

ЛАШИНА

Нина Михайловна

**СОЗДАНИЕ ДИГАПЛОИДОВ ЯЧМЕНЯ КАК ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ
СЕЛЕКЦИИ СОРТОВ С ГРУППОВОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К БОЛЕЗНЯМ**

Шифр и наименование специальности

06.01.07 – Защита растений

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Санкт – Петербург

2015

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений» (ФГБНУ ВИЗР)

Научный руководитель: **Афанасенко Ольга Сильвестровна**
доктор биологических наук, профессор,
член-корреспондент РАН, заведующая
лабораторией иммунитета растений к болезням
ФГБНУ ВИЗР

Официальные оппоненты: **Радченко Евгений Евгеньевич**
доктор биологических наук, заведующий отделом
генетики ФГБНУ Всероссийский институт
растениеводства им. Н.И. Вавилова

Кузнецова Тамара Евгеньевна
доктор сельскохозяйственных наук, главный научный
сотрудник отдела селекции и семеноводства ячменя
ФГБНУ Краснодарский научно-
исследовательский институт сельского хозяйства
им. П.П. Лукьяненко

Ведущая организация: **ФГБОУ ВПО Санкт-Петербургский
государственный аграрный университет**

Защита диссертации состоится 9 апреля 2015 г. в 11 час.
на заседании диссертационного совета Д 006.015.01 на базе Всероссийского
научно-исследовательского института защиты растений по адресу: 196608, Санкт-
Петербург-Пушкин, шоссе Подбельского, д.3, тел./факс (812) 470-51-10, e-mail:
info@vizr.spb.ru, сайт: vizr.spb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ ВИЗР

Автореферат разослан « » февраля 2015г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Наседкина Галина Анатольевна

Актуальность работы.

Одним из лимитирующих факторов получения высоких урожаев качественного зерна кормового и пивоваренного ячменя в основных зонах его возделывания являются болезни, вызываемые гемиботрофными патогенами. К их числу относятся гельминтоспориозные пятнистости: сетчатая (возбудитель - аскомицет *Pyrenophora teres* Drechs. (анаморфа: *Drechslera teres* Sacc. (Shoem.) = *Helminthosporium teres*) и темно-бурая (возбудитель - аскомицет *Cochliobolus sativus* (Ito et Kurib.) Drechsler ex Dastur. (анаморфа: *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker. = *Drechslera sorokiniana* (Sacc.) Subram. et P.C. Jain, *Helminthosporium sorokinianum* Sacc., *H. sativum* Pammel, C.V. King et Bakke).

Снижение урожайности при сильном развитии пятнистостей может достигать 20–50% и более (Jayasena et al., 2007; Murray, Brennan, 2009; Саладунова и др., 2012).

Ежегодные обследования, проводимые нами на производственных посевах ячменя, и оценка поражаемости сортов на Госсортоучастках Ленинградской, Новгородской и Псковской областей, а также в Краснодарском крае свидетельствуют, что все зарегистрированные в Госреестре сорта ячменя являются восприимчивыми к гельминтоспориозным пятнистостям. При этом сорта с относительной устойчивостью к одному патогену восприимчивы к другому. Поскольку ячмень является основной кормовой культурой, то восстановление и развитие животноводства, как приоритетного направления развития агропромышленного комплекса России, напрямую связано с расширением площадей и увеличением его урожайности. Кроме того, гельминтоспориозные пятнистости значительно снижают качество зерна, что делает его непригодным для производства солода в пивоваренной промышленности.

В соответствии с прогнозом координатора Платформы БиоТех 2030 профессора В. О. Попова 50% мирового производства сельскохозяйственной продукции к 2030 г. будет создано биотехнологическими методами (<http://www.fp7-bio.ru/tech-platforms/russian/biotech2030.php>). Ускоренное создание с использованием методов биотехнологии сортов сельскохозяйственных культур, устойчивых к болезням, и широкое их возделывание способствует решению проблем экологической безопасности окружающей среды, качества сельскохозяйственной продукции, а также ресурсосбережения.

Одним из перспективных направлений исследований является селекция ячменя на устойчивость к вредоносным болезням с использованием удвоенных гаплоидов (=дигаплоидов), технология создания которых базируется на культивировании *in vitro* неоплодотворенных половых клеток с редуцированным набором хромосом (пыльцы), спонтанного удвоения хромосом и получения дигаплоидных растений. Использование в качестве родительских компонентов скрещивания источников устойчивости ячменя к возбудителям заболеваний и продуктивных сортов позволяет от растений F₁ получить дигаплоидные рекомбинантные линии, гомозиготные по генам устойчивости. Соответственно необходимо значительно меньшее число растений в потомстве для отбора устойчивых генотипов. Быстрая гомозиготизация селекционного материала приводит к ускорению как традиционной, так и беккроссной селекции на 3-4 года.

Большие дигаплоидные популяции, полученные от скрещивания устойчивых и восприимчивых к болезням сортов, являются материалом для картирования генов устойчивости и разработки молекулярных маркеров для селекции. Создание дигаплоидных картирующих популяций – принципиально новое для России направление, развитие которого позволит картировать не только генетические детерминанты устойчивости ячменя к болезням, но и любые другие хозяйственно ценные признаки.

Цель и задачи исследований.

Целью данной работы являлось создание исходного материала для селекции ячменя на устойчивость к гельминтоспориозным пятнистостям с использованием удвоенных гаплоидов.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Охарактеризовать устойчивость к сетчатой и темно-бурой пятнистостям сортов и образцов ячменя;
2. Провести скрещивания источников устойчивости, в том числе и групповой с восприимчивыми сортами;
3. Получить гибриды F₁ и инициировать культуру пыльников ячменя;
4. Изучить эффективность каллусогенеза и регенерации в культуре пыльников у родительских компонентов скрещиваний и у гибридов F₁;

5. Получить дигаплоидные популяции ячменя, количество растений в которых достаточно для проведения генетического анализа устойчивости и последующего картирования генов устойчивости к различным болезням;

6. Оценить устойчивость проростков и взрослых растений дигаплоидных линий к возбудителям сетчатой и темно-бурой пятнистостей и провести отбор линий с групповой устойчивостью;

7. Провести генетический анализ устойчивости к возбудителям сетчатой и темно-бурой пятнистостей в дигаплоидных популяциях;

8. Размножить дигаплоидные линии гомозиготные по эффективным генам устойчивости, в том числе и с групповой устойчивостью к болезням и охарактеризовать хозяйственно-ценные признаки полученных дигаплоидных линий ячменя.

Научная новизна исследований.

Впервые охарактеризованы сорта ячменя скандинавского происхождения по ювенильной устойчивости к сетчатой и темно-бурой пятнистостям и выделены 23 сорта с групповой устойчивостью.

Впервые определена эффективность регенерации в культуре пыльников ячменя *in vitro* у гибридов 26 комбинаций скрещиваний и выявлены группы с высокой, средней и низкой частотой регенерации растений.

Для развития принципиально нового в России направления исследований по картированию генов устойчивости ячменя к болезням создан материал в виде дигаплоидных картирующих популяций от четырех комбинаций скрещиваний.

Выявлен характер наследования ювенильной и взрослой устойчивости к различным изолятам *P. teres f. teres* у высокоустойчивого эфиопского образца к-23874 и сорта Ранний 1 и к *C. sativus* у сортов Зерноградский 813 и Aidas. Определена специфичность ответных реакций дигаплоидных линий популяции Зерноградский 813 x Ранний 1 на инокуляцию различными изолятами возбудителей сетчатой и темно-бурой пятнистостей. Обнаружена супрессия признака устойчивости к *P. teres f. teres* при объединении генов устойчивости образцов к-20019 и CI 739.

В дигаплоидных популяциях ячменя выявлено наличие большого числа линий с промежуточным типом реакции, как к *P. teres f. teres*, так и к *C. sativus*, что свидетельствует об участии «малых» генов (QTL) в детерминации признака устойчивости к патогенам.

Практическая значимость работы.

Создан исходный материал для селекции ячменя на устойчивость к пятнистостям листьев: 65 дигаплоидных линий гомозиготных по генам устойчивости к возбудителю сетчатой пятнистости, 105 - к возбудителю темно-бурой пятнистости и 17 линий - с групповой устойчивостью к обоим возбудителям.

Выявлены генотипы ячменя с устойчивостью к возбудителям сетчатой и темно-бурой пятнистостей, с хорошей отзывчивостью в культуре *in vitro*, которые могут быть использованы для создания дигаплоидных линий и быстрой гомозиготизации селекционного материала при традиционной и беккроссной селекции.

По комплексу хозяйственно-биологических признаков выделено 5 линий шестирядного ячменя, которые превосходят стандартный сорт Ленинградский и 4 линии двурядного ячменя, превосходящие стандартный сорт Суздалец. Эти линии являются ценным исходным материалом для селекции ячменя на устойчивость к пятнистостям листьев в условиях Северо-Запада и могут быть использованы в экологических испытаниях в других агроклиматических зонах России.

Апробация работы и публикации результатов исследований.

Материалы диссертации доложены на II и III Всероссийских конференциях «Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам» (Санкт-Петербург, 2008 г. и 2012 г.), на Всероссийской научной конференции «Фитосанитарное оздоровление агроэкосистем» (Санкт-Петербург, 2010 г.) и на III Всероссийском съезде по защите растений «Фитосанитарная оптимизация агроэкосистем» (Санкт-Петербург, 2013 г.).

По материалам диссертации опубликовано 17 печатных работ, из них 4 в изданиях, рекомендуемых ВАК РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 207 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложения. Работа иллюстрирована 21 рисунком и 48 таблицами. Библиография включает 230 источников, из них 140 на иностранном языке.

Декларация личного участия автора. Диссертация содержит фактический материал, непосредственно полученный автором в период с 2006 по 2013 гг. Работа проведена в лаборатории иммунитета растений к болезням ВИЗР, в условиях теплицы ВИЗР, на опытных полях ВИЗР и ЛНИИСХ. Оценка хозяйственно-биологических признаков дигаплоидных линий проведена совместно со старшим научным сотрудником лаборатории селекции яровых зерновых культур ЛНИИСХ Т. Н. Радюкевич.

Положения, выносимые на защиту.

1. Исходный материал для селекции сортов ячменя на групповую устойчивость к возбудителям сетчатой и темно-бурой пятнистостей в виде гомозиготных по генам устойчивости дигаплоидных линий, созданных с использованием источников устойчивости и продуктивных сортов ячменя в культуре пыльников *in vitro*.

2. Четыре дигаплоидные картирующие популяции ячменя с определенным характером наследования устойчивости к различным изолятам *Cochliobolus sativus* и *Pyrenophora teres f. teres*.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

Приведены сведения о распространении, вредоносности и биологических особенностях возбудителей гельминтоспориозных пятнистостей. Обобщены сведения об устойчивости ячменя к данным видам пятнистостей и приведены сведения о генетической детерминации признака устойчивости. Представлены данные о достижениях в создании исходного материала для селекции биотехнологическими методами.

Глава 2. Материалы и методы

Для получения исходного материала для селекции были использованы сорта и образцы из созданной совместно с ВИР коллекции (каталог ВИЗР, 2013) и 176 сортов скандинавского происхождения.

Для инициации культуры пыльников ячменя использовали гибриды F_1 , полученные в 26 комбинациях от скрещивания устойчивых и восприимчивых сортов. Гибридные семена (F_0) высевали в вегетационные сосуды в условиях теплицы ВИЗР (апрель, 2008 г.) и Центра сельскохозяйственных исследований Финляндии (Йокиойнен, январь 2008 г.). Растения-доноры F_1 выращивали при дневной температуре воздуха $+20^{\circ}\text{C}$, ночной -14°C и 16 часовом фотопериоде.

В соответствии с методикой О. Manninen (1997) колосья растений-доноров собирали в фазу выхода растений в трубку, когда пыльцевые зерна находятся на стадии «средних» или «поздних» одноядерных вакуолизованных микроспор. При определении фазы развития пыльцевого зерна важно место расположения ядра относительно поры клетки (Wheatley et al., 1986; Hu, 1997; Kasha et al., 2001).

Для определения фазы развития микроспор ячменя использовали метод окрашивания пыльцы раствором ацетокармина. Фотографии пыльцевых зерен сделаны с помощью системы визуализации изображения, установленной на микроскопе Carl Zeiss Axio Scope 40.

Для получения дигаплоидных линий (ДЛ) ячменя в условиях лаборатории были использованы три питательные среды, базовой составляющей которых являлась среда Мурасиге-Скуга (Murashige, Skoog, 1962): среда для первого пассажа пыльников (MS-MAN) с добавлением 32 г маннитола, 0.75 г глутамина и по 1 мл ВАР и IAA, среда для каллусообразования (MS-MG) с добавлением 63 г мальтозы и среда для корнеобразования (MS-Root) с добавлением 30 г сахарозы.

Все работы по извлечению пыльников, определению фазы развития пыльцы, последовательного помещения их на разные среды проводили в стерильных условиях в ламинаре NuAire (Biological Safety Cabinets).

Пыльники раскладывали на поверхность агаризованной среды MS-MAN на нейлоновую сетку, примерно по 40-50 штук на чашку Петри (d=6 см). Через 3-4 суток нейлоновую сетку с пыльниками аккуратно переносили на среду для индукции каллусогенеза и регенерации (среда MS-MG), переворачивали её так, чтобы пыльники остались на поверхности среды, после чего сетку убирали. Чашки Петри с пыльниками помещали в термостат при температуре +25°C в темноте. Спустя две - три недели в чашках можно было наблюдать процесс каллусообразования. На четвертой неделе от начала эксперимента чашки переносили в светоустановку под лампы дневного света с интенсивностью освещения 3-5 тыс. люкс при температуре +22°C.

Через 14 суток появлялись первые зеленые растения - регенеранты и альбиносы. Зелёные растения-регенеранты помещали в стерильные пробирки со средой, индуцирующей рост и развитие корней MS - Root. После пересадки растений на среду, пробирки герметично закрывали фольгой, обматывали парафильмом (Parafilm® M) и помещали в климатическую камеру при температуре +18...+20°C с освещением лампами дневного света (16 часовой фотопериод).

Спустя 3-4 недели растения аккуратно извлекали из агаризованной среды, промывали корни и пересаживали в горшочки с почвогрунтом (N₂₀:P₄₀:K₂₀). Дальнейший рост растений проходил в термостатированной комнате при температуре +21...+23°C, с освещением лампами Vialox NAV-T (SON-T) 400W при 16 часовом фотопериоде в ВИЗР и в условиях теплицы в Центре сельскохозяйственных исследований Финляндии (МТТ, Йокиойнен).

Инфекционным материалом для инокуляции растений в лабораторных условиях послужили моноконидиальные изоляты грибов *C. sativus* и *P. teres f. teres*, выделенные из заражённых листьев, собранных на сортоучастках Ленинградской, Псковской, Новгородской и Архангельской областей (Россия), республики Беларусь, на производственных посевах ячменя в Швеции (г. Уппсала) и Канаде (Альберта).

В условиях лаборатории и теплицы проводили тестирование выделенных сортов и образцов ячменя на устойчивость к клонам грибов *P. teres f. teres* и *C. sativus*, как с использованием метода искусственной инокуляции отсечённых листьев проростков и флаг-листа у взрослых растений с применением бензимидазольной техники, так и искусственной инокуляции интактных растений (Афанасенко, 1977).

Заражение проростков ячменя грибом *P. teres f. teres* проводили двумя методами: капельным и путём опрыскивания из пульверизатора, при заражении взрослых растений использовали метод опрыскивания и метод микрокамер. Заражение грибом *C. sativus* проводили методом опрыскивания.

Капельный метод: на каждый отрезок листа наносили пастеровской микропипеткой каплю (0,05 мл) конидиальной суспензии гриба *P. teres f. teres* с концентрацией конидий 5-7 тыс./мл.

Метод микрокамер: на кусочек фильтровальной бумаги наносили суспензию гриба *P. teres f. teres* в концентрации 5-7 тыс./мл. Прикладывали его к флаг-листу растения и сверху оборачивали тонкой полиэтиленовой пленкой. Через сутки микрокамеру удаляли. Учет проводили на 7-10 сутки по 5- балльной шкале (Афанасенко, 1977).

Метод опрыскивания суспензией *P. teres f. teres* и *C. sativus*.

Отрезки листьев проростков ячменя длиной 3,5-4 см в возрасте 8-10 дней инокулировали путем опрыскивания конидиальной суспензией концентрации 8-10 тыс. конидий/мл (для *C. sativus*) и 5-7 тыс./мл (для *P. teres f. teres*).

В качестве контроля использовали универсально восприимчивый сорт Пиркка.

Кювету с инокулированными отрезками листьев накрывали стеклом и помещали в светоустановку с интенсивностью освещения 3-5 тыс. люкс при температуре +22°C.

Тип реакции каждого растения на инокуляцию изолятами *P. teres f. teres* определяли на 4-5 сутки после заражения капельным методом по 5-балльной шкале (Афанасенко, 1977).

При инокуляции изолятами *P. teres f. teres* методом опрыскивания для оценки устойчивости образцов ячменя использовали принятую в международной практике 10-балльную шкалу (Tekauz, 1985)

Скрининг коллекции на устойчивость образцов и сортов ячменя к возбудителю темно-бурой пятнистости проводили, используя 5-балльную шкалу Л.Г. Тырышкина и Л.А. Михайловой (1993).

Для оценки устойчивости дигампоидных линий и анализа расщеплений в дигампоидных популяциях использовали принятую в международной практике 9-балльную шкалу (Fetch, Steffenson, 1999). Тип реакции каждого растения на инокуляцию изолятами *C. sativus* учитывали на 3-и сутки.

Оценку ДЛ ячменя и их родителей на устойчивость к листовым пятнистостям проводили на опытных полях ВИЗР (2009-2010 гг.) и ЛНИИСХ (2011 – 2013 гг.). Линии высевали на делянках размером 1 м², в двух повторностях. На опытном поле ВИЗР через каждые 10 образцов высевали восприимчивый сорт Пиркка. В условиях опытного поля ЛНИИСХ – сорта стандарты: Ленинградский, Суздалец и Пиркка. Оценку проводили на фоне естественного развития болезней в фазы молочной и молочно-восковой спелости зерна по 5-балльным шкалам (Афанасенко, 1976; Fetch, Steffenson, 1997) и по развитию болезни в % (Чумаков, Захарова, 1990).

Оценку дигаплоидных линий ячменя по хозяйственно-ценным признакам проводили на опытном поле ЛНИИСХ совместно с сотрудником лаборатории селекции яровых зерновых культур ЛНИИСХ Т.Н. Радиокевич по Международному классификатору рода *Hordeum* L. (1983).

В качестве стандартов были использованы районированные в Ленинградской области сорта ячменя Суздалец (разновидность *nutans*) для образцов двурядного ячменя и Ленинградский (разновидность *pallidum*) для шестирядного.

Экспериментальная часть

Глава 3. Создание коллекции источников устойчивости

Наибольшую ценность в качестве исходного материала для селекции имеют генотипы ячменя с групповой устойчивостью к болезням. Поэтому, одной из основных задач исследования было выявление образцов одновременно устойчивых как к сетчатой пятнистости, так и к темно-бурой.

Из созданной в ВИЗР, совместно с ВИР, коллекции ячменя нами были отобраны наиболее устойчивые сорта и образцы к одному или двум патогенам и проведена их повторная оценка устойчивости к *P. teres* f. *teres* и *C. sativus*. Анализ результатов искусственного заражения возбудителями *P. teres* f. *teres* и *C. sativus* коллекционных образцов и данных литературы позволил сформировать коллекцию, включающую 31 родительский компонент скрещивания, 22 из которых были использованы для инициации культуры пыльников (табл. 1). Кроме устойчивых сортов и образцов в качестве родительских форм были привлечены сорта-дифференциаторы популяций *P. teres* f. *teres* из созданного в ВИЗР (в результате международного сотрудничества) международного набора сортов-дифференциаторов: CI 4207, CI 739, Tifang (Afanasenko et al., 1995), а также CI 9825, CI 5791, Canadian Lake Shore (к-25282), к-20019, к-8755 (Afanasenko et al., 2009). В качестве восприимчивых родителей были использованы финский сорт Пиркка и канадский сорт Harrington. В исследования были включены 176 сортов скандинавского происхождения, как наиболее адаптированных к климатическим условиям Северо-Западного региона и, в связи с этим, наиболее перспективных в качестве исходного материала для селекции. Выявлено 23 сорта с групповой ювенильной устойчивостью к сетчатой и темно-бурой пятнистостям: Frost, Herta, Stallar, Ellinor, Welam Weibu (Швеция), Denso abed (Дания), Mojar (Норвегия), Rauto, Laari (Финляндия) и др. Выделенные по устойчивости сорта были размножены, и рекомендованы для экологических испытаний в условиях Северо-Запада России.

Глава 4. Создание дигаплоидов ячменя как исходного материала для селекции на устойчивость к гельминтоспориозным пятнистостям

Создание дигаплоидных линий (ДЛ).

Работа по получению дигаплоидных растений ячменя в культуре пыльников складывалась из следующих этапов:

- Получение растений F₁ от скрещивания устойчивых и восприимчивых сортов и образцов ячменя;
- Определение оптимальной фазы развития микроспор (рис. 1) в колосьях растений-доноров и сбор «готовых» колосьев;
- Извлечение пыльников в стерильных условиях ламинара и пассирование их на среде MS-MAN в течение 3-х суток;
- Перемещение пыльников на среду MS-MG и пассирование их в течение 30 суток для получения каллусов и последующей регенерации;
- Перемещение каллусной культуры на свежую среду MS-MG;
- Ежедневный контроль контаминации чашек с пыльниками;

- Перемещение зеленых растений-регенерантов на среду MS-Root для укоренения растений (прописи сред приведены в главе диссертации «Материалы и методы»);
- Пересадка растений-регенерантов в почву;
- Уход за растениями и размножение дигаплоидных линий.

В результате скрещиваний источников устойчивости к разным видам пятнистостей между собой и с восприимчивыми сортами нами были получены семена 67 гибридных комбинаций.

Для работы по получению дигаплоидных растений ячменя были отобраны 26 комбинаций скрещивания, в каждой из которых было получено не менее 60 гибридных зерен F_0 . В таблице 1. представлена характеристика устойчивости родительских компонентов скрещиваний. В некоторых комбинациях скрещиваний родители отличались по устойчивости к двум патогенам, что являлось предпосылкой создания исходного материала для селекции ячменя с групповой устойчивостью.

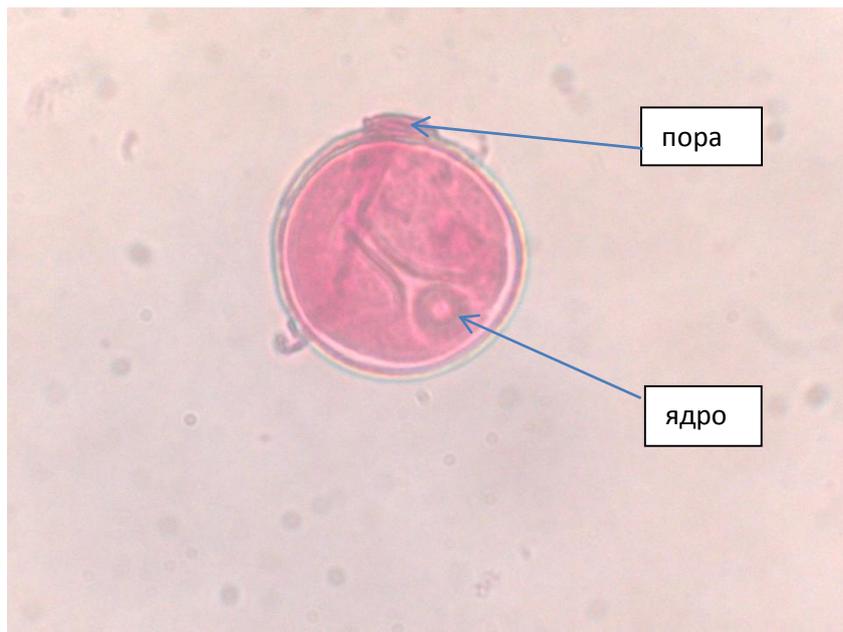


Рис. 1. Оптимальная фаза развития микроспоры для инициации культуры пыльников ячменя (ориг.)

Эффективность каллусообразования и регенерации в культуре *in vitro*. Известно значительное влияние генотипов ячменя на регенерацию в культуре пыльников (Knudsen et al., 1989). Эффективность регенерации в культуре пыльников *in vitro* у родительских форм ячменя была ниже, чем у гибридов F_1 . В 10 из 26 изученных комбинаций скрещиваний, таких как Нутанс 778 x Оренбургский 15, к-19979 x NDB 112, к-19979 x Bowman, Bowman x 798 Fengtein Black, Morex x к-15811, Оренбургский 15 x зерноградский 584, Пастбищный x Нутанс 778, Нутанс 778 x Пастбищный, Morex x к-15812, Оренбургский 15 x Нутанс 778 процесс каллусообразования не происходил.

В 16 комбинациях мы наблюдали каллусогенез и в 13 комбинациях последующую регенерацию (табл. 2). Данные таблицы 2 свидетельствуют, что наибольшее количество каллусов образовалось в комбинациях Задонский 8 x Ingve и Оренбургский 15 x к-29709 (35 и 32% соответственно). В то же время эти комбинации не отличались высоким выходом растений-регенерантов (1,0% и 2,9% соответственно). В остальных комбинациях количество образовавшихся каллусов находилось в пределах 7,2 – 20,2 % от числа пассированных пыльников. В комбинациях прямых и обратных скрещиваний сортов Оренбургский 15 и Задонский 8, а также Нутанс 778 x зерноградский 584 зеленые растения - регенеранты не получены. Значения более 100% свидетельствуют о появлении из одного пыльника и каллуса более двух альбиносов.

Всего получено 485 зеленых растений. Количество растений альбиносов во всех комбинациях скрещиваний превышало количество зеленых растений (рис. 2).

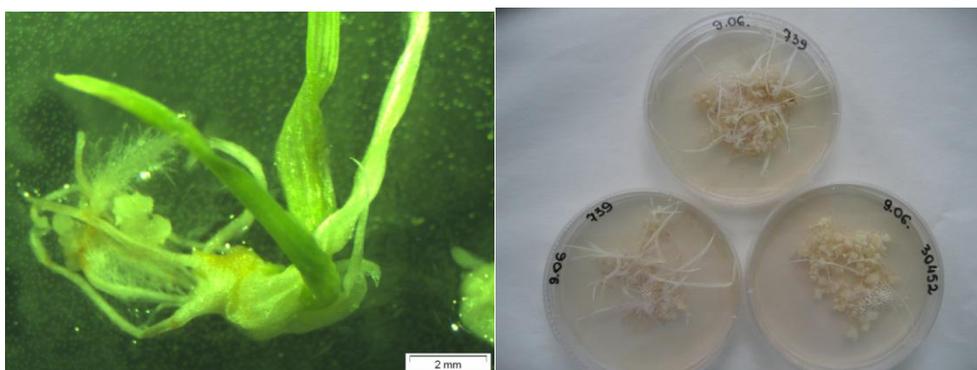


Рис.2. Зеленое растение-регенерант и растения-альбиносы на среде MS-MG (ориг.)

По эффективности регенерации изученные комбинации скрещиваний разделены на группы: высокая – 9,6% растений-регенерантов от числа пассированных пыльников (Зерноградский 813 x Ранний 1); средняя – 2,2, - 4,2% (к-20019 x CI 739, Ранний 1 x Пиркка, к-20019 x CI 4207, Зерноградский 813 x Пиркка, Пиркка x Aidas, Пиркка x к-23874) и низкая 0,1 - 1,3% (Задонский 8 x Пастбищный, Оренбургский 15 x NDB112, Оренбургский 15 x к-29709, Пиркка x Зерноградский 813, Ingve x Оренбургский 15, Задонский 8 x Ingve). Комбинации в каждой группе достоверно не различались по изучаемому признаку (табл. 3). Не выявлено корреляции между интенсивностью каллусообразования и регенерационной способностью (коэффициент корреляции 0,09).

Таблица 1. Комбинации скрещивания, включенные в работу по инициации культуры пыльников ячменя

№п/п	Комбинация скрещивания P1 x P2	Устойчивость к <i>P. teres f. teres</i>		Устойчивость к <i>C. sativus</i>	
		P1	P2	P1	P2
1	Нутанс 778 x Оренбургский 15	В	У	У	У
2	к-19979 x NDB 112	У	У	У	У
3	к-19979 x Bowman	У	В	У	У
4	Bowman x 798 Fengtein Black	В	В	У	У
5	Morex x к-15811	В	У	У	В
6	Оренбургский 15 x Зерноградский 584	У	В	У	У
7	Пастбищный x Нутанс 778	В	В	У	У
8	Нутанс 778 x Пастбищный	В	В	У	У
9	Morex x к-15812	В	У	У	В
10	Оренбургский 15 x Нутанс 778	У	В	У	У
11	Оренбургский 15 x к-29709	У	У	У	В
12	Ingve x Оренбургский 15	В	У	У	У
13	Задонский 8 x Ingve	В	В	У	У
14	Оренбургский 15 x Задонский 8	У	В	У	У
15	Задонский 8 x Пастбищный	В	В	У	У
16	к-27577 x Зерноградский 584	В	В	У	У
17	Задонский 8 x Оренбургский 15	В	У	У	У
18	Оренбургский 15 x NDB112	У	У	У	У
19	Пиркка x Aidas	В	В	В	У
20	Ранний 1 x Пиркка	У	В	В	В
21	к-20019 x CI 4207	У	У	В	В
22	к-20019 x CI 739	У	У	В	В
23	Зерноградский 813 x Пиркка	В	В	У	В
24	Пиркка x Зерноградский 813	В	В	В	У
25	Зерноградский 813 x Ранний 1	В	У	У	В
26	Пиркка x к-23874	В	У	В	В

Условные обозначения: У - устойчивость, В – восприимчивость.

Таблица 2. Эффективность каллусогенеза в культуре пыльников гибридов F₁ различных комбинаций скрещивания

№ комбинации скрещивания	Комбинация скрещивания	Число пыльников, шт.	Количество каллусов		Количество регенерантов				
			шт.	% от числа пыльников	альбиносов		зеленых растений		
					шт.	% от числа пыльников	шт.	% от числа пыльников	% от числа каллусов
1	Оренбургский 15 x к-29709	750	240	32,0±1,70	25	3,3±0,65	7	0,9±0,35	2,9±1,09
2	Ingve x Оренбургский 15	350	56	16,0±1,96	14	4,0±1,05	3	0,9±0,51	5,4±3,05
3	Задонский 8 x Ingve	800	280	35,0±1,69	16	2,0±0,50	3	0,4±0,22	1,1±0,62
4	Задонский 8 x Пастбищный	750	112	14,9±1,30	21	2,8±0,60	1	0,1±0,12	0,9±0,90
5	Оренбургский 15 x NDB112	400	41	10,3±1,52	6	1,5±0,61	1	0,3±0,27	2,4±2,42
6	Пиркка x Aidas	1755	256	14,6±0,84	2475	141,0±1,82	66	3,8±0,46	25,8±2,74
7	Ранний 1 x Пиркка	540	109	20,2±1,73	664	123,0±2,29	16	3,0±0,73	14,7±3,41
8	к-20019 x CI 4207	180	13	7,2±1,93	125	69,4±3,44	4	2,2±1,10	30,8±13,33
9	к-20019 x CI 739	360	26	7,2±1,36	139	38,6±2,57	15	4,2±1,06	57,7±9,88
10	Зерноградский 813 x Пиркка	2295	341	14,9±0,74	3218	140,2±1,57	66	2,9±0,35	19,4±2,14
11	Пиркка x Зерноградский 813	855	144	16,8±1,28	944	110,4±1,16	11	1,3±0,39	7,6±2,22
12	Зерноградский 813 x Ранний 1	2340	461	19,7±0,82	3021	129,1±1,27	224	9,6±0,61	48,6±2,33
13	Пиркка x к-23874	1755	228	13,0±0,80	1966	112,0±0,88	68	3,9±0,46	29,8±3,04
14	Оренбургский 15 x Задонский 8	350	50	14,3±1,87	12	3,4±0,97	0	0	0
15	Нутанс 778 x Зерноградский 584	500	52	10,4±1,37	11	2,2±0,66	0	0	0
16	Задонский 8 x Оренбургский 15	600	71	11,8±1,32	12	2,0±0,57	0	0	0

В четырех полученных комбинациях зерноградский 813 (к-30453) (сорт устойчив к темно-бурой пятнистости) x Ранний 1 (к-27737) (сорт устойчив к сетчатой пятнистости и ринхоспориозу), Пиркка (универсально восприимчивый сорт) x Aidas (сорт устойчив к темно-бурой пятнистости), зерноградский 813 (сорт устойчив к темно-бурой пятнистости) x Пиркка и Пиркка x к-23874 (устойчив к сетчатой пятнистости) количество полученных зеленых растений-регенерантов достаточно для проведения генетического анализа устойчивости и молекулярного картирования генов устойчивости.

Следует отметить, что в одной дигиплоидной популяции от скрещивания сортов зерноградский 813 x Ранний 1 возможно будет провести картирование генов устойчивости сразу к трем болезням: темно-бурой, сетчатой пятнистостям и ринхоспориозу. Образец к-23874 по данным И. Г. Тернюк (2008) отличался устойчивостью к пыльной головне (балл поражения «1» по 4-х бальной шкале), что открывает перспективу картирования генов устойчивости в дигиплоидной популяции, полученной от скрещивания Пиркка x к-23874 сразу к двум болезням: сетчатой пятнистости и пыльной головне.

Необходимо отметить, что часть из полученных зеленых растений-регенерантов погибли после пересадки в почву, а некоторые впоследствии оказались стерильными (табл. 4).

В результате семенное потомство получено для 356 дигиплоидных линий в 13 комбинациях скрещиваний (табл. 4). 341 ДЛ, для которых удалось получить достаточное количество семенного материала для дальнейшей работы, представлены восемью комбинациями скрещиваний, обозначенных буквами в табл. 4. Размножение ДЛ проводили в теплице и на опытном поле ВИЗР.

Таблица 3. Достоверность отличий (td) количества зеленых растений-регенерантов, полученных в различных комбинациях скрещиваний (% от числа пыльников)

Комбинации скрещиваний	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0	1,22	2,16*	1,36	5,00*	2,59*	1,13	2,95*	4,08*	0,77	12,43*	5,17*
2	-	0,91	1,54	1,03	4,20*	2,36*	1,07	2,80*	3,23*	0,63	10,88*	4,35*
3	-	-	1,20	0,29	6,67*	3,42*	1,61	3,52*	6,10*	2,00*	14,15*	6,86*
4	-	-	-	0,67	7,71*	3,92*	1,89	3,83*	7,57*	2,93*	15,32*	7,92*
5	-	-	-	-	6,60*	3,46*	1,68	3,58*	5,91*	2,13*	13,90*	6,79*
6	-	-	-	-	-	0,93	1,34	0,34	1,55	4,17*	7,63*	0,15
7	-	-	-	-	-	-	0,61	0,93	0,12	2,05*	6,95*	1,05
8	-	-	-	-	-	-	-	1,31	0,61	0,77	5,87*	1,43
9	-	-	-	-	-	-	-	-	1,16	2,57*	4,43*	0,26
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,08*	9,24*	1,72
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,53*	4,33*
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,5*

*-различия существенны ($P \geq 0,95$) при $td \geq 1,96$

Оценка устойчивости дигиплоидных линий (ДЛ) ячменя к возбудителям сетчатой и темно-бурой пятнистостей и наследование признака устойчивости

В комбинации скрещивания «А» эфиопский образец к-23874 отличался высокой устойчивостью к возбудителю сетчатой пятнистости, но был восприимчив к *S. sativus*. В связи с этим оценку устойчивости проростков и взрослых растений проводили только к изолятам *P. teres f. teres*. Сорт Пиркка являлся универсально восприимчивым к *P. teres*.

В табл. 5 представлены данные расщепления по устойчивости ДЛ в популяции «А». К большинству изученных изолятов расщепление с высокой степенью достоверности соответствовало наличию одного гена устойчивости. Только в одном случае при инокуляции ДЛ изолятом *P. teres f. teres* из Швеции, фактическое расщепление не соответствовало теоретически ожидаемому 1:1, с явным преобладанием восприимчивых растений.

Таблица 4. Жизнеспособность, полученных *in vitro*, растений-регенерантов

Комбинация скрещивания	Условное обозначение комбинации скрещивания	Число зеленых растений-регенерантов			
		всего	продуктивные	стерильные	погибшие при пересадке в почву
Пиррка х к-23874	А	68	51	15	2
Зерноградский 813 х Ранний 1	В	224	178	30	16
Пиррка х Aidas	С	66	42	14	10
Пиррка х Зерноградский 813	Д	11	7	2	2
Ранний 1 х Пиррка	Е	16	6	4	6
к-20019 х СИ 739	Ф	15	8	3	4
Зерноградский 813 х Пиррка	Г	66	45	10	11
к-20019 х СИ 4207	Н	4	4	0	0
Оренбургский 15 х к-29709		7	7	0	0
Ingve х Оренбургский 15		3	3	0	0
Задонский 8 х Ingve		3	3	0	0
Задонский 8 х Пастбищный		1	1	0	0
Оренбургский 15 х NDB112		1	1	0	0
Всего:			356		

Таблица 5. Расщепление по устойчивости к различным изолятам *P. teres f. teres* в популяции ДЛ «А» в фазе проростков (оценка по шкале О.С. Афанасенко (1977))

Изолят	Тип реакции родителей		Число линий		Теоретически ожидаемое расщепление	χ^2	Р
	к-23874(У)	Пиррка(В)	У	В			
L5	2,0	3,0	25	26	1:1	0,02	0,90
L 9	1,7	3,0	19	32	1:1	3,32	0,05
L 11	1,8	2,8	21	28	1:1	1,00	0,20
A 5	2,0	3,0	21	28	1:1	1,00	0,20
N 10	2,0	3,0	18	31	1:1	3,44	0,05
Bel 7	1,8	3,0	18	25	1:1	1,14	0,25
Bel 23	1,8	3,0	19	27	1:1	1,38	0,20
Sw 13	2,0	3,0	15	28	1:1	3,94	-
Can 15	1,9	2,9	20	27	1:1	1,04	0,25
L1*	1,5	9,0	23	22	1:1	0,02	0,90
L7**	1,5	8,9	15	11	1:1	0,62	0,50

Примечание: У – устойчивость, В – восприимчивость;

* - оценка устойчивости проростков по шкале А. Текауза (1985);

** - оценка устойчивости взрослых растений по шкале А. Текауза (1985);

$P > 0,05$ при $\chi^2 < 3,84$

Для оценки ювенильной устойчивости растений, инокулированных изолятами *P. teres f. teres*, мы использовали 10-балльную шкалу (Tekauz, 1985). На рис. 3 представлены данные по оценке устойчивости ДЛ при заражении изолятом L 1 *P. teres f. teres* с помощью метода опрыскивания. Два одинаковых по численности классов устойчивых (баллы 1-4.9 - 23 линии) и восприимчивых (баллы 5.0-9.0 - 22 линии) свидетельствовали также о моногенном характере расщепления по устойчивости.

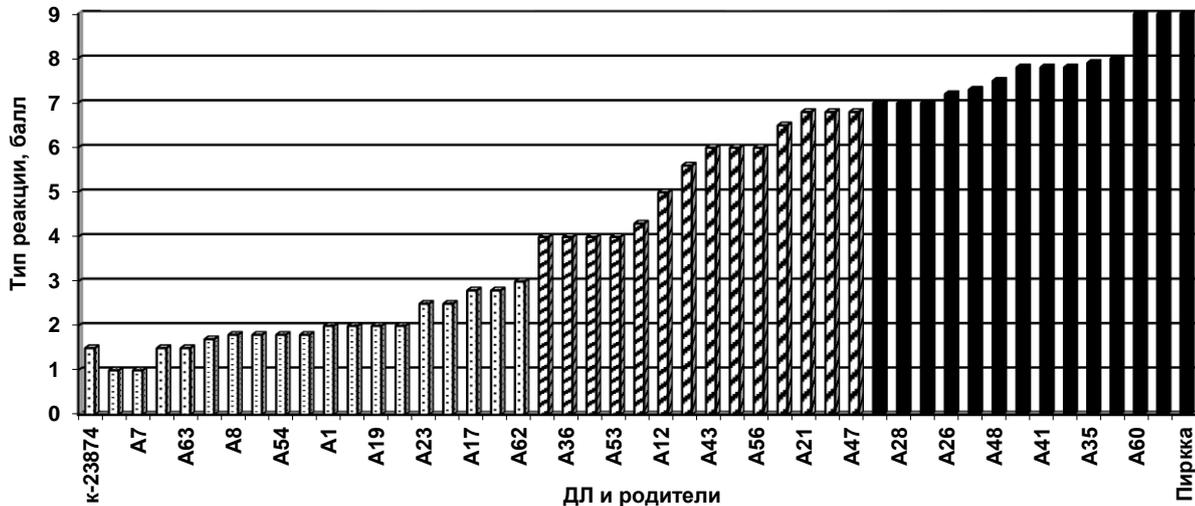


Рис. 3. Характеристика устойчивости проростков ДЛ и родителей комбинации скрещивания «А» к изоляту L 1 *P. teres f. teres* по шкале А. Текауза (1985)

Условные обозначения:
 - устойчивость
 - промежуточный тип реакции
 - восприимчивость

Расщепление по устойчивости взрослых растений при инокуляции изолятом L7 соответствовало теоретически ожидаемому 1:1, что свидетельствовало о моногенном контроле устойчивости взрослых растений (табл. 7). Растения, отнесенные к классу устойчивых (баллы 1-4) в фазу проростков остались в классе устойчивых и в фазу взрослых растений. По-видимому, один и тот же ген детерминировал устойчивость проростков и взрослых растений в комбинации «А».

Дигамплоидные линии, полученные в комбинации скрещивания «В» (Зерноградский 813 x Ранний 1) мы оценили на устойчивость к обоим возбудителям пятнистостей листьев ячменя, так как сорт Зерноградский 813 отличался устойчивостью к возбудителю темно-бурой пятнистости, а сорт Ранний 1 к возбудителю сетчатой пятнистости.

Данные табл. 6 свидетельствуют, что расщепление по устойчивости к пяти изолятам *P. teres f. teres* соответствует теоретически ожидаемому 1:3, то есть наличию двух комплементарных генов детерминирующих устойчивость. Фактическое расщепление по устойчивости к изолятам L5, L9, L11 и A5 не соответствовало ни одной гипотезе простого наследования признака, однако, при удалении из экспериментальной выборки растений с промежуточным типом реакции, фактическое расщепление по устойчивости к этим изолятам соответствовало теоретически ожидаемому 1:3, то есть наличию двух комплементарных генов устойчивости (табл. 6). По-видимому, в ответных реакциях растений участвуют также «малые» гены (QTL), о чем свидетельствует наличие растений с промежуточным типом реакции.

Сравнительная оценка устойчивости к изоляту L5 проростков и взрослых растений ДЛ комбинации «В» показала, что примерно треть линий (16 из 43) были восприимчивы или имели промежуточный тип реакции при заражении проростков, но отличались устойчивостью при инокуляции взрослых растений. Эти данные свидетельствуют о возможном участии других генов в детерминации признака устойчивости к *P. teres f. teres* у взрослых растений. Расщепление по устойчивости флаг-листа к изоляту L5 (32У:11В) с высоким уровнем достоверности соответствовало наличию двух генов устойчивости ($\chi^2 = 0,006$). В то время как расщепление по устойчивости проростков к этому изоляту соответствовало наличию двух комплементарных генов устойчивости (1:3) (табл. 6) без учета растений с промежуточным типом реакции.

Расщепление по устойчивости растений в фазе проростков к трем изолятам *C. sativus* в популяции ДЛ «В» соответствовало теоретически ожидаемому 1:1, то есть наличию одного гена устойчивости (табл. 7).

Расщепление по устойчивости взрослых растений дигаплоидной популяции «В» представлено на рис. 4. Такое распределение по устойчивости при большом числе линий с промежуточным типом реакции так же, как и к возбудителю сетчатой пятнистости, свидетельствует об участии «малых» генов в детерминации признака.

Высокое значение коэффициента корреляции ($r = 0,77$) свидетельствует об устойчивости отобранных линий, как в фазе проростков, так и в фазе флаг-листа.

По результатам проведенных оценок были выбраны 17 линий, отличающиеся групповой устойчивостью к возбудителям сетчатой и темно-бурой пятнистостей (табл. 8). Эти линии переданы в ЛНИИСХ для использования в селекции с целью создания устойчивых к гельминтоспориозным пятнистостям сортов ячменя.

Таблица 6. Расщепление по устойчивости растений в фазе проростков к различным изолятам *P. teres f. teres* в популяции ДЛ «В» (оценка по шкале О.С. Афанасенко (1977))

Изолят	Тип реакции родителей		Число линий		Теоретически ожидаемое расщепление	χ^2	P
	Зерноградский 813 (В)	Ранний 1 (У)	У	В			
L5*	3,0	2,0	43	113	1:3	0,56	0,50
L 9*	3,0	2,0	41	117	1:3	0,08	0,95
L 11*	2,7	2,0	45	107	1:3	1,72	0,20
A 5*	2,8	1,8	38	120	1:3	0,08	0,95
N 10	3,0	2,2	54	124	1:3	2,69	0,10
Bel 7	3,0	2,0	46	132	1:3	0,06	0,80
Bel 23	3,0	2,0	50	128	1:3	0,92	0,75
Sw 13	3,0	2,1	52	126	1:3	1,68	0,10
Can 15	3,0	2,0	47	131	1:3	0,18	0,50

Примечание: У – устойчивость, В - восприимчивость;

* - из экспериментальной выборки удалены растения с промежуточным типом реакции;

$P > 0,05$ при $\chi^2 < 3,84$

Таблица 7. Расщепление по устойчивости растений в фазе проростков к трем изолятам *C. sativus* в популяции ДЛ «В» (оценка по шкале Т. Фетча и Б. Стеффенсона (1999))

Изолят	Тип реакции родителей		Число линий		Теоретически ожидаемое расщепление	χ^2	P
	Зерноградский 813 (У)	Ранний 1 (В)	У	В			
LB1M	3,0	8,0	91	69	1:1	3,02	0,05
NB3Э	3,8	9,0	85	83	1:1	0,02	0,90
PB1Д	3,0	8,7	79	89	1:1	0,60	0,50

Примечание: У – устойчивость, В – восприимчивость;

$P > 0,05$ при $\chi^2 < 3,84$

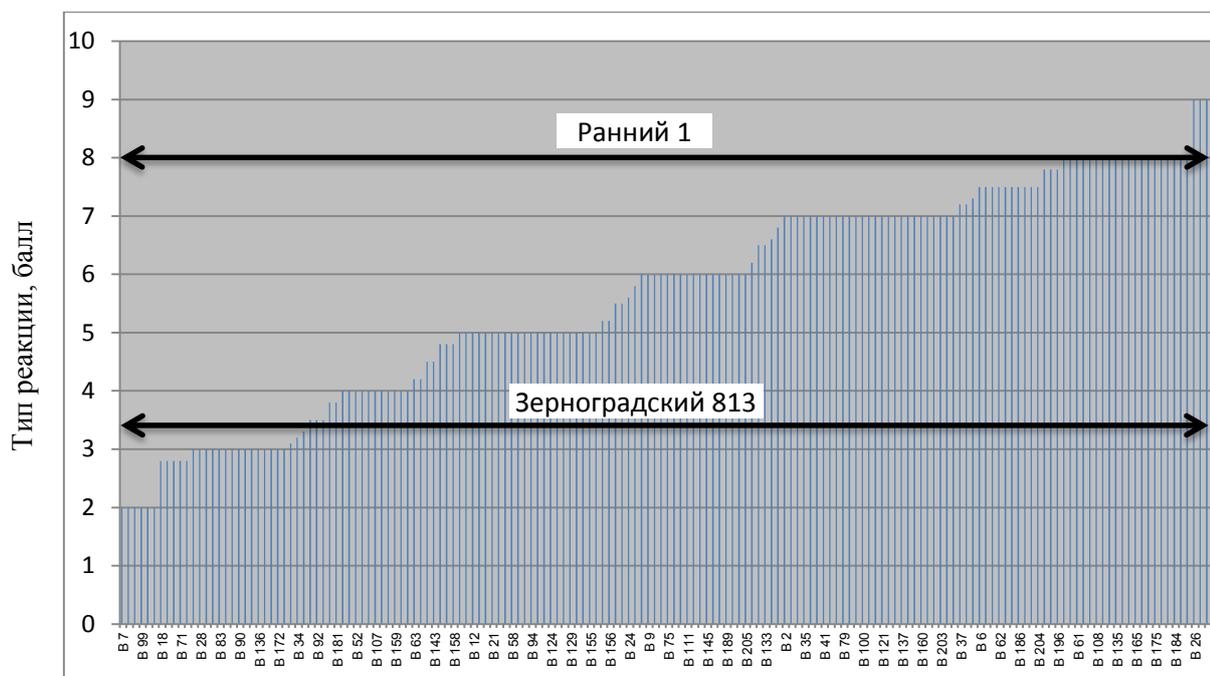


Рис.4. Характеристика устойчивости ДЛ в комбинации скрещивания «В» к изоляту LB1M возбудителя темно-бурой пятнистости по реакции флаг-листа (оценка по шкале Т. Фетча, Б. Стеффенсона, (1999))

Таблица 8. Дигиплоидные линии в комбинации скрещивания «В» с групповой устойчивостью к возбудителям сетчатой и темно-бурой пятнистостей

№п/п	ДЛ	Устойчивость к сетчатой пятнистости (средний балл по шкале А. Текауза (1985))		Устойчивость к темно-бурой пятнистости (средний балл по шкале Т. Фетча, Б. Стеффенсона (1999))	
		проростки	взрослые растения	проростки	взрослые растения
1	В 7	2,8	5,0	3,0	2,0
2	В 11	5,1	5,0	2,7	2,0
3	В 32	4,3	3,0	5,0	3,1
4	В 48	4,0	1,5	3,2	2,8
5	В 66	4,0	4,0	2,5	3,0
6	В 85	5,0	5,0	3,0	3,0
7	В 89	4,5	4,5	3,5	3,0
8	В 98	2,6	4,0	5,0	3,0
9	В 104	4,0	4,0	3,0	2,8
10	В 106	5,1	5,0	3,0	2,0
11	В 125	3,0	4,8	5,0	5,0
12	В 152	2,0	4,0	5,0	4,0
13	В 154	2,0	1,8	4,5	3,0
14	В 157	3,5	4,0	5,0	4,0
15	В 172	2,0	5,0	3,0	3,0
16	В 181	4,0	4,0	4,0	3,8
17	В 190	2,1	2,5	5,0	4,0

Подавляющее большинство линий в комбинациях скрещивания «D» (Пиркка x Зерноградский 813) и «G» (Зерноградский 813 x Пиркка) проявили одинаковый уровень устойчивости при заражении тремя изолятами различного происхождения. Для анализа расщепления по устойчивости ДЛ комбинации «D» и «G» были объединены в одну выборку. Расщепление по устойчивости к трем изолятам *S. sativus* соответствовало теоретически ожидаемому 1 : 1, то есть моногенному контролю признака (табл. 9). Такое

же наследование устойчивости сорта Зерноградский 813 к изолятам *C. sativus* было выявлено и в комбинации «В».

Таблица 9. Расщепление популяций ДЛ «D» и «G» по устойчивости к различным изолятам *C. sativus* в фазе проростков (оценка по шкале Т. Фетча, Б. Стеффенсона (1999))

Изолят	Тип реакции родителей		Число линий		Теоретически ожидаемое расщепление	χ^2	P
	Пиркка (В)	Зерноградский 813 (У)	У	В			
LB1M	9,0	3,0	13	17	1:1	0,54	0,25
NB3Э	8,9	2,8	16	15	1:1	0,04	0,90
PB1Д	8,6	3,8	12	18	1:1	1,20	0,25

Примечание: У – устойчивость, В – восприимчивость;
P>0,05 при $\chi^2 < 3,84$

В комбинации скрещивания «Е» (Ранний 1 x Пиркка) сорт Ранний 1 отличался устойчивостью к сетчатой пятнистости. Всего получено 6 ДЛ, 3 из которых отличались устойчивостью аналогичной устойчивости родителя к 9 изолятам *P. teres f. teres*.

Изучение устойчивости взрослых растений проводили с использованием двух методов: опрыскивания срезанного флаг-листа и инокуляцией инфекционной каплей интактных растений с использованием микрокамеры. При обоих методах заражения ДЛ были распределены по одинаковым классам устойчивости; ДЛ отличающиеся устойчивостью в фазе проростков были устойчивы и в фазе флаг-листа.

В комбинации скрещивания «С» (Пиркка x Aidas) родительский компонент сорт Aidas отличался устойчивостью к возбудителю темно-бурой пятнистости.

Расщепление по устойчивости к трем изолятам *C. sativus* соответствовало теоретически ожидаемому 1 : 1, то есть моногенному контролю признака (табл. 10). Подавляющее большинство линий проявили одинаковый уровень устойчивости при заражении тремя изолятами различного происхождения.

Таблица 10. Расщепление по устойчивости растений в фазе проростков и флаг-листа к различным изолятам *C. sativus* в популяции ДЛ «С» (оценка по шкале Т. Фетча, Б. Стеффенсона (1999))

Изолят	Тип реакции родителей		Число линий		Теоретически ожидаемое расщепление	χ^2	P
	Пиркка (В)	Aidas (У)	У	В			
LB1M	9,0	3,8	14	26	1:1	3,60	0,05
NB3Э	8,8	3,0	17	23	1:1	0,90	0,50
PB1Д	8,6	3,0	16	25	1:1	1,98	0,20
LB8M*	8,0	3,9	17	24	1:1	1,20	0,25
PB1Д*	8,0	3,8	17	25	1:1	1,52	0,20

Примечание: У – устойчивость, В – восприимчивость;
* - устойчивость взрослых растений;
P>0,05 при $\chi^2 < 3,84$

Контрастные типы реакций родительских компонентов скрещивания к использованным изолятам *C. sativus* и промежуточный тип реакции у примерно трети ДЛ свидетельствует об участии в паразит-хозяинных отношениях «малых» генов устойчивости. Для многих патосистем злаковые – гемибиотрофные патогены и, в том числе, ячмень – *C. sativus* было показано наличие нескольких QTL, которые, наряду с «главными» генами контролируют устойчивость к патогену (Vovil et al., 2010).

По-видимому, контрастные реакции устойчивости и восприимчивости являются показателем наличия или отсутствия «главного» гена(ов), тогда как промежуточный тип реакции детерминирован малыми генами (QTL) при отсутствии «главных» генов.

Оценка устойчивости взрослых растений комбинации «С» показала полное соответствие типов реакции ДЛ к двум изолятам возбудителя темно-бурой пятнистости. Расщепление по устойчивости, также как и в стадии проростков, было моногенным (табл. 10).

По-видимому, один и тот же ген детерминирует устойчивость проростков и взрослых растений у сорта Aidas.

В комбинации «F» (к-20019 х CI 739) оба родителя отличались расспецифической устойчивостью к возбудителю сетчатой пятнистости. Однако в потомстве из 8 ДЛ одна линия отличалась восприимчивостью к 9 изученным изолятам (F9) и две (F1и F3) были более восприимчивы, чем родители (табл. 11). Незначительная выборка анализируемых линий не позволяет нам сделать вывод о характере генных взаимодействий, но не исключена супрессия признака при объединении генов устойчивости образцов к-20019 и CI 739. Оценка устойчивости флаг-листа и проростков при инокуляции изолятом L5 показала одинаковые результаты.

Таблица 11. Характеристика ювенильной устойчивости ДЛ к *P. teres f. teres* в комбинации скрещивания «F» в лабораторных условиях

№п/п	ДЛ	Тип реакции к изолятам <i>P. teres f. teres</i> , средний балл по трем повторностям (по шкале О.С. Афанасенко (1977))								
		L5	L9	L11	A5	N10	Bel7	Bel23	Sw13.2	Can15
1	F1	2,5	2,4	2,5	2,8	2,4	2,3	2,3	2,3	2,3
2	F3	2,0	2,5	2,5	2,5	2,5	1,8	2,5	2,3	2,5
3	F4	2,0	2,0	2,0	1,8	2,0	2,0	2,1	2,0	2,0
4	F5	2,5	2,0	2,5	2,3	1,9	2,3	2,1	2,1	2,1
5	F6	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,1	2,0	2,0
6	F7	2,0	2,0	2,0	2,0	2,4	2,0	2,0	2,0	2,0
7	F8	2,2	2,5	2,2	2,2	2,5	2,2	2,5	2,5	2,5
8	F9	2,7	2,5	2,5	2,8	2,8	2,5	2,5	2,8	2,5
Родители:	к-20019(P1)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,5	2,0	2,0	2,0	1,9
	CI 739(P2)	2,0	2,0	2,2	2,0	2,5	2,0	2,0	2,0	2,0

Родительские компоненты скрещивания «Н» (к-20019 х CI 4207) отличаются расспецифической устойчивостью к возбудителю сетчатой пятнистости. По результатам фитопатологического теста они имеют различные гены устойчивости. Целесообразность объединения генов устойчивости этих образцов была показана ранее (Афанасенко и др., 2010). Все 4 ДЛ были устойчивы к девяти изолятам *P. teres f. teres*. Линии Н3 и Н4 отличались более высокой устойчивостью ко всем испытанным изолятам, что позволяет предположить объединение в этих линиях генетических факторов устойчивости обоих родителей. Все полученные линии в комбинации скрещивания «Н» были устойчивы и в фазе флаг-листа. Эти линии представляют несомненный интерес для селекции устойчивых сортов.

Оценка хозяйственно-биологических признаков ДЛ. 62 дигамплоидные линии ячменя, отобранные по результатам лабораторных и полевых оценок на базе ВИЗР, были переданы в ЛНИИСХ для оценки хозяйственно-ценных признаков, которая также включает в себя оценку устойчивости к болезням. В этот набор были включены ДЛ отличающиеся, прежде всего, групповой устойчивостью к возбудителям сетчатой и темно-бурой пятнистостям (комбинация «В») и линии, устойчивые, как в проростках, так и в фазе флаг-листа.

В лаборатории селекции яровых зерновых культур ЛНИИСХ сделан анализ структуры урожая, определены основные хозяйственно-биологические признаки, от которых зависит урожайность ячменя: высота растений, продуктивная кустистость, длина колоса, число и масса зерна главного колоса, масса зерна с растения (данные представлены в Главе 4 (4.2.8.1) диссертации). Жаркое и сухое лето 2011 г. обусловило некоторое ингибирование процессов роста ячменя.

По итогам изучения 62 ДЛ ячменя по комплексу хозяйственно-биологических признаков выделено 9 линий, что составило 14.5% от проходивших полевую оценку (табл. 12).

Таким образом, из созданных нами 341 ДЛ в восьми комбинациях скрещиваний отличаются устойчивостью к сетчатой пятнистости 65 ДЛ, 105 ДЛ к темно-бурой и 17 ДЛ с групповой устойчивостью к обоим патогенам. Все ДЛ, особенно с групповой устойчивостью являются исходным материалом для селекции ячменя на устойчивость к наиболее распространенным и вредоносным болезням ячменя,

Таблица 12. Лучшие ДЛ, выделенные по хозяйственно-ценным признакам, урожай 2011г.

Линия	Высота растений, см	Длина колоса, см	Продуктивная кустистость, шт.	Число зёрен в колосе, шт.	Масса зерна с колоса, г	Масса зерна с растения, г	Вегетационный период, дней	Сетчатая пятнистость, %	Тёмно-бурая пятнистость, %
Шестирядные образцы									
St Ленинградский, <i>pallidum</i>	78.0	5.0	3.0	42.0	1.6	3.9	68	5	10-15
A 14	70.0	8.0	5.0	41.0	1.4	4.3	80	0	1
A 39	68.0	6.0	5.0	33.0	2.0	5.1	82	0	1
G 31	61.0	8.0	2.0	46.0	2.0	3.0	79	0	1
G 48	67.0	7.0	5.0	51.0	1.1	4.6	76	1	1
D 1	63.0	9.0	4.0	58.0	1.9	4.8	77	1	1
НСР ₀₅	3.55	3.61	1.78	2.83	3.08	5.70	2.81	-	-
Двурядные образцы									
St Суздалец, <i>nutans</i>	68.0	8.0	5.0	24.0	1.3	5.7	80	1	5-10
B 48	78.0	9.0	3.0	29.0	1.6	3.2	77	0	3
B 142	73.0	9.0	5.0	22.0	1.4	6.2	79	0	5
D 4	71.0	10.0	3.0	25.0	1.4	3.3	80	0	1
E 9	70.0	9.0	5.0	26.0	1.3	5.0	77	0	3
НСР ₀₅	2.70	3.81	1.82	3.05	3.04	3.40	2.30	-	-

Оценка проводилась по международному классификатору СЭВ рода *Hordeum* L. (подрод *Hordeum*), Ленинград. 1983г.

вызываемых возбудителями пятнистостей листьев. Выделенные по устойчивости и по хорошим агрономическим характеристикам в условиях Северо-Западного региона линии являются наиболее ценным исходным материалом для предбридинговой селекции. Все линии переданы для использования в селекционном процессе в ЛНИИСХ. Эти линии могут быть также использованы в широком экологическом испытании в других регионах РФ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возделывание сортов ячменя устойчивых к вредоносным болезням помогает решать проблемы экологической безопасности и ресурсосбережения. Полученный в культуре пыльников *in vitro* исходный материал шестирядного и двурядного ячменя с групповой устойчивостью и удовлетворительными хозяйственно-биологическими характеристиками позволит значительно сократить время селекции и повысить ее эффективность. Созданные дигаплоидные линии могут быть использованы в широких экологических испытаниях в различных агроклиматических зонах России. Полученный материал в виде дигаплоидных картирующих популяций от четырех комбинаций скрещиваний будет способствовать развитию принципиально нового для России направления по изучению структурной и функциональной организации генетических детерминант устойчивости к болезням в геноме ячменя.

ВЫВОДЫ

1. Из 176 сортов скандинавского происхождения выделены 23 сорта с групповой ювенильной устойчивостью к сетчатой и темно-бурой пятнистостям: Frost, Herta, Stallar, Ellinor, Welam Weibu (Швеция), Denso abed (Дания), Mojar (Норвегия), Rauto, Laari (Финляндия) и др. Эти сорта могут быть использованы в качестве исходного материала, как наиболее адаптированного к климатическим условиям Северо-Запада России.

2. При создании исходного материала для селекции ячменя с групповой устойчивостью к возбудителям *P. teres f. teres* и *C. sativus* в комбинациях скрещиваний 7 источников устойчивости с продуктивными сортами получены 341 дигаплоидная линия, в том числе четыре дигаплоидные картирующие популяции от комбинаций скрещиваний Зерноградский 813 x Ранний 1 (178 линий), Пиркка x Aidas (42 линии), Зерноградский 813 x Пиркка (52 линии) и Пиркка x к-23874 (51 линия).

3. Эффективность регенерации в культуре пыльников *in vitro* у родительских форм ячменя была ниже, чем у гибридов F1. Не выявлено корреляции между интенсивностью каллусообразования и регенерационной способностью.

4. По эффективности регенерации изученные комбинации скрещиваний разделены на группы: высокая – 9,6% растений-регенерантов от числа пассированных пыльников (Зерноградский 813 x Ранний 1); средняя – 2,2, - 4,2% (к-20019 x CI 739, Ранний 1 x Пиркка, к-20019 x CI 4207, Зерноградский 813 x Пиркка, Пиркка x Aidas, Пиркка x к-23874) и низкая 0,1 - 1,3% (Задонский 8 x Пастбищный, Оренбургский 15 x NDB112, Оренбургский 15 x к-29709, Пиркка x Зерноградский 813, Ingve x Оренбургский 15, Задонский 8 x Ingve). Комбинации в каждой группе достоверно не различались по изучаемому признаку.

5. Выявлен моногенный характер наследования ювенильной устойчивости к 10 изолятам и взрослой устойчивости к одному изоляту *P. teres f. teres* у высокоустойчивого образца к-23874. Один и тот же ген детерминировал устойчивость проростков и взрослых растений.

6. Ювенильная устойчивость к различным изолятам возбудителя сетчатой пятнистости сорта Ранний 1 (дигаплоидная популяция Зерноградский 813 x Ранний 1) контролируется, как двумя комплементарными генами, так и «малыми» генами (QTL), устойчивость взрослых растений - двумя независимыми генами.

7. Устойчивость к различным изолятам возбудителя темно-бурой пятнистости сорта Зерноградский 813 (комбинации «В», «D» и «G») и сорта Aidas (комбинация «С») контролируется одним геном. Наличие большого числа линий с промежуточным типом реакции свидетельствует об участии «малых» генов в детерминации признака устойчивости к *C. sativus*. Одни и те же гены контролируют устойчивость к возбудителю темно-бурой пятнистости проростков и взрослых растений у сортов Зерноградский 813 и Aidas (комбинации «В», «С», «D» и «G»).

8. Создан исходный материал для селекции ячменя на устойчивость к пятнистостям листьев: 65 дигаплоидных линий гомозиготных по генам устойчивости к возбудителю сетчатой пятнистости, 105 - к возбудителю темно-бурой пятнистости и 17 линий - с групповой устойчивостью к обоим возбудителям.

9. По комплексу хозяйственно-биологических признаков (ювенильной и взрослой устойчивости, продуктивной кустистости, высоте растений, массе зерна с колоса и со всего растения) выделено 5 линий шестирядного ячменя, которые превосходят стандартный сорт Ленинградский, но отличаются более длительным вегетационным периодом. Четыре линии двурядного ячменя превосходили стандартный сорт Суздалец по длине колоса и массе зерна с колоса, а также отличались более коротким или равным сорту стандарту вегетационным периодом. Эти линии являются ценным исходным материалом для селекции ячменя на устойчивость к пятнистостям листьев в условиях Северо-Запада России.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Созданный в культуре пыльников *in vitro* гомозиготный по устойчивости к гельминтоспориозным пятнистостям исходный материал позволит сократить время селекции ячменя на устойчивость к болезням на 3-4 года.

Для селекции ячменя на устойчивость к пятнистостям листьев предлагается использовать 65 дигаплоидных линий гомозиготных по генам устойчивости к возбудителю сетчатой пятнистости, 105 - к возбудителю темно-бурой пятнистости и 17 линий - с групповой устойчивостью к обоим возбудителям: В 7, В 11, В 32, В 48, В 66, В 85, В 89, В 98, В 104, В 106, В 125, В 152, В 154, В 157, В 172, В 181, В 190.

В качестве исходного материала для предбридинговой селекции в условиях Северо-Запада РФ могут быть использованы 5 дигаплоидных линий шестирядного ячменя, которые превосходят по комплексу хозяйственно-биологических признаков стандартный сорт Ленинградский и 4 линии двурядного ячменя, превосходящие стандартный сорт Суздалец. Эти линии могут быть использованы в широких экологических испытаниях и в других агроклиматических зонах России.

СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы в изданиях рекомендованных ВАК РФ

1. **Лашина, Н.М.** Создание исходного материала для селекции устойчивых сортов ячменя / Н.М. Лашина // Защита и карантин растений. - 2009. - N 10. - С. 24–27.
2. **Лашина, Н.М.** Определение эффективности регенерации в культуре пыльников у образцов ячменя устойчивых к пятнистостям листьев / Н.М. Лашина, А.В. Анисимова, О.С. Афанасенко, О. Manninen // Вестник защиты растений. - 2009. - N 1. - С. 48–51.
3. Радюкевич, Т.Н., Анисимова А.В., **Лашина Н.М.**, Иванова Н.В. Селекционная оценка дигаплоидных линий ярового ячменя, созданных с использованием источников устойчивости к листовым пятнистостям / Т.Н. Радюкевич, А.В. Анисимова, Н.М. Лашина, Н.В. Иванова // Вестник защиты растений. - 2012. - N 1. - С. 61–64.
4. Афанасенко, О. С. Картирование локусов, контролирующих устойчивость ячменя к *Pyrenophora teres f. teres* и *Cochliobolus sativus* в двух дигаплоидных популяциях / О.С. Афанасенко, А.В. Козьяков, П. Хедлэй, **Н.М. Лашина**, А.В. Анисимова, О. Маннинен, М. Ялли, Е.К. Потокина // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2014. - Т. 18. - N 4/1. - С. 751–764.

Работы в других изданиях и сборниках

5. **Лашина, Н.М.** Оценка устойчивости сортов ячменя скандинавского происхождения к сетчатой и темно-бурой пятнистостям / Н.М. Лашина, А.В. Анисимова, М.А. Кузоватова, М. Rasmussen // Вторая Всероссийская конференция «Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам» (29 сентября - 2 октября 2008) - СПб.: ВИЗР, 2008. - С. 151–152.
6. **Лашина, Н.М.** Создание исходного материала для селекции сортов ячменя с групповой устойчивостью к болезням. / Н.М. Лашина, А.В. Анисимова, О.С. Афанасенко // Съезд генетиков и селекционеров,

посвященный 200-летию со дня рождения Чарльза Дарвина. V съезд ВОГиС (21-28 июня 2009). - М., 2009. - С. 263.

7. **Лашина, Н.М.** Оценка устойчивости сортов ячменя скандинавского происхождения к сетчатой и тёмно-бурой пятнистостям / Н.М. Лашина, А.В. Анисимова, М.А. Кузватова, М. Расмуссен // Технологии создания и использования сортов и гибридов с групповой и комплексной устойчивостью к вредным организмам в защите растений. - СПб., 2010. - С. 214–217.

8. **Лашина, Н.М.** Создание исходного материала для селекции устойчивых сортов ячменя методами биотехнологии / Н.М. Лашина, А.В. Анисимова, Т.Н. Радюкевич, О.С. Афанасенко // Третий Всероссийский съезд по защите растений «Фитосанитарная оптимизация агроэкосистем» (16-20 декабря 2013). - СПб.: ВИЗР, 2013 - Т.1. - С. 416–419.

9. Афанасенко, О.С. Создание генетически разнородного исходного материала для селекции ячменя с длительной устойчивостью к гемибiotрофным патогенам / О.С. Афанасенко, Н.В. Мироненко, А.В. Анисимова, **Н.М. Лашина**, Т.Н. Радюкевич, К.В. Новожилов // Вторая Всероссийская конференция «Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам» (29 сентября - 2 октября 2008). - СПб.: ВИЗР, 2008. - С. 105–108.

10. Новожилов, К.В. Создание генетически разнородного исходного материала для селекции ячменя и пшеницы на устойчивость к листовым пятнистостям / К.В. Новожилов, О.С. Афанасенко, Н.В. Мироненко, А.В. Анисимова, **Н.М. Лашина**, И.Г. Тернюк, Н.М. Коваленко // Вторая Всероссийская конференция «Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам» (29 сентября - 2 октября 2008). - СПб.: ВИЗР, 2008. - С. 165–167.

11. Афанасенко, О.С. Создание дигаплоидных популяций ячменя с генетическими детерминантами устойчивости к болезням. Современные иммунологические исследования, их роль в создании новых сортов и интенсификации растениеводства / О.С. Афанасенко, **Н.М. Лашина**, А.В. Анисимова, А.В. Козьяков, Е.К. Потокина, О. Маннинен // Материалы Всероссийской научно-производственной конференции (18 ноября 2009). - М. обл., Большие Вязёмы, 2009. - С. 33–37.

12. Афанасенко, О.С. Методологическое обеспечение селекции ячменя на устойчивость к пятнистостям листьев / О.С. Афанасенко, Н.В. Мироненко, А.В. Анисимова, **Н.М. Лашина**, К.В. Новожилов, И.А. Терентьева, И.Г. Лоскутов // Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке: состояние, проблемы, перспективы. Доклады II Вавиловской международной конференции (26-30 ноября 2007) - СПб.: ВИР, 2009. - С. 205–213.

13. Афанасенко, О.С. Устойчивость районированных и перспективных для районирования сортов ячменя и пшеницы к листовым болезням на Государственных сортоучастках (ГСУ) в Северо-Западном регионе РФ / О.С. Афанасенко, Л.А. Михайлова, А.В. Анисимова, **Н.М. Лашина**, Н.М. Коваленко, Т.И. Добрина, Т.Д. Лисицкая, Н.П. Халиулова, И.И. Константинова // Технологии создания и использования сортов и гибридов с групповой и комплексной устойчивостью к вредным организмам в защите растений. - СПб., 2010. - С. 199–211.

14. Афанасенко, О.С. Методологическое обеспечение селекции ячменя на устойчивость к пятнистостям листьев / О.С. Афанасенко, Н.В. Мироненко, А.В. Анисимова, **Н.М. Лашина**, Т.Н. Радюкевич, И.Г. Лоскутов, К.В. Новожилов // Технологии создания и использования сортов и гибридов с групповой и комплексной устойчивостью к вредным организмам в защите растений. - СПб., 2010. - С. 217–228.

15. Потокина, Е.К. Картирование QTL (Quantitative Trait Loci), детерминирующих устойчивость к сетчатой пятнистости ячменя / Е.К. Потокина, П. Хедлэй, О.С. Афанасенко, **Н.М. Лашина**, А.В. Анисимова, А.В. Козьяков, М. Ялли, О. Маннинен // Технологии создания и использования сортов и гибридов с групповой и комплексной устойчивостью к вредным организмам в защите растений. - СПб., 2010. - С. 229–236.

16. Анисимова, А.В. Дигаплоидные линии ячменя – исходный материал для селекции на устойчивость к возбудителям пятнистостей / А.В. Анисимова, **Н.М. Лашина**, Т.Н. Радюкевич, Н.В. Иванова, О.С. Афанасенко // Третья Всероссийская и международная конференция «Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам» (23 - 26 октября 2012) - СПб.: ВИЗР, 2012. - С. 195–197.

17. Устойчивость ячменя к возбудителям пятнистостей листьев. (Каталог ВИЗР) / М.М. Левитин (ред.), О.С. Афанасенко, А.В. Анисимова, Н.В. Мироненко, **Н.М. Лашина**, Л.В. Лебедева, И.Г. Лоскутов, О.Н. Ковалева, Г.С. Коновалова, А.Г. Семенова, С.Ю. Орлов (сост.) - СПб.: ВИЗР, 2013. - 63с.