

На правах рукописи



ФРОЛОВ СЕРГЕЙ СЕРГЕЕВИЧ

**СЕЛЕКЦИЯ ГИБРИДОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА НА
УСТОЙЧИВОСТЬ К ИМИДАЗОЛИНОВЫМ ГЕРБИЦИДАМ**

Специальность 06.01.05 – селекция и семеноводство
сельскохозяйственных растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Армавир - 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном научном учреждении "Армавирская опытная станция Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур им. В.С. Пустовойта" в 2005-2014 гг.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Демури Яков Николаевич

Официальные оппоненты:

1. Сухорада Татьяна Ивановна, заведующая лабораторией селекции конопли ФГБНУ «Краснодарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко», доктор с.-х. наук.
2. Чухирь Ирина Николаевна, руководитель группы исходного материала отдела селекции ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт риса», кандидат с.-х. наук.

Ведущая организация: ФГБОУ ВПО «Кубанский Государственный аграрный университет»

Защита диссертации состоится _____
на заседании диссертационного совета Д 006.026.01 при ФГБНУ
«Всероссийский научно-исследовательский институт риса» по адресу:
350921, г. Краснодар, пос. Белозерный, 3, тел.: (861)229-49-91, 229-49-85.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «ВНИИ риса» и на сайте: www.vniirice.ru

Объявление о защите и автореферат размещены на официальном сайте
ВАК РФ <http://vak.ed.gov.ru>

Автореферат разослан _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, к.б.н.

С.С. Чижикова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Подсолнечник (*Helianthus annuus* L.) является главной масличной культурой России. При этом его доля в производстве растительных масел достигает 80 %, а ежегодный сбор маслосемян – более 7 млн. тонн.

Существует потенциал увеличения урожайности подсолнечника в производственных посевах за счет более эффективного уничтожения сорняков и борьбы с цветковым паразитом заразихой. Количественной оценкой этого потенциала может служить очевидное несовпадение значений семенной продуктивности современных сортов и гибридов подсолнечника в хороших условиях выращивания около 3 т/га и реальной урожайности, например, в среднем по России в благоприятном 2013 г. – только 1,56 т/га. Следовательно, около половины урожая подсолнечника теряется из-за низкой культуры земледелия.

В настоящее время в мировом сельскохозяйственном производстве с 2003 г., а в России с 2008 г., используется новая производственная система выращивания подсолнечника Clearfield® (BASF), состоящая из двух компонентов: послевсходовой обработки растений высокоэффективными гербицидами имидазолинового ряда (Евро-Лайтнинг®), обладающими системным действием, и гербицидоустойчивого гибрида. Признак устойчивости был обнаружен в популяции дикорастущего подсолнечника в 1996 г. в США и передан в генофонд культурного подсолнечника обычными селекционными методами. Этот признак контролируется основным полудоминантным геном *Imr* при наличии дополнительного гена-модификатора.

Генетическая устойчивость к имидазолиновым гербицидам, с действующими веществами имазапир и имазамокс, при использовании технологии выращивания Clearfield® на подсолнечнике, представляет большую ценность для контроля широкого спектра сорняков, включая амброзию и заразиху.

В Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию в России, начиная с 2007 г. по настоящее время, внесено несколько десятков только зарубежных гербицидоустойчивых гибридов подсолнечника.

В нашей стране во ВНИИМК были выполнены первые генетические исследования признака имидазолиноустойчивости, однако селекционных работ по этому направлению ранее не проводилось.

Цель исследования. Создать и изучить межлинейный гибрид подсолнечника с устойчивостью к имидазолиновым гербицидам для производственной системы Clearfield®.

Задачи исследования:

- оценить частоту встречаемости гена гербицидоустойчивости при широкомасштабном скрининге селекционного материала по толерантности к имидазолинонам;

- создать и изучить гербицидоустойчивые родительские линии и экспериментальный гибрид;
- оценить степень устойчивости полученного гибрида к имидазолинонам в квалификационном испытании.

Идея работы. Обеспечить селекционное решение задачи получения первого отечественного имидазолиноустойчивого гибрида для производственной системы Clearfield®.

Методы исследований. Выбранная селекционная стратегия основана на создании гербицидоустойчивого аналога продуктивного гибрида подсолнечника за счет введения гена толерантности к имидазолинонам *Imr* в родительские линии путем серии беккроссов. В работе использовали выращивание растений в полевых условиях и в камерах фитотрона. Скрещивания и самоопыление растений, а также полевые эксперименты проводили принятыми во ВНИИМК способами. Молекулярно-генетические анализы осуществляли с использованием ПЦР. Обработку растений гербицидами выполняли согласно нормативам фирмы BASF для технологии Clearfield®. Экспериментальные данные обрабатывали общепринятыми методами биометрии.

Научная новизна исследований. Впервые установлено, что потенциальная частота встречаемости доминантных генов гербицидоустойчивости в селекционном генофонде ЦЭБ ВНИИМК оценивается менее чем 5×10^{-6} (1:200000), а в линиях Армавирской опытной станции - менее чем 4×10^{-6} (1:280000). Созданы первые отечественные родительские линии и гибрид подсолнечника Арими, несущие ген устойчивости к имидазолиноновым гербицидам *Imr* в гомозиготном состоянии. Гибрид Арими по степени устойчивости к имидазолинонам соответствует международным стандартам.

Практическая значимость работы. Данные об отсутствии гербицидоустойчивых растений в сортах и линиях подсолнечника при широкомасштабном скрининге указывают на целесообразность привлечения доноров гена *Imr* в селекционных программах. Рекомендуется использовать созданный гибрид подсолнечника Арими в товарных посевах по производственной системе Clearfield® при послевсходовой обработке растений гербицидом Евро-Лайтнинг® для борьбы с сорняками и болезнями. Использование родительских линий ВК1-ими и ВК21-ими в семеноводческих посевах при их размножении, а также на участках гибридизации, по этой технологии выращивания, позволяет бороться не только с сорняками и болезнями, но и падалицей подсолнечника, что повышает генетическую чистоту полученных семян. Использование в селекции подсолнечника масличности ядер семян и надземной вегетативной биомассы как фоновых признаков увеличит эффективность отбора при идентификации урожайных генотипов по фенотипу.

Личный вклад автора. Соискатель разрабатывал и реализовывал схему исследований, подбирал материал и методы, проводил экспериментальную часть работы, собирал необходимые литературные

данные; осуществлял статистическую обработку результатов с их интерпретацией и делал выводы.

Достоверность и обоснованность научных положений, выводов, рекомендаций подтверждается необходимым объемом опытов. Вся работа последовательно выполнена в соответствии с обозначенной целью и детализированными задачами. Результаты были получены в ходе полевых и фитотронных экспериментов, а также лабораторных анализов. Проведена необходимая статистическая обработка фактического материала. Выводы логично вытекают из результатов исследований.

Апробация результатов. Материалы исследований были доложены на 4-ой международной конференции молодых ученых и специалистов "Актуальные вопросы селекции, технологии и переработки масличных культур" (ВНИИМК, Краснодар, 27-29 марта 2007 г.), на 5-ой международной конференции молодых ученых и специалистов "Перспективные направления исследований в селекции и технологии возделывания масличных культур" (ВНИИМК, Краснодар, 3-6 февраля 2009 г.), на 7-ой международной конференции молодых ученых и специалистов «Актуальные вопросы биологии, селекции, технологии возделывания и переработки масличных культур» (ВНИИМК, Краснодар, 19-21 февраля 2013 г.), на 8-ой международной конференции молодых ученых и специалистов «Конкурентная способность отечественных гибридов, сортов и технологии возделывания масличных культур» (ВНИИМК, Краснодар, 19-20 февраля 2015 г.), на 5-ой международной научно-практической конференции «Современные концепции научных исследований» (Москва, 29-30 августа 2014 г.).

Публикация результатов исследования. По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 5 - в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, получено 4 патента на селекционные достижения.

Положения, выносимые на защиту:

- результаты широкомасштабного скрининга селекционного генофонда подсолнечника ВНИИМК по устойчивости к имидазолиномам;
- схема создания и результаты отбора имидазолиноустойчивых аналогов родительских линий подсолнечника на основе беккроссов;
- квалификационный тест гибрида подсолнечника Арими по устойчивости к имидазолиномам с использованием шкалы фитотоксичности гербицида;
- характеристика созданного гибрида подсолнечника Арими по хозяйственно ценным признакам.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 110 страницах текста в компьютерном исполнении, состоит из введения, 5 глав, выводов, рекомендаций для селекционной практики, списка использованной литературы и приложений. Содержит 16 таблиц и 14 рисунков. Список литературных источников включает 120 работ, в том числе 40 иностранных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Биологические основы селекции подсолнечника на имидазолиноустойчивость (обзор литературы)

В данной главе представлен аналитический обзор существующей на данный момент научной литературы с целью обоснования постановки исследовательской проблемы. Последовательно рассмотрены вопросы о подсолнечнике, как культурном растении, создании межлинейных гибридов этой культуры и его селекции на устойчивость к имидазолинонам.

2. Условия, материал и методы проведения исследований. Исследования проводили на Армавирской опытной станции (г. Армавир) и центральной экспериментальной базе ВНИИ масличных культур им. В.С. Пустовойта (г. Краснодар) в 2005-2014 гг.

Армавирская опытная станция ВНИИМК, где проводились основные работы, расположена в равнинной части восточной зоны Краснодарского края. Климат умеренно-континентальный, с недостаточным увлажнением. Почвенный покров опытной станции представляет чернозем типичный и обыкновенный малогумусный тяжелосуглинистый, сформированный на лессовидном карбонатном суглинке. Мощность гумусового горизонта составляет 90-110 см. Содержание гумуса в пахотном слое колеблется от 4,2% до 4,8%.

Среднесуточная температура по среднегодовым данным равняется 10,5 °С. Сумма эффективных температур за вегетационный период составляет 3450 °С.

В работе использованы линии, гибриды и сорта подсолнечника селекции Армавирской опытной станции и центральной экспериментальной базы ВНИИМК. Линии: ВА6, ВА384, ВА760, ВК276, ВК580, ВК585 и ВК678. Гибриды: Темп, Триумф и Кубанский 93. Сорта: Родник, Мастер и Орешек. В качестве стандартов использованы иностранные гибриды НК Неома и Римисол.

Ежегодно проводили ручной и сеялочный посев на экспериментальных участках при расстановке растений 70×35 см по одному в гнезде. Предшествующая культура – озимая пшеница. В случае оценки признака гербицидоустойчивости, на стадии трёх пар настоящих листьев растения обрабатывали имидазолиновыми гербицидами, как правило, в однократной дозе 1х (1 л/га): Пульсаром (д.в. имазамокс) или Евро-Лайтнингом (д.в. имазапир и имазамокс). Оценку степени поражения растений гербицидом проводили по шкале фитотоксичности через 7-10 дней после обработки.

При выращивании растений в осенне-зимний период в камере фитотрона использовали фотопериод 16/8 ч день/ночь, светильники Фотос.4 с лампами ДРИ-2000-6, обеспечивающие освещенность 25 килोलюкс.

Самоопыление и гибридизацию подсолнечника проводили принятыми во ВНИИМК методами.

При проведении молекулярно-генетического анализа ДНК подсолнечника выделяли из листьев отдельных растений по модифицированному методу. Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 67 мМ трис-НСl, рН=8,8; 16,6 мМ сульфата аммония; 1,5-3 мМ MgCl₂; 0,01% Tween 20; по 0,2 мМ дезоксирибонуклеозидфосфатов; по 20 мкМ праймеров; 5X Q solution; 10 нг матричной ДНК и 1 ед. рекомбинантной термостабильной ДНК полимеразы. Для амплификации использовали термоциклер S1000[™] (BioRad, США). Условия амплификации: начальная денатурация – 2 мин 96 °С, затем 30 циклов при соблюдении температурно-временного режима: денатурация при 94 °С – 30 сек, отжиг при 60 °С в течение 40 сек, элонгация – 1 мин при 70 °С, финальная элонгация – 2 мин. Для ПЦР анализа использовали SNP-праймеры, которые были предоставлены фирмой BASF.

Электрофорез продуктов амплификации проводили в агарозном геле (2% агарозы, 1x TAE-буфер) с использованием камеры SE-2 для горизонтального электрофореза (Хеликон, Россия). Последующее окрашивание осуществляли бромистым этидием. Документирование результатов электрофореза обеспечивалось при помощи системы цифрового видеоизображения BIO-PRINT (Vilber Lourmat, Франция).

Статистическую обработку результатов исследования проводили, используя стандартные биометрические методы, в частности, определение наименьшей существенной разности (НСР) и проверку гипотез о схемах расщепления с использованием критерия соответствия χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3 Скрининг генотипов подсолнечника по устойчивости к имидазолиновым гербицидам

3.1 Селекционный генофонд ЦЭБ ВНИИМК

В связи с отсутствием данных о нахождении устойчивых к имидазолинонам растений у культурного подсолнечника при оценке в небольших выборках была поставлена задача изучить частоту встречаемости потенциальных наследственных факторов гербицидоустойчивости в генофонде культурного подсолнечника ВНИИМК при существенно большем объёме выборки.

В 2012 г. исследование проводили на центральной экспериментальной базе ВНИИМК (г. Краснодар). Посев сеялкой проводили на 5-ти гектарном участке. На стадии 3-х пар настоящих листьев растения обрабатывали гербицидом Пульсар (1 л/га, д.в. имазамокс). Оценка поражения растений проводили через семь дней после обработки. Ложно-устойчивые типичные растения в пределах посеянного ряда, т.е. группы растений, на которые не попал гербицид, а также и единичные поздно взошедшие растения, избежавшие контакта с гербицидом, не учитывались как резистентные.

Всего было обнаружено семь растений без признаков фитотоксичности, тогда как все остальные из около 200000 осмотренных растений сортов Родник, Мастер и Орешек, а также линий ВК678 и ВК580 обладали явными симптомами повреждения гербицидом. Особи без признаков поражения гербицидом были выкопаны, пересажены и самоопылены в питомнике на селекционном поле.

Семь полученных инбредных семей были оценены по устойчивости к имидазолиновому гербициду Евро-Лайтнинг в условиях камеры фитотрона в осенне-зимний период 2012-2013 гг. (табл. 1).

Шесть семей оказались повреждёнными гербицидом, следовательно, исходные растения были ложно устойчивыми. Однако одна семья от родоначального растения из ряда линии ВК580 в полевом посеве, показала моногенное расщепление на устойчивые и погибшие в отношении 14:4, $\chi^2_{3:1} = 0,07$, $\chi^2_{st} = 3,84$, $p > 0,05$ при доминировании устойчивости. Расщепление в I_1 указало на гетерозиготность родоначального растения. С выращенных особей с максимальной степенью устойчивости, обладающих при этом ветвистым фенотипом, были получены семена I_2 в условиях камеры фитотрона. В полевых условиях 2013 г. все растения одной из отобранных семей I_2 «ВК580» оказались одновременно ветвистыми и устойчивыми к имидазолиновому гербициду Евро-Лайтнинг, т.е. были гомозиготны по генам этих признаков. Однако по комплексу морфологических признаков растения этой семьи однозначно отличались от ожидаемого морфотипа линии ВК580. Поскольку на скрининговом поле в 2012 г. была посеяна только одна ветвистая линия ВК580, то очевидно, что родоначальное гербицидоустойчивое гетерозиготное растение, обнаруженное в ряду растений ВК580, было или падалицей, или ауткроссом в предыдущих поколениях (т.е. условно «ВК580»).

Таблица 1 – Результаты оценки отобранных в поле семей I_1 по устойчивости к Евро-Лайтнингу (доза 0,25х) в камере фитотрона

ЦЭБ ВНИИМК, Краснодар, 2012 г.

Генотип	Число растений I_1 , шт.	
	устойчивые	погибшие
Мастер	0	2
Родник	0	12
Родник	0	6
Орешек	0	16
ВК 678	0	17
ВК 580	0	11
ВК «580»	14	4

Более того, идентификация с помощью молекулярно-генетических SNP-маркеров, показала аллельность обнаруженной мутации гену *Imr*, уже используемому в селекции и сельскохозяйственном производстве (рис. 1).

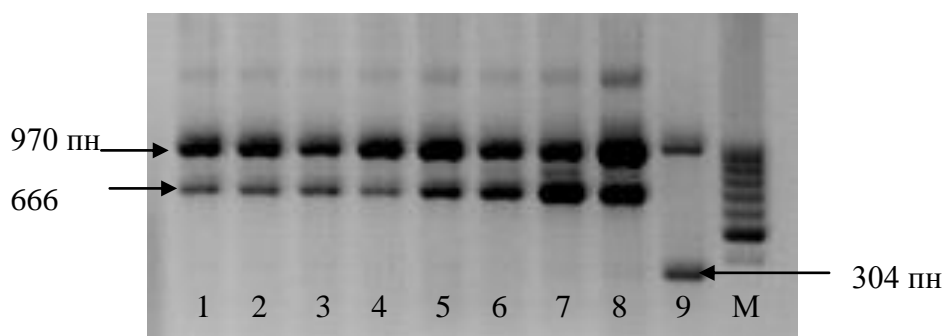


Рисунок 1 - Электрофоретические спектры фрагментов ДНК подсолнечника, амплифицированные с аллель-специфичными праймерами по гену *ImiSun*.

М – маркер молекулярной массы 100 kb. Дорожки: 1-3 - ДНК образцов п, несущих мутацию A205 (At)V; 4-8 - ДНК образцов, толерантных к имидазолиновым гербицидам; 9 - ДНК дикого типа, не устойчивого к имидазолинонам

В частности, был проведен анализ образцов подсолнечника гербицидоустойчивой семьи «ВК580», по маркерам, выявляющих точечные мутации в разных позициях гена устойчивости к имидазолинонам *AHASL1*. Дорожки 1-3 на рис.1 являются контрольными и показывают образцы подсолнечника, несущие мутацию A205 (At)V. Фракция длиной 970 пн представляет собой контрольный бенд, который амплифицируется несмотря на наличие или отсутствие мутации. Фрагмент ДНК 666 пн является диагностическим для мутантного генотипа. И, наконец, фрагмент 304 пн амплифицируется у образцов подсолнечника дикого типа, т.е. не несущего мутацию A205 (At)V. Дорожки 4-8 на рис. 1 – ДНК испытуемых образцов. Поскольку у этих образцов амплифицировался диагностический бенд 666 пн, но не амплифицировался фрагмент 304 пн, данные образцы подсолнечника являются гомозиготными мутантами по гену *ImiSun* (или *Imr*).

3.2 Селекционный генофонд Армавирской опытной станции ВНИИМК

На Армавирской опытной станции ВНИИМК в 2013 г. на 5-ти гектарном поле подсолнечника после обработки Пульсаром (1 л/га) при массовой гибели растений подсолнечника (рис. 2) были отобраны, выращены и самоопылены два растения без признаков повреждения гербицидом, по одному из рядов линий ВА6 и ВА384 в посеве. В камере фитотрона в осенне-зимний период 2013-2014 гг. семья I₁ «ВА6» показала моногенное расщепление по гербицидоустойчивости, тогда как все растения семьи I₁ ВА384 полностью погибли, показав ложную устойчивость родоначального растения. Выжившие растения семьи I₁ «ВА6» по комплексу морфологических признаков, включая окраску и форму как листьев, так и околоплодника семян, явно не соответствовали фенотипу линии ВА6, что указывает на родоначальное растение как падалицу или ауткросс в предыдущих поколениях.



Рисунок 2 - Погибшие растения подсолнечника через 10 дней после обработки Пульсаром (доза 1х). В правом нижнем углу не обработанный контроль. Армавирская опытная станция ВНИИМК, 2013 г.

Таким образом, на двух экспериментальных полях общей площадью 10 га при осмотре около 480000 растений трёх сортов и семи линий не было обнаружено ни одного типичного растения посеянных генотипов подсолнечника с признаком устойчивости к имидазолинонам (табл. 2).

Таблица 2 – Результаты оценки частоты встречаемости доминантных генов гербицидоустойчивости в селекционном материале подсолнечника ВНИИМК

ВНИИМК, 2012-2013 гг.

Генотип	Количество обработанных растений, шт.	Количество устойчивых растений, шт.	Частота встречаемости генов гербицидоустойчивости
<i>Поле №1, 200000 растений, Пульсар, 2012 г.</i>			
Родник	20000	0	< 1/20000
Мастер	20000	0	< 1/20000
Орешек	20000	0	< 1/20000
ВК276	30000	0	< 1/30000
ВК678	30000	0	< 1/30000
ВК580	40000	0	< 1/40000
ВК585	40000	0	< 1/40000
<i>Поле №2, 280000 растений, Пульсар, 2013 г.</i>			
ВА6	100000	0	< 1/100000
ВА760	70000	0	< 1/70000
ВА384	110000	0	< 1/110000

Следовательно, потенциальная частота встречаемости доминантного гена имидазолиноустойчивости при этом оценивается менее чем 5×10^{-6} (1:200000) для генофонда изученных сортов и линий ЦЭБ ВНИИМК и менее 4×10^{-6} для линий Армавирской опытной станции (1:280000).

4 Создание гибрида подсолнечника с устойчивостью к имидазолиновым гербицидам

В случае отсутствия у селекционных линий и сортов признака устойчивости к имидазолиномам, можно использовать два основных подхода: создание новых по комплексу хозяйственно ценных признаков линий после гибридизации с донором гербицидоустойчивости и создание аналогов лучших селекционных линий по целевому признаку путем серии беккроссов. Поскольку второй подход обладает большей вероятностью получения прогнозируемого положительного результата, именно он был взят в качестве селекционной стратегии.

4.1 Совершенствование способов определения ценотически продуктивных генотипов при индивидуальном отборе

Система возвратных скрещиваний при создании аналогов предполагает на каждом этапе беккроссов отбор гетерозиготных по целевому гену растений из расщепляющегося потомства. Эти выживающие после обработки гербицидом гетерозиготы случайным образом распределены в посеве среди погибающих гомозигот. В результате формируется посев с нерегулярной расстановкой отдельных растений, которые продуцируют семена при разной площади питания. Очевидно, что в таких условиях существует необходимость разработки эффективных способов отбора ценотически продуктивных растений в потомстве.

Для изучения влияния конкуренции на признаки растений подсолнечника в агрофитоценозе были экспериментально созданы стартовые различия роста соседних растений за счет разного срока появления их всходов. Эксперименты проводили в 3-х повторностях на 6-ти рядных делянках с расположением гнезд 70×70 см и оставлением после прорывки по одному растению в гнезде. В первый срок засевали 50% гнезд в шахматном порядке, в оставшиеся между ними гнезда семена тех же генотипов высевали через три, шесть и девять дней в зависимости от варианта опыта. На контрольных делянках все гнезда засевали одновременно в первый срок. С целью достижения минимального наследственного варьирования брали семена F_1 простых межлинейных гибридов Триумф и Кубанский 93 (Краснодар, ЦЭБ ВНИИМК, 2004 г.) и Темп (Армавирская опытная станция, 2005 г.).

Полученные результаты (рис. 3) говорят о существенных изменениях величин характеристик растений по мере увеличения их различий по конкурентоспособности. Судя по прямолинейности регрессии не только в правых, но и в левых частях отдельных графиков наблюдается аддитивность реакции соседних растений на изменения освоенной ими площади питания в посевах. А именно, в какой мере снижается продуктивность слабых конкурентов, в такой же степени возрастает продуктивность растущих рядом с ними более сильных конкурентов. Различия растений по конкурентоспособности не только искажают оценки селекционных признаков генотипа, но также пропорционально изменяют значения других признаков, например массы стебля с цветоложем корзинки (рис. 3, Б), что позволяет измерять степень искажения конкуренцией оценок селекционных признаков на основе принципа фоновых признаков.

При этом следует учитывать обнаруженную закономерность: улучшение условий питания растений за счет усиления их конкурентоспособности в большей степени стимулирует вегетативный рост, чем увеличение урожая семян. Об этом свидетельствует сопоставление значений коэффициентов регрессий этих признаков на число дней разницы в появлении всходов (рис. 3, А и Б). По мере повышения конкурентоспособности уменьшается эффективность утилизации ресурсов среды на биосинтез жира, что приводит к закономерному снижению масличности ядер семян по мере усиления конкурентоспособности особей подсолнечника (рис. 3, Г).

По данным графика (рис. 3, Г), масличность может значительно повышаться вследствие недостаточной обеспеченности ресурсами слабоконкурентоспособных растений. Однако связанные с этим ошибки отборов растений можно исключить на основе учета того, что повышение масличности по мере снижения конкурентоспособности связано со снижением урожая семян (рис. 3, А и Г). Подобные ошибки элиминируются при отборах растений по методу В.С. Пустовойта, поскольку он рекомендовал отбирать продуктивные корзинки с количеством семян более 1000. Очевидно, что практически следует осуществлять отборы растений с высокой масличностью ядер семян среди высокопродуктивных растений, т.е. лучшие генотипы характеризуются сочетанием высокого урожая ядер семян с их высокой масличностью.

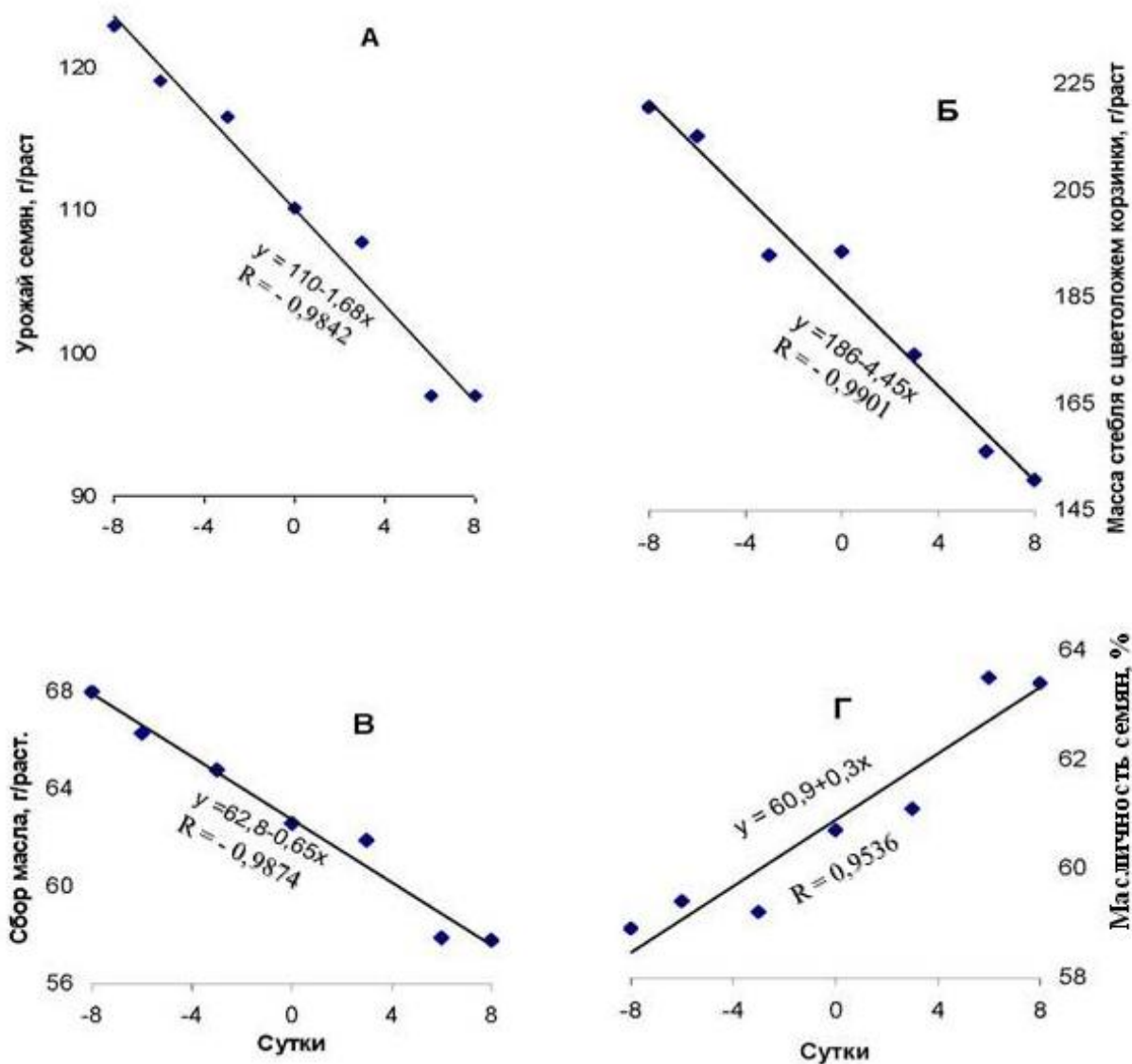


Рисунок 3 — Влияние различий в сроках появления всходов соседних растений в посевах гибрида подсолнечника Темп на оценки урожая семян: А (ядра семянок, г/раст.), Б (масса стебля с цветоложем корзинок, г/раст.), В (сбор масла, г/раст.) и Г (масличность ядер семян, %). Армавирская опытная станция, 2005 г.

Результаты испытания семей потомков лучших и худших растений, отобранных в 2007 г. из синтетической популяции подсолнечника по продуктивности ядер семянок (г/раст.) с коррекцией по двум фоновым признакам позволили установить, что разница между средними величинами двух групп потомков была достоверна для урожайности семянок, урожайности ядер семянок и сбора масла (табл. 3).

Таблица 3 - Результаты испытания семей потомков лучших и худших растений, отобранных в 2007 г. из синтетической популяции подсолнечника по урожаю семян ядер семян (г/раст.)

Армавирская опытная станция, 2007-2008 гг.

Потомства	Число семей	Урожайность, т/га		Лузжистость семян, %	Масличность семян, %	Сбор масла, т/га
		семянков	семян			
Лучшие	15	2,99	2,69	24,1	65,8	1,40
Худшие	15	2,78	2,10	24,4	65,3	1,29
t факт.		2,69*	3,01*	0,61	1,23	2,99*

* $p < 0,05$, различия достоверны

Таким образом, полученные результаты подтверждают возможность использования масличности ядер семянков и массы вегетативных органов (стебель с цветоложем корзинки) как фоновых признаков при отборе ценотически продуктивных отдельных растений в условиях различной площади питания. Подобные условия формируются, в частности, при отборе желательных генотипов из выживших после обработки гербицидом растений в расщепляющихся по признаку имидазолиноустойчивости популяциях, например беккроссных потомствах.

4.2 Создание имидазолиноустойчивых родительских линий

В качестве базового гибрида для создания имидазолиноустойчивого аналога был выбран внесенный в 2008 г. в Госреестр допущенных к использованию урожайный гибрид подсолнечника Беркут, созданный на Армавирской опытной станции ВНИИМК. Генетическая формула гибрида: ВА93 А × ВА325. Следовательно, рекуррентными родителями в программе беккроссов были материнская линия закрепитель стерильности ВА93 и отцовская линия восстановитель фертильности ВА325. Донорами гена гербицидоустойчивости *Imr*, происходящего от дикорастущего подсолнечника, при этом являлись линии лаборатории генетики ВНИИМК *imi-B* (F_4 НА425 × ВК876) и *imi-R* (F_4 РНА426 × ВК580), соответственно.

Работа по введению гена гербицидоустойчивости *Imr* путем беккроссов в родительские линии ВА93 и ВА325 осуществлялась на ЦЭБ ВНИИМК с 2006 по 2010 гг. Работа проводилась как в поле, так и в камерах фитотрона, что позволяло получать два последовательных поколения в год.

На каждом этапе беккроссов растения расщепляющихся семей в соотношении 1 *Imr imr* : 1 *imr imr* обрабатывали имидазолиновыми гербицидами (Пивот или Пульсар) в полевых условиях в однократной дозе 1х (3 мл/л) и в камерах фитотрона - 0,25х.

Гетерозиготные растения с геном устойчивости выжили с признаками повреждения, подвергались самоопылению и скрещиванию в качестве отцовской формы с рекуррентным родителем.

Имидазолиноустойчивая линия подсолнечника ВК1-ими была получена на основе скрещивания в 2006 г. селекционной линии ВА93, обладающей высокой комбинационной способностью, с инбредной линией лаборатории генетики *imi-B* (F_4 HA425 \times BK876), являющейся донором доминантного гена устойчивости к имидазолиновым гербицидам (*Imr*), возвратных скрещиваний на линию ВА93 и принудительного самоопыления в сочетании с отбором рекомбинантных гетеро- и гомозигот по комплексу хозяйственно ценных признаков (рис. 4).

Линия ВК1-ими представлена фертильным и стерильным на основе цитоплазмы РЕТ1 аналогами, устойчивыми к заразице расы Е. Вегетационный период от всходов до цветения 54 и до физиологической спелости 94 дня, масличность семян 44 % при их лужистости 23 % и массе 1000 штук 55 г.

Главной особенностью линии ВК1-ими является её наследственная устойчивость к гербицидам имидазолинового ряда за счёт гомозиготного состояния гена *Imr*, что позволяет использовать эту линию в селекции гибридов, выращиваемых по технологии Clearfield®.

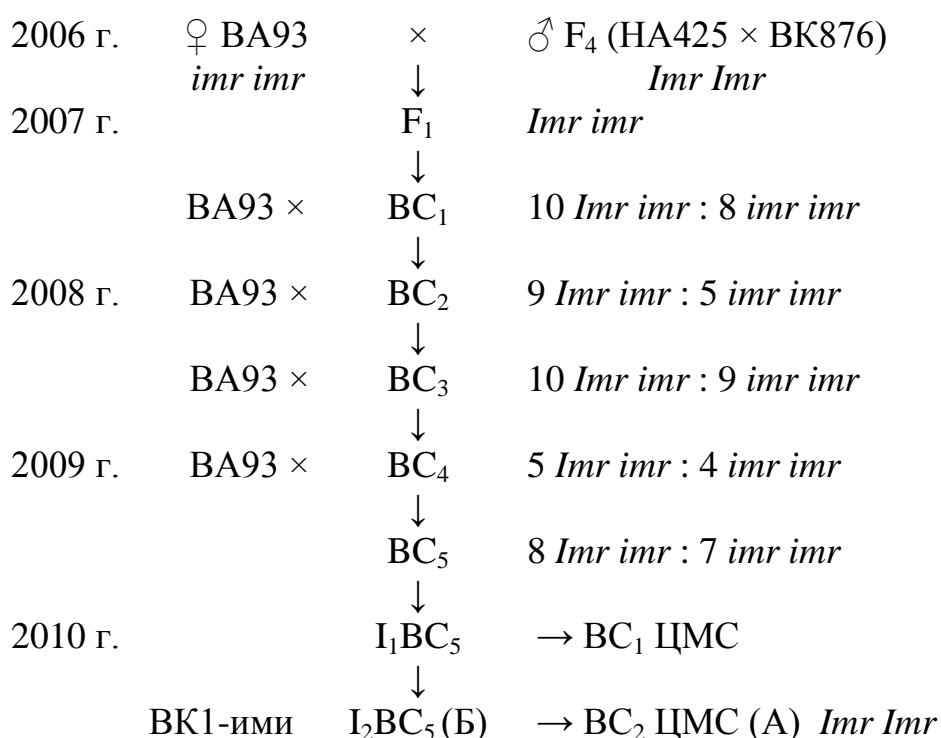


Рисунок 4 – Схема получения материнской линии ВК1-ими, имидазолиноустойчивого аналога ВА93 в Б и А формах

Имидазолиноустойчивая линия подсолнечника ВК21-ими была получена на основе скрещивания в 2006 г. селекционной линии ВА325, обладающей высокой комбинационной способностью, с инбредной линией лаборатории генетики *imi-R* (F_4 RHA426 × BK580), являющейся донором доминантного гена устойчивости к имидазолиновым гербицидам (*Imr*), возвратных скрещиваний на линию ВА325 и принудительного самоопыления в сочетании с отбором рекомбинантных гетеро- и гомозигот по комплексу хозяйственно ценных признаков (рис. 5).

Константная инбредная линия восстановитель фертильности пыльцы ВК21-ими обладает рецессивным ветвлением, устойчивостью к ложной мучнистой росе (раса 330), толерантностью к фомопсису и высокой комбинационной способностью. Вегетационный период от всходов до цветения 53 и до физиологической спелости 93 дня, масличность семян 48% при их лужистости 22% и массе 1000 штук 40 г.

Главной особенностью линии ВК21-ими является её наследственная устойчивость к гербицидам имидазолинового ряда за счёт гомозиготного состояния гена *Imr*, что позволяет использовать эту линию в селекции подсолнечника для получения гибридов, выращиваемых по технологии Clearfield®.

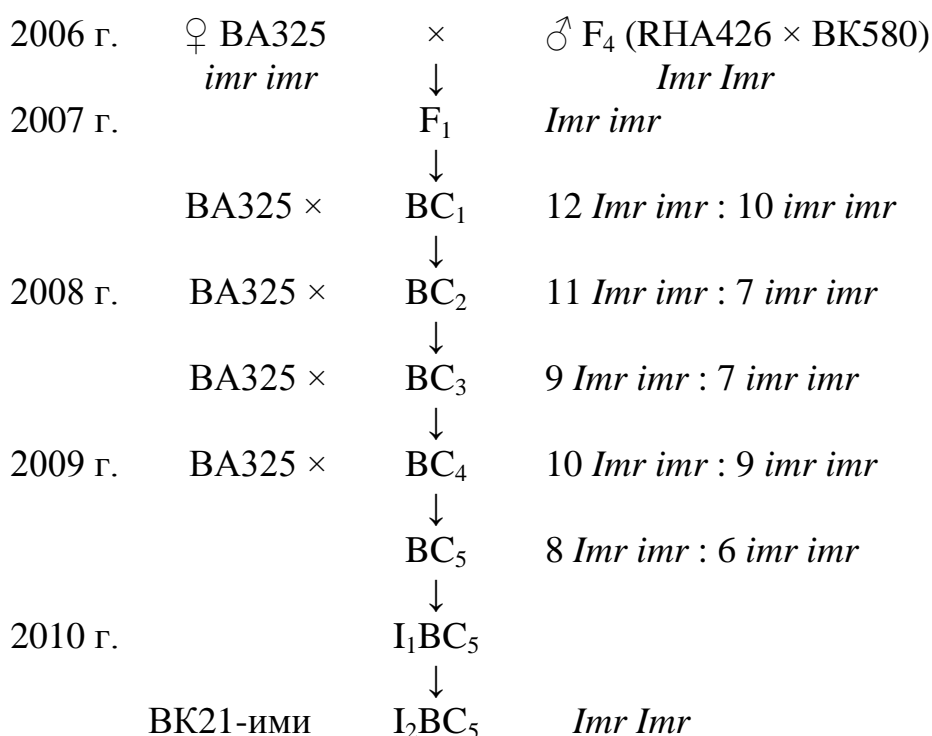


Рисунок 5 – Схема получения отцовской линии ВК21-ими, имидазолиноустойчивого аналога ВА325

4.3 Создание и изучение гибрида подсолнечника Арими в производственной системе Clearfield®

Простой межлинейный гибрид подсолнечника Арими (ВК1-ими А × ВК21-ими) получен в рамках селекционно-генетической программы создания гербицидоустойчивых растений во ВНИИМК (табл. 4).

Материнская форма, включая стерильный аналог и закрепитель стерильности, а также отцовская форма – восстановитель фертильности пыльцы, гомозиготны по гену *Imr*, контролирующему признак устойчивости к имидазолиноновым гербицидам (Пульсар, Пивот, Евро-Лайтнинг).

Гибрид Арими генетически близок к созданному ранее гибриду Беркут, являясь его имидазолиноноустойчивым аналогом, обладает высокой урожайностью. Устойчив к заразице (раса Е) и ложной мучнистой росе (раса 330), толерантен к фомопсису. Гибрид среднеранний, вегетационный период от всходов до физиологической спелости 90 суток. Масличность семян 51% при лужистости 21%. По данным Госкомиссии, например в 2012 г., гибрид Арими в Краснодарском крае показал превышение на 2,4 ц/га по урожайности семян над контрольным сортом Березанский (25,5 и 23,1 ц/га, соответственно) при обычной технологии испытания.

Гибрид Арими предназначен для выращивания в производственной системе Clearfield® при послевсходовой обработке растений гербицидом Евро-Лайтнинг. При испытании по этой технологии основные селекционные параметры продуктивности отечественного гибрида Арими были на уровне лучших мировых стандартов, таких как гибрид НК Неома (табл. 4).

Таблица 4 – Селекционная характеристика гибрида подсолнечника Арими при выращивании по технологии Clearfield® (Евро-Лайтнинг, 1х) при ручной уборке

ВНИИМК, 2011-2012 гг.

Признак	Аrimi			НК Неома (к)		
	2011 г.	2012 г.	среднее	2011 г.	2012 г.	среднее
Вегетационный период, сутки	92*	90*	91	97	95	96
Высота растений, см	172*	160*	166	178	167	173
Диаметр корзинки, см	18*	24*	21	16	22	19
Масса 1000 семян, г	40	45	43	42	49	46
Урожайность семян, т/га	3,0	3,3	3,2	2,6	3,5	3,1
Масличность семян, %	51,5	49,9	50,7	50,3	49,0	49,7
Сбор масла, т/га	1,4	1,7	1,6	1,3	1,8	1,6

* $p < 0,05$, отличия с контролем достоверны

5 Квалификационный тест гибрида подсолнечника Арими на устойчивость к имидазолининам

Степень гербицидоустойчивости растений определяется по шкале фитотоксичности гербицида. Оценка фитотоксичности действия гербицида в баллах проводилась по модифицированному нами методу через 12-14 дней после обработки: 0 – растения без симптомов повреждения; от 1 до 4 – увеличение степени хлороза листьев и снижение высоты растений; от 5 до 8 – появление морфологических аномалий и некроза листьев; 9 – полный некроз апекса и гибель растений.

Материалом исследования были: межлинейный гибрид селекции ВНИИМК Арими, а также лучшие устойчивые к имидазолинонам гибриды иностранных фирм – НК Неома и Римисол, использованные в качестве международного стандарта устойчивости.

Обработка растений гербицидом Пульсар (40 г/л действующего вещества имазамокс) проводилась в фазе 3-х пар настоящих листьев с помощью ранцевого опрыскивателя в квалификационном полевом опыте на центральной экспериментальной базе ВНИИМК, г. Краснодар в 2013 г. Использовали дозы Пульсара: 0х – без обработки, 1х (1,25 л/га) и 2х (2,5 л/га).

Квалификационные испытания гербицидоустойчивых генотипов проводили, согласно рекомендациям фирмы BASF, при повышенных дозах действующих веществ. Это связано с тем, что для эффективного использования гибрида в агротехнологии Clearfield® требуется его способность выдерживать одинарную (1х) и даже двойную (2х) от рекомендуемой в производстве дозы. Например, для гербицида Пульсар это будет 50 г и 100 г/га действующего вещества имазамокс, соответственно.

В нашем эксперименте контрольные растения восприимчивого (не устойчивого) сорта Мастер показали максимальные значения индекса фитотоксичности в 8,1 балла для дозы 1х и в 8,9 балла для дозы 2х (табл. 5) при полной остановке роста стебля (табл. 6) и гибели растений.

Таблица 5 - Индекс фитотоксичности у имидазолиноустойчивых гибридов и неустойчивого сорта (к) подсолнечника, обработанных Пульсаром в различных дозах: 0х, 1х (1,25 л/га) и 2х (2,5 л/га) через 12 дней после обработки

ВНИИМК, 2013 г.

Генотип	Индекс фитотоксичности, балл			НСР ₀₅
	0х	1х	2х	
Мастер (к)	0	8,1	8,9	0,3
НК Неома	0	1,0	2,0	0,6
Римисол	0	1,1	2,5	0,5
Аrimi	0	1,0	2,2	0,1

Все три имидазолиноустойчивых гибрида НК Неома, Римисол и Арими характеризовались в изученных дозах умеренной толерантностью с баллами фитотоксичности от 0,6 до 1,1 и от 2,0 до 2,5, соответственно (табл. 5). При этом в дозе 1х произошло статистически достоверное снижение высоты растений, в среднем для гибридов, на 3 см, а в дозе 2х - на 8 см (табл. 6). В относительном выражении это уменьшение высоты оценивается в 7 и 27%, соответственно, что типично для реакции толерантности.

Таблица 6 - Высота растений имидазолиноустойчивых гибридов подсолнечника, обработанных Пульсаром в различных дозах: 0х, 1х (1,25 л/га) и 2х (2,5 л/га) через 12 дней после обработки

ЦЭБ ВНИИМК, 2013 г.

Генотип	Высота растений, см				
	0х	1х		2х	
	среднее	среднее	± 0х	среднее	± 0х
Мастер (к)	31	8	- 23*	7	- 24*
НК Неома	30	27	- 3*	21	- 9*
Римисол	26	24	- 2*	18	- 8*
Арими	32	28	- 4*	25	- 7*

* - $p < 0,05$, различия достоверны

Отсутствие достоверных различий по баллам фитотоксичности между изученными гибридами НК Неома, Римисол и Арими указывает, вероятно, на одинаковую генотипическую среду по т.н. нецелевым признакам толерантности. Этот факт имеет большое значение в рамках предположения о потенциальном существовании генов-усилителей устойчивости.

Таким образом, использование 9-ти балльной шкалы фитотоксичности для гербицида Пульсар по отношению к имидазолиноустойчивым гибридам подсолнечника позволило количественно оценить симптомы повреждения растений через 12 дней после обработки. Отечественный гибрид Арими характеризовался при этом аналогичной степенью устойчивости к Пульсару по сравнению со стандартными импортными гибридами. Все использованные в изучении имидазолиноустойчивые гибриды выдержали максимальную однократную (50 г/га д.в. имазамокс), а также двукратную (100 г/га) дозу Пульсара, показывая при этом умеренную толерантность по баллам шкалы фитотоксичности.

Международное испытание гибрида Арими специалистами фирмы БАСФ подтвердило наши результаты и также показало пригодность его использования для технологии выращивания Clearfield® при послевсходовой обработке растений имидазолинонами, включая допущенный к использованию на подсолнечнике в России гербицид Евро-Лайтнинг.

ВЫВОДЫ

1. При скрининге около 480000 растений подсолнечника трёх сортов-популяций (Родник, Мастер, Орешек) и семи линий (ВК276, ВК678, ВА6, ВА760, ВК580, ВК585, ВА384), обработанных гербицидом Пульсар (1 л/га) на площади 10 га, не было обнаружено ни одного типичного растения посеянных генотипов с признаком устойчивости к имидазолинонам. Потенциальная частота встречаемости доминантных генов гербицидоустойчивости при этом в селекционном генофонде ЦЭБ ВНИИМК оценивается менее чем 5×10^{-6} (1:200000), а в линиях Армавирской опытной станции – менее чем 4×10^{-6} (1:280000).
2. Создана имидазолиноустойчивая материнская линия подсолнечника ВК1-ими на основе введения путем пяти этапов беккроссов в селекционную линию ВА93 полудоминантного гена устойчивости к гербицидам *Imr*. Линия ВК1-ими представлена фертильным и стерильным на основе цитоплазмы РЕТ1 аналогами.
3. Создана имидазолиноустойчивая отцовская линия подсолнечника ВК21-ими на основе введения путем пяти этапов беккроссов в селекционную линию ВА325 гена *Imr*. Линия ВК21-ими обладает признаками восстановления фертильности пыльцы и рецессивного ветвления стебля.
4. Генетическая формула созданного простого межлинейного гибрида подсолнечника Арими (ВК1-ими А × ВК21-ими), гомозиготного по гену *Imr*, позволяет использовать как родительские линии, так и гибрид в производственной системе Clearfield®.
5. При выращивании гибрида Арими по технологии Clearfield® с обработкой растений гербицидом Евро-Лайтнинг (1л/га) в конкурсном сортоиспытании урожайность семян составила 3,2 т/га при их масличности 51 % и сборе масла 1,6 т/га, что не уступало уровню мирового стандарта гибрида НК Неома.
6. Гибрид подсолнечника Арими является одним из первых отечественных имидазолиноустойчивых гибридов, внесен в Госреестр допущенных к использованию в РФ и зарегистрирован в реестре охраняемых селекционных достижений с 2014 г.
7. Гибрид подсолнечника Арими получен как имидазолиноустойчивый аналог гибрида Беркут, относится к среднеранней группе, вегетационный период от всходов до физиологической спелости составляет 90 дней при высоте растений равной 170 см.
8. Квалификационное испытание гибрида Арими по регламенту фирмы BASF при обработке растений как одинарной, так и двойной дозой гербицида Пульсар (50 г и 100 г/га действующего вещества имазамокс, соответственно) показало полное соответствие степени гербицидоустойчивости гибрида Арими по шкале фитотоксичности стандартным гибридам НК Неома и Римисол.

РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ СЕЛЕКЦИОННОЙ ПРАКТИКИ

1. Использовать родительские линии ВК1-ими и ВК21-ими и гибрид подсолнечника Арими в качестве исходного селекционного материала для создания новых линий и гибридов подсолнечника, устойчивых к имидазолиноновым гербицидам.
2. Использовать в семеноводческих посевах линии ВК1-ими и ВК21-ими при их размножении, а также на участках гибридизации, по технологии выращивания Clearfield® для борьбы не только с сорняками и болезнью, но и гербицидонеустойчивой падалицей подсолнечника с целью повышения генетической чистоты выращиваемых семян.
3. Использовать в селекции подсолнечника для идентификации урожайных генотипов по фенотипу отдельных растений масличность ядер семян и надземную вегетативную биомассу как фоновые признаки для повышения эффективности отбора в условиях различной площади питания растений.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Деревенец, В.Н. Новый гибрид подсолнечника Беркут / В.Н. Деревенец, **С.С. Фролов**, И.Н. Русинова // Масличные культуры. НТБ ВНИИМК, Краснодар.- 2006.- Вып. 1 (134).- С. 24-25.
2. Дьяков, А.Б. Искажение конкуренцией селекционных признаков растений подсолнечника и фоновые признаки для коррекции оценок продуктивности / А.Б. Дьяков, В.Н. Деревенец, Т.А. Васильева, **С.С. Фролов** // Масличные культуры. НТБ ВНИИМК, Краснодар.- 2006.- Вып. 2 (135). - С. 3-14.
3. Зайцев, Н.И. Селекция и семеноводство гибридов подсолнечника на Армавирской опытной станции ВНИИМК / Н.И. Зайцев, **С.С. Фролов** // Масличные культуры. НТБ ВНИИМК, Краснодар.- 2011.- Вып. 2 (148-149).- С. 35-37.
4. Лукомец, В.М. Поиск генов устойчивости к имидазолинонам и сульфонилмочевинам у культурного подсолнечника / В.М. Лукомец, Я.Н. Демуринов, А.С. Тронин, **С.С. Фролов** // Труды Кубанского государственного аграрного университета.- 2014.- №50.- С.67-71.
5. Демуринов, Я.Н. Скрининг линий и сортов подсолнечника селекции ВНИИМК по устойчивости к ALS-ингибирующим гербицидам / Я.Н. Демуринов, А.С. Тронин, А.А. Пихтярёва, А.Н. Левуцкая, **С.С. Фролов**, С.З. Гучетль // Масличные культуры. НТБ ВНИИМК, Краснодар.- 2014.- Вып. № 2 (159-160).- С. 26-32.

Работы, опубликованные в других изданиях:

6. **Фролов, С.С.** Влияние разной конкурентоспособности растений в посевах подсолнечника на оценки селекционного и фоновых признаков / С.С. Фролов // Сборник материалов 4-й международной конференции молодых ученых и специалистов "Актуальные вопросы селекции, технологии и переработки масличных культур", посвященной 95-летию со дня основания ВНИИМК / ВНИИМК, Краснодар, 2007. - С. 285-289.
7. **Фролов, С.С.** Возможности прогноза оценок масличности семян по величинам масличности и лужистости семян / С.С. Фролов // Сборник материалов 5-й международной конференции молодых ученых и специалистов "Перспективные направления исследований в селекции и технологии возделывания масличных культур" / ВНИИМК, Краснодар, 2009. – С. 240-243.
8. Илюхин, Д.В. Селекция гибридов подсолнечника на Армавирской опытной станции ВНИИМК / Д.В. Илюхин, **С.С. Фролов** // Сборник материалов 7-й международной конференции молодых ученых и специалистов «Актуальные вопросы биологии, селекции, технологии возделывания и переработки масличных культур», посвященной 100-летию со дня основания ВНИИМК, 19-21 февраля 2013 г. / ВНИИМК, Краснодар, 2013. – С. 97-99.
9. Демурин, Я.Н. Квалификационный тест на устойчивость к имидазолиновому гербициду у гибрида подсолнечника Арими / Я.Н. Демурин, **С.С. Фролов** // Современные концепции научных исследований / сборник научных трудов V международной научно-практической конференции. Россия, Москва, 29-30.08.2014 г. / Евразийский союз ученых (ЕСУ), - № V, 2014 г. – С. 6-7.
10. **Фролов, С.С.** Характеристика сортов и гибридов подсолнечника селекции Армавирской опытной станции ВНИИМК / С.С. Фролов, Н.Н. Свиридов, И.Н. Фролова // Сборник материалов 8-й международной конференции молодых ученых и специалистов «Конкурентная способность отечественных гибридов, сортов и технологии возделывания масличных культур», 19-20 февраля 2015 г., / ВНИИМК, Краснодар, 2015. – С. 146-149.

Патенты на селекционные достижения:

11. Подсолнечник Беркут. Патент № 5360 от 14.04.2010 по заявке № 9464315 от 21.12.2005. Авторское свидетельство № 44510 от 14.04.2010. Авторы: Деревенец В.Н., Зайцев Н.И., Мамонов И.Ф., Мамонова Р.Н., Русинова И.Н., **Фролов С.С.**
12. Подсолнечник ВА 325. Патент № 4529 от 20.02.2009 по заявке № 9253489 от 05.12.2007. Авторское свидетельство № 49182 от 20.02.2009. Авторы: Деревенец В.Н., Дудка Н.З., Зайцев Н.И., Мамонов И.Ф., Мамонова Р.Н., Фролова И.Н., **Фролов С.С.**

13. Подсолнечник ВК21-ими. Патент № 7503 от 03.09.2014 по заявке № 8853881 от 28.11.2011. Авторское свидетельство. № 57390 от 03.09.2014. Авторы: Борисенко О.М., Демури́н Я.Н., Зайцев Н.И., Пихтярёва А.А., **Фролов С.С.**
14. Подсолнечник Арими. Патент № 7391 от 29.05.2014 по заявке № 8853879 от 28.11.2011. Авторское свидетельство № 57388 от 29.05.2014. Авторы: Борисенко О.М., Демури́н Я.Н., Зайцев Н.И., Лукомец В.М., Пикалова Н.А., Пихтярёва А.А., Трёмбак Е.Н., **Фролов С.С.**