

**ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПРИЗНАКОВ В ГИБРИДНЫХ
ПОПУЛЯЦИЯХ ЯЧМЕНЯ F_2 ПОД ВЛИЯНИЕМ
УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ
СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ F_1**

И.А. Епишко

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

(Поступила в редакцию 29.06.2013 г.)

Аннотация. В результате проведенных исследований экспериментально доказана индукция мутационной изменчивости и рекомбинации сцепленных генов при воздействии на сенсibilизированные гибриды ячменя F_1 ультрафиолетовой радиацией. Оптимизированы состав, концентрация, экспозиция воздействия сенсibilизаторов и параметры ультрафиолетового облучения на растения ячменя. Показана эффективность использования УФ-облучения сенсibilизированных гибридов F_1 для усиления изменчивости признаков и расширения спектра рекомбинантов в F_2 . Созданы перспективные рекомбинантные формы ячменя с комплексом хозяйственно-ценных признаков.

Summary. As a result of the conducted researches the induction of mutational variability and a recombination of the linked genes is experimentally proved at impact on sensitized hybrids of F_1 barley by ultra-violet radiation. The structure, concentration, exposition of influence of sensitizers and parameters of ultra-violet radiation on barley plants are optimized. Efficiency of use of UF-radiation of sensitized hybrids of F_1 for strengthening of variability of signs and expansion of a range of rekombinant in F_2 is shown. Perspective recombinant forms of barley with a complex of economic and valuable signs are created.

Введение. Экспериментальный муторекомбиногенез – направление исследований по искусственному изменению наследственного материала путем перемещения генов и фрагментов хромосом с целью получения хозяйственно-ценных форм. Все разнообразие живого мира на земле получено с помощью мутаций и рекомбинаций, т.к. они – изначальные источники любой изменчивости [1]. Впервые на важность рекомбиногенеза для селекции растений указал Л. Расмуссон, поэтому не зря шведский генетик А. Мюнтцинг назвал мейотическую рекомбинацию краугольным камнем селекции.

Несмотря на то что экспериментальный мутагенез и рекомбиногенез занимают важное место в исследованиях по генетике и селекции, тем не менее их эффективность все же недостаточна, особенно рекомбиногенеза, для широкого использования в практической селекции. Это объясняется как сложностью самой проблемы, так и технически сложными методами ее решения. Известно, что возможности экспери-

ментального рекомбиногенеза и особенно мутагенеза в простом, классическом их исполнении, во многом уже исчерпаны. Поэтому постоянно ведется поиск новых рекомбиногенно-мутагенных факторов и способов их воздействия на растения [2].

Методологической основой индуцированного рекомбиногенеза является возможность получения бесконечного сочетания генов в результате экспериментальных рекомбиногенных воздействий на гетерозиготный геном. Но для этого необходимы новые технологии, предусматривающие рекомбинационные воздействия на гибриды F_1 .

В настоящее время существует два основных подхода в индукции рекомбинаций и мутаций: 1 – под влиянием солей тяжелых металлов, антибиотиков, алкилирующих веществ и ряда других активных соединений [3]; 2 – под действием температуры, проникающей и ультрафиолетовой радиации [4].

Известно достаточно высокое мутагенно-рекомбиногенное действие проникающей радиации, изотопов и химических соединений. Но изотопы, ионизирующая радиация и химические мутагены опасны для человека, поэтому их использование требует соблюдения особых мер предосторожности. Наиболее приемлемым и технологичным для решения поставленных задач следует считать коротковолновую ультрафиолет, на который в последнее время стали все больше и больше обращать внимание. Мутагенное действие УФ-радиации впервые было открыто на *E. Coli* В. Генри в 1914 году, которое более чем в тысячу раз по сравнению со спонтанным уровнем повышали частоту появления мутантов [5].

А.А. Жученко показал, что даже простое УФ-облучение гибридов F_1 томатов приводит к увеличению частоты рекомбинации сцепленных генов в среднем в 1,7 раза при лимитах 1,3-2,4 раза, при этом продуктивность растений возрастает в 1,2-1,3, а дисперсия количественных признаков – в 1,5-1,8 раза [4]. Интересно, что при сравнении эффективности действия УФ-радиации гамма-лучей и нитрозометилмочевина на гибриды F_1 только при облучении ультрафиолетом в F_2 появляются положительные по уровню развития количественных признаков трансгрессии.

Многообещающим направлением создания мутантов и рекомбинантов является УФ-рекомбиногенез и мутагенез в культуре *in vitro*, когда молодые ткани эксплантов легко проницаемы для УФ-радиации. Усилить генетическое действие УФ-радиации можно в результате сенсибилизации ДНК специфическими химическими соединениями, например, галогенпроизводными азотистых оснований: 5-бромурацила (5-BrU) и 5-бромдезоксисуридина (5-BrUdR). Мутагенный эффект

5-BrU на бактериофагах открыли в 1955 году Р. Литман и А. Парди [6]. Вследствие присутствия атома брома 5-BrU легко переходит в енольную форму и «незаконно» спаривается с гуанином, азотистым основанием ДНК в момент ее редупликации, когда она становится доступной для него, что вызывает генные мутации. В связи с тем что наиболее высокой способностью среди галогенизированных аналогов азотистых оснований к спариванию с дезоксинуклеозидтрифосфатами обладает 5-BrU и 5-BrUdR, они в максимальной степени подходят для сенсбилизации ДНК гибридов.

Галогенпроизводные азотистых оснований легко включаются в клетки прокариот и эукариот, занимая место нуклеозида тимидина, особенно, когда подавлен его синтез [7]. Клетки при этом остаются жизнеспособными, но приобретают крайне высокую чувствительность к УФ и ионизирующим излучениям, что приводит к повышению частоты мутаций хромосом, причем разрывы отмечаются именно в местах включения 5-BrU или 5-BrUdR [8].

Несмотря на то что реакция галогенпроизводных оснований с ДНК химически высокоспецифична, из этого никак не следует, что будет индуцироваться только один тип мутаций или рекомбинаций. Вследствие того что специфика замещения будет проявляться не на генном уровне, а на химическом, модификации подвергнутся различные гены. При облучении такой сенсбилизированной ДНК будет индуцирован широкий спектр рекомбинаций и мутаций как база для отбора утилитарных форм.

Материалы и методика исследований. Исследования проводились с 2008 по 2011 годы в отделе генетики и биотехнологии РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию». ДНК-типирование источников устойчивости к мучнистой росе и полученных образцов проводилось в лаборатории нехомосомной наследственности ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси».

В качестве объекта исследования использовали сорта и образцы, маркированные качественными альтернативными признаками, а также гибриды F_1 – F_3 ячменя.

Дивосны (*Hordeum vulgare* L.) – неполегающий, низкорослый, высокопродуктивный. Колос двурядный, зерно крупное, пленчатое, желтой окраски, масса 1000 зерен 48-52 г.

Поспех (*Hordeum vulgare* L.) – неполегающий, среднерослый, высокопродуктивный. Колос плотный, двурядный, зерно средне-крупное, пленчатое желтой окраски, масса 1000 зерен 42-46 г.

К-24600 – короткостебельный, неполегающий, среднепродуктивный, голозерный. Колос многорядный, плотный, зерно мелкое, шаровидного типа, желтой окраски, высокобелковое.

К-2930 – среднерослый, склонный к полеганию, среднепродуктивный, голозерный. Колос многорядный, поникающий, зерно средней величины, фиолетовой окраски, высокобелковое.

ММС – гамма-мутант из сорта Сталы. Полукарлик, низкопродуктивный. Колос плотный, стебель многоузловый, лист узкий, зерно желтой окраски пленчатое, мелкое.

При проведении гибридизации в качестве материнских компонентов были использованы образцы Поспех и Дивосны, а в качестве отцовских – К-24600, К-2930 и ММС (таблица 1).

Таблица 1– Схема скрещиваний

♀	♂ К-24600	♂ К-2930	♂ ММС
Поспех	×	×	×
Дивосны	×	×	×

Кастрация материнских цветков проводилась удалением пыльников, а опыление – твел-методом. По каждой комбинации получали не менее 150 гибридных зерновок. Для ускорения селекционного процесса зерновки на 14-19 день после опыления извлекли из колоса и их зародыши высадили в условиях *in vitro* на питательную среду Р-8. Половину растений полученных в культуре *in vitro* на стадии 2-3 листьев подвергали сенсibilизации в течение 22 часов. Вторую половину растений использовали в качестве контроля.

Для сенсibilизации использовали композиционную смесь из 5-BrU, 5-BrUdR, ингибитора синтеза тимина в водном растворе и ДМСО для повышения проницаемость мембран. Сенсibilизированные проростки с целью индукции генетических изменений в течение одного часа были облучены в экспериментальной УФ-установке [9].

В F₁ определили выживаемость растений, а по результатам биометрического анализа растений по высоте и элементам продуктивности определили интегрирующую величину DS средних значений, а в F₂ – DS дисперсии признаков, частоту и степень положительных трансгрессий [2, 10].

Контролем служили растения F₁, полученные из зародышей в культуре *in vitro*, без сенсibilизации и УФ-облучения.

Результаты исследований и их обсуждение. Для научно-методического обоснования использования ДНК-тропных соединений были получены спектры поглощения водных растворов ряда ДНК-сенсibilизаторов и их композиционной смеси (рисунок 1).

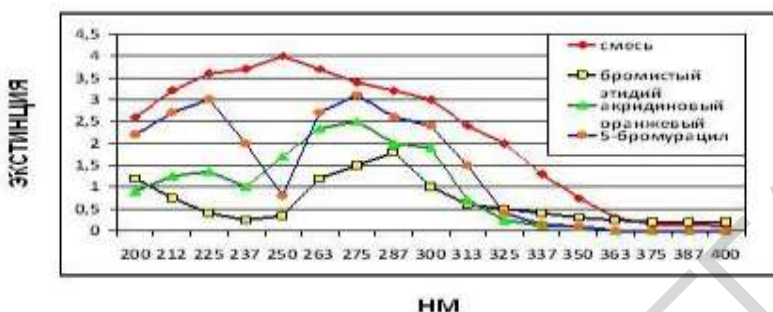


Рисунок 1 – Спектры поглощения водных растворов красителей

Характерной особенностью этих соединений является интенсивное поглощение в широкой полосе ультрафиолетового спектра, так называемых белково-нуклеиновых максимумах. Спектры 5-бромурацила и 5-бромдезоксиуридина оказались идентичны. Важно, что максимум и широкая плавная кривая поглощения композиционной смеси полностью закрывает пики поглощения всех четырех азотистых оснований.

Оценка выживаемости гибридных растений, прошедших через культуру *in vitro* (контрольный вариант) и сенсбилизацию-облучение (опытный вариант), показала, что проведенные манипуляции достоверно не повлияли на жизнеспособность растений F_1 , то есть из гибридной популяции не произошло искусственной элиминации генотипов, что было бы очень нежелательно (таблица 2).

Таблица 2 – Влияние УФ-облучения и сенсбилизации растений F_1 *in vitro* на выживаемость и характер расщепления по качественным признакам в F_2 (%)

Комбинация	Выживаемость	Многорядный	Двурядный	Пленчатый	Голозерный	Желтый	Фиолетовый
Контроль							
Поспех × К-24600	92,4	23,7	74,8	79,1	23,3	31,2	70,6
Опытный вариант							
Поспех × К-24600	90,3	46,7	53,9	85,2	12,9	45,8	55,6
Контроль							
Дивосны × К-2930	87,5	20,7	78,8	71,3	26,8	23,8	74,1
Опытный вариант							
Дивосны × К-2930	88,3	34,5	62,1	58,7	40,1	15,2	83,9

Анализ расщепления качественных признаков в гибридной популяции F_2 показал, что частота проявления растений с маркерными при-

знаками существенно изменилась. Значит под влиянием УФ-радиации и сенсбилизаторов произошли определенные изменения в геноме растений, хотя их конкретный характер точно определить не представляется возможным. Можно предположить, что это могут быть рекомбинации, изменяющие группы сцепления признаков (генов), эффекты положения генов и их иное проявление в другой генотипической среде, что и привело к изменению характера расщепления [11].

Анализ изменчивости количественных признаков в F_1 показал, что сенсбилизация и УФ-облучение не привело к существенному ингибированию высоты растений и элементов продуктивности, хотя при этом отмечена некоторая генотипическая специфика (таблица 3). Так, в комбинации Дивосны \times ММС отмечена незначительная депрессия в развитии количественных признаков. Интересным является то, что экспериментальные воздействия привели к увеличению продуктивного потенциала практически во всех комбинациях. Интересно было бы проследить, не возрастает ли дисперсия признаков? Априори можно предположить, что возрастание абсолютной величины признака, например числа зерен или их крупность, приведет к возрастанию их дисперсии и желательной правой ветви Гаусовского распределения – положительный вариант. Это является очень важным моментом, так как для полного проявления всевозможных сочетаний признаков необходимо максимальное количество потомков от индивидуальных гибридных растений F_1 и отсутствие депрессивных эффектов, которые могут проявиться в потомстве, и маскировать трансгрессивные генотипы F_2 .

Таблица 3 – Выраженность количественных признаков у сенсбилизировано-облученных гибридов ячменя в F_1

Комбинация, вариант опыта	Высота растения, DSX%	Длина колоса, DSX%	Число зерен, DSX%	Масса зерна с колоса, DSX%	Масса 1000 зерен, SX%
Поспех \times К-24600	-3,4	1,2	-2,7	0,9	9,9*
Поспех \times К-2930	1,2	2,6	7,6	-1,2	6,5
Поспех \times ММС	2,3	4,8	4,4	-1,2	5,6
Дивосны \times К-24600	4,8	-2,6	5,3	3,9	8,6*
Дивосны \times К-2930	-2,7	-1,9	4,4	5,3	7,9
Дивосны \times ММС	-6,8	-2,7	-2,4	-1,9	0,8

*– достоверно отличие от контроля при $P_{0,05}$

Анализ развития и изменчивости количественных признаков у растений гибридно-рекомбинантных популяций F_2 показал практически во всех комбинациях возрастание средних значений и дисперсии основных элементов продуктивности (таблица 4). Также практически по всем признакам, и во всех комбинациях, выявлены положительные трансгрессии. В данном случае трудно сказать – это результат транс-

грессивной или мутационной изменчивости. Тем не менее по таким важным селектируемым признакам, как число зерен в метелке, ее продуктивность и крупность зерна, частота проявления положительных трансгрессий достигала 9-13%, а степень их выраженности 21-25%. Увеличение средних значений и значительное возрастание изменчивости ведущих селектируемых признаков наряду с достаточно высокой частотой появления и степенью выраженности положительных трансгрессий указывает на экспериментально созданное рекомбинационно-популяционное поле для отбора продуктивных форм.

Достигнутое изменение частоты расщепления по качественным признакам указывает на достаточно интенсивное протекание в популяции мутационных и рекомбинационных процессов, индуцированных ультрафиолетовым облучением. На это указывает также возрастание размаха изменчивости количественных признаков и появление с достаточно высокой частотой положительных трансгрессий, являющихся наиболее важным показателем в селекционной практике.

Большинство отобранных в F₂ трансгрессивных генотипов по элементам продуктивности в F₃ подтвердили наследование признаков, по которым они были идентифицированы. Из отобранных генотипов была сформирована коллекция перспективных форм для их улучшения, так как они поражались мучнистой росой.

Таблица 4 – Влияние сенсбилизации и УФ-облучения растений F₁ на выраженность и изменчивость элементов продуктивности у растений ячменя в F₂ поколении

Гибридная комбинация	Масса зерна с растения			Число зерен в колосе			Масса зерна с колоса			Масса 1000 зерен		
	DSX, %	S σ^2 , %	Tч, %	DSX, %	S σ^2 , %	Tч, %	DSX, %	S σ^2 , %	Tч, %	DSX, %	S σ^2 , %	Tч, %
П×К-24600	8,9*	78,5	8,8	24,5*	56,7*	7,5	13,8	56,4*	12,8	9,9	76,4	7,7
П×К-2930	2,3	56,9	2,1	13,6	49,4*	6,7	7,9	78,2*	9,5	5,8	67,5	8,6
П×ММС	-1,3	68,7*	3,4	0,2	45,3	2,2	-2,7	65,5*	2,1	-3,3	35,4	0,0
Д×К-24600	9,5	46,3*	5,9	18,7*	35,8*	9,9	13,2	74,8*	5,6	7,6	77,1	7,5
Д×К-2930	3,2	54,1	6,5	13,2	77,5	7,7	29,6*	75,9*	13,1	6,9	66,5	9,7
Д×ММС	-3,4	55,8*	3,2	-2,4	23,5	0,0	-3,9	18,5	0,0	-4,2	23,8	0,0

П - Поспех, Д - Дивосны, Тч - частота положительных трансгрессий

*- достоверность различия с контролем при P_{0,05}

Поэтому дальнейшая работа велась по приданию лучшим рекомбинантам устойчивости к мучнистой росе. Для этого были взяты образцы ячменя, устойчивые к мучнистой росе с эффективным геном mlo. Образцы были высеяны в тепличных и полевых условиях, проверены на устойчивость к мучнистой росе путем искусственного зараже-

ния в фазе 2-3-х листьев, кушения, выхода в трубку и колошения. Для этого предварительно были отобраны листья с сильно пораженных растений, после чего они помещались под пакетом на тестируемые растения для создания условий повышенной влажности. Наиболее хорошие результаты показали Saloon (*mlo*), К-30223 (*mlo9*) и К-30225 (*mlo11*), на которых не было отмечено ни одного очага заражения на всех стадиях развития. Выделенные образцы были скрещены с перспективными трансгрессивными рекомбинантами – VSU (таблица 5).

Таблица 5 – Схема скрещивания перспективных рекомбинантов с образцами ген-источниками устойчивости к мучнистой росе

Рекомбинант VSU ♀	♂ Saloon (<i>mlo</i>)	♂ К-30223 (<i>mlo9</i>)	♂ К-30225(<i>mlo11</i>)
Дивосны × К-24641	×	×	×
Дивосны × К- 24600	×	×	×
Дивосны × К -2930	×	×	×

Из популяций F₂, полученных с участием этих форм ячменя, отбрали положительные трансгрессии по продуктивности. В дальнейшем предполагается оценка выделенных форм в теплице на устойчивость к мучнистой росе путем искусственного заражения и диагностика наличия гена устойчивости *mlo* в рекомбинантах при помощи ПЦР анализа. Продолжением этой работы будет сравнительная оценка идентификации иммунных к этой болезни форм ячменя традиционным методом инфекционного заражения и методом ДНК-типирования по таким показателям как точность, надежность диагностики и экономическая эффективность методов.

Заключение. 1. Оптимизированы для гибридных растений F₁ ячменя состав, концентрация и экспозиция сенсбилизаторов, а также параметры ультрафиолетового облучения.

2. Экспериментально доказано влияние сочетанного действия сенсбилизации и УФ-радиации на генетическую структуру гибридных популяций F₂ ячменя, выразившееся в изменение характера расщепления по качественным признакам, возрастании дисперсии количественных признаков и индукции положительных трансгрессий.

3. Выделены трансгрессивные по продуктивности формы ячменя, являющиеся генетической основой для создания высокопродуктивных, устойчивых к мучнистой росе генотипов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Левонтин, Р. Генетические основы эволюции / Р. Левонтин. – Москва: Мир, 1978. – 451с.
2. Шишлов, М.П. Модификация мутационного процесса в облученных семенах овса (*Avena sativa L.*) и ячменя (*Hordeum vulgare L.*) / М.П. Шишлов // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2007. – № 1. – С. 41–48.

3. Дишлер, В.Я. Индуцированный рекомбиногенез у высших растений / В.Я. Дишлер. – Рига: Зинатне, 1983. – 222с.
4. Жученко, А.А. Рекомбинация в эволюции и селекции / А.А. Жученко, А.Б. Король. – Москва, 1985. – 400с.
5. Стент, Г. Молекулярная генетика / Г. Стент. – Москва, 1974. – 386с.
6. Дэвидсон, Дж. Биохимия нуклеиновых кислот / Дж. Дэвидсон. – Москва, 1976. – 412с.
7. Дубинин, Н. П. Потенциальные изменения в ДНК и мутации / Н.П. Дубинин. // Молекулярная цитогенетика. – Москва, 1978. – 246с.
8. Томилин, Н. В. Генетическая стабильность клетки / Н.В. Томилин. – Ленинград, 1983. – 223с.
9. Шишлов М.П. Мутагенез и рекомбиногенез сельскохозяйственных растений / М. Шишлов, А. Шишлова, Н. Шишлова, С. Добровольский, В. Кубарев // Наука и инновации. – 2009. – №7. – С.29-33.
10. Воскресенская, Г.С. Трансгрессия признаков у гибридов *Brassica* и методы количественного учета этого явления / Г.С. Воскресенская, В.И. Шпота // Доклады ВАСХНИЛ. – 1967. – № 7. – С. 18 – 20.
11. Шишлов М.П., Шишлова А.М., Епишко И.А. Индуцированный УФ-рекомбиногенез и мутагенез с.-х. растений – важный резерв повышения эффективности селекционного процесса//Сб. науч. трудов «Земледелие и селекция в Беларуси» Мн. 2012. в. 48. стр. 304-314.

УДК: 633.853.494 (476)

ПРИМЕНЕНИЕ СТИМУЛЯТОРА РОСТА РАЙКАТ НА ПОСЕВАХ ОЗИМОГО РАПСА

Г.А. Жолик¹, А.М. Луковец¹, М.Г. Жолик²

¹ – УО «Гродненский государственный аграрный университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь

² – УО «Белорусский государственный аграрный технический
университет»,
г. Минск, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 29.06.2013 г.)

Аннотация. Установлено положительное влияние стимулятора роста растений Райкат на зимостойкость озимого рапса, завязываемость плодов и сохраняемость их к уборке. Наиболее высокая урожайность семян озимого рапса получена при комплексном применении препарата (Райкат Старт осенью в фазе 2-4 настоящих листьев, 1 л/га + Райкат Развитие весной в начале бутонизации, 1 л/га) – 5,02 т/га.

Summary. The positive effect of plant growth stimulant Raykaton for winter rape hardness, fruit-setting and their preservation ability for harvesting has been revealed. The highest crop yield of winter rape seeds has been obtained by combined application of the agent (Raykat. Start in the autumn phase of 2-4 true leaves, 1 l/ha + Raykat. Growth in early spring budding 1 l/ha) – 5,02 t/ha.