



Генетика, селекція, біотехнологія

УДК 631.52:633.31:631.67

© 2017

Р.А. Вожегова,
член-кореспондент НААН,
доктор сільсько-
господарських наук

О.Д. Тищенко,
кандидат сільсько-
господарських наук
Інститут зрошуваного
землеробства НААН

СТВОРЕННЯ ТА ОЦІНКА СЕЛЕКЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ ЛЮЦЕРНИ З ПІДВИЩЕНИМ РІВНЕМ АЗОТФІКСАЦІЇ

Мета. Створити та оцінити вихідний матеріал люцерни за комплексом господарсько-цінних ознак для залучення кращих із них до селекційного процесу. **Методи.** Інбридинг, полікросметод і штучне схрещування. Оцінку проводили в піщаному субстраті та польових умовах. **Результати.** Здійснено диференціацію синтетичного селекційного матеріалу (S_1 та S_2). Виділено беккросовані та інбредні нащадки з максимальними показниками продуктивності, високим рівнем морфологічних ознак кореневої системи: діаметром кореня, його масою, об'ємом кореневої системи, нітрогеназною активністю. Інбридинг у другому поколінні незалежно від будови кореневої системи вихідної форми зумовив збільшення кількості рослин зі стрижнево-розгалуженою кореневою системою. Визначено факторіальні ознаки, які можуть бути критеріями добору за продуктивністю азотфіксації. **Висновки.** Проведення всебічної оцінки колекційного матеріалу в умовах зрошення дало змогу виділити форми, які представляють інтерес як вихідний матеріал для селекції нових високопродуктивних сортів люцерни з різними ознаками і властивостями та високою симбіотичною азотфіксацією. Визначено маркерні ознаки, які дають можливість на перших етапах селекційного процесу добирати форми з максимальними показниками азотфіксації.

Ключові слова: люцерна, популяція, інбридинг, полікрос, коренева система, урожайність, азотфіксація, успадкованість.

Серед багаторічних кормових бобових трав найбільшу популярність і поширення у світі отримала люцерна. Практична її

цінність не обмежується лише кормовими якостями. Вона виконує й інші важливі функції: агротехнічні, біологічні, агроекологічні.

Важливе її значення як фактора відтворення родючості ґрунту, збагачення його азотом. Це питання особливо актуальне, тому що в останні роки землеробство України функціонує за негативного балансу гумусу, азоту, фосфору та інших елементів живлення [1–3], 80–90% орних земель є деградованими [2]. Люцерна — кращий попередник для багатьох сільськогосподарських культур [4, 5]. Проте встановлено, що цінність сортів люцерни як попередника, їх ступінь дії на родючість ґрунту, його структуру залежать від форм кореневої системи, здатності накопичувати кореневу масу, рівня азотфіксувальної активності.

Однією з основних проблем залишається поєднання високої потенційної кормової, насіннєвої продуктивності сортів із підвищеним рівнем біологічної азотфіксації, накопичення кореневої маси. Ключову роль у технології створення нових сортів відіграють вихідний матеріал, розпізнання і добір цінних генотипів згідно із завданням селекції, яке полягає не лише у використанні різних, принципово нових методів збільшення доступної генотипової мінливості, а й нових способів добору.

Зі створенням нових сортів у центрі уваги завжди залишається проблема цінного вихідного матеріалу як невичерпного джерела генетичного різноманіття ознак і властивостей. Це найвідповідальніший етап селекційного процесу, який зумовлює кінцевий результат роботи селекціонера.

Мета досліджень — отримання та оцінка вихідного матеріалу люцерни для залучення його в селекційний процес під час створення нових сортів із підвищеним рівнем азотфіксації і застосуванням різних методів селекції.

Матеріали і методи досліджень. Вихідним матеріалом були генетично різноманітні донори та джерела цінних ознак і властивостей. Це сорти вітчизняної та зарубіжної селекції, які частіше мають одиничні ознаки, зрідка комплекс цінних ознак. До таких належать селекційні сорти зі США — Teton, Progress, що вирізняються довголіттям, швидким відростанням, високорослістю; Франції — F-34 з високою насіннєвою продуктивністю; Югославії, Екватору — характеризуються

багатоукісністю, швидким післяукісним відростанням; Італії — Florida з хорошим куцінням; Канади — сорт Rambler має високу зимостійкість і посухостійкість, розгалужену кореневу систему, у зв'язку з чим легко переносить витоптування тваринами; Австралії — сорт Sanseer з ознаками швидкого відростання після скошувань, стійкості до кореневої гнилі та грибних хвороб листя. Серед сортів селекції колишнього СРСР найціннішими для зони зрощуваного землеробства є сорти люцерни: Веселоподолянська 11 (Веселоподолянська дослідна станція, Полтавська обл.) з хорошим куцінням, зимостійкістю, Йигева 118 (Литовський НДІСГ), який характеризується високою зимостійкістю. З огляду на цінність дикорослих форм, які мають комплекс найважливіших ознак і властивостей, у селекційному процесі беруть участь різні дикорослі види люцерни: тяньшанська — *Medicago tyanschanica* Vass. ($2n = 32$); клейка — *M. glutinosa* M.B. ($2n = 32$); різнокольорова — *M. polychroa* Grossh. ($2n = 32$); пирійна — *M. agropyretorum* Vass. ($2n = 32$); серпоподібна — *M. quasifalcat* Sinsk. ($2n = 16$) та блакитна — *M. coerulea* Less. ($2n = 16$), які переведено на тетраплоїдний рівень.

У дослідженнях за азотофіксувальною здатністю використовували безазотисте середовище (піщана культура) на фоні інокуляції та вологості на рівні 70–80% НВ. Повний аналіз рослин проводили в 2-му укосі у фазі початку цвітіння з урахуванням висоти рослин, форми кореневої системи, її об'єму, архітекtonіки, кількості бульбочок та їх фракційного складу, кількості стебел, надземної та кореневої маси [6]. Нітрогеназну активність визначали на газовому хроматографі Chrom 5. У польових умовах популяції оцінювалися в розсаднику поодинокого стояння рослин за кормового використання з міжряддями 15 см, відстанню між рослинами 3–5 см. Аналіз проводили по кожній рослині в укосі окремо з урахуванням висоти, куціння, надземної маси рослини.

Для створення синтетичного матеріалу люцерни використовували методи інбридингу, полікросу та штучне схрещування.

Результати досліджень. За аналізом багаторічних досліджень в Інституті

зрошеного землеробства НААН, наявний генетичний фонду люцерни з різних країн земної кулі згідно з класифікацією П.О. Лубенця [7], належить до видів, що утворилися в процесі природної еволюції та селекційної роботи. Загалом це люцерна виду посівна (60,9%), мінлива (26,2), жовта (7,4), блакитна (1,2) та по 1,1% інших видів: пірийна, різнокольорова, клейка, тянь-шанська.

Після всебічної оцінки в зоні зрошеного землеробства з деяких сортів зарубіжної селекції та селекції інших наукових установ колишнього СРСР виділено форми, які представляють інтерес як вихідний матеріал. Проте висока гетерозиготність люцерни через перехресне запилення зумовлює велику мінливість серед рослин у сортах за багатьма ознаками, зокрема за азотфіксацією, формою кореневої системи, кореневими характеристиками. Інбридинг дає змогу провести генотипову диференціацію вихідного матеріалу, різного за спадковістю. Полікрос-метод дає можливість об'єднати кращі генотипи.

Метод інцухту припускає розкриття багатьох форм, які має культура, і зумовлює появу великої різноманітності морфологічних ознак, форм за швидкістю відростання, кущіння, ознаками стебла, кореневої системи, характером листя, його кількістю, за тривалістю вегетаційного періоду, холодостійкістю, стійкістю до хвороб [8]. Використання інбридингу показало різну реакцію селекційного матеріалу за основними ознаками.

З метою диференціації отриманого синтетичного селекційного матеріалу проведено неглибокий інбридинг (S_1 та S_2). Частину цього матеріалу було включено в штучні і насичувальні схрещування. Таким чином отримано 7 популяцій: Сін (с) $S_1 BC_1$, Сін (с) S_1 за вільного запилення, Сін (с) S_2 , Сін опуш. S_1 /Сін (с) $S_1 F_2$, Сін (с) S_1 /Сін опушен. $S_1 F_2$, Сін опушен. S_2 , Сін опуш. S_1 — за вільного запилення.

Результати аналізу одержаних даних показали, що в досліджуваних номерів зелена та повітряносуха маса рослини становила 16,0–22,7 і 5,7–7,5 г/рослину відповідно (табл. 1).

Максимальними показниками продуктивності в досліді вирізнялися: беккросовані та інбредні нащадки: Сін(с) $S_1 BC_1$, Сін (с) S_1 за вільного запилення, гібридні популяції Сін опуш. S_1 /Сін(с) $S_1 F_2$, Сін (с) S_1 /Сін опуш. $S_1 F_2$. Беккросовані нащадки Сін (с) $S_1 BC_1$ та гібридна популяція Сін (с) S_1 /Сін опуш. $S_1 F_2$ також мали вищі показники, ніж у середньопопуляційної за морфологічними ознаками кореневої системи: діаметром кореня (+3,3%), його масою (+6,9–12,0%), об'ємом кореневої системи (+6,1–6,5%). Вони характеризувалися високим рівнем нітрогеназної активності (+9,2–21,1%) щодо середньопопуляційної. Крім того, інбредні потомства Сін (с) S_1 та Сін опуш. S_1 за вільного запилення за ознаками: висота рослини, кількість стебел на рослину, зелена та

1. Характеристика популяцій люцерни за господарсько-цінними ознаками в піщаній культурі (2013–2015 рр.)

Генетичне походження	Висота рослин, см	Кількість стебел, шт./росл.	Маса рослини, г		Діаметр кореня, мм	Об'єм кореня, мл	Повітряносуха маса кореня, г	Нітрогеназна активність, Н/ моль/росл./ год
			зелена	повітряносуха				
Сін(с) $S_1 BC_1$	28,2	5,0	22,7	7,6	6,3	6,58	6,5	29156,6
Сін (с) S_1 за вільного запилення	29,0	4,6	21,4	6,9	6,2	6,30	5,6	26715,7
Сін (с) S_2	28,5	4,3	16,0	5,7	5,8	5,70	5,3	27075,7
Сін опуш. S_1 /Сін(с) $S_1 F_2$	30,2	4,7	21,0	7,5	6,2	6,00	5,9	23710,4
Сін опуш. S_1 за вільного запилення	30,0	4,5	20,0	7,1	6,0	6,00	5,7	21027,4
Сін опуш. S_2	30,0	4,4	16,2	5,9	6,0	6,00	5,5	14583,5
Сін(с)/Сін опуш. $S_1 F_2$	31,0	4,9	21,2	7,1	6,3	6,60	6,2	26302,5
Середньопопуляційна	29,6	4,6	19,8	6,7	6,1	6,20	5,8	24082,8
НІР _{0,05}			0,53	0,15	0,10		0,11	

повітряносуха маса рослини перевищували ці ознаки в популяції із більш глибоким інбридингом Сін (с) S₂, Сін опуш. S₂, тобто в них спостерігалася депресія. Особливо різко зменшився рівень нітрогеназної активності (у 1,44 раза) у популяції Сін опуш. S₂ порівняно з інбредними нащадками Сін опуш. S₁ за вільного запилення.

Оцінка селекційного матеріалу в польових умовах показала, що високою продуктивністю характеризувалися беккросовані нащадки Сін (с) S₁BC₁ та нащадки 2-го покоління інбридингу Сін (с) S₂ Сін, опушені S₂ на відміну від отриманих даних у піщаній культурі. Вони за врожайністю зеленої та повітряносухої маси перевищували середньопопуляційну на 12,7–43,0%. Перші 2 популяції виділилися також за кількістю стебел на 1 рослину — 13,5–13,6 шт. проти 10,2 у середньопопуляційній. За оцінкою цього селекційного матеріалу в різних розсадниках кормового використання, популяція Сін (с) S₁BC₁ сформувала врожайність зеленої маси 12,85 кг/м² на 2-й рік життя травостою і 15,94 кг/м² — у сумі за 2 роки та перевищила стандартний сорт Надежда на 7,5–8,2%. Максимальною насінневою врожайністю (4,4–4,6 ц/га) характеризувалися популяції: Сін опуш. S₁/Сін (с) S₁F₂, Сін (с) S₁/Сін опушен. S₁F₂, Сін (с) S₁ за вільного запилення. Сорти Надежда і Сінська (стандарт) сформували врожайність насіння 2,7 і 3,0 ц/га.

Вивчення впливу інбридингу на особливості кореневих характеристик, їх зв'язок з бульбочкоутворювальним процесом та іншими господарсько-цінними ознаками показало, що інбридинг у другому поколінні незалежно від будови кореневої системи вихідної форми зумовив збільшення кількості рослин зі стрижнево-розгалуженою кореневою системою. Водночас спостерігалася депресія за висотою рослин, об'ємом та масою кореневої маси. За бульбочкоутворювального процесу реакція рослин була різною залежно від генотипу, форми кореневої системи, ступеня інбридингу. Так, у гібридній популяції ФХНВ рослини зі стрижнево-розгалуженою кореневою системою сформували вдвічі більше бульбочок, а зі стрижневою — на 51,8% менше порівняно з вихідними формами. Реакція на інбридинг у сорту Павлівська 7 була іншою. Незалежно від форми кореневої системи в другому поколінні інбридингу бульбочкоутворювальний процес проходив у рослин у 1–4 рази інтенсивніше, ніж у вихідних форм.

За створення сортів люцерни з потужною кореневою системою і підвищеним рівнем азотфіксувальної здатності селекція має свої особливості. Попри загальновідомий факт фіксації атмосферного азоту бобовими травами не відпрацьовано істотні методи вимірювання цього процесу, не визначено маркерні ознаки, які дають можливість добирати форми з максимальними його

2. Структура популяцій люцерни, різних за азотфіксувальною активністю

Клас за активністю, мкмоль/роsl./год	Кількість рослин, %						
	Sitel	Sitel/Надежда F ₂	Надежда	Gloria	Gloria/Надежда F ₂	ЦП-11	ЦП-11/ Sitel F ₂
0,0	5,26	4,29	4,29	2,29	1,52	1,43	39,13
0,01–1,07	71,93	42,90	71,73	65,67	6,06	28,57	43,48
1,08–2,14	19,30	27,14	18,57	28,36	71,24	42,86	10,14
2,15–3,21	3,51	12,86	4,29	2,99	13,64	11,43	4,35
3,22–4,28	–	5,71	1,43	–	4,55	5,71	–
4,29–5,35	–	4,29	–	–	1,52	2,86	–
5,36–6,42	–	2,86	–	–	1,52	1,43	–
6,43–7,49	–	–	–	–	–	1,43	–
7,50–8,56	–	–	–	–	–	1,43	–
8,57–9,63	–	–	–	–	–	1,43	–
9,64–10,70	–	–	–	–	–	1,43	2,90

показниками. Тому ми намагалися відшукати маркерні ознаки для оцінювання рослини за рівнем азотфіксації на перших етапах селекційного процесу.

Ефективність біологічної фіксації азоту значною мірою залежить від характеру взаємодії макро- та мікросимбіонтів, який контролюється рослиною-господарем [9–12]. З огляду на актуальність цієї проблеми для селекції провели порівняльну оцінку азотфіксувальної здатності в батьківських форм і гібридів у піщаному субстраті (табл. 2).

Результати досліджень за рівнем азотфіксувальної здатності показали, що сорти і гібридні популяції мають найрізноманітніший склад генів, які контролюють цю ознаку. Трапляються рослини, які не фіксували азот із повітря (1,43–39,13%). Здебільшого 53,6–94,0% рослин у популяціях мали низький рівень азотфіксації (0,01–2,14 мкмоль/росл./год). Різною виявилася їх частка з проміжним рівнем нітрогеназної активності (2,15–5,35 мкмоль/росл./год): у гібридних комбінацій Sitel/Наdejда F₂, ЦП-11, Gloria/Наdejда F₂ вона становила 18,2–22,9%, в інших популяціях — 2,99–5,72% рослин.

За аналізу внутрішньосортової мінливості за ознакою рівня азотфіксації увагу привертає наявність 2-х піків у гібридів Sitel/Наdejда F₂ та Gloria/Наdejда F₂ за розподілом рослин за класами (4,29–6,42 мкмоль/росл./год), у їхніх батьківських форм їх немає. Цікавою в цьому плані є популяція ЦП-11: рослини здатні зв'язувати азот із повітря до максимального значення, водночас у деяких рослин цього немає. У гібрида ЦП-11/Sitel F₂ після розриву в розподілі (клас 3,22–9,63) виділилося 2,9% зразка з високою азотфіксувальною здатністю.

Така різноманітність знайшла відображення в середніх величинах. Гібридні популяції з великою кількістю рослин мали високі показники азотфіксувальної здатності і високі показники середніх значень.

Ступінь вираження ознаки в нащадках можна прогнозувати за наявністю характеру успадкування. Під час схрещування контрастних за азотфіксацією рослин люцерни домінує підвищена здатність рослин фіксувати азот із повітря. Тому для схрещування було взято батьківські форми з різним рівнем нітрогеназної активності. Залежно від генетичних компонентів схрещування азотфіксувальна активність передавалася нащадкам по-різному, і характер її успадкованості визначався їх генетичними компонентами і механізмом дії та взаємодії генів, які контролюють цю ознаку. Залежно від генетичних компонентів схрещування азотфіксувальна здатність успадковувалася за типом неповного позитивного ($h_p + 0,23 + 0,64$) та проміжного домінування ($h_p = +0,08$). У гібридних популяцій (Gloria/Наdejда F₂ і Sitel/Наdejда F₂) з неповним позитивним домінуванням рослини перевершують за активністю нітрогенази кращого з батьків відповідно на 83,7 і 137,2%, тоді як із проміжним успадкуванням гібрид ЦП-11/Sitel F₂ поступався кращій батьківській формі на 80,8% (табл. 3).

Вивчення кореляційних залежностей дає змогу визначити факторіальні ознаки, які можуть бути критеріями добору за продуктивністю азотфіксації. Дослідження показали, що між азотфіксацією та морфологічними ознаками, загальною кількістю бульбочок і їх фракційним складом є взаємозв'язок різної сили. Отримані експериментальні

3. Азотфіксувальна активність різних популяцій люцерни

Сорт, гібридна популяція	n	$\bar{x} \pm s_x$	σ^2	v, %	lim	h_p
Gloria ♀	57	0,70±0,225	2,87	72,2	0,13–2,20	
Gloria/Наdejда F ₂	70	1,58±0,470	15,80	79,5	0,13–5,82	+0,23
Наdejда ♂	70	0,86±0,081	0,46	79,0	0,06–4,17	
Sitel ♀	67	0,80±0,265	3,12	69,4	0,05–2,43	
Sitel/Наdejда F ₂	67	2,04±0,479	14,90	59,8	0,57–8,14	+0,64
ЦП-11 ♀	70	2,03±0,730	37,80	95,8	0,05–8,80	
ЦП-11/Sitel F ₂	70	1,64±0,700	34,40	113,2	0,10–10,90	+0,08

дані дають змогу припустити, що рівень азотфіксувальної активності на 33,6–98,0% залежить від кількісного складу бульбочок розміром більше 1 мм. Такі морфологічні ознаки бульбочкоутворювального процесу, як загальна кількість бульбочок розміром більше 1 мм, їх забарвлення та розміщення на кореневій системі можна використовувати як маркерні. Візуальні спостереження за їх застосуванням мають велике значення для первинної оцінки на початку селекційної

роботи і можуть бути використані як негативний добір — вибраковування рослин із низьким рівнем азотфіксації.

Отримані експериментальні дані стали основою для розроблених методик селекції люцерни на підвищений рівень накопичення кореневої маси, симбіотичної азотфіксації та створення сортів люцерни Унітро, Серафіма, Зоряна, Анжеліка, Елегія, занесених до Державного Реєстру сортів рослин України.

Висновки

Проведення всебічної оцінки колекційного матеріалу в умовах зрошення дало змогу виділити форми, які представляють інтерес як вихідний матеріал для селекції нових високопродуктивних сортів люцерни з різними ознаками та властивостями. У процесі вивчення синтетичного матеріалу люцерни спостерігалася різна його реакція на самозапилення. Глибший інбридинг (S_2) у рослин показав депресію за повітряносухою масою надземної частини та кореня. Інбридинг сприяв збільшенню

кількості рослин зі стрижнево-розгалуженою кореневою системою.

Рівень нітрогеназної активності та її характер успадкування в гібридів визначається їх генетичними компонентами. Нітрогеназна активність успадковувалася за типом неповного позитивного та проміжного домінування.

Визначено маркерні ознаки, які дають можливість на перших етапах селекційного процесу добирати форми з максимальними показниками азотфіксації.

Бібліографія

1. Тараріко О.Г. Концепція і наукове обґрунтування основних напрямків удосконалення систем випуску і реалізації мікробіологічних препаратів для сільськогосподарського виробництва/О.Г. Тараріко, О.В. Шерстобоева, В.П. Патица//Мікробіол. журн. — 1997. — № 4. — С. 102–108.

2. Відтворення гумусу в агроecosистемах Полісся/В.П. Стрельченко, А.Т. Бовсуновський, О.П. Стецюк та ін.//Вісн. аграр. науки. — 2000. — № 7. — С. 9–13.

3. Туев Н.А. Экологические проблемы интенсивного земледелия/Н.А. Туев//Вестн. с.-х. науки. — 1988. — № 6. — С. 91–93.

4. Лозовіцький П.С. Поповнення гумусу у ґрунтах Інгулецької зрошувальної системи за рахунок корневих залишків сільськогосподарських культур/П.С. Лозовіцький//Зрошуване землеробство. — Херсон: Айлант, 2010. — № 54. — С. 198–210.

5. Лымарь А.О. Экологические основы системы орошаемого земледелия/А.О. Лымарь. — К.: Аграр. наука, 1997. — 400 с.

6. Тищенко О.Д. Методика селекції люцерни на підвищений рівень симбіотичної азотфіксації/О.Д. Тищенко, А.В. Тищенко. — Херсон, 2016. — 19 с.

7. Лубенец П.А. Люцерна — *Medicago L.* (краткий обзор рода и классификация подрода *Falcago* (Rchb.) Crossh.)/П.А. Лубенец//Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. — Л., 1972. — Т. 47. — Вып. 3. — С. 3–82.

8. Шевцов И.А. Использование инбридинга у растений/И.А. Шевцов. — К.: Наук. думка, 1983. — 270 с.

9. Сметанин Н.И. Структура популяций люцерны (*Medicago sativa L.*) по уровню азотфиксации/Н.И. Сметанин, В.К. Шумный//Сибирск. вестн. с.-х. науки. — 1982. — № 6. — С. 38–43.

10. Тихонович И.А. Эколого-генетические основы использования биоразнообразия симбиотических систем для повышения продуктивности растений в условиях экологически устойчивого земледелия/И.А. Тихонович, Н.А. Проворов//Матер. междунар. агропром. конгресса Агрорусь. Инновации — основа развития агропромышленного комплекса. — СПб.: Ленэкспо, 2010. — С. 38–61.

11. Spaink H. The Rhizobiaceae. Molecular biology of model plant — associated bacteria/H. Spaink, A. Kondorosi, P. Hooykaas; пер. с англ. под ред. И.А. Тихоновича и Н.А. Проворова. — СПб., 2002. — С. 376–561.

Надійшла 3.07.2017.