

DOI: 10.24411/2309-348X-2019-11107

УДК 633.14:630.165.41

СЕЛЕКЦИЯ ВОССТАНОВИТЕЛЕЙ МУЖСКОЙ ФЕРТИЛЬНОСТИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГИБРИДОВ F₁ ОЗИМОЙ РЖИ

А.А. ГОНЧАРЕНКО, академик РАН

А.В. МАКАРОВ, доктор сельскохозяйственных наук

С.А. ЕРМАКОВ, Т.В. СЕМЕНОВА, В.Н. ТОЧИЛИН, Н.В. ЦЫГАНКОВА, кандидаты сельскохозяйственных наук, **О.А. КРАХМАЛЕВА**

ФГБНУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «НЕМЧИНОВКА»»

E-mail: goncharenko05@mail.ru

В селекции озимой ржи на основе ЦМС широко используется стерильная цитоплазма Р-типа, отличительной особенностью которой является низкая частота восстановителей фертильности. Это создает определенные трудности в селекции гибридной ржи. Целью проведенных исследований было выявление новых эффективных восстановителей мужской фертильности в стерильной цитоплазме Ратра-типа. Оценивали индекс восстановления фертильности (RI) у тесткроссов, полученных от скрещивания 16 двухлинейных синтетиков и 21 инбредной линии с линией Н-1185, взятой в качестве ЦМС – тестера. У тесткроссов с участием инбредных линий индекс RI варьировал от 8,4 до 86,1%, а у тесткроссов с участием синтетиков – от 12,2 до 90,0%. Установлено, что большинство изучаемых синтетиков и инбредных линий лишь частично восстанавливали мужскую фертильность в тестовых скрещиваниях. Почти полное восстановление пыльцевой фертильности (на уровне $RI \geq 67\%$) показали только 7 синтетиков из 16 и 2 инбредные линии из 21. Особого внимания заслуживают синтетики С-8090/12 ($RI=90,0\%$) и С-8082/12 ($RI=88,4\%$), а также линии Н-663 и Н-649, оказавшиеся частичными восстановителями фертильности. Они представляют интерес для селекции пыльцевых родителей коммерческих гибридов. Выделены линии Н-451, Н-732 и Н-1185, которые показали почти полное закрепление стерильности ($RI = 0,9...1,6\%$). Обсуждаются перспективы их использования в селекции гибридной ржи.

Ключевые слова: гибридная рожь, синтетик, инбредная линия, цитоплазматическая мужская стерильность, восстановитель фертильности, закрепитель стерильности, индекс восстановления.

Озимая рожь является единственной колосовой культурой, у которой реально достижимо использование эффекта гетерозиса. Однако начало гибридной селекции озимой ржи на основе цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) было положено недавно, всего лишь 50 лет назад [1]. Первые гетерозисные гибриды ржи были получены в Германии в 1980-х годах. Их внедрение позволило резко повысить урожайность культуры и эффективно решить многие другие задачи селекции: улучшить устойчивость к полеганию, снизить поражение болезнями, повысить качество зерна. Явное преимущество гибридов явилось причиной постоянного сдвига соотношения между сортами и гибридами в пользу более урожайных гибридов, площадь под которыми в мире приближается к 1 млн. га [2, 3].

В селекции гибридной ржи существенно важно иметь материалы с двумя эффективно работающими механизмами: 100%-ной цитоплазматической мужской стерильностью и 100%-ной способностью пыльцевого родителя восстанавливать мужскую фертильность в стерильной цитоплазме. В общебиологическом плане явление ЦМС представляет собой мутацию ДНК в геноме клеточных органелл – митохондрий, находящихся в цитоплазме. Эта мутация вызывает дегенерацию андроеца цветка, которая проявляется либо в дегенерации пыльников, либо в их нераскрытии, либо в продуцировании нежизнеспособной пыльцы. Фертильность растений восстанавливается (полностью или частично) при наличии в клеточном ядре доминантного аллеля гена-восстановителя фертильности (т.н. Rf-гена).

Генотипы, имеющие в цитоплазме мутантные митохондрии и являющиеся гомозиготами по рецессивному аллелю rf , являются мужски стерильными, тогда как все остальные являются мужски фертильными [4].

В селекции гибридной ржи наиболее широкое применение получила мужски стерильная цитоплазма Р-типа, обнаруженная в популяции аргентинского сорта Пампа. Было показано [5], что мужская стерильность в цитоплазме Р-типа контролируется двумя парами независимых рецессивных генов и имеет формулу: (S) rf_1rf_2 . Для этого типа цитоплазмы характерна высокая частота закрепления стерильности, но очень редко встречаются восстановители фертильности. Отличительной особенностью цитоплазмы Р-типа является то, что по отношению к ней гены-восстановители фертильности (Rf) у большинства европейских сортов ржи встречаются с низкой частотой (3,5%), а гены-закрепители стерильности (rf) – с высокой частотой (85%) [6]. Это создает определенные трудности при селекции гибридных сортов на основе цитоплазмы Р-типа.

Суть проблемы в том, что при неполном восстановлении фертильности и недостаточном пыльцеобразовании гибриды F_1 ржи могут сильно поражаться спорыньей, из-за чего полученное зерно не может быть использовано в хозяйственных целях. Первая линия-восстановитель для цитоплазмы Р-типа (L-18) была получена проф. Г.Г. Гайгер в Германии [7], но она не получила широкого использования в селекции из-за недостатков по ряду признаков. Это побудило развернуть поиски новых эффективных источников восстановителей фертильности [8, 9]. Немецкие исследователи Т. Miedaner et al. [10] сообщают, что ими были обнаружены в примитивных сортообразцах ржи из Ирана и Аргентины генотипы с сильным восстановлением фертильности пыльцы. Было установлено, что эти источники несут 2 сильных гена-восстановителя Rfp1 и Rfp2, которые обеспечивают 59-68% фенотипического варьирования по пыльцеобразованию. Методом маркер-опосредованного беккроссинга новые гены-восстановители были переданы в генотипы синтетиков-опылителей некоторых перспективных гибридов. Так был получен первый гибрид Pollino (plus), несущий сильные гены-восстановители. Испытания показали, что гибриды с улучшенным пыльцевым родителем имеют лучшую пыльцевую продуктивность и меньше поражаются спорыньей. В то же время были выявлены их слабые места: они оказались менее устойчивыми к полеганию и менее урожайными по зерну [11]. Поэтому поиск новых эффективных генов-восстановителей является важной селекционной задачей.

Цель исследований – оценить уровень восстановления мужской фертильности у тестовых гибридов озимой ржи и выявить генотипы, эффективно восстанавливающие мужскую фертильность в стерильной цитоплазме Р-типа.

Методы исследования

Исходным материалом для исследований послужили две группы материалов: двухлинейные синтетики Rf и перспективные инбредные линии озимой ржи глубокого инцухта. В таблице 1 показаны исходные родительские формы, на базе которых были созданы изучаемые синтетики. Первоначально было отобрано 5 сортообразцов (Валдай, Популяция 56, ГК-1205, Популяция 11/92, S. *iranicum*), которые по предварительным оценкам могли быть носителями генов Rf. На первом этапе провели тестовые скрещивания этих предполагаемых Rf-источников с ЦМС-тестером, в качестве которого использовали материнскую форму гибрида НПВ-3. На втором этапе в потомстве тесткроссов провели поиск растений с восстановленной фертильностью и подвергли их 2-3-кратному самоопылению. В итоге на базе этих частично инбредных линий сформировали 16 двухлинейных синтетиков, представляющих интерес для поиска эффективных генов-восстановителей.

Вторую часть наших материалов составили 15 перспективных гомозиготных линий, ранее прошедших предварительную оценку на общую и специфическую комбинационную способность в топкроссных и диаллельных скрещиваниях. Для эффективного использования их в гибридной селекции очень важно знать их восстановительную и закрепительную способность в цитоплазме Р-типа.

Таблица 1

Исходные родительские формы и этапы работ при создании 16 синтетиков Rf

№ п/п	Первый этап	Второй этап	Синтезированные синтетики Rf
	Тестовые скрещивания: CMS-t x Rf-источник	Скрещивание линий S ₂ - S ₃ , полученных на базе восстановленных растений	
1	CMS-t x Популяция 56	НВ-12-15 x НВ-12-11	C-8082/12
2	CMS-t x Популяция 56	НВ-12-19 x НВ-12-10	C-8084/12
3	CMS-t x Валдай	НВ-14-7-4 x НВ-14-7-13	C-8088/12
4	CMS-t x Валдай	НВ-14-7-22 x НВ-14-7-23	C-8090/12
5	CMS-t x Валдай	НВ-14-7-32 x НВ-14-7-28	C-8091/12
6	CMS-t x Валдай	НВ-14-7-17 x НВ-14-7-30	C-8092/12
7	CMS-t x S.iranicum	НВ-15-16-3 x НВ-15-16-7	C-8093/12
8	CMS-t x S.iranicum	НВ-15-16-9 x НВ-15-16-12	C-8094/12
9	CMS-t x S.iranicum	НВ-15-16-20 x НВ-15-16-21	C-8095/12
10	CMS-t x S.iranicum	НВ-15-16-31 x НВ-15-16-27	C-8096/12
11	CMS-t x ГК-1205	НВ-16-9-10 x НВ-16-9-3	C-8087/12
12	CMS-t x Популяция 11/92	НВ-17-3 x НВ-17-1	C-8097/12
13	CMS-t x Популяция 11/92	НВ-17-5 x НВ-17-4	C-8098/12
14	CMS-t x Популяция 11/92	НВ-17-9 x НВ-17-6	C-8099/12
15	CMS-t x Популяция 11/92	НВ-17-12 x НВ-17-10	C-8100/12
16	CMS-t x Популяция 11/92	НВ-17-13 x НВ-17-20	C-8101/12

Тестовые скрещивания вышеуказанных 16 синтетиков и 15 инбредных линий провели в 2016 г. по схеме cms x mf. В качестве ЦМС-тестера использовали стерильный аналог линии Н-1185. Технология их проведения состояла в помещении под пергаментный изолятор по 3-4 колоса от стерильного и фертильного растений. Одновременно на отцовском растении каждой пары 2-3 колоса самоопыляли, чтобы сохранить генотип последнего. Гибридные семена от каждой пары высевали в поле для оценки на степень стерильности пыльцы, а семена от самоопыления резервировали. Посев проводили сеялкой Plotseed на 2-х рядковых делянках длиной 1 м, на каждую делянку высевали по 100 зерен. На каждой делянке отбирали 10 хорошо раскустившихся растений и на каждом из них 2 колоса помещали под целлофановый изолятор. Благодаря этому во время цветения пыльники и пыльца не теряются, а остаются внутри изолятора, их можно хорошо рассмотреть и оценить генотип по количеству образуемой пыльцы и степени дегенерации пыльников.

В 2017 г. по изложенной выше методике были проведены тестовые скрещивания 6 других мужски фертильных инбредных линий с тем же ЦМС – тестером Н-1185. Изучали фертильные аналоги линий: Н-451, Н-577, Н-649, Н-663, Н-732, Н-1185. Парные скрещивания стерильных и фертильных растений проводили зимой в условиях теплицы с одновременным самоопылением 2-3 колосьев на фертильных растениях. Всего было получено 260 пар, в среднем по 40-45 пар на каждую линию. Оценку восстановительной способности проводили в полевых условиях в 2018 году, просматривая цветущие колосья тестовых гибридов под целлофановым изолятором.

Оценку мужской стерильности проводили путем визуального осмотра пыльников и оценки степени их стерильности по методике Н. Geiger und К. Morgenstern [12]. Интервал по степени стерильности растений включал три класса: стерильные (ms), полустерильные (pms) и фертильные (mf), а по степени стерильности пыльников варьировал от 1 до 9 баллов: балл 1 – пыльники сильно дегенерированные, тонкие, короткие, не растрескиваются, пыльца отсутствует; балл 9 - пыльники крупные, длинные, толстые, содержат много пыльцы, сильно пылят и почти не отличаются от растений с нормальной цитоплазмой. Индекс восстановления фертильности рассчитывали по формуле, предложенной Н.Н. Geiger et al. [13]:

$$RI = 100 (AxV-3) / 6,$$

где AxV – средневзвешенный балл стерильности пыльников по 9-балльной шкале.

Лучшим восстановителем фертильности считался тот генотип, тесткроссы которого с ЦМС-тестером не содержали в себе стерильных и полустерильных растений, а полностью состояли из фертильных растений, у которых пыльники оценивались баллами 7, 8 и 9, т.е. имели индекс $RI = 67\%$ и выше.

Результаты и обсуждение

Результаты оценки восстановительной способности тесткроссов, полученных с участием 16 синтетиков Rf и 15 инбредных линий представлены в таблице 2.

Таблица 2

Оценка восстановительной способности у 16 синтетиков Rf и 15 инбредных линий озимой ржи (RI, %), 2017 г.

Синтетики Rf		Инбредные линии	
C-8082/12 = 88,4*	C-8095/12 = 44,5	H-649 = 30,0	H-1099 = 47,7
C-8084/12 = 77,7*	C-8096/12 = 78,9*	H-700 = 52,6	H-1185 = 8,4 **
C-8087/12 = 71,1*	C-8097/12 = 78,3*	H-842 = 9,9**	H-1190 = 77,2*
C-8088/12 = 58,9	C-8098/12 = 79,4*	H-1011 = 26,6	H-1238 = 60,0
C-8090/12 = 90,0*	C-8099/12 = 51,1	H-1054 = 52,0	H-1247 = 8,9**
C-8091/12 = 12,2	C-8100/12 = 65,0	H-1058 = 44,4	H-1423 = 55,6
C-8092/12 = 17,2	C-8101/12 = 52,1	H-1071 = 45,2	H-1432 = 86,1*
C-8093/12 = 53,9	Среднее: 60,6	H-1074 = 61,7	Среднее: 43,1
C-8094/12 = 51,0	Cv= 37,1%		Cv= 54,8%
* – восстановитель фертильности		** – закрепитель стерильности	

Обращает на себя внимание большая вариация тесткроссов по степени стерильности пыльников. У тесткроссов с участием синтетиков Rf среднее значение индекса RI составило 60,6%, а коэффициент вариации Cv – 37,1%. Для тесткроссов с участием инбредных линий эти величины составили соответственно 43,1% и 54,8%. Неоднозначность этих данных можно объяснить существенным влиянием генотипа восстановителя. В целом инбредные линии обладали более низкой способностью восстанавливать фертильность, чем изучаемые синтетики Rf, но тесткроссы с их участием сильнее варьировали по индексу RI , что и следовало ожидать.

В наших опытах почти полную восстановительную способность в стерильной цитоплазме Р-типа показали 7 синтетиков из 16. Особого внимания заслуживают синтетики C-8090/12 ($RI=90,0\%$) и C-8082/12 ($RI=88,4\%$), которые получили донорские гены Rf соответственно от сорта Валдай и Популяции 56. У остальных синтетиков уровень восстановления был ниже и варьировал от 12,2 до 65,0%. Важно отметить, что у всех исходных образцов, взятых нами априорно как вероятные носители генов Rf, это предположение подтвердилось. Среди изучаемых инбредных линий почти полными восстановителями фертильности оказались 2 линии из 15, что составляет 13,3%. Таковыми оказались линии H-1432 ($RI=86,1\%$) и H-1190 ($RI=77,2\%$). Этот уровень восстановительной способности можно оценить как удовлетворительный, что позволяет использовать эти генотипы для синтеза синтетиков-восстановителей. Остальные линии лишь частично восстанавливали мужскую фертильность растений тестовых гибридов. Наиболее низкой восстановительной способностью обладали линии H-1185 ($RI=8,4\%$), H-1247 ($RI=8,9\%$) и H-842 ($RI=9,9\%$). Эти линии оказались почти полными закрепителями стерильности, а содержащиеся в них гены Rf трудно восстанавливают фертильность в цитоплазме Р-типа. Благодаря этому свойству они могут быть использованы как эффективные CMS-тестеры при оценке на высокое восстановление. В целом же изучаемые линии по величине восстановительного индекса можно разделить на три группы: слабые, средние и сильные восстановители. Вероятно, такая градация обусловлена тем, что тестируемые линии имеют различное число и частоту генов, ответственных за восстановление фертильности.

Результаты оценки восстановительной способности тесткроссов, полученных на базе 6 перспективных инбредных линий, представлены в таблице 3.

Таблица 3

Индекс восстановления (RI, %) у тесткроссов, полученных с участием 6 инбредных линий озимой ржи (2018 г.)

Линии	Число учетных растений	Значение индекса RI			Число пар с индексом RI>67%	
		минимальное	максимальное	среднее	шт.	%
Н-451	95	0	16,5	1,6	0	0
Н-577	177	0	58,4	12,8	1	2,5
Н-649	221	0	83,3	32,9	10	21,7
Н-663	159	0	93,3	48,2	18	50,0
Н-732	178	0	11,1	0,9	0	0
Н-1185	379	0	13,3	1,2	0	0

Как видно, наиболее сильно индекс RI варьировал у тесткроссов с участием двух линий: Н-663 (от 0 до 93,3%) и Н-649 (от 0 до 83,3%). Это значит, что генотипы этих линий содержат гены, способные восстанавливать фертильность пыльников от 0 до 7-8-9 баллов. Частота генотипов с такой восстановительной способностью у линии Н-663 составила 52,8%, а у линии Н-649 – 28,1%. Из этого следует, что указанные линии являются частичными восстановителями и могут быть использованы как доноры эффективных генов-восстановителей фертильности. Используя резервные семена от самоопыления, можно увеличить полноту восстановления фертильности у этих линий до уровня 100%, одновременно улучшив стабильность восстановления в разные по погодным условиям годы. Выявление таких линий важно также с точки зрения необходимости накопления в отцовском генопуле создаваемых гибридов новых сильных генов-восстановителей различного происхождения. Считается, что включение новых генов-восстановителей обеспечит селекционный прорыв в улучшении фертильности гибридов ржи, создаваемых на основе ЦМС Р-типа [14].

Заслуживают внимания также линии с очень низким индексом RI. В наших опытах таковыми оказались линии Н-451, Н-732 и Н-1185, которые показали почти полное закрепление стерильности (средний индекс RI у них варьировал от 0,9 до 1,6%). Они представляют интерес для использования в качестве родительских форм будущих ЦМС простых гибридов.

Заключение

Мужская стерильность в мутантной цитоплазме Р-типа относительно легко закрепляется и сохраняется, но ее трудно перевести в фертильное состояние. У изученных нами тесткроссов индекс восстановления фертильности варьировал в широких пределах – от 0 до 93,3%. Главной причиной этой вариации явился генотип фертильных родителей. По способности к восстановлению их можно разделить на три группы: слабые, средние и сильные. Большинство изученных нами синтетиков и инбредных линий оказались частичными (т.е. слабыми и средними) восстановителями. Почти полное (сильное) восстановление пыльцевой фертильности (RI≥67%) показали только 7 синтетиков из 16 и 2 инбредные линии из 21. Они представляют селекционный интерес для улучшения пыльцевых родителей коммерческих гибридов. Однако для этого необходимо изучить их способность к универсальному восстановлению фертильности в более широком наборе ЦМС-тестеров, несущих цитоплазму Р-типа. Большой научный интерес представляет также оптимизация синтетиков-восстановителей на генетическом уровне, т.е. выяснить вопрос о том, достаточно ли одного главного гена Rf для полного восстановления фертильности или же лучше объединить все другие гены-восстановители в один пирамидальный пул. Эти и другие вопросы требуют дальнейшего изучения.

Литература

1. Geiger H.H., Schnell F.W. Cytoplasmatic male sterility in rye (*Secale cereale* L.) // Crop Sci. 1970, 10, 590-593.
2. Schlegel R. Selection of hybrid forms as incentive of development of molecular and genetic researches in rye // Vavilovsky journal of genetics and selection. – 2015, 19, No. 5, 589-603.
3. Urban E. P., Gordey S. I. Selection and problems of cultivation of heterosis hybrids F_1 of winter rye in Republic of Belarus / News national academician science of Belarus. – 2018. 56, No. 4, 448-455.
4. Becker H. Pflanzenzuchtung. 2. Auflage, Ulmer UTB, Stuttgart, – 2010, 368.
5. Geiger H.H. Cytoplasmatisch-genische Pollensterilität in Roggenformen iranischer Herkunft // Naturwissenschaften, – 1971, 58, 98-99.
6. Madej L., Osinski R., Jagodzinski J. Ocena plodnosci mieszanow zyta // Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roslin, – 1995, 195/196, 283-290.
7. Geiger H.H. Wiederherstellung der Pollenfertilität in cytoplasmisch männlich sterilem Roggen // Theor. and Appl.Genet., 1972, 42, 32-33.
8. Kolasinska I., Maluszynska E. Factors influencing the ergot infection of male sterile rye//. Phytopatol. Pol. 2004. 31, 15-24.
9. Kolasinska I. Identifikacja genow przwracajacych plodnos mieszanow z cytoplazma Pampa w srobie linii wsobnych zyta o roznym pochodzeniu // Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roslin. 2011, NR 260/261, 241-249.
10. Miedaner T., Glass C., Dreyer F., Wilde P., Wortman H., Geiger H.H. // Mapping of genes for male-fertility restoration in «Pampa» CMS winter rye (*Secale cereale* L.) // Theor.Appl.Genet., – 2000, Vol.101, 8, 1226-1233.
11. Miedaner T., Wilde P., Wortmann H. Combining ability of non-adapted sources for male-sterility restoration in Pampa CMS of hybrid rye // Plant Breeding, – 2005, 124, 1, 39-43.
12. Geiger H.H., Morgenstern K. Angewandt-genetische Studien zur cytoplasmatischen Pollensterilität bei Winterroggen // Theor.Appl.Genet., – 1975, 46, 269-276.
13. Geiger H.H., Yuan Y., Miedaner T., Wilde P. Environmental sensitivity of cytoplasmic genic male sterility (CMS) in *Secale cereale* L. // In: Genetic Mechanisms for Hybrid Breeding. Adv. Plant. Breed., – 1995, 18, 7-11.
14. Kolasinska Irena. Postep w hodowli komponentow ojcowskich odmian mieszanow zyta o wysokiej zdolnosci przywracania meskiej plodnosci w cytoplazmie Pampa // Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roslin. – 2017, NR 281, 37-46.

THE BREEDING OF RESTORATORS MALE FERTILITY FOR RECEIVING HYBRIDS F_1 OF WINTER RYE

A.A. Goncharenko, A.V. Makarov, S.A. Ermakov, T.V. Semenova,
V.N. Tochilin, N.V. Tsygankova, O. A. Krakhmaleva
FEDERAL RESEARCH CENTER «NEMCHINOVKA»

E-mail: goncharenko05@mail.ru

Abstract: *In the breeding of winter rye on the basis of CMS sterile cytoplasm of P-type which distinctive feature is low frequency of restorators of fertility is widely used. It creates certain difficulties in the breeding of hybrid rye. Detection of new effective restorators of male fertility in sterile cytoplasm of P-type was the purpose of the conducted researches. Evaluated an index of restoration of fertility (RI) at the test cross connects received from crossing of 16 two-line synthetics and 21 inbred lines with the line N-1185 taken as tester CMS. At test cross connects with an involvement of inbred lines the RI index varied from 8,4 to 86,1%, and at test cross connects with an involvement of synthetics – from 12,2 to 90,0%. It is set that the majority of the studied synthetics and inbred lines only partially recovered male fertility in test crossings. Almost complete restoration of pollen fertility (at the level of % $RI \geq 67$) was shown only by 7 synthetic from 16 and 2 inbred lines from 21. The special attention is deserved C-8090/12 synthetics ($RI=90,0\%$) and C-8082/12 ($RI=88,4\%$), and also by the N-663 and N-649 lines which appeared the partial restorators of fertility. They are of interest to breeding of pollen parents of commercial hybrids. Dedicated lines of N-451, N-732 and N-1185 which showed almost complete fixing of sterility ($RI=0,9 \dots 1,6\%$). The prospects their use in breeding of hybrid winter rye are discussed.*

Keywords: hybrid rye, synthetic, inbred line, cytoplasmatic male sterility, fertility restoration, sterility fixer, restoration index.