

efficiency of applying of different agricultural technologies on garden pea cultivating. The most favourable agrophysical condition of the layer equal to 0–30 sm and density 1,15 g/sm³ was observed when surface tillage. Sub-surface tillage and surface tillage resulted in soil density up to 1,18 g/sm³. Deeper fall tillage (on average 193–194 mm) favours to great moisture content in the soil layer. Surface tillage favours to moisture concentration less (on 16mm or 8.5 %) and is equal to the lowest level of moisture. Subsurface tillage and surface tillage with no herbicides prevent weeds less than ploughing. The paper points out that content of impurity in soil-protective covers was increased on 21–34 un/m², or 88–107 g/m², and dangerous, hazardous and harmful species are increased. The authors recommend applying of resource saving technologies of soil protection tillage in cases of applying mineral fertilizers and herbicides for good pea yield. They reckon it is efficient to apply technologies of high energy in order to get high pea yields and conserve the soil fertility.

УДК 633.854.78:575

СОЗДАНИЕ ЗАКРЕПИТЕЛЕЙ СТЕРИЛЬНОСТИ ПОДСОЛНЕЧНИКА, УСТОЙЧИВЫХ К ГЕРБИЦИДУ ЭКСПРЕСС 75 В.Г.

С. О. Кириенко, аспирант

Уманский национальный университет садоводства

E-mail: SKirienko@i.ua

Ключевые слова: резистентность, гербицид, сульфонилмочевина, наследование, линия, подсолнечник, Экспресс 75 в.г.

Реферат. В настоящее время используется производственная система возделывания подсолнечника, имеющая несколько названий – ExpressSun, Экспресс или СУМО, представляющая собой комбинацию гербицида, являющегося ALS-ингибитором из группы сульфонилмочевин, и генотипов подсолнечника, устойчивых к этому гербициду. Создание гербицидоустойчивых гибридов подсолнечника стало возможным после обнаружения в дикорастущих популяциях особей, резистентных к трибенурон-метилу – веществу из группы сульфонилмочевинных гербицидов. Вследствие длительного использования в сельском хозяйстве гербицида Экспресс 75 в.г. у некоторых растений подсолнечника была выявлена устойчивость к нему. Данные растения имеют ген Su, который определяет устойчивость к гербициду, этот ген был перенесен в коммерческие гибриды подсолнечника. Созданы они методом традиционной селекции, путем скрещивания линий, которые имеют природную устойчивость к трибенурон-метилу. Начиная с 2003 г. в мире начали активно использовать гибриды подсолнечника, устойчивые к гербицидам на основе трибенурон-метила, производного сульфонилмочевины. Генетическая устойчивость гибридов к этому гербициду разрешает использовать гербицид в широком спектре – от 2 до 8 настоящих листков культуры и на ранних сроках развития сорняков. Преимущества данной технологии следующие: а) высокая эффективность против самих опасных однодольных сорняков; б) отсутствие ограничений в использовании и влияния на последующие культуры в севообороте. Использование гербицида не зависит от количества осадков. Механизмом действия является ингибирование фермента ацелоктатсинтазы (ALS inhibitor), иначе говоря, угнетение функции фермента, который принимает участие в синтезе некоторых аминокислот, и как следствие, – блокирование синтеза белков. Донорские формы подсолнуха показали полную устойчивость к сульфонилмочевинному гербициду Экспресс 75 в.г. (действующее вещество – трибенурон-метил). Резистентность к трибенурон-метилу при скрещивании этих материалов с селекционными линиями контролировалась в F₁ и F₂ одним полностью доминантным геном. Получены линии – закрепители стерильности подсолнечника, устойчивые к сульфонилмочевинным гербицидам.

Среди масличных культур ведущее место в агропромышленном комплексе Украины занимает подсолнечник. Засорение посевов сорняками приводит к значительным потерям урожая [1].

Вопрос толерантности и чувствительности растений подсолнечника к гербицидам является важным и актуальным для изучения, так как применение послевсходовых гербицидов может вызвать

стресс у растений и подавлять их рост и развитие, что, в свою очередь, негативно отразится на продуктивности этой культуры.

Поиск наследственной устойчивости к гербицидам в популяциях культурных растений и их дикорастущих сородичей привлекает внимание ученых как с точки зрения познания генетики этого признака, так и с целью разработки инновационных агротехнологий.

В настоящее время используется производственная система возделывания подсолнечника, имеющая несколько названий – ExpressSun, Экспресс или СУМО, представляющая собой комбинацию гербицида, являющегося ALS-ингибитором из группы сульфонилмочевин, и генотипов подсолнечника, устойчивых к этому гербициду [2].

Создание гербицидоустойчивых гибридов подсолнечника стало возможным после обнаружения в дикорастущих популяциях резистентных особей к трибенурон-метилу – веществу из группы сульфонилмочевинных гербицидов. Так, 57% из 46 природных популяций *Helianthus annuus* L. и трёх популяций *H. petiolaris* Nutt., семена которых были собраны в ходе экспедиций в пяти штатах США в 2002 г., обладали устойчивыми к трибенурон-метилу особями [4]. При этом в южных регионах, где сульфонилмочевины использовались более длительное время, доля популяций с устойчивыми растениями была выше, например, в штате Канзас до 94%.

С молекулярно-генетической точки зрения устойчивость к сульфонилмочевинам у линий представляет собой точковую мутацию в гене фермента AHAS (ALS), а именно замену С-Т в кодоне 197 [5, 7]. Эта транзигция приводит к моноаминокислотному изменению пролинлейцина в первичной структуре фермента, что модифицирует его конформацию и делает устойчивым к действию гербицида. С другой стороны, данных об изучении наследования признака с проведением гибридологического анализа в литературе не содержится [6, 10].

Аналогичные результаты были получены также при изучении популяционной структуры 23 образцов дикорастущего *H. annuus* из коллекции, собранной в трех провинциях Канады в 1994 г., хранящихся в генбанке. Так, 52% популяций обладали устойчивыми особями, причём доля устойчивых к трибенурону растений в этих популяциях в среднем составляла 3% с максимальным лимитом до 6% [8].

Интродукция гена устойчивости к трибенурон-метилу от дикорастущего *H. annuus* из Канзаса в генофонд культурного подсолнечника завершилась созданием линий, которые обладают этими признаками [9]. Они представляют собой инбредную линию – закрепитель стерильности, и линию – восстановитель фертильности, полученные на основе скрещиваний. В частности, доказана эффективность влияния сульфонилмочевинного гербицида Гранстар на развитие клубеньков вирулентной популяции заразики при оценке в условиях теплицы [3]. Таким образом, есть необходимость создания отечественных гибридов, обладающих устойчивостью к гербицидам из группы сульфонилмочевины.

Целью исследования было селекционно-генетическое изучение признака устойчивости к сульфонилмочевинным гербицидам у подсолнечника; оценка коллекции линий по устойчивости к трибенурон-метилу; изучение наследования этого признака, а также создание закрепителей стерильности и аналогов селекционных линий с устойчивостью к трибенурон-метилу.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проведены в 2012–2014 гг. на опытных делянках кафедры генетики, селекции растений и биотехнологии Уманского национального университета садоводства (Черкасская область).

Объектами исследований являлись промышленные зарубежные гибриды, обладающие устойчивостью к трибенурон-метилу, а также стерильные отцовские формы гибридов Украинский F₁, Украинское солнышко, Заграва и Украинский скороспелый.

Для оценки устойчивости подсолнечника к сульфонилмочевинам на стадии трех пар настоящих листьев проводилась обработка растений гербицидом Экспресс 75 в.г. (действующее вещество трибенурон-метил, 750 г/кг, компания производитель DuPont). Опрыскивание проводили в вечерние часы с помощью ранцевого пневматического опрыскивателя. Гербицид равномерно наносили на листья, включая точку роста растений. Оценку воздействия гербицида проводили на 5-е сутки после обработки. Степень повреждения подсолнечника гербицидом Экспресс 75 в.г. оценивали по следующей шкале:

– растения без видимых повреждений;

– растения, имеющие разную степень повреждения (хлороз);

– растения полностью некротические и погибшие.

Отобранные для скрещивания растения во время раскрытия корзинки изолировали при помощи изоляторов для сохранения чистоты растений от чужеродной пыльцы. Кастрацию (удаление пыльников) проводили с помощью пинцета в 6–7 ч утра, когда пыльники вытянулись, а рыльца еще не открылись. Для оценки хозяйственно-полезных признаков проводили полевые и лабораторные исследования с использованием полевой и канцелярской линейки и лабораторных весов. Статистический анализ результатов исследования проводили с использованием критерия Пирсона (χ^2), наименьшей существенной разницы НСР_{0,05}.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При первичном скрининге коллекции были изучены четыре селекционные линии, два образца-донора и 57 семей селекционных линий. Для определения устойчивости к трибенурон-метилу гербицидом были индивидуально обработаны около 700 растений подсолнечника. При визуаль-

ной оценке состояния растений после обработки гербицидом по шкале фитотоксичности выделялись два фенотипических класса: устойчивые – без видимых повреждений тканей растения и погибшие – остановившиеся в росте растения с полным некрозом тканей.

Образцы-доноры показали полную устойчивость к гербициду Экспресс 75 в.г. Все растения обычных линий Украинский F₁, Украинское солнышко, Заграва и Украинский скороспелый погибли в результате обработки гербицидом (табл. 1).

Таким образом, выявлено, что в образцах коллекции мутантный ген, который обеспечивает устойчивость к сульфонилмочевинам, отсутствует.

Для изучения наследования признака устойчивости к сульфонилмочевинам были обработаны гербицидом Экспресс 75 в.г. растения F₁ и F₂ по нескольким комбинациям скрещиваний (табл. 2). Гибриды F₁ Заграва × донор (З × Д), Украинское солнышко × донор (УСн × Д), Украинский скороспелый × донор (УСк × Д) и Украинский F₁ × донор (УF₁ × Д), как и интродуцированные родительские формы, показали полную устойчивость к гербициду Экспресс 75 в.г. Кроме того, отсутствовал промежуточный фенотипический класс «чувствительные» (т.е. растения с различной степенью хлорозов и некрозов, а также поврежде-

Таблица 1

Результаты скрининга коллекции подсолнечника по устойчивости к гербициду Экспресс 75 в.г., 2012 г.

Генотип	Число растений, шт.	
	устойчивые	погибшие
Образцы-доноры	37	0
Заграва	0	28
Украинское солнышко	0	26
Украинский скороспелый	0	34
Украинский F ₁	0	27
57 семей	0	524

Таблица 2

Наследование в F₁ и F₂ устойчивости растений подсолнечника к гербициду Экспресс 75 в.г.

Поклоение	Комбинация скрещивания	Число растений, шт.		$\chi^2_{3:1}$
		устойчивые	погибшие	
F ₁	З × Д	31	0	–
	УСн × Д	28	0	
	УСк × Д	47	0	
	Ук F ₁ × Д	18	0	
F ₂	З × Д	37	12	0,06 *
	УСн × Д	39	16	0,08 *
	УСк × Д	50	18	0,73 *
	У F ₁ × Д	39	13	0,39 *

* – $\chi^2_{3:1} < \chi^2_{05} = 3,84$.

нием центральной точки роста после обработки), который мог бы указывать на наличие генов-модификаторов или недоминантный тип наследования. Следовательно, характер наследования этого признака в F_1 – полное доминирование устойчивости.

Расщепление в популяциях F_2 по всем четырём комбинациям после самоопыления также подтвердило моногенную схему наследования: 3 устойчивых и 1 погибший (3:1). Было обработано гербицидом гибридов F_1 Заграва × донор (3 × Д) 37 шт., из них погибло 12; Украинское солнышко × донор (УСн × Д) – 39 шт., из них погибло 16; Украинский скороспелый × донор (УСк × Д) – 50 шт., из них погибло 18 и Украинский F_1 × донор (УФ $_1$ × Д) – 39 шт., из них погибло 13. Соотношение между неустойчивыми и гербицид-резистентными особями должно составлять 3 : 1. Проведенный статистический анализ Пирсона подтвердил достоверность полученных результатов. Таким образом, ген устойчивости к гербициду Экспресс 75 в.г. передается путем гибридизации и наследуется как доминантный.

Результаты свидетельствуют, что генетический признак гербицид-резистентности подсолнечника обусловлен лишь ядерными факторами, а не цитоплазматическими. Это убедительно доказано возможностью ее успешной передачи проведенными скрещиваниями с МС-линией. Количество проведенных скрещиваний и генотип реципиента не сказывались на уменьшении уровня экспрессии, а полученные устойчивые потомки не проявляли никаких визуальных симптомов повреждений или нарушений в росте и развитии.

В результате проведенных скрещиваний нами получены растения с нормальной цитоплазмой и генами – закрепителями стерильности пыльцы в гетерозиготном и гомозиготном состоянии, а также геном резистентности Su в гетерозиготном состоянии.

Анализ идиотипов полученных растений показывает, что все они гетерозиготны по гену устойчивости, и их необходимо самоопылить для дальнейшего отбора гомозиготной формы. Половина из этих растений имеют ген – закрепитель стерильности в гетерозиготном состоянии и тоже нуждаются в самоопылении и переводе гена – закрепителя стерильности в гомозиготное состояние.

Другая половина растений имеет ген закрепителя стерильности в гомозиготном состоянии, и эти растения являются закрепителями стерильности, а из них еще половина имеет ген ветвле-

ния в гетерозиготном состоянии и лишь растения с идиотипом N rfrf BB SuSu являются закрепителями стерильности с доминантными алелями ветвления стебля и самым желанным материалом для получения устойчивых закрепителей стерильности. Их количество в популяции составляет одну четвертую часть.

Имеющиеся популяции, которые имеют резистентность, послужили материалом для выделения закрепителей стерильности. Из выделенных кандидатов в закрепители стерильности отобрали истинные закрепители стерильности, которые имели нормальную плазму. Для выделения закрепителей стерильности проводили скрещивание кандидатов в закрепители стерильности со стерильной формой:

Стерильная форма х
кандидат в закрепители стерильности
S rfrf BB Su Sux N rfrf BB Su Su
S rfrf BB Su Sux N rfrfBb Su Su
S rfrf BB Su Sux N Rfrf BB Su Su
S rfrf BB Su Sux N RfrfBb Su Su

Семена от самоопыления высевали по семьям, и растения обрабатывали гербицидом. Четверть растений, которые не имели гена устойчивости, погибли. Провели анализ по признаку «ветвление стебля». Было установлено, что половина семей имеет признак «ветвление стебля». Семена от скрещивания использовали для анализа признака «стерильность – фертильность». По этому признаку определяли закрепители стерильности у растений, полученных от самоопыления. Если все потомки стерильные, то растение – кандидат в закрепители стерильности является таковым.

На самоопыленных потомках проводили отбор по хозяйственно полезным признакам. В результате проведенной работы мы получили закрепители стерильности и их стерильные аналоги.

Данные по лучшим устойчивым к гербициду Экспресс 75 в.г. линиям – закрепителям стерильности приведены в табл. 3. Созданные линии отличаются по урожайности, высоте растений, диаметру корзинки и длине вегетационного периода.

Линия 3453/12 имеет наименьшую высоту (153±3 см) и наименьшую урожайность (6,2 ц/га). Диаметр корзинки составлял 17±3 см, а продолжительность вегетационного периода 100 дней. Масса 1 000 семян не отличалась от других линий и составляла 52 г.

Линия 3599/12 имеет высоту 165±5 см, диаметр корзинки 19±2 см, вегетационный период 105 дней и урожайность 8,1 ц/га.

Таблица 3

Характеристика созданных закрепителей стерильности, устойчивых к гербициду Экспресс 75 в.г. (2013 г.)

Линия	Урожайность, ц/га	Высота растений, см	Диаметр корзинки, см	Масса 1 000 семян, г	Продолжительность вегетационного периода, дней
4453/13	6,2	153±3	17±3	52	100
4599/13	8,1	165±5	19±2	50	105
А 4451/13	10,2	170±4	21±3	52	107
А 4632/13	11,3	170±4	21±2	52	108
А 4461/13	12,1	175±5	22±2	52	110
3641/13	12,3	176±5	22±2	52	112
НСР _{0,05}	0,5	15	3	2	4

Линии А 3451/12 и А 3632/12 схожие, имеют одинаковую высоту – 170±4 см, диаметр корзинки 21±3 и 21±2 см, продолжительность вегетационного периода 107 и 108 дней. Немного отличались они урожайностью – 10,2 и 11,3 ц/га.

Также мало отличались между собой линии А 3461/12 и 2641/12: высота растений 175±5 и 176±5 см, диаметр корзинки 22±2 см, продолжительность вегетационного периода 110 и 112 дней, урожайность 12,1 и 12,3 ц/га.

Линии имеют достаточную урожайность для использования их в семеноводстве гибридов подсолнечника.

В результате самоопыления и отбора были получены три линии закрепителей стерильности. Новые линии являются донорами признака устойчивости к сульфонилмочевинным гербицидам у подсолнечника.

ВЫВОДЫ

1. Доноры показали полную устойчивость к сульфонилмочевинному гербициду Экспресс 75 в.г. (действующее вещество трибенурон-метил), тогда как отечественные линии подсолнечника не имели мутантного гена устойчивости к данному гербициду.
2. Резистентность к трибенурон-метилу в F₁ при скрещивании этих донорских линий с селекционными линиями и F₂ после самоопыления контролировалась одним полностью доминантным геном.
3. Получены линии-доноры – закрепители стерильности подсолнечника, устойчивые к сульфонилмочевинным гербицидам, и устойчивые аналоги селекционных линий подсолнечника.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Васильев Д. С. Химические способы борьбы с сорняками на посевах масличных и эфиромасличных культур // Масличные культуры: тр. за 1912–1926 гг. – М.: Колос, 1963. – С. 424–434.
2. Воронова О. В борьбе за место под солнцем // Новый аграрный журнал. – 2011. – Вып. 2 (2). – С. 48–54.
3. Демури Я. Н., Перстенова А. А. Влияние ALS-ингибиторов на клубеньки заразики у гербицидоустойчивых линий подсолнечника // Масличные культуры: науч.-техн. бюл. ВНИИМК. – Краснодар, 2011. – Вып. 1 (146–147). – С. 134–138.
4. Kaya Y., Demirci M., Evci G. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) breeding in Turkey for broomrape (*Orobanchecernua* Loeffl.) and herbicide resistance // *Helia*. – 2004. – Vol. 27. – P. 199–21.
5. *Acetohydroxyacid* synthase mutations conferring resistance to imidazolinone or sulfonyleurea herbicides in sunflower / J. M. Kolkman, M. B. Slabaugh, J. M. Bruniard [et al.] // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2004. – Vol. 109. – P. 1147–1159.
6. Miller J. F., Seiler G. J. Tribenuron resistance in accessions of wild sunflower collected in Canada // [Электрон. ресурс]. – Режим доступа: www.sunflowerusa.com/research.
7. Miller J. F., Al-Khatib K. Registration of two oilseed sunflower genetic stocks, SURES-1 and SURES-2, resistant to tribenuron herbicide // *Crop Science*. – 2004. – Vol. 44. – P. 1037–1038.
8. Olson B. L. S., Al-Khatib K., Aiken R. M. Distribution of resistance to imazamox and tribenuron-methyl in native sunflower. [Электрон. ресурс]. – Режим доступа: <http://www.sunflowerusa.com/research/research-workshop/documents/158.pdf>.
9. *Genetics and breeding of herbicide tolerance in sunflower* / C. F. Sala, M. Bulos, E. Altieri, M. L. Ramos // *Proc. 18th Int. Sunfl. Conf., Mar del Plata, Argentina*. – 2012. – P. 75–81.

10. Tranel P.J., Wright T.R. Resistance of weeds to AHAS-inhibiting herbicides: what have we learned // Weed Science. – 2002. – Vol. 50. – P. 700–712.
1. Vasil'ev D. S. *Khimicheskie sposoby bor'by s sornyakami na posevakh maslichnykh i efiromaslichnykh kul'tur* [Maslichnye kul'tury: tr. za 1912–1926 gg.]. Moscow: Kolos, 1963. pp. 424–434.
2. Voronova O. *V bor'be za mesto pod solntsem* [Novyy agrarnyy zhurnal], Vyp. 2 (2) (2011): 48–54.
3. Demurin Ya. N., Perstenova A. A. *Vliyanie ALS-ingibitorov na klubn'ki zarazikhi u gerbitsidoustoychivyykh liniy podsolnechnika* [Maslichnye kul'tury: nauch.-tekhn. byul. VNIIMK]. Krasnodar. Vyp. 1 (146–147) (2011): 134–138.
4. Kaya Y., Demirci M., Evci G. *Sunflower (Helianthus annuus L.) breeding in Turkey for broomrape (Orobanchecernua Loeffl.) and herbicide resistance* [Helia], Vol. 27 (2004): 199–21.
5. Kolkman J. M., Slabaugh M. B., Bruniard J. M. et al. *Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidazolinone or sulfonylurea herbicides in sunflower* [Theoretical and Applied Genetics], Vol. 109 (2004): 1147–1159.
6. Miller J. F., Seiler G. J. *Tribenuron resistance in accessions of wild sunflower collected in Canada*: www.sunflowernsa.com/research.
7. Miller J. F., Al-Khatib K. *Registration of two oilseed sunflower genetic stocks, SURES-1 and SURES-2, resistant to tribenuron herbicide* [Srop Science], Vol. 44 (2004): 1037–1038.
8. Olson B. L. S., Al-Khatib K., Aiken R. M. *Distribution of resistance to imazamox and tribenuron-methyl in native sunflower*: <http://www.sunflowernsa.com/research/research-workshop/documents/158.pdf>.
9. Sala C. F., Bulos M., Altieri E., Ramos M. L. *Genetics and breeding of herbicide tolerance in sunflower* [Proc. 18th Int. Sunfl. Conf., Mar del Plata]. Argentina. 2012. pp. 75–81.
10. Tranel P. J., Wright T. R. *Resistance of weeds to AHAS-inhibiting herbicides: what have we learned* [Weed Science]. Vol. 50 (2002): 700–712.

STERILITY-FIXING AGENTS OF SUNFLOWER, RESISTANT TO EXPRESS 75 v.g. HERBICIDE

Kirienko O. S.

Key words: resistance, herbicide, sulfonylureas, inheritance, line, sunflower, Express 75 v.g.

Abstract. Nowadays, the specialists apply productive way of sunflower cultivating which is called ExpressSun, Express or SUMO. It is revealed a combination of herbicide, which is ALS-inhibitor from the group of sulfonylureas and sunflower genotypes resistant to this herbicide. The author outlines, that hybrids of sunflower resistant to herbicide became possible after finding species resistant to tribenuron methyl, which is a substance of sulfonylureas herbicides in wild flora. The author discovers that some plants of sunflower are resistant to 75 g. v. Express herbicide due to long applying. The plants of this kind have Su gene, which defines resistance to herbicide; this gene was transferred to the profit hybrids of sunflowers. They are made by means of selection and crossing the lines resistant to tribenuron-methyl. Since 2003, sunflower hybrids resistant to herbicides contained tribenuron-methyl derived from sulfonylureas are widely applied in the world. Genetic resistance of hybrids to this herbicide allows this herbicide applying from 2 to 8 leaves at the early stages of weeds growing. The author points out the following advantages of this technology: a) high effectiveness against the most hazardous monocotyledonous weeds; b) no limits in applying and influence on succeeding species in crop rotation. Applying of herbicide doesn't depend on precipitation amount. It is fostered by inhibiting the ALS inhibitor enzyme, i.e. reducing the enzyme function which participates in synthesis of some aminoacids and freezing the protein synthesis. The experiment shows, that donated sunflowers are totally resistant to sulfonylureas herbicide Express 75 g. v.; the researchers controlled resistance to tribenuron-methyl while crossing these materials with selection lines in F_1 u F_2 by one dominant gene. The author receives lines, which are sterility-fixing agents of sunflower resistant to sulfonylureas herbicides.