Р. Галиева [и др.] // *Физиология и биохимия культ. растений*. – 2005. – Т. 37, № 2. – С. 132–138.

4. Влияние холодовой предобработки на культивируемые пыльники ячменя разных

генотипов / Т.В. Лазариду [и др.] // *Физиология растений*. – 2005. – Т. 52, № 5. – С. 781–785.

5. Shim, Y.S The influence of pretreatment on cell stage progression and the time of DNA synthesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) uninucleate microspores / Y.S. Shim, K.J. Kasha // *Plant Cell Rep.* – 2003. – Vol 23, № 6. – P. 1–7.

6. Wheat anther culture: effect of genotype and environment conditions / C.S. Lu [et al.] // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 1991. – V. 24. – P. 233–236.

7. Орлов П.А. Клеточные и генно-инженерные технологии модификации растений / П.А. Орлов. – Минск: Тонпик, 2006. – 248 с.

8. Круглова, Н.Н. Морфогенез в культуре пыльников пшеницы: эмбриологический подход / Н.Н. Круглова. – Уфа: Гилем, 2001. – 203 с.

9. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis / M.E. Shariatpanahia [et al.] // *Physiologia Plantarum*. – 2006. – Vol. 127. – P. 519–534.
10. Rye doubled haploids as a research and breeding tool – a practical point of view / T. Tenhola-Roininen [et al.] // *Plant Breeding*. – 2006. – Vol. 125. – P. 584–590.
11. Highly efficient doubled-haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis / W. Liu [et al.] // *Crop Sci*. – 2002. – Vol. 42. – P. 686–692.
12. Culture of freshly isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores treated with inducer chemicals / M. Y. Zheng [et al.] // *Plant Cell Rep*. – 2001. – Vol. 20. – P. 685–690.
13. Arzani, A. Comparison of doubled haploid lines and their mid-generation progenitors in forage and dual-purpose triticales under greenhouse hydroponic conditions / A. Arzani, N.L. Darvey // *Euphytica*. – 2002. – V. 126. – P. 219–225.
14. Anther culture-derived regenerants of durum wheat and their cytological characterization / M. Dogramaci-Altuntee [et al.] // *The American Genetic Association*. – 2001. – V. 92. – P. 56–64.
15. Wang, P. A study of the application of C17 medium for anther culture / P. Wang, Y. Chen R. // *Acta Botanica Sinica*. – 1986. – Vol. 28. – P. 38–45.
16. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant*. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
17. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis / M.E. Shariatpanahia [et al.] // *Physiologia Plantarum*. – 2006. – Vol. 127. – P. 519–534.
18. Analysis of anther culture response in hexaploid triticales / M. Gonzalez [et al.] // *Plant Breeding*. – 1997 – Vol. 116. – P. 302–304.

Дата поступления статьи 4 декабря 2008 г.

МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КОЛЛЕКЦИИ ЖЕЛТОГО И УЗКОЛИСТНОГО ЛЮПИНА

Белорусский государственный университет, биологический ф-т
Республика Беларусь, 220030, Минск, пр. Независимости, 4

Введение

Проблему белка невозможно решить посредством повышения этого показателя у отдельных видов сельскохозяйственных культур. Зернобобовые растения включают достаточно широкий круг видов, некоторые из них признаны основными (приоритетными) видами для решения проблемы дефицита белка. Необходимы комплексные исследования генофонда коллекций зернобобовых культур. Важность генофонда люпина и особенно форм с ограниченным ветвлением для селекции этой культуры и необходимость изучения их генетического разнообразия подчеркивается в работах [1, 2]. Современные сорта узколистного и желтого люпина обладают индетерминантным ростом, у которых вегетативный рост продолжается в период налива семян. Это вызывает внутри растения сильную конкуренцию за ассимиляты. Генотипы с ограниченным ветвлением (ОВ) обоих видов люпина могут снизить эту тенденцию и повысить долю биомассы растения, приходящейся на зерно. Признак ОВ у узколистного люпина встречается в двух формах: умеренной (mild) и сильной (severe). Не обнаружено устойчивой корреляции признака ОВ с числом междоузлий на главном стебле или временем цветения. Следовательно, посредством селекции можно получить

различные комбинации растений с разными типами ветвления и сроками созревания [2]. В настоящее время создание новых форм растений с ограниченным ветвлением и их использование в селекционных программах с целью расширения и обогащения генофонда люпина желтого и узколистного является важной задачей селекции.

Генофонд коллекции люпина (*Lupinus luteus* и *Lupinus angustifolius*) БГУ состоит из различных сортов отечественной и зарубежной селекции, мутантных и гибридных форм. Кроме того, сортовой материал был получен из разных селекционных учреждений России, Польши, Беларуси, Австралии. Увеличение разнообразия образцов люпина путем мутагенеза, межсортовой и межлинейной гибридизации основная задача селекции люпина, а комплексная оценка в условиях Беларуси форм люпина, интродуцированных и полученных нами, является наиболее важным ее этапом.

Целью данной работы было исследование разнообразия коллекции люпинов по количественным признакам, резистентности растений к грибам рода *Fusarium*, содержанию алкалоидов и создание новых форм люпина (*Lupinus luteus*) и (*Lupinus angustifolius*) с ограниченным ветвлением.

Материалы и методы

Оценку морфогенетических показателей и описание коллекционных образцов проводили по методике [4]. Межсортовую гибридизацию осуществляли по общепринятой методике. В НИЛ цитогенетики растений БГУ путем обработки 0,0012 %-ным водным раствором НММ семян сорта Академический-1 получен целый

ряд мутантов люпина желтого (БГУ М-2, М-3, М-4, Мутантная линия). В схеме межсортовых скрещиваний люпина желтого использовали мутанты с редуцированным ветвлением, полученные в НИЛ цитогенетики растений БГУ. Для внутривидовой гибридизации у люпина узколистного использовали сорта с редуци-

рованным ветвлением селекции Беларуси и России. В потомстве популяций F₆ были выделены линии, у которых изучали следующие количественные признаки: количество бобов на растение, количество семян на растение, масса семян растения, масса 1 000 семян и длину вегетационного периода.

При отборе генотипов на устойчивость к фузариозу были использованы культуральные жидкости (КЖ) трех высоковирулентных изолятов возбудителей фузариоза (*Fusarium oxysporum* var *orthoceras* штамм 61-04; II – *F. sporotrichioides* штамм 88-04; III – *F. javanicum* штамм 25-00). Для определения устойчиво-

сти генотипов к этим изолятам использовали методические приемы гаметной селекции [5]. Реакцию мужского гаметофита люпина на воздействие патогенов оценивали по жизнеспособности пыльцы (процент проросших пыльцевых зерен к общему изученному их количеству) и длине пыльцевых трубок с использованием модифицированной нами для люпина методики гаметофитного отбора. Содержание алкалоидов определяли нефелометрическим методом. Хроматографический анализ суммарных экстрактов алкалоидов проводили по общепринятой методике [6] методом распределительной хроматографии на бумаге.

Результаты и обсуждение

В полевых и лабораторных условиях изучен полиморфизм коллекционных образцов люпина желтого и узколистного по биологическим и практически значимым признакам. Образцы люпина желтого и узколистного, имеющиеся в коллекции НИЛ цитогенетики БГУ, распределены по разновидностям согласно классифи-

кации Таранухо Г.И. [7] и Курловича Б.С. [8]. Они представляют 15 разновидностей люпина желтого (*Lupinus luteus*) и 5 основных разновидностей люпина узколистного (*Lupinus angustifolius*)s. У обоих видов люпина выявлен широкий внутривидовой полиморфизм по типу ветвления, окраске цветков и семян.

Линии, выделенные из гибридных комбинаций

Lupinus luteus

Все полученные в нашей лаборатории мутанты люпина желтого обладали в разной степени редуцированным ветвлением (детеры нулевого и первого порядка), разной окраской семян, разной продуктивностью и коротким вегетационным периодом. Известно, что мутантные формы люпина, как правило, обладают низкой жизнеспособностью

и продуктивностью. Изучение семенной продуктивности линий люпина с комплексом мутантных генов подтвердило факт, что только повторные отборы внутри линий приводят к возрастанию их продуктивности [1]. Поэтому для увеличения семенной продуктивности растений мутантные формы были вовлечены в межсортовые и межлинейные скрещивания. В результате проведенной гибридизации и последующих отборов получены новые перспективные по ряду ценных признаков генотипы (Табл. 1).

Таблица 1

Характеристика гибридных форм, родительских компонентов и сорта-стандарта люпина желтого ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

Комбинация скрещивания, сорт	Количество на 1 растении, шт.		Масса, г.		ДВП, дней
	бобов	семян	семян с 1 растения	1000 семян	
Фауст × БГУ М-2, F ₆	8,85 ± 0,70	34,87 ± 2,89	5,67 ± 0,38*	176,67 ± 6,89	111,0 ± 0*
Фауст × М-3, F ₆	14,75 ± 2,49*	52,13 ± 7,55*	7,58 ± 0,86*	152,89 ± 9,19	111,0 ± 0*
М-3 × МЛ, F ₆	8,76 ± 0,60	32,64 ± 2,27	5,7 ± 0,31*	183,15 ± 5,33	101,0 ± 0*
БГУ М-2 × МЛ, F ₆	6,80 ± 1,71	28,0 ± 8,22	5,09 ± 0,98*	215,45 ± 32,56	111,0 ± 0*

Продолжение таблицы

Комбинация скрещивания, сорт	Количество на 1 растении, шт.		Масса, г.		ДВП, дней
	бобов	семян	семян с 1 растения	1000 семян	
М-4 × МЛ, F ₆	8,07±0,57	30,19±2,35	5,11±0,32*	176,13±4,62	101,0±0*
Детер К 2733 × МЛ, F ₆	6,24±0,53	22,23±2,20	4,31±0,27	214,35±15,31	111,0±0*
Фауст	4,80±0,20	12,80±1,20	3,49±0,15	281,06±24,80	124,0±0
Детер К 2733	10,80±0,89	38,63±3,50	5,02±0,46	130,52±3,05	116,0±0
БГУ М-2	3,89±0,34	12,89±1,21	1,62±0,14	131,89±4,34	110,08±2,14*
М-3	8,33±0,88	28,0±2,65	4,89±0,34	175,79±9,28	111,0±0*
М-4	4,64±0,28	13,60±0,93	1,78±0,11	135,16±5,41	106,04±2,08*
МЛ	6,36±0,79	22,5±2,58	2,73±0,29	124,33±4,05	95,21±0,21*
Академический 1	7,65±0,89	28,88±4,35	3,78±0,55	131,56±7,25	121,0±0
Жемчуг St.	9,28±1,11	28,86±5,41	3,86±0,63	138,26±4,91	122,0±0

Примечания. МЛ – мутантная линия;

* – разница со стандартом достоверна при P≥0,05.

При сравнении мутантных форм (БГУ М-2, М-3, М-4, Мутантная линия) с исходным сортом Академический-1 достоверное отличие по признакам количество бобов растения и масса семян растения отмечено только у образца М-3. Все остальные формы по изученным признакам уступали оригинальному сорту, за исключением признака длина вегетационного периода. Все мутантные формы были более скороспелыми, чем исходный сорт. Выделенные в ряду поколений линии существенно отличались от исходных компонентов скрещивания. Так, в F₆ гибридной комбинации Фауст × БГУ М-2 отмечены достоверные различия по всем изученным признакам в сравнении с родительскими сортами. Тенденция достоверного превышения массы семян с растения над стандартным сортом выявлена у гибридных комбинаций: Фауст × М-3; М-3 × МЛ; БГУ М- × МЛ и М-4 × МЛ. По признаку масса 1 000

семян все гибридные формы характеризовались более крупными семенами в сравнении с сортом-стандартом. Длина вегетационного периода была достоверно меньшей у гибридных и мутантных форм по сравнению как с сортом-стандартом, родительскими компонентами скрещивания, так и исходным для мутантов сортом Академический 1. Наиболее перспективной гибридной комбинацией является Фауст × М-3. Она значительно превосходила родительские формы, а также стандартный сорт Жемчуг по признакам: количество бобов растения, количество семян растения и масса 1 000 семян.

Lupinus angustifolius

В результате проведенных межсортных скрещиваний и последующих отборов среди форм люпина узколистного выделены лучшие рекомбинантные линии (Табл. 2).

Таблица 2

Характеристика гибридных форм, родительских компонентов и сорта-стандарта люпина узколистного ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

Комбинация скрещивания, сорт	Количество на 1 растении, шт.		Масса, г.		ДВП, дней
	бобов	семян	семян с 1 растения	1000 семян	
Миртан, Р	8,4 ± 0,54	15,0 ± 1,82	2,28 ± 0,25	156,55 ± 3,00	117
Миртан × Дикаф14, F ₆	8,84 ± 0,28	35,56 ± 1,14*	5,26 ± 0,17*	152,40 ± 3,22*	97
Дикаф 14, Р	9,21 ± 0,58	30,23 ± 2,24	5,25 ± 0,35	176,84 ± 3,93	109
Дикаф 14 × Ладны, F ₆	9,48 ± 0,36*	31,01 ± 1,21*	5,29 ± 0,18*	173,29 ± 2,33	103

Продолжение таблицы

Комбинация скрещивания, сорт	Количество на 1 растении, шт.		Масса, г		ДВП, дней
	бобов	семян	семян с 1 растения	1000 семян	
Ладны, Р	7,75± 0,28	17,79 ± 0,82	3,37± 0,09	206,06± 6,61	101
Дикаф14 × Першацвет, F ₆	8,97 ± 0,33	29,64 ± 1,03	4,81± 0,12	166,73± 2,87	103
Першацвет, Р, стандарт	8,63 ± 0,44	24,53 ± 1,36	3,93 ± 0,19	164,0± 4,22	110
Ладны × Першацвет, F ₆	10,11± 0,41*	29,66 ± 1,48*	4,55± 0,21*	160,15± 14,89*	102

Примечания. * – разница со стандартом достоверна при $P \geq 0,05$.

При сравнении линий, выделенных из гибридов Ладный × Першацвет; Дикаф 14 × Ладный, с сортом стандартом Першацвет отмечены достоверные различия по всем изученным признакам. Комбинация скрещивания Митран × Дикаф 14 является наиболее перспективной среди форм *Lupinus angustifolius*. Она достоверно превышает стандартный сорт по признакам: количество бобов растения, масса семян растения и длина вегетационного периода. Данная форма была самой скороспелой. Таким образом, удалось создать рекомбинантный генотип, обладающий способностью формировать высокую продуктивность за сравнительно короткий период вегетации.

Устойчивость к фузариозу

Выявлена сортоспецифичная реакция сортов люпина узколистного на воздействие трех изолятов *Fusarium*, показана разная их устойчивость к фузариозу. Так, устойчивыми к изученным патогенам были сорта Першацвет, Миртан, Кристалл, Сидерат 38- узколистного люпина и образцы люпина желтого - Мутантная линия, М 3, Afus. При сравнении устойчивости с содержанием алкалоидов отмечено, что высоко устойчивые образцы обладали, как правило, повышенным содержанием алкалоидов. У фузариозоустойчивых образцов при воздействии на их семена продуктов патогена установлено увеличение содержания алкалоидов по сравнению с контролем (Табл. 3).

Таблица 3

Устойчивость к фузариозу по гаметофиту и содержание алкалоидов у сортов люпина узколистного

Сорт	Длина пыльцевых трубок, % к контролю	Содержание алкалоидов, % абс.сух. ве-ва	
		контроль	после воздействия патогена
Миртан	80,07	0,164 ± 0,006	0,191 ± 0,004
Першацвет	73,33	0,076 ± 0,0	0,151 ± 0,003
Сидерат 38	74,35	0,955 ± 0,009	1,068 ± 0,004
Брянский 1124	23,04	0,326 ± 0,036	0,326 ± 0,012

Содержание алкалоидов

Коллекционные образцы различались и по содержанию алкалоидов. Их содержание варьировало от 0,01 % у образцов люпина узколистного Радужный, Шуарге до 1,23 % у сортов Синий 1, S.E. Blue №1. В то же время содержание алкалоидов колебалось от 0,007 % у образцов люпина желтого Белоцветковый Т, БГУ М1 до 0,32 % у сортов Любишевский и Schwako. Мы обнаружили, что сорта люпина узколистного последних лет селекции имели более низкое содержание

алкалоидов в семенах по сравнению с формами ранней селекции. По количеству алкалоидов новые образцы люпина желтого были на уровне или даже выше старых сортов. Использование хроматографии позволило нам выделить группу сортов люпина желтого, содержащих грамин, среди которых были сорта ранней селекции Сут, Afus, Янтарь, Томик и др., а также сорта более поздней селекции – Пружанский, Крок, Улита и др. Компонентный состав алкалоидного комплекса люпина узколистного практически не

изменялся. Мы только обнаружили неидентифицированный алкалоид у сорта Брянский 123, присутствовавший как в зеленой массе, так и в зрелых семенах.

Заключение

Генофонд коллекции люпинов БГУ состоит из различных сортов отечественной и зарубежной селекции, мутантных и гибридных форм. В данной работе было проведено исследование разнообразия коллекции люпинов по количественным признакам, резистентности растений к роду *Fusarium*, содержанию алкалоидов и созданию новых форм *Lupinus luteus* и *Lupinus angustifolius* с ограниченным ветвлением. Кроме того, проведена классификация образцов люпина: формы *Lupinus luteus* разделены на пятнадцать групп, а *Lupinus angustifolius* – на пять групп в соответ-

ствии с методикой Таранухи и Курловича. Выявлено, что образцы более резистентные к роду *Fusarium* имели, как правило, повышенное содержание алкалоидов. Изученные образцы люпина различались по содержанию алкалоидов (от 0,01 до 1,23 %). Обнаружено, что семена сортов *Lupinus angustifolius* более поздней селекции имели значительно более низкое содержание алкалоидов по сравнению со старыми сортами, в то время как новые генотипы *Lupinus luteus* по этому признаку были на том же уровне и даже выше, чем сорта ранней селекции.

Список использованных источников

1. Купцов, Н.С. Люпин (генетика, селекция, гетерогенные посевы) / Н.С. Купцов, И.П. Такунов. Брянск: Клинецовский город, 2006. – 576 с.
2. Adhikari, K.N. The genetic control of highly restricted branching in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) / K.N. Adhikari, N.W. Galwey, M. Dracup // *Euphitica*. – 2001. – V. 117. – P. 261–274.
3. Adhikari, K.N. The genetic control of mildly restricted branching in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) / K.N. Adhikari, N.W. Galwey, M. Dracup // *Euphitica*. – 2002. – V. 123. – P. 101–109.
4. Широкий унифицированный классификатор СЭВ и Международный классификатор СЭВ рода *Lupinus* L. / С. Степанова [и др.]. Ленинград: ВИР, 1983. – 40 с.
5. Пивоваров, В. А. Методические рекомендации по гаметной селекции у растений (методы, результаты и перспективы) / В.А. Пивоваров. Москва: ВНИИССОК, 2001. – 391 с.
6. Мироненко, А.В. Методы определения алкалоидов / А.В. Мироненко. Мн.: Наука и техника, 1966. – 179 с.
7. Тарануха, Г.И. Люпин: биология, технология возделывания / Г.И. Тарануха. Горки: БСХА, 2001. – 112 с.
8. Kurlovich, V. S. *Lupinus: Geography, Classification, Genetic Resources and Breeding* / V. S. Kurlovich. St.- Petersburg: Intan, 2002. – 408 p.

Дата поступления статьи 27 октября 2008 г.

АЛКАЛОИДЫ ЛЮПИНА: ИХ ФУНГИЦИДНЫЕ ЭФФЕКТЫ

Белорусский государственный университет, биологический ф-т
Республика Беларусь, 220030, Минск, пр. Независимости, 4

Введение

Заболееваемость сельскохозяйственных культур привела к широкому использованию препаратов защиты растений от возбудителей болезней, поскольку поражение растений фитопатогенами приводит к снижению урожайности и ухудшению качеств зерна [1, 2]. Однако использование синтетических фунгицидов способно привести к изменению метаболизма и значительному снижению урожайности [3]. Особо следует подчеркнуть возникновение устойчивости патогенов к фунгицидам, связанное с микроэволюционными процессами, происходящими под влиянием препаратов в популяциях патогенов [4-5].

В современных экологических условиях необходимы новые подходы в поиске средств защиты растений от возбудителей заболеваний. Поэтому актуален поиск средств защиты растений среди веществ природного происхождения, не вызывающих нарушения экологического равновесия. Одними из таких веществ являются растительные алкалоиды, в частности алкалоиды люпина, которые могут быть очень эффективны при использовании их в качестве защитных веществ растений.

Среди групп алкалоидов производные хинолизидина представлены в большом количестве [6]. В результате широких исследований у них выявлены бактериостатические [7], противовирусные [8], гербицидные [9], токсичные и другие эффекты [10-12]. В то же время алкалоиды могут повышать всхожесть и энергию

прорастания семян, урожайность различных сельскохозяйственных культур за счет стимуляции процессов обмена веществ в растениях [13], снижают накопление нитратов [14], они также обладают антимуtagenным действием [15]. Алкалоиды, как уже было отмечено, могут использоваться как защитные вещества против болезней растений. Показано, что они могут быстро разрушаться в среде. По данным Gross R., Wink M. [16] только 0,1 – 2,0 % спартеина остается в почве спустя 20 дней после его внесения. Выделены некоторые штаммы бактерий, способные разрушать алкалоиды *in vitro* [17]. Исследована антибактериальная и антигрибковая активность алкалоидного экстракта растений *Lupinus angustifolius* против стандартных штаммов следующих бактерий: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus*, а также против таких грибов, как *Candida albicans* и *C. krusei*. Алкалоидный экстракт проявил значительную активность в отношении *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*, в то время как слабую активность он показал в отношении *Escherichia coli*. С другой стороны, данный экстракт обладал умеренной активностью против грибов *Candida albicans* и *C. krusei*. [18]. Целью наших опытов явилось изучение различных концентраций алкалоидов, выделенных из растений люпина, на рост и спорообразование грибов *Fusarium* в лабораторных условиях.

Материалы и методы

Исследования проводили в НИЛ цитогенетики растений БГУ. Объектами исследований были коллекционные образцы люпина желтого *L. luteus* и узколистного *L. angustifolius* и коллекция фитопатогенов рода *Fusarium*. Алкалоидность

сортов люпина желтого и узколистного определяли по [19]. Чистые алкалоиды выделяли: люпанин, 13-оксилупанин – по [20], спартеина перхлорат, люпинин по [20, 21]. Хроматографический анализ проводили на пластинах «Sorbfil»

по методу [22], в качестве стандартов использовали чистые препараты алкалоидов. Грибы культивировали на жидкой среде с постоянным химическим составом при температуре +24,0° С.

В среду вносили взвесь спор гриба 1 млн.спор/мл. В качестве контроля использовалась среда для культивирования грибов без добавления алкалоидов.

Результаты и обсуждение

Выделенные люпинин, люпанин, 13-оксилюпанин хорошо растворимы в среде Чапека при рН 5,5, спартеин – при рН 9,0-9,5. Мы изучали эффекты выделенных алкалоидов люпина при содержании их в среде 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 г/л. Данные наших исследований представлены в таблице. Спартеин при концентрации 0,5 г/л подавлял развитие мицелия изолята 6(10) *F. oxysporum* (Schlecht) Sn. et H. и в то же время стимулировал его спорогенез. Это указывает на активность этого алкалоида в данной концентрации в отношении изолята 6(10). Наиболее чувствительными к действию спартеина были изоляты *F. avenaceum* и *F. javanicum*, их рост ингибировался по мере повышения содержания спартеина в среде. Так, спартеин при самом высоком уровне его содержания в среде (5,0 г/л) полностью ингибировал развитие ве-

гетативной массы *F. avenaceum* и *F. javanicum*. Оба гриба (*F. avenaceum* и *F. javanicum*) не являются специфическими патогенами, вызывающими заболевания люпина желтого и узколистного. Вероятно, поэтому эти патогенные грибы нечувствительны к обработке вторичными токсичными метаболитами люпина. Наиболее высокие концентрации люпинина в среде ингибировали развитие вегетативной массы как *F. avenaceum*, так и *F. javanicum* и значительно снижали активность спорогенеза *F. javanicum*. Люпинин не влиял на массу мицелия изолятов *F. oxysporum* 6/10 и *F. oxysporum* 6/12. В то же время он значительно повышал интенсивность спорогенеза изолята *F. oxysporum* 6/10 при концентрации 1.0 г/л и интенсивность спорогенеза изолята *F. oxysporum* 6/12 при всех изученных концентрациях.

Таблица

Влияние различных концентраций алкалоидов, выделенных из растений люпина, на рост мицелия и спорогенез грибов рода *Fusarium*

Вариант	Масса мицелия, мг				Количество спор, млн /мл			
	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. javanicum</i>	<i>F. oxysporum</i> 6/10	<i>F. oxysporum</i> 6/12	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. javanicum</i>	<i>F. oxysporum</i> 6/10	<i>F. oxysporum</i> 6/12
Спартеин при рН 9,0-9,5 в среде								
контроль	45,38	21,16	30,64	30,16	0,710	–	0,546	3,441
0,1 г/л	45,52	21,64	31,32	22,77	0,263*	–	0,515	1,954*
0,5 г/л	38,28	22,70	19,51*	24,09	0,265*	–	0,850**	2,853
1,0 г/л	40,54	28,86**	21,16	24,69	0,270*	–	1,020***	3,603
5,0 г/л	0,0	0,0	24,66	25,06	0,0	–	0,782*	3,237
Люпинин								
контроль	48,56	27,23	38,51	32,11	0,852	0,215	0,501	0,356
0,1 г/л	49,58	28,35	42,61	33,15	0,801	0,190	0,544	0,415*
0,5 г/л	52,51	26,66	45,18	37,14	0,791	0,186	0,538	0,426*
1,0 г/л	44,53	21,37	37,14	33,18	0,602 *	0,174	0,596*	0,436*

Продолжение таблицы

Вариант	Масса мицелия, мг				Количество спор, млн /мл			
	<i>F.avenaceum</i>	<i>F.javanicum</i>	<i>F.oxysporum</i> 6/10	<i>F.oxysporum</i> 6/12	<i>F.avenaceum</i>	<i>F.javanicum</i>	<i>F.oxysporum</i> 6/10	<i>F.oxysporum</i> 6/12
5,0 г/л	38,14*	16,11*	36,10	35,19	0,601*	0,112*	0,508	0,409 *
Люпанин								
контроль	48,56	27,23	38,51	32,11	0,852	0,215	0,501	0,356
0,1 г/л	36,00*	16,31*	31,44	29,12	0,624*	0,103**	0,486	0,316
0,5 г/л	34,91*	18,6*	32,48	24,16*	0,516**	0,151*	0,451	0,281
1,0 г/л	29,51*	15,96*	29,16*	20,18*	0,514*	0,102**	0,328*	0,272**
5,0 г/л	28,30*	14,81*	21,81*	19,11*	0,558*	0,096**	0,216**	0,264**
13-оксилюпанин								
контроль	48,56	27,23	38,51	32,11	0,852	0,215	0,501	0,356
0,1 г/л	46,54	24,34	39,46	39,10*	0,791	0,214	0,516	0,396
0,5 г/л	54,81*	33,18*	56,18**	54,11**	0,812	0,226	0,624*	0,428*
1,0 г/л	49,18	32,11*	49,38*	48,10 *	0,903	0,193	0,735*	0,529*
5,0 г/л	53,26	29,18	45,18	35,12	0,805	0,186	0,704*	0,409

Примечание. * – Разница достоверна по сравнению с контролем при $P = 0,05$;

** – Разница достоверна по сравнению с контролем при $P = 0,01$;

*** – Разница достоверна по сравнению с контролем при $P = 0,001$.

Данный факт можно рассматривать как использование патогеном алкалоида для стимуляции жизненных процессов.

Наименее токсичным по отношению ко всем изученным патогенам был алкалоид 13-оксилюпанин. Он стимулировал развитие массы мицелия у *F. oxysporum* 6/12, *F. avenaceum* и *F. javanicum* при концентрации в среде 0,5 г/л, а при концентрации 1,0 г/л проявление этого признака у *F. oxysporum* 6/10. Кроме того, 13-оксилюпанин значительно повышал интенсивность спорогенеза у обоих изолятов 6/10 и 6/12 *F. oxysporum* при концентрации 0,5 г/л, это может указывать на его роль как источника азота для грибов, что было

обнаружено в каллусной культуре люпина [23]. Люпанин был наиболее токсичным в отношении всех изученных патогенов и вызывал снижение активности спорогенеза и ингибировал развитие вегетативной массы грибов при всех изученных концентрациях. Полученные результаты представляют несомненный интерес для защиты растений против возбудителей грибных болезней сельскохозяйственных культур и указывают на необходимость дальнейших исследований для выяснения механизма действия алкалоидов, а также функциональной активности действующих концентраций в отношении грибных и бактериальных заболеваний.

Заключение

Изучены некоторые эффекты алкалоидов люпина (при концентрации в среде 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 г/л) на рост и развитие патогенных для растений грибов рода *Fusarium*. Объектами для данного исследования послужили разные алкалоиды видов люпина желтого (*L. luteus*) и узколист-

ного (*L. angustifolius*) и коллекция фитопатогенов рода *Fusarium*. В результате данного исследования выявлены различные токсичные эффекты алкалоидов на патогенные грибы растений рода *Fusarium*. Наиболее токсичным веществом в отношении всех изученных патогенов был люпа-

нин, а наименее токсичным - 13-оксилупанин. Показано, что люпинин и спартеин имели различное влияние на изученные патогены растений. *Fusarium oxysporum* практически оказался нечувствительным к их токсичному действию.

Эти алкалоиды были более токсичны по отношению к патогенным грибам *F. avenaceum* и *F. javanicum*, вызывая у них снижение активности спорообразования и ингибируя развитие вегетативной массы гриба.

Список использованных источников

1. D'Mello, J.P.F. Mycotoxins/ J.P.F. D'Mello, A.M.C. Macdonald // *Animal Feed Science and Technology*. – 1997. – V. 69. – P. 155 – 166.
2. Bennet, J.W. New perspectives of aflatoxin biosynthesis / J.W.Bennet, S.B. Christensen // *Advances in Applied Microbiology*. – 1983. – V.29. – P. 53–62.
3. Rozek, S. Zmiana ilosciu bialku w nasionach fasolu pod wplywem fungicydow/ S. Rozek // *Hodowla roslin, Aklimatyzacja Nasien*. – 1978. – V. 22. – P. 89–95.
4. Saayman-du Toit, A.E.J. Efficacy and phytotoxicity of simazine and terbuthylazine in lupins./ A.E.J. Saayman-du Toit // *S. Afr. J. Plant and Soil*. – 2004. – V.20, № 4. – P. 188–192.
5. Ishii, H. Studies on fungicide resistance in phytopathogenic fungi/ Ishii, H // *J. Gen. Plant Pathol*. – 2004. – V. 70, № 6. – P. 379–381.
6. Xiao, P. Lupinus alkaloids seeds *Sophora viciifolia* / P. Xiao, H. Kubo // *Phytochemistry*. – 1999. – V. 50. – P. 189–193.
7. Tyski, S. The effect of lupine alkaloids and ethanol extracts from seeds of *Lupinus angustifolius* on selected bacterial strains / S. Tyski, M. Markiewicz // *J. Plant Physiology*. – 1988. – V. 133. – P. 240–242.
8. Pei-Lan, Ding. (+)-12alpha-Hydroxyisophocarpine, a new quinolizidine alkaloid and related anti-HBV alkaloids from *Sophora flavescens* / Pei-Lan, Ding, Zhi-Xin Liao, Hai Huang, Pei Zhou, Dao-Feng Chen // *Bioorg Med Chem Lett*. – 2006. – V. 16. – P. 1231–1235.
9. Muzquiz, M. Herbicide-like effect of Lupins alkaloids / M. Muzquiz, C. de la Guadra, C. Cuadrado, C. Burbano, R. Calvo // *Industrial Crops and Products*. – 1994. – V.2. – P. 273–280.
10. Caprioli, V. Potenzialita in campo antiparasitario di alkuni alkaloidi del lupino/ V.Caprioli,, N. Andreoni // *Inform. fitopatol*. – 1990. – V. 40. – P. 53.
11. Proby zastosowania ekstraktu łubinowego do zwalczania szkodników roślin uprawnych / D. Waligora [et al.] // *Materiały XXIX Ses. nauk Roln./ Inst. ochrony roślin*. 1990. – S. 9.
12. Mironova, T. Possibilities of non-traditional using of alkaloidness in the breeding of narrow-leaved lupine // *10th Int. Lupin Conference 19-24 June 2002 Laugarvatn, Iceland*. 2002. – P. 110.
13. Kahnt, G. Use of Lupinex to increase crop yield and improve harvest quality with lesser nitrogen fertilization / G. Kahnt, I.A. Hijazi // *J. Agron. Crop Sci*. – 1991. – V. 166.– P. 228–230.
14. Gwojdzinski, W. Ekstrakt z nasion lubinu gorzkiego czynnikiem ograniczajacym kumulacje azotanow przez korzenie marchwi/ W. Gwojdzinski, K. Gulewicz, K. Nowak // *Lubin: kierunki badan i perspektywy uzytkowe*. – Poznan, 1996. – S. 254–265.
15. de Pinto, M.C. Superoxide anion scavenger properties of sparteine, a quinolizidine alkaloid from *Lupinus*/ M.C. de Pinto, A. Ros Barselo. // *J. Plant Physiol*. – 1997. – V. 150, № 1–2. – P. 5–8.
16. Gross, R. Degradation of sparteine in soil/ R. Gross, M. Wink. // *Lupin Nslett*. – 1986 – № 9. – P. 15–18.
17. Santana, F.C.M. Isolation of lupanine metabolizing bacterial strains and application to the embittering of *Lupinus albus* extracts/ F.C.M. Santana, J. Sa-Correia, I.A. Empis. / *Proceedings of the 7 th International Lupin Conference*. Portugal. – 1993. – P. 506–511.
18. Erdemoglu, N. Alkaloid profile and antimicrobial activity of *Lupinus angustifolius* L. alkaloid extract / N. Erdemoglu, S. Ozkan, F. Tosun // *Phytochem. Rev*. – 2007. – V. 6. – P. 197–201.
19. Методические рекомендации по использованию бобовых культур в кормлении сельскохозяйственных животных / В.М. Голушко, [и др.]. – Минск, 2003. – 26 с.
20. Verfahren zur Gewinnung der Lupinen-Alkaloide: Deutsches Patent. P 44 186 18.5 / Oeh, R., K. Rieblinger, M. Wink, Заявитель и патентообладатель Fraunhofer – Gesellschaft zur Foerderung der angewandten Forschung E.V.,

80636, Muenchen, DE. – № WO 95/32968 art 158 des EPU. – Anmeldetag 27.5.1994. – Bundesdruckerei 06.95 508 134/251. – P. 33–36.

21. Novel Potential phase Transfer Catalysts Based on Lupinine / E.V Dehmlow [et al.] // J. Prakt. Chem. – 1998 – V. 340 – P. 572–575.

22. Мироненко, А.В. Биохимия люпинов / А.В Мироненко. Мн.: Наука и техника, 1975. – 312 с.

23. Wink, M. Quinolizidine alkaloids as nitrogen source for lupine seedlings and cell cultures / Wink, M., L. Witte// Z. Naturforsch. – 1985. – V. 40, № 11-12 – P. 767–775.

Дата поступления статьи 27 октября 2008 г.

Н.П. Максимова, Е.А. Храмцова, И.Н. Феклистова, Ю.М. Кулешова, С.С. Жардецкий, Е.Г. Веремеенко

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS*

Белорусский государственный университет, биологический ф-т
Республика Беларусь, 220030, Минск, пр. Независимости, 4

Введение

Одной из важнейших задач современной биотехнологии является создание высокопродуктивных форм микроорганизмов, способных синтезировать биологически активные соединения (антибиотики, фитогормоны, витамины, ферменты и др.). Особенно перспективными в этом плане являются бактерии рода *Pseudomonas*, обладающие природной способностью синтезировать свыше 300 наименований различных антимикробных соединений, подавляющих развитие возбудителей заболеваний сельскохозяйственных растений; фитогормоны – индоллил-3-уксусную кислоту (ИУК), гиббереллины, цитокинины, этилен,

аммиак и др. а также ряд соединений, стимулирующих иммунитет и повышающих их устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды. За последние два десятилетия в этом направлении достигнуты значительные успехи, обусловленные как совершенствованием традиционных методов селекции, так и новых современных подходов.

Целью работы являлась разработка генетических и генно-инженерных подходов получения штаммов-продуцентов биологически активных соединений – фитогормонов, антибиотиков и пигментов на основе ризосферных бактерий рода *Pseudomonas*.

Материалы и методы

Объекты исследований – штаммы бактерий *P. aurantiaca* В-162, *P. mendocina* В-1299, *P. putida* КМБУ 4308 дикого типа и их регуляторные мутанты, а также штаммы *E. coli* DH 5 α , *E. coli* TG-1 trpB28, *E. coli* S17/1 (pro⁻; thi⁻) pUT(Ap^R):: miniTn5(Sm^R) и *E. coli* S17/1(pro⁻; thi⁻) pUT(Ap^R):: miniTn5(Km^R), фитопатогенные бактерии и грибы различных родов и видов, векторные плазмиды pUC18, pAYC31, pXcmKn12 и др. Бактерии выращивали в жидкой минимальной среде М9, а также среде Канада, освобожденной от ионов железа [1] и питательном бульоне на круговой качалке (180-200 об/мин); при необходимости культивирование бактерий осуществляли на агаризованных средах различного состава. Температура выращивания – 28°-37°С, время – 24-96 ч в зависимости от используемых штаммов и целей эксперимента.

Для выделения феназиновых антибиотиков и пирролнитрина бактерии выращивали в среде, предложенной Levitch, Stadtman и van Pee [2, 3], для выделения ИУК – в среде РС [4]. В качестве источника углерода и энергии при культивировании микроорганизмов использовали глюкозу (0,2 %) или сукцинат Na (0,4 %). Центрифугирование культуральной жидкости (КЖ) осуществляли при 5000 об/мин в течение 15 мин. Концентрацию бактерий в среде культивирования определяли по калибровочной кривой известным методом [5], клеточный экстракт получали путем обработки суспензии клеток ультразвуком (30 кHz, 3 раза по 15 с).

Выделение хромосомной ДНК и электрофорез в агарозном геле проводили согласно стандартным методикам [6]. Подбор праймеров для полимеразной цепной реакции осуществ-

вляли с использованием базы данных Basic Local Alignment Search Tool.

Мутанты получали путем обработки бактерий N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином в концентрации 200 мкг/мл, либо с помощью транспозонного мутагенеза по известной методике [7]. Для определения активности 3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфат-синтазы (ДАГФ-синтазы), фосфоенолпируват-синтазы (ФЕП-синтазы), трансальдолазы и антранилат-синтазы использовали методы [8, 9 и др.]. Выделение фенозинов осуществляли согласно [10], пирролнитрина – [11], а их иден-

тификацию с помощью жидкостного хроматографа с масс-спектрометрическим детектором LCMS-QP8000α («Shimadzu» Japan). Выделение и очистку пиовердина, а также определение его концентрации в растворе проводили по методике, описанной ранее [1]. Выделение N-ацил-гомосерин лактона, его идентификацию и количественный анализ осуществляли по известным методом [12].

Антимикробную активность бактерий изучали стандартным методом [13]. Статистическую обработку данных проводили с использованием Microsoft Excel для Microsoft Office 2000.

Результаты и обсуждение

Создание продуцентов индолил-3-уксусной кислоты на основе ризосферных бактерий *P. mendocina*

В ходе изучения пути синтеза индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) и механизмов ее регуляции у ризосферных бактерий *P. mendocina* ВКМВ1299 установлено, что синтез ауксина у данных бактерий осуществляется с участием ИПВК-пути (через индол-3-пировиноградную кислоту), в котором задействовано три фермента – триптофан-аминотрансфераза, индолпируват-декарбоксилаза и индолацетальдегид-дегидрогеназа [14]. Показано, что регуляция шикиматного пути у изучаемых бактерий осуществляется на уровне 3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфат-синтазы (ДАГФ-синтазы) с помощью ретроингибирования двумя аминокислотами – тирозином и триптофаном. Репрессия синтеза данного фермента у изучаемых бактерий не зарегистрирована. Синтез триптофана контролируется с помощью репрессии *trpE*-, *trpD*- и *trpC*-генов триптофаном, а также пу-

тем ретроингибирования антранилат-синтазы триптофаном. Синтез двух ферментов – индолпируват-декарбоксилазы и триптофан-аминотрансферазы индуцируется триптофаном, синтез последнего фермента, кроме того, репрессируется антранилатом.

С помощью НГ-мутагенеза и последующей селекции клонов на устойчивость к токсическому аналогу триптофана – 5-фтор-DL-триптофану получены регуляторные мутанты, способные к сверхсинтезу ИУК. Продукция гормона у одного из полученных мутантов (штамм 9-40) оказалась в 10 раз выше, чем у исходного штамма [15]. Сверхсинтез ИУК коррелировал с повышенным уровнем синтеза ключевых ферментов ароматического пути – ДАГФ-синтазы и триптофан-синтазы в 2 раза, триптофан-аминотрансферазы и индолилпируват-декарбоксилазы – примерно в 8 раз (Табл. 1). Кроме того, при обработке растений препаратом мутантных бактерий *P. mendocina* 9-40 в экспериментах *in vitro* наблюдалась значительная стимуляция их роста (Рис. 1).

Таблица 1

Активность ферментов пути синтеза ИУК у бактерий дикого типа *P. mendocina* ВКМВ1299 и регуляторного мутанта 9-40

Ферменты	Удельная активность (нмоль/мин · мг белка)	
	Дикий тип	Мутант 9-40
ДАГФ-синтаза	7,1	14,5
Антранилат-синтаза	1,0	2,2
Триптофан-аминотрансфераза	3,0	25,0
Индолилпируват-декарбоксилаза	8,6	700

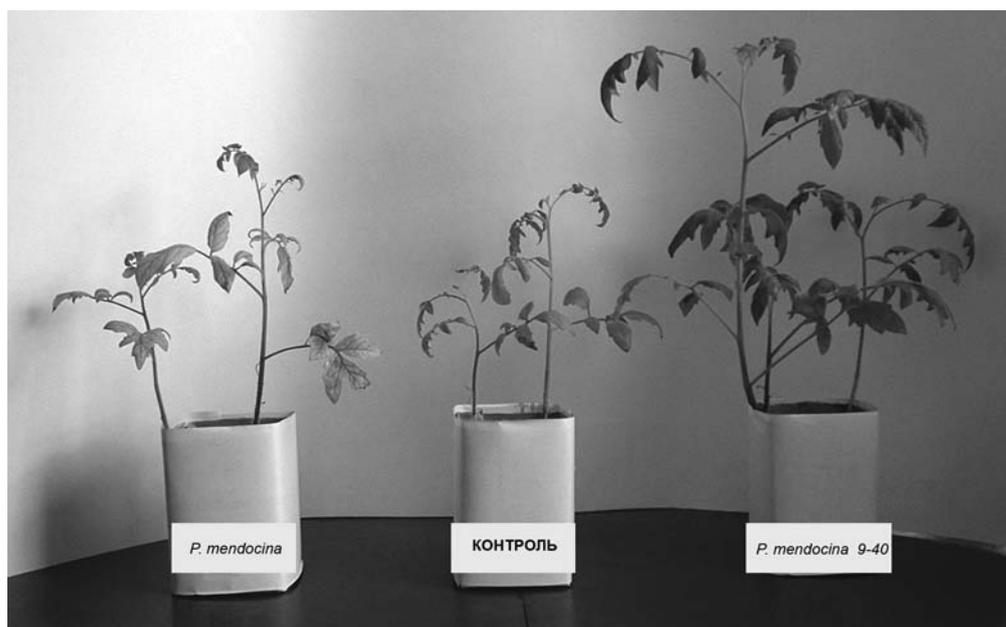


Рис. 1. Стимуляция роста растений томата под действием препарата мутантных бактерий *P. mendocina* 9-40.

С целью создания генно-инженерного штамма-продуцента ИУК на основе бактерий *P. mendocina* было осуществлено клонирование *ipdc*-гена (кодирует синтез фермента индолилпируват-декарбоксилазы) с использованием векторов pUC18 и pXcmKn12 в клетках *E. coli* DH5 α . В результате, была получена гибридная плазмида pTVN4 (4,5 т.п.н.) со вставкой *ipdc*-гена, размер которого – 1,7 т.п.н. [16]. Наличие вставки *ipdc*-гена было доказано с помощью повторной ПЦР, способности синтезировать ИУК рекомбинантными бактериями *E. coli*, а также по наличию в их клетках ИПВК-декарбоксилазной активности. Осуществлено секвенирование *ipdc*-гена и установлен его точный размер – 1 764 п.н. Проведено переклонирование *ipdc*-гена в вектор pAYC31 с целью изучения его экспрессии в клетках *P. mendocina*. Сконструирована плазмида pAYSCD1.7, стабильно наследующаяся в бактериях *P. mendocina*. Наличие в их клетках рекомбинантной плазмиды со встроенным *ipdc*-геном обеспечивает повышенный уровень синтеза ИПВК-декарбоксилазы (в 5,3

раза) и ауксина, соответственно. Таким образом, регуляторный мутант *P. mendocina* 9-40 и рекомбинантный штамм, клетки которого несут плазмиду pAYC1.7, включающую *ipdc*-ген, могут быть рекомендованы для создания новых биопрепаратов биостимулирующего роста растений действия.

Создание продуцентов антибиотиков ароматической природы на основе ризосферных бактерий *P. aurantiaca*

Анализ ризосферных бактерий рода *Pseudomonas* на предмет высокой антимикробной активности и наличия в их геноме генов, контролирующей синтез антибиотиков пирролнитрина, феназинов, 2,4-диацетилфлороглюцинола и пиолотеорина позволил отобрать штамм *P. aurantiaca* В-162, пригодный для использования в биотехнологических целях.

Масс-спектрометрический анализ феназинового комплекса, синтезируемого бактериями *P. aurantiaca* В-162 показал, что он включает феназин, 1-оксифеназин и феназин-1,6-дикарбоксилат (Рис. 2, Рис. 3) [17, 18].

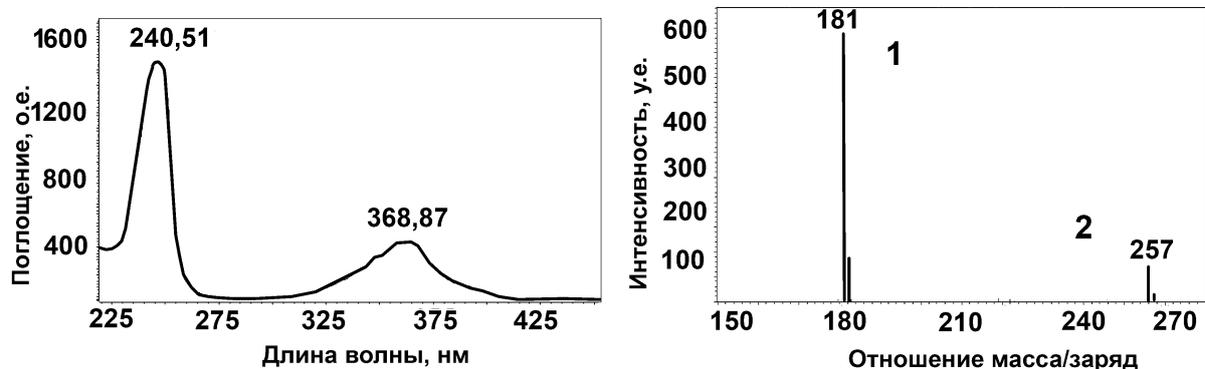


Рис. 2. Спектр поглощения (А) и масс-спектр (Б) феназина и феназин-1,6-дикарбоксилата: 1 – феназин, 2 – феназин-1,6-дикарбоксилат.

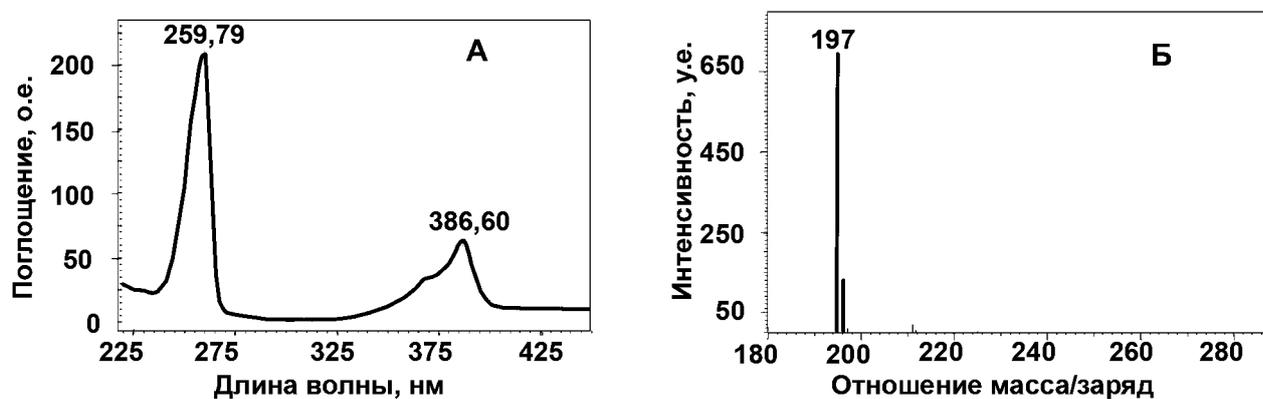


Рис. 3. Спектр поглощения (А) и масс-спектр (Б) 1-оксифеназина.

Установлено, что исследуемые бактерии являются природными продуцентами феназинов, уровень продукции которых составляет в оптимизированных условиях 71-76 мг/л, что превышает таковой у известных бактерий

Pseudomobas. Масс-спектрометрический анализ позволил выявить у бактерий *P. aurantiaca* В-162 антибиотик пирролнитрин (Рис. 4), уровень продукции которого соответствует 5,6 мг/л.

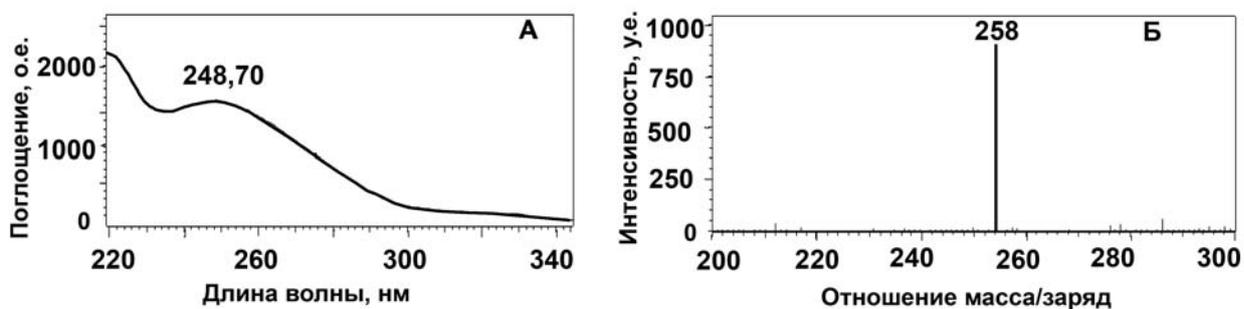


Рис. 4. Спектр поглощения (А) и масс-спектр (Б) пирролнитрина.

Наибольшая антимикробная активность пирролнитрина проявляется в отношении фи-

топатогенных грибов *A. alternata* и *F. culmorum* (фунгицидная доза составляет 2,5-3,5 мкг/мл),

тогда как бактерицидная доза в отношении фитопатогенных бактерий *Pseudomonas* и *Erwinia* в 3,5 раза выше (7,5-12,5 мкг/мл).

Исследование механизмов синтеза феназиновых антибиотиков у бактерий *P. aurantiaca* В-162 осуществляли на уровне ключевых ферментов шикиматного пути – ДАГФ-синтазы, фосфоенопируват-синтазы (ФЕП-синтазы), трансальдолазы, а также антранилат-синтазы – основного фермента пути синтеза триптофана – предшественника пирролнитрина. Установлено, что ДАГФ-синтаза изучаемых бактерий представлена двумя изоферментами (ДАГФ-синтазой [phe] и ДАГФ-синтазой [tyr]), которые подвержены ретроингибированию фенилаланином и тирозином. Кроме того, активность ДАГФ-синтазы ингибируется феназином, действие которого носит бесконкурентный характер, и стимулируется ионами металлов, наиболее активными среди которых являются ионы Co^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{2+} . Синтез ДАГФ-синтазы у бактерий *P. aurantiaca* В-162 осуществляется конститутивно [20]. На активность ФЕП-синтазы оказывают стимулирующее действие ионы Mg^{2+} , Fe^{2+} и Co^{2+} , в то время как трансальдолаза с помощью ионов металлов не регулируется. Антранилат-синтаза подвержена ретроингибированию триптофаном, что характерно для всех представителей рода *Pseudomonas*. Кроме того, установлено, что синтез антибиотиков феназинового ряда у бактерий *P. aurantiaca* В-162 контролируется QS-системой с участием позитивного регулятора метаболизма N-гексаноил-гомосерин лактона [21].

Впервые с помощью химического мутагенеза и последующей селекции на устойчивость к токсическим аналогам метаболитов ароматического пути (азасерину, *m*-фтор-DL-фенилаланину и 6-диазо-5-оксо-L-норлейцину) получены мутанты *P. aurantiaca* В-162 – продуценты антибиотиков феназинового ряда, уровень синтеза которых у отдельных штаммов (а именно, мутанта В-162/498 и В-162/55 достиг 205 мг/л, что в 3 раза, выше, чем у бактерий дикого типа). В ходе дальнейшего мутагенеза получен штамм В-162/255, устойчивый к более высоким концентрациям *m*-фтор-DL-фенилаланина, уровень продукции феназинов у которого достиг 420-450 мг/л, что в 5,6 раза выше, чем у бактерий дикого типа и почти в

17 раз – чем у ранее описанных продуцентов *P. fluorescens* и *P. chlororaphis*. Установлено, что в основе сверхсинтеза феназиновых антибиотиков у мутантных штаммов лежит дерегуляция ДАГФ-синтазы (снятие ингибирования фенилаланином, тирозином и феназином), либо сверхсинтез N-гексаноил-гомосерин лактона (в 2 и 2,3 раза выше для мутантов В-162/298 и В-162/255, соответственно, чем у исходного штамма) [19, 22].

Показано, что бактерии *P. aurantiaca* обладают антимикробной активностью в отношении широкого спектра фитопатогенных микроорганизмов – бактерий (*E. aroideae*; *E. carotovora*; *P. atrofaciens*; *P. glycinea*; *P. lachrymans*; *P. lupini*; *P. pisi*; *P. syringae*; *P. viciae*; *P. xanthochlora*) и грибов (*A. alternata*; *A. brassicicola* *A. infectoria* *A. ternnuisima*, *Ascochyta* sp.; *B. cinerea*; *F. avenaceum*; *F. culmorum*; *F. culmorum*; *F. culmorum*; *F. oxysporum*; *F. oxysporum*; *F. sambucinum*; *F. emitectum*; 13 – *S. sclerotiorum*, 14 – *P. infestans*; 15 – *P. infestans*) [23]. На примере мутантных бактерий *P. aurantiaca* В-162/498 продемонстрирована антифунгальная активность в системе *in planta*, что проявлялось в подавлении развития инфекций, вызванных *B. cinerea*, *Ascochyta* sp., *F. avenaceum* и *F. semitectum*, а также снятию неспецифического фитотоксического действия этих организмов в отношении исследуемых культур растений (огурцы и пшеница).

В условиях производственного эксперимента показано, что 4-х кратная обработка растений огурца культурой клеток мутантного штамма *P. aurantiaca* В-162/498 привела к увеличению их высоты на 50 % по сравнению с контрольной группой [24]. Показано, что ростостимулирующая активность бактерии *P. aurantiaca* связана с синтезом фитогормона гиббереллиновой кислоты [25].

Создание продуцентов флуоресцирующего пигмента пиовердина *Pm* на основе ризосферных бактерий *P. putida*

Известно, что ризосферные бактерии рода *Pseudomonas* способны синтезировать водорастворимые желто-зеленые флуоресцирующие пигменты – пиовердины, выполняющие функции сидерофоров. Молекулы пиовердинов состоят из трех структурно-функциональных элементов, представленных

хромофором (диоксихинолиновым ядром), дикарбоновой кислотой (или ее амидом) и пептидной цепью. В состав диоксихинолинового ядра входит катехольная структура, две реакционно-активные ОН-группы которой находятся в С8- и С9-положении. Две других ОН-группы принадлежат гидроксированному производному N^δ-оксиорнитина и N-оксиаспарагиновой кислоты, находящихся в пептидной части молекулы пигмента. Перечисленные группы обеспечивают высокую хелатирующую активность пиовердинов. В этом плане представлялось интересным изучить физико-химические свойства пиовердина Р_м, синтезируемого ризосферными бактериями *P. putida* КМБУ 4308, в том числе его антиоксидантную активность.

Анализ молекулярного строения пигмента позволил установить, что в его состав, помимо ароматического (диоксихинолинового) ядра, входит пептид, включающий пять различных аминокислот: треонин, серин, лизин, аспарагиновую кислоту и N^σ-оксиорнитин в молярном соотношении 3:2:1:1:1. Исследование физико-химических свойств пиовердина Р_м показало высокую степень средства пигмента не только к Fe³⁺-ионам, а

также ионам тяжелых металлов – Zn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Sn²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, W⁶⁺ и Mo⁶⁺. Хелатирующая Fe³⁺-ионы активность пиовердина Р_м обеспечивает бактериям *P. putida* антимикробную активность в отношении широкого спектра про- и эукариотических микроорганизмов [26].

Использование методики перекисного восстановления в системе ПНТХ (ПНТБ)-рибофлавин позволило впервые зарегистрировать наличие антиоксидантной активности у пиовердина Р_м. При этом уровень антирадикальной активности пигмента оказался достаточно высоким и сравнимым с таковым для известных органических антиоксидантов природного происхождения. В частности, 50 %-ое ингибирование свободнорадикальных процессов в присутствии пиовердина Р_м наблюдалось при его концентрации 25 мкг/мл, а максимальный уровень (около 90 %) – при 90 мкг/мл, что сопоставимо с действием меланина и других полифенолов (Табл. 2) [27].

Полученные результаты открывают перспективы для использования пиовердина Р_м в качестве антирадикального агента и разработке на его основе антиоксидантных препаратов нового поколения.

Таблица 2

Сравнительная характеристика активности антирадикальных препаратов природного происхождения

Соединение	Антирадикальная активность I50 мкМ/л	Цитотоксическое действие (IC50 мкМ/л*)
Пиовердин Р _м	20,6 + 3,5	2010 + 9,3
Кверцетин	35,7 + 1,6	64,1 + 5,1
Морин	52 + 2	454,2 + 14,2
Рутин	31,5 + 2,5	>1280

Примечание. Цитотоксичность по отношению к культуре клеток линии К562 эритробластного криза хронического миелоидного лейкоза человека.

С использованием НГ и транспозонного (Tn5) мутагенеза получены мутанты F14, F17, F18, F19 *P. putida*, характеризующиеся повышенной в 1,6-2,5 раза по сравнению с бактериями дикого типа продукцией пио-

вердина Р_м (Табл. 3) и обладающие высокой антимикробной активностью. Особенностью полученных мутантов является способность к синтезу пигмента в присутствии ионов железа [5].

Таблица 3

Продукция пиовердина P_m мутантными штаммами *P. putida*

Уровень синтеза пиовердина P _m при оптимальных условиях			
Штамм	Количество пиовердина мкг/мл	Количество клеток ×10 ⁹ /мл	Удельная продукция пиовердина мкг×10 ⁻⁹ /КОЕ
Дикий тип	752	2,77	271,48
M 8	1220	1,92	635,42
F14	900	1,79	502,79
F17	800	1,81	441,99
F18	930	2,04	455,88
F19	938	1,75	536,00

Исследование антагонистической активности бактерий *P. putida* КМБУ 4308 показало высокую антимикробную (подавляет рост более 95,9 % культур) активность изучаемых бактерий. Не менее интересным свойством бактерий *P. putida* КМБУ 4308 оказался их фитостимулирующий эффект, связанный, вероятно, с антиоксидантной активностью пигмента. Стимулирующее действие изучаемых бактерий зарегистрировано в отношении 24 сельскохозяйственных культур. На уровне проростков увеличение основных показателей роста возрастало в 2–4 раза. Полученные

данные аргументировали вывод, что штамм *P. putida* КМБУ 4308 является перспективным объектом агробιοтехнологии и может быть использован для создания на его основе биопрепарата широкого спектра противомикробного действия, обладающего одновременно антиоксидантной активностью, а также способностью стимулировать рост растений. Особенно перспективным оказалось применение препаративной формы бактерий *P. putida* КМБУ 4308 для борьбы с галловой нематодой (эффективность подавления инфекции на культуре огурцов [28]).

Заключение

Таким образом, на основе ризосферных бактерий *Pseudomonas* осуществлено конструирование штаммов-продуцентов биологически активных веществ – индоллил-3-уксусной кислоты (на основе штамма *P. mendocina*), антибиотиков феназинового ряда (на основе *P. aurantiaca*) и флуоресцирующего пигмента пиовердина (на основе *P. putida*). Показано, что уровень синтеза

ИУК возрос в 10 раз (по сравнению с исходным штаммом дикоого типа), феназиновых антибиотиков – в 6 раз, пиовердина – в 2,5 раза. Изучены механизмы, лежащие в основе повышения продуктивности штаммов, дана оценка их биологической активности. Рассмотрены возможные подходы к практическому использованию штаммов-продуцентов.

Список литературы

1. Кулешова, Ю.М Идентификация и характеристика пиовердина P_m – нового антирадикального соединения, синтезируемого бактериями *Pseudomonas putida* КМБУ4308 / Ю.М Кулешова, Н.П. Максимова, О.В. Блажевич, И.В. Семак // Труды Белорусс. Гос. ун-та. – 2006. – Выпуск 1. С. 89–97.

2. Levitch, M.E. Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in phenazine-producing strains / M.E. Levitch // J. Bacteriol. – 1970. – Vol. 103, № 1. – P. 16–19.

3. van Pée, K.H. The biosynthesis of brominated pyrrolnitrin derivatives by *Pseudomonas aureofaciens* / K.H. van Pée, O. Salcher, P. Fischer, M. Bokel, F. Lingens // J. Antibiot. (Tokyo). – 1983. – Vol. 36, № 12. – P. 1735–1742.

4. Dubeikovsky, F.N. Growth promotion of blackcurrant softwood cutting by recombinant strain *Pseudomonas fluorescens* BSP53a synthesizing an increased amount of indolil-3-acetic acid / F.N. Dubeikovsky, E.A. Mordukhova, V.V. Kochetkov [et al.] // Soil Biol. Biochem. – 1993. – Vol. 25. – P. 1277–1281.

5. Кулешова, Ю.М. Получение бактерий *Pseudomonas putida* КМБУ4308, способных к сверхпродукции пигмента пиовердина Pm / Ю.М. Кулешова, Н.П. Максимова, М.В. Камаева // Вестн. Белорус. ун-та. – Сер. 2: Химия. Биология. География. – 2006. – № 2. – С. 48–52.
6. Sambrook, J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual / J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis // Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Publications, NY. – 1989. – 468 p.
7. De Lorenzo, V. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria / V. De Lorenzo, M. Herrero, U. Jakubzik, K. Timmis // J. Bacteriology. – 1990. – Vol. 172, № 11. – P. 6568–6572.
8. Jensen, R.A., Nester E.W. The regulatory significance of intermediary metabolites: control of aromatic acid biosynthesis by feedback inhibition in *Bacillus subtilis* / R.A. Jensen, E.W. Nester // J. Mol. Biol. – 1965. – Vol. 12, № 2. – P. 468–481.
9. Ito, J. Regulation of the enzymes of the tryptophan pathway in *Escherichia coli* / J. Ito, I.P. Crawford // Genetics. – 1965. – Vol. 52, № 6. – P. 1303–1316.
10. Levitch, M.E. Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in phenazine-producing strains of *Pseudomonas* / M.E. Levitch // J. Bacteriol. – 1970. – Vol. – 103, № 1. – P. 16–19.
11. Burkhead, K.D. Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds of potatoes / K.D. Burkhead, D.A. Schisler, P.J. Slininger // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – Vol. 60, № 6. – P. 2031–2039.
12. McClean, K.H. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones / K.H. McClean, M.K. Winson, L. Fish et al. // Microbiology. – 1997. – Vol. 143, № 12. – P. 3703–3711.
13. Основы учения об антибиотиках: [Учеб. пособие для биол. спец. ун-тов] / Н. С. Егоров, 455 с. ил. 22 см, 3-е изд., перераб. и доп. М. Высш. школа 1979.
14. Храмцова, Е.А. Синтез индол-3-уксусной кислоты ризосферными бактериями *Pseudomonas mendocina* / Е.А. Храмцова, С.С. Жардецкий, Л.Е. Садовская, Н.П. Максимова // Научные труды Молекулярная и прикладная генетика. – Минск: Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси. – Минск, 2006. – Т. 3. – С.146–153.
15. Храмцова, Е.А. Синтез индол-3-уксусной кислоты ризосферными бактериями *Pseudomonas mendocina*. Характеристика регуляторных мутантов / Е.А. Храмцова, С.С. Жардецкий, Н.П. Максимова // Вестн. Белорус. Гос. Ун-та. Серия 2. Химия. Биология. География. – 2006. – № 2. – С 69–73.
16. Жардецкий, С.С. Клонирование гена синтеза ИУК бактерий *P. mendocina*, способных стимулировать рост растений / С.С. Жардецкий, Е.А. Храмцова, Н.П. Максимова // Сб. тезисов докладов Международной школы-конференции, посвященной 100-летию со дня рождения С.И. Алиханяна, 28 ноября – 1 декабря 2006 г., Москва – Пущино. – С. 96.
17. Феклистова, И.Н. Оптимизация условий синтеза феназина бактериями *Pseudomonas aurantiaca* B-162 / И.Н. Феклистова, Н.П. Максимова // Вест. Белорус. ун-та.– Сер. 2: Химия. Биология. География.– 2005.– № 3.– С. 29–31.
18. Феклистова, И.Н. Синтез феназиновых соединений бактериями *Pseudomonas aurantiaca* B-162 / И.Н. Феклистова, Н.П. Максимова // Вест. Белорус. ун-та.– Сер. 2: Химия. Биология. География.– 2005.– № 2.– С. 66–69.
19. Feklistova, I.N. Obtaining *Pseudomonas aurantiaca* strains capable of overproduction of phenazine antibiotics / I.N. Feklistova, N.P. Maksimova // Microbiology. – 2008. – Vol. 77, № 2. – P. 176–180.
20. Феклистова, И.Н. ДАГФ-синтаза *Pseudomonas aurantiaca* B-162: регуляция активности и синтеза / И.Н. Феклистова, Н.П. Максимова // Молекул. генетика, микробиол. и вирусол. – 2005.– № 4.– С. 34–36.
21. Феклистова, И.Н., Плотностно-зависимая регуляция синтеза антибиотиков феназинового ряда бактериями *Pseudomonas aurantiaca* B-162 / И.Н. Феклистова, Н.П. Максимова // III Съезд Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (ОБР), 25-27 октября 2005 г., Москва. – С. 78.
22. Веремеенко, Е.Г. Создание и селекция штаммов *Pseudomonas aurantiaca*, способных

к сверхпродукции антибиотиков феназинового ряда / Е.Г. Веремеенко, Н.П. Максимова // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: материалы международной конференции, Минск, 2-6 июня 2008 г. / Институт микробиологии НАН Беларуси; редкол.: Э.И. Коломиец [и др.]. – Минск, 2008, С. 208–210.

23. Феклистова, И.Н. Бактерии *Pseudomonas aurantiaca* В-162 как основа биопрепарата для защиты растений / И.Н. Феклистова, Н.П. Максимова // Земляробства і ахова раслін. – 2006. – № 2. – С. 42–44.

24. Феклистова И.Н., Максимова Н.П. Стимулирующая рост растений активность ризосферных бактерий *Pseudomonas aurantiaca* / И.Н. Феклистова, Н.П. Максимова // Регуляция роста, развития и продуктивности растений: Материалы V междунар. науч. конф., Минск, 28-30 ноября 2007 г. / Нац. акад. наук Беларуси. Ин-т эксп. Ботаники им. В.Ф. Купревича. Белорусское общественное объединение физиологов растений. – Минск, 2007. – С. 206.

25. Feklistova, I.N. Increased bean (*Faseolus vulgaris*) root growth by treatment of steam cuttings with *Pseudomonas aurantiaca* КМБУ-498 strain / I.N. Feklistova // Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution: Proceedings of the III international young scientists conference, Одес-

са, 15–18 мая 2007 г. / Мин-во обр. и науки Ураины. Одесский нац. ун-т им. И.И. Мечникова. Ин-т ботаники им. М.Г. Холодного НАН Украины. – Одесса, 2007. – С. 149–150.

26. Максимова, Н.П. Биосинтез биологически активных соединений ароматической природы микроорганизмами / Н.П. Максимова, В.В. Лысак, Е.В. Доброжинская [и др.] // Выбраныя навуковыя працы Беларускага дзяржаўнага ўніверсітэта. Біялогія. Геаграфія. / Адк. рэд. І. І. Пірожнік. – Мн.: БДУ, 2001. – Т. 7. – С. 102–126.

27. Кулешова, Ю.М. Характеристика антирадикальной активности бактериального пигмента пиовердина Pm / Ю.М. Кулешова, Н.П. Максимова // Вестн. Белорус. гос. ун-та. – Сер. 2: Химия. Биология. География. – 2006. – №1. – С. 57–60.

28. Маслак, Д.В. Оценка нематитцидной активности нового фитозащитного биопрепарата нематиды, КС / Д.В. Маслак, И.В. Можарова, Д.А. Долматов, Н.П. Максимова // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: Материалы VI междунар. науч. конф., Минск, 2–6 июня 2008 г. / Нац. акад. наук Беларуси. Отд-е химии и наук о Земле. Ин-т микробиологии. БРФФИ. Бел. Общественное объединение микробиологов. ООО «Актив Био Тех». – Минск, 2008. – С. 310–312.

Дата поступления статьи 27 октября 2008 г.

ГЕНЕТИКО-ПОПУЛЯЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ И РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВРОЖДЕННЫХ ДЕФЕКТОВ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

Республика Беларусь, 220020, г.Минск, ул.Академическая, 27

²УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,

Республика Беларусь, 210026, г. Витебск, ул. 1-я Доватора 7/11

Введение

Современное развитие отрасли животноводства имеет несомненные достижения в решении продовольственной программы. Однако возникает ряд проблем, связанных, в частности, с широкомасштабным применением методов искусственного осеменения, позволяющих существенно расширить возможности селекции. Искусственное осеменение дает огромный положительный эффект, но при бесконтрольности может нанести и большой ущерб генофонду. Обмен генетическим материалом между разными странами сопровождается распространением различных заболеваний, вызываемых редкими мутациями, возникшими у выдающихся представителей коммерческих пород черно-пестрого скота [1–5].

Генные мутации, как правило, затрагивают участки ДНК, соответствующие одному гену. Молекулярный механизм генных мутаций связан с выпадением, добавкой или заменой нуклеотидов. В результате изменяется процесс экспрессии мутантного гена, обуславливающий изменения биохимических и физиологических функций организма.

Фенотипически мутация часто проявляется в форме врожденных уродств (аномалий), снижении жизнеспособности и устойчивости к болезням, нарушении воспроизводительной функции. Степень влияния мутантного гена на жизнеспособность организма животного может быть различной. Часть генных мутаций вызывает летальный исход на разных этапах

внутриутробного развития или вскоре после рождения животных.

Поэтому прогрессивное ведение селекционной работы требует новых методов оценки генотипов высокопродуктивных племенных животных. ДНК-диагностика наследственных заболеваний позволяет выявлять скрытых носителей врожденных дефектов и, тем самым, контролировать процесс распространения генетических мутаций в популяции.

Примерами таких врожденных аномалий, вызывающих заболевания крупного рогатого скота, являются:

– дефект иммунной системы или дефицит лейкоцитарной адгезии (*BLAD* – Bovine leucocyte adhesion deficiency);

– дефицит фермента уридинмонофосфат-синтазы (*DUMPS* – deficiency of uridine monophosphate synthase). Данные заболевания обусловлены точковыми мутациями, наследуемыми по аутосомно-рецессивному типу. Благодаря отсутствию фенотипических признаков заболевания у гетерозигот наблюдается очень высокая скорость распространения мутаций, что приводит к быстрому накоплению их в популяции и появлению гомозиготных, с фенотипическим проявлением болезни, животных [3–5].

Экономический ущерб в результате распространения таких мутаций приводит к необходимости строгого генетического контроля импортируемого материала.

Материалы и методы исследования

Объект исследования – быки-производители и племенное ядро селекционного стада крупного рогатого скота племенных предприятий Гомельской, Витебской и Минской областей Республики Беларусь.

Процедура диагностики включает следующие этапы: выделение ДНК; аллель-специфичная амплификация участка ДНК, несущего мутацию; идентификация генотипа с помощью горизонтального и вертикального гель-электрофорезов.

Для анализа в качестве биологических образцов использовалась кровь или сперма исследуемых животных. Выделение ДНК из крови проводили с помощью стандартных наборов (фирма Fermentas, Литва). Выделение ДНК из спермы осуществлялось методом солевой экстракции с некоторыми нашими модификациями [3]. Примерное количество выделенной ДНК составляет 2–3 мкг.

ДНК-диагностику животных по генам *BLAD* и *DUMPS* проводили с помощью метода полимеразной цепной реакции по полиморфизму длин рестриктных фрагментов ДНК (ПЦР/ПДРФ).

Для амплификации фрагмента гена *CD18* (*BLAD*) использовали праймеры [5]:

BL-1: 5' - tga gac cag gtc agg cat tgc gtt ca-3',

BL-2: 5' -ccc cca gct tct tga cgt tga cga cga ggt-3'.

ПЦР проводили в амплификаторе в конечном объеме 25 мкл в следующем режиме: «горячий старт» - 3 мин 93° С. Затем 35 циклов амплификации в режиме: 93° С – 1 мин – денатурация; 62° С – 1 мин – отжиг праймеров; 72° С – 1,5 мин – синтез. Элонгация – 5 мин при 72° С.

Длина амплифицированного фрагмента ДНК составляет 132 пн. В норме он расщепляется рестриктазой *TagI* на два фрагмента длиной 71 и 61 пн. (гомозиготный генотип *TL/TL CD18*) (Табл.1). Мутация в гене *CD18* приводит к исчезновению сайта узнавания для рестриктазы. Продукт рестрикции на электрофореграмме визуализируется одной яркой полосой длиной 132 пн (гомозиготный генотип *BL/BL CD18*). У особи с гетерозиготным генотипом *TL/BL* присутствуют два аллеля – нормальный (*TL*-аллель *CD18*) и мутантный (*BL*-аллель *CD18*), и на электрофореграмме гетерозигота *TL/BL CD18* имеет три полосы длиной 132, 71 и 61 пн (Рис. 1).

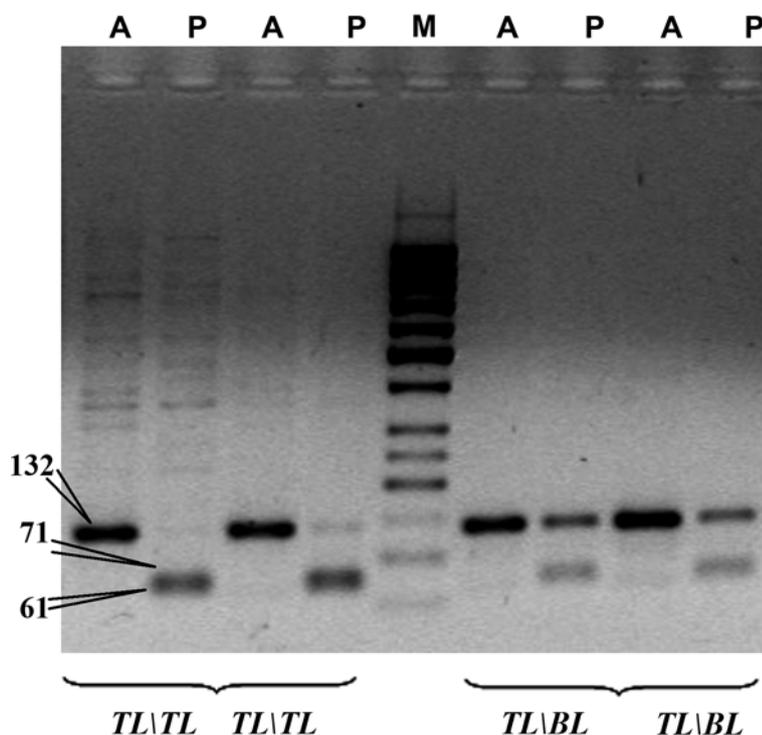


Рис. 1. Фореграмма продуктов амплификации и рестрикции в 2 % агарозном геле фрагмента гена *CD18* (*BLAD*).

Помимо «исчезновения» сайта узнавания для определенных рестриктаз, в некоторых случаях вследствие мутации, в гене может возникнуть дополнительный сайт. Молекулярной основой *BLAD* является точковая замена (аденин-гуанин) в положении 383 кДНК *CD18*,

что приводит к аминокислотной замене в молекуле белка (вместо аспарагиновой кислоты синтезируется глицин). Такая точковая мутация приводит к исчезновению сайта рестрикции для *TagI* и появлению дополнительного сайта для *HaeIII* [3,5,6] (Табл. 1).

Таблица 1

Схема определения генотипа крупного рогатого скота по точковой мутации в гене *CD18 (BLAD)* после гидролиза амплификата эндонуклеазами *TagI* и *HaeIII* по длине рестрикционных фрагментов

Генотип <i>CD18 (BLAD)</i>	Длина фрагментов после рестрикции рестриктазами (пн)	
	<i>TagI</i>	<i>HaeIII</i>
<i>TL/TL</i> (гомозиготный генотип), здоровое животное	71, 61	87, 45
<i>TL/BL</i> (гетерозиготный генотип), скрытый носитель мутантного <i>BLAD</i> -аллеля	132, 71, 61	87, 68, 45, 19
<i>BL/BL</i> (гомозиготный генотип), больное животное	132	68, 45, 19

Рестрикционный анализ амплифицированного продукта, содержащего участок с нуклеотидной заменой, позволяет различать животных с нормальным генотипом и носителей мутантного *BLAD*-аллеля.

Для ДНК-диагностики мутации гена *DUMPS* амплификацию проводили с помощью олигонуклеотидных праймеров следующего состава [7]

UMPS L 5' gcaaatggctgaagaacattctg -3'

UMPS R 5' gcttctaactgaactcctcgagt-3'

В результате амплифицируется фрагмент гена уридинмонофосфат-синтазы длиной 108 п.н. Продукт амплификации подвергся рестрикции с помощью фермента *AvaI*, разрезающей ДНК по схеме:



В амплифицируемом участке ДНК находятся два сайта узнавания для эндонуклеазы *AvaI*. Размер амплификата составляет 108 bp. В случае разрезания продукта амплификации рестриктазой на фрагменты 53, 36 и 19 bp, образец диагностируется как гомозиготный *TD/TD DUMPS*-генотип (здоровое животное). Если в результате рестрикции образуются фрагменты 89, 53, 36, 19 bp, животное диагностируется как гетерозиготный *TD/DP DUMPS*-генотип (скрытый носитель мутации) (Табл 2).

Таблица 2

Схема определения генотипа по точковой мутации в гене уридинмонофосфат-синтазы (*DUMPS*) по длине рестрикционных фрагментов

Генотип по гену <i>DUMPS</i>	Длина фрагментов после рестрикции эндонуклеазой <i>AvaI</i> (bp)
<i>TD/TD</i> (гомозиготный генотип здорового животного)	53, 36, 19
<i>TD/DP</i> (скрытый носитель мутации <i>DUMPS</i>)	89, 53, 36, 19
<i>DP/DP</i> (гомозиготный генотип больного животного)	89, 19

Оценку результатов амплификации и рестрикции проводили с помощью горизонтального (2 % агарозный гель) и вертикального (12 % акриламидный гель) электрофорезов.

Результаты и обсуждение

1. ДНК-диагностика наследственного заболевания крупного рогатого скота, обусловленного точковой мутацией в гене *CD18* (врожденный иммунодефицит)

Врожденные иммунные дефициты возникают вследствие генетически детерминированной неспособности организма животного реализовать иммунный ответ. Они, как правило, связаны с наследственно обусловленной неспособностью к полноценному иммунному ответу. В организме таких животных возникают морфологические функциональные расстройства клеточного и гуморального иммунитета на различных этапах развития популяций Т- и В-лимфоцитов, макро- и микрофагов, образования иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента [8].

BLAD – это болезнь, связанная с дефектом иммунной системы крупного рогатого скота. Молекулярной основой *BLAD* является точковая замена (аденин-гуанин) в положении 383 кДНК *CD18*, которая приводит к аминокислотной замене в молекуле белка (вместо аспарагиновой кислоты синтезируется глицин) [5-8]. В результате точковой мутации гена *CD18* нарушается вся цепочка экспрессии β -интегрина, поверхностного белка нейтрофилов (разновидность лейкоцитов) и, как результат этого, лейкоциты теряют активность и неспособны выполнять защитную фагоцитарную функцию. Нарушается процесс диапедеза, т.е. блокируется способность лейкоцитов проникать через кровеносные капилляры и двигаться с кровотоком к очагу инфекции. Эти нарушения способствуют развитию иммунодефицитного состояния животного, при котором особь погибает от любой инфекции.

Проявление иммунодефицита или *BLAD*-синдрома:

Животные с мутантным аллелем (гетерозиготный генотип *TL/BL*) – здоровые, но являются скрытыми носителями мутации.

Болезнь фенотипически проявляется только у гомозиготных по мутантному гену

особей (рецессивный гомозиготный генотип *BL/BL*).

Больные животные имеют замедленный рост, тусклую взъерошенную шерсть, язвы в ротовой полости, шаткость зубов, а из-за низкой резистентности и нарушения иммунитета телята гибнут в 2-7 месячном возрасте от инфекционных болезней (диарея, пневмония и др.) [5, 6, 8].

Впервые это заболевание, сопровождающееся большой потерей телят от инфекций, обнаружили при исследовании прямых потомков знаменитых американских быков – родоначальников голштинской породы: Осборндэйла Айвенго, Карлин М. Айвенго Белл, Пайсент Айвенго Стар. В США в 1992 г. носителями *BLAD*-синдрома было 15,6 % быков и 6 % маточного поголовья, а экономический ущерб оценен в 5 млн. долларов [5]. Интересно, что Япония буквально за 4 года (1992-1996 гг.) после проведения ДНК-диагностики иммунодефицита снизила частоту встречаемости мутации *BLAD* с 13,4 до 0,31 % [2]. В Россию и Украину *BLAD* был завезен с потомками его внука – Айвенго Белла [1,3,4]. В Беларуси развернута крупномасштабная работа по генетическому улучшению белорусской черно-пестрой породы скота. Животноводство республики интенсивно развивается, применяя методы искусственного осеменения, максимально используя при этом лучших быков голштинской породы, ввозимых из-за рубежа. Поэтому несомненно, что ситуацию по распространению мутации *BLAD* и в Беларуси следует держать под контролем.

Анализ генетической структуры популяций черно-пестрой породы крупного рогатого скота по гену *CD18* показал, что частота встречаемости мутантного аллеля *CD18^{BL}* составляет 0.03 (Табл.3). Выявлены носители мутации, несущие дефектный аллель в гетерозиготном состоянии (*TL/BL*). Процент гетерозиготных генотипов *TL/BL* гена *CD18* составил 6,61 % (Табл.3).

Таблица 3

Анализ генетической структуры популяций черно-пестрой породы крупного рогатого скота в Беларуси по гену *CD18 (BLAD)*

Принадлежность	Количество особей (n)	Частота встречаемости				
		генотипов, %			аллелей ± ошибка	
		<i>TL/TL</i>	<i>TL/BL</i>	<i>BL/BL</i>	<i>TL</i>	<i>BL</i>
РСУП «Витебск племпредприятие»	117	99,15	0,85	–	0,99±0,011	0,01±0,011
РСУП «Минское племпредприятие»	87	97,7	2,3	–	0,99±0,006	0,01±0,006
РУП «Гомельплемпредприятие»	89	97,75	2,25	–	0,99±0,011	0,01±0,011
ЗАО «Липовцы» Витебского района	120	95,84	4,16	–	0,98±0,013	0,02±0,013
СПК «Калиновый Лог» Талочинского района	20	65,0	35,0	–	0,83±0,085	0,17±0,085
ГУСП «Племзавод «Мухавец» Брестского района	80	96,25	3,75	–	0,98±0,015	0,02±0,015
РУСП «Племенной завод Красная звезда» ♀	39	97,44	2,56	–	0,99±0,018	0,01±0,018
СПК «Снов» Минское племпредприятие	206	98,05	1,95	–	0,99±0,007	0,01±0,007
среднее	758	93,39	6,61		0,97	0,03

В результате проведенных нами молекулярно-генетических исследований быков-производителей РУСП «Несвижский филиал Минского племпредприятия» выявлен один из носителей мутации *BLAD*. Это бык «Милан»

отечественной черно-пестрой породы. Прослежена родословная быка «Милана», ведущего свое происхождение от знаменитого предка Карлин М.Айвенго Белл – носителя мутации *BLAD* (Рис. 2).

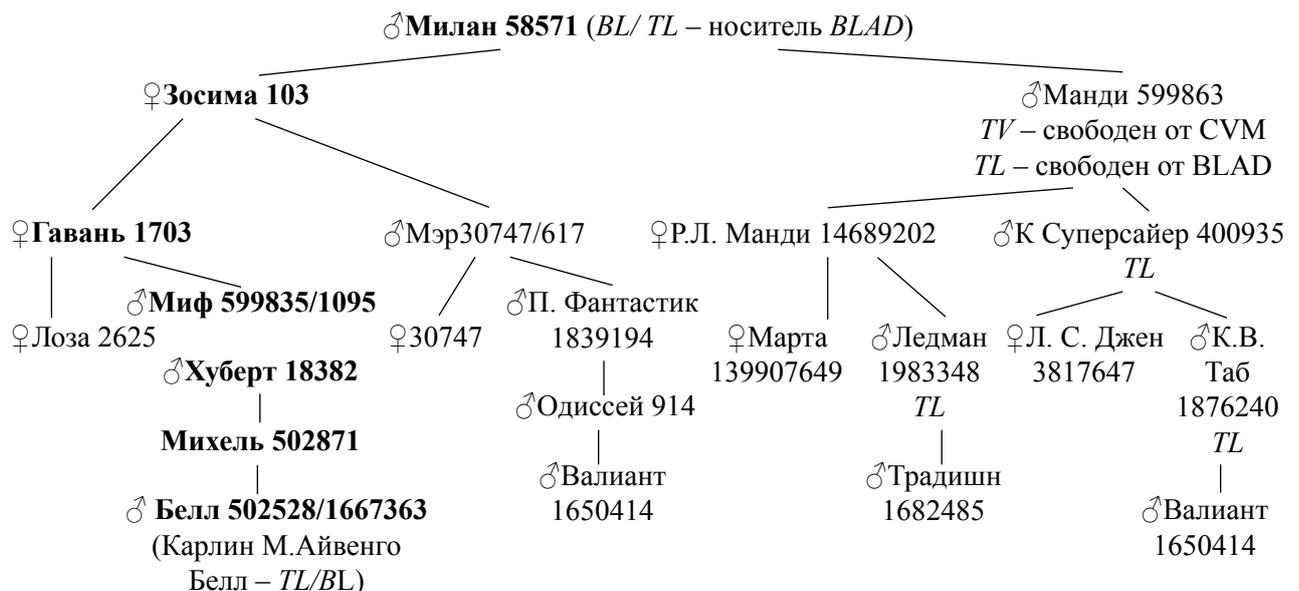


Рис. 2. Генеологическая схема передачи аллеля *BLAD* быку Милану от знаменитого американского предка Карлин М.Айвенго Белл (генотип *TL/BL*).

В Витебском племпредприятии диагностирован скрытый носитель мутации *BLAD* – бык «Ребус». Это представитель линии Монтвик Чифтейна.

В результате проведенных нами исследований было установлено, что нетель, доставленная из Венгрии и ее приплод в количестве 2-х телят, а также молодняк от быка «Ребуса» унаследовали мутацию *BLAD* в гене *CD18* (гетерозиготный генотип *TL/BL*).

При исследовании иммунологических показателей крови носителей мутации *BLAD* отклонений не установлено, что подтверждает данные о том, что фенотипически болезнь проявляется только у гомозиготных по мутантному гену особей (рецессивный гомозиготный генотип *BL/BL*).

В СПК «Калиновый Лог» из 20-ти телят, рожденных от быка «Ребуса» у 7-ми диагностировали мутацию *BLAD*. Также было установлено большое непроизводительное выбытие телят от быка «Ребуса» в раннем возрасте. Падеж телят произошел по причине врожденного иммунодефицита, обусловленного гомозиготным генотипом *BL/BL*, которые элиминированы естественным отбором. Поскольку животные с гетерозиготным генотипом *TL/BL* являются скрытыми носителями мутации, необходимо индивидуально подходить к их использованию, а именно, при подборе родительских пар исключить возможность получения рецессивных *BL/BL* – гомозигот.

Анализ генеалогической схемы линии Карлин М. Айвенго Белл показал, что современные потомки, в родословной которых присутствуют линии Лаусон, Вендег, Самуэл, должны обязательно подвергаться ДНК-диагностике на носительство мутации *BLAD*.

2. ДНК-диагностика дефицита фермента уридинмонофосфат-синтазы (*DUMPS*) крупного рогатого скота, обуславливающего раннюю abortируемость эмбрионов у крупного рогатого скота

Недостаточность уридинмонофосфатсинтазы и связанное с нею наследственное заболевание оротовая ацидоурия – описано у человека. Дефицит уридинмонофосфат-синтазы проявляется и у крупного рогатого скота (*DUMPS*). Эта аномалия была обнаружена у черно-пестрого и красно-пестрого голштинского

скота в США и Европе. Уридинмонофосфат-синтаза (*UMPS*) контролирует превращение уротата в уридинмонофосфат, который необходим для биосинтеза пиримидинов [9-10]. Работами ученых института биохимии Северной Каролины, изучавшими оротовую ацидоурию, было доказано, что заболевание обусловлено изменением в структуре белка уридинмонофосфат-синтазы [10,11].

Причиной заболевания является точковая мутация (замена цитозина на тимин), возникшая в 405 кодоне кодирующей части гена уридинмонофосфат-синтазы. Ген локализован на первой хромосоме: 1 q34-36. Мутация ведет к появлению вместо смыслового – стоп-кодона. Точка мутации обозначена как R405Stop [9]. Данная мутация нарушает цикл синтеза пиримидиновых оснований, которые являются неотъемлемым компонентом для синтеза нуклеозидфосфатов. Так как в молоке лактирующих коров, гетерозиготных по *DUMPS*, наблюдается повышенное содержание уротата, то можно предположить, что данная мутация вызывает нарушение декарбоксилазной функции [10].

Болезнь дефицита фермента уридинмонофосфат-синтазы фенотипически проявляется у рецессивных гомозигот (*DP/DP-DUMPS*). Этот генетический дефект вызывает летальность эмбрионов на ранней стадии развития. У гетерозигот на 50 % наблюдается снижение ферментной активности *UMPS* в крови и повышение содержания уротата в молоке. Выявлено, что гетерозиготные коровы имеют более длинный межотельный период [11].

В 1992 году группа ученых под руководством Шанкса исследовала потомков элитного быка Skokie Sensation Ned («Нед») – высокопродуктивного представителя голштинской породы, у которого впервые была обнаружена мутация *DUMPS*. Было установлено, что потомки «Неда» являются носителями данной мутации. [7,8].

Швенгером в 1994 г. был предложен метод обнаружения рецессивных гомозигот у эмбрионов, получаемых *in vitro* [11]. В ряде стран в родословных быков указываются результаты исследований на носительство мутации *DUMPS*.

Учеными США проведен анализ уровня фермента *UMPS* у 85-ти коров – дочерей 7-ми бы-

ков голштинской породы, у которых была обнаружена частичная недостаточность данного фермента. Активность UMPS в эритроцитах 43-х дочерей была в норме, у остальных 42-х коров она составляла половину нормы. Предполагается, что дефицит UMPS может приводить к торможению роста скота. Частота аномальных животных у голштинского скота составила 2,34 % [12]. Среди 287-ми наиболее интенсивно используемых быков в США и Европе – четыре были носителями мутации (13,14).

Начиная с конца 90-ых годов, исследования по выявлению генетических мутаций, в том числе и *DUMPS*, ведутся по всей Европе. В скрытой форме данное заболевание достаточно быстро распространяется среди животных голштинского и черно-пестрого скота, разводимых в Европе, где частота мутации достигала более 2-х процентов [11-13]. В резуль-

тате проведения молекулярно-генетических исследований, позволяющих контролировать распространение мутантных аллелей гена UMPS, численность скрытых носителей мутации снижена до 1 % [12,13]. В Европе продолжают работы по диагностике мутации *DUMPS* [8]. Кроме того, учеными активно исследуется вероятность связи дефицита фермента уридинмонофосфат-синтазы с другими заболеваниями, в частности с иммунодефицитом (BLAD), а так же с признаками молочной продуктивности скота [13-14].

Нами проведена ДНК-диагностика 428 животных, принадлежащих Витебскому и Минскому племпредприятиям на носительство мутации *DUMPS*.

Результаты исследования по выявлению носителей мутации *DUMPS* представлены в таблице 4.

Таблица 4

Генетическая структура черно-пестрой породы крупного рогатого скота по мутации *DUMPS*, детерминирующей раннюю abortируемость эмбрионов

Кол-во особей (n)	Частота встречаемости генотипов, %			Частота встречаемости аллелей	
	<i>TD/TD</i> (гомозиготный генотип – здоровое животное)	<i>TD/DP</i> (гетерозиготный генотип – скрытый носитель мутации)	<i>DP/DP</i> (гомозиготный генотип – больное животное)	<i>TD</i>	<i>DP</i>
428	98,4	1,6	0	0,99±0,005	0,01±0,005

Среди исследованных животных выявлено 1,6 % гетерозиготных генотипов, несущих мутантный аллель *DP-DUMPS*. Скрытые носители мутации выявлены у коров из различных хозяйств Беларуси. Это доказывает необходимость проведения ДНК-диагностики

дефицита фермента уридинмонофосфатсинтазы, так как мутация *DUMPS* вызывает у стельных коров гибель эмбрионов на ранних стадиях развития, что несомненно наносит прямой экономический ущерб животноводству республики.

Заключение

В результате проведенного молекулярно-генетического анализа выявлены животные – скрытые носители мутации в гене *CD18* (гетерозиготный генотип *TL/BL*) и особи – носители мутации *DUMPS* (гетерозиготный генотип *TD/DP*).

Необходимо отметить важность проведения скрининговых работ, направленных на выявление генетических дефектов. ДНК-

диагностика крупного рогатого скота по выявлению скрытых носителей иммунодефицита (*BLAD*-синдром) и дефицита фермента уридинмонофосфатсинтазы (*DUMPS*), приводящего к ранней abortируемости эмбрионов в племенном поголовье, позволит контролировать распространение данных мутаций и снизить наносимый ими существенный экономический ущерб.

В противном случае это может привести к увеличению частоты мутантных аллелей в популяции. Бесконтрольное использование племенного

поголовья крупного рогатого скота в селекционных программах представляется нам небезопасным и экономически неоправданным.

Список использованных источников

1. ДНК-технологии и биоинформатика в решении проблем биотехнологий млекопитающих / В.И. Глазко [и др.] ; Белоцерковский гос. аграрный ун-т ; под общ. ред. В.И. Глазко. Белая Церковь, 2001. – 488 с.
2. Nagata, H. Prevalence and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Holstein-Friesian cattle in Japan / H. Nagata [et al.] // J. Vet. Med. Sci. – 1997. – Vol. 59. – P. 233–238.
3. Калашникова, Л.А. ДНК-технология оценки сельскохозяйственных животных / Л.А. Калашникова, И.М. Дунин, В.И. Глазко. – Москва: ВНИИплем, 1999. – 148 с.
4. Эрнст, Л.К. Биологические проблемы животноводства в XXI веке / Эрнст Л.К., Зиновьева Н.А. – Москва: РАСХН, 2008. – 508 с.
5. Shuster, D.E. Identification and prevalence of genetic defect that causes leukocytes adhesion deficiency in Holstein cattle / D.E. Shuster [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – Vol. 89. – P. 9225–9229.
6. Norouzy, A. Identification of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) carriers in Holstein and brown Swiss bulls in Iran / A. Norouzy [et al.] // Генетика – 2005. – том. 41, № 12. С. 1697–1701.
7. Nagahata, H. Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD): A Review / H. Nagahata // Journal of Veterinary Medical Science. – 2004. – Vol. 66, № 12. – P. 1475–14.
8. Bernadina, W.E. Leukocyte adhesion deficiency in a Dutch Holstein calf: a case with clear-cut family history/ Bernadina, W.E. [et al.] // Vet Immunol Immunopathol. – 1993. Vol. 37. – P. 295–308.
9. Robinson, J. Consequences of UMP synthase deficiency in cattle // J. Robinson // Proc. Natl. Acad. Sci. USA Applied biology. – 1983. – Vol. 80. – P. 321–323.
10. Shanks, R.D. Relationship between genetic merit of Holstein bulls and deficiency of uridine-5'-monophosphate synthase / R.D. Shanks [et al.] // J Dairy Sci. – 1992. – Vol. 75, № 7. – P. 2023–2029.
11. Schwenger, B. DUMPS cattle carry a point mutation in the uridine monophosphate synthase gene/ B. Schwenger [et al.] // Genomics. – 1993. – Vol. 16. – P. 241–244.
12. Kaminski, S. No incidence of DUMPS carriers in Polish dairy cattle. / S. Kaminski [et al.] // J. Appl Genet. – 2005. – Vol. 46, № 4. – P. 395–397.
13. Rahimi, G. Genotyping BLAD, DUMPS and kappa -CSN loci in Holstein young bulls of the National Animal Breeding Center of Iran. Pakistan / G. Rahimi [et al.] // Journal-of-Biological-Sciences. – 2006. – Vol. 9, № 7. – P. 1389–1392.
14. Ghanem, M.E. Deficiency of uridine monophosphate synthase (DUMPS) and X-chromosome deletion in fetal mummification in cattle / M.E. Ghanem [et al.] // Animal-reproduction-science. – 2006. – Jan; Vol. 91, № 1–2. – P. 45–54.

Дата поступления статьи 4 декабря 2008 г.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ МАРКИРОВАНИЕ ПРИЗНАКОВ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

Республика Беларусь, 220020, г. Минск, ул. Академическая, 27

²УО «Белорусский государственный аграрный технический университет»

Введение

Достижения науки и разработка новых методов молекулярно-генетического анализа предоставили практическую возможность использования ДНК-маркеров в селекции племенных животных, что предполагает возможность определения их генетического потенциала. Генотипирование животных с помощью ДНК-маркеров позволяет найти корреляции между аллельными вариантами генов и хозяйственно-полезными признаками и целенаправленно вести селекцию на выявление и закрепление в популяции ценных аллелей [1-3].

Применение ДНК-маркеров для ускорения решения селекционных задач получило на-

звание «селекция с помощью маркеров или маркер-сопутствующая селекция (MAS – marker assisted selection)». ДНК – маркеры – это аллельные варианты генов, напрямую или косвенно связанные с продуктивными и адаптационными признаками животных, с устойчивостью или восприимчивостью к заболеваниям. Выявление предпочтительных с точки зрения селекции вариантов таких генов позволяет дополнительно к традиционному отбору животных, например, по содержанию жира в молоке, уровню удоя, проводить оценку особей по генотипу.

Материалы и методы исследования

Для анализа в качестве биологических образцов использовалась кровь или сперма исследуемых животных. ДНК выделяли из крови животного фенольно-хлороформовым методом и в дальнейшем анализировали с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим рестриктным анализом ампликонов по полиморфизму длин рестриктных фрагментов (ПДРФ) [1]. Выделение ДНК из спермы осуществлялось методом солевой экстракции с некоторыми нашими модификациями [3]. Примерное количество выделенной ДНК составляет 2-3 мкг. Полимеразная цепная реакция проводилась в амплификаторе «Vimeta T-cycler».

Для амплификации фрагмента гена гормона роста *GH* использовали следующие праймеры [4]:

G-GH S: 5` ttc ggc ctc tct gtc tct ccc t-3`;

G-GH R: 5`-agg cgg cgg cac ttc atg ac-3`.

Длина амплифицированного фрагмента составляет 208 пн. Рестрикция проводилась с использованием рестриктазы *AluI*. Продукты рестрикции разделяли в 2 % агарозном геле. Результаты генотипирования представлены на электрофореграмме (Рис. 1а).

Для ДНК-типирования полиморфных вариантов гена *Pit-1* использовали праймеры следующего состава [5]:

Pit-1 S: 5`-aaa cca tca tct ccc ttc tt-3`;

Pit-1 R: 5`-aat gta caa tgt gcc ttc tga g-3`.

Рестрикция проводилась с помощью рестриктазы *HinfI*. Результаты генотипирования представлены на рисунке 1б. Наличие на электрофореграмме двух полос размером 244 и 207 пн. соответствует генотипу ВВ-*Pit-1*; трех полос размером 451, 244 и 207 пн. – генотипу АВ-*Pit-1* и одной полосы размером 451 пн. – генотипу АА-*Pit-1* (Рис. 1б).

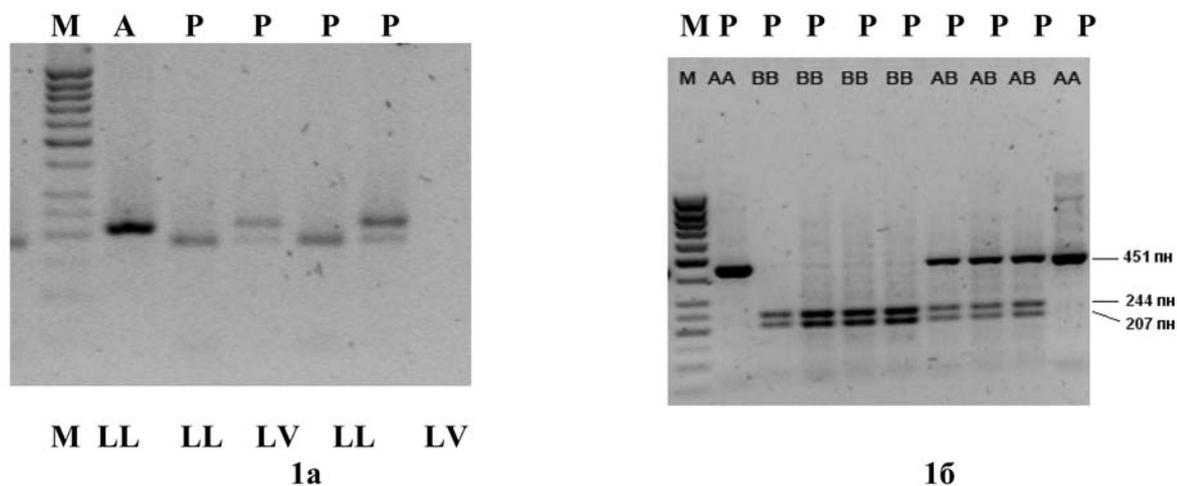


Рис. 1. Электрофореграммы ДНК-типирования крупного рогатого скота
1а. Электрофореграмма продуктов амплификации и рестрикции гена гормона роста (*GH*) в 2% агарозном геле. Условные обозначения: маркер 50 br DNA Lader (Fermentas); А–продукты амплификации, Р–продукты рестрикции, VV-, LV-, LL – генотипы.

1б. Электрофореграмма продуктов рестрикции гена *Pit-1*. Условные обозначения: маркер 50 br DNA Lader (Fermentas); Р–продукты рестрикции, AA, AB и BB – генотипы.

Выявление ассоциации аллельных вариантов генов *GH* и *Pit-1* с молочной продуктивностью, а именно, общим удоем молока за 305 суток, содержанием жира и белка в молоке (%),

проводилось на основании данных племенных карт. Достоверность полученных результатов была проверена с помощью статистических методов оценки достоверности.

Результаты и обсуждение

1. Полиморфизм гена гормона роста (*GH*) и его связь с молочной продуктивностью крупного рогатого скота

В работах многих исследователей выполнен анализ распределения аллельных вариантов ряда структурных генов, полиморфизм которых часто оказывается связанным с основными показателями молочной продуктивности крупного рогатого скота [3, 6, 7]. Выявлены аллельные варианты гена гормона роста *GH*, ассоциированные с высоким удоем и повышенной жирностью молока [6, 8, 9].

Ген гормона роста привлекает внимание исследователей как потенциальный маркер молочной продуктивности. Соматотропин или гормон роста – один из главных регуляторов развития млекопитающих. Гормон роста синтезируется в передней доле гипофиза и регулирует интенсивность метаболизма белков, участвующих в формировании мышечных тканей. Гормон стимулирует транспорт аминокислот в мышечные клетки, кроме того, усиливает син-

тез белков, участвующих в инициации и поддержании лактации у млекопитающих [4,9].

Ген гормона роста *GH* расположен на участке хромосомы 19q26-qter, состоит из пяти экзонов, включающих около 1800 пар оснований. Продуктом экспрессии этого гена является один из представителей семейства белковых гормонов – гормон роста, который представляет собой одиночный полипептид, состоящий из 190-191 аминокислот. Гормон соматотропин необходим для постнатального развития и нормализации углеводного, липидного, азотного и минерального обменов. [4, 5].

В гене *GH* идентифицировано несколько различных мутаций [9]. Выявлена ассоциация полиморфных вариантов гена соматотропина с показателями продуктивности (живая масса, молочная продуктивность, содержание жира в молоке). Наиболее изучена взаимосвязь мутации в пятом экзоне с продуктивностью крупного рогатого скота [10]. Эта мутация представляет собой С→G трансверсию в нуклеотидной по-

следовательности 2141, в результате которой происходит замена аминокислоты лейцин (*L*) на валин (*V*) в 127 позиции полипептида. Таким образом, этот одиночный нуклеотидный полиморфизм приводит к образованию двух аллелей: *L-GH* и *V-GH*. По данным ряда исследователей *L*-аллель гена гормона роста является предпочтительным для популяции, так как обнаружена положительная корреляция с количественными признаками продуктивности крупного рогатого скота [4, 10, 11].

Нами проведен анализ генетической структуры черно-пестрой породы крупного рогатого скота по частоте встречаемости генотипов и аллелей гена гормона роста (*GH*). Установлено, что среди исследованных быков-производителей Гомельского, Витебского и Минского племпредприятий, а также коров основного селекционного стада Минского племпредприятия преобладает *L*-аллель, частота встречаемости которого составляет 83-84 % соответственно (Табл.1).

Таблица 1

Генетическая структура популяции быков-производителей и быкопроизводящих коров черно-пестрой породы по гену *GH*

Кол-во особей (n)	Ген гормона роста <i>GH</i>				
	Частота встречаемости генотипов, %			Частота встречаемости аллелей	
	<i>LL</i>	<i>LV</i>	<i>VV</i>	<i>L</i>	<i>V</i>
422♂	72,25	24,08	3,67	0,84±0,017	0,16±0,017
42♀	66,66	33,34	0	0,83±0,057	0,17±0,057

Изучено влияние полиморфизма локуса *GH* на голштинской, голштино-фризской и черно-пестрой породах крупного рогатого скота [10-12]. Проанализирована связь полиморфизма гена *GH* с основными показателями молочной продуктивности. Доказано, что животные с гомозиготным генотипом *LL-GH*, а также гетерозиготные особи *LV-GH* – имеют более высокие показатели молочной продуктивности по срав-

нению с обладателями гомозиготных генотипов (*VV-GH*) [9,10,11,12]. Выявлена связь полиморфизма гена *GH* с удоем и содержанием жира в молоке. По этим показателям генотипы *LL^{GH}* превосходили генотипы *VV^{GH}* [9-12].

Мы исследовали такие показатели молочной продуктивности, как общий удой молока за 305 суток и процентное содержание жира и белка в молоке (Рис. 2, 3, 4).

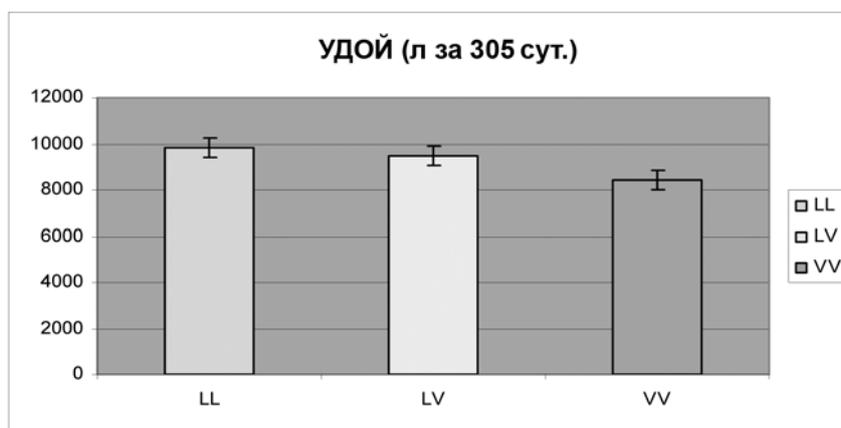


Рис. 2. Влияние различных аллельных вариантов гена гормона роста *GH* на общий удой (л) за 305 суток лактации.

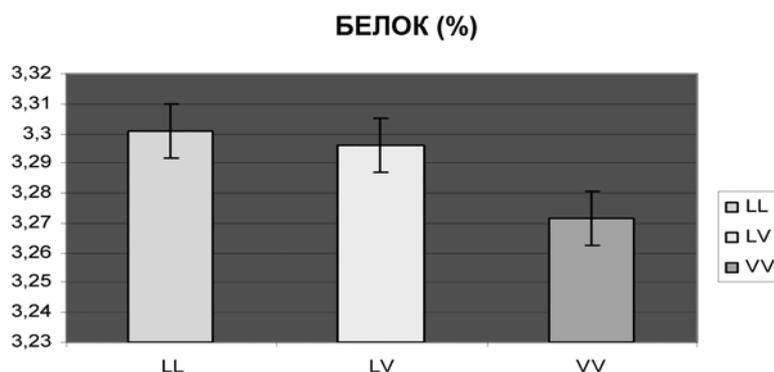


Рис. 3. Влияние различных аллельных вариантов гена гормона роста *GH* на содержание белка в молоке

Достоверно установлено, что у коров с *LL* гомозиготным генотипом по гену *GH* общий удой молока выше на 8,1 % ($P < 0,05$) (Рис. 2). Содержание белка и жира в молоке выше ($< 3,3$ % и $< 4,06$ % соответственно), чем у особей с генотипом *VV-GH* ($P < 0,05$) (Рис. 3, 4).

Таким образом, полученные результаты научных исследований позволяют утверждать, что в изученной популяции крупного рогатого скота выявлено положительное влияние *L*-аллеля гена *GH* на общий удой, содержание белка и жира в молоке.

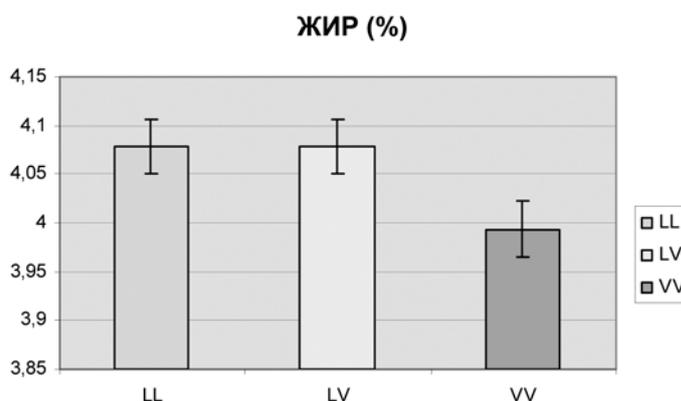


Рис. 4. Влияние различных аллельных вариантов гена гормона роста *GH* на содержание жира в молоке (%).

2. Полиморфные варианты гена гипофизарно-специфического фактора транскрипции (*pit-1*), ассоциированные с молочной продуктивностью крупного рогатого скота

Интенсивность экспрессии гена гормона роста, в свою очередь, находится под контролем клеток гипоталамуса, выделяющих стимулирующий белок – рилизинг-фактор. Гипофизарно-специфический фактор транскрипции *Pit1*, являющийся регуляторным геном, осуществляет контроль транскрипции генов пролактина, тиротропина и гормона роста, а также играет важную роль в пролиферации и дифференциации клеток гипофиза, секретирующих эти гормоны. Ингибирование синтеза *Pit1* приводит к заметному снижению экспрес-

сии генов пролактина и гормона роста и значительному снижению пролиферации клеточных линий, продуцирующих эти гормоны. Поэтому полиморфизм гена *Pit1* изучается как маркер молочной продуктивности крупного рогатого скота [11, 12]. Очевидно, мутации гена *Pit1*, сопровождаемые нарушением структуры его продукта, могут оказывать существенное влияние на экспрессию контролируемых им генов и, таким образом, изменять фенотипическое проявление признаков молочной продуктивности крупного рогатого скота.

Цель нашего исследования заключалась в изучении *HinfI*-полиморфизма в шестом экзоне гена *Pit1* у представителей черно-пестрой породы крупного рогатого скота, разводимых в республике.

Проведен анализ генетической структуры популяций крупного рогатого скота в Госплемпредприятиях Минской и Витебской областей по гену гипофизарно-специфического фактора транскрипции *Pit1*. Выявлено, что частота предпочтительного генотипа *AA-Pit1* в исследуемых образцах животных Витебского племпредприятия составляет 11 %, а Минского – почти в два раза меньше – 5,6 %. Это согласуется с данными польских исследователей, которые показали связь аллельных вариантов

гена *Pit1* с молочной продуктивностью [10].

Наиболее ценным генотипом, ассоциированным с повышенным удоем молока, является генотип *AA-Pit-1*. Анализ генетической структуры черно-пестрой породы крупного рогатого скота в некоторых племенных хозяйствах Республики Беларусь существует, что частота предпочтительного генотипа *AA-Pit1* в популяции Витебского племпредприятия составляет 11 %, а Минского – почти в два раза меньше – 5,5 % (Табл. 2).

Таблица 2

Генетическая структура популяций быков-производителей и быкопроизводящих коров белорусской черно-пестрой породы по локусу *Pit-1*

Принадлежность	Количество особей (n)	Частота встречаемости				
		генотипов, %			аллелей	
		<i>BB</i>	<i>AB</i>	<i>AA</i>	<i>B</i>	<i>A</i>
РСУП «Витебск племпредприятие»	118	45,8	43,2	11,0	0,67±0,043	0,33±0,043
РСУП «Минск племпредприятие»	90	58,9	35,6	5,5	0,77±0,044	0,23±0,044
РУСП «Племенной завод Красная звезда»	42	47,6	33,4	19,0	0,64±0,074	0,36±0,074

Самая высокая частота генотипа *AA* была выявлена в популяции КРС РУСП «Племенной завод Красная звезда», которая составляет 19 %.

Наибольший уровень продуктивности по такому показателю, как общий удои, имеют животные с генотипом *Pit-1^{AA}*, по сравнению с гомозиготными особями *BB-Pit-1* генотипом.

Из полученных данных очевидно, что наибольший уровень продуктивности по показателям

общего удою характерен для особей с генотипом *Pit-1^{AA}*, что согласуется с данными других авторов [10, 11, 12]. Особи с генотипом *Pit-1^{BB}* имеют наименьшие показатели по удою. В частности, нами показано, что особи с генотипом *Pit-1^{AA}* дают в среднем на 2,6 % больше молока за 305 суток лактации по сравнению с особями, обладающими генотипом *Pit-1^{BB}* ($P < 0,05$) (Рис. 5).

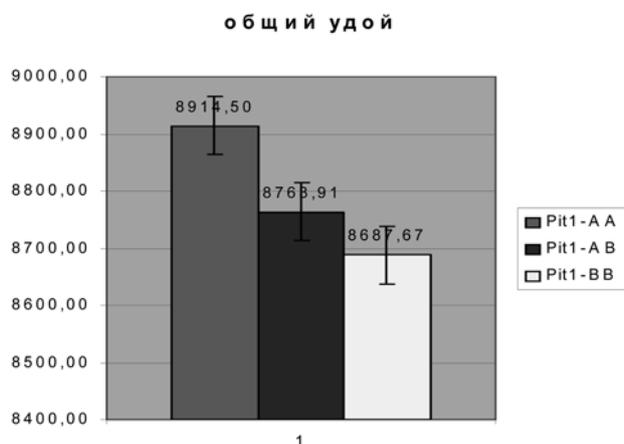


Рис.5. Влияние различных аллельных вариантов гена релизинг-фактора *Pit-1* на общий удои (л) за 305 суток лактации.

Нашими исследованиями не было выявлено статистически достоверных различий между обладателями *Pit-1^{AA}* и *Pit-1^{BB}* генотипов по содержанию белка и жира в молоке.

Исследования по влиянию полиморфизма генов гормона роста и гипофизарно-специфического фактора транскрипции на молочную продуктивность крупного рогатого скота будет продолжено.

Заключение

Проведен анализ генетической структуры черно-пестрой породы крупного рогатого скота по частоте встречаемости предпочтительных генотипов основных генов соматотропного каскада:

гена гормона роста (*GH*);
гена гипофизарно-специфического фактора транскрипции (*Pit1*).

Показано, что среди исследованных быков-производителей Витебского и Минского племпредприятий, а также коров основного селекционного стада Минского племпредприятия преобладает L-аллель гена гормона роста (*GH*). Установлено положительное влияние

L-аллеля гена *GH* на общий удой, содержание белка и жира в молоке.

Изучена связь молочной продуктивности КРС с полиморфными аллельными вариантами гена *Pit 1* у крупного рогатого скота. Выявлено положительное влияние AA-генотипа гена *Pit1* на общий удой молока.

Таким образом, связь полиморфизма генов гормона роста и гипофизарно-специфического фактора транскрипции с хозяйственно-ценными признаками служит основанием использовать *GH* и *Pit-1* в маркер-сопутствующей селекции, направленной на повышение молочной продуктивности крупного рогатого скота.

Список используемых источников

1. Калашникова, Л.А. ДНК-технология оценки сельскохозяйственных животных / Л.А. Калашникова, И.М. Дунин, В.И. Глазко. – Москва: ВНИИплем, 1999. – 148 с.

2. Эрнст, Л.К. Биологические проблемы животноводства в XXI веке / Л.К. Эрнст, Н.А. Зиновьева – Москва: РАСХН, 2008. – 508 с.

3. Введение в молекулярную генную диагностику сельскохозяйственных животных / Н.А. Зиновьева [и др.]; под общей редакцией Л.К. Эрнста. – Москва: ВИЖ, 2002. – 112 с.

4. Jianbo, Y. Flan Hayes and Urs Kuhnlein Sequence Variations in the Bovine Growth Hormone Gene Characterized by Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis and Their Association with Milk Production Traits in Holsteins / Y. Jianbo [et al.] // Genetics. – 2004. – Vol. 144. – P. 1809–1816.

5. Woollard, J. Rapid communication: HinfI polymorphism at the bovine Pit locus. / J. Woollard [et al.] // J. Anim. Sci. – 1994. Vol. – 72. – P. 3267.

6. Сулимова, Г.Е., Мониторинг генетической структуры пород и популяций крупного рогатого скота России по локусам хозяйственно-полезных признаков / Г.Е. Сулимова, С.О. Туркова, С.Р. Хатами // Молекулярная генетика,

геномика и биотехнология: материалы междунар. науч.-практ.конф., Минск, 24–26 ноября 2004 г.: в 1 ч. / ИГЦ НАНБ; редкол.: Н.А. Карпель [и др.]. – Минск, 2004. – С. 98–100.

7. Калашникова, Л.А. Селекция XXI века: использование ДНК-технологий / Л.А. Калашникова, И.М. Дунин, В.И. Глазко; под ред. Калашниковой Л.А. [и др.]. – Московская область: Лесные поляны, ВНИИплем. 2001. – 34 с.

8. Михайлова, М.Е. Использование ДНК-технологий для генетического маркирования хозяйственно-ценных признаков и идентификации скрытых носителей иммунодефицита крупного рогатого скота / М.Е. Михайлова, Е.В. Белая, С.Г. Голенченко, Н.М. Волчок, Н.А. Камыш // Современные методы генетики и селекции в животноводстве: материалы междунар. науч. конф., Санкт-Петербург, 26–28 июня 2007 г. / С.-Пт. ВНИИГРЖ; редкол.: П.Н. Прохоренко [и др.]. – Санкт-Петербург, 2007. – С. 267–273.

9. Lucy, M.C. Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production / M.C. Lucy [et al.] // Domestic Animal Endocrinology. – 1993. – Vol. 10. – P. 325–333.

10. Zvierchowski, L. An association of growth hormone, κ-casein, p-lactoglobulin, leptin and

Pit-I loci polymorphism with growth rate and carcass traits in beef cattle / L. Zvierzchowski // Animal Science Papers and Reports.– 2001. – Vol. 19.– P. 65–78.

11. Pawar, R. S. Growth hormone gene polymorphism and its association with lactation yield in dairy cattle / R. S. Pawar [et al.] // Indian Jour-

nal of Animal Sciences.– 2007– Vol.11, № 9.– P. 884–888.

12. Renaville, R. Pit-1 gene polymorphism, milk yield, and conformation traits for Italian Holstein-Friesian bulls / R. Renaville [et al.] // J. Dairy Sci. –1997. Vol. 80, № 12.– P. 3431–3437.

Дата поступления статьи 4 декабря 2008 г.

РЕФЕРАТЫ

SUMMURIES

УДК 635.64:631.527.5

Гетерозис в селекции сельскохозяйственных растений / А.В. Кильчевский [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 8. Минск, 2008. С. 7-24. Соавт.: Хотылева Л.В., Тарутина Л.А., Шаптуренко М.Н.

В представленном обзоре авторы анализируют генетическую природу явления гетерозиса. В результате многолетних исследований выявлено долевое участие различных генетических эффектов в проявлении гетерозиса (доминирование, сверхдоминирование, эпистаз). Показано, что гетерозис зависит от степени дивергенции родительских форм и условий окружающей среды. Обсуждаются методические подходы к гетерозисной селекции, конечная цель которых – создание высокопродуктивных и устойчивых гибридов, эффективно использующих ресурсы среды. Показаны перспективы использования современных молекулярных методов при изучении гетерогенности исходного материала в селекции на гетерозис.

Ключевые слова: гетерозис, генетический анализ, комбинационная способность, периодический отбор, взаимодействие генотип-среда, молекулярные маркеры.

Heterosis in breeding of agricultural plants / A. Kilchevsky [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 8. Minsk, 2008. P. 7-24. Khotyleva L., Tarutina L., Shapturenko M.

The given review deals with analysis of the genetic nature of heterosis. As a result of long-term investigations, involvement by shares of different genetic effects in heterosis manifestation (dominance, overdominance, epistasis) was revealed. Heterosis was shown to depend on the divergence degree of parental forms and environmental conditions. Methodical approaches to heterosis breeding, the final aim of which is development of high-productive and resistant hybrids effectively using environmental resources, are discussed. Prospects of applying current molecular methods in studying heterogeneity of the parent material in breeding for heterosis are shown.

Key word: heterosis, genetic analysis, combining ability, periodic selection, genotype-environment interaction, molecular markers.

УДК 635.64:631.527.5

Генетические основы селекции томата на гетерозис / А.В. Кильчевский [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 8. Минск, 2008. С. 25-39. Соавт.: Добродькин М.М., Скорина В.В., Бабак О.Г., Коготко Л.Г., Иванцова Е.Ю., Хотылева Л.В., Тарутина Л.А., Мишин Л.А.

В статье представлены результаты многолетних исследований, выполненных авторами по оптимизации селекционного процесса и созданию гетерозисных гибридов томата для пленочных теплиц и открытого грунта. Показаны особенности наследования признаков урожайности, партенокарпии лежкости в системе топкроссных и диаллельных скрещиваний. Используются методы генетического анализа наследования признаков, экологической генетики, реципрокных тестеров, что привело к созданию новых высокопродуктивных гетерозисных гибридов томата на основе функциональной мужской стерильности, нашедших практическое применение в условиях Беларуси.

Ключевые слова: томат, селекция, гетерозис, комбинационная способность, реципрокный периодический отбор, экологическая стабильность.

Genetic principles of tomato breeding for heterosis / A. Kilchevsky [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 8. Minsk, 2008. P. 25-39 Dobrodkin M., Skorina V., Babak O., Kogotko L., Ivantsova E., Hotyleva L., Tarutina L., Mishin L.

The article presents the results of long-term investigations carried out by the authors for optimizing the breeding process and developing tomato heterotic hybrids for plastic film greenhouses and open ground. Distinctions in the inheritance of such traits as productivity, parthenocarpy and shell life were shown in the system of topcrosses and diallel crosses. The methods for genetic analysis of traits inheritance, ecological genetics, reciprocal periodic selection and reciprocal testers were used that has resulted in the development of new high-productive heterotic hybrids of tomato based on functional male sterility which have found a practical application under Belarus conditions.

Key words: tomato, breeding, heterosis, combining ability, reciprocal periodic selection, ecological stability.

УДК. 631.527.52:633.14 «324»(476)

Гордей, И.А. Генетические основы селекции гибридной ржи (*S.cereale* L.) / И.А. Гордей, С.И. Гордей, Э.П. Урбан // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 8, Минск, 2008. С. 40-51.

В статье изложены генетические основы и методы селекции ржи (*Secale cereale* L.) на гетерозис: генетический контроль самофертильности; особенности закрепления стерильности и восстановления фертильности при создании систем ЦМС Р- и G-типов; молекулярно-генетические механизмы цитоплазматической мужской стерильности; методы создания самофертильных линий, систем ЦМС Р- и G-типов, гетерозисных гибридов F₁ озимой

диплоидной ржи. Изложены основные отличительные особенности ЦМС Р- и G-типов, методика размножения материнских мужских стерильных компонентов гетерозисных гибридов F₁ ржи; система семеноводства, преимущества и недостатки гибридных сортов. Представлены приоритетные направления дальнейших молекулярно-генетических исследований по использованию гетерозиса у ржи.

Ключевые слова: гетерозис, рожь, цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС).

Hardzei, I. Genetic foundations of hybrid rye (*Secale cereale* L.) breeding / I. Hardzei, S. Hardzei, E. Urban // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 8. Minsk, 2008. P. 40-51.

The article concerns genetic principles and methods of rye (*Secale cereale* L.) breeding for heterosis: genetic control of self-fertility; peculiarity of sterility maintenance and fertility restoration in developing CMS systems of P- and G-types; molecular-genetic mechanisms of cytoplasmic male sterility; methods for developing self-fertile lines, CMS systems of P- and G-types, heterotic F₁ hybrids of winter diploid rye. Basic distinctive CMS features of P- and G-types, methods for reproduction of maternal male-sterile components of heterotic rye hybrids, seed growing system as well as advantages and disadvantages of hybrid cultivars are described. Priority trends of further molecular-genetic research for using heterosis in rye are presented.

Key words: heterosis, rye, cytoplasmic male sterility (CMS).

УДК 633.854.78:631.527.5(476)

Силкова, Т.А. Основные результаты селекции гибридного подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) в Республике Беларусь / Т.А. Силкова, Н.С. Фомченко, О.Г. Давыденко // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 8, Минск, 2008. С. 52-57.

Получены данные по оценке показателей хозяйственно важных признаков 160 гибридов F₁ подсолнечника, созданных на основе самоопыленных линий белорусской селекции, выделены перспективные комбинации скрещивания. Урожайность семян лучших гибридов F₁ составила 22,9-39,0 ц/га, масличность семян – 45,4 – 55,8 %, сбор масла – 11,8 – 19,1 ц/га. Гибриды: M517/05A × M798/05Rf, M517/05A × M868/05Rf, M517/05A × M879/05Rf, M659/05A × M798/05Rf и M719/05A × M868/05Rf имели высокую толерантность к склеротинии независимо от года выращивания растений. Первый межлинейный гибрид подсолнечника F₁ Поиск, передан в государственное учреждение «Государственная инспекция по испытанию и охране сортов растений». Средняя урожайность семян, по результатам двухлетних испытаний гибрида в шести регионах республики Беларусь, составила 38,4 ц/га, а масличность семян – 50,5 %.

Ключевые слова: гибридный подсолнечник, цитоплазматическая мужская стерильность, инбредные линии.

Silkova, T. Basic results of hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.) breeding in the Republic of Belarus / T. Silkova, N. Fomchenko, O. Davydenko // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 8. Minsk, 2008. P. 52-57.

The article presents the obtained data on assessment of agronomic trait parameters in 160 sunflower F₁ hybrids developed on the basis of self-pollinated lines of Belarusian breeding, with promising crossing combinations being selected. Seed productivity of the best F₁ hybrids was 2,3–3,9 t/ha, the oil content – 45,4–55,8 % and the oil yield – 1,18–1,99 tone per hectare. Hybrids M517/05A × M798/05Rf, M517/05A × M868/05Rf, M517/05A × M879/05Rf, M659/05A × M798/05Rf and M719/05A × M868/05Rf were high tolerant to Sclerotinia irrespective of a plant growing year. The first interline sunflower F₁ hybrid «Poisk» was presented to the State Institution «State Inspection for test and protection of plant cultivars.» The mean seed productivity was 3,84 t/ha and the oil content – 50,5 % by the results of two-year tests of the hybrid in six regions of the Republic of Belarus.

Key words: sunflower hybrids, cytoplasmic male sterility (CMS), inbred lines.

УДК 633.15:631.527

Зародышевая плазма самоопыленных линий кукурузы в селекции на гетерозис / Л.П. Шиманский [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 8. Минск, 2008. С. 58-64. Соавт.: Мустяца С.И., Туровец В.Н., Долгова Е.Л.

Коллекция интродуцированных самоопыленных линий дифференцирована на 12 гетерозисных групп на основе данных о происхождении и по фенотипическим признакам. По зерновой продуктивности разных моделей гибридов на базе исходных гетерозисных групп выделены наиболее продуктивные гибриды, сочетающие плазму кремнистых групп Лакон, Лизаргарат, СМ 7 и плазму зубовидной гетерозисной группы Айодент. Высокий уровень гетерозиса (от 100,0 до 245,5 %) гибридов, полученных по диаллельной схеме, указывает на большие генетические различия между их родительскими формами. Анализ электрофоретических спектров зеина позволил подтвердить генетическую дивергенцию изученной зародышевой плазмы кукурузы. Линии распределились по кластерам согласно своей групповой принадлежности, причём проявили значительную связь внутри. Обособления гетерозисных групп было очевидным, поскольку внутригрупповые дистанции генетического сходства превосходили межгрупповые в опытах в среднем в 3,2 раза.

Ключевые слова: кукуруза, самоопыленная линия, гетерозисная группа.

Germ plasm of self-pollinated maize lines in breeding for heterosis / L. Shimansky [et al.] // *Molecular and Applied Genetics: Proceedings*. Vol. 8. Minsk, 2008. P. 58-64., Mustyatsa S., Turovets V., Dolgova E.

The collection of introduced self-pollinated lines is differentiated into 12 heterotic groups on the basis of their origin and by phenotypic characters. The most productive hybrids combining the plasm of the flinty groups of Lakon, Lizargarat, SM 7 and the plasm of the odontoid heterotic group Iodent were identified by grain productivity of different hybrid models on the basis of initial heterotic groups. A high heterosis level (from 100,0 to 245,5 %) of the hybrids obtained according to diallel scheme pointed to great genetic differences between their parental forms. Analysis of zein electrophoretic spectra allowed confirmation of genetic divergence of the studied maize germ plasm. The lines were distributed into clusters by the group characteristic, moreover, they showed significant internal relation. Isolation of heterotic groups was obvious because the intragroup distances of genetic similarity exceeded intergroup ones on the average by a factor of 3,2.

Key words: maize, self-pollinated lines, heterotic groups.

УДК: 633.494:631.527

Пилюк, Я.Э. Использование гетерозиса в селекции рапса / Я.Э. Пилюк, В.В. Зеленьяк, А.В. Бакановская // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр.* Т. 8. Минск, 2008. С. 65-72.

Представлен анализ и результаты селекции озимого и ярового рапса на гетерозис, с использованием различных методов селекции, дана оценка комбинационной способности инбредных линий и сортов озимого и ярового рапса по основным хозяйственно-полезным признакам. Установлены существенные различия ценности исходного материала по анализируемым признакам.

Ключевые слова: рапс, гетерозис, цитоплазматическая мужская стерильность, инбредные линии, диаллельное скрещивание.

Pilyuk, Ya. Heterosis use in rape breeding / Ya. Pilyuk, V. Zelianiak, A. Bakanoyskaya // *Molecular and Applied Genetics: Proceedings*. Vol. 8. Minsk, 2008. P. 65-72.

Analysis and research results of winter and spring rape breeding for heterosis using different methods of breeding are presented, with the combining ability estimation of inbred lines and varieties of winter and spring rape for main traits being given. The important differences in the value of the parent material for the traits analysed were revealed.

Key words: rape, heterosis, cytoplasmic male sterility (CMS), inbred line, diallel crossing.

УДК 633.416:631.527

Лужинский, Д.В. Генетические основы и результаты практической селекции гибридов кормовой свеклы (*Beta vulgaris* L.) полусахарного типа в Беларуси / Д.В. Лужинский // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр.* Т. 8, Минск, 2008. С. 61-66.

В статье изложены генетические основы, проблемы и результаты практической селекции гибридов кормовой свеклы (*Beta vulgaris* L.) полусахарного типа: генетический контроль стерильности и самофертильности; способы получения и поддержания ЦМС форм; оценка комбинационной способности, преимущества и недостатки гибридов по отношению к сортам-популяциям.

Ключевые слова: гетерозис, гибрид, свекла, цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС), самосовместимость, комбинационная способность.

Luzhinski, D. Genetic principles and practical breeding results of fodder sugar beet (*Beta vulgaris* L.) hybrids of semi-sugar type in Belarus / D. Luzhinski // *Molecular and Applied Genetics: Proceedings*. Vol. 8. Minsk, 2008. P. 61-66.

Genetic principles, problems and results of practical breeding of fodder beet hybrids (*Beta vulgaris* L.), such as genetic control of sterility and self-fertility; methods of obtaining and maintaining CMS-forms; estimation of combining ability, advantages and disadvantages of hybrids towards varieties-populations are presented in the article.

Key words: heterosis, beet, hybrids, cytoplasmic male sterility (CMS), self-fertility, combining ability.

УДК 631.547:581.19:633.521

Титок, В.В. Биоэнергетическая концепция гетерозиса / В.В.Титок // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр.* Т. 8, Минск, 2008. С. 81-93.

Реализован системный физиолого-биохимический подход оценки селекционного материала, позволивший установить причинно-следственные связи между биоэнергетическими показателями и продуктивностью при гетерозисе. На различных культурах впервые выявлена зависимость фенотипического проявления морфологических признаков от величин интегральных показателей энергетического метаболизма, что подтверждает взаимосвязь генетических и биоэнергетических процессов. Обнаруженные закономерности свидетельствуют о ключевой роли макроэргических соединений и восстановительных эквивалентов в регуляции процессов роста, развития и формирования продуктивности при гетерозисе у однодольных и двудольных растений.

Обобщением результатов являются основные положения биоэнергетической концепции гетерозиса.

Ключевые слова: биоэнергетические процессы, гибридизация, гетерозис, продуктивность.

Titok, V. Bioenergy heterosis conception / V. Titok // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 8. Minsk, 2008. P. 81-93.

A systemic physiologobiochemical approach to evaluation of breeding material, enabling establishment of cause and effect relationship between bioenergetic parameters and productivity in the heterosis, was realized. Dependence of phenotypic manifestation of morphological traits on the value of integral parameters of energy metabolism was revealed for the first time in various crops that corroborated the relationship between genetic and bioenergetic processes. The regularities revealed point to a key role of macroergic compounds and reducing equivalents in regulation of growth processes, development and formation of productivity in the heterosis in mono- and dicotyledonous plants.

The data obtained are the basis for working out principles of an original conception of heterosis – hypothesis of bioenergy balance.

Key words: bioenergetic processes, hybridization, heterosis, productivity.

УДК 631.523:575.116:633.2:577.21:575:633.854.54

Лемеш, В.А. Молекулярные маркеры в изучении генетических ресурсов льна / В.А. Лемеш // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 8, Минск, 2008. С. 94-104.

Показано, что молекулярно-генетический анализ дает возможность выявить специфические геномные маркеры, которые могут использоваться для видовой и внутривидовой идентификации генотипов льна. При изучении внутривидового разнообразия культурного льна обнаружено, что молекулярно-генетические изменения в геноме масличного льна, как правило, выше, чем льна-долгунца. С помощью SSR-маркеров (микросателлитный анализ) возможна более эффективная идентификация сортов льна, чем с помощью наиболее информативных RAPD-маркеров. Уровень изменчивости, выявляемый с помощью микросателлитных маркеров льна, позволяет использовать SSR анализ как для работы с генетическими коллекциями, так и для паспортизации образцов.

Ключевые слова: лен-долгунец, масличный лен, генетический полиморфизм, RAPD-маркеры, SSR-маркеры

V. Lemesh

Lemesh, V. Molecular markers in study on flax genetic resources / V. Lemesh // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 8. Minsk, 2008. P. 94-104.

Molecular-genetic analysis was shown to give the possibility to reveal specific genome markers which can be used for species and intraspecies identification of flax genotypes. When studying intraspecies diversity of common flax, it was revealed that molecular-genetic changes in linseed genome were higher, as a rule, than in fiber flax. More effective identification of flax cultivars is possible by means of SSR markers (microsatellite analysis) than by means of the most informative RAPD markers. The variation level determined by flax microsatellite markers allows application of the SSR analysis for both work with genetic collections and certification of accessions.

Key words: fiber flax, linseed, genetic polymorphism, RAPD markers, SSR markers.

УДК 575.858 + 631.523.55 + 631.527.5: 582.542.1

Рекомбинантный геном как источник внутривидовой дивергенции полиплоидных злаков / Н.И. Дубовец [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 8. Минск, 2008. С. 105-112. Соавт.: Сычева Е.А., Соловей Л.А., Штык Т.И., Бондаревич Е.Б.

Исследованы закономерности формирования рекомбинантного генома тетраплоидных тритикале. Установлено, что процесс взаимозамещения хромосом А и В геномов пшеницы происходит не случайным образом, а подчинен давлению отбора. Отбор идет на уровне гомеологов, селективные преимущества которых определяются генотип-средовыми взаимодействиями. Когда гомеолог обладает явными селективными преимуществами, стабилизация хромосомного состава соответствующей гомеологической группы заканчивается быстро, что приводит к образованию межгеномных рекомбинаций на уровне целых хромосом. Если конкурентоспособность гомеологов одинакова, скорость стабилизации состава группы замедляется. При этом доминирование генетических систем базового генома ржи обеспечивает высокий уровень спаривания в мейозе гомеологических хромосом пшеницы и, как следствие этого, образование рекомбинаций на уровне сегментов хромосом. Показано, что в различных условиях произрастания отбираются разные варианты сочетаний хромосом А и В геномов пшеницы.

Ключевые слова: рекомбинантный геном, межгеномные замещения хромосом, реципрокные транслокации, гомеологичное спаривание хромосом, дифференциальное окрашивание хромосом (С-бэндинг).

Recombinant genome as a source of intraspecific divergence of polyploid cereals / N. Dubovets [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 8. Minsk, 2008. P. 105-112. Sycheva Ye., Solovey L., Shtyk T., Bondarevich Ye.

Regularities of recombinant genome formation were studied in tetraploid triticale. The chromosome intersubstitution process of wheat A- and B- genomes was revealed to take place not at random but to be subject to selection pressure. Selection takes place at the homeologue level, whose selective advantages are determined by genotype – environment interactions. When homeologue exhibits evident selective advantages, stabilization of chromosome composition of the appropriate homeologous group ends quickly that results in formation of intergenomic recombinations at the level of intact

chromosomes. If competitiveness of homeologues is identical, the rate of the group composition stabilization becomes slower. Dominance of genetic systems in basic rye genome provides a high level of homeologous wheat chromosome pairing in meiosis and, as a result, recombination formation at the level of chromosome segments. Various variants of chromosome combinations in wheat A- and B-genomes were shown to be selected under different growth conditions.

Key words: recombinant genome, intergenomic chromosome substitutions, reciprocal translocations, homeologous chromosome pairing, differential staining of chromosomes (C-banding).

УДК 634.11:631.524.86

Результаты отбора гибридных семян яблони на устойчивость к парше фитопатологическим и молекулярными методами / О.Ю. Урбанович [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 8. Минск, 2008. С. 113-119. Соавт.: Гашенко Т.А., Заблоская Е.А., Козловская З.А., Картель Н.А.

Гибридные семена яблони, полученные в результате скрещивания с донорами гена *Vf*, обеспечивающего иммунитет к парше, были оценены на устойчивость и присутствие данного гена с помощью молекулярных маркеров. Показано, что часть растений, прошедших отбор на искусственном инфекционном фоне, не содержит в составе генома искомого гена. Для повышения эффективности селекции, направленной на получение высокоустойчивых к парше сортов яблони, целесообразно сочетать классические фитопатологические методы и молекулярные маркеры.

Ключевые слова: парша яблони, молекулярные маркеры, ген *Vf*.

Results of screening among the hybrid apple seedlings for scab resistance by means of phytopathological and molecular methods / O. Urbanovich [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 8. Minsk, 2008. P. 113-119. Hashenka T., Zablotskaya A., Kazlouskaya Z., Kartel N.

Donors of *Vf* gene, which is responsible for scab resistance, were used in crosses to produce hybrid apple seedlings. The seedlings were assessed for immunity and afterwards for the presence of the gene *Vf* by means of molecular markers. A part of the plants, which had been selected according to the infection tests results, was not demonstrated to contain the *Vf* gene in their genomes. It is advisable to combine conventional phytopathological methods and molecular markers to improve the efficiency of breeding aimed at producing high scab resistant apple cultivar.

Key words: apple scab, molecular markers, gene *Vf*.

УДК: 602.643.66.633.491

Исаенко Е.В. Повышение устойчивости растений картофеля к колорадскому жуку путем трансгеноза ДНК-последовательностью *CRY3AM* / Е.В. Исаенко, Н.А. Картель // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т.8, Минск, 2008. С. 120-126.

Сконструирована система для экспрессии в растениях картофеля гена *cry3aM Bacillus thuringiensis*, имеющего оптимизированный нуклеотидный и кодонный состав для эффективной экспрессии в клетках эукариот. Ген *cry3aM* под контролем промотора *rbcs Arabidopsis thaliana* перенесен в растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) посредством агробактериальной трансформации. Отобрано 126 независимых трансформантов картофеля, укоренившихся на среде с селективным агентом канамицином. Проанализирована выборка из 85 первичных трансформантов картофеля методом ПЦР, подтверждено наличие перенесенной последовательности целевого гена в растительный геном. Случайная выборка из 22 линий трансформантов исследована методом РТ-ПЦР; экспрессия гена *cry3aM* выявлена у 11 линий. Проведены исследования на повреждаемость листовых пластинок колорадским жуком, обнаружены статистически значимые отличия трансформированных растений от контрольных.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, колорадский жук, *cry3a*, картофель, трансформация.

Isayenko, I. Improvement of potato resistance to colorado potato beetle by transfer of the *CRY3AM* gene / I. Isayenko., N. Kartel // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 8. Minsk, 2008. P. 120-126.

Plant expression system for *cry3aM* gene from *Bacillus thuringiensis* was constructed. Modified sequence of *cry3aM* gene with optimized codon and nucleotide composition was used for the study. *Cry3aM* gene under control of *rbcs Arabidopsis thaliana* promoter was introduced into potato (*Solanum tuberosum* L.) genome through *Agrobacterium*-mediated transformation. A hundred and twenty-six independent potato transformants were selected in the presence of kanamycin. Primary potato transformants (85 lines) were analyzed by PCR technique to prove the target gene integration into potato genome. Eleven plants with *Cry3aM* gene expression were selected using RT-PCR from the 22 tested. Potato transformants were tested for resistance to Colorado potato beetle larvae and imago. The effect of *cry3aM* gene expression on Colorado potato beetle ability to damage potato leaves was studied.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, Colorado potato beetle, *cry3a*, potato, transformation.

УДК: [633.11+633.14]:57.085.2

Зайцева, О.И. Образование андрогенных структур и растений-регенерантов в культуре пыльников *in vitro* ярового тритикале (х *Triticosecale* WITTM.) в зависимости от условий выращивания и способов обработки колосьев / О.И. Зайцева // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 8, Минск, 2008. С. 127-132.

Изучена отзывчивость в культуре пыльников *in vitro* гибридов и сортов ярового гексаплоидного тритикале в зависимости от условий выращивания донорных растений при трех типах предобработки срезанных колосьев. Условия выращивания растений-доноров пыльников оказывали значимое воздействие на параметры пыльцевого эмбриогенеза. Исследованные генотипы проявили большую отзывчивость при выращивании растений в теплицах. Показано положительное влияние холодной обработки в течение 21 дня на основные параметры андрогенеза для большинства изученных форм. Наблюдалась генотипически специфичная реакция на способ обработки колосьев, условия выращивания донорных растений, а также взаимодействие данных факторов.

Ключевые слова: х *Triticosecale*, культура пыльников; пыльцевой эмбриогенез; предварительная обработка.

Zaitseva, O. Analysis of the effect of growth conditions and spike treatment methods on formation of androgenic structures and regenerant plants in anther culture *in vitro* in spring Triticale (х *Triticosecale* WITTM.) / O. Zaitseva // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 8. Minsk, 2008. P. 127-132.

Responsiveness of plants was studied in the *in vitro* anther culture of hybrids and cultivars of spring hexaploid triticale depending on growth conditions of donor plants with three types of pretreatments of cut spikes. Growth conditions of anther donor plants exerted a considerable effect on parameters of pollen embryogenesis. The studied genotypes displayed high responsiveness under growing plants in greenhouse. Cold treatment for 21 days was shown to have a positive effect on basic parameters of androgenesis in the majority of the studied forms. A genotypically specific response to the spike treatment method, growth conditions of donor plants, as well as to interaction of the given factors was observed.

Key words: х *Triticosecale*, anther culture, pollen embryogenesis, pretreatment.

УДК 633.31/37

Морфогенетические и биохимические исследования коллекции желтого и узколистного люпина / И.Б.Саук [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 8. Минск, 2008. С. 133-137. Соавт.: Анохина В.С., Тимошенко М.К., Цибульская И.Ю., Брыль Е.А

Генофонд коллекции люпинов БГУ состоит из различных сортов отечественной и зарубежной селекции, мутантных и гибридных форм. Целью данной работы было исследование разнообразия коллекции люпинов по количественным признакам, резистентности растений к грибам рода *Fusarium*, содержанию алкалоидов, а также создание новых форм люпина *Lupinus luteus* и *Lupinus angustifolius* с ограниченным ветвлением. Кроме того, проведена классификация образцов люпина: формы *Lupinus luteus* разделены на пятнадцать групп, а *Lupinus angustifolius* – на пять групп в соответствии с методикой Таранухи и Курловича. Выявлено, что образцы более резистентные к грибам рода *Fusarium* имели, как правило, повышенное содержание алкалоидов. Изученные образцы люпина различались по содержанию алкалоидов (от 0,01 до 1,23 %). Обнаружено, что семена сортов *Lupinus angustifolius* более поздней селекции имели значительно более низкое содержание алкалоидов по сравнению со старыми сортами, в то время как новые генотипы *Lupinus luteus* по этому признаку были на том же уровне и даже выше, чем сорта ранней селекции.

Ключевые слова: *Lupinus*, рекомбинантные линии, резистентность, алкалоиды, *Fusarium*.

Morphogenetic and biochemical studies of yellow and blue lupine collection / I. Sauk [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 8. Minsk, 2008. P.133-137., Anokhina V., Timoshenko M., Tsibulskaya I., Bryl A.

The Lupine germplasm collection of Belarusian State University consists of different varieties of native and foreign origins, mutant and hybrid forms. The purpose of the present study was investigation of the lupine collection diversity for quantitative characters, plant resistance to *Fusarium*, plant alkaloid content and development of a new *Lupinus luteus* and *L. angustifolius* forms with restricted branching by breeding. Lupine samples were classified: *L.luteus* into fifteen groups and *L.angustifolius* into five main groups in accordance with Taranukho's and Kurlovich's procedures. It has been revealed that samples with higher resistance to *Fusarium* had, as a rule, an increased alkaloid content. The samples differed in the alkaloid content (from 0,01 to 1,23 %). We found that *L.angustifolius* varieties of recent breeding had a significantly lower seed alkaloid content in comparison with that of varieties of early breeding, while new genotypes of *L.luteus* for that character were at the same level or even higher than that of old varieties.

Key words: *Lupinus*, recombinant line, resistance, alkaloid, *Fusarium*.

УДК 633.31/37:581.13:577.13:635.8

Анохина, В.С. Алкалоиды люпина: их фунгицидные эффекты / В.С. Анохина, Л.Н. Каминская, И.Ю. Цибульская // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 8. Минск, 2008. С. 138-142.

Изучены некоторые эффекты алкалоидов люпина (при концентрации в среде 0,1, 0,5, 1,0, 5,0 г/л) на патогенные грибы растений. Объектами данного исследования были алкалоиды видов люпина желтого *L. luteus* и узколистного *L. angustifolius* и патогенные грибы рода *Fusarium*. В результате исследования были выявлены различные токсичные эффекты алкалоидов на патогенные грибы растений рода *Fusarium*. Наиболее токсичным веществом в отношении всех изученных патогенов растений явился люпинин, а наименее токсичным – 13-оксилупанин. Люпинин и спартеин имели различное влияние на изученные патогены растений. Изоляты *F. oxysporum* оказались практически нечувствительными к их токсичному действию. Данные алкалоиды были более токсичны для

грибов *F. avenaceum* и *F. javanicum*, вызывая у них снижение активности спорообразования и ингибируя развитие вегетативной массы гриба.

Ключевые слова: хинолизиновые алкалоиды, *Lupinus*, *Fusarium*.

Anokhina, V. Lupine alkaloids: their fungicidal effects / Y. Anokhina, L. Kaminskaya, I. Tsubluskaya // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 8. Minsk, 2008. P. 138-142.

Some lupine alkaloid effects (at the content in media 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 g / l) on plant pathogenic fungi have been studied. Alkaloids from the species *L. luteus* and *L. angustifolius* and plant pathogenic fungi of genus *Fusarium* were the objects of the study. As a result of the study, the different toxic alkaloid effects on the plant pathogenic fungi *Fusarium* have been found. Lupanine was the most toxic agent with respect to all the plant pathogens and 13-oxilupanine was the least toxic one of the alkaloids tested. Lupinine and sparteine had variable influences on the plant pathogens under study. *Fusarium oxysporum* isolates were practically insensitive to toxic effects of these alkaloids. They were more toxic to pathogenic fungi *Fusarium avenaceum* and *Fusarium javanicum* causing decrease of spore formation activity and inhibiting the development of vegetative fungus weight.

Key words: quinolizidine alkaloids, *Lupinus*, *Fusarium*.

УДК [577.21 + 579.25. 579.22; 577.213]

Генетические подходы к созданию штаммов-продуцентов биологически активных соединений на основе ризосферных бактерий *Pseudomonas* / Н.П. Максимова [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 8. Минск, 2008. С. 143-151. Соавт.: Храмова Е.А., Феклистова И.Н., Кулешова Ю.М., Жардецкий С.С., Веремеенко Е.Г.

На основе ризосферных бактерий *Pseudomonas* осуществлено конструирование штаммов-продуцентов биологически активных веществ – индолил-3-уксусной кислоты, антибиотиков феназинового ряда, флуоресцирующего пигмента пиовердина. Показано, что уровень синтеза ИУК у полученных штаммов *P. mendocina* возрос в 10 раз, феназиновых антибиотиков у *P. aurantiaca* – в 6 раз, пиовердина у *P. putida* – в 2,5 раза. Изучены механизмы, лежащие в основе повышения продуктивности штаммов, дана оценка их биологической активности. Рассмотрены возможные подходы практического использования штаммов-продуцентов.

Ключевые слова: ризосферные бактерии *Pseudomonas*, биологически активные вещества, штаммы-продуценты, механизмы сверхсинтеза.

Genetic approaches to construction of the producer strains of biologically active compounds on the basis of rhizospheric bacteria *Pseudomonas* / N. Maximova [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 8. Minsk, 2008. P. 143-151., Khramtsova E., Feklistova I., Kuleshova Y., Zhardzetski S., Veremeenko E.

Producer strains of such biologically active substances as indole-3-acetic acid (IAA), phenazine antibiotics and fluorescent pigment pyoverdine were constructed on the basis of rhizospheric bacteria *P. pseudomonas*. The level of IAA synthesis increased 10-fold in the produced *P. mendocina* strains, the level of phenazine antibiotics synthesis rose 6-fold in *P. aurantiaca* and that of pyoverdine synthesis did 2,5-fold in *P. putida*. The mechanisms underlying an increase in strain productivity were studied, with their biological activity being estimated. The likely approaches to practical application of producer strains were discussed.

Key words: rhizospheric bacteria *Pseudomonas*, biologically active substances, producer strains, oversynthesis mechanisms.

УДК 619:616-097.3ц

Генетико-популяционные аспекты возникновения и распространения врожденных дефектов у крупного рогатого скота в Республике Беларусь / М.Е. Михайлова [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 8. Минск, 2008. С. 152-159. Соавт.: Белая Е.В., Волчок Н.М., Камыш Н.А., Машеро В.А.

Проведены исследования по выявлению скрытых носителей наследственных заболеваний крупного рогатого скота, детерминирующих иммунодефицит (BLAD-синдром) и дефицит фермента уридинмонофосфата (DUMPS), приводящей к ранней abortируемости эмбрионов, ДНК-диагностика племенного поголовья позволит контролировать распространение данных мутаций и снизить наносимый ими существенный экономический ущерб.

Ключевые слова: ДНК-диагностика, генные мутации, дефект иммунной системы, дефицит фермента уридинмонофосфат-синтазы, лейкоцитарная адгезия, диапедез, фагоцитоз.

Genetic and population aspects of emergence and occurrence of hereditary defects in cattle in Belarus / M. Mikhailova [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 8. Minsk, 2008. P. 152-159. Belaya E., Volchok M., Kamysh N., Mashero V.

Studies on detecting latent carriers of hereditary diseases, determining immunodeficiency (BLAD-syndrome) and deficiency of the enzyme uridinmonophosphate (DUMPS) leading to early abortion of embryos, were carried out in cattle. DNA-diagnostics of pedigree cattle will allow control of the above mutations spread and reduction in essential economic damage caused by them.

Key words: DNA-diagnostics, hereditary diseases, immunodeficiency, deficiency of the enzyme uridinmonophosphate.

УДК 619:616-097.3

Генетическое маркирование признаков молочной продуктивности крупного рогатого скота / М.Е. Михайлова [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 8. Минск, 2008. С. 160-166. Соавт.: Белая Е.В., Казаровец Н.В., Волчок Н.М., Камыш Н.А.

С помощью ДНК-технологий проведено генетическое маркирование крупного рогатого скота по гену гормона роста (*GH*) и регуляторному гену гипофизарно-специфического фактора транскрипции (*Pit1*), связанных с молочной продуктивностью. Определена частота встречаемости генотипов и аллелей гена гормона роста (*GH*) и регуляторного гена (*Pit1*). Изучена связь молочной продуктивности КРС с полиморфными аллельными вариантами генов *Pit1* и гена гормона роста *GH* у крупного рогатого скота.

Ключевые слова: ДНК-типирование, маркер-сопутствующая селекция, ген гормона роста и гипофизарно-специфического фактора транскрипции, частота аллелей, частота генотипов, молочная продуктивность, крупный рогатый скот.

Genetic marking of milk productivity traits in cattle / M. Mikhailova [et al.] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 8. Minsk, 2008. P. 160-166. Belaya E., Volchok M., Kazarovets N., Kamysh N.

Genetic marking of cattle was carried out by DNA- technologies for growth hormone gene (*GH*) and regulatory gene (*Pit1*) related to cattle milk productivity. The occurrence frequency of genotypes and alleles of the growth hormone gene (*GH*) and the regulatory gene (*Pit1*) was determined. The relationship between milk productivity of cattle and polymorphic allelic variants of genes *Pit1* and the growth hormone gene *GH* was studied in cattle.

Key words: DNA-typing, marker-assisted selection, gene of growth hormone and hypophysial-specific factor of transcription, allele frequency, genotype frequency, milk productivity, cattle.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЬИ

Статьи должны быть написаны в сжатой и ясной форме и содержать:

- соответствующий индекс универсальной десятичной классификации литературы (УДК);
- название на русском и английском языках;
- инициалы и фамилии авторов на русском и английском языках;
- полное название учреждений, в которых выполнялось исследование и их почтовые адреса;
- ключевые слова (3...5 слов);
- аннотацию на русском и английском языках (100—150 слов). Аннотация должна ясно излагать содержание статьи и быть пригодной для опубликования в аннотациях к журналам отдельно от статьи;
 - текст статьи (стандартизировать, используя подзаголовки «Введение», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение»);
 - список использованных источников (оформляется в соответствии с Правилами ВАК, Приложение 2);
 - дату поступления статьи в редакцию.

Объем статьи должен составлять не менее 14 000 знаков, включая пробелы, до 10—12 страниц. Последняя страница статьи должна быть заполнена не менее чем на 4/5(!). После распечатки статья должна быть вычитана автором (авторами). На последней ее странице должна(ы) быть подпись(и) автора(ов). Текст статьи идентично содержания представляется в электронном виде (по e-mail или на дискете) и на бумажном носителе в 2 экз. В виде отдельного документа представляются краткие сведения о каждом из авторов, включающие фамилию, имя, отчество, год рождения, сведения об образовании, служебные адреса, адрес электронной почты, ученую степень, ученое звание, должность, область научных интересов. Необходимо представить АКТ ЭКСПЕРТИЗЫ о возможности опубликования открытой печати (для статей) и РЕЦЕНЗИЮ на статью.

1. Сдаваемый документ должен быть представлен в электронном виде в формате MS-Word. Название файлов — фамилия первого автора латинскими буквами.

2. Формат бумаги А4 (297×210 мм), ориентация — книжная.

3. Поля: верхнее — 2,5 см, нижнее — 2,5 см, левое — 2,5 см, правое — 2,5 см.

4. Основной текст статьи набирается шрифтом Times New Roman, размером 12 пт, в одну колонку с одинарным межстрочным интервалом. Не допускается использование табуляции или пробелов для обозначения первой строки абзаца.

5. Автоматическая расстановка переносов обязательна.

6. Название статьи набирать полужирным начертанием шрифта по центру. Переносы в заголовках не допускаются.

7. Все таблицы, содержащиеся в документе, должны быть реализованы средствами работы с таблицами редактора MS-Word. Не допускается вложение таблиц, созданных в других программах. Таблицы и графики должны быть пронумерованы и иметь названия. Не допускается размещение таблиц и рисунков в конце статьи (непосредственно перед списком литературы).

8. Вставка в текст символов (например, β, €) производится только через опцию «Вставка\Символ». Выключку вверх и вниз (C², C₄) выполнять через меню «Формат\Шрифт\Верхний индекс\Нижний индекс». Греческие символы должны быть прямыми, латинские буквы набираются *курсивом*. Математические формулы (lim, sum, sin, и т.д.) и цифры набираются прямым начертанием.

9. Печатать в сложных словах дефис (минерал-индикатор, К-пространство). Тире отбивают с обеих сторон неразрывным пробелом как знак препинания между словами: система «человек — машина», «май — июнь». Тире между цифрами, напр., 20—30 чел. — не отбивается.

10. Кавычки по всему тексту должны быть одного «рисунка». Кавычки не отбивают от заключенных в них слов.

11. При подготовке к печати графиков, блок-схем, диаграмм, файлы должны быть поименованы таким образом, чтобы было понятно, к какой статье они принадлежат и какими по порядку рисунками статьи являются. Графики должны иметь толщину всех линий не менее 0,2 пункта для четкого воспроизведения. Все надписи на рисунках должны быть набраны на компьютере и сгруппированы с рисунком, не допускается использование сканированного текста.

12. Необходимо предоставить электронные файлы фотоматериалов, а также распечатки лазерным принтером всех иллюстраций на листе формата А4. Отсканированные фотоиллюстрации серой, черно-белой цветовой модели должны иметь разрешение 600 dpi и формат TIFF.

13. Список цитированных источников располагается в конце текста, ссылки нумеруются согласно порядку цитирования в тексте. Порядковые номера ссылок д.б. написаны внутри квадратных скобок. (напр.: [1]).

Научное издание

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Том 8

Ответственный за выпуск *И.В. Широкая*
Переводчик *Г.А. Мартысь*
Верстка *М.В. Сергеева*
Технический редактор *В.Г. Гавриленко*

Подписано в печать 19.12.2008. Формат 60x84 1/8 Бумага офсетная. Гарнитура Roman.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 22,5. Уч.изд. л. 22,7. Тираж 100 экз. Заказ №628
ИООО «Право и экономика» Лицензия ЛИ №02330/0056831 от 01.04.2004.
220072 Минск Сурганова 1, корп. 2. Тел. 284 18 66, 8029 684 18 66
Отпечатано на настольно - издательской системе XEROX в ИООО «Право и экономика»
Оригинал-макет подготовлен ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси».