

СОЗДАНИЕ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ ПОДСОЛНЕЧНИКА *HELIANTHUS ANNUUS L.* НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ПАТОГЕНУ *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*

А.А. ВОЛОТОВИЧ¹, О.А. КУДРЯШОВА²

¹Полесский государственный университет,

г. Пинск, Республика Беларусь, volant777@tut.by

²Ботанический сад биологического факультета БГУ,

г. Минск, Республика Беларусь

ВВЕДЕНИЕ

Helianthus annuus L. – подсолнечник культурный (масличный, $2n=34$) – однолетнее растение с сильно развитым стержневым корнем. Естественным ареалом распространения дикорастущего однолетнего подсолнечника являются сухие, знойные прерии Северной Америки. Процесс окультуривания подсолнечника происходил в условиях континентального климата степи европейской части России в XIX–XX вв. [1].

В настоящее время подсолнечник является одной из основных, наиболее ценных масличных культур в мире и занимает до 21 млн. га посевных площадей, что позволяет ежегодно получать до 25 млн. т маслосемян (~ 8 % мирового объема производимого масличного сырья) [2]. Подсолнечник масличный (*Helianthus annuus L.*) является источником высококачественного растительного масла и жирных кислот для пищевой и химической промышленности. Кроме того, жмых и шрот подсолнечника используются в животноводстве как ценные кормовые добавки, которые содержат в достаточном количестве все незаменимые аминокислоты [1, 3–5].

Интерес к подсолнечнику масличному (*Helianthus annuus L.*) в нашей стране связан с частичным решением проблемы импортзамещения ежегодно ввозимых в Республику Беларусь высококачественных растительных масел и белка [6]. Как объект для промышленного производства маслосемян, подсолнечник, несомненно, является новой культурой в нашей стране.

Работа по созданию простых межлинейных гибридов подсолнечника на основе ЦМС, адаптированных к местным почвенно-климатическим условиям, впервые в истории отечественной селекции началась в 1998 г. За период 1998–2007 гг. в процессе селекции подсолнечника на гетерозис в лаборатории нехромосомной наследственности Института генетики и цитологии НАН Беларуси впервые созданы свыше 500 самоопыленных форм 76 линий-закрепителей стерильности (I_6-I_7) и их ЦМС-аналогов (BC_5-BC_6), 57 линий-восстановителей фертильности пыльцы (I_5-I_7), а также получено около 200 гибридных комбинаций [7].

Адаптивная селекция растений направлена на повышение устойчивости генотипов к биотическим и абиотическим факторам окружающей среды [8]. Особенности белорусского климата являются высокая относительная влажность воздуха и умеренные температуры в весенне-летний период времени. И то и другое способствует развитию грибов-патогенов. В настоящее время наиболее вредоносным патогеном подсолнечника в условиях Беларуси является сумчатый гриб-некрограф *Sclerotinia sclerotiorum* [7]. Среди видов рода *Helianthus* нет ни одного, обладающего абсолютной устойчивостью к возбудителю белой гнили. Устойчивость подсолнечника носит полигенный характер [9–10], поэтому поиск относительно устойчивых (толерантных) к патогену форм подсолнечника определяется величиной инфекционной нагрузки патогена [11].

Успех создания устойчивых к патогенам сортов и гибридов культурных растений определяется наличием простых и достоверных методов искусственного заражения растений и отбора устойчивых форм на всех этапах селекционного процесса [11–12].

К концу 70-х гг. XX в. во ВНИИМКе им. В.С. Пустовойта был разработан комплекс методов искусственного заражения и отбора устойчивых биотипов подсолнечника на разных стадиях вегетации, а также получены первые самоопыленные линии, невосприимчивые ко всем формам белой гнили [9]. Было установлено, что эти линии в отличие от восприимчивых характеризуются высоким содержанием Ca^{2+} в тканях и стабильно низкой проницаемостью клеточных мембран.

На основе устойчивых к патогену линий подсолнечника были созданы первые высокоустойчивые синтетические популяции. Однако проблема оказалась сложнее, чем казалось изначально: устойчивость не закреплялась у потомков.

Анализ публикаций, связанных с селекцией подсолнечника на устойчивость к белой гнили, указывает на невозможность создания коммерчески ценных сортов и гибридов подсолнечника с устойчивостью, удовлетворяющей требованиям в условиях жесткого инфекционного фона патогена. Тем не менее различия в восприимчивости к патогену у подсолнечника культурного все же существуют [9–10].

Цель настоящей работы заключалась в том, чтобы методом инокуляции 5–7 дневных проростков смесью гомогената мицелия и культуральной жидкости *Sclerotinia sclerotiorum* осуществить дифференциацию коммерчески ценных линий подсолнечника селекции ИГЦ НАНБ по степени устойчивости к патогену и отобрать сохранившие жизнеспособность (толерантные) формы для получения потомства.

МЕТОДИКА И ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследований были отобраны 4 линии-закрепителя стерильности пыльцы (В-линии) – М260/06В, М260/06/2В, М379/04В, М271/06В (I₁) и 3 линии-восстановителя фертильности пыльцы (Rf-линии) – М708/04Rf, М780/04Rf и М791/04Rf (I₁) подсолнечника селекции лаборатории нехромосомной наследственности Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси (ИГЦ НАНБ). Исследования проводили на биологической опытной станции ИГЦ НАНБ с мая по сентябрь 2007 г.

По 40–50 семян каждой линии отмывали 3,0 % раствором кальцинированной соды в течение 5–7 минут при температуре +50°C, подсушивали в течение 2–3 часов и выдерживали в течение суток в водопроводной воде при температуре +24°C. Затем ядра отделяли от лузги, удаляли поврежденные, а здоровые промывали проточной водой и проращивали во влажной камере в течение суток при +24°C. Здоровые проростки, с длиной зародышевого корня 5–7 мм, высаживали в отверстия диаметром 3 мм на фольговых пластинах, размещенных на кюветах 28×42×4 см³. Кюветы с проростками заполняли дистиллированной водой, прикрывали стеклом и выдерживали в течение 48 часов при температуре +24°C. После этого воду в кюветах заменяли инокулюмом, а через 48 часов инокулюм – водой.

Для получения инокулюма по стандартной методике [12–13] использовали наиболее патогенные штаммы *Sclerotinia sclerotiorum* (изоляты 2005 и 2006 гг.), имеющие хорошо развитый мицелий и малочисленные, но крупные склероции [13]. После отмывания растворами, содержащими ПАВ, склероции дополнительно выдерживали в 70,0 % растворе этилового спирта в течение 30 сек, стерильно разрезали на фрагменты, которые высаживали на картофельно-глюкозную агаризованную среду (приготовленную по стандартной методике [14]) в центр чашек Петри. Через 5 дней культивации при температуре +22°C по периметру колоний с помощью пробирки диаметром 20 мм вырезали диски одинакового диаметра, которые затем помещали в колбы Эрленмейера емкостью 250 мл, содержащие 50 мл жидкой среды Чапека (приготовленной по стандартной методике [14]). Через 5–6 дней культивирования при температуре +22°C колонии извлекали и гомогенизировали в медицинском гомогенизаторе при 2000 об/мин в течение 3 мин. Подбор дозы патогена осуществлялся по данным предварительной дифференциации линий, полученным нами в 2006 г. Инфекционная нагрузка составила 2 колонии патогена на 100 мл воды из расчета на 100 проростков. Инокулюм смешивали с культуральной жидкостью пятидневных штаммов в соотношении 1:1. Перед смешиванием культуральную жидкость пропускали через ватно-марлевый фильтр.

Учет интенсивности поражения растений проводили через 3 дня после инокуляции. При этом растения на протяжении 3 дней выращивали в водопроводной воде при температуре +24°C. При учете руководствовались шкалой, разработанной в Украинском НИИ растениеводства, селекции и генетики им. В.Я. Юрьева [13]: 0 баллов – поражение отсутствует, 1 балл – побурение кончика зародышевого корня, 2 балла – побурение зародышевого корня на 50–70 %, 3 балла – полное побурение зародышевого корня, 4 балла – полное побурение зародышевого корня и частичное семядолей, 5 баллов – полное побурение зародышевого корня и семядолей. На рис. 1 приведены проростки подсолнечника, различающиеся по интенсивности поражения.

Далее проростки с интенсивностью поражения 0–3 балла аккуратно извлекали из отверстий пластины, тщательно отмывали сначала проточной, затем дистиллированной водой и помещали на 10 дней в химические стаканы с дистиллированной водой. Через каждые 2 дня растения с признаками усиления патологического процесса удаляли, а оставшиеся отмывали сначала проточной, затем дистиллированной водой и размещали в тех же стаканах со свежей порцией дистиллированной воды. Окончательный учет количества выживших растений изучаемых линий подсолнечника осуществляли на 13–14 день после инокуляции. Статистический анализ полученных данных осуществляли по принятым методам [15–16] в программе STATISTICA 6.0.

Жизнеспособность, как правило, сохраняли растения с интенсивностью поражения 0–2 балла. При интенсивности поражения 3 балла жизнеспособность сохранялась только у тех растений, которые формировали ограничивающую поражение зону некроза, выше которой происходило формирование новых боковых корешков на утолщении основания зародышевого корня (как показано на рис. 2). Согласно данным украинских исследователей, это явление относится к иммунологической реакции растений подсолнечника в ответ на заражение [12–13].

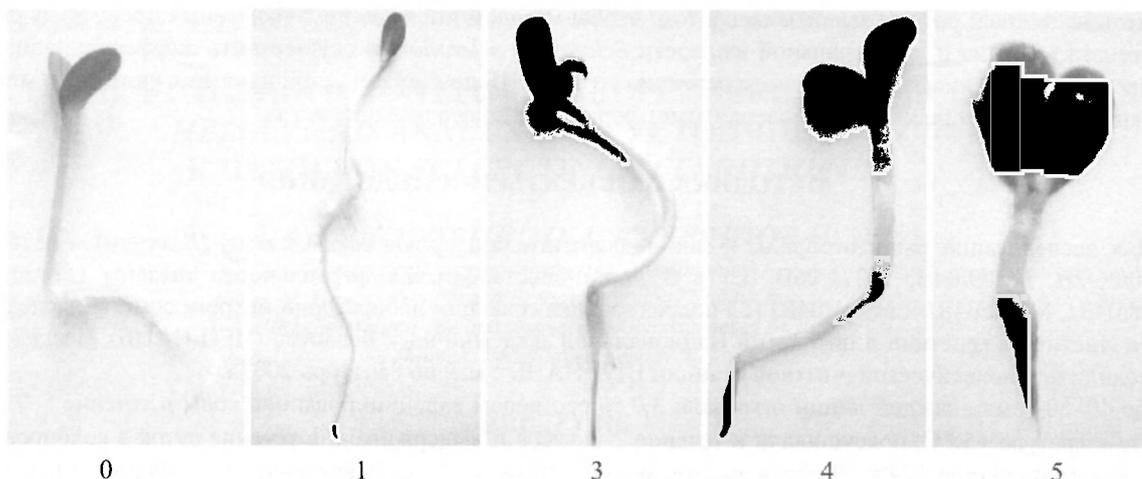


Рис. 1. Интенсивность поражения проростков *H. annuus L.* в баллах (0–5)



Рис. 2. Характер иммунологической реакции растений при заражении возбудителем белой гнили

Все растения, сохранившие жизнеспособность через 14 дней после инокуляции были высажены в почву в пластиковые стаканы емкостью 250 мл, а через 7 дней – пересажены в почву в сосуды емкостью 10 л, где и выращивались до созревания семян. Растения поливали водой через каждые 24–48 часов. 1 раз в неделю проводилась подкормка раствором минеральных удобрений (из расчета по 0,5 г азота, фосфора и калия на одно растение). Уборку растений проводили не ранее, чем через 7 дней после их физиологического созревания.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На основании предварительных данных, полученных нами в 2006 г., оптимальная инфекционная нагрузка патогена *Sclerotinia sclerotiorum* составила 2 колонии (полученные по стандартной методике [13]) на 100 проростков линий подсолнечника. Этими данными руководствовались в настоящем исследовании при инокуляции семи отобранных линий подсолнечника селекции ИГЦ НАНБ.

Интенсивность поражения проростков большинства испытываемых линий на 3 день после инокуляции находилась в пределах 1–4 балла (табл.).

Достоверно наиболее низкой интенсивностью поражения характеризовались проростки линии-восстановителя фертильности пыльцы М708/04Rf, средний балл интенсивности поражения растений составил 1,2. Причем 13,9 % проростков линии-восстановителя фертильности пыльцы М708/04Rf на момент учета (на 3 день после инокуляции) оказались здоровыми (интенсивность поражения 0 баллов). В целом, проростки линии М708/04Rf характеризовались и наиболее высокой выживаемостью – на 14-й день после инокуляции жизнеспособность сохранили 88,9 % растений.

Наиболее восприимчивой к патогену оказалась линия-восстановитель фертильности пыльцы М791/04Rf (на 14 день после инокуляции жизнеспособными оставались 17,3 % проростков). В среднем, выживаемость проростков линий-восстановителей фертильности пыльцы была несколько выше, чем таковая у линий-закрепителей стерильности (42,6 % и 40,9 %, соответственно), что согласуется с результатами, полученными нами в 2006 г. Причина данного явления кроется в необычно высокой толерантности растений линии М708/04Rf, завышающей показатели для линий-восстановителей фертильности пыльцы в целом. Если исключить данные этой линии из анализа, можно убедиться в том, что выживаемость проростков оставшихся Rf-линий, в среднем, существенно ниже таковой линий-закрепителей стерильности.

Все растения, выжившие через 14 дней после инокуляции, были высажены в почву для получения потомства. Перед цветением растения укрывали изоляторами из спанбонда СУФ-17 для самоопыления. У растений ветвистых *Rf*-линий изолировали центральную крупную корзинку и 2–3 боковых корзинки первого яруса.

Исследуемые линии различались по продолжительности вегетационного периода, следовательно, будучи посажены одновременно, цвели и созревали в разное время. Толерантные растения линий М708/04Rf и М791/04Rf совпадали по датам цветения. Боковые корзинки растений линии М708/04Rf использовали для перекрестной гибридизации с растениями линии М791/04Rf. При этом линию М708/04Rf опыляли смесью пыльцы с растений линии М791/04Rf на 2, 4 и 6 в дни цветения. Боковые корзинки перед опылением помечали этикетками. Данная работа проводилась с целью совмещения геномов толерантных к патогену форм двух разных линий-восстановителей фертильности пыльцы для закладки в дальнейшем на основе данного гибрида новой, устойчивой к патогену *Sclerotinia sclerotiorum* *Rf*-линии.

Таблица. Интенсивность поражения (в баллах), выживаемость проростков (в %) и продолжительность вегетационного периода линий подсолнечника селекции ИГЦ НАНБ

Линии	Интенсивность поражения, балл			Количество выживших растений, %	П-Цв, сут.	ПВП, сут.
	средний балл	минимум	максимум			
М260/06В	2,1±0,3	1,0	4,0	26,5	56	106
М379/04В	1,8±0,2	1,0	3,0	61,1	48	97
М260/06/2В	2,0±0,3	1,0	3,0	35,3	56	106
М271/06В	1,7±0,2	1,0	4,0	41,0	54	102
М780/04Rf	2,2±0,2	1,0	4,0	21,5	51	100
М708/04Rf	1,2±0,1	0,0	3,0	88,9	54	103
М791/04Rf	2,1±0,3	1,0	4,0	17,3	54	103
НСР ₀₅	0,5	–	–	24,3	–	–

ПВП – продолжительность вегетационного периода;

П-Цв – период от посева до цветения растений.

По мере наступления массового цветения растения внутри той или иной линии переопыляли смесью пыльцы для того, чтобы повысить уровень завязываемости семян. Корзинки обмолачивали по мере их созревания не ранее, чем через 7 дней после наступления физиологической зрелости растений. Семена, убранные с растений определенной линии (равно как и гибридные семена М708/04Rf×М791/04Rf), ссыпали в отдельные пакеты, сшитые из бумаги «Крафт» для сохранения генетической чистоты самоопыленных линий.

ВЫВОДЫ

1. Методом экспресс-анализа осуществлена дифференциация 4 линий-закрепителей стерильности (М260/06В, М260/06/2В, М379/04В, М271/06В) и 3 линий-восстановителей фертильности пыльцы (М708/04Rf, М780/04Rf, М791/04Rf) подсолнечника селекции ИГЦ НАНБ по степени устойчивости к патогену *Sclerotinia sclerotiorum*. Установлены достоверные различия по интенсивности поражения проростков линий на 3-й день после инокуляции и по их выживаемости через 14 дней после инокуляции, определяемые генотипом линий.

2. Установлено, что линия-восстановитель фертильности пыльцы М791/04Rf является наиболее восприимчивой к патогену (на 14 день после инокуляции жизнеспособными оставались 17,3 % проростков), а линия-восстановитель фертильности пыльцы М708/04Rf – наименее восприимчивой (на 14-й день после инокуляции жизнеспособность сохранили 88,9 % проростков).

3. Получены семена от самоопыления сохранивших жизнеспособность после инокуляции (толерантных) растений 7 линий подсолнечника селекции ИГЦ НАНБ, созданных в процессе селекции на гетерозис и представляющих коммерческую ценность.

4. Получены гибридные семена от скрещивания выживших после инокуляции растений двух линий-восстановителей фертильности пыльцы – М708/04Rf и М791/04Rf. Гибрид М708/04Rf×М791/04Rf представляет собой исходный материал для создания новой линии-восстановителя фертильности пыльцы, которая будет совмещать в одном геноме исходные гены устойчивости обоих родителей. Ожидается, что полученный нами новый гибрид (М708/04Rf×М791/04Rf) будет менее восприимчив к патогену *Sclerotinia sclerotiorum*, чем каждая из исходных родительских линий.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (Б06М-022, № 20063888), с участием студентов Минского государственного областного лицея Я.В. Шамшиевой и А.Д. Мороз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Подсолнечник / под общ. ред. академика В.С. Пустовойта. – М.: Колос, 1975. – 592 с.
2. Вронских, М.Д. Мировой рынок подсолнечника и продуктов его переработки / М.Д. Вронских, О.Д. Чеботарь // Современные проблемы научного обеспечения производства подсолнечника: Сб. докл. междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 120-летию со дня рожд. акад. В.С. Пустовойта, Краснодар, 19–22 июля 2006 г. – Краснодар, 2006. – С. 50–68.
3. Маковский, Н. Подсолнечник продвигается на север / Н. Маковский, В. Самсонов, К. Хендель // Международный аграрный журнал. – 2001. – № 9. – С. 18–19.
4. Околелова, Т.М. Подсолнечниковый жмых и «Ровабио» в комбикормах для птицы / Т.М. Околелова, Л. Криворучко, С.А. Молоскин // Птицеводство Беларуси. – 2004. – № 4. – С. 24–25.
5. Биология, селекция и возделывание подсолнечника / О.И. Тихонов [и др.]. – М.: Агропромиздат, 1991. – 281 с.
6. Сырьевая база в Республике Беларусь для развития масложировой отрасли / Д.А. Хоняк [и др.] // Рапс: масло, белок, биодизель: Материалы междунар. науч.-практ. конф. – Жодино, 2006. – С. 161–165.
7. Результаты и перспективы гетерозисной селекции подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) в Республике Беларусь / Т.А. Силкова [и др.] // Принципы и методы оптимизации селекционного процесса сельскохозяйственных растений: Сб. статей междунар. науч.-практ. конф. – Жодино, 2005. – С. 164–169.
8. Кильчевский, А.В. Экологическая селекция растений / А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. – Минск, 1997. – 372 с.
9. Антонова, Т.С. Селекция подсолнечника на иммунитет / Т.С. Антонова // История научных исследований во ВНИИМКе. – Краснодар, 2003. – С. 253–272.
10. Волотович, А.А. Защита растений от патогена *Sclerotinia sclerotiorum* / А.А. Волотович // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2005. – № 4. – С. 112–116.
11. Лессовой, М.П. Методы оценки устойчивости / М.П. Лессовой, А.И. Парфенюк // Масличные культуры. – 1984. – № 1. – С. 8–10.
12. Оценка подсолнечника на устойчивость к склеротиниозу и серой гнили: методические рекомендации / Е.М. Долгова [и др.]. – Харьков, 1989. – 16 с.
13. Методика определения и отбора устойчивых форм подсолнечника к возбудителям белой и серой гнилей / М.П. Лессовой [и др.] // Микология и фитопатология. – 1987. – Т. 21, № 3. – С. 273–278.
14. Литвинов, М.А. Методы изучения почвенных микроскопических грибов / М.А. Литвинов. – Л., 1969. – 121 с.
15. Плохинский, Н.А. Биометрия / Н.А. Плохинский – М., 1970. – 218 с.
16. Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий – Минск, 1973. – 320 с.

THE CREATION OF INITIAL BREEDING MATERIAL FOR THE SELECTION OF SUNFLOWER *HELIANTHUS ANNUUS* L. RESISTANT TO *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* PATHOGEN

A.A. VOLOTOVICH, O.A. KUDRYASHOVA

Summary

The express-analysis method carried out a differentiation in the degree of stability to *Sclerotinia sclerotiorum* pathogen between 7 sunflower lines of IGC NASB breeding. Established by a genotype of lines the authentic distinctions on defeat intensity and on survival rate of the germs have been defined. Seeds from the self-pollinated tolerant plants and also hybrid seeds from crossing tolerant forms of two investigated *Rf*-lines have been obtained.

Поступила в редакцию 22 февраля 2008 г.