

УДК 633.63:631.52

## СТАБИЛИЗАЦИЯ ПРИЗНАКА ОДНОСЕМЯННОСТИ ПРИ СОЗДАНИИ КОМПОНЕНТОВ ГИБРИДОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

© 2018 В.П. Ошевнев, Н.П. Грибанова, Е.Н. Васильченко, Р.В. Бердников

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара им. А.Л. Мазлумова»,  
п. ВНИИСС, Рамонский р-н, Воронежская область

Статья поступила в редакцию 06.07.2018

Создание генетически односемянных гибридов сахарной свеклы имело огромное значение для сельхозпроизводителей, так как явилось предпосылкой внедрения технологий промышленного выращивания сахарной свеклы без затрат ручного труда. Это можно достичь при условии, если партии фабричных семян имеют минимальное значение одноростковости и высокую всхожесть, что достигается за счет постоянных отборов и оценки по локусам односемянности. Эффективным оказался способ индуцирования неоплодотворенных семязачатков и культивирование гаплоидных регенерантов опылителей-закрепителей стерильности. Показана эффективность метода RFLP-анализа с использованием рестриктазы Hind III, позволившего идентифицировать гаплоидные микроклоны по типу цитоплазмы. Молекулярные маркеры свидетельствовали, что регенеранты с нормальной цитоплазмой (N) имели один ПЦР-продукт длиной 800 п.н., у форм (S) с цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС) обнаруживались два продукта рестрикции (320 п.н. и 480 п.н.). Выявление гаплоидных регенерантов со стерильной цитоплазмой из исходных популяций имеет важное теоретическое и прикладное значение для селекции, облегчая задачу создания гомозиготных линий с ЦМС и высокопродуктивных гибридов на стерильной основе. Заключительными процессами технологии являются: перевод в условия закрытого грунта укорененных микроклонов с мощной корневой системой и хорошо развитой листовой поверхностью, выращивание из них семенных растений и получение семян DH-линий.

**Ключевые слова:** сахарная свекла, односемянность, отбор, гибридизация, цитоплазматическая мужская стерильность, опылители-закрепители стерильности, гомозиготные гаплоидные линии, элита, RFLP-анализ.

Предпосылкой в усовершенствовании технологии выращивания свеклы явилась необходимость выведения сортов, дающих при прорастании один росток.

Такие односемянные спонтанные мутанты были найдены и послужили исходными формами для создания одноростковых сортов и компонентов гибридов свеклы. Первый сорт односемянной свеклы создан в 1956 году [1, 2].

Лишь создание гибридов на основе цитоплазматической мужской стерильности с односемянностью выше 95 % позволяет выращивать свеклу по современной технологии. В настоящее время в мире отсутствует гибрид со 100 % стабильностью этого признака. Только благодаря интенсивной подготовке семян удается довести их до односемянности 95 %.

Ошевнев Валерий Павлович, доктор сельскохозяйственных наук, заведующий лабораторией селекции сахарной свеклы на основе ЦМС. E-mail: 5891542@mail.ru  
Грибанова Нина Павловна, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории селекции сахарной свеклы на основе ЦМС  
Васильченко Елена Николаевна, старший научный сотрудник отдела биотехнологии.

E-mail: vasilchenko@inbox.ru

Бердников Роман Владимирович, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник лаборатории селекции сахарной свеклы на основе ЦМС

Причину нестабильности односемянности следует искать в полигенном наследовании этого признака. Отсюда для практической селекции и первичного семеноводства следует вывод о необходимости постоянного и строгого отбора по этому признаку.

В настоящее время считается установленным, что признак односемянности имеется в любой популяции сахарной свеклы и носит рецессивный характер.

Раздельноплодные формы в сростноплодных популяциях возникают, по-видимому, в результате естественного мутационного процесса [3, 4]. Мутанты могут скрещиваться со сростноплодной свеклой или находиться в виде автогерфтильных растений.

В опытах Савицкого В.Ф. по наследованию признака раздельноплодности убедительно и на большом фактическом материале показан много-гибридный характер расщепления по локусу M-m. Однако в работах других авторов можно найти как подтверждение этих данных, так и наличие резких отклонений от моногибридной схемы.

Sedlmayr K. [5] объясняет это наличием селективного оплодотворения как между растениями одной группы, так и в пределах отдельных растений, Knapp E. [6] связывает отклонения от моногибридной схемы с различиями исходных

раздельноплодных материалов при использовании и гибридизации односемянных форм из России и Германии. Отклонения от много-гибридной схемы известны и в более поздних исследованиях. Многочисленные случаи отклонений от моногибридной схемы расщепления приводят иногда к представлению, что генетический контроль признака односемянности у европейских селекционных материалов иной чем у американских. С.И. Малецкий [7] на основании проведенных серий скрещиваний предполагает наличие двухлокусной модели наследования ( $mmlI$ ) признака односемянности.

Строптнoplодные растения постоянно появляются при репродукциировании раздельноплодных сортов – популяций или компонентов гибридов. Обязательным методическим приемом для поддержания односемянности на необходимом уровне является браковка. Проведение ежегодных поддерживающих отборов односемянных популяций поставил вопрос о генетической природе односемянных растений независимо от их континентального происхождения. Этот вопрос до сих пор не решен. В последнее десятилетие в рамках международных программ селекции сортов и гибридов накопилась дополнительная информация, описывающая особенности проявления признака односемянности в селекционных образцах – Ошевнев В.П. [8].

Следует отметить, что и потомства, полученные от самоопыления растений со 100 % односемянностью, не всегда были полностью односемянными. Мы попытались проследить связь между односемянностью F1 на основе ЦМС и односемянностью потомств, полученных от инцукта опылителей закрепителей стерильности, с которыми проводилась гибридизация. Такая связь не прослеживалась.

Для поиска новых опылителей закрепителей стерильности (О-Типа) и поддержание в чистоте имеющихся проводили парные скрещивания под бязевыми изоляторами. Кандидаты

опылителя О-типа создавались путем скрещивания различных по происхождению односемянных селекционных образцов, индивидуальных отборов и инцукта. По односемянности растения классифицировались следующим образом: односемянные, которые имеют только односемянные плоды или одно-двусемянные только на центральном стебле; одно-двусемянные с содержанием односемянных семян 80-90 %; многосемянные на ветвях второго порядка, когда наряду с односемянными плодами присутствуют двусемянные и трехсемянные. Сибсовые, насыщающие скрещивания, выращивание суперэлиты проводились на пространственно изолированных участках в посевах озимых культур.

Оценивая итоги изменения признака односемянности при репродукциировании фертильных по пыльце опылителей О-типа РФ 8, гибрида РМС 120, можно видеть, что при стабилизации этого признака и повышении интенсивности отбора резко возрастает доля потомств с полной односемянностью (табл. 1).

Таким путем удалось повысить долю односемянных растений как у потомств с ЦМС, так и у опылителей О-типа при размножении семенного материала по схеме: линия О-типа, мужскостерильный аналог – сибсовое скрещивание – суперэлита – элита (табл.2)

Повышение доли односемянных растений и относительно высокий уровень односемянности в семенных партиях можно считать результатами тщательного отбора на стабилизацию этого признака при репродукциировании. В настоящее время нельзя отказаться от браковки по односемянности при размножении мужскостерильных компонентов и опылителей О-типа. Односемянность у элит с браковкой на 10-15 % выше, чем у элит без отбора. Достигнутый уровень односемянности позволяет использовать семена гибридов нашей селекции, внесенных в Государственный реестр селекционных достижений РМС 120, РМС 121, РМС 129, Рамоза для выра-

**Таблица 1.** Наследование признака односемянности у опылителя О-типа РФ 8

Поколение отбора	Среднее значение односемянности	Доля растений		
		со 100 % односемянностью	одно-двусемянных	многосемянных
G <sub>1</sub>	78,2	11,0	71,0	18,0
G <sub>2</sub>	83,4	24,8	69,2	6,0
G <sub>3</sub>	84,8	38,9	60,2	0,9
G <sub>4</sub>	96,0	68,4	31,1	0,5

**Таблица 2.** Односемянность различных партий семян гибрида РМС 120

Категория семян	% односемянных растений		Средняя односемянность, %	
	ЦМС форма	Опылитель О-типа	ЦМС форма	Опылитель О-типа
Линии	48	50	96	97
Семьи	54	58	97	97
Суперэлита	65	68	96	98
Элита	80	82	95	97

щивания фабричной свеклы по современным технологиям.

Наличие двух или большего числа генных систем, контролирующих развитие признака односемянности, затрудняет стабилизацию этого признака в популяциях, так как по фенотипу особи нельзя судить о его генотипе по генам односемянности. Это вынуждает селекционеров постоянно вести негативный отбор растений со сростноплодными плодами.

Поэтому при включении различных линий в предбазисную партию семян необходимо проводить предварительную их оценку по М-т локусам. Надежным методом здесь могут служить односторонние циклические скрещивания, которые позволяют изучить односемянность во всех возможных комбинациях.

Согласно схемы, все имеющиеся у селекционера односемянные мужскостерильные линии скрещиваются на разных изолированных участках с имеющимися опылителями О-типа. По результатам анализа потомств по односемянности судят об идентичности генотипа родительских компонентов и на основании этого формируют компоненты суперэлиты.

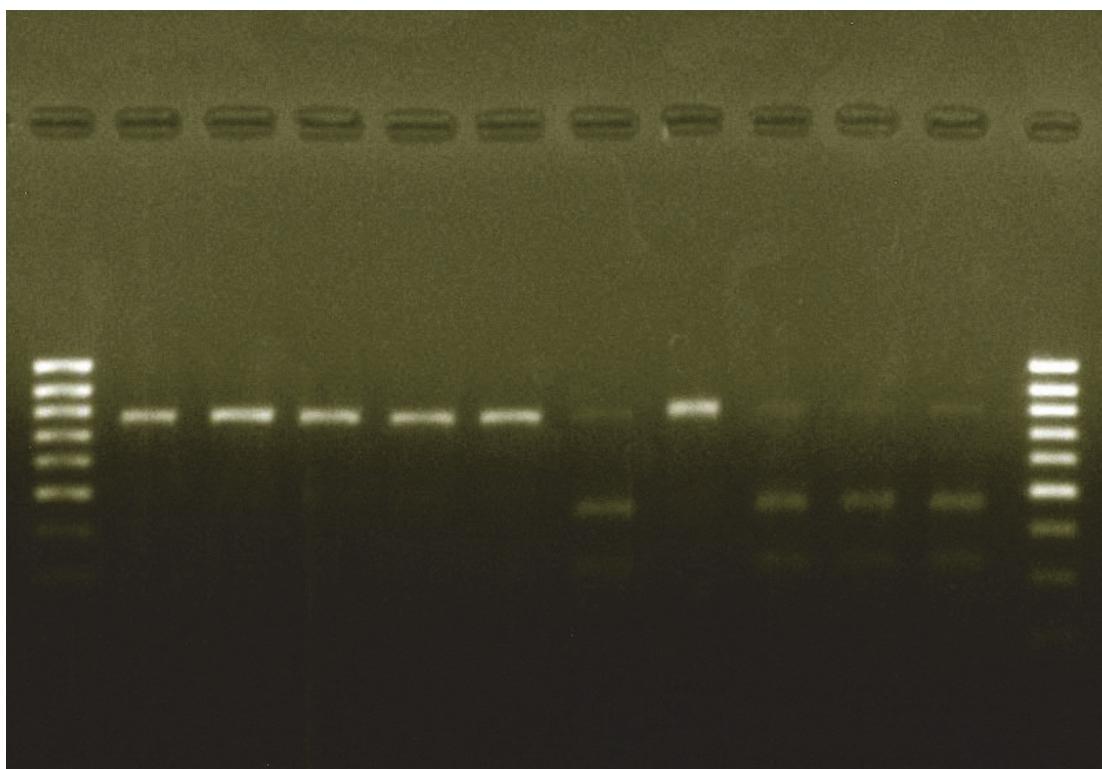
Таким образом, в связи с нестабильностью фенотипического проявления признака односемянности селекционеры вынуждены ежегодно, на всех исходных селекционных образцах, супе-

рэлите и даже элите проводить браковку растений со сростноплодными плодами. Поэтому для создания МС компонента гибрида РМС 120 со стабильной односемянностью мы использовали биотехнологию получения удвоенных гаплоидов, которые представляют собой константные нерасщепляющиеся формы, пригодные для практической селекции [9].

Гаплоидный партогенез осуществлялся путем индукции неоплодотворенных семязачатков и культивирования гаплоидных регенерантов, выделенных из опылителей закрепителей стерильности (О-типа).

Необходимыми условиями формирования гаплоидных растений являются: первичная оценка морфологических признаков, проведение цитологического и цитофотометрического анализов уровня полидности, оптимизация этапов морфогенеза в период стабилизирующих отборов, а также выявление растений со стерильной цитоплазмой.

Проведенный PCR и RFLP-анализ с использованием рестриктазы Hind III позволил идентифицировать тип цитоплазмы у создаваемых гаплоидов сахарной свеклы по числу рестриктов. У гаплоидных микроклонов с нормальной цитоплазмой амплифицировался один фрагмент (800 п.н.). У стерильных (S) форм выявлены два продукта рестрикции 320 и 480 п.н. (рис 1).



**Рис. 1.** Электрофорограмма рестриктов амплифицированных фрагментов ДНК (RFLP- анализ, рестриктаза Hind III) у гаплоидных растений-регенерантов сахарной свеклы (*Beta vulgaris L.*):

K1 – контрольные fertильные растения, K2 – контрольные стерильные растения;

1-5 – формы с нормальной (N) цитоплазмой, 6-8 – формы со стерильной (S) цитоплазмой;

M – маркеры молекулярных масс (ДНК- маркер MassRuler™, 80-1031 п.н., SM0383, «Thermo Scientific», США)

Гаплоиды, у которых этот фрагмент не реэстррировался Hind III, были представлены полностью фертильными формами с нормальной цитоплазмой (N) и ядерными генами в рецессивном состоянии (*rf*). В остальных образцах наблюдался полиморфизм фрагментов, что, по-видимому, предполагает наличие у соответствующих гаплоидных форм стерильной цитоплазмы (S) и разное сочетание рецессивных и доминантных аллелей ядерных генов *Rf<sub>1</sub>*/*rf<sub>1</sub>* и *Rf<sub>2</sub>*/*rf<sub>2</sub>*. Поэтому выявление растений-регенерантов со стерильной цитоплазмой на ранних этапах культивирования представляет значительный интерес для селекции сахарной свеклы, облегчая создание линий с ЦМС и высокопродуктивных гибридов на стерильной основе [10].

Для создания жизнеспособного гомозиготного материала гаплоидные растения переводились на более высокий уровень пloidности путем колхицинирования. При дальнейшем культивировании на ростовой среде сформировались диплоидные нормально развитые микроклоны с листовыми пластинками и развитой точкой роста. Затем растения поместили в теплицу в сосуды со смесью песка с перегноем.

Удалось сохранить до 72 % микроклонов. За 3 месяца выросли небольшие корнеплоды (штеклинги) массой от 20 до 100 грамм (рис. 2).

Индукция пониженной температурой +4° С (яровизация) проводилась в течение 45 дней. По истечении этого срока растения сформировали нормальный габитус куста, наблюдалась бутонизация и цветение (рис. 3).

Высота растений достигала 1,5 метра и выше, толщина основного цветоносного стебля составляла 3,0 – 3,5 см, цветение проходило одновременно и интенсивно, фертильность пыльцевых зерен варьировалась от 87 до 92 %. Через 8 – 10 недель формировались семена со 100 % раздельноплодностью (рис 4).

В результате были созданы 4 удвоенных гомозиготных линии (DH – линии) и получены семена для дальнейшего использования в селекционном процессе и выращивания суперэлиты мужскостерильного компонента гибрида РМС 120.

Разработанная технология позволяет ускоренно получать качественные семена гомозиготных удвоенных линий (DH) – компонентов высокопродуктивных гибридов.



Рис. 2. Штеклинги О-типа



Рис. 3. Семенные растения О-типа



Рис. 4. Семена гомозиготных DH-линий

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Попов А.В. Результаты работы Ялтушковского селекционного пункта по выведению и изучению односемянной сахарной свеклы. Односемянная сахарная свекла. М.: 4 изд. МСХ СССР. 1960. С. 45-73.
2. Коломиец О.К. Селекция и методика работ, применяемых по выведению сортов сахарной свеклы с односемянными плодами на Белоцерковской опытно-селекционной станции. Односемянная сахарная свекла. М. 4 изд. МСХ СССР. 1960. С. 22-45.
3. Бородинос М.Г. Особенности наследования односемянности плодов у гибридов первого поколения сахарной свеклы // Вестн. с.-х. науки. 1966. № 12. С. 60-61.
4. Savitsky V.F. Monodgerm Sugar beets in United States // Proc. Amer. Soc. Sugar Beet Technol. 1950. V. 6. P. 156-159.
5. Sedlmayer K. Monogerme Zuckeruben, ihre Genetik Zuchtung und Bedeutung fur den Zuckerubeneanbau //Der. Zuchter 1964. Bd 2. N34. S. 45-51.
6. Knapp E. Die genetischen Grundlagen der Einzelefruchtind - keit (Monokarpie) bei Beta vulgaris L.// Tag. ber. Dt. Akad. Landwirtsch. WISS, GDR, Berlin. 1967. Bd 89. S. 189-213.
7. Малецкий С.И., Вепрев С.Г., Шовруков Ю.Н. Генетический контроль размножения сахарной свеклы. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние. 1991. С. 168.
8. Ошевнев В.П. Научные основы интенсификации семенного процесса раздельноплодной сахарной свеклы с использованием признака генной и цитоплазматической мужской стерильности: Автотеф. дис. докт. сельскохоз. наук. Рамонь, 1999. С. 40.
9. Особенности морфогенеза и молекулярно-биохимических свойств гаплоидных регенерантов сахарной свеклы / Е.Н. Васильченко, Т.П. Жужжалова, О.З. Землянухина, Н.А. Карпеченко // Сахарная свекла. 2017. № 8. С.14-20.
10. Васильченко Е.Н., Карпеченко Н.А. Молекулярно-генетическая оценка растений-регенерантов сахарной свеклы в культуре in vitro / Сахар. 2018. № 2. С. 24-26.

## STABILIZATION OF THE MONOGERMITY TRAIT WHEN DEVELOPING SUGAR BEET HYBRID COMPONENTS

© 2018 V.P. Oshevnev, N.P. Gribanova, E.N. Vasilchenko, R.V. Berdnikov

Federal State Budgetary Scientific Institution  
“The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar”,  
VNISS, Ramon District , Voronezh Region

Development of genetical monogerm sugar beet hybrids is of great importance for farmers as it is a prerequisite for introduction of technologies of sugar beet industrial cultivation without manual labour inputs. It can be achieved if factory seed lots have minimum monogermity and high germinating capacity being the result of periodic selections and evaluation using monogermity loci. The method of unfertilized ovules induction and cultivation of haploid regenerants that are pollinators - sterility fixers has proved to be effective. Efficiency of RFLP-analysis method using Hind III restrictionase that has allowed identifications of haploid microclones according cytoplasm type is shown. Molecular markers have indicated that regenerants with normal cytoplasm (N) have one PCR-product of 800 bp in length; two products of restriction (320 bp and 480 bp) have been found in the forms (S) with cytoplasmic male sterility (CMS). Detection of haploid regenerants with sterile cytoplasm from initial population is of great theoretical and practical importance for breeding thus facilitating the problem of producing homozygous lines with CMS and high-productive hybrids on the sterile basis. Final processes of the technology are: transfer of rooted microclones with a vigorous root system and well developed leaf area to greenhouse conditions, growing seed-bearing plants from them, and obtaining of seeds of DH-lines. **Keywords:** monogermity, selection, hybridization, cytoplasmic male sterility, pollinators - male sterility fixers, homozygous haploid lines, best specimens, RFLP-analysis.

---

Valeriy Oshevnev, Doctor of Agricultural Science, Head of the Laboratory of Sugar Beet Breeding based on CMS.  
E-mail: 5891542@mail.ru

Nina Gribanova, Candidate of Agricultural Science, Leading Research Fellow, of the Laboratory of Sugar Beet Breeding based on CMS

Elena Vasilchenko, Senior Research Fellow of Biotechnology Department. E-mail: vasilchenko@inbox.ru

Roman Berdnikov, Candidate of Agricultural Science, Senior Research Fellow of the Laboratory of Sugar Beet Breeding based on CMS