

КОНДРАЦКАЯ И.П.¹, АХМЕДОВ Р.Б.², ВАСЬКО П.П.³, СТОЛЕПЧЕНКО В.А.³,
НАМ И.Я.², ЗАЯКИН В.В.², КОЗЛОВСКАЯ З.Г.³

¹ ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»,

Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2в, e-mail: ikondratskaya@mail.ru

² ФГБОУ ВПО «Брянский государственный университет им. акад. И.Г. Петровского», Россия, 241036,
г. Брянск, ул. Бежицкая, 14, e-mail: roma.akhmedov.91@mail.ru

³ РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию»,
Беларусь, 222164, г. Жодино, ул. Тимирязева, 1

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ СОЗДАНИИ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ МНОГОЛЕТНИХ ЗЛАКОВЫХ ТРАВ

Среди кормовых культур важная роль принадлежит многолетним злаковым травам. Они растут везде на природных сенокосах и пастбищах и широко используются в травосмесях. Основные направления селекции многолетних злаковых трав направлены на создание генотипов с хорошей отрастаемостью и стабильностью урожая; высокой устойчивостью к основным болезням, зимостойкостью, теневыносливостью; хорошей конкурентной способностью в многокомпонентных травостоях; а также стабильной семенной продуктивностью. Эффективность использования отдаленной гибридизации для создания новых форм растений с реконструированными геномами значительно возросла благодаря современным методам *in vitro*, молекулярной генетики и цитогенетики. Скрещивание представителей различных видов и родов позволяет не только улучшать сорта существующих культурных растений, но и создавать совершенно новые, сельскохозяйственные культуры, пополняя и расширяя их ассортимент. Целью данной работы является создание сортообразцов лисохвоста лугового с уровнем долголетия и качеством корма для укосного и пастбищного использования.

Для злаковых трав характерна осыпаемость семян. Наиболее склонны к этому канареечник тростниковый, лисохвост луговой, райграсы, овсяница луговая и ежа сборная, менее – кострец безостый и мятлик луговой. Низкая семенная продуктивность лисохвоста лугового в Беларуси – одна из причин недостаточного производства травяных кормов из раннеспелых травостоев. Основной причиной низкой семенной продуктивности лисохвоста является неравномерность созревания семян и их высокая осыпаемость [1, 2]. Лисохвост вздутый обладает высокой семенной продуктивностью, но характеризуется низким качеством корма. Лисохвост луговой облада-

ет высоким качеством корма, но семена осыпаются. Объединение хозяйственно-полезных признаков в межвидовом гибриде лисохвоста позволит сформировать сорто-популяцию с высоким качеством корма и стабильной семенной продуктивностью. Для достижения поставленной задачи, нами разработана геномная технология селекции лисохвоста лугового на основе дубликации генома, интрогрессивной гибридизации с использованием ДНК-маркирования для целенаправленного преобразования генома, расширения генофонда исходного материала и повышения эффективности селекции.

Материалы и методы

Объектами исследования были родительские формы лисохвоста лугового (*Alopecurus platensis* L.) и лисохвоста вздутого (*Alopecurus ventricornis* Pers): материнские формы лисохвоста лугового – Рассвет, Brudzynska, Poiret, Alattyani, Донской 20, Обский, 4 AR-местный; отцовская форма лисохвоста вздутого – Довский.

В селекции на кормовое использование в процессе вегетационного периода и при структурном анализе нами учитывались 36 количественных и качественных показателей, в том числе по основным признакам кормовой и семенной продуктивности. Используемые методы селекции: внутривидовая гибридизация, индивидуальный, семейственно-групповой отборы в естественных условиях [3]. Во время культивирования изолированных зародышей из незрелой зерновки используют простую минерально-сахарозную среду с витаминами и регуляторами роста. Зародыши выделяли из незрелой зерновки после обработки 70 % этанолом, а затем в стерильных условиях выделяли зародыши. Дорастивание зародышей было проведено в стерильных условиях в термостатах INCUCCELL при температуре 24 °C

до появления проростков, после чего пробирки помещались в световую культуральную комнату с режимом 16-часового фотопериода с освещенностью 8000 люкс и температурой 20–22 °С.

Проведенный молекулярно-генетический анализ включал следующие этапы: выделение ДНК → электрофорез геномной ДНК → спектроскопический анализ → ISSR-ПЦР → электрофорез продуктов ПЦР. ДНК выделяли с использованием лизирующего СТАВ-буфера, денатурирующей смеси хлороформ/изоамиловый спирт (24/1) и осаждающего агента – этанола (96 %). Для растворения осажденной ДНК использовали деионизированную воду (50 мкл). Выделение геномной ДНК проводили из отдельных сухих зерновок лисохвоста (массой около 0,001 г, по 10 зерновок каждого сорта или сортообразца) с предварительной гомогенизацией растительного материала. Для визуализации выделенной ДНК выполняли электрофорез в 1 % агарозном геле. Концентрацию и чистоту геномной ДНК определяли методом спектроскопии в УФ-области ($\lambda = 230, 260, 280$ нм) на спектрофотометре для микрообъемов NanoVue Plus™.

В ходе анализа использовали десять ISSR-праймеров из ранее выбранных путем анализа литературных данных: IS1, IS2, IS3, IS4, IS5, IS6, UBC810, U840, HB12, B4.

Аmplификацию проводили в многоканальном программируемом термостате «Терцик» компании «ДНК-Технология» по следующей температурной схеме: 1) первичная денатурация – 94 °С – 4 мин; 2) денатурация – 94 °С –

35 сек – 37 циклов; 3) отжиг* – 30 сек – 37 циклов; 4) элонгация – 72 °С – 2 мин. – 37 циклов; 5) финальный синтез – 72 °С – 4 мин. После амплификации выполняли горизонтальный электрофорез продуктов реакции в 2 % агарозном геле в TBE-буфере ($U = 120$ В; $t = 150$ мин).

Результаты и обсуждение

При создании межвидовых гибридов в 2012 и 2013 годах было проведено семь комбинаций скрещиваний в полевых условиях и с использованием фитотронно-тепличного комплекса. На 14–17 день после опыления срезанные султаны перемещены в лабораторные условия, где из них было произведено извлечение в 2012 году 332 штук зерновок (табл. 1), в 2013 году 181 штук зерновок (табл. 2, рис. 1).

На регенерационную питательную среду в 2012 году было высажено 184 штук зародышей, из которых 76,7 % погибло, в 2013 году 79 штук зародышей, из которых 72,2 % погибло.

Полученные в фитотронно-тепличном комплексе гибридные растения лисохвоста, срезанные на высоте 7–8 см для прохождения яровизации пересажены в естественных условиях.

В полевых условиях проведены наблюдения за ростом и развитием гибридных растений лисохвоста поколений F_1 , F_2 и F_3 . Были даны характеристики по кормовой и семенной продуктивности, по высоте генеративных побегов, по зеленой массе, по ширине и длине листа, по кустистости, по массе одного побега, а также по содержанию белка и % содержания сухого ве-

Таблица 1

Результативность создания межвидовых гибридов лисохвоста лугового с лисохвостом вздутым в 2012 году

Комбинации	Извлечено зерновок		Высажено зародышей		Получено растений	
	шт	%	шт	%	шт	%
Результаты проведения гибридизации в ФТК						
ЛТ—3	25	49,0	13	41,9	2	20,0
ЛТ—11	15	29,4	9	29,0	3	30,0
ЛТ—31	11	21,6	9	29,0	5	50,0
	51		31		10	
Результаты проведения гибридизации в полевых условиях						
ЛК—2	18	6,7	15	9,8	2	6,1
ЛК—3	44	16,2	8	5,2	1	3,0
ЛК—5	37	13,7	30	19,6	15	45,4
ЛК—7	19	7,0	17	11,1	2	6,1
ЛК—9	75	27,7	28	18,3	4	12,1
ЛК—11	63	23,2	43	28,1	5	15,2
ЛК—31	15	5,5	12	7,9	4	12,1
	271		153		33	

Таблица 2

Результативность создания межвидовых гибридов лисохвоста лугового с лисохвостом вздутым в 2013 году

Комбинации	Извлечено зерновок		Высажено зародышей		Получено растений		
	шт	%	шт	%	шт	%	
Результаты проведения гибридизации в ФТК							
Лк—3	25	49,0	13	41,9	2	20,0	
Результаты проведения гибридизации в полевых условиях							
Лк—3	44	16,2	8	5,2	1	3,0	
Лк—5	37	13,7	30	19,6	15	45,4	
Лк—9	75	27,7	28	18,3	4	12,1	
	181		79		22		



Рис. 1. Извлеченный зародыш из незрелых зерновок лисохвоста и дорастивание зародыша на питательной среде

щества. Растения перспективного сортообразца лисохвоста наблюдались при прохождении следующих основных фенологических фаз: всходы в год посева, у растений второго года жизни – весеннее отрастание; кущение; выход в трубку; выметывание; цветение; созревание; позднелетнее кущение.

В результате комплексной оценки созданных форм межвидовых гибридов лисохвоста лугового (*Alopecurus pratensis* L.) с лисохвостом вздутым (*Alopecurus ventricorus* Pers.) отобраны морфотипы с высоким качеством корма и стабильной семенной продуктивностью, что позволило сформировать сорто-популяции лисохвоста и дать оценку по выполненности и осыпаемости семян. Лучший показатель завязываемости семян наблюдается у сортообразцов 3/1-1, 3/1-3 и 3/1-5, соответственно 50,2, 53,6 и 60,8 %. Сортообразец 3/1-5 выделяется хорошей сыпучестью семян, что позволяет получить качественный посев и хорошую очистку семян при послеуборочной обработке. Сортообразец 3/1 продукт межви-

довой гибридизации лисохвоста лугового сорта Обский с лисохвостом вздутым сорта Довский.

Развитие молекулярных методов исследований позволило создать новые тест-системы, с помощью которых стало возможно анализировать



Рис. 2. Ген-источник сыпучести семян–сортообразец лисохвоста с колосковыми чешуйками, на которых отсутствуют волоски, что увеличивает сыпучесть семян

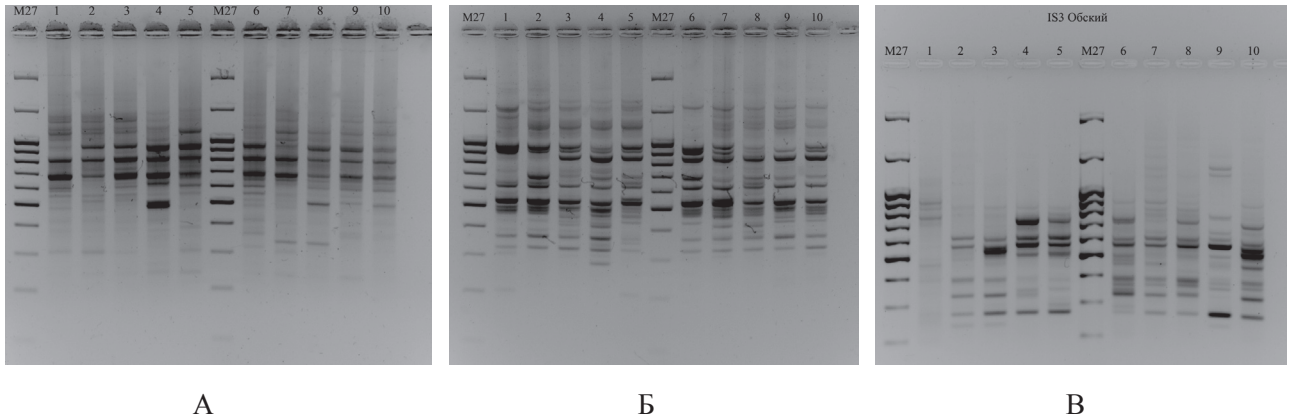


Рис. 3. Сравнительная гель-электрофореграмма разделения ампликонов перспективного сортобразца 3/1 праймерами: А – IS3; Б – UBC810; В – B4

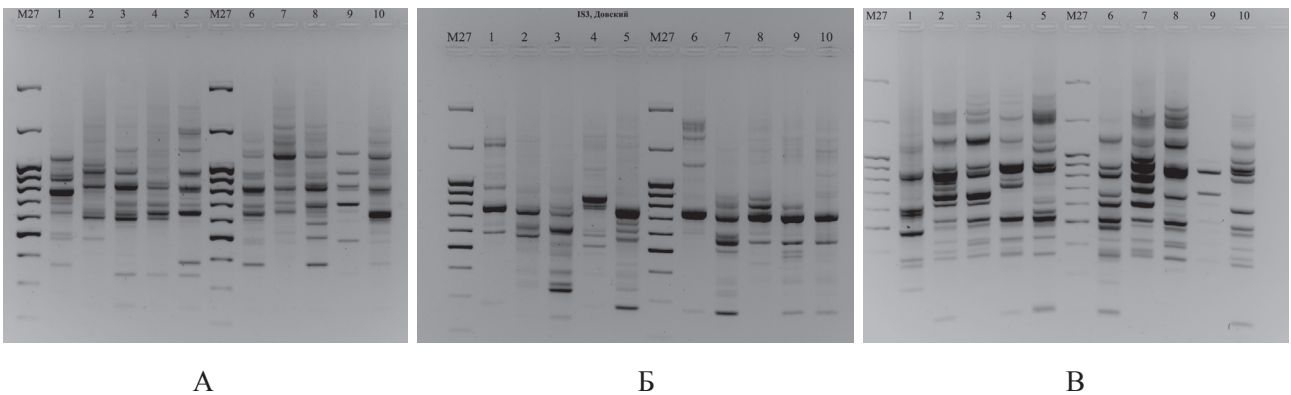


Рис. 4. Сравнительная гель-электрофореграмма разделения ампликонов лисохвоста лугового сорта Обский праймерами: А – IS3; Б – UBC810; В – B4

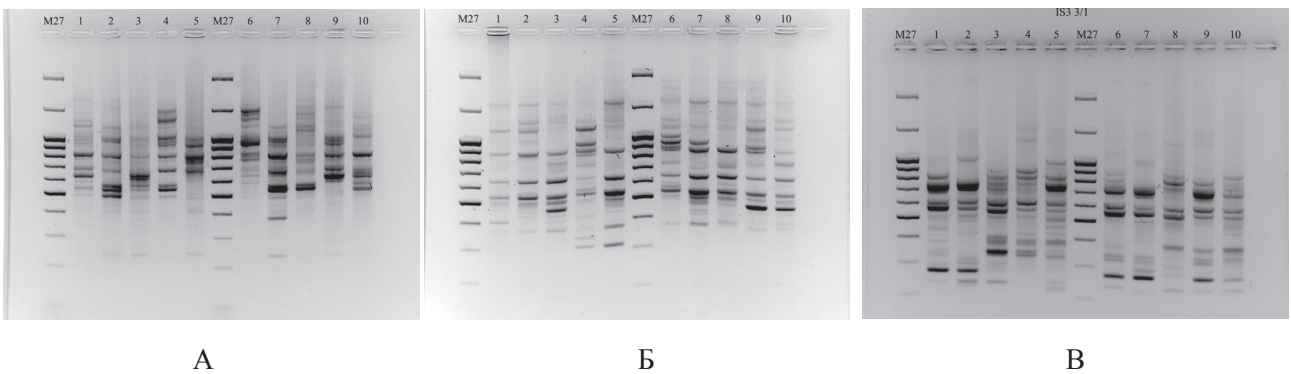


Рис. 5. Сравнительная гель-электрофореграмма разделения ампликонов лисохвоста вздутого сорта Довский праймерами: А – IS3; Б – UBC810; В – B4

генетический полиморфизм на уровне продуктов генов (белковый или биохимический полиморфизм) и на уровне генетического материала клетки (полиморфизм ДНК) [4, 5].

С точки зрения методического подхода ДНК-маркирование весьма удобно, поскольку можно выделять ДНК практически из любых тканей, на любых стадиях развития организма.

Более того, анализу можно подвергнуть даже гербарный материал, ископаемые остатки и т.д. Еще одним положительным моментом является то, что образцы выделенной ДНК хранятся длительное время.

Для идентификации уровня внутривидового молекулярно-генетического разнообразия сортобразцов лисохвоста лугового нами был про-

***Alopecurus pratensis* L., Сорт Обский**

Праймеры	Маркеры
IS3 (C)	⁵ C ₉₁₇ ⁷ C ₈₅₄ ⁴ C ₇₈₀ ⁵ C ₇₄₀ ⁸ C ₆₁₂ ⁷ C ₅₅₅ ⁴ C ₅₁₃ ⁶ C ₄₅₀ ¹⁰ C ₃₉₀ ⁵ C ₃₇₃ ⁷ C ₃₃₆ ² C ₂₉₀ ² C ₂₈₇ ¹⁰ C ₂₇₇ ³ C ₂₃₂
UBC-810 (I)	³ I ₁₅₅₀ ⁴ I ₁₁₆₀ ⁵ I ₁₁₂₀ ⁷ I ₉₈₅ ³ I ₉₃₀ ³ I ₈₅₀ ⁹ I ₈₃₀ ⁶ I ₆₈₀ ³ I ₆₆₀ ⁸ I ₆₂₅ ⁵ I ₆₀₀ ⁶ I ₄₈₀ ⁵ I ₃₈₀ ⁴ I ₃₃₁ ³ I ₂₃₈
B4 (U)	³ U ₁₇₅₀ ⁵ U ₁₅₈₄ ⁸ U ₁₁₇₀ ⁹ U ₈₈₀ ⁵ U ₈₄₉ ⁵ U ₈₀₀ ⁴ U ₇₀₆ ⁴ U ₆₄₀ ³ U ₆₂₀ ⁶ U ₅₉₂ ⁴ U ₅₅₁ ⁸ U ₅₀₀ ⁶ U ₄₉₀ ⁸ U ₄₃₂ ⁶ U ₃₇₇ ¹⁰ U ₃₄₇ ³ U ₃₂₀ ⁵ U ₁₉₅

***Alopecurus ventricorus* Pers., Сорт Довский**

Праймеры	Маркеры
IS3 (C)	⁷ C ₂₇₇ ⁴ C ₁₅₀₅ ⁶ C ₇₈₀ ⁹ C ₇₀₅ ¹⁰ C ₆₁₂ ⁶ C ₅₅₅ ⁴ C ₅₁₃ ³ C ₄₉₀ ³ C ₃₄₅
UBC-810 (I)	³ I ₁₄₉₀ ⁴ I ₁₃₀₀ ⁶ I ₁₂₅₀ ⁶ I ₁₀₅₀ ⁵ I ₉₈₅ ⁵ I ₉₃₀ ¹⁰ I ₈₀₀ ³ I ₇₈₅ ⁸ I ₆₆₀ ⁴ I ₆₂₅ ³ I ₆₀₀ ⁶ I ₅₅₂ ⁷ I ₅₂₀ ⁶ I ₄₈₀ ⁷ I ₂₃₈
B4 (U)	⁹ U ₁₅₈₄ ⁶ U ₁₂₇₅ ⁶ U ₁₁₇₀ ³ U ₉₂₀ ¹⁰ U ₈₄₉ ⁴ U ₇₄₇ ¹⁰ U ₆₂₀ ¹⁰ U ₅₄₀ ⁹ U ₅₀₀ ⁶ U ₄₃₂ ⁴ U ₄₁₆ ⁹ U ₃₇₇ ³ U ₃₄₇

***Alopecurus pratensis* L.. сортообразец 3/1**

Праймеры	Маркеры
IS3 (C)	³ C ₁₀₀₇ ⁵ C ₈₇₀ ⁸ C ₈₃₀ ⁵ C ₇₆₀ ⁸ C ₇₀₅ ¹⁰ C ₅₈₀ ¹⁰ C ₅₅₅ ⁸ C ₅₁₃ ³ C ₄₅₀ ³ C ₄₂₃ ⁶ C ₃₉₀ ⁸ C ₃₃₆ ⁶ C ₃₂₈ ⁴ C ₂₈₇ ⁶ C ₂₇₇ ⁸ C ₂₃₂
UBC-810 (I)	³ I ₁₁₆₀ ⁷ I ₁₁₂₀ ⁵ I ₁₀₅₀ ¹⁰ I ₉₃₀ ¹⁰ I ₈₃₀ ⁷ I ₇₈₅ ⁹ I ₆₈₀ ¹⁰ I ₆₆₀ ⁸ I ₅₈₅ ¹⁰ I ₅₅₂ ⁶ I ₅₀₀ ⁶ I ₄₈₀ ¹⁰ I ₄₁₀ ⁷ I ₃₈₀ ⁷ I ₃₃₁ ⁴ I ₃₂₀ ⁵ I ₃₀₇ ³ I ₂₇₅ ¹⁰ I ₂₃
B4 (U)	⁶ U ₁₅₈₄ ⁶ U ₁₂₀₀ ¹⁰ U ₉₂₀ ⁵ U ₈₄₉ ¹⁰ U ₆₂₀ ¹⁰ U ₅₄₀ ⁵ U ₅₀₀ ¹⁰ U ₄₇₀ ⁹ U ₄₃₂ ¹⁰ U ₃₇₇ ⁹ U ₃₄₇ ⁸ U ₂₃₀ ⁵ U ₁₉₅

Примечания: ** встречаемость фрагмента данной длины (от 0 до 10) ← ⁴C555 → длина полиморфного фрагмента

веден подбор высокополимерных маркеров который проводился путем тестирования групп ISSR праймеров по эффективности их использования на других видах растений и способных выявлять внутривидовой полиморфизм и получили специфичные полиморфные ISSR-спектры амплификации ДНК-фрагментов. Для молекулярно-генетического анализа сортообразцов лисохвоста было использовано 10 праймеров IS1 ((AG)₈YG); IS 2 ((AC)₈G); IS3 ((GA)₈C); IS4 ((CA)₈A); IS5 ((CA)₈A); IS6 ((AG)₈(Y)T); UBC810 ((GA)₈T); U840 ((GA)₈YT); HB12(CAC)₃GC); B4 ((CAC)₃GC).

В ходе данного анализа были выбраны три ISSR-праймера (IS3, UBC810, B4) для проведения молекулярно-генетического анализа 6 перспективных сортообразцов лисохвоста и трех родительских форм.

Молекулярно-генетические паспорта сортов и сортообразцов лисохвоста составлены на основе результатов микросателлитных повторов геномной ДНК.

Выводы

В результате проведенной работы были получены фертильные растения межвидовых гибридов лисохвоста. Комплексная оценка созданных форм межвидовых гибридов лисохвоста лугового (*Alopecurus pratensis* L.) с лисохвостом вздутым (*Alopecurus ventricorus* Pers.) позволила отобрать морфотипы с высоким качеством корма и стабильной семенной продуктивностью и сформировать сорто-популяции лисохвоста и дать оценку по выполненности и осыпаемости семян. Идентифицированы ген-источники лисохвоста лугового (*Alopecurus pratensis* L.) и лисохвоста вздутого (*Alopecurus ventricorus* Pers.). Создан перспективный сортообразец для укосного и пастбищного использования. Проведен молекулярно-генетический анализ ДНК родительских форм и гибридов лисохвоста лугового. Полученные данные по геномному полиморфизму исследуемых сортов и гибридов лисохвоста использованы для паспортизации и будут применены в дальнейшем селекционном процессе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васько П.П. Производство собственного растительного белка в республике Беларусь за счет перспективных видов и сортов многолетних злаков и бобовых // Материалы Междунар.научн-практ. конф. Посвящ. 85-летию основания РУП НПЦ НАНБ по земледелию «Земледелие, растениеводство, селекция: настоящее и будущее», 15–16 ноября 2012 г. – Жодино, 2012. – С. 217–220.
2. Холдеев С.И. Формирование луговых фитоценозов в зависимости от способов использования и агрофонов // Материалы Междунар.научн-практ. конф. Посвящ. 85-летию основания РУП НПЦ НАНБ по земледелию «Земледелие, растениеводство селекция: настоящее и будущее», 15–16 ноября 2012 г. Жодино, 2012. – С. 246–252.
3. Смурыгин М.А., Новоселова А.С., Константинова А.М. и др. Методические указания по селекции многолетних трав. – М., 2006. – 186 с.
4. Сулимова Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения [Электронный ресурс] // ИОГен им. Н.И. Вавилова РАН Лаборатория Сравнительной Генетики Животных. – Режим доступа: <http://lab-sga.ru/> – дата доступа: 24.03.2008.
5. Bardakci F. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers// Turk. J. Biol. – 2001. – 25. – P. 185–196.

KONDRATSKAYA I.P.¹, AHMEDOV R.B.², VASKO P.P.³, STOLEPCHENKO V.A.³, NAM I.Y.², ZYAKIN V.V.², KOZLOVSKAYA Z.G.³

¹ Central Botanical Garden NAS of Belarus,

Belarus, 220012, Minsk, Syrganova str., 2v, e-mail: ikondratskaya@mail.ru

² Bryansk State University named after Academician L.G. Petrovsky,

Russia, 241036, Bryansk, Bezhitskaya str., 14, e-mail: roma.akhmedov.91@mail.ru

³ Scientific Practical Center of Arable Farming of the National Academy of Belarus,
Belarus, 222160, Zhodino, Timiryazeva, 1

BIOTECHNOLOGY AND MOLECULAR GENETIC RESEARCH OF THE INTER-SPECIFIC HYBRIDS OF PERENNIAL GRASSES

Aims. The first attempt to work out genomic technology selection *Alopecurus pratensis* was made with the purposeful aim to convert genome and to expand gene pool of initial material and increase efficiency of selection. **Methods.** The subject of exploring were parental and hybrid forms *Alopecurus pratensis* L. and *Alopecurus ventricorus* Pers. Hybrids were developed by method of cultivating young embryo *in vitro*. **Results.** Analysis of inter-specific hybrids by DNA markers by ISSR-PCR method allowed revealing high polymorphism of samples. Complex assessment of the created forms of inter-specific hybrids of a foxtail meadow (*Alopecurus pratensis* L.) with a foxtail blown up (*Alopecurus ventricorus* Pers.) on analyzing backgrounds I allowed to make selection of morphotypes with high quality of a forage and stable seed efficiency.

Keywords: inter-specific hybrids, ISSR-PCR method, cultivating young embryo *in vitro*.