

# Создание фертильных межродовых гибридов житняка (*Agropyron cristatum*) с райграсом пастбищным (*Lolium perenne*) с использованием геномной и клеточной биотехнологии

Кондрацкая И. П.<sup>1</sup>, Столепченко В. А.<sup>2</sup>, Юхимук А. Н.<sup>1</sup>,  
Чижик О. В.<sup>1</sup>, Беляй М. О.<sup>2</sup>, Васько П. П.<sup>2</sup>, Решетников В. Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», г. Минск, Беларусь

<sup>2</sup> РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию», г. Жодино, Беларусь

**Резюме** Созданы фертильные межродовые гибриды житняка (*Agropyron cristatum*) с райграсом пастбищным (*Lolium perenne*) и идентифицированы ген-источники высокой продуктивности. Проведенно мультилокусное ДНК-маркирование житняка (*Agropyron cristatum*) с использованием RAPD — и ISSR-праймеров позволило дифференцировать все исследованные генотипы, разработать и составить уникальные профили для каждого из них. На основании полученных мультилокусных RAPD/ISSR-спектров для исследованных образцов составлены генетические паспорта

**The fertile intergeneric hybrids of *Agropyron cristatum* with *Lolium perenne* creation using genomic and cellular biotechnology.** Kondratskaya I. P., Stolepchenko V. A., Yukhimuk A. N., Chizhik O. V., Belyaj M. O., Vasko P. P., Reshetnikov V. N. **Summary.** Fertile intergeneric hybrids of (*Agropyron cristatum*) with (*Lolium perenne*) have been created and gene sources of high productivity have been identified. The multilocus DNA marking of Agarwood (*Agropyron cristatum*) using RAPD and ISSR primers allowed to differentiate all the investigated genotypes, to develop and compile unique profiles for each of them. The genetic passports for the samples studied have been compiled on the base of multilocus RAPD / ISSR spectra

В Республике Беларусь супесчаные почвы и пески составляют более 2 миллионов гектаров и преобладают в Гомельской и Брестской областях. Средняя продуктивность луговых угодий в хозяйствах республики составляет 28–32 ц/га кормовых единиц, а на песчаных почвах — 18–20 ц/га. В южных областях республики почти ежегодно наблюдаются засухи, которые приводят к выгоранию пастбищных травостоев на супесчаных почвах Полесья. Негативные воздействия засушливых условий особенно выражены на легких по механическому составу почвах Гомельской, Брестской и части Могилевской областей. Житняк гребенчатый (*Agropyron cristatum*) является засухоустойчивым и морозоустойчивым многолетним злаком, райграс пастбищный (*Lolium perenne*) — высокоурожайная трава высокого качества. Среди многолетних злаковых трав житняк первым вступает в вегетацию. В связи с этим, возникла необходимость создания межродового гибрида житняка (*Agropyron cristatum*), объединяющего качественные признаки житняка гребенчатого и райграса пастбищного. На сельскохозяйственных угодьях Беларуси житняк гребенчатый пока не культивируется. В рамках выполнения задания «Создать фертильные межродовые гибриды житняка (*Agropyron cristatum*) с

райграсом пастбищным (*Lolium perenne*) и идентифицировать ген-источники высокой продуктивности для селекции житняка с использованием геномной и клеточной биотехнологии» ГНТП «Агропромкомплекс 2020», сотрудниками РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» и ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» впервые в Беларуси начаты работы по созданию межродового гибрида житняка (*Agropyron cristatum*) с высокой продуктивностью.

Основная задача селекции многолетних злаковых трав — создание новых, высокопродуктивных, экономически устойчивых сортов кормовых злаковых трав, хорошо адаптированных к конкретным местным условиям, обладающих высокой экологической устойчивостью и способных полнее использовать биоклиматический потенциал данного региона, обеспечивая достаточную семенную продуктивность и отличающихся от других ранее выведенных сортов. Согласно современным положением международного союза селекционеров [1], а также международных правовых документов о защите авторских прав, главным признаком нового сорта являются постоянные морфологические или иные отличия его от уже существующих сортов и гибридов.

Оценка улучшенных кормовых злаковых трав усложняется тем, что животные разных видов и пород отличаются по избирательной приверженности к тем или иным кормам и характеру срамливания. Кроме того, многолетние злаки должны отличаться устойчивостью к резким колебаниям условий окружающей среды как в течение одного и того же года, так и в различные годы.

Некоторые виды злаковых трав, благодаря своей облиственности, времени созревания и совместимости с сопутствующими бобовыми, дают высокие урожаи высококачественного сена, но не способны поддерживать продуктивность травостоя вследствие слабого отрастания или недостаточной выносливости к вытаптыванию и частому скашиванию. Поэтому задачи, поставленные при выведении нового сорта, решаются различными методами в связи с новыми требованиями к сортам при создании высокопродуктивных, устойчивых к экстремальным условиям среды, болезням и вредителям, пластичных, зимостойких, долгодетных и специализированных сортов многолетних злаковых трав. Наряду с традиционными методами, широко используются селекционные методы создания сложногибридных популяций (поликросса), экспериментальной полиплоидии, химического мутагенеза и отдаленной гибридизации.

Для создания межродовых гибридов житняка (*Agropyron cristatum*) с райграсом пастбищным (*Lolium perenne*) авторами разработана геномная и клеточная биотехнологии селекции многолетних злаковых трав на основе дупликации генома и интрогрессивной гибридизации с использованием ДНК-маркирования с целью целенаправленно преобразования генома, расширения генофонда исходного материала и повышения эффективности селекции.

Объектами исследования были выбраны:

Родительские формы: житняк Петровский, житняк ширококолосый сорт Батыр, житняк Павловский 12, житняк дикорастущий, райграс пастбищный № 38, райграс пастбищный Гусляр, райграс пастбищный Гаспадар.

Сортообразцы F3:

- сортообразец 8 — житняк Петровский × райграс пастбищный № 38;
- сортообразец 10 — житняк ширококолосый сорт Батыр × райграс пастбищный Гусляр;
- сортообразец 13 — житняк Павловский 12 × райграс пастбищный Гусляр;
- сортообразец 11 — житняк дикорастущий × райграс пастбищный № 38;
- сортообразец 12 — житняк Павловский 12 × райграс пастбищный Гаспадар.

Селекция многолетних трав осуществлялась согласно методическим рекомендациям Всероссийского института кормов им Вильямса В. Р.

В селекции на кормовое использование в процессе вегетационного периода и при структурном анализе учитывались 36 количественных и качественных показателей, в том числе по основным признакам кормовой и семенной продуктивности. Фенологические наблюдения включают определение основных фаз развития многолетних злаковых трав. Проводятся био-

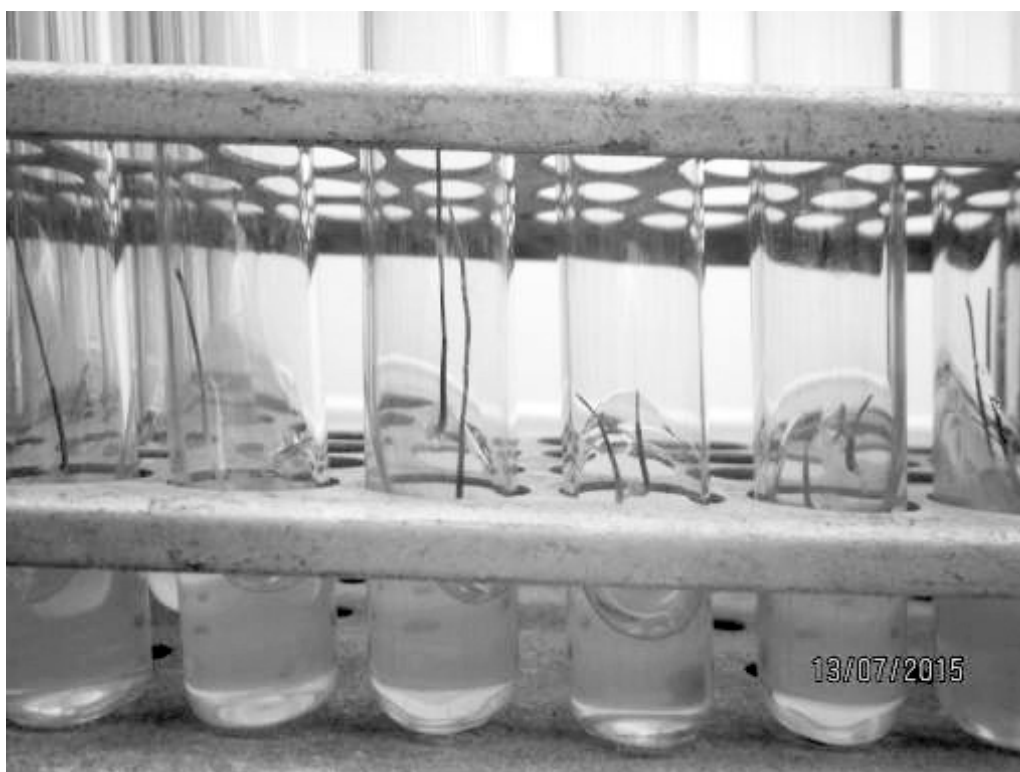


Рис. 1. Высадка зародыша на питательную среду и доращивание

химические анализы селекционного материала, оценка поражения и устойчивости образцов к болезням. Используемые методы селекции: внутривидовая гибридизация, индивидуальный, семейственно-групповой отборы в естественных условиях [2, 3].

При создании межродовых гибридов было проведено восемь комбинаций скрещиваний в полевых условиях. В фазу полного вымётывания проводилась изоляция растений житняка и райграса, в период цветения под изоляторами было проведено опыление. На 14–17 день после опыления срезанные колоски перемещены в лабораторные условия, где из них было произведено извлечение зерновок. Зародыши, изолированные на ранних стадиях развития из незрелого семени через 16 дней после оплодотворения, характеризуются очень маленькими, имеют малые размеры органов, из которых они выделяются, поэтому их культивирования связано с определенными технологическими трудностями. Сложным является также подбор питательной среды, которая должно обеспечить развитие зародыша до его полного развития в зрелом семени с последующим поддержанием прорастания и роста.

В результате проведения биотехнологических работ была преодолена прогамная несовместимость, у межродовых гибридов житняка выделены зародыши и высажены на питательную среду, преодолена постгамная несовместимость и получены фертильные растения межродовых гибридов житняка. Результативность создания межродовых гибридов представлены в табл. 1.

В первые два года на регенерационную питательную среду было высажено 183 зародыша. Пересадка растений-регенерантов из пробирок в питательную среду Биона проведена с целью формирования у растений хорошей корневой системы.

В вегетационный период в полевых условиях в апреле 2015 года была проведена оценка перезимовки гибридных растений житняка, которая оказалась значительно более высокой в сравнении с перезимовкой райграсов. Растения житняка раньше райграсов приступили к вегетации, и к 30 апреля высота растений уже достигала 14–16 см. В неблагоприятных условиях вегетационного периода 2015 года наблюдались значительные преимущества житняка в формировании надземной массы при изучении в сенокосном режиме использования в первом укосе.

Таблица 1

Результативность создания межродовых гибридов житняка в полевых условиях

комбинации	Высажено зародышей в среду МС, шт.		Высажено зародышей в среду Биона, шт.		Получено растений, шт.
	шт.	%	шт.	%	
6	18	6,7	15	9,8	14
7	44	16,2	8	5,2	0
6+	37	13,7	30	19,6	25
8	19	7,0	17	11,1	15
9	75	27,7	28	18,3	10
10	63	23,2	43	28,1	40
11	15	5,5	12	7,9	12
12	18	6,7	15	9,8	10
	<b>289</b>		<b>168</b>		<b>126</b>

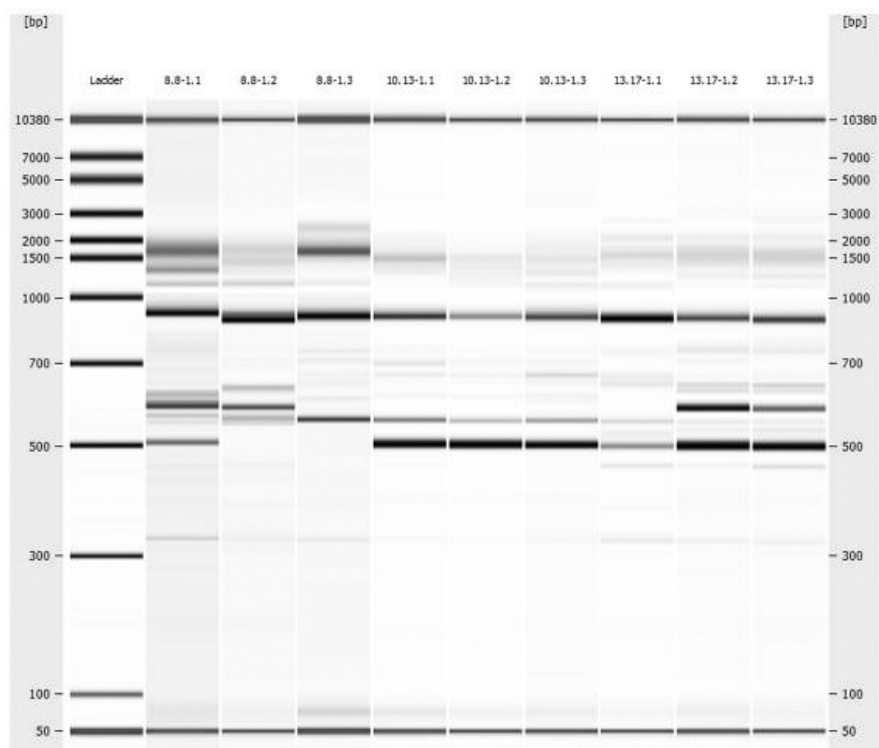
При оценке семенной продуктивности селекционного материала полученных сортообразцов житняка был проведен анализ структуры генеративных побегов для расчета биологического урожая. Выявлен высокий биологический потенциал семенной продуктивности у сортообразцов житняка. В колосе главного побега насчитывалось 360–470 цветков. Масса семян с одного растения у сортообразцов в посевах житняка первого года пользования достигала 24 г/растения, а в среднем составила 6,4–11,3 г/растение. Проведено определение высоты генеративных побегов, определение количества листьев, проведено определение длины и ширины флагового листа, количества колосков в колосе, масса 1000 семян и число зерен в колосе. Проведен структурный анализ генеративных побегов биотипов межродовых гибридов житняка, определена продуктивность растений житняка по укосам и после подкоса отавы.

В результате комплексной оценки созданных форм межродовых гибридов житняка (*Agropyron cristatum*) с райграсом пастбищным (*Lolium perenne*) отобраны морфотипы с высокой продуктивностью, что позволило сформировать сорто-популяции житняка с содержанием сухого вещества свыше 0,8 кг/м<sup>2</sup> за вегетацию (сортообразцы № 8, 10 и 13). Проведение учетов нарастания надземной массы растениями житняка в течение вегетации показало, что сортообразцом № 8 накоплено 353 ц/га зеленой массы, сортообразцом № 10 — 355,2 ц/га и сортообразцом № 13 — 340,3 ц/га. В течение всей вегетации происходит образование генеративных побегов с максимальным количеством в первом укосе 380–420 шт./м<sup>2</sup> и снижение этого показателя в последующих укосах. Показатель облиственности в одновидовых посевах житняка увеличивался у всех изучаемых сортообразцов от начала к концу вегетации. Количественный анализ общих белков показал наибольшее содержание белка (мкг/мл) в сортообразце № 13 во всех укосах.

Для проведения молекулярно-генетической паспортизации исследуемых таксонов были отобраны праймеры, обладающие достаточным полиморфизмом и имеющие воспроизводимую амплификационную активность. В общей сложности для генотипирования сортообразцов житняка (*Agropyron cristatum*) было отобрано 4RAPD-праймера и 7ISSR-праймеров.

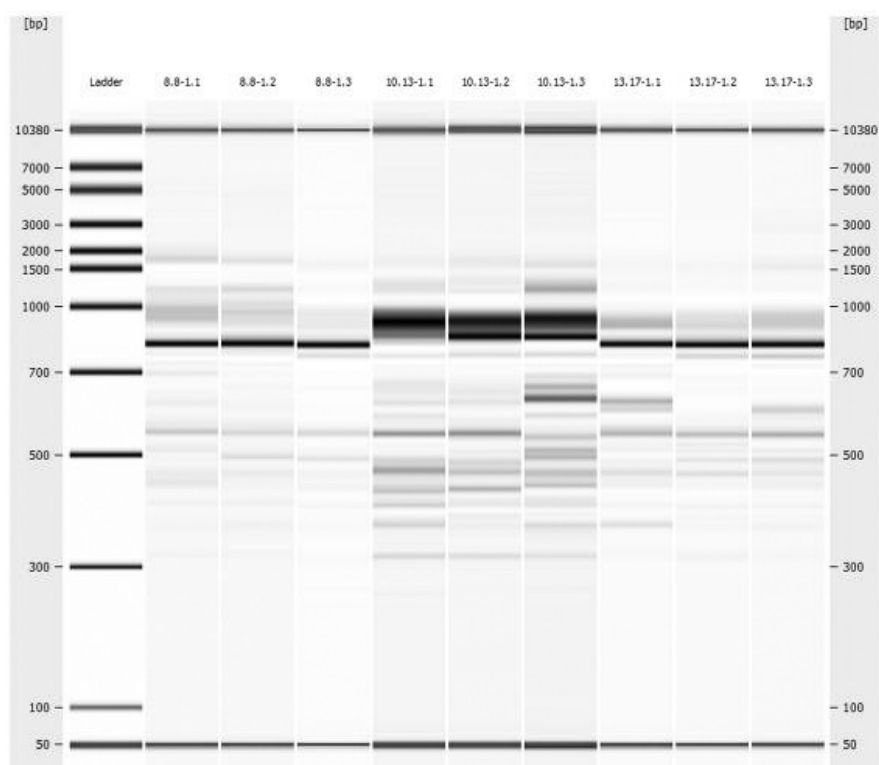
Все использованные в исследовании праймеры генерировали четкие, воспроизводимые маркеры, набор которых для каждого исследуемого таксона характеризовался уникальностью (рис. 2, 3).

Для сортообразцов рода житняка (*Agropyron cristatum*) максимальное количество локусов (ДНК-маркеров) 19 было идентифицировано с помощью праймера UBC–827, минимальное — 7 с использованием праймеров OPC–05 и UBC–836. В общей сложности было идентифицировано 157 локусов (ДНК-маркеров) — 52 для RAPD-ПЦР и 105 для ISSR-ПЦР соответственно. Для каждого праймера был рассчитан показатель **R<sub>p</sub>**, отражающий разрешающую способ-



**Рис. 2.** Электрофоретическое разделение продуктов амплификации totalной ДНК трех сортообразцов 8.8, 10.13 и 13.17 житняка с праймером **OPB-08**

**Примечание:** после номера сортообразца через дефиз указан номер биологической повторности; Ladder — маркер молекулярного веса



**Рис. 3.** Электрофоретическое разделение продуктов амплификации totalной ДНК трех сортообразцов 8.8, 10.13 и 13.17 житняка с праймером **UBC-818**

**Примечание:** После номера сортообразца через дефиз указан номер биологической повторности; Ladder — маркер молекулярного веса

ность праймера [4]. Максимальной разрешающей способностью обладал праймер UBC-817 (10,0), минимальной — праймер UBC-836 (2,0). Из всего пула маркеров 104 маркера являлись полиморфными. Обе ПЦР техники позволили выявить достаточный уровень полиморфизма у исследуемых сортообразцов рода житняк (*Agropyron cristatum*) — в среднем 66,24%. Максимальный полиморфизм выявлен при использовании праймеров UBC-807 и UBC-808 (80,00%), минимальный — 42,86% при использовании праймера UBC-836.

На основании полученных мультилокусных RAPD/ISSR-спектров для исследованных образцов составлены генетические паспорта. В табл. 2 приведены примеры генетического паспорта для сортообразцов 8.8, 10.13 и 13.17 житняка (*Agropyron cristatum*) соответственно.

Таблица 2  
Мультилокусный генетический паспорт сортообразца 13.17  
рода житняка (*Agropyron cristatum*)

Сортообразец 13.17	
Праймер	Маркер
RAPD	
OPB-08 (B08)	B08 <sub>330'</sub> B08 <sub>465'</sub> B08 <sub>505'</sub> B08 <sub>535'</sub> B08 <sub>565'</sub> B08 <sub>590'</sub> B08 <sub>640'</sub> B08 <sub>760'</sub> B08 <sub>910'</sub> B08 <sub>1165'</sub> B08 <sub>1275'</sub> B08 <sub>1515'</sub>
OPC-05 (C05)	C05 <sub>600'</sub> C05 <sub>1145'</sub> C05 <sub>1670'</sub>
OPD-07 (D07)	D07 <sub>515'</sub> D07 <sub>560'</sub> D07 <sub>605'</sub> D07 <sub>680'</sub> D07 <sub>830'</sub> D07 <sub>955'</sub> D07 <sub>1225'</sub> D07 <sub>1545'</sub> D07 <sub>1840'</sub>
OPP-09 (P09)	P09 <sub>650'</sub> P09 <sub>685'</sub> P09 <sub>730'</sub> P09 <sub>755'</sub> P09 <sub>960'</sub> P09 <sub>1135'</sub> P09 <sub>1295'</sub> P09 <sub>1490'</sub>
ISSR	
UBC-807 (807)	807 <sub>340'</sub> 807 <sub>370'</sub> 807 <sub>475'</sub>
UBC-808 (808)	808 <sub>375'</sub> 808 <sub>485'</sub> 808 <sub>555'</sub> 808 <sub>650'</sub> 808 <sub>880'</sub> 808 <sub>910'</sub>
UBC-812 (812)	812 <sub>325'</sub> 812 <sub>405'</sub> 812 <sub>465'</sub> 812 <sub>495'</sub> 812 <sub>525'</sub> 812 <sub>555'</sub> 812 <sub>610'</sub> 812 <sub>630'</sub> 812 <sub>660'</sub> 812 <sub>720'</sub> 812 <sub>855'</sub>
UBC-817 (817)	817 <sub>405'</sub> 817 <sub>515'</sub> 817 <sub>565'</sub> 817 <sub>595'</sub> 817 <sub>635'</sub> 817 <sub>660'</sub> 817 <sub>700'</sub> 817 <sub>815'</sub> 817 <sub>855'</sub> 817 <sub>1080'</sub>
UBC-818 (818)	818 <sub>375'</sub> 818 <sub>470'</sub> 818 <sub>495'</sub> 818 <sub>510'</sub> 818 <sub>525'</sub> 818 <sub>555'</sub> 818 <sub>610'</sub> 818 <sub>635'</sub> 818 <sub>765'</sub> 818 <sub>830'</sub> 818 <sub>925'</sub>
UBC-827 (827)	827 <sub>305'</sub> 827 <sub>390'</sub> 827 <sub>405'</sub> 827 <sub>420'</sub> 827 <sub>535'</sub> 827 <sub>555'</sub> 827 <sub>580'</sub> 827 <sub>640'</sub> 827 <sub>745'</sub> 827 <sub>785'</sub> 827 <sub>820'</sub> 827 <sub>875'</sub>
UBC-836 (836)	836 <sub>315'</sub> 836 <sub>330'</sub> 836 <sub>370'</sub> 836 <sub>405'</sub> 836 <sub>470'</sub> 836 <sub>530'</sub>

На основе интрогрессивной гибридизации, дупликации генома и с использованием геномной и клеточной биотехнологий создан качественно новый исходный материал житняка, проведена его идентификация и оценка по хозяйственно-ценным признакам, выделены и включены в селекционный процесс перспективные морфотипы. Новый исходный материал обладает высокой зимостойкостью, засухоустойчивостью, долголетием, интенсивным формированием наземной массы в начале вегетации по сравнению с райграсом пастбищным. Включение новой культуры в селекционный процесс позволит создать сорта житняка, обеспечивающие формирование продуктивных раннеспелых травостоев на почвах легкого механического состава с неустойчивым водным режимом в условиях Республики Беларусь. Новый вид многолетних злаковых трав впервые будет внедрен в сельскохозяйственное производство республики.

Проведенное мультилокусное ДНК-маркирование житняка (*Agropyron cristatum*) с использованием RAPD — и ISSR-праймеров позволило дифференцировать все исследованные генотипы, разработать и составить уникальные профили для каждого из них. На основании полученных мультилокусных RAPD/ISSR-спектров для исследованных образцов впервые составлены генетические паспорта житняка (*Agropyron cristatum*).

## Список литературы

---

1. Международный союз по охране новых сортов растений. Женева, 2015.-110 с.
2. Методические указания по селекции многолетних трав. М.: 1985, 188 с.
3. Методические указания по селекции многолетних трав /Смурыгин М. А., Новоселова А. С., Константинова А. М. и др — 2006.-186 с.
4. Prevost A., Wilkinson M. J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars // Theoretical and Applied Genetics. — 1999. — V. 98. — P. 107–112.