

1.4. Конспект лекций

1.4.1. Введение. Значение генетических методов в селекции растений

Вопросы.

1. Основные приоритеты современной селекции.
2. Роль генетических методов в получении требуемых форм растений.
3. Решение селекционным путем основных проблем сельского хозяйства.

1. Основные приоритеты современной селекции.

В начале наступившего тысячелетия, по заключению многих экспертов, население Земного шара столкнется с неизбежно возрастающей потребностью увеличения сельскохозяйственного производства. Связано это, в первую очередь, с тем, что уже к 2050 году популяция человечества, как ожидается, увеличится до 9–10 миллиардов человек. Это соответствует практически 50%-процентному увеличению численности населения Земли, по отношению к уровню народонаселения, составлявшему к середине девяностых годов прошлого столетия 5,7 миллиардов человек. Ранее человечество регулировало увеличение продуктивности сельского хозяйства путем комбинирования и улучшения как генетических свойств возделываемых культур, так и посредством больших вложений в затраты на использование удобрений, ядохимикатов, воды, а также за счет расширения площадей пахотных земель. С истощением запасов пресной воды и нефти (на использовании последней базируется производство удобрений и ядохимикатов), а также с возрастанием проблем, связанных с загрязнением сельскохозяйственных угодий, человечество уже сегодня сталкивается с необходимостью не только увеличения, но и в некоторых случаях просто поддержания нынешнего уровня сельскохозяйственного производства. Значительное количество обрабатываемых земель приносится в жертву все возрастающей урбанизации и маловероятно, что в будущем появятся новые земли, на которых будет производиться выращивание сельскохозяйственной продукции. Это означает, что, на сегодня, улучшение генетических свойств возделываемых культур остается наиболее перспективным, а главное — способным не только существовать, но и развиваться подходом, с помощью которого производство пищевых и других необходимых человечеству продуктов сельского хозяйства, может коррелировать с ожидаемой скоростью роста увеличения численности человеческой популяции. Совершенно очевидно, что для достижения ощутимых результатов в этой области необходимо использовать изобилие генетической изменчивости и богатство разнообразия, присутствующие в природе, и помещенное человечеством в хранилища Генных Банков семян. До сих пор человечество на сравнительно скромном уровне использовало эти ресурсы для улучшения свойств и признаков возделываемых растений.

Существует три важных следствия, к которым привел процесс одомашнивания, поскольку при реализации процесса окультуривания дикорастущего биоразнообразия человек

- не просто сажал семена и выращивал растения, а вмешивался в процесс естественного отбора. Фактически он перемещал семена и растения из их естественного местообитания и произрастания и выращивал их в местах, к которым они не вполне были приспособлены или адаптированы;
- устранил определенное давление естественного отбора посредством выращивания растений на возделываемых полях;
- применил искусственное селекционное давление посредством отбора признаков, которые не были бы необходимы растениям, если бы они по-прежнему произрастали в естественной среде обитания.

Культивирование одомашненных растений создало дополнительное селекционное давление, которое привело к изменению частот аллелей, грациям внутри и между видами, фиксации основных генов и усовершенствованию количественных признаков. К концу 18-го века неформализованный процесс селекции, осуществлявшийся крестьянами, привел к

повсеместному созданию тысяч примитивных форм и местных сортов у каждого из основных сельскохозяйственных видов растений.

На сегодняшний день сельское хозяйство характеризуется резким сокращением разнообразия возделываемых культур. Из примерно 30 000 видов пригодных в пищу растений, всего 30 «кормят» мир, из них три основные культуры: пшеница (*Triticum aestivum*), кукуруза (*Zea mays*) и рис (*Oryza sativa*) (FAO, 2010). В дополнение к уменьшению межвидового разнообразия сельскохозяйственных культур, селекция растений привнесла сужение сортового и внутривидового разнообразия посредством создания адаптированных селекционных популяций, отбором «лучших» генотипов, получением генетически гомогенных сортов и продвижением нескольких широко адаптированных разновидностей.

В целом, как следует из накопленных к сегодняшнему дню данных, потеря меж- и внутривидового разнообразия среди возделываемых видов растений может приводить:

- к эпидемиям, вызванным вредителями и заболеваниями (генетическая уязвимость). Таких, например, как *P. infestans* у картофеля (*Solanum tuberosum*) в Ирландии в 1845–1850 гг., или бедствие, обусловленное *Bipolaris maydis* у T-цитоплазменной кукурузы в США в 1970 г. и эпидемия *Fusarium graminearum* у пшеницы и ячменя в западных штатах США (1994–1996);

- к потерям адаптации к усиливающим свое воздействие абиотическим стрессорам, таким как засуха и высокие концентрации озона;

- к потерям генетической изменчивости у характерных признаков качества, например, качество сахаров у кукурузы, состава жирных кислот или мужской стерильности у масличного рапса (*Brassica napus*).

Как подчеркивается ФАО в Глобальном плане действий по сохранению и устойчивому использованию генетических ресурсов растений (ГРР), более эффективное использование генетического разнообразия ГРР, является необходимым условием для дальнейшего развития, продовольственной безопасности и ослабления бедности.

В этой связи перед селекционерами были поставлены следующие стратегические задачи:

- получить сорта, которые были бы специфично адаптированы к маргинальным и стрессовым условиям окружающей среды;

- обеспечить гарантированное устойчивое производство и выработку сельскохозяйственной продукции (перспективных линий, сортов) в высокоурожайных условиях окружающей среды посредством достижения лучшего соотношения «вложение/выход», например, благодаря уменьшению применения агрохимикатов и увеличения эффективности потребления минеральных питательных веществ и воды;

- налаживание производства индустриально востребованных и фармацевтически значимых видов растений как альтернативы для сельхозпроизводителей, выращивающих традиционные сельскохозяйственные культуры.

2. Роль генетических методов в получении требуемых форм растений.

Последние открытия, сделанные при исследовании растительных геномов, показывают, что в Генных Банках семян содержится огромный, поистине неисчерпаемый потенциал генетического разнообразия, наиболее полный доступ к которому может быть открыт, и наиболее планомерное использование которого, на сегодня, возможно только за счет сдвига практической реализации парадигмы «поиск по фенотипу» в сторону поиска основных или ключевых генов (локусов количественных признаков) с помощью современных молекулярно-генетических методов, а также за счет построения и использования генетических карт. В то же время необходимо заметить, что все современные молекулярно-генетические методы идентификации, выделения и локализации на хромосомах (генетических картах) генов и/или локусов количественных/качественных признаков базируются на классических методах генетики и селекции идентификации по фенотипу, скрещивании, если это необходимо, подборе родительских пар и т. д. Следовательно, молекулярно-генетические методы являются ничем иным, как продолжением и логическим развитием классических методов генетики и селекции. Они призваны ускорить и упростить селекционный процесс, но они никогда не заменят собой

классические методы генетики и селекции. В то же время, получение и реализация новых фундаментальных и приоритетных прикладных данных лежит в комплементарном, т. е. взаимодополняющем использовании современных и классических методов исследований, в их прогрессивном развитии, в умении применять их, в способности понять их суть и критически оценить их реальные возможности, что, в конечном счете, позволит ускорить селекционный процесс — основной механизм получения новых сортов сельскохозяйственных растений с улучшенными агрономическими и хозяйственно значимыми признаками, в том числе, за счет применения методологий так называемой маркер-вспомогательной селекции, столь активно развиваемой в настоящее время.

Сама идея использования маркер-вспомогательной селекции восходит к двадцатым годам прошлого века (1923), когда Sax, проводя исследования на бобовых, наблюдал ассоциацию между окраской (моногенный признак) и массой (полигенный, количественно наследуемый признак) семян у *Phaseolus vulgaris* L. и пришел к заключению, что один моноген, контролирующей окраску семян, должен быть сцеплен с одним или двумя полигенами, определяющими массу семян у этого вида растений. Как результат концепция использования сцепленных генов для установления наследования генов, контролирующей другие признаки, стала реальностью. Дальнейшее свое развитие она получила в 1961 году, когда Thoday первым сделал попытку картировать и охарактеризовать все полигены, влияющие на определенный признак с помощью моногенных маркеров. Поскольку он работал с фенотипическими маркерами, то основное практическое ограничение его исследований заключалось в том, что пригодными для такой работы оказались всего несколько маркеров. В начале 1980-х гг. на смену фенотипическим маркерам, использованным Sax и Thoday, пришли изоферменты, предложенные в качестве маркеров для дискриминации различных генотипов и установления генетического сцепления сначала у томатов, а потом и у других видов растений.

Изоферментные маркеры основываются на выявлении существующего полиморфизма белков. Они являются аллельными формами ферментов и могут быть разделены методом электрофореза с последующей окраской их в гелях. Преимущества этого класса маркеров состоит в их низкой цене, технической простоте проведения анализа и их кодоминантной природе, что позволяет отличать гомо- и гетерозиготы друг от друга. Однако ограниченное число подходящих для анализа изоферментных локусов в геноме и необходимость использования образцов свежей ткани, собранных в нужную фазу развития, являлись несомненными недостатками.

С появлением молекулярно-генетических маркеров ситуация изменилась коренным образом, поскольку с их помощью генотипическую изменчивость стали оценивать на молекулярном уровне ДНК. Благодаря этому появилась возможность выявлять больше полиморфизма у различных генотипов, и селекционеры смогли впервые получить большое количество маркеров, распространенных по всему геному любого интересующего их вида растений, к тому же генетически сцепленных с желаемыми признаками и независящих от стадии специфичной экспрессии каких бы то ни было генов. С этого момента маркер-вспомогательная селекция приобрела реальные очертания. На сегодня молекулярная селекция (molecular breeding, MB) в широком смысле слова может быть определена как применение генетических манипуляций, осуществляемых на уровне молекул ДНК, с целью улучшения желаемых признаков у растений или животных, включая генетическую инженерию, маркер-вспомогательную селекцию, геномную селекцию и прочие подобного рода манипуляции. Этот термин используют для определения ряда современных селекционных стратегий, таких как: маркер-вспомогательная селекция (marker-assisted selection, MAS), маркер-вспомогательное беккроссирование (marker-assisted backcrossing, MABC), маркер-вспомогательная рекуррентная селекция (marker-assisted recurrent selection, MARS) и геномная селекция (genomic selection, GS). Все эти направления молекулярной селекции могут быть определены как применение молекулярных биотехнологий, особенно молекулярно-генетических маркеров, в комбинировании с информацией карт сцепления и геномики, для изменения и улучшения желаемых признаков у растений и животных на основе генотипического анализа. В этом смысле маркерные технологии являются не только методологиями, призванными ускорить и упростить

селекционный процесс, но и своеобразной связкой между работой кураторов коллекций по сохранению и изучению генетических ресурсов растений (ГРР) и трудом селекционеров, использующих ГРР в качестве исходного селекционного материала в своих селекционных программах.

Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости Н.И. Вавилова, синтения геномов и молекулярная гомология генов значительно увеличивают потенциал маркерных технологий при их практическом применении в целях ускорения селекционного процесса. Закон Н.И. Вавилова о гомологических рядах в наследственной изменчивости и современные молекулярно-генетические методические подходы дают исследователям уникальный шанс найти точки соприкосновения молекулярной и классической генетики и, что особенно ценно, на их основе более полно раскрыть потенциал генетической изменчивости, заключенный в зародышевой плазме генетических ресурсов растений или ином селекционно-значимом материале, сохраняемом в различного рода коллекциях ГРР, с целью его реализации в практической селекции.

Молекулярно-генетические маркеры могут применяться в различных фазах и на различных этапах селекционных программ. Например, при оптимизации сохранения генетических ресурсов или иного исходного селекционного материала, при выборе родительских пар, при идентификации желаемых аллелей, также как и при получении генотипов с этими аллелями. Некоторые из этих маркерных подходов уже стали повседневными. Анализ генетической изменчивости с целью организации отобранных генотипов в группы (популяции) или оценка уже существующих групп, проведение возвратного скрещивания на основе применения молекулярных маркеров уже довольно широко используются в большом числе как частных, так и государственных селекционных программ. Остальные подходы, где используются молекулярные маркеры, пока еще остаются не столь широко востребованными в практической селекции растений. Это, прежде всего, относится к маркерной селекции количественных признаков, для которых основные принципы анализа полигенных систем были разработаны, но экспериментальное изучение и, тем более, практическое применение полученных результатов, подходов и методов, в отечественной селекции, по сравнению с зарубежной, пока остается на относительно скромном уровне.

Проблема генетического анализа полигенных количественных признаков может быть полем деятельности для дальнейшей методической оптимизации и «наведения мостов» между классической и молекулярной генетикой и селекцией растений. Последующее влияние этих методов на генетику и практическую селекцию растений будет зависеть от результатов, которые будут получены, в частности, от выявления возможности или невозможности генотипирования особи по одному генетическому маркеру, также как и от экономической цены получаемых информативных данных. Тем не менее, молекулярные маркеры уже, несомненно, обогатили и развили целый ряд методов по управлению и использованию генотипической изменчивости, заключенной в генетическом разнообразии растений, что в самом ближайшем будущем может привести к интенсификации селекционных программ, ускорению селекционного процесса и, как следствие, к получению новых сортов с улучшенными хозяйственно значимыми показателями.

3. Решение селекционным путем основных проблем сельского хозяйства.

Изменения климата, экстремальные погодные условия, такие как засухи, аномальные температуры, неравномерное выпадение осадков негативно влияют на урожайность и качество сельскохозяйственных растений. Изменения климата ведут к распространению вредителей и болезней, что также негативно сказывается на величине урожая. Неудовлетворительное состояние сельскохозяйственных земель. Наблюдаемая деградация земель и выбывание больших площадей из сельскохозяйственного оборота связано с упадком созданных в советское время мелиоративных систем, закисления почвы, снижения темпов осушения территорий, сокращения применения минеральных и органических удобрений также сказывается на валовых сборах.

Селекция растений во все времена была и остается главным стратегическим направлением сельского хозяйства – от ее успехов зависит продовольственная безопасность государства.

Большинство сортов, характеризующихся рядом ценных свойств, не обладают комплексом биологических и хозяйственно-полезных признаков, которые в большей степени удовлетворяли бы запросы производства по своей экологической стабильности, отзывчивости на проводимые технологические приемы возделывания, устойчивости к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам окружающей среды по количеству и качеству получаемой продукции. Решение стоящих задач по любой сельскохозяйственной культуре должно быть направлено на создание более ценных сортов и гибридов по урожайности, устойчивости к полеганию, осыпанию, прорастанию на корню, к вредителям и наиболее злостным болезням, выносливости по отношению к недостатку и избытку влаги, отклонениям температурного режима от оптимального, пригодности к механизированному возделыванию, технологичности и качеству продукции при ее хранении, переработке и использовании.

1.4.2. Применение закономерностей наследования признаков при внутривидовой гибридизации в селекции растений

Вопросы.

1. Аналитическая и синтетическая селекция
2. Комбинационная и трансгрессивная селекция, новообразования.
3. Принципы подбора пар для скрещиваний
4. Типы скрещиваний
5. Этапы технологии скрещиваний и контроль за качеством скрещиваний

1. Аналитическая и синтетическая селекция.

Аналитическая селекция основана на отборе из уже существующих популяций. Таковыми являлись крестьянские сорта, из которых селекционеры в самом начале возникновения профессиональной селекции создали первые селекционные сорта. У самоопыляющихся культур это были, как правило, индивидуальные отборы, у перекрестноопыляющихся и вегетативно размножаемых (кроме многолетних) – массовые. Примеров такой селекции известно множество. Путем аналитической селекции в России вывели следующие сорта озимой пшеницы: Кооператорка, Московская 2453, Гостианум 237; отбором из Белоколоски безостой был создан сорт Ульяновка, из Высоколитовки – сорт Эритроспермум 917. Многие сорта ржи – Вятка, Лисицына, Волжанка и др. – получены на базе местных сортов, как и сорта яровой пшеницы – Лютеценс 62, Мильтурум 321, ячменя Винер, овса Московский 315, картофеля Лорх, гречихи Богатырь и др.

В настоящее время аналитическая селекция практически исчерпала свои возможности и применяется только эпизодически в форме отбора из существующих селекционных сортов в случае их популярности и с успехом применяется при селекции многолетних трав. Так, из сорта озимой пшеницы Прибой был отобран устойчивый к желтой ржавчине сорт Степняк, из сорта озимой тритикале Гармония – сорт Валентин, из сорта Стрельна 11 – Александр. Используется аналитическая селекция и у культур, с которыми селекционная работа началась сравнительно недавно, как, например, галега восточная.

Селекция, основанная на гибридизации, называется **синтетической**. В настоящее время самым распространенным методом создания популяций для отбора элитных растений является внутривидовая гибридизация. Другие методы создания популяций (отдаленная гибридизация, мутагенез, биотехнологические методы) часто предваряют внутривидовую гибридизацию. Их применяют для получения исходного материала или при создании популяций, отборы из которых используют для заключительного внутривидового скрещивания. Например, продукты отдаленной гибридизации скрещивают с образцами селекционируемой культуры, чтобы вытеснить нежелательный генетический материал другого вида.

2. Комбинационная и трансгрессивная селекция, новообразования.

Возможности рекомбиногенеза, т. е. «перетасовки» генетического материала с целью выделения наиболее желательных сочетаний, необычайно велики. Это можно продемонстрировать на примере такой хорошо изученной в генетическом отношении культуры, как горох. У этого растения семь пар хромосом. Если скрестить два сорта гороха, то в F_1 половина хромосом будет от одного, а половина – от другого родителя. Если в каждой паре хромосом имеется отличие хотя бы по одному гену (разные аллели гена), т. е. хромосомы неодинаковы, в F_2 при свободной их рекомбинации возможно 128 комбинаций. Если же представить, что имеется хотя бы пять вариантов каждой хромосомы (по комбинации аллелей) у разных сортов, то количество возможных комбинаций возрастает до 235 (34 359 738 368). На самом деле комбинаторика аллелей в хромосоме может быть во много раз больше. А если учесть и кроссинговер (который, в общем, не поддается точному количественному учету), то возможности рекомбиногенеза кажутся безграничными. Однако для селекционера представляют интерес далеко не все случаи комбинаторики, а только те, которые обуславливают хороший

хозяйственный результат. Кроме того, имеет значение и «запрет» на свободную рекомбинацию в виде ассоциации генов в блоки. Кстати, такие блоки также могут давать хороший хозяйственный эффект. Тем не менее вероятности появления различных комбинаций генов при внутривидовой гибридизации чрезвычайно высоки.

Синтетическая селекция может быть двух видов – **комбинационная** и **трансгрессивная**. Первая заключается в объединении хозяйственно полезных признаков родителей. Вторая – в увеличении или уменьшении полезного признака по сравнению с родительскими формами (положительная или отрицательная трансгрессия), например сокращение вегетационного периода.

Суть трансгрессивного расщепления, известного в генетике как расщепление при полимерии (когда контроль признака осуществляется более чем одним геном и когда вклад доминантных аллелей значительнее, чем рецессивных), можно представить в виде самой простой двухлокусной модели: $A1A1a2a2 \times a1a1A2A2$. В F_2 возможно появление положительной ($A1A1A2A2$) и отрицательной ($a1a1a2a2$) трансгрессии.

В селекционной практике оба вида селекции, как правило, не разделяют.

В результате гибридизации иногда возникают **новообразования** – свойства (признаки), которых не было ни у одного из родителей. Так, при скрещивании двух «сладких» (безалкалоидных) форм люпина может возникнуть «горькая», двух яровых форм пшеницы – озимая. Причина этого явления кроется в особенностях рекомбинации на генотипическом уровне. Например, свойство озимости–яровости у мягкой пшеницы контролируется четырьмя Vrn генами. Озимая форма возникает только тогда, когда все аллели этих локусов рецессивны. Если скрещиваются две яровые формы, из которых одна имеет рецессивные аллели в двух локусах, а вторая – в двух других, то в расщеплении может появиться растение, у которого все аллели будут только рецессивными.

В общем, разделение эффектов гибридизации на комбинативные, трансгрессивные и новообразования имеет чисто фенотипический характер: основа одна – генотипическая рекомбинация.

3. Принципы подбора пар для скрещиваний.

Самое важное в гибридизации – это подбор пар для скрещивания. Удачная гибридная комбинация во многом определяет успех селекционной работы. Поэтому важно определить, насколько ценным окажется то или иное скрещивание. Прогноз очень неточен, и этот недостаток селекционеры стараются компенсировать большим числом гибридных комбинаций в надежде на то, что какая-нибудь из них окажется результативной. В НИИСХ ЦРНЗ, например, в отдельные годы делали до 800 гибридных комбинаций ячменя и до 550 – яровой пшеницы. В СИММУТ выполняют 3-5 тыс. гибридных комбинаций пшеницы в течение года.

Подбирая родительские пары, селекционер руководствуется определенными принципами. Существуют два всеобъемлющих принципа подбора пар для скрещивания:

- по взаимному дополнению;
- по генетической дивергенции.

Остальные, даже имеющие фундаментальное значение, вытекают из них.

Принцип взаимного дополнения означает взаимную компенсацию недостатков одного родителя достоинствами другого. Например, одна из форм пшеницы обладает высокой урожайностью, устойчивостью к полеганию, к бурой ржавчине, но невысокими хлебопекарными качествами, восприимчива к мучнистой росе, слишком позднеспелая. Ее целесообразно скрестить с образцом, устойчивым к мучнистой росе, хотя и обладающим средней урожайностью, не самой высокой устойчивостью к полеганию и бурой ржавчине, более скороспелым.

Данный принцип имеет обратную сторону, которая формулируется как подбор по наименьшему количеству отрицательных признаков. Это означает, что надежда на удачную

рекомбинацию в случае, если родители имеют много отрицательных признаков, хотя бы и взаимно компенсирующихся, едва ли осуществится. Гораздо лучше, если у обоих родителей часть признаков имеет одинаково высокий уровень или хотя бы у одного – средний. Знаменитый селекционер П. П. Лукьяненко считал, что при селекции на устойчивость к ржавчине один из родителей должен обладать полной устойчивостью к заболеванию, а другой – хотя бы средней.

Если известна генетика признака, то принцип подбора пар по взаимному дополнению основывается и на этой информации, выводя тем самым данный метод для скрещивания на более высокий уровень.

Известный сербский селекционер С. Борович выделял три концепции подбора родительских пар:

- сорта, когда скрещивается в различных комбинациях большое количество сортов, характеристики которых неизвестны;
- признака, когда признаки исходного материала известны и задача заключается в том, чтобы их рекомбинировать наилучшим образом;
- гена, когда подбор ведется на основании генотипического контроля признака, что означает более высокий уровень изученности исходного материала.

Собственно, концепция сорта несколько выпадает из проблемы подбора пар, здесь ставка на то, что вероятность удачной комбинации возрастает при увеличении их числа. Вторая и третья концепции равнозначны принципам подбора пар по взаимному дополнению и генетической дивергенции.

Планируя объединение хозяйственно ценных свойств родительских форм, селекционер отдает себе отчет, что свойства и признаки, как правило, связаны корреляционными зависимостями, в том числе и отрицательными. Так, высокая урожайность плохо совмещается со скороспелостью, высоким содержанием белка в зерне, устойчивостью к засухе. Но всегда можно надеяться на частичное преодоление таких корреляций.

Подбор пар для скрещивания по генетической дивергенции означает скрещивание форм, генетически отдаленных (но принадлежащих одному виду). Большие различия в генотипах создают больше возможностей для рекомбинации, чем в случае мало различающихся генотипов. Это предполагает большую вероятность объединения хозяйственно ценных свойств родителей. Кроме того, появляется больше возможностей для получения трансгрессий, поскольку у генетически отдаленных форм больше вероятности, что в одних и тех же локусах, отвечающих за количественный признак, окажутся различные аллели.

Насколько генетически отличаются родительские формы, возможно установить, проведя анализ их родословных или путевой анализ. Можно также ориентироваться по происхождению образцов. Если они из различных эколого-географических регионов, много шансов, что их генотипы сильно различаются.

Рассматриваемые принципы подбора пар не противоречат, а взаимно дополняют друг друга и в практической селекции не всегда могут быть разделены. Генетическая отдаленность сопровождается различиями в фенотипах, а последнее, в свою очередь, указывает на генетическую отдаленность.

Выше говорилось о том, что другие принципы подбора пар вытекают из двух, только что изложенных. Почти все они представляют собой частные случаи фенотипической комбинаторики. Например, объединением более коротких (по сравнению с другими) межфазных периодов вегетации от разных родителей пытаются добиться в гибридах большей скороспелости. Объединением наиболее высоких показателей элементов структуры урожайности – добиться увеличения урожайности (например, объединение крупного зерна у одного из родителей с большим числом зерен в колосе у другого – подбор по элементам структуры урожая по В. Е. Писареву). Все эти частные случаи имеют тот недостаток, что они не учитывают значения отрицательных корреляций признаков, о чем уже сказано выше. Так, крупность зерна связана отрицательной корреляцией с числом зерен из-за ограниченной возможности растения создавать питательную базу: если в колосе пшеницы формируется большое число зерен, то они будут

мелкими.

К частным случаям относится и подбор пар с целью объединить гены, отвечающие за один признак. Его часто применяют, например, в селекции на устойчивость к болезням. Объединяют два и более генов, отвечающих за так называемую расоспецифическую устойчивость к болезни. Если один ген защищает сорт от одной расы, а другой – от другой, то защита будет более надежной. Или объединяют расоспецифическую устойчивость (называемую вертикальной) с нерасоспецифической, определяемой многими малыми генами (горизонтальная устойчивость), в тех же целях.

Фундаментальное значение имеет подбор пар по эколого-географическому принципу, в известной мере объединяющего элементы принципа подбора по взаимному дополнению и по генетической дивергенции. Выше говорилось о том, что эколого-географическая отдаленность свидетельствует и о генетической дивергенции, последняя же – о различиях по хозяйственно ценным признакам. Под подбором по эколого-географическому принципу обычно понимают скрещивание местных форм, адаптированных к условиям данного региона, и форм инорайонного происхождения, привлекаемых в скрещивание ради свойств, которые у местного материала отсутствуют. Но это может быть скрещивание и форм, не принадлежащих данному региону, а взятых из других местностей, однако требование адаптивности одного из родителей остается в силе. И. В. Мичурин брал для гибридизации формы из мест с суровым климатом в надежде, что они привнесут в гибрид зимостойкость, достаточную для благополучной перезимовки в Черноземье, и южные сорта с высокими потребительскими качествами. Так, при выведении сорта груши Бере зимняя Мичурина были скрещены уссурийская груша и сорт из Франции Бере рояль.

Подбор пар по принципу эколого-географической отдаленности применяли многие выдающиеся селекционеры. П. П. Лукьяненко использовал озимые пшеницы Кубани в качестве местной экологической основы, привлекая в качестве второго родителя инорайонные сорта, главным образом за устойчивость к различным видам ржавчины.

Существуют также генетико-статистические методы подбора пар для скрещивания, которые на первый взгляд способны давать более точный прогноз успешности гибридных комбинаций, чем простое изучение фенотипа образцов исходного материала. Но у них есть существенный недостаток – нетехнологичность.

Самый известный из указанных методов – диаллельный анализ. Он проводится путем скрещивания всех изучаемых образцов по принципу «каждый с каждым». Количество гибридных комбинаций при этом составляет $n \times (n - 1)$. Если не менять скрещиваемые образцы местами, т. е. не использовать их и в качестве матери, и в качестве отца, что дает гибриды с одним и тем же ядерным материалом, но с разной цитоплазмой, то количество гибридных комбинаций уменьшится вдвое. Тем не менее при большом числе образцов это непосильная работа: например, если имеется 100 образцов, необходимо будет выполнить 4950 комбинаций. Далее требуется оценить первое гибридное поколение по интересующим селекционера признаков, т. е. заложить специальный опыт с повторениями. В результате будет получена оценка общей комбинационной способности (ОКС), и ее можно трактовать как уровень признака (например, продуктивности растения), который в среднем имеют все гибриды данного образца. ОКС сорта свидетельствует об особенностях его полигенной системы, контролирующей признак, – она сочетается с полигенными системами других образцов в соответствии с упомянутым выше полимерным наследованием. Высокая ОКС говорит о селекционной ценности образца в качестве родительской формы. Соответственно два таких образца представляют собой перспективную гибридную комбинацию.

Таким образом, метод очень трудоемок. Кроме того, из выполненных гибридных комбинаций можно использовать для дальнейшей работы только те, у которых высокая ОКС родителей, а семена остальных будут забракованы. Поэтому оказывается более выгодным использовать менее информативные способы подбора пар, при которых ценность гибридных комбинаций устанавливается попутно в процессе браковки потомств отобранных из них растений в оценочных питомниках селекционного процесса, и добиваться успеха за счет

большого числа гибридных комбинаций. Постоянный анализ числа и ценности потомств элитных растений, отобранных из гибридных популяций, позволяет выявлять наиболее ценные родительские формы и использовать их для новых скрещиваний, а иногда даже для повторения уже полученных однажды гибридных комбинаций в большем объеме.

Диаллельный анализ может быть применен для исследовательских работ и, возможно, для оценки узкого круга образцов, если есть основания считать, что среди них окажутся наиболее перспективные для гибридизации. Этот метод используется также при селекции гетерозисных гибридов.

4. Типы скрещиваний.

В селекции используют два типа скрещиваний: простые и сложные. Простые или парные скрещивания – это скрещивания двух родительских форм, сложные – скрещивания более двух родительских форм (разумеется, не одновременно) или повторные скрещивания с одним из родителей.

Простые скрещивания бывают **прямыми** и **обратными**. Используя буквенные символы родительских форм, их можно записать следующим образом: $A \times B$ и $B \times A$. Первая буква в формуле скрещивания означает материнскую форму, вторая – отцовскую. Первое скрещивание – прямое, второе – обратное. Но ничто не мешает считать второе скрещивание прямым, а первое – обратным, нужно только при записи поменять их местами.

Система прямого и обратного скрещивания носит название **реципрокного скрещивания**. И прямой, и обратный гибрид будут иметь одинаковый ядерный (хромосомный) материал, но отличаться цитоплазмой, поскольку та наследуется только по материнской линии.

В селекции реципрокное скрещивание применяется редко, поскольку селекционер заранее определяет, какую цитоплазму он хочет иметь в гибриде. Обычно отдают предпочтение местной форме, поскольку считается, что адаптивность к почвенно-климатическим условиям в какой-то степени контролируется плазмогенами.

Кроме того, от выбора той или иной формы в качестве материнской или отцовской иногда зависит сам успех скрещивания. Это часто наблюдается при отдаленных скрещиваниях, но может иметь место и при внутривидовых. Например, важно, какая родительская форма будет выступать в качестве материнской, а какая – в качестве отцовской, если они цветут не одновременно. Обычно форму, цветущую позднее, используют в качестве отцовской: яйцеклетки дольше сохраняют способность к оплодотворению, чем спермии. Реципрокное скрещивание может быть применено, если неизвестно, какое из скрещиваний – прямое или обратное – обеспечит большее завязывание гибридных семян, а есть основания считать, что они в этом отношении неравнозначны. Или хотят, чтобы в гибридной популяции присутствовали генотипы и с той, и с другой цитоплазмой. Простые скрещивания могут складываться в системы скрещиваний, например такую, как описанная выше система диаллельного скрещивания.

Среди сложных скрещиваний различают ступенчатые, возвратные, насыщающие (поглощительные) и конвергентные.

Задача **ступенчатого скрещивания** заключается в том, чтобы объединить полезные признаки и свойства, присущие различным родительским формам, в один гибрид путем последовательного скрещивания гибридов между собой или с другими родительскими формами. В качестве примера можно привести ряд формул скрещивания:

$$(A \times B) \times C; (A \times B) \times (C \times D); \{(A \times B) \times (C \times D)\} \times E.$$

Нужно иметь в виду возможное неравенство вкладов родительских форм в конечный результат. Так, в первой формуле сорт C привнесет в гибрид 50% ядерного материала, а сорта A и B – только по 25%. Здесь на последнем этапе целесообразно использовать наиболее ценный сорт.

Существуют два варианта проведения ступенчатых скрещиваний:

- скрещивают первые гибридные поколения – так называемые межгибридные скрещивания;

- получение второго или более поздних поколений, отбор рекомбинантов, ради которых скрещивание было проведено (сочетающих те признаки родителей, которые было намечено объединить), а затем дальнейшие скрещивания.

Оба варианта имеют достоинства и недостатки, которые отметим в предлагаемой ниже модели.

Поставлена цель объединить в одном генотипе доминантные аллели, которыми обладают четыре формы: AAbbccdd, aaBBccdd, aabbCCdd и aabbccDD, с целью отобрать в гибридной популяции генотип AABVCCDD.

В первом случае выполним эту задачу посредством ступенчатых скрещиваний.

1-й год Первые скрещивания:

(AAbbccdd × aaBBccdd) и (aabbCCdd × aabbccDD).

2-й год Выращивание

F₁: AaBbccdd aabbCcDd.

3-й год Отбор нужных генотипов в F₂:

AABVccdd и aabbCCDD.

Каждый из них встречается как 1/16 (расщепление при дигибридном скрещивании).

4-й год Второе скрещивание:

AABVccdd × aabbCCDD.

5-й год Выращивание F₁: AaBbCcDd

6-й год

Отбор нужных генотипов в F₂: AABVCCDD.

Теоретическая встречаемость генотипа AABVCCDD в популяции равна 1/256.

Таким образом, работа может быть выполнена за шесть поколений с минимальной частотой встречаемости нужного генотипа не менее 1/256.

Выполним ту же задачу посредством межгибридных скрещиваний.

1-й год. Первые скрещивания:

(AAbbccdd × aaBBccdd) и (aabbCCdd × aabbccDD).

2-й год

Второе скрещивание:

Выращивание F₁:

AaBbccdd × aabbCcDd.

3-й год

AaBbCcDd.

Кроме указанного, в F₁ будут и другие генотипы. Встречаемость генотипа AaBbCcDd в популяции 1/16, так как гаметы ABcd и abCD родителей составляют

1/4 всего набора гамет ($1/4 \times 1/4 = 1/16$).

4-й год Отбор нужных генотипов в F₂:

AABVCCDD.

Теоретическая встречаемость генотипа AABVCCDD в популяции F₂ составит 1/16 (встречаемость генотипа AaBbCcDd в F₁) × 1/256 (встречаемость генотипа AABVCCDD в F₂ от расщепления AaBbCcDd). Следовательно, встречаемость искомого генотипа в популяции $1/16 \times 1/256 = 1/4096$.

В этой модели есть одна условность: можно заранее при ступенчатых скрещиваниях извлечь из популяции на третий год работы генотип AaBbCcDd и на четвертый год работы иметь дело только с расщеплением этого генотипа, а не со всей популяцией. И тогда искомым генотип будет выщепляться в отношении 1/256, как и в первом варианте. Но это – модель. В реальной селекции при полигенном наследовании выделить заранее генотип, который даст необходимое расщепление, невозможно или очень трудно. Таким образом, вариант межгибридных скрещиваний дает возможность завершить работу за четыре года, но зато селекционер столкнется

с большими трудностями при отборе из-за редкой встречаемости ценных рекомбинантов. При использовании ступенчатых скрещиваний работу придется вести на два года дольше, но отбор может быть более успешным. Последнее обстоятельство объясняет, почему селекционеры так редко прибегают к межгибридным скрещиваниям, несмотря на, казалось бы, очевидную возможность ускорить работу. Хотя такие примеры есть. Так, сорт озимой пшеницы Безостая 2 получен от скрещивания F_1 (Нойцухт \times Безостая 4) \times Безостая 1; сорт ячменя Степовый – F_1 (Одесский 14 \times Одесский 9) \times Уманский.

В настоящее время подавляющее число сортов сельскохозяйственных культур создано методом ступенчатой гибридизации. Однако часто разные этапы скрещиваний проводились в разное время в разных селекционных учреждениях. Поэтому ступенчатыми скрещиваниями следует считать скрещивания, выполненные в каком-либо конкретном селекционном учреждении в рамках единой селекционной программы.

Скрещивания, выполненные на сортах, уже используемых в производстве, а то и выведенных в разных учреждениях и даже в разных странах, ступенчатыми скрещиваниями называть нецелесообразно. Ведь работали разные селекционеры по разным программам без какой-либо преемственности. В этих случаях следует говорить о родословных сортах. Каждый сорт культуры, селекция которой началась достаточно давно, часто имеет в своей родословной несколько сортов и, если считать каждое скрещивание «ступенькой», простых скрещиваний в селекции вообще не останется.

Когда возникает необходимость увеличить в гибриде долю наследственного материала одного из родителей, прибегают к **возвратному скрещиванию** или **беккросу**.

Возвратное скрещивание заключается в скрещивании гибрида с одним из родителей, с тем, свойства которого в гибриде хотят усилить: $(A \times B) \times A$ или $(A \times B) \times B$. Если хотят иметь в гибриде и цитоплазму B, то первое скрещивание – $B \times A$.

Примером использования возвратных скрещиваний могут служить родословные сортов озимой пшеницы:

- Краснодарская 46 — F_1 (Безостая 1 \times Одесская 16) \times Безостая 1.
- Обрий – F_1 (Red River 68 \times Одесская 51) \times Одесская 51.

Самоопыление полученных растений,
их полинейный посев, отбор и
объединение гомозиготных линий.

P (улучшаемый сорт, рекуррентный родитель), D (донор)

1-е скрещивание:	$P \times D = PD$	(50% от P)
1-й беккросс	$BC1 : PD \times P = P^2D$	(75% от P)
2-й беккросс	$BC2 : P^2D \times P = P^3D$	(87,5% от P)
.....		
• 6-й беккросс	$BC6 : P^6D \times P = P^7D$	(99,2% от P)

Схема насыщающего скрещивания

Если необходимо от одного из родителей передать только один ген, используют **насыщающие скрещивания**. Они представляют собой систему беккроссов, в которых сорт, получающий ген, все время повторяется, а сорт, из которого ген берется, участвует только в первом скрещивании, которое беккроссом не является. Первый сорт называют рекуррентом (от *англ. recurre* – повторяться), второй – донором.

Здесь цитоплазма гибрида берется от рекуррентного сорта, что чаще всего бывает, но можно взять ее и от донора, используя донор в первом скрещивании в качестве материнской формы. Суть последовательных беккроссов в том, что ядерный материал донора постепенно заменяется на материал рекуррента, но при этом все время нужно следить за тем, чтобы ген донора, который передается рекурренту, оставался. Доля ядерного материала рекуррента после каждого скрещивания возрастает. Эта доля взята из расчета, что ядерный материал родителей после каждого скрещивания в популяции будет представлен поровну, хотя на самом деле могут

быть существенные отклонения, связанные со случайным распределением хромосом в мейозе и отбором для следующего скрещивания только тех растений гибрида (да и то не всех), которые содержат передаваемый ген. Считают, что шесть беккроссов достаточно, чтобы вытеснить ядерный материал донора. Показатель степени при символе рекуррентного сорта указывает номер скрещивания (он будет больше на один номер беккросса) и показывает увеличение доли ядерного материала рекуррента. По нему можно судить и о доле рекуррента, и о доле донора после каждого скрещивания по формулам: $P=1-0,5^n$; $D=0,5^n$.

Завершение насыщающего скрещивания, а также некоторые особенности беккроссирования зависят от того, какой аллель, доминантный или рецессивный, вводится в рекуррентный сорт. При введении доминантного аллеля ведут непрерывное беккроссирование, поскольку после каждого скрещивания растения, в генотипе которых присутствует этот аллель и которые нужно повторно беккроссировать, можно идентифицировать. Например, если вводится доминантный аллель гена устойчивости к болезни, обуславливающий иммунитет, присутствие его легко обнаруживается при посеве на инфекционном фоне. После заключительного беккроссирования получают популяцию гомозиготных рецессивов и гетерозигот. Гетерозиготы подвергают самоопылению с тем, чтобы получить доминантные гомозиготы. Они по фенотипу не отличимы от гетерозигот. Приходится потомство каждого растения на следующий год высевать отдельно. Те потомства, которые не дадут расщепления, и будут конечным продуктом насыщающего скрещивания. Их можно объединить.

Если вводится рецессивный аллель, то после первого беккросса в популяции будут гомозиготные доминантные и гетерозиготные генотипы. Фенотипически они неразличимы. Придется провести самоопыление и в потомстве от него взять для беккроссирования гомозиготные рецессивы. В дальнейшем самоопыление придется проводить через два беккросса. Зато после последнего самоопыления сразу выявятся гомозиготные рецессивы как конечный продукт насыщения.

Если беккроссирование чередуется с самоопылением, говорят о прерывающемся беккроссировании. В итоге на введение рецессивного аллеля придется затратить 11 лет, на введение доминантного – 9. Это слишком долго, поэтому насыщающие скрещивания требуют работы в закрытом грунте, чтобы получать в течение года 3-4 поколения.

Прерывать беккроссирование при введении рецессивного аллеля можно и реже, чем через 2 беккросса. Но тогда придется вести третий беккросс «вслепую», т. е. опылять такое количество растений, чтобы между ними с высокой вероятностью были и необходимые гетерозиготные генотипы. Естественно, что и популяция после такого беккросса должна быть обширной, чтобы при самоопылении в ней обнаружили рецессивные гомозиготы. Можно ограничиться меньшим, чем указано выше, числом беккроссов, если удастся быстрее освободиться от ядерного материала донора (напомним, что доли ядерного материала рекуррента рассчитаны из предположения о точном делении поровну ядерного материала родителей в потомстве после каждого скрещивания, а на самом деле возможны значительные отклонения). Этого можно достигнуть, применив параллельно с беккроссированием отбор на фенотип рекуррентного родителя. Кроме того, беккроссирование прекращают раньше, если нет необходимости полностью освободиться от ядерного материала донора, поскольку некоторые его свойства и признаки, помимо специально передаваемого, желательно передать гибриду. Тогда говорят о неполном беккроссировании. Но в этом случае необходим специальный отбор на указанные признаки.

Ввести от донора один аллель в рекуррентный сорт путем насыщающих скрещиваний, по-видимому, невозможно из-за сцепления генов на хромосоме. Вводится группа генов, что может иметь как положительные, так и отрицательные последствия. Если один из этих генов контролирует нежелательный признак, а сцепление тесное, то вся работа, возможно, обречена на неудачу. Известен случай, когда при введении гена устойчивости к бурой ржавчине Lr9 в сорт яровой пшеницы Саратовская 29 даже после 15 беккроссов (считая все беккроссирование при передаче гена от сорта к сорту) не удалось освободиться от коричневатого цвета муки, связанного

с этим геном. Первоначально донором выступала форма Трансфер, из которой ген попал в сорт Чайниз спринг, затем в сорт Тетчер (США) и уже из этого сорта – в сорт Саратовская 29.

Сцепление гена, который намериваются ввести в рекуррентный сорт с другим геном, может оказаться полезным, если этот другой ген можно использовать в качестве маркера. Тогда его присутствие в продуктах беккрасса будет указывать и на наличие передаваемого в рекуррентный сорт гена, который фенотипически может не проявляться явно. Например, при передаче гена высокого содержания лизина в белке у ячменя использовали его сцепление с геном (аллелем), контролирующим войлочную (коротковолосистую или вообще без опушения) щетинку при основании зерна (рудимент второго цветка в колоске). Контролировать присутствие этого аллеля, конечно, гораздо проще, чем содержание лизина в белке. К сожалению, сцепление недостаточно тесное, и маркер может указывать на низколизиновые формы. Однако можно очертить круг растений, среди которых должны присутствовать высоколизиновые формы, а затем уже прибегать к прямому анализу содержания лизина.

С помощью насыщающих скрещиваний вводят, как правило, один ген. Одновременное введение двух несцепленных генов от одного донора представляет более сложную задачу, поскольку приходится увеличивать объем популяций, чтобы в расщеплении обнаруживались генотипы, содержащие оба вводимых аллеля. Да и такие доноры редки. Введение трех и более генов одновременно практически невозможно.

Поскольку генетические формулы скрещивания при введении определенного аллеля просты, а расщепление подчиняется законам Менделя, всегда есть возможность расчетным путем определить объем популяций, достаточный для того, чтобы в них оказались требуемые генотипы.

Насыщающие скрещивания проводят, как правило, у самоопыляющихся культур. У перекрестноопыляющихся возникают дополнительные сложности: необходимо увеличивать объем скрещиваний, чтобы разнообразить генотипы, вовлекаемые в гибридизацию, что позволяет избежать инбредной депрессии.

Сложно проводить этот вид гибридизации у двулетних и, тем более, многолетних культур из-за длительности временного промежутка между поколениями. Тем не менее известна работа американских селекционеров по введению гена устойчивости к парше яблони от дикого вида *Malus floribunda* в генотип культурной яблони. Правда, сделано было всего четыре беккрасса.

Путем насыщающих скрещиваний можно передать рекуррентному сорту любой моногенный (в крайнем случае – дигенный) признак. При этом, конечно, приходится считаться с плейотропным действием гена, которое может оказаться неприемлемым. Часто трудность заключается в распознавании требуемых генотипов. Так, отмечены случаи «потери» гена высоколизиновости у ячменя при попытке передать его в низколизиновые сорта. Правда, тут может быть и другая причина: в новой генотипической среде ген перестает экспрессироваться. Насыщающие скрещивания часто использовались для передачи генов низкостебельности у злаков, признака «тенакс» (неосыпаемости семян, связанной с гипертрофией семяножки) у гороха, передачи генов устойчивости к болезням и вредителям у кукурузы.

На использовании насыщающих скрещиваний основано создание многолинейных сортов – это смесь линий, полученных на основе одного рекуррентного сорта путем насыщающих скрещиваний с разными донорами, обладающими генами устойчивости к различным расам патогена. Многолинейный сорт лучше противостоит эпифитотии за счет того, что большая часть спор, попав на растения, устойчивые к расам, представленным этими спорами линий, пропадает.

Если в сорт нужно ввести два или больше генов от разных доноров, прибегают к **конвергентным скрещиваниям** – это параллельные насыщающие скрещивания, в каждом из которых используется один и тот же рекуррентный сорт, но разные доноры. В результате получают изогенные линии, различающиеся генами, введенными от доноров. Следующий этап заключается в скрещивании этих изогенных линий с целью объединить гены от разных доноров в одном образце.

5. Этапы технологии скрещиваний и контроль за качеством скрещиваний.

Технология скрещивания складывается из трех этапов: подготовки соцветий и цветков к скрещиванию, удаления мужских элементов, пыльников (кастрация), опыления. Не всегда в зависимости от особенностей той или иной культуры присутствуют все три этапа: первый или второй или оба вместе могут отсутствовать.

Техническая работа по гибридизации основывается на знании биологии цветения и оплодотворения сельскохозяйственных культуррастений, способов их размножения. Селекционное значение хазмогамии и клейстогамии сводится к возможности или невозможности свободного опыления кастрированных колосьев. Однако среди основных культурных растений невозможно указать строго клейстогамные формы. У пшеницы, например, клейстогамными являются верхние цветки колосков, которые при подготовке колоса к гибридизации уничтожаются. Гейтеногамия отчетливо может наблюдаться у однодомных раздельнополых растений (тыквенные).

Подготовка соцветий или цветков материнских растений к гибридизации заключается в выборе хорошо развитых растений с соцветиями и цветками, имеющими зеленые, еще незрелые пыльники. У пшеницы, ржи, например, удаляют слабые колоски, срезая верхнюю часть колоса и 2-4 нижних колоска, а в оставшихся колосках – третий и цветки более высокого порядка, у многорядного ячменя – верхние, нижние и боковые колоски, у льна – мелкие цветки в соцветии.

Для предотвращения самоопыления используются многочисленные механизмы. У двудомных растений (конопля, спаржа, клубника) удаляются мужские экземпляры из рядов материнской формы.

У гетеростильных культур, например гречихи, имеются два вида растений: с длинными пестиками и короткими тычинками и с короткими пестиками и длинными тычинками. От переопыления растений разных видов их семена завязываются (лигитимное опыление), от переопыления внутри каждого вида – нет (иллигитимное опыление). В случае гетеростилии из посева материнской формы удаляются длинно- или короткопестичные растения.

У однодомных раздельнополых растений проводится кастрация – удаляются мужские цветки (тыквенные) или мужские соцветия (кукуруза).

Возможность опыления без кастрации обеспечивается за счет протерогинии (более раннего созревания пестика по сравнению с тычинками) или протерандрии (противоположное протерогинии явление). Это применяется, в частности, у картофеля. Такую же возможность дает гетеростилия, например лонгостилия (более длинные, чем тычинки, пестики у томатов). Здесь у одного и того же образца нет дизигии – мужских и женских растений.

Избежать кастрации часто позволяет явление самонесовместимости, обусловленное наличием серии аллелей самонесовместимости. В случае совпадения аллелей рыльца и пыльцы опыления не происходит.

Если не используются вышеперечисленные природные особенности и механизмы, проводят кастрацию – удаление пыльников. К этой трудоемкой операции приходится прибегать у многих культур: у зерновых злаков, зернобобовых, крупяных, льна, хлопчатника, овощных и плодовых культур.

Остроумное решение найдено для кастрации риса. У этой культуры для удаления пыльников требуются очень незначительные усилия, поэтому их отсасывают устройством, создающим вакуум.

Другая группа методов основана на меньшей чувствительности яйцеклеток к различным повреждающим агентам по сравнению с пыльцой. В качестве таких агентов используют относительно высокую температуру и специальные вещества – гаметоциды. Для кастрации сорго метелки погружают на 10 мин в воду, нагретую до температуры 44-48 °С. В качестве гаметоцида на подсолнечнике применяют гиббереллин, обрабатывая его раствором растения в период образования корзинки. Другой гаметоцид – этрел – применяют для кастрации злаков во время выхода в трубку. Идет поиск и других гаметоцидов для различных культур. Эта работа ведется, в основном, для массового получения гибридов первого поколения у злаковых культур, чтобы затем непосредственно использовать их в производстве. Химическая кастрация часто не дает

стабильных результатов. Очевидно, это зависит от условий времени года и периода обработки.

При гибридизации различают три вида опыления: свободное, ограниченно свободное и принудительное. **Свободное** не значит неконтролируемое, в селекции оно применяется редко, поскольку исключает планирование гибридных комбинаций. Речь идет о естественных способах опыления при сохранении контроля за использованием определенных отцовских форм. Его применяют, когда самоопыление материнского образца исключено в силу морфологических особенностей культуры, позволяющих легко осуществить удаление мужских растений, например у двудомной конопля. Но возможно его использование и у культур, требующих кастрации обоеполюх цветков. Примером может служить размещение площадок материнских сортов в массиве отцовского сорта при гибридизации пшеницы. При этом все побеги материнских растений, не подвергшиеся кастрации, вырезаются до цветения, а сам участок гибридизации должен быть пространственно изолирован от других образцов. У перекрестноопыляющихся культур с выраженной самонесовместимостью (клевер, люцерна, капуста) можно получить гибридные семена, высевая рядом родительские сорта. Это могут быть и самоопылители – факультативные перекрестники (просо, чечевица), но тогда необходимо, чтобы гибридные растения в F_1 отличались от негибридных.

Ограниченно свободное опыление также использует естественные механизмы опыления, но в искусственно ограниченном пространстве. Для изоляции кастрированных цветков и соцветий применяют соответственно индивидуальные или групповые изоляторы.

Для ветроопыляемых культур они должны быть плотными, поскольку пыльца у них мелкая и переносится ветром (обыкновенно применяют пергаментную бумагу), для насекомоопыляемых используют изоляторы из марли – они защищают от опылителей и в то же время позволяют сохранять для цветков оптимальную температуру и влажность воздуха. У гороха и льна просто окутывают кастрированный цветок тонким слоем ваты, а у картофеля надевают на столбик пестика отрезок овсяной (она толстая) соломы, заткнутый ваткой.

При гибридизации зерновых злаков кастрированные колосья помещают в изолятор, а когда рыльца созревают, вводят под изолятор отцовские колосья (метелки). Концы соломин отцовских колосьев помещают в емкость с водой, чтобы они преждевременно не засохли. Впрочем, в КНИИСХ, где этот метод разработан (почему и получил название «краснодарского»), теперь обходятся без воды, прямо вводя отцовские колосья в разрез верхушки изолятора.

В последние годы популярным стал твел-метод, предложенный Н. Борлаугом: пылящий колос вводят в изолятор, раскрывая его верхушку, и вращают над материнским колосом, осыпая его пыльцой.

При гибридизации клевера (перекрестник) гибридизируемые образцы помещают под большой марлевый изолятор и запускают туда шмелей (шмели должны быть освобождены от посторонней пыльцы, их предварительно моют и сушат).

Принудительное опыление осуществляется путем нанесения пыльцы отцовского образца на рыльце пестика материнского растения. Пыльцу предварительно собирают, а опыляют цветки материнского растения с помощью кисточки, кусочка ватки на лучинке, пчелиной ножки (ножка пчелы, приклеенная к лучинке) или «из цветка в цветок», вкладывая пыльники отцовского растения в цветки материнского.

Для успеха гибридизации необходимо учитывать время созревания рылец и пыльников, продолжительность периода, в течение которого пыльца сохраняет оплодотворяющую способность, а яйцеклетки – способность к оплодотворению. У разных культур эти показатели сильно различаются. Так, у пыльцы злаков оплодотворяющая способность очень быстро снижается и примерно через 6 ч уже не годится для опыления. У гороха пыльца может храниться 2-3 суток, а у черной смородины – до 1 мес. Яйцеклетки у пшеницы остаются жизнеспособными в течение примерно 6 дней после кастрации, в холодную погоду – до 10 дней.

Ситуация, когда время цветения скрещиваемых форм не совпадает, заставляет искать способы ускорения или замедления развития репродуктивных органов, а также способы их «консервации».

Самый простой способ совместить время цветения–посев в разные сроки.

Изменением продолжительности светового дня можно добиться существенного изменения наступления фазы цветения у растений длинного и короткого дня. Для этого можно использовать светонепроницаемые каркасы или досвечивание.

Чтобы получать гибриды озимых и яровых форм, последние нужно посеять заблаговременно в теплице или первые – прояровизировать.

Хранением пыльцы при пониженной температуре у некоторых культур удается поддерживать ее жизнеспособность длительное время. Так, у злаков хороших результатов добиваются, поставив колосья концами соломин в воду и поместив их в условия низкой положительной температуры (в холодильник). Велись опыты по длительному хранению пыльцы при отрицательных температурах (аналогично сперме животных). Но только у некоторых культур они дали положительные результаты (люпин и некоторые цитрусовые).

Контроль за качеством гибридизации определяется как завязываемостью семян, так и определением их гибридной природы. Последнее возможно, если отцовская форма имеет доминантный аллель, а материнская соответственно рецессивный. Тогда в посеве первого гибридного поколения нужно отбраковать те из них, которые обнаружат присутствие рецессива. Например, при гибридизации пшеницы рецессивом будут остистые, белые, не опушенные колосья. Иногда брак можно обнаружить непосредственно в первом поколении, т. е. в семенах, завязавшихся от гибридизации, используя ксенийность.

Ксенийность – это проявление признаков отцовской формы в гибридных семенах первого поколения. Но в гибридных семенах только зародыш и эндосперм имеют гибридную природу. Семенная и плодовая оболочки принадлежат материнской форме, и они могут препятствовать обнаружению ксений. Так, не удастся обнаружить у гороха ксений по окраске семян (желтых семян в сорте, имеющем зеленые семядоли), если оболочка семян непрозрачная, как это бывает у кормового гороха – пелюшки.

Источник брака при гибридизации может иметь биологическую природу, когда селекционер имеет дело с апомиксисом. При этом внешне все обстоит благополучно: семена завязываются, но без оплодотворения, т. е. это своеобразный вид вегетативного размножения (через семена). Понятно, что генетическая природа их идентична материнской форме. Но обнаружить это можно только в следующем поколении.

1.4.3. Отдаленная гибридизация и особенности формообразовательного процесса

Вопросы.

1. Значение отдаленной гибридизации
2. Виды несовместимости при отдаленной гибридизации и пути их преодоления
3. Перспективы отдаленной гибридизации

1. Значение отдаленной гибридизации.

Под отдаленной гибридизацией в селекции понимаются скрещивания, в которых в той или иной мере проявляется несовместимость родительских форм. Обычно это понятие увязывают со скрещиванием форм, принадлежащих к различным ботаническим таксонам, и различают межвидовую и межродовую гибридизацию. Но классическая ботаническая классификация построена большей частью на отчетливо выраженных морфологических признаках без учета генетических различий. Поэтому межвидовые скрещивания не всегда можно причислить к отдаленным. Например, виды пшеницы: мягкая, карликовая, шарозерная — хорошо скрещиваются между собой и дают плодовитое потомство. Это объясняется тем, что отличие этих видов друг от друга определяется всего одним геном.

Г. Д. Карпеченко предложил называть скрещивания, не обнаруживающие несовместимости вне зависимости от ботанического таксона, которому принадлежат родительские формы, конгруэнтными, а скрещивания, при которых несовместимость присутствует, инконгруэнтными.

Цитологическим признаком несовместимости является неполная гомология хромосом родителей, которая проявляется в нарушениях мейоза. Степень ее может быть различна, в зависимости от этого гибридизация в разной мере успешна.

Отдаленная гибридизация широко применяется в современной селекции, и масштабы ее применения растут. Это объясняется тем, что с ее помощью можно создавать сорта, обладающие такими ценными признаками, которые невозможно (или сложно) придать селекционному материалу с помощью внутривидовой гибридизации и других методов. Прежде всего это касается устойчивости к болезням, вредителям и неблагоприятным абиотическим факторам, в особенности устойчивости к болезням. Так была спасена культура сахарного тростника, погибавшая от вирусных болезней. Благодаря гибридизации с диким американским видом были получены устойчивые к филлоксере (корневой тле) европейские сорта винограда. С помощью отдаленной гибридизации ведется селекция вишни на устойчивость к коккомикозу, селекция пшеницы на устойчивость к различным видам ржавчины, селекция картофеля на устойчивость к нематоду, фитофторе, селекция яблони на устойчивость к парше. И это далеко не полный перечень использования рассматриваемого метода.

Первый известный науке пример отдаленного скрещивания относится к 1771 г., когда англичанин Т. Фэрчайлд скрестил два вида гвоздики. Но в больших масштабах отдаленная гибридизация впервые была применена в работах И. В. Мичурина и Л. Бербанка. Известны мичуринские сорта яблонь — Бельфлер красный, Бельфлер-рекорд, Яхонтовый, — в родословных которых присутствует яблоня Недзведцкого *Malus niedzwetzkyana*. Она имеет красные цветки и красномясые плоды и этот признак передает гибридам, что, собственно, и привлекало Мичурина. Он широко использовал гибриды с Китайкой (сливолистная яблоня — *M. prunifolia* Vorkh). От такого скрещивания получены сорта Бельфлер-китайка, Кандиль-китайка, Кальвиль-китайка и др. Использовал Мичурин и ягодную яблоню *M. vaccata* В. с ее участием выведен сорт Таежная.

Скрещивания степной вишни (*Prunus chamaecerasus* Jacq) с японской черемухой Маака (*Padus Maackii* Rupr) дало ряд сортов церападусов (использовал Мичурин для получения церападусов и виргинскую черемуху).

Широко применял отдаленную гибридизацию видный американский селекционер Лютер Бербанк. Известны его гибриды лимона с апельсином, сливы с абрикосом и др.

В селекции полевых культур нужно отметить гибриды мягкой пшеницы с твердой, мягкой пшеницы с полбой, полученные в США и Канаде, гибриды мягкой пшеницы и пырея, мягкой пшеницы и эгилопса.

В настоящее время отдаленная гибридизация используется во многих селекционных программах и имеет тенденцию к расширению применения. Это диктуется прежде всего необходимостью вовлечения в селекцию новых генов. Поэтому в мире широко практикуется получение методом отдаленной гибридизации новых доноров, отличающихся устойчивостью к ряду заболеваний и высоким качеством продукции.

2. Виды несовместимости при отдаленной гибридизации и пути их преодоления.

Несовместимость при отдаленной гибридизации проявляется в различных формах на разных этапах получения гибридов и в гибридных поколениях: нескрещиваемость, гибель зародыша на ранних этапах его развития, невсхожесть семян, гибель растений F_1 , стерильность гибридов F_1 , расщепление в последующих поколениях, далекое от менделевского, сопровождающееся гибелью части растений. Нескрещиваемость может происходить из-за того, что пыльцевые зерна не прорастают, пыльцевые трубки не достигают зародышевого мешка, не происходит оплодотворения. Разработаны различные методы ее преодоления. Некоторые из них поддаются объяснению, другие рассматриваются как чисто эмпирический факт. И. В. Мичурин рекомендовал опыление смесью пыльцы селективируемого вида и вида, с которым желают получить гибрид. Своя пыльца служит своеобразным проводником для чужой пыльцы, снимая барьер несовместимости на этапе прорастания пыльцы. Метод особенно успешен, когда завязь материнского растения имеет большое число семязачек и для пыльцевых трубок собственной пыльцы их не хватает, так что чужие спермии также могут принять участие в оплодотворении. Такую же роль может играть пыльца третьего вида, обнаруживающая некоторую совместимость с рыльцем пестика материнской формы. Несовместимость на этапе «прорастание пыльцы-оплодотворение» может быть снята методом предварительного вегетативного сближения, разработанного Мичуриным для древесных культур. Суть его заключается в том, что один из скрещиваемых видов прививается на другой. Несовместимость снимается под влиянием продуктов метаболизма, которыми обмениваются партнеры. На полевых однолетних культурах этот метод с успехом использовался В. Е. Писаревым и Н. А. Васильевой при скрещивании растений пшеницы с рожью. Для проведения успешной гибридизации этих культур они пересадили зародыш семени пшеницы на эндосперм ржи. И. В. Мичурин предложил и метод посредника, который теперь предпочитают называть методом мостов. Он заключается в том, что если два вида не скрещиваются, то один из них скрещивается с третьим видом, с которым скрещивания его удаются, а затем уже полученный гибрид скрещивают с другим родителем. Классическим примером является скрещивание И. В. Мичуриным персика культурного с персиком Давида как с посредником с последующим скрещиванием гибрида с монгольским бобовником как источником зимостойкости. В настоящее время в селекции пшеницы широко используется ржано-пшеничная транслокация 1В/1R, полученная от ржи. При этом используют отдаленную гибридизацию, так называемый «тритикальный мостик», скрещивая рожь с тритикале, а полученный гибрид – с пшеницей.

Нескрещиваемость при отдаленной гибридизации удалось преодолеть использованием пыльцы на ранних этапах ее развития, облучением пыльцы гамма-лучами, выдерживанием в электромагнитном поле, нанесением пыльцы на срез столбика после удаления рыльца. Сюда можно отнести также культивирование на питательной среде выделенных семязачек с последующим оплодотворением внесенными в среду спермиями. Делается это в стерильных условиях, т. е. метод относится к числу биотехнологических.

Для отдаленной гибридизации имеет существенное значение, какой из партнеров берется в качестве отца, а какой – матери. При скрещивании самоопылителя и перекрестника, например пшеницы и ржи, предпочитают в качестве матери брать самоопылитель. Перекрестник как отцовская форма более надежен, поскольку пыльца у него жизнеспособнее, так как должна быть перенесена тем или иным способом на другое растение и сохранять при этом оплодотворяющую

способность. Гибель зародыша после успешного скрещивания, которая может наблюдаться при отдаленной гибридизации, удастся предотвратить, если извлечь его и поместить для дальнейшего развития на питательную среду.

Стерильность растений F_1 при отдаленной гибридизации может проявляться в различной степени и быть разной природы. Это может быть диплонтная или гаплонтная стерильность. В первом случае она возникает на диплоидном уровне и выражается в отклонении генеративных органов от нормы. Если такие отклонения носят характер уродств, то восстановление плодovitости невозможно. Иногда диплонтная стерильность проявляется в незначительных отклонениях от нормы, например в нерастрескиваемости пыльников. Тогда для получения семян достаточно вскрыть пыльники. Чаще всего стерильность бывает гаплонтной и вызвана отсутствием или неполной гомологией партнеров, т. е. наблюдается несовместимость геномов (гаплоидного набора хромосом). Степень несовместимости может быть различной. Если имеет место гомология большого числа хромосом, гибриды оказываются довольно плодovitыми (естественно, что и скрещивания такого рода довольно успешны).

При отсутствии гомологии наблюдается полная стерильность, так как хромосомы родителей в метафазе мейоза не конъюгируют и расхождение их беспорядочно. Естественно, чем больше степень родства видов, чем ближе их геномы, тем плодovитее оказывается первое поколение от их скрещивания. У аллополиплоидов в составе их сложного генома могут оказаться «подгеномы», родственные геномам партнера по скрещиванию, что увеличивает шансы на хотя бы частичную плодovitость F_1 . Так, геном мягкой пшеницы складывается из простых геномов А, В, D; геном твердой пшеницы выглядит как А, В; геном пырея сизого – как В, D, X.

Плоидность партнеров по скрещиванию играет существенную роль при отдаленной гибридизации. Выравнивание родительских форм по числу хромосом может способствовать успеху скрещивания. При скрещивании видов картофеля, имеющих 2 и 4n хромосом соответственно, перевод последнего на гаплоидный уровень обеспечивает большее завязывание гибридных семян в F_1 . В данном случае 4n должен быть автотетраплоидом, поэтому при переводе его на гаплоидный уровень жизнеспособность гамет сохраняется. Скрещивание указанных видов без предварительного перевода на гаплоидный уровень давало бы триплоид, стерильный в первом гибридном поколении. Однако если вид большей плоидности является аллополиплоидом, перевод его на гаплоидный уровень только ухудшает ситуацию: гаметы его оказываются нежизнеспособными. Преодоление гаплоидного бесплодия первого гибридного поколения возможно путем возвратного скрещивания с одним из родителей. Естественно, таким родителем будет селекционируемая культура. Так, при скрещивании пшеницы с пыреем гибриды первого поколения скрещивают повторно с пшеницей. Беккроссирование несет и другую функцию: часто приходится избавляться от отрицательных свойств одного из партнеров, особенно если этот партнер – дикий вид. Естественно, в этом случае одним беккроссом не обойтись и приходится проводить целую серию.

Прогноз самой возможности отдаленной гибридизации и свойств форм, которые могут быть получены в случае ее осуществления в каждом конкретном случае, нереален. Можно говорить только о некоторых общих рекомендациях – генетической близости видов как предпосылке успеха и направлении скрещивания. Под последним понимается выбор материнского и отцовского компонента. Если скрещиваются самоопылитель и перекрестник, то в качестве отцовской формы лучше использовать перекрестник. Его пыльца более жизнеспособна, имеет больший запас питания, поскольку переносится на значительные расстояния. Так, при скрещивании мягкой пшеницы и ржи в качестве отцовского компонента нужно взять рожь.

Известны три уровня результатов отдаленной гибридизации:

- интрогрессия (перенос) отдельных генов от другого вида в геном селекционируемой культуры;
- перенос отдельных хромосом или их фрагментов, часто с заменой ими части ядерного материала селекционируемой культуры;
- совмещение геномов разных видов.

Каждый из этих уровней достигается определенной методикой скрещивания и работы с гибридными поколениями. Интрогрессии генов добиваются, ведя отборы в гибридных поколениях. Эти отборы в основном направлены на возврат к исходной культуре, однако в ее геноме могут включаться и чужеродные гены. Характер расщепления в гибридных поколениях способствует выполнению данной задачи. Здесь расщепление не подчиняется законам Менделя, оно хаотично, часто возникают уродливые не жизнеспособные формы вследствие того, что гаметы гибрида несбалансированы и зиготы лишены генов, необходимых для обеспечения жизнеспособности. Понятно, что, чем больше в гамете в результате случайного распределения окажется хромосом одного из родителей, тем более жизнеспособной будет эта гамета и тем более жизнеспособной будет зигота от слияния таких гамет. Поэтому в гибридных поколениях идет постепенный возврат к родительским, исходным формам, которому помогает своими отборами селекционер. Но в геноме селективируемой культуры могут включаться и чужеродные гены. Если признаки, которые они контролируют, ценны в хозяйственном отношении, селекционный отбор их закрепляет. Перенос отдельных хромосом или их фрагментов в геном селективируемой культуры – так называемая хромосомная инженерия – практикуется у культур со сложным геномом, например у мягкой пшеницы (AABBDD), поскольку такой перенос осуществляется с участием анеуплоидных форм, жизнеспособность которых обеспечивается за счет дублирования генов, ответственных за жизнеобеспечение. Геном мягкой пшеницы состоит из трех простых геномов, каждый из которых имеет такие гены. Поэтому у этой культуры возможны моносомии и нуллисомии, хотя жизнеспособность их, особенно нуллисомиков, понижена. Перенос небольших участков хромосом от других культур в геном селективируемой культуры возможен и у культур с простым геномом. Но этот перенос носит случайный характер, заранее не планируется и представляет собой интрогрессию – только не отдельного гена, а участка хромосомы. Под понятие хромосомной инженерии он не подпадает.

Чаще всего хромосомная инженерия использовалась у пшеницы. Известны линии пшеницы с добавленными хромосомами других видов или родов. Их получают, скрещивая пшеницу с другими родственными видами: пыреем, рожью, эгилопами, удваивая у гибридов число хромосом, чтобы сделать их плодовитыми, и беккроссируя эти гибриды пшеницей. В потомстве от беккросса присутствует диплоидный набор хромосом пшеницы и одинарный набор хромосом другого вида. При самоопылении могут возникать формы с различным числом хромосом другого вида, поскольку расхождение их при мейозе случайно из-за отсутствия гомологов, в том числе и с одной хромосомой. В расщеплении последних могут оказаться растения с двумя гомологичными хромосомами другого вида при полном диплоидном наборе хромосом пшеницы. Линия с добавленными хромосомами может нормально размножаться. Линии с добавленными хромосомами нестабильны, при репродуцировании добавленные хромосомы могут элиминироваться. Поэтому напрямую каких-либо форм, представляющих хозяйственный интерес, этим путем не получено. Линии с добавленными хромосомами служат для получения форм, у которых пара пшеничных хромосом замещена парой хромосом другого вида.

Известны различные пути получения линий с замещенными хромосомами. Все они связаны с участием анеуплоидов: моносомиков и нуллисомиков.

Наиболее простая схема основана на участии нуллисомиков. Линию с добавленными хромосомами скрещивают с нуллисомиком той же линии по той паре хромосом, которую требуется заменить. В расщепляющемся потомстве гибрида можно отобрать растения, у которых произошло требуемое замещение, если объединятся гаметы с «чужими» хромосомами и отсутствием замещаемых хромосом. Работать с моносомиками сложнее, так как от первого скрещивания получают две формы: моносомная и имеющая обе хромосомы, которые хотят заменить. Естественно, что вторая не может дать в расщеплении растения, у которых эта пара отсутствовала бы, и ее следует из дальнейшей работы исключить. Далее поступают так же, как при работе с нуллисомиками. Несмотря на более сложную схему, предпочтение отдается моносомикам, поскольку они более жизнеспособны (у нуллисомиков часто проявляется мужская стерильность). Чтобы распознавать требующиеся формы, нужно проводить цитологический анализ, а также руководствоваться морфологическими особенностями, характерными для

растений с той или иной хромосомой. Цитологический анализ облегчается, если вместо моносомиков использовать монотелосомики. У них замещающая хромосома представлена только одним плечом с центромерой, что делает ее хорошо различимой при цитологическом анализе.

Замена пары хромосом на хромосомы другого вида вызывает изменения фенотипа, которые часто оказываются чрезмерными, особенно если это хромосомы дикого вида. Однако можно добиться того, что из чужеродной хромосомы в геном селективируемой культуры может быть перенесен только фрагмент хромосомы, контролирующей ценные хозяйственные признаки. Перенос осуществляется путем обмена участка хромосомы селективируемой культуры на фрагмент чужеродной хромосомы (транслокация). При использовании моносомика можно получить растения, у которых его единственная хромосома сочетается с чужеродной. Тогда возможна спонтанная транслокация или индуцированная, например, облучением, что многократно повышает ее вероятность. У пшеницы возникновению транслокаций способствует также устранение хромосомы 5В, блокирующей негомологичную конъюгацию. Естественно, вся хромосомная инженерия осуществляется в пределах родственных видов, когда имеется частичная гомология. Для пшеницы это будут рожь, эгилопсы, пырей и некоторые другие.

Описанными методами были получены формы мягкой пшеницы с сегментами хромосом других видов, обеспечивающими устойчивость к таким болезням, как бурая и желтая ржавчина, мучнистая роса. Первый такой транслокант был создан американским генетиком Э. Сирсом на основе сорта Чайниз спринг, в хромосому которого удалось включить сегмент хромосомы эгилопса зонтичновидного. Форма получила название Трансфер и используется в селекции в качестве носителя гена устойчивости к бурой ржавчине Lr 9. Методика, использованная Сирсом, построена на описанных принципах, но имеет некоторые отличия. Известны и другие транслоканты пшеницы, используемые в селекции как доноры ценных свойств.

Совмещение геномов разных видов, впервые осуществленное Г. Д. Карпеченко на примере капусты и редьки, которые выступали как модельные объекты, нашло применение в селекции некоторых культур. Естественно, используются геномы культурных видов, потому что дикие привнесли бы в гибрид множество отрицательных в хозяйственном отношении свойств. Технология получения такого гибрида заключается в скрещивании разных видов с последующим, в F₁, удвоении числа хромосом.

Таким образом, в клетках гибрида сосуществуют диплоидные наборы хромосом одного и другого вида, что обеспечивает нормальный мейоз и плодовитость.

3. Перспективы отдаленной гибридизации.

Самый известный отдаленный гибрид, и единственный, получивший распространение в производстве новый вид, – это гибрид пшеницы и ржи тритикале (от тритикум и секале – видовых названий пшеницы и ржи).

Первое сообщение о получении жизнеспособных гибридов от скрещивания пшеницы с рожью сделано А. С. Вильсоном в Эдинбурге в 1875 г. Несколько позже растения от гибридизации мягкой пшеницы и ржи получил Е. С. Кармен в США, однако его гибриды отличались очень низкой фертильностью. Гибриды немецкого селекционера В. Римпау сохраняются до сир пор, они остаются неизменными и старейшими из существующих октоплоидных линий тритикале. С начала в скрещивание вовлекали мягкую пшеницу и, следовательно, получали тритикале с октоплоидным набором хромосом (имея в виду, что сложный геном мягкой пшеницы состоит из трех простых геномов). Эти 56-хромосомные тритикале оказались неудачными: объединить высокую продуктивность пшеницы с неприхотливостью и высокой зимостойкостью ржи не удалось – гибриды получились позднеспелыми и плохо зимовали.

Скрещивания с твердыми пшеницами дали лучшие результаты. Но и эти 42-хромосомные тритикале селекционеров не удовлетворили. Тогда скрестили 56- и 42-хромосомные тритикале. В этих гибридах геном D мягкой пшеницы элиминировался, поскольку был представлен одинарным набором хромосом. В результате получили опять-таки 42-хромосомные тритикале, но в пределах геномов A и B, которые имеются у мягкой и твердой пшеницы. Стали возможны

обмены на уровне хромосом и на уровне участков хромосом (кроссинговер) между геномами мягкой и твердой пшеницы. Обмены сыграли решающую роль в получении сортов тритикале. Формально никакого отличия между 42-хромосомными тритикале, полученными от скрещивания твердой пшеницы с рожью, и такими же по числу хромосом формами, полученными тритикале от скрещивания 56- и 42-хромосомных, нет: в обоих случаях от пшеницы присутствуют только геномы А и В. Однако они прошли длительную эволюцию и при всем своем сходстве имеют и существенные отличия. Поэтому рекомбинанты в пределах этих двух геномов обеспечили новые возможности. Тритикале, полученные таким образом, назвали вторичными, в отличие от первичных, в результате гибридизации ржи с мягкой и твердой пшеницами.

Так, впервые в современной селекции был создан новый вид, получивший признание в качестве новой культуры. Был создан ряд сортов как кормового (Одесский кормовой, Конвейер, Гренадер), так и зернового и зернокормового (ТИ 17, Водолей, Валентин 90, Тальва 100, Александр) назначения.

Первые сорта тритикале зарекомендовали себя как высокоурожайные, превосходя в благоприятные годы лучшие сорта озимой пшеницы. Однако в годы с неблагоприятными условиями зимовки и вегетационного периода урожай их снижался значительно, чем у озимой пшеницы, т. е. был менее стабильным. Это сдерживало рост площадей под новой культурой. В последние годы селекционерам удалось получить более стабильные по урожайности сорта тритикале, и площади под нее начали увеличиваться.

Помимо озимых, известны и яровые тритикале (от скрещивания с яровой пшеницей), но они пока не получили широкого распространения (Ярило).

Тритикале играет заметную роль и как исходный материал в селекции озимой пшеницы. Ее скрещивают с мягкой пшеницей и повторно беккроссируют опять-таки пшеницей для восстановления генома D.

Отдаленная гибридизация получила широкое распространение в современной селекции. Дальнейшее расширение ее применения зависит от конкретной культуры – каковы видоые ресурсы, которые могут быть вовлечены в скрещивания. Так, у картофеля *Solanum tuberosum* возможности очень велики: известно около 200 видов этого рода. У гороха *Pisum sativum*, помимо культурного, имеется только один вид, не обладающий какими-либо ценными хозяйственными свойствами.

Помимо тритикале, предприняты успешные попытки получить подобные гибриды и других культур. От скрещивания пшеницы и ячменя получен гибрид тритодеум (тритикум и хордеум). Но пока эти новые культуры не получили сколько-нибудь заметного распространения.

1.4.4. Мутационный процесс в селекции растений

Вопросы.

1. Использование мутационного процесса в селекции растений
2. Использование в селекции растений естественных мутантов
3. Физический и химический мутагенез их отличия, технология применения (дозы, экспозиции, формы применения, безопасность работы)
4. Расщепление и химерность при мутагенезе
5. Трудности выделения мутантов у перекрестноопыляемых растений
6. Работа с мутантными поколениями растений
7. Плейотропия и отрицательные корреляции как факторы, ограничивающие получение мутантных форм

1. Использование мутационного процесса в селекции растений

Один из способов создания популяций для отбора – мутагенез. Он заключается в изменении гена (точковая мутация), хромосомы (хромосомная мутация или хромосомная абберация), генома в целом (геномная мутация).

Ценность для селекции представляют главным образом точковые мутации. Хромосомные абберации, связанные с изменением положения участков хромосом, тоже имеют некоторое практическое значение. Хромосомные абберации нарушают сбалансированность генома, в результате чего жизнеспособность растения резко понижается. Точковые мутации меньше сказываются на жизнеспособности растения, чем хромосомные перестройки, особенно связанные с утратой части хромосомного материала. Но возможны и удачные варианты. При перекомпоновке хромосомного материала (инверсиях, транслокациях) он полностью сохраняется, но возникает эффект положения, который проявляется фенотипически и может иметь селекционную ценность. Селекционную ценность могут иметь и дубликации (повторения участков хромосом).

Полезные хромосомные мутации, возникшие спонтанно, обнаруживали у пшеницы, ячменя, райграса пастбищного. Например, сорт мягкой пшеницы Чайниз спринг несет ряд межхромосомных транслокаций. Особый класс составляют мутации цитоплазмы.

Мутагенез принципиально отличается от гибридизации тем, что гибридизация полностью разрушает геномы родительских форм, возникают новые комбинации родительских аллелей (естественно, это не относится к локусам, аллельный состав которых у родителей одинаков), тогда как при мутагенезе может изменяться один ген или небольшая часть генома. Поэтому на мутагенез смотрят часто как на метод, позволяющий исправлять недостатки какого-нибудь в целом хорошего сорта.

Мутационная теория де Фриза (в России аналогичные представления развил С. И. Коржинский), в сущности, оставляла открытым вопрос о возможности индуцированного мутагенеза, хотя де Фриз полагал, что он возможен. Только в 1930-х гг. Г. А. Надсон и Г. С. Филиппов (СССР) получили с помощью рентгеновского излучения мутацию у дрожжей, а Г. Меллер (США), благодаря методам обнаружения мутаций у дрозофилы, которые он разработал, привел доказательства возможности получения мутаций искусственным путем (он также использовал рентгеновское излучение). Очевидно, под влиянием этих работ А. А. Сапегин и Л. Н. Делоне (СССР), Л. Стадлер (США), О. Густавсон и Н. Г. Нильсон-Эле (Швеция) предприняли попытки получить путем мутагенеза хозяйственно ценные формы пшеницы, ячменя, кукурузы. Эти попытки были большей частью безуспешны, но Делоне в 1928 г. удалось получить у мягкой пшеницы мутацию, которая представляла хозяйственную ценность. Данный результат имел принципиальное значение, поскольку многие сомневались в возможности применения метода мутагенеза для целей селекции. Сомнения возникали потому, что индуцированные мутации, как правило, непродуктивные и даже нежизнеспособные, а мутантные формы, представляющие селекционную ценность, возникают редко. При небольшом объеме мутантных популяций они не обнаруживались. Первый коммерческий сорт-мутант ячменя Паллас был получен в Швеции из

сорта Бонус. Он не превосходил своего родителя по урожайности, но был устойчивее к полеганию. С тех пор метод мутагенеза прочно вошел в селекционную практику.

2. Использование в селекции растений естественных мутантов

Еще до внедрения в практику селекции индуцированного мутагенеза селекционеры широко использовали и продолжают использовать естественные мутации. В плодоводстве известно такое явление, как почковые мутации (спорты) – появление побегов с иными морфологическими признаками, чем у дерева или куста определенного сорта, например, с красными плодами, тогда как остальные побеги несут желтые плоды. Это вегетативные мутации, и, будучи размножены прививочным способом, они дают новые формы, которые могут оказаться ценными сортами. Известны, например, мутантные сорта-клоны, полученные от сортов яблони Делишес, Мелба, Коричное полосатое – Ред делишес, Мелба красная, Коричное красное. Известный сорт И. В. Мичурина Антоновка шестисотграммовая – вегетативный мутант сорта Антоновка могилевская белая.

С обнаружением некоторых естественных мутаций связаны целые направления в селекции. Селекция пшеницы на короткостебельность, которая привела к «зеленой революции», началась с японского сорта Норин 10, очевидно, естественного мутанта, имеющего два гена короткостебельности Rht1 и Rht2. Короткостебельный мутант риса, обнаруженный на Филиппинах, явился родоначальником низкорослых сортов этой культуры, позволивших значительно увеличить урожай, в том числе и за счет внесения больших доз азотных удобрений, которые на старых высокостебельных сортах вызывали полегание. Мутация гороха «тенакс», найденная в Прибалтике, была использована для выведения неосыпающихся сортов, которая характеризуется прочным срастанием семяножки с кожурой семени, благодаря чему семена при растрескивании боба не осыпаются.

Создание немецким селекционером Р. Зенгбушем безалкалоидных сортов желтого, а затем и других видов люпина, позволило использовать эту культуру в качестве кормовой, не прибегая к специальным приемам переработки ее зерновой продукции.

Линии кукурузы со спонтанными мутациями Флоури 2 и Опак 2 отличаются высоким содержанием лизина и широко используются при создании высоколизиновых гибридов.

Колонновидная яблоня, представляющая новое направление в селекции этой культуры, также естественный мутант.

Большое значение в селекции на гетерозис имеют мутации цитоплазмы, вызывающие ЦМС.

Естественно, современная селекция не может основываться исключительно на спонтанном мутагенезе – слишком редко возникают такие мутации.

3. Физический и химический мутагенез их отличия, технология применения (дозы, экспозиции, формы применения, безопасность работы)

Индукцированный мутагенез в зависимости от характера используемых мутагенов делится на физический и химический. К физическим мутагенам относятся различные виды радиоактивного излучения, температура, ультразвук, механические воздействия. Первыми в качестве физических мутагенов применялись рентгеновские, а позднее и гамма-лучи, поскольку в медицинских учреждениях к тому времени рентгенокопия получила широкое распространение и имелось соответствующее оборудование. Позднее стали применять и другие источники. При этом использовались рентгеновские установки и радиоактивные изотопы Co^{60} и Cs^{137} . В настоящее время наиболее широко используется гамма-излучение, а также другие виды ионизирующей радиации. Однако применение многих из них, например быстрых и тепловых нейтронов, связано с использованием дорогостоящих и сложных технических установок (ядерных реакторов или циклотронов). К тому же нейтронное облучение дает наведенную радиацию, обработанный материал необходимо выдержать после облучения до двух суток, проверить на отсутствие радиации и только после этого продолжать с ним работу. Облучение рентгеновскими и гамма-лучами не вызывает наведенной радиации, с семенами можно работать, не подвергая себя опасности.

Для получения индуцированных мутаций используется ультрафиолетовое излучение, при длине волн которого 260-266 нм проявляется максимальный мутагенный эффект. Чаще всего источником данного излучения служат ртутные лампы. Для получения мутаций у растений применяются также лучи лазера.

Физическими мутагенами можно обрабатывать как целое растение, так и отдельные его части. Несмотря на принципиальную возможность получать мутации при облучении растений в различные периоды онтогенеза, в селекции предпочитают облучение сухих семян, а также органов, которые служат для вегетативного размножения растений: клубней, луковиц, так как это наиболее технологично. Исключения составляют многолетние плодовые растения: облучают черенки, поскольку размножение осуществляется вегетативно и генетическая природа семян неизвестна.

При работе с ультрафиолетовым излучением и лучами лазера воздействуют на пыльцу растений, поскольку их проникающая способность мала.

Облучение может быть однократным, многократным и хроническим: одну и ту же дозу радиации обрабатываемый объект может получить за один или несколько раз, а может получать на протяжении длительного периода времени. Для ряда культур, например мягкой пшеницы, частота выхода мутаций при 2-3-кратном облучении значительно выше, чем при однократном.

У отдельных культур отмечен большой выход мутаций при хроническом облучении на гамма-поле. Это может быть объяснено тем, что однократная большая доза радиации приводит к гибели радиочувствительных, наиболее мутабельных клеток, в то время как та же доза радиации, полученная за более длительное время, не убивает клетки с возникшими мутациями. Оптимальные дозы ионизирующего облучения устанавливаются эмпирически. При использовании физических мутагенов доза облучения зависит от вида излучения и обрабатываемого материала. Различают летальную (смертельную) и критическую дозу радиации. Критической называется доза радиации, при которой наблюдается сильное угнетение и гибель примерно половины организмов, но значительная часть их (30-40%) доживает до плодоношения, давая большое число мутаций. В настоящее время критическая доза радиации установлена более чем для 150 видов растений. При облучении нейтронами доза должна быть на порядок меньше, поскольку этот вид облучения вызывает сильный повреждающий эффект (хромосомные aberrации с летальным исходом). Дозы, рекомендуемые для облучения семян различных культур, могут заметно отличаться. При увеличении дозы выход мутаций (в процентах от числа высеянных семян) растет сначала линейно, затем рост замедляется, и процент мутантов начинает снижаться. Это происходит потому, что растет процент погибших растений, а они, скорее всего, являются мутантами.

Перед селекционером стоит задача получить максимальный выход мутаций, избежав массовой гибели растений. Тем более что быстрее всего гибнут растения, у которых в результате облучения произошли какие-либо мутации. Экспериментально доказано, что наиболее приемлемыми при обработке семян являются дозы, равные половине критической, так как обеспечивают достаточно большой выход мутаций при незначительной гибели обрабатываемых растений.

Например, для обработки гамма-лучами семян мягкой пшеницы рекомендуется доза 1,9-2,6 Кл/кг, овса – 2,6-3,2, кукурузы – 1,3-1,9 Кл/кг (прежняя единица дозы излучения 1 рентген равна $2,58 \times 10^4$ Кл/кг). При облучении пыльцы доза облучения значительно меньше. Облучение при температуре ниже 0 °С (например, на сухом льду при -78 °С), в бескислородной среде (считается, что кислород подавляет действие репарационных ферментов) уменьшает повреждающий эффект радиации. Однако в практической селекции эти приемы не применяют: технологичнее просто увеличить количество облучаемых объектов.

Доза облучения зависит не только от облучаемого материала, но и от того, в каком периоде органогенеза проводится облучение. Установлено, например, что ячмень обладает наибольшей радиочувствительностью в период от начала закладки до полного формирования генеративных органов и половых клеток. При обработке эмбрионально молодых семян наблюдается большой выход мутантов. От периода органогенеза, на котором происходит обработка растений, в

определенной степени зависит спектр мутаций, так как на разных периодах органогенеза активно функционируют разные гены и одни участки ДНК закрыты белками-гистонами, а другие – открыты.

Женские гаметы обладают большей стойкостью к облучению, чем мужские. Тетраплоидные растения менее радиочувствительны, чем диплоидные, в силу компенсаций, связанных с удвоением хромосомного материала. От мощности дозы в некоторой степени зависит выход мутаций определенного типа. С ростом мощности дозы облучения увеличивается количество хромосомных aberrаций, тогда как число точковых мутаций от мощности дозы не зависит.

Химический мутагенез стали применять позднее, хотя еще в 1930-е гг. Э. Бауэр (Германия) и В. В. Сахаров (СССР) показали возможность индуцированного химического мутагенеза под воздействием простых неорганических соединений. Широко химический мутагенез стали использовать в 1950-е гг., после того как И. А. Рапопортом (СССР), Ш. Ауэрбах (Англия) и другими исследователями были обнаружены органические вещества, обладающие сильным мутагенным действием. Огромное значение в развитии химического мутагенеза сыграло открытие Рапопортом химических супермутагенов – веществ, обеспечивающих стопроцентный выход мутаций. Стараниями И. А. Рапопорта, Т. В. Сальниковой и других сотрудников отдела химической генетики Института химической физики РАН данный вид индуцированного мутагенеза получил широкое распространение.

В настоящее время в селекции в качестве химических мутагенов наиболее часто используют нитрозометилмочевину (НММ), нитрозоэтилмочевину (НЭМ), нитрозодиметилмочевину (НДММ), нитрозодиэтилмочевину (НДЭМ), диметилсульфат (ДМС), этиленмин (ЭИ), 1,4-бисдиазоацетилбутан (ДАБ).

Концентрация рабочего раствора зависит главным образом от мутагена и в меньшей степени – от объекта. Экспозиция, напротив, определяется культурой, с которой работает селекционер. Так, для семян бобовых требуется 3-5 ч, для злаковых – 12, винограда – 48 ч. Для каждого мутагена существует градация культур по степени чувствительности к нему. Так, для ЭИ пшеница более чувствительна, чем горох, а для ДАБ – наоборот. Проросшие семена обрабатывают меньше по времени, чем сухие.

Проникающая способность раствора мутагена увеличивается под действием ультразвука.

Так же, как при ионизирующем облучении, может наблюдаться гибель растений, и селекционеру необходимо выбрать такой режим обработки, чтобы при возможно меньшей их гибели получить высокий выход мутаций. При обработке объем раствора мутагена должен быть в 5-10 раз больше массы семян.

Воздействие некоторыми мутагенами можно осуществлять в газовой среде в их парах (например, диметилсульфатом, нитрозометилмочевинной, нитрозодиметилмочевинной). Это удобно для обработки пыльцы, бутонов, раскрывшихся цветков. Обработку ведут в эксикаторах емкостью 1,5-3,0 л. Мутагены вносят в бюкс на дне эксикатора, семена помещают на сетку. Дозировка осуществляется в зависимости от вида мутагена в мг (например, нитрозометилмочевина – 5-20 мг) или в каплях (диметилсульфат – 1-5 капель).

Экспозиция при обработке в газовой среде сильно варьируется:

- 5-30 мин для сильночувствительных культур (пшеница, рожь, ячмень, овес, кукуруза, рис, просо);
- 1-8 сут для среднечувствительных (горох, фасоль, бобы, лен, картофель, клевер, люцерна, томат, перец, гречиха, хлопчатник);
- свыше 8 сут – для слабочувствительных (лук, капуста, редис).

С увеличением температуры на 10 °С эффективность мутагенов в газовой среде возрастает в 1,5-2 раза, что значительно экономит расход мутагенов. Кроме того, поскольку семена не замачивают, сохраняется их сыпучесть и исключаются ферментативные и ростовые процессы, увеличивающие количество гибнущих растений. Очевидно, по этой причине избегают большого разрыва во времени между завершением обработки в растворах химических мутагенов и посевом.

Между физическим и химическим мутагенезом имеются существенные различия. В отличие от физических, химические мутагены действуют более мягко, дают больший выход микромутаций и меньший выход хромосомных аббераций (1,4-бисдиазоацетилбутан, например, их вообще не дает). Хромосомные перестройки при химическом мутагенезе появляются только при очень высоких концентрациях мутагена. В то же время выход мутаций при химическом мутагенезе в 3-4 раза выше, чем при физическом, а при использовании супермутагенов наблюдается практически 100%-ный выход мутантов. Кроме того, при работе с химическими мутагенами можно проводить обработку растительного материала в парах некоторых из них (этиленimina, нитрозометилмочевина, нитрозодиметилмочевина и др.), что очень удобно для обработки пыльцы, бутонов, соцветий.

Таким образом, применение химического мутагенеза более эффективно, чем физического. Однако широкое использование химического мутагенеза сдерживается низкой технологичностью большинства химических мутагенов. И это обстоятельство может оказаться решающим при выборе способа получения мутантов. Многие из химических мутагенов – быстро разлагающиеся вещества, которые необходимо хранить при температуре не выше 0 °С. Транспортируют их в таре, помещенной в термос с сухим льдом. Пребывание при комнатной температуре в течение получаса сильно снижает эффективность таких мутагенов.

Химические мутагены – высокотоксичные вещества, поэтому их растворы готовят в вытяжном шкафу в резиновых перчатках. Растворы готовят на дистиллированной воде, иногда на буферах, обеспечивающих стабильный уровень рН (близкий к 7). В некоторых случаях добавляют органические растворители, уменьшающие повреждающее действие мутагенов и повышающие их эффект. Обработанные семена тщательно отмывают от мутагена под краном. При этом они теряют сыпучесть. Можно их сеять в таком виде, а можно предварительно подсушить, чтобы сеять было удобнее.

По спектру мутаций индуцированный мутагенез не отличается от спонтанного. Различие только в том, что первый интенсифицирует мутационный процесс. Действие мутагенов неспецифично. Но некоторые небольшие отличия есть. При облучении чаще, чем при химическом мутагенезе, возникают эректоидные мутации (жесткий стебель), мутации устойчивости к болезням. У гороха УФ-лучи вызывают широкий спектр мутаций, а ДЭС и ДМС – преимущественно мутации количественных признаков и физиологические мутации. Облучение нейтронами дает более узкий спектр мутаций, чем облучение, и большое число хромосомных аббераций. Отмечено, что НЭМ часто вызывает мутации короткостебельности, а ЭИ – устойчивости к болезням.

В реакции генотипов на мутагенное воздействие могут наблюдаться существенные различия. Так, ДАБ дает много мутаций на одних культурах (злаки, хлопчатник, лен) и неэффективен на других (бобовые). НЭМ давала у сорта льна-долгунца Светоч больше мутаций, чем у сорта Вайгантас, а ЭМС – наоборот.

Отмечается, что повторная обработка мутагенами, а также обработка уже полученных мутантов расширяют спектр изменчивости. Гибриды также более мутабельны, чем чистые линии.

4. Расщепление и химерность при мутагенезе

Генотипическая природа и проявление мутации могут быть различны. Чтобы представить себе возможные варианты и причины их появления, нужно проследить судьбу мутации с момента ее возникновения. При воздействии мутагена на клетки зародыша (инициальные клетки или инициалии), мутации могут произойти только в части клеток, причем маловероятно, чтобы это будут одни и те же мутации. Кроме того, мутации будут гетерозиготны по мутантному локусу, так как вероятность возникновения одной и той же мутации в одном локусе гомологичной пары хромосом ничтожна. Если все эти клетки при дальнейшем делении дадут археспориальную ткань (ту, которая образует гаметы), часть гамет окажется мутантными. Даже при облучении пыльцы, когда мутация возникает в гаплоидном спермии, иногда наблюдали развитие мутантной и

немутантной ткани. Считается, что это следствие политенного строения хромосом, однако такие случаи редки. Естественно, что расщепления по Менделю в таких случаях ожидать не приходится, и это исключает расчет объема популяции, в которой селекционер рассчитывал бы обнаружить с заданной вероятностью в определенном количестве мутантные доминантные или рецессивные гомозиготы. Одновременное присутствие в растении мутантной и немутантной ткани вызывает их конкуренцию, в результате которой мутантная ткань может быть вытеснена, а вместе с ней и образовавшаяся мутация. Если мутантная ткань полностью не вытеснена, но археспорий образуется без ее участия, все гаметы будут немутантными. В вегетативной части растения возможны участки мутантной ткани, которые при вегетативном размножении могут дать начало растениям-мутантам. Растения, у которых часть тканей мутантна, называются химерами. Таковыми являются пестролистные формы многих комнатных растений.

В селекции плодовых и полевых культур (картофель), чтобы получить однородные сорта, прибегают к расхимериванию, т. е. выделению чисто мутантной формы. Его проводят путем выращивания побега из мутантной почки, а затем укоренения или прививки на подвой. Более сложный случай — возникновение мутантной ткани в толще побега. Если удастся добиться образования адвентивных почек, а из них — побегов, последние могут оказаться мутантными. У картофеля удастся выявить такие мутации путем уничтожения всех глазков (почек) клубня. В результате в толще клубня возникают адвентивные почки. Расположение мутантных тканей в побеге зависит от того, в какой части зародыша или конуса нарастания возникла мутация. Если это клетки — предшественницы эпидермального слоя, то мутации могут изменить форму, окраску плодов, побега, листа. Следующий слой клеток дает археспориальную ткань. Мутации, появившиеся в этом слое, могут наследоваться половым путем. Мутации еще более глубоких слоев могут быть выявлены только путем расхимеривания. Во втором мутантном поколении химерность не наблюдается, поскольку мутация передается только одной клеткой — гаметой.

По расположению химерной ткани различают типы мутаций и выявление мутации зависит от типа химеры:

- видимые вегетативные мутации;
- мутации генеративной части;
- мутации, выявляемые только расхимериванием.

5. Трудности выделения мутантов у перекрестноопыляемых растений

Обнаружение и выделение мутантных растений у само- и перекрестноопыляющихся культур при половом размножении имеет свои особенности, которые учитываются при работе с мутантными популяциями. В первом мутантном поколении, которое обозначается как M_1 , фенотипически проявляются только доминантные мутации. Вероятность встречи женской и мужской гамет с одинаковой мутацией ничтожна. Поскольку практически все мутации гетерозиготны, то рецессивные признаки проявиться не могут.

Если культура — самоопылитель, то, чтобы выделить гомозиготную форму по мутантному аллелю, достаточно посеять потомство обнаруженного мутанта, отобрать в нем мутантные растения (это будут гомозиготы и гетерозиготы, различить которые визуальным способом невозможно) и семена с каждого растения посеять отдельно. Те потомства, в которых не будет наблюдаться расщепления, и будут гомозиготными мутантами.

Если мутация рецессивна, то обнаружить ее можно не ранее M_2 . Но зато она будет гомозиготна. Большинство мутаций рецессивны. Доминантные мутации отмечены не у всех культур. Их наблюдали главным образом у пшеницы.

Большие трудности возникают при работе с перекрестноопыляющимися культурами, потому что необходимо добиться гомозиготности по мутантному локусу, иначе мутантный аллель не может быть закреплен. Но вновь возникшая мутация гетерозиготна. И в таком состоянии она будет поддерживаться, поскольку мутантные гаметы, будь это яйцеклетки или спермии, могут объединиться только с немутантными гаметами, которые абсолютно преобладают в популяции. Даже при совпадении двух мутантных гамет их объединению мешает самонесовместимость, обычная у перекрестников. Для выявления и закрепления мутации у

перекрестноопыляющихся культур приходится прибегать к инбридингу, а это влечет за собой инбредную депрессию. Избавиться от нее можно, скрестив возникшую мутантную форму с рядом растений исходного образца, а затем вести инбридинг в потомстве каждого из этих скрещиваний, отбирая гомозиготы по мутантному аллелю. На заключительном этапе нужно переопылить полученные формы.

Степень идентичности с исходным сортом (по признакам, не затронутым мутацией) зависит от числа растений сорта-популяции, которым будет передан мутантный аллель. Если мутантный аллель доминантный, то фенотипически он проявляется и в гетерозиготе, и все описанное выше может быть реализовано. Но если произошла рецессивная мутация (а, как правило, мутации рецессивны), во-втором поколении она не выявляется по причинам, указанным ранее. Производить искусственное самоопыление для выявления рецессивной мутантной гомозиготы можно только вслепую, надеясь, что какое-то из самоопыляемых растений имеет полезную рецессивную мутацию. Понятно, что шансы попасть на такое растение очень невелики.

Таким образом, понятно, почему мутантная селекция у перекрестников идет гораздо менее успешно, чем у самоопылителей. У перекрестноопыляющихся культур мутантных сортов и форм очень немного.

6. Работа с мутантными поколениями растений

Есть два способа посева второго мутантного поколения:

- в виде совокупной популяции, полученной от посева M_1 ;
- в виде отдельных потомств каждого растения (или каждой части растения, например, колосьев).

Первый способ технически проще, но при втором мутанты выделяются надежнее, поскольку легче обнаружить те, которые не имеют явных морфологических отличий (ниже об этом будет сказано при описании методики выделения микромутаций). В отдельном потомстве таких мутантных растений может быть несколько. Доминантные мутации, обнаруженные в M_1 , высевают отдельно. Еще одно важное обстоятельство, которое влияет на технику работы с мутантными поколениями, заключается в том, что на побегах разного порядка мутации проявляются по-разному. Так, при воздействии мутагенов на семена у злаков мутации возникают чаще у главного побега, чем у побегов, чьи инициальные клетки образуются позднее. Было установлено, что у ячменя при воздействии мутагенами на семена выход мутаций существенно уменьшается, начиная с побегов третьего порядка; у гороха то же самое наблюдали, начиная с 3-4-го узла. Поэтому для посева M_2 не следует брать семена с тех частей растения, у которых присутствие мутантных семян маловероятно. По этой же причине семьей при мутагенезе считают не потомство отдельного растения, как это принято в других случаях, а потомство отдельного побега, соцветия. Именно данное обстоятельство делает целесообразным посев отдельно семян различных колосьев и других соцветий, хотя бы и принадлежащих одному растению. В связи с этим можно практиковать посев целыми колосьями, что экономит время и земельную площадь. Площадь питания растений M_1 по той же причине не должна провоцировать излишнюю кустистость. Мутантные популяции следует выращивать на хорошем агротехническом фоне при неглубокой заделке семян, чтобы обеспечить хорошую полевую всхожесть и комфортные условия для развития растений, в том числе слабых, так как именно они часто имеют мутантную природу. При необходимости применяют специальные фоны, чтобы выделить определенные мутации, например инфекционный фон при селекции на устойчивость к болезням, провокационные фоны для выделения морозостойких (посев озимых культур в условиях низких температур), солеустойчивых (посев на засоленных почвах) и т. п. мутантов. Мутации, выделенные на провокационном и инфекционном фонах, часто морфологически неотличимы от немутировавших растений. В их мутантной природе необходимо убедиться посевом потомства на том же фоне. В неясных случаях может понадобиться анализ еще одного поколения. В случае, если болезнь проявляется на следующий после заражения год (головня), обнаружение устойчивых мутантов сдвигается на один год по сравнению с болезнями, проявляющимися непосредственно после заражения. Вместе с мутантами в популяции M_1 могут присутствовать и

так называемые морфозы, фенотипически не отличимые от мутантов, но не наследуемые в следующем поколении. Они тоже попадают в отбор, что бесполезно, так как отмечено, что в их потомстве чаще появляются мутанты, чем в потомстве неизменившихся растений.

Особый случай представляет выделение мутантов по продуктивности и биохимических мутантов. Их часто называют микромутантами, поскольку, в отличие от ясно различимых морфологических мутантов — макромутантов, они в популяции плохо различимы. Даже мутации адаптивного характера (засухоустойчивые, морозостойкие и т. д.), а также устойчивые к биотическим факторам, о которых говорилось выше, выделяются легче, поскольку для них существует селективный фон. Между тем все эти классы мутаций чрезвычайно важны.

Выделять мутации по продуктивности в M_2 можно, ориентируясь на вариабельность внутри семей. Сильное варьирование может означать расщепление по признаку продуктивности. Х. Гауль предложил рассчитывать коэффициент вариации количественного признака для каждой семьи M_2 . Если он велик, то в семье идет расщепление по этому признаку из-за возникшей по нему мутации. Однако этот метод чрезвычайно трудоемок. Задачу можно упростить, определяя интервал между самым продуктивным и наименее продуктивным растением в семье, он соответствует примерно шестикратному стандартному отклонению. Этот способ был успешно применен для выделения мутаций по крупности зерна у пшеницы в Тимирязевской академии. Еще проще выделять из популяции наиболее продуктивные растения. Это можно делать и из M_1 , поскольку согласно теории полимерии высокую продуктивность дает сочетание доминантных аллелей. Последующая проверка в M_3 , а при необходимости и в M_4 покажет, какие из них действительно являются мутантами по продуктивности. Можно создавать популяции M_2 , беря из каждого продуктивного растения M_1 по 2-3 семени, концентрируя таким образом продуктивные мутантные генотипы для последующего отбора в M_2 . Еще труднее выделять биохимические мутанты или мутанты, имеющие какие-то структурные особенности веществ, тканей органов, ради которых культура возделывается (например, качество клейковины в зерне пшеницы). Нужны экспресс-методы, позволяющие определять те или иные вещества или структуры. В Тимирязевской академии была проведена работа по улучшению хлебопекарных качеств сорта яровой пшеницы. В M_2 отбирали колосья со стекловидным зерном, а потом определяли методом седиментации формы те, что могли быть мутантами по хлебопекарным качествам. Анализ не требует много времени и материала и состоит в определении толщины осадка шрота (смолового зерна без последующего отсева) в растворе уксусной или молочной кислоты (чем выше осадок, тем больше клейковины). Выделение микромутаций в поздних поколениях (M_3 , M_4) малоперспективно, так как признаки, которыми они характеризуются, полигенны и расщепление делает маловероятным генотипы с наиболее ценным набором аллелей.

Очень важно иметь достаточно большой объем мутантной популяции. Чем он больше, тем выше шанс обнаружить в ней ценные мутантные формы. Считается, что для обработки мутагенами нужно иметь не менее 700-1000 семян, для выделения микромутаций – несколько тысяч. В M_2 при посеве по семьям должно быть 200-800 семей. Для того чтобы семья зерновых, зернобобовых и крупяных культур была достаточно представительна, необходимо 20-40 семян для посева каждой семьи. Если посев M_2 ведется смесью семян без разделения на семьи, то достаточно взять из каждого соцветия (например, колоса) по два зерна. Популяция будет компактна, хорошо обзрима и удобна для выделения мутантов, хотя имеется риск потери части мутантов в связи с возможной химерностью соцветий.

Поскольку есть возможность выделения мутантов и в M_3 , если они не проявились в M_2 , посев каждой семьи следует повторить, взяв для этой цели часть семян. Особенно это касается полиплоидов, у которых выщепление мутантных форм может быть задержано из-за сложности генома, и перекрестников из-за маскировки мутантных аллелей немутантными вследствие постоянного переопыления.

Итак, при определении объемов семей и популяции нужно иметь в виду, что увеличение числа семей дает больший эффект при выделении мутаций, чем увеличение числа растений в семье. Если мутация возникла, то вероятность проявления ее в семье велика (значительно больше шансов на возникновение нехимерного соцветия, чем химерного). Следовательно, поиск должен

быть направлен в основном на обнаружение мутантных семей, а не отдельных мутаций внутри семьи.

Задача определения частоты мутаций при использовании того или иного мутагена (равным образом и режима обработки) целью практической селекции не является. Но для того, чтобы дать селекции рекомендации по наиболее результативному применению мутагенов, исследования в этом направлении осуществляются. Здесь есть одна методическая проблема: к чему отнести количество обнаруженных мутаций? Их можно рассчитывать на 100 семей в M_2 . Это то же самое, что расчет на 100 растений или соцветий в M_1 . Первое достаточно надежно ориентирует селекцию в отношении количества семян для обработки. Второе учитывает своеобразное понятие семьи в мутантной популяции, о котором говорилось выше, и биологически более точно. Еще точнее расчет на 100 растений в популяции M_2 , поскольку можно полагать, что это число соответствует числу инициальных клеток, подвергшихся мутагенному воздействию. Конечно, если взять только те инициалии, которые были в момент обработки мутагеном, придется допустить, что каждая из них даст примерно равное число мегаспор, а значит, семян и растений в M_2 (считаем, что доля абортивных мегаспор во всех случаях одинакова). В семье растения с одинаковой мутацией следует считать за одно, так как возникли они в результате одной мутации в инициальной клетке. Естественно, что в M_1 можно учесть только выход доминантов.

Мутагенез может сочетаться с гибридизацией, это расширяет формообразовательный процесс. Можно облучать пыльцу отцовского сорта, обрабатывать мутагенами родительские формы или первое либо второе гибридное поколение. Совместное использование мутагенеза и гибридизации определяется тем, что гибриды более мутабильны, чем линии. При осуществлении гибридизации не исключено, что какой-то признак у родительских форм селекционера не устраивает. Можно попытаться исправить положение с помощью мутагенеза, обработав полученные гибриды, и тем сэкономить время. Гибридное и мутантное поколения нужно совместить: $F_2 M_2$, $F_3 M_3$. Так, в Болгарии был выведен сорт твердой пшеницы Гергана и мягкой озимой пшеницы Златоструй из гибридов, обработанных мутагенами. Сорт льна-долгунца Заря 87 получили после обработки гибридного материала этиленмином.

Мутагенез может сочетаться с биотехнологическими методами. Так называемые соматональные вариации или соматональная изменчивость есть не что иное, как продукты спонтанного мутагенеза в культуре клеток и тканей. Очевидно, частота мутаций многократно возрастает в условиях обособления клеток и агрегатов клеток. В одном из опытов обрабатывали семена риса мутагенами, а параллельно получали растения-регенеранты из культуры тканей, и в последнем варианте мутантов оказалось вдвое больше. Получение мутантов в виде соматоклонов широко применяется у сахарного тростника.

Появление соматональных вариантов можно интенсифицировать, облучая культуру клеток или тканей либо добавляя в культуральную среду мутаген. Способ особенно перспективен, если при обычном индуцированном мутагенезе возникающие мутантные клетки обладают сильно пониженной конкурентоспособностью и, следовательно, будут вытесняться нормальными клетками или если эти клетки возникают в тканях, не участвующих затем в образовании археспория. Так, у петунии мутации, обуславливающие антоциановую окраску, возникают, как правило, в эпидермисе, который в образовании гамет не участвует.

7. Плейотропия и отрицательные корреляции как факторы, ограничивающие получение мутантных форм

Исходным материалом для мутагенеза служат сорта и формы, обладающие комплексом хозяйственно ценных признаков. Как отмечено, при мутагенезе меняется небольшая часть генетического материала и поэтому надеяться получить хозяйственно ценный сорт из образца, имеющего много недостатков, не стоит. С другой стороны, изменение одного гена еще не означает изменение одного свойства. Здесь имеется в виду не только плейотропия в классическом виде (контроль геном более одного признака), но и корреляции, которыми связаны различные характеристики. Ситуация та же, что и при гибридизации: улучшая какую-то характеристику сорта, рискуют ухудшить другую.

В Тимирязевской сельскохозяйственной академии проводилась работа, целью которой было улучшение хлебопекарных качеств отличного в других отношениях сорта яровой пшеницы с помощью мутагенеза. Было выделено около 400 мутантных семей и получены формы с отличными хлебопекарными качествами, но ни одна из них не повторила полностью фенотип исходного сорта, хотя некоторые были близки к нему. Более того, все они частично утратили ценные хозяйственные свойства исходного сорта: иммунитет, устойчивость к полеганию и т. д. Это, разумеется, не значит, что нельзя добиться общего улучшения сорта, как и при гибридизации, путем разумных компромиссов или подбором более подходящего исходного материала.

С помощью мутагенеза можно изменять различные свойства растений. Но в практике селекции одни свойства в результате мутации возникают чаще, чем другие. Это зависит в том числе от степени трудности их выделения из популяции. Действительно, мутацию короткостебельности легче выделить, чем мутацию высокой продуктивности или мутацию с высоким содержанием белка.

Генофонд некоторых культур, например узколистного люпина, сравнительно беден, поэтому применение мутагенеза для создания новых форм растений имеет первостепенное значение. Полученные в результате мутагенеза

новые хозяйственно ценные формы сельскохозяйственных растений могут быть использованы непосредственно в качестве сортов-мутантов. Примеры использования в селекции индуцированных мутантов многочисленны. Уже упоминался первый мутантный сорт ячменя Паллас, полученный из сорта Бонус в Швеции, отличавшийся более устойчивым к полеганию стеблем. В Институте цитологии и генетики Сибирского отделения РАН путем гамма-облучения создан сорт яровой пшеницы Новосибирская 67, более устойчивый к полеганию, чем исходный сорт Новосибирская 7. В Англии из сорта ячменя Проктор получен короткостебельный мутант. В Московской сельскохозяйственной академии – радиомутант люпина узколистного Ладный, не имеющий бокового ветвления (детерминантная форма). Он дает семена только на главной кисти, что обеспечивает их одновременное созревание и позволяет так выбрать время уборки, чтобы потери были минимальными.

Длина вегетационного периода также часто изменяется в результате мутаций. Полученный одновременно с мутантным ячменем Паллас из того же сорта Бонус мутантный сорт Мари, был скороспелее исходного сорта. Упомянутый выше детерминантный сорт узколистного люпина Ладный также скороспелее сорта Немчиновский 846, из которого он был получен. Раннеспелые мутанты созданы также у овса, льна, арахиса, гороха, кукурузы. С другой стороны, известны позднеспелые мутанты. В КНИИСХ получен очень позднеспелый мутантный сорт овса Зеленый.

С помощью мутагенеза удалось создать ряд сортов, отличающихся высоким качеством продукции. Так, упомянутый выше мутантный сорт Новосибирская 67, в отличие от исходного сорта, является сильной пшеницей. В Индии путем мутагенеза было значительно увеличено содержание белка в зерне у сорта пшеницы Сонора 64. В Японии выведен короткостебельный сорт – мутант ячменя Гамма 4 с отличными пивоваренными качествами. В ряде стран получены желтолистные мутантные табаки, у которых хлорофилл разрушается в листьях к моменту ломки и ферментация проходит в два раза быстрее, чем у обычных. С помощью мутагенеза удалось довести волокно средневолокнистого хлопчатника до качественных показателей тонковолокнистого. Интересные мутанты вики получены в Центральном сибирском ботаническом саду. Они отличаются пониженным содержанием характерных для бобовых ингибиторов пищеварительных ферментов. Кормовая ценность их более велика, чем у обычных сортов. Во ВНИИ масличных культур химическим мутагенезом был получен сорт подсолнечника Первенец, в масле которого олеиновый компонент занимает до 75%, не уступая по этому показателю лучшему из растительных масел – оливковому.

Большую ценность представляют мутанты, устойчивые к болезням и вредителям. Селекция в этом направлении трудна, в частности из-за недостатка хороших доноров, и получить последние можно с помощью мутагенеза. Еще в начале мутационной селекции в Свалефе (Швеция) была создана серия рецессивных мутантных аллелей, обуславливающих устойчивость

к мучнистой росе ячменя. В США путем мутагенеза получен устойчивый к корончатой ржавчине сорт овса Флорад. В Украинском и Белорусском НИИ земледелия – мутантные сорта желтого люпина, относительно устойчивые к фузариозному увяданию – болезни, селекция на устойчивость к которой сопряжена с большими трудностями. В Австрии выведен мутант ячменя Виена, устойчивый к мучнистой росе. Известны мутации пшеницы, устойчивые к твердой головне и мучнистой росе, кукурузы – к пузырчатой головне, африканского проса – к ложной мучнистой росе. В Латвии из сорта картофеля Агро получен мутант, устойчивый к парше. В институте Магарач – мутант винограда, устойчивый к корневой тле (филлоксере).

Меньше известны мутанты, устойчивые к неблагоприятным абиотическим условиям. Но и такие мутанты получены. В Ростовском государственном университете получен засухоустойчивый мутант подсолнечника, в Мордовском университете – холодостойкие мутанты проса, в КНИИСХ – зимостойкий озимый ячмень Дебют.

Несмотря на трудности, связанные с выделением высокоурожайных мутантных форм, в США химическим мутагенезом получен высокоурожайный короткостебельный сорт Лютер. Очень высокой урожайностью зеленой массы отличается сорт упомянутый выше овса Зеленый, который возделывается на зеленый корм. На Нарымской селекционно-опытной станции выведен мутантный сорт овса Белозерный с высоким потенциалом урожайности, в Башкирском НИИСХ – высокоурожайный мутантный сорт гороха Агидель. Необычайно продуктивный мутант картофеля получен из сорта Ранняя роза в Институте цитологии и генетики СО АН СССР. У этого мутанта зарегистрирован клубень массой 1,7 кг (всего этот куст дал 3,2 кг клубней). Хотя такой картофель не может быть использован в производстве (из-за чрезмерно большого размера клубня), этот пример хорошо демонстрирует возможности метода индуцированного мутагенеза.

Благодаря мутагенезу можно решать некоторые специальные задачи — например, ослаблять отрицательные корреляции между хозяйственно полезными свойствами.

Известно, что крупность зерна и процент белка в нем коррелируют отрицательно. Однако с помощью мутагенеза В. М. Шевцову в КНИИСХ удалось получить крупнозерные высокобелковые формы ячменя. В Воронежском ГАУ успешно применили химический мутагенез для преодоления отрицательной корреляции «высокая урожайность – высокая зимостойкость» у озимой пшеницы. Даже такая тесная связь, как «большая масса корня сахарной свеклы – низкое содержание сахара» может быть ослаблена мутационной селекцией. Мутантным путем могут быть получены гены мужской стерильности, что имеет большое значение при переводе сельскохозяйственных культур на гибридную основу. Поскольку при мутагенезе, в отличие от гибридизации, геном исходного образца полностью не меняется (только отдельные признаки), этим методом можно создать сорт быстрее. Кроме того, с помощью мутагенеза можно получать такие изменения, которые не дает гибридизация (примером может служить появление высокоолеинового мутанта подсолнечника, о котором сказано выше). Но результат применения мутагенеза еще менее предсказуем, чем результат гибридизации, поэтому последняя используется чаще.

Довольно часто полученные мутанты не могут быть сразу использованы в качестве родоначальника нового сорта, но обладают какими-либо признаками и свойствами, делающими такие мутантные формы ценным ИМ для селекционной работы. Возможность получить необходимый признак на фоне хозяйственно ценного генотипа породила и другую ветвь экспериментального мутагенеза — получение доноров важных в хозяйственном отношении свойств. Такие формы в дальнейшем вовлекаются в гибридизацию с целью передачи этих признаков и свойств существующим сортам. Так, в Дании была получена серия мутантов ячменя с высоким содержанием лизина в белке. Один из них – Ризо-мутант 1508 – используют в селекции как донор высоколизинового. Он обладает геном высокого содержания лизина *lys3a*. В КНИИСХ был выведен короткостебельный мутант из получившего мировую известность сорта озимой пшеницы Безостая 1 – Краснодарский карлик 1. Данный мутант несет ген короткостебельности *Rht 11*. С его участием создан ряд сортов озимой пшеницы: Одесская полукарликовая, Прогресс, Питикул, Одесская 75, Московская низкостебельная и др. В

результате применения в скрещиваниях мутантного сорта Темп созданы новые сорта ячменя Каскад и Курьер; с использованием ряда мутантных линий – сорта ячменя Аккорд и Радикал.

Мутантные линии широко применяются в селекции гибридов кукурузы. С их участием получены гибриды Юбилейный Т60, Черкасский 30ТВ, Коллективный 100ТВ, Коллективный 244МВ и др.

В гибридизации используют и мутантные сорта, не обладающие каким-либо определенным донорским свойством, но показывающие хорошую сортообразующую способность. Так, чешский мутантный сорт ячменя Диамант вошел в родословную более чем 15 новых сортов. Мутантный сорт желтолистного табака Американ 181 стал родоначальником трех сортов этой культуры. Сорт-мутант ярового ячменя Темп использован при выведении сортов Каскад и Курьер.

1.4.5. Полиплоидия в селекции растений

Вопросы.

1. Виды полиплоидов в природе, их полезные свойства
2. Способы получения полиплоидов
3. Основные недостатки получаемых полиплоидов и способы их устранения
4. Успехи полиплоидной селекции. Гаплоидия.

1. Виды полиплоидов в природе, их полезные свойства

Одним из методов создания популяций для отбора является индуцированное изменение числа хромосом у селекционируемой культуры – полиплоидия. Это может быть кратное увеличение модального (основного) числа хромосом внутри вида – автополиплоидия, не кратное изменение их числа – анеуплоидия или гетероплоидия, объединение геномов различных видов – аллополиплоидия. Все эти виды изменения числа хромосом используются в селекции. Но, когда говорят о полиплоидии в селекции, имеют в виду, как правило, автополи- и анеуплоидию.

Аллополиплоидия входит в качестве составной части в метод отдаленной гибридизации и рассматривается там.

Специфическим является метод гаплоидии – получения и использования гаплоидов – растений с одинарным (n) числом хромосом, который используется в различных селекционных программах.

Первым индуцированным автополиплоидом была, по-видимому, водоросль спирогира. В 1890 г. русский ботаник И. И. Герасимов, воздействуя на этот объект низкой температурой и некоторыми наркотическими веществами, добился увеличения размера клеточных ядер. Позднее было установлено, что эти изменения клеток связаны с увеличением числа хромосом, и по предложению Г. Винклера их стали называть полиплоидией.

В дальнейшем полиплоиды получали эпизодически у разных объектов с помощью различных воздействий, в частности из клеток каллуса, который образуется на срезе побега. И только после обнаружения в 1937 г. А. Ф. Блексли и О. Т. Эйвери полиплоидизирующего действия алкалоида колхицина стало возможным массовое получение полиплоидов, поскольку колхицин обеспечивал надежный эффект удвоения числа хромосом. Колхицин добывается из цветущего осенью растения безвременник осенний (*Colchicum autumnale* L.). Он представляет собой желтый порошок, химически инертный и легко растворимый в воде, этаноле и других растворителях. Колхицин блокирует в делящихся клетках действие веретена деления, хромосомы не расходятся к полюсам, в результате чего число их в клетке удваивается.

Спонтанные полиплоиды широко распространены в природе, образуя иногда в пределах рода целые ряды видов, отличающихся числом хромосом. Многие культурные растения являются полиплоидами (как авто-, так и алло-): мягкая и твердая пшеницы, овес посевной, просо, картофель, люцерна, яблоня, слива, банан, земляника и др. То обстоятельство, что внутри рода виды с большим числом хромосом урожайнее, чем виды с меньшим их числом, и имеют более крупные плоды (можно сравнить, например, мягкую пшеницу и однозернянку, овес посевной и овес песчаный, сливу и терн), говорит о хозяйственном преимуществе полиплоидов. А большой процент полиплоидных видов в местах с суровыми климатическими условиями – о высокой адаптивности. Поэтому усилия селекционеров по созданию полиплоидных сортов можно представить как осознание этих природных закономерностей и стремление использовать их в селекции.

Экспериментально полученные полиплоиды отличаются более крупными размерами органов растений, в частности, цветков (что представляет интерес для декоративных культур) и плодов. Что касается адаптивности, то никакого выигрыша в селекции экспериментальная полиплоидия не дала, поскольку речь не идет о каких-то чрезвычайно экстремальных условиях. Однако во многих случаях у полиплоидов отмечается увеличение содержания ценных веществ: витаминов, алкалоидов.

Далеко не все экспериментально полученные полиплоиды отличаются ценными

хозяйственными свойствами. В связи с этим говорят об оптимальном уровне пloidности, и таковым, например, для ржи является тетраплоид. То же наблюдается у турнепса, клевера лугового. Дальнейшее увеличение числа хромосом у этих культур ведет к снижению продуктивности и урожайности.

Оптимальный уровень пloidности может рассматриваться и с позиции содержания полезных веществ. Так, для перечной мяты (содержание масла), сахарной свеклы (содержание сахара), опиумного мака (содержание морфина в комплексе алкалоидов) оптимальный уровень пloidности – триплоид.

Отмечено высокое содержание витамина С в плодах триплоидной яблони, сочетание большой массы корня и высокого содержания сахара в нем у триплоидной сахарной свеклы, высокая сахаристость у триплоидного арбуза.

У видов, имеющих высокий уровень пloidности, хотя бы и достигнутый за счет объединения геномов разных видов (мягкая и твердая пшеницы, слива и др.), получение полиплоидов выигрыша не дает, они отличаются более низкой урожайностью по сравнению с исходными формами. С другой стороны, культуры самоопылители с невысоким числом хромосом (горох, ячмень) также не дают высокоурожайных тетраплоидов по причине низкой завязываемости семян.

В селекции практикуется создание тетраплоидов и триплоидов, более высокая степень пloidности обычно успеха не имеет.

Автополиплоиды с нечетным числом геномов создаются путем гибридизации. Так, триплоиды получаются от скрещивания диплоидов и тетраплоидов. Однако получение их не всегда возможно: у ржи, например, триплоидные зародыши погибают на ранних этапах развития.

2. Способы получения полиплоидов

Существует ряд способов получения тетраплоидов – речь идет о тетраплоидах как о наиболее типичном случае, хотя при получении других полиплоидов с кратным четырем числом геномов, применяются те же способы. Другие автополиплоиды получают путем скрещивания.

Наиболее часто обрабатывают колхицином проростки семян или точки роста молодых растений. Последний способ не может быть применен к однодольным злакам, поскольку у них точки роста защищены свернутыми листовыми пластинками, его используют на свекле, гречихе и некоторых других объектах.

Обычно готовят маточный 2%-ный раствор колхицина и по мере надобности разбавляют его до концентрации рабочего раствора. При обработке проростков семян используют 0,01-0,2%-ный, а при обработке точек роста – 0,5-2%-ный водный раствор колхицина.

Проросшие семена погружают в раствор колхицина таким образом, чтобы раствор смачивал ростки, но не попадал на корешки. Корешки под действием колхицина погибают, и растение дальше не может развиваться. Технически это осуществляется следующим способом. Семена проращивают на сетке, а затем переворачивают ростками вниз, корешками вверх и помещают ростки в раствор колхицина, залитый, например, в чашку Коха, а корешки защищают от высыхания, прикрыв стеклом или чашкой Петри. С мелкими семенами (например, клевера) поступают еще проще, используя вместо сетки фильтровальную бумагу, на которой они проращиваются.

При обработке точек роста используют капельный метод или метод тампонов. Капельный метод заключается в том, что на точку роста периодически, обыкновенно с интервалами в 3-4 ч, наносят каплю раствора колхицина, лучше с прилипателем. Особенно удачным считается смола растения трагокант, которая обладает способностью после высыхания вновь набухать при увлажнении. Обыкновенно операцию прерывают в ночные часы не только для отдыха работников, но и для того, чтобы растения оправились от действия колхицина, который действует угнетающе на процессы их жизнедеятельности. Обработку проводят в течение нескольких дней.

Метод тампонов отличается от капельного только тем, что на точку роста помещают

тампон, смоченный раствором колхицина.

Во всех случаях обработку ведут при умеренной температуре, достаточно высокой влажности воздуха и не на прямом солнечном свете (растения притеняют).

Первое после обработки колхицином поколение обозначается как C_0 (от слова *Colchicum*). Последующие поколения обозначают как C_1 , C_2 и т. д. Нет никакого основания для того, чтобы обозначить поколение, в котором ведется воздействие мутагеном (колхицин – это тоже мутаген), в одном случае как M_0 (в случае точковых и хромосомных мутаций), а в другом – как C_0 . Приходится ссылаться просто на то, что «так принято».

Поэтому необходимо, чтобы обнаруженные полиплоиды подтвердили свою природу на поздних этапах онтогенеза. Отчасти поэтому идентификация полиплоидов ведется в два этапа – по косвенным признакам и путем подсчета числа хромосом. Главная же причина такой двухэтапной оценки заключается в трудоемкости цитологической оценки путем подсчета хромосом на препаратах, полученных из тканей эпидермиса листа. Поэтому целесообразно проводить ее на материале, который уже первоначально зарекомендовал себя как полиплоидный. Первичная оценка ведется по косвенным признакам. Растения-полиплоиды имеют более крупные и более темные листья, иногда гофрированные. Далее о полиплоидной природе можно судить по числу хлоропластов в замыкающих клетках устьиц, что уже требует применения микроскопа, потом – по величине пыльцевых зерен и количеству пор в пыльце. Во всех этих случаях полиплоиды имеют более высокие показатели, чем диплоиды.

В C_1 химерности быть не должно, поскольку каждое растение происходит из одной клетки. Но здесь и в последующих поколениях бывают случаи реверсии – возврата на диплоидный уровень. Такие реверсивные диплоиды, как правило, по генотипу отличаются от исходных и могут рассматриваться как своеобразный исходный материал для селекции.

3. Основные недостатки получаемых полиплоидов и способы их устранения

Первично полученные полиплоиды называют сырыми полиплоидами. Они обладают самым большим недостатком автополиплоидов – низкой семенной продуктивностью, что связано с нарушениями в мейозе. У тетраплоида в метафазе мейоза могут образоваться два бивалента гомологичных хромосом, и это благоприятный случай: расхождение хромосом дает жизнеспособные диплоидные гаметы. Но могут образоваться квадριваленты (в ядре образуется вместо двух четыре гомологичные хромосомы). Нормальное распределение хромосом обеспечивается расхождением их попарно, что происходит не всегда: к одному полюсу могут отойти три хромосомы, к другому – одна. Наконец, при образовании тривалента и унивалента тоже возможно несбалансированное расхождение хромосом. Поскольку в геноме присутствует несколько групп гомологичных хромосом, то вероятность получения сбалансированных гамет значительно меньше, чем при рассмотрении только одной группы.

Значение пониженной семенной продуктивности полиплоидов для той или иной сельскохозяйственной культуры неодинаково. Если это вегетативно размножаемая культура, например какая-либо из плодовых, пониженная семенная продуктивность не имеет никакого значения. Роль ее у культур, размножаемых семенами, определяется тем, являются ли семена продукционной частью урожая, как у ржи и гречихи, или служат только посевным материалом. Понятно, что пониженная семенная продуктивность у тетраплоидной гречихи и ржи чревата недобором урожая. Во втором случае важны коэффициент размножения и норма высева. При очень большом коэффициенте размножения и невысокой норме высева у турнепса недобор определенного количества семян несуществен. Однако если взять клевер, для которого проблема семян стоит остро даже у диплоидных сортов, пониженная семенная продуктивность – серьезный порок. Попутно нужно отметить, что у клевера полиплоидия удлиняет трубку венчика цветка, что создает дополнительные препятствия для опыления насекомыми. Нужно отметить, что равный по массе урожай семян диплоидного и тетраплоидного клеверов, который может быть достигнут селекцией тетраплоидного клевера, еще не означает их равной семенной продуктивности. Масса 1000 семян у тетраплоида больше, семена крупнее, а значит, количество семян в одном килограмме или иной единице массы у тетраплоида меньше.

Мейотические тетраплоиды (т. е. полученные при воздействии колхицина на мейоз), как было замечено, меньше снижают семенную продуктивность, чем митотические, возможно, потому, что не разошедшиеся в мейозе хромосомы и в дальнейшем образуют пары, биваленты. Но получение их затруднено тем, что необходимо воздействовать колхицином на археспориальную ткань в период образования гамет, а она хорошо защищена от внешних воздействий. Кроме того, надо, чтобы диплоидными оказались и женские, и мужские гаметы. Можно использовать половинчатое решение, применяя унивалентные скрещивания – диплоидов и тетраплоидов. Они дают, как уже отмечено, триплоиды, которые в первом поколении семян не образуют, поскольку триваленты родительских хромосом не могут разделиться в анафазе мейоза поровну и гаметы оказываются несбалансированными – нежизнеспособными. Если семена тем не менее образуются, значит это не триплоид, а тетраплоид, возникший в результате спонтанного появления у диплоида нередуцированных гамет (в мейозе не произошло расхождения хромосом к полюсам). Таким образом, эти растения наполовину происходят от митотического тетраплоида, а наполовину – от мейотического.

Увеличить семенную продуктивность сырых тетраплоидов можно путем неоднократного отбора, направленного на увеличение этого признака. Но такой отбор успешен при условии непрерывной рекомбинации генетического материала, свойственной перекрестникам. Вот почему полиплоидная селекция оказалась успешной только у перекрестноопыляющихся культур. Чтобы убедиться в этом, достаточно перечислить культуры, у которых получены тетраплоидные сорта: рожь, гречиха, клевер, турнепс.

Полиплоиды легко получают и у самоопылителей. Известны тетраплоидные ячмень, горох. Но сортов, которые бы использовались в производстве, среди них нет, слишком они низкоурожайны из-за пониженной семенной продуктивности.

Таким образом, с полиплоидами дело обстоит совершенно иначе, чем с мутациями. Мутационная селекция, за редким исключением, дает сорта только самоопылители из-за сложности выявления и стабилизации мейоза мутантов у перекрестноопыляющихся культур. Селекция полиплоидов дает сорта преимущественно перекрестников.

Триплоиды, как было отмечено, тоже используются в современной селекции. Часто это многолетние вегетативно размножаемые культуры (плодовые, лесные породы), для которых бесплодие триплоидных форм не имеет значения. Но среди используемых в производстве триплоидов также есть одно-, двулетние культуры, размножаемые семенами. Это всегда гибриды тетраплоидов и диплоидов, каждый раз получаемые заново. Особенным успехом пользуется триплоидная сахарная свекла и триплоидный арбуз. Выигрыш здесь в более высоких сборах сахара с гектара у сахарной свеклы, в более высокой сахаристости арбуза (триплоидный арбуз ценен еще и отсутствием семян). Идея создания триплоидных гибридов сахарной свеклы принадлежит русскому ученому А. Н. Луткову. Первым был Кубанский полигибрид 9, а затем появился ряд других триплоидных гибридов. Триплоидный арбуз был получен японским генетиком Кихара.

Получение семян триплоидов и возделывание их имеют некоторые особенности. Так, высадка корней сахарной свеклы для получения триплоидных семян производится в отношении три тетраплоида к одному диплоиду, поскольку пыльца диплоида более активна. В результате перекрестного опыления, которое идет не только между диплоидами и тетраплоидами, но и внутри этих групп, получается смесь триплоидных, диплоидных и тетраплоидных семян – анизоплоидная популяция. При посеве таких семян процент триплоидных растений постепенно возрастает в силу того, что триплоиды отличаются большей мощностью и при прорывке (шаровке) остаются в посеве, в то время как диплоидные и тетраплоидные растения элиминируются. Считается, что приемлемым показателем является уже 50%-ное присутствие триплоидных семян в популяции. К концу вегетации триплоидные растения занимают примерно 3/4 посева.

При выращивании триплоидных арбузов цветки их приходится опылять пылью диплоидов – без этого плоды не развиваются.

4. Успехи полиплоидной селекции. Гаплоидия.

Селекция автополиплоидов дала сельскому хозяйству целый ряд сортов ржи, гречихи, клевера и других культур, не считая тетра- и триплоидных сортов яблонь, груш, бананов.

Первая тетраплоидная рожь была создана русской исследовательницей Л. П. Бреславец, а первый коммерческий сорт Стил – шведскими селекционерами. Впоследствии появились и другие сорта, в том числе и созданные путем гибридизации тетраплоидов.

Первый сорт тетраплоидного клевера Тетраалсайк был выведен в Швеции. Сейчас тетраплоидных клеверов довольно много: Тетра ВИК, Темп, Тетраплоидный ВИК, Тимирязевец и др.

Тетра- и триплоидных сортов яблонь и груш довольно много в США, Канаде и других странах. Сорт триплоидного банана Кавендиш занимает основные площади под этой культурой.

Нельзя отдать абсолютного предпочтения полиплоидным сортами и гибридам перед диплоидными. Успехи селекции в выведении то тех, то других меняют соотношение их в сортименте. В 1960–1970/х гг. селекция тетраплоидов ржи испытала настоящий взлет. Но тетраплоидные сорта не вытеснили диплоиды. Напротив, успехи селекции последних потеснили тетраплоидные сорта. Тем временем развернулась селекция гетерозисных гибридов ржи, которые в Германии, например, заменили обычные сорта.

Многое зависит и от культуры. Триплоидные гибриды сахарной и кормовой свеклы вытесняются межлинейными гетерозисными гибридами, тетраплоидный клевер и тетра-, триплоидные плодовые сохраняют и укрепляют свои позиции. Хороший пример динамики площадей под влиянием успехов селекции представляет амфидиплоид ржи и пшеницы — тритикале. После получения первых коммерческих сортов эта культура заняла в мире примерно 1 млн га. Затем площади начали уменьшаться, поскольку обнаружилась нестабильность урожаев, заметно снижавшихся в неблагоприятные годы. После создания сначала в Польше, а затем и в других странах новых, более устойчивых сортов, площади под тритикале вновь начали увеличиваться.

Гаплоиды – организмы, которые содержат одинарное число хромосом. Нормальный мейоз у них невозможен, поскольку отсутствуют гомологи в хромосомном наборе и, следовательно, мейоз протекает с нарушениями: биваленты в метафазе не образуются, а значит, не могут возникнуть и нормальные гаметы. Гаплоиды не образуют семян. Но если их полиплоидизировать, плодовитость восстанавливается и при этом образуются гомозиготы. Это обстоятельство и применяется в селекции: за очень короткое время можно получить «чистые линии» у перекрестников и использовать их в качестве самоопыленных линий, что практикуется сейчас в селекции гетерозисных гибридов. В обычной селекции самоопылителей, где работа с гибридными поколениями требует получения чистопородного материала, гаплоиды позволяют избавиться от гетерозигот уже в первом поколении.

Есть еще одно важное преимущество использования гаплоидов в селекции растений: применение гаплоидии позволяет существенно сократить объем гибридной популяции без ущерба для результативности отбора. Чтобы продемонстрировать это, воспользуемся обычной моделью – дигибридным скрещиванием. Если это гаплоид, он способен образовать четыре генотипа (разумеется, после полиплоидизации), т. е. столько, сколько видов гамет дает дигибрид. Если же это – диплоид, то согласно решетке Пеннета, в F_2 она имеет $4 \times 4 = 16$ клеток. Но это не значит, что диплоид способен в F_2 дать 16 генотипов. Здесь генотипы повторяются. Во-первых, вся диагональ сверху справа до снизу слева заполнена одним генотипом – гетерозиготой. Во-вторых, есть повторения (по одному разу) других генотипов. И только вторая диагональ заполнена неповторяющимися генотипами.

Можно убедиться, что и три- и тетра- и скрещивания с большим числом локусов дают такую же картину. Число «независимых» генотипов в скрещиваниях разной аллельности подчиняется формуле $H = x/2 + 1$, где x – степень гибридности. Отсюда число генотипов у дигаплоида в F_2 после полиплоидизации равно $2H - 1$.

Таким образом, гаплоидия позволяет обходиться гораздо более малочисленными популяциями. И, действительно, сорта ячменя, полученные с помощью гаплоидов, это

подтверждают. Популяция, из которой были получены первые в СССР дигамплоидные сорта Исток и Одесский 115, состояла всего из 41 элитной линии.

Гамплоиды могут быть успешно применены и при отдаленной гибридизации, если родительские формы кратно отличаются числом хромосом. Так, перевод картофеля на гамплоидный уровень позволил получить гибриды в достаточном количестве при скрещивании *S. tuberosum*, тетраплоидом, имеющим 48 хромосом с *S. ruginii* (24 хромосомы).

1.4.6. Использование нехромосомной наследственности в селекции на гетерозис

Вопросы.

1. Преимущества гетерозисных гибридов F_1
2. Перевод сельскохозяйственных растений на гибридную основу. Типы гибридов
3. Методы создания самоопыленных линий
4. Определение комбинационной способности линий
5. Способы улучшения самоопыленных линий
6. Способы получения гибридных семян в промышленном объеме

1. Преимущества гетерозисных гибридов F_1

Гетерозис, как известно из курса генетики, представляет собой увеличение продуктивности растений в результате гетерозиготности. Увеличивается не только продуктивность, но и адаптивность, устойчивость к неблагоприятным условиям внешней среды. Все это ведет к росту урожайности, что и составляет ценность этого явления для селекции. Идея использования гетерозиса у растений для увеличения урожая возникла свыше 250 лет назад. Ее высказал еще в 1760 г. немецкий ботаник Й. Г. Кельрейтер – адъюнкт Петербургской академии наук. Он проводил опыты по скрещиванию различных видов табака и обнаружил, что по размерам вегетативных органов (стеблей и листьев) гибриды намного превосходят родительские формы. На основании этих опытов ученый разработал схему получения высокоурожайных межвидовых гибридов первого поколения табака для одноразового использования в производстве. Однако только по прошествии 200 лет эта идея была реализована первоначально на кукурузе американскими исследователями (Д. Билл, Г. Шелл, Д. Джонс), а затем и на других культурах во многих странах.

У самоопыляющихся культур гетерозис в наибольшей степени проявляется в первом гибридном поколении, где все растения гетерозиготны. В последующих поколениях уровень гетерозиса снижается вследствие расщепления и появления гомозигот по локусам, которые в F_1 были гетерозиготными.

У перекрестноопыляющихся культур преимущество первого гибридного поколения перед родительскими формами обычно выражено в меньшей степени, чем у самоопылителей, поскольку родители гетерозиготны. Селекция, тем не менее, нашла способ увеличить гетерозис первого поколения и у перекрестников, используя для этого линии, полученные путем многократного принудительного самоопыления и отбора. Использование гетерозиса F_1 ввело в практику возделывания сельскохозяйственных культур, помимо сортов, гетерозисные гибриды. Семена их для товарных посевов приходится каждый раз получать заново, что означает дополнительные затраты в этом своеобразном семеноводстве по сравнению с семеноводством обычных сортов, которые при определенных условиях с лихвой окупаются стоимостью дополнительной продукции. Здесь есть и другие плюсы. Гетерозисные гибриды перекрестноопыляющихся культур, поскольку это F_1 , полученные от практически гомозиготных линий, значительно более выровнены по признакам и свойствам, чем сорта, что делает их технологичнее при возделывании и уборке. Они позволяют легко объединять хозяйственно ценные свойства родительских форм (в рамках особенностей их наследования), поскольку при использовании только первого поколения расщепления не наблюдается.

Родительские формы, которые необходимы для получения гибрида, находятся у селекционера, поэтому без его ведома никто семена гибрида получить не может. Отпадает необходимость в защите этого селекционного достижения от незаконного использования, которая вынуждает владельцев сортов получать на них патенты и заключать лицензионные договоры с семеноводческими хозяйствами на предмет получения денежного вознаграждения (роялти) за использование сорта. В случае гибридов стоимость их входит в стоимость семян.

Селекция использует гетерозис в ряде случаев и в обычных селекционных программах по созданию сортов. Так, сорта вегетативно размножаемых культур могут быть гетерозиготны, и в

известной мере урожайность их основывается на гетерозисе. Это картофель, топинамбур, сахарный тростник, плодовые и ягодные культуры. При получении новых генераций посадкой клубней, размножении отводками или путем прививок уровень гетерозиса сохраняется, поскольку расщепление отсутствует. Урожайность сортов перекрестноопыляющихся культур, размножающихся семенами, также зависит от гетерозиса, поскольку они популятивны и гетерозиготны. Но здесь примерно постоянный уровень гетерозиса поддерживается за счет панмиксии, все время «поставляющей» в популяцию гетерозиготы. Хотя в разобранных случаях селекция тоже создает определенный гетерозисный эффект, но под понятием «селекция на гетерозис», или «гетерозисная селекция», понимаются только выведение гибридов F_1 , семена которых для новой генерации нужно получать каждый раз заново.

2. Перевод сельскохозяйственных растений на гибридную основу. Типы гибридов

Замену сортов гетерозисными гибридами принято называть переводом культуры на гибридную основу. Чтобы он был успешным, требуется выполнение ряда условий. Нужны эффективные и нетрудоемкие методы эмаскуляции (элиминации мужских генеративных органов) у материнской формы гибрида. Отцовская форма должна иметь достаточно большую пыльцевую продуктивность, в особенности если гибридизация проводится методом свободного опыления. У культур, в плодах которых после опыления формируется большое число семян, бывает принудительное опыление (томаты, табак и др.). Цветки материнской формы должны хорошо опыляться и иметь высокий процент завязывания гибридных семян. Материнские и отцовские формы – совпадать по времени цветения. Необходим достаточно высокий и стабильный уровень гетерозиса, последнее условие особенно важно для культур сплошного сева, так как в густом посеве гетерозис проявляется слабее. В результате затраты на получение гибридных семян не только окупаются, но и принесут прибыль. То, что названные условия далеко не всегда удается удовлетворить, показывают многочисленные примеры. У многих культур проблема массового получения гибридных семян не решена по различным причинам, чаще всего из-за отсутствия эффективных методов эмаскуляции. Ясно, что ручная кастрация у культур с обоеполюми цветками, в плодах которых формируется только одно семя (пшеница, ячмень, овес, просо и др.), для этой цели абсолютно не подходит, а другие способы в настоящее время либо не найдены, либо ненадежны.

При попытке создать гибридный лен на основе цитоплазматической мужской стерильности селекционеры столкнулись с эффектом изменения в морфологии цветка (трубчатость, мелкоцветковость), которые мешают энтомофильному опылению. Материнские линии ячменя с таким же типом стерильности оказались слишком позднеспелыми по сравнению с раноцветущими отцовскими формами. Пшеница и рожь дают в сомкнутом посеве гораздо меньший гетерозис, чем при посеве широкорядном (впрочем, экономически приемлемом). Трудности перевода многих культур на гетерозисную основу не являются фатальными: селекция ищет пути их преодоления и знает примеры, когда это удалось сделать (например, у риса и ржи).

В производстве в настоящее время используют различные типы гибридов. Это зависит от особенностей культуры: биологии опыления, коэффициентов размножения, норм высева, хотя разные типы могут быть свойственны одной и той же культуре вследствие приуроченности к разным регионам возделывания и просто потому, что гибрид того или иного типа оказался наиболее удачным.

Если обозначить линии буквами *A*, *B*, *C* и т. д., а сорта – *S*, то формулы гибридов записывают следующим образом:

Межсортовые гибриды используют у самоопыляющихся культур, поскольку сорта, как правило, гомозиготны и могут быть относительно чистопородными. У перекрестников использование их обычно экономически неоправданно: слишком мала прибавка от гетерозиса. Хотя именно с межсортовых гибридов кукурузы началась селекция на гетерозис. Такие гибриды получил американский селекционер Д. Билл в 1878 г.

Тип гибрида	Формула
Простой межлинейный	$A \times B$
Простой модифицированный	$(A \times A1) \times (B \times B1)$
Трехлинейный	$(A \times B) \times C$
Трехлинейный модифицированный	$(A \times B) \times (C \times C1)$
Двойной межлинейный	$(A \times B) \times (C \times D)$
Сортолинейный	$S \times A$ или $S \times (A \times B)$
Линейно-сортовой	$(A \times B) \times S$
Сложный пятилинейный	$[(A \times B) \times C] \times (D \times E)$
Сложный шестилинейный	$[(A \times B) \times C] \times [(D \times E) \times F]$
Сложный семилинейный	$\{[(A \times B) \times C] \times \phi\} \times [(D \times E) \times F]$
Сложный линейно-сортовой	$[(A \times B) \times S] \times [(D \times E) \times F]$

Выбор объекта был не случайным: кукуруза – важнейшая продовольственная и кормовая культура США, а получение гибридных семян у нее относительно простое, достаточно в совместном посеве материнской и отцовской форм удалить у первой метелки до цветения. Попытка ввести в производство межсортовые гибриды кукурузы оказалась неудачной по экономическим причинам. У этих гибридов гетерозис едва достигал 10-12% и не покрывал расходы на их получение. Межлинейные гибриды дают у перекрестников более высокий гетерозис. Прибавка в урожае составляет 30-40% по сравнению с сортами (или другими популяциями), из которых получены линии. Их используют и у самоопылителей, склонных к факультативному перекресту, вследствие чего сорта оказываются генетически неоднородными (сорго), и в других случаях, когда сорта популятивны по другим причинам. Использовать самоопыленные линии для получения гибридов (у кукурузы) предложил американский исследователь Г. Шелл еще в 1909 г. (он же является автором термина «гетерозис»). Их получают путем многократного принудительного самоопыления и отбора лучших растений. При самоопылении у перекрестников наблюдается инбредная депрессия, в результате которой продуктивность самоопыленных линий в 2-3 раза ниже, чем популяций, из которых они получены. Однако их генотип освобожден от летальных и полуметальных рецессивных аллелей и просто аллелей, снижающих продуктивность, которые в популяциях присутствуют под прикрытием доминантов. При самоопылении происходит их гомозиготизация и они выпадают из популяции вследствие гибели или потому, что не попадают в отбор для дальнейшего самоопыления. Возможно, этим и объясняется, что при скрещивании линий урожайность гибридов не только превосходит урожайность линий, что было бы неудивительно, но и значительно превосходит урожайность исходной популяции.

Попытка возделывания простых, полученных скрещиванием двух линий гибридов кукурузы во времена Шелла успеха не имела. Слишком велик был недобор урожая на участках размножения линий и на участках гибридизации, где высевались те же низкоурожайные линии в качестве материнского компонента для получения гибридных семян. Кроме того, на участках размножения и выращивания гибридных семян 25-35% площади поля занято опылителями, урожай с которых не используется в качестве семян. Эти потери плюс стоимость работ по гибридизации плохо компенсировались высоким урожаем первого поколения в производственных посевах. Только в 1950-е гг. удалось найти пути получения более урожайных линий, и простые межлинейные гибриды кукурузы получили распространение. Но у культур-самоопылителей, линии которых высокоурожайны, они были распространены изначально (просо, рис, сорго и др.).

Проблему рентабельности гибридной кукурузы первоначально удалось решить Д. Джонсу (США), который в 1918 г. предложил получать двойные межлинейные гибриды, т. е. скрещивать

между собой два простых гибрида. Схема несколько усложнилась, зато на участке гибридизации простых гибридов, благодаря их высокой урожайности, был достигнут очень высокий коэффициент размножения. Это позволило для получения такого же количества семян, как и в случае использования простого гибрида, резко сократить площадь посева на участке гибридизации линий, а значит, и участки их размножения. Причем урожайность двойных гибридов при удачном подборе линий незначительно уступала урожайности простых гибридов, хотя расщепление имеет место (ведь это уже второе поколение простых гибридов), однако возникают и новые гибридные локусы.

Опыт возделывания простых и двойных межлинейных гибридов показал, что первые особенно успешны в комфортных условиях возделывания, вторые имеют преимущество адаптивности за счет более богатой генетической основы и некоторой популятивности. Продолжая ту же тенденцию, Ю. К. Кобелев (ВСГИ, Одесса) предложил создавать еще более сложные гибриды – пяти-, шести- и даже семилинейные. Это позволяет еще больше сэкономить на участках гибридизации простых гибридов и участках размножения линий, но удлиняет время получения конечной партии семян для использования в товарных посевах и несколько снижает урожайность. Впрочем, последнее удастся компенсировать за счет широкой адаптивности, если гибрид предназначен для посева на территории с не благоприятными абиотическими условиями.

В других типах гибридов кукурузы (сортолинейных, линейносортных) в качестве материнской формы берется форма с большим коэффициентом размножения – сорт, простой гибрид, – поскольку на участке гибридизации на один рядок отцовского компонента приходится обыкновенно три рядка материнского (пыльцы хватает), и значит, семян материнских форм требуется больше. Какой гибрид предлагать производству, зависит и от условий возделывания, и от ценности конкретного гибрида, который удалось получить. В США в настоящее время возделывают преимущественно простые гибриды. В России, с ее менее благоприятным климатом, доля трехлинейных и двойных межлинейных составляет 45%, остальное – простые гибриды. У кукурузы тоже практикуется создание сложных гибридных популяций путем смешения семян гибридов. Такие популяции позволяют пересевать их ряд лет, имея не слишком большое снижение урожайности: гетерозис поддерживается за счет богатого генетического состава и панмиксии.

Выше уже было сказано, что у самоопылителей используют простые межсортные или (если необходимо довести сорт до чистоты) межлинейные гибриды (например, у склонного к перекресту самоопылителя сорго). Несмотря на невысокий коэффициент размножения, у культур сплошного сева используют простые гибриды еще и потому, что коэффициент размножения удается очень сильно повысить в широкорядных посевах (рис, рожь и др.). Наконец, простые гибриды широко используют у овощных культур частично из-за небольшой потребности в семенах (томат, огурец, перец и др.), частично из-за высокого коэффициента размножения, свойственного культуре (капуста, морковь).

3. Методы создания самоопыленных линий

Самоопыленные линии у перекрестноопыляющихся культур получают в результате многократного самоопыления и отбора.

Другой способ – использование гаплоидов. Он значительно ускоряет создание гомозиготных линий, но не обеспечивает столь широкий рекомбиногенез, как классический способ. Дело в том, что известные на сегодняшний день методы получения гаплоидов не обеспечивают выход их в большом, достаточном для практических целей, количестве. Например, у кукурузы выход матроклиных гаплоидов составляет только 0,5-1,3% от общего количества получаемых особей. Между тем ценные самоопыленные линии возникают очень редко – по литературным данным, одна на тысячу. Не случайно выдающиеся линии используют во многих гибридах. Так, для успеха работы нужно, чтобы популяция, из которой намечено получить линии (сорт, гетерозисный гибрид), обладала высокой урожайностью и другими ценными хозяйственными свойствами, установленными в результате предварительного испытания. По

этой же причине необходимо также большое число растений, которые первоначально подвергаются самоопылению. У кукурузы самоопыляются ежегодно 250 початков исходного образца. Заранее изолируют початок и метелку (чтобы не попала чужая пыльца), а затем при достижении готовности рылец к восприятию пыльцы срезают метелку и подставляют ее в изолятор с початком. В некоторых селекционных учреждениях используют метод «рукавов», который заключается в совместной изоляции обоих соцветий, что значительно сокращает объем работы.

Таким образом, применяется та же техника, что и при получении гибридов для выведения сортов.

У кукурузы самоопыление удается хорошо. Но есть культуры, у которых семена от самоопыления по разным причинам не завязываются (например, пыльца не прорастает на рыльцах пестика вследствие наличия механизмов гаметофитной или спорофитной самонесовместимости), поэтому применяют различные приемы, чтобы ее снять. Например, сахарную свеклу выращивают при низкой температуре порядка 10-12 °С, подбирая местности с такой температурой (предгорья). У капусты применяют гейтеногамное опыление незрелых рылец пестиков в бутонах нормальной пылью, взятой с раскрывшихся цветков этого же соцветия.

Для получения практически однородной и гомозиготной линии требуется 5-6 поколений. В каждом инбредном или инцухт-поколении, которые обозначают буквой *I* (generation of inbred) или *S* (generation of selfing) с номером в индексе, указывающим на поколение инбридинга ($I_1, I_2...I_n$) ведут браковку инбредных семей целиком, а из других отбирают лучшие растения, у кукурузы – початки. Потомство их высевают на следующий год, и операция повторяется. Постепенно происходит выравнивание растений в пределах семьи вместе с падением общей продуктивности из-за инбредной депрессии. Поэтому в ранних инбредных поколениях отбирают в семье больше растений (у кукурузы – початков), чем в поздних. У кукурузы отбирают из удачных семей в I_1 поколении 10-12 лучших растений для повторного опыления, а в последних инцухт-поколениях отбор может быть сокращен до 4-5, при том что численность растений в семье поддерживают на стандартном уровне, высевая 25-30 семян.

К $I_5...I_6$ линии выравниваются и достигают инбредного минимума, после чего при продолжении самоопыления их жизнеспособность и продуктивность стабилизируются.

4. Определение комбинационной способности линий

Следующий этап – определение комбинационной способности линий. Различают общую (ОКС) и специфическую комбинационную способность (СКС). Общая комбинационная способность определяется в отдельности для каждой линии, специфическая – для каждой пары линий, которая в случае высокой СКС может получить статус простого межлинейного гибрида. Высокая ОКС означает, что линия способна давать достаточно высокий гетерозис в скрещивании с любой линией. Но наилучшую комбинацию может указать только высокая СКС. Поэтому сначала нужно протестировать все линии на ОКС, а затем лучшие – на СКС в гибридных парах. Это можно сделать и за один прием в так называемых диаллельных скрещиваниях, т. е. скрещиваниях во всех возможных комбинациях – каждая линия скрещивается со всеми изучаемыми линиями. Далее проводится диаллельный анализ, математический аппарат которого рассматривается в курсах биометрии, позволяющий рассчитать ОКС и СКС. Этот анализ неудобен тем, что число комбинаций слишком велико. Оно выражается формулой $n \times (n - 1)$, где n – число линий. Если имеется 100 линий, а это еще не самое большое число для крупного селекционного учреждения, то число комбинаций – прямых и обратных – составит 9900. Если оставить только прямые скрещивания, то и это составит внушительный объем $n \times (n - 1)/2$ (4950 комбинаций). Поэтому прибегают к топкроссам или тестерному методу.

Метод был предложен Дэвисом и заключается в том, что весь набор линий скрещивают с одним образцом – тестером, который представляет собой популяцию со средней комбинационной способностью (высокая не давала бы возможность дифференцировать линии по ОКС). Именно популятивность тестера дает возможность выявить ОКС, так как каждый

образец скрещивается как бы с несколькими линиями. Далее определяют среднюю величину (т. е. x) ОКС как прибавку (в %) к урожайности исходных сортов-популяций по всем скрещиваниям. Выбирают линии, показавшие ОКС выше средней, и скрещивают их между собой по полной диаллельной схеме с целью определения СКС.

Не принципиально, будут ли испытуемые на ОКС линии при скрещивании с тестером взяты в качестве материнской или отцовской формы. Но второй вариант имеет то преимущество, что гибридные семена по крупности будут однородны, от чего во многом зависят начальные темпы роста всходов. Это будет способствовать более объективной интерпретации эффектов комбинационной способности. Недостаток данного варианта – необходимость ручного опыления.

В случае использования тестера в качестве отцовской формы каждую линию, испытываемую на ОКС, высевают в один рядок. Далее каждые три рядка линий чередуют с рядом тестера. Для большей надежности совмещения фаз цветения линий и тестера последний высевают в разные сроки. Перед началом цветения на материнских линиях обрывают метелки. Также необходимо обеспечить данное поле надежной пространственной изоляцией от других цветущих посевов данной культуры, а линии будут опыляться исключительно пылью тестера. Этот вариант исключает ручное опыление (т. е. парное скрещивание) и значительно сокращает объем работы. Однако в результате гибридные семена будут неоднородны по крупности. Использование двух и более тестеров повышает надежность оценки, но увеличивает трудоемкость.

Определение ОКС можно начинать, когда создание линий еще не завершено. Можно оценивать ОКС, начиная с третьего инцухт-поколения, когда инбредные семьи достигли некоторой однородности, не прерывая самоопыления. Скрещивают с тестером лучшие растения, которые продолжают самоопылять. Можно скрещивать с тестером не все отобранные растения, а только часть или даже одно, по которому и судить о свойственной семье ОКС. Гибриды от скрещивания с тестером высевают на следующий год для определения ОКС. Каждый раз новые отборы будут оставлены для дальнейшей работы, если по результатам топкроссов семья окажется с высокой ОКС, или исключены из дальнейшей работы при противоположных результатах. Может быть проведено и повторное тестирование. После выделения линий с высокой ОКС необходимо провести испытание их на специфическую комбинационную способность по полной диаллельной схеме. При определении СКС целесообразно испытывать гибриды F_1 в различных почвенно-климатических условиях и в разные годы, поскольку специфическая комбинационная способность намного сильнее, чем ОКС, подвержена влиянию взаимодействий генотипа со средой.

С выявлением комбинации с высокой СКС, собственно селекционный процесс заканчивается, если конечной целью является создание простых межлинейных гибридов. Однако во многих странах мира по экономическим причинам весьма значительна доля двойных межлинейных гибридов. Известно, что не от каждой комбинации простых гибридов можно получить высокоурожайный и экологически пластичный двойной межлинейный гибрид. Из этого следует, что для достижения нужных результатов требуется провести диаллельные скрещивания большого количества простых гибридов и их испытания на комбинационную способность. Например, из 10 линий можно составить 45 простых и 630 двойных гибридов (без реципрочных). Выполнить эту работу не под силу даже крупному селекцентру.

Формула, позволяющая рассчитать все возможные комбинации двойных межлинейных гибридов:

$$K = \frac{n(n-1)(n-2)(n-3)}{8},$$

где n – число линий.

М. Дженкинс (М. Т. Jenkins, 1934) исследовал четыре метода, с помощью которых по продуктивности простых гибридов можно предсказать урожайность двойных межлинейных гибридов.

1. Определение средних показателей для всех шести комбинаций простых гибридов, в которых можно скомбинировать четыре линии: $A \times B$, $A \times C$, $A \times D$, $B \times C$, $B \times D$ и $C \times D$ (без рецiproкных).

2. Определение средних показателей четырех гибридов из шести, которые не участвовали в двойном межлинейном гибриде. Для гибрида $(A \times B) \times (C \times D)$ – это комбинации $A \times C$, $A \times D$, $B \times D$ и $B \times C$.

3. Определение средних показателей для всех возможных простых гибридов. В нашем примере это $4 \times (4 - 1) = 12$: $A \times B$, $B \times A$, $A \times C$, $C \times A$ и т. д.

4. Определение средних показателей для четырех гибридов, в которых материнской формой является линия, а отцовской – тестер.

При проверке соответствия указанных методов с фактическими результатами Дженкинс получил следующие коэффициенты корреляции: для метода 1 – 0,75; 2 – 0,76; 3 – 0,73 и 4 – 0,61. На основании полученных данных он предложил метод 2, где фактическая урожайность двойного гибрида наиболее тесно коррелирует со средней урожайностью четырех простых гибридов, составленных из тех же линий в комбинациях, не входящих в данный двойной межлинейный гибрид. Таким образом, урожайность двойного гибрида можно довольно точно рассчитать по формуле

$$(A \times B) \times (C \times D) = \frac{(A \times C) + (A \times D) + (B \times C) + (B \times D)}{4},$$

где A , B , C , D — линии, составляющие двойной межлинейный гибрид. Исходя из полученных данных, Дженкинс высказал мнение, что если средний урожай обоих простых гибридов $A \times B$ и $C \times D$ будет выше урожая двойного гибрида $(A \times B) \times (C \times D)$, то порядок сочетания линий выбран неправильно, иное их расположение дало бы более урожайный гибрид.

На основании урожайности, установленной для простых гибридов, можно также определять теоретический урожай трехлинейных гибридов по формуле

$$(A \times B) \times C = \frac{(A \times C) + (B \times C)}{2},$$

где A , B , C – линии, составляющие трехлинейный гибрид.

Формула, позволяющая рассчитать все возможные комбинации трехлинейных гибридов:

$$K = \frac{n(n-1)(n-2)}{2},$$

где n – число линий.

В случае если имеем 10 линий, можно получить 360 сочетаний трехлинейных гибридов (для простых гибридов в этом случае получим только 45).

Однако следует иметь в виду, что математически определенная урожайность гипотетических двойных гибридов не всегда соответствует реальности. Всевозможные эпистатические эффекты, и особенно взаимодействие генотипа со средой, могут вызвать отклонения от реальной урожайности. Теоретические расчеты ценности двойных межлинейных гибридов дают возможность исключить из дальнейшей работы явно неперспективные комбинации. А оставшееся небольшое количество лучших сочетаний самоопыленных линий следует подвергнуть дальнейшей оценке в поле.

От представленной выше схемы в практической селекции могут быть большие отклонения. Так, вместо тестера-популяции может быть применена перспективная линия, уже зарекомендовавшая себя в других гибридах. Таким образом, будет сразу определена специфическая комбинационная способность и предложены перспективные простые межлинейные гибриды.

5. Способы улучшения самоопыленных линий

Параллельно с испытанием на комбинационную способность можно вести работу по

улучшению линий, вводить в них гены, контролирующие важные хозяйственные свойства (например, ген высокого содержания лизина), скрещивать сестринские линии с последующим самоопылением, что позволяет повысить их продуктивность (медленный инбридинг). Сестринские линии, отобранные из одной семьи на заключительном этапе самоопыления, иногда используют, чтобы повысить продуктивность родительских форм простых гибридов, скрещивая их между собой. Поскольку они генетически близки, гибрид по однородности приближается к обычной линии и рассматривается как таковая. Вместе с тем значительно снижается инбредная депрессия и указанные гибриды довольно урожайны. Скрещивание таких линий-гибридов рассматривается как простой гибрид $[(A \times A_1) \times (B \times B_1)]$. Он однороден (в отличие от двойных гибридов, у которых при скрещивании простых гибридов наблюдается расщепление) и высокоурожаен.

Рекуррентный отбор на комбинационную способность, параллельный созданию самоопыленных линий, позволяет с самого начала контролировать ОКС и проводить браковку по этому признаку. Он заключается в том, что в исходной популяции лучшие растения самоопыляются. Одновременно часть пыльцы от каждого растения используют для получения гибридов с тестером. На следующий год высевают потомство самоопыленных растений и потомство топкроссов. Анализ последнего покажет, какие первоначально взятые в самоопыление растения в перспективе дадут линии с высокой ОКС, потомство остальных подлежит браковке. Но результаты такого анализа будут получены, когда культура уже созрела. Чтобы не терять год, для получения нового инбредного поколения лучшие растения в каждой семье продолжают самоопылять, как и при определении ОКС в процессе получения самоопыленных линий (описанного выше), хотя семена их в семьях, забракованных по результатам топкроссов, будут исключены из дальнейшего посева. Семена всех отобранных линий смешивают в новую популяцию, генофонд которой имеет больше шансов на получение относительно более урожайных линий с высокой ОКС. Первый цикл рекуррентного отбора завершен.

Подобным же образом может быть получен второй и последующие циклы. Но более двух циклов обыкновенно не проводят, а переходят к обычной процедуре получения самоопыленных линий. При использовании рекуррентного отбора получают более урожайные линии, чем обычно за счет линий с высокой ОКС, переопыление которых дает продуктивные генотипы. Это еще один способ повысить продуктивность линий, необходимую для создания простых гибридов (выше уже указаны такие способы, как медленный инбридинг и скрещивание сестринских линий для создания линий-гибридов).

Рекуррентный отбор может быть реципрокным. В таком отборе участвуют две исходных популяции, каждая из которых является тестером для другой (для опыления собирают пыльцу со многих растений). Популяции подбирают по принципу генетической дивергенции (возможно, менее родственные по их генофонду). Это увеличивает шансы на обнаружение пар с высокой ОКС на заключительном этапе селекции, когда будут получены самоопыленные линии из обеих популяций.

6. Способы получения гибридных семян в промышленном объеме

Гибридные семена у разных культур можно получить различными способами. Для этого используют:

- удаление мужских элементов (у двудомных – мужских экземпляров в рядах материнской формы) вручную;
- ЦМС – цитоплазматическую мужскую стерильность;
- ЯЦМС – ядерно-цитоплазматическую мужскую стерильность;
- ГМС или ЯМС – генную или ядерную мужскую стерильность;
- ФМС – функциональную мужскую стерильность;
- самонесовместимость и маркерные гены;
- женские линии у однодомных, раздельнополых культур;
- лонгостилию и протерогинию;

- гаметоциды.

У некоторых культур получение гибридных семян делается вручную. Уже было отмечено, что у кукурузы вначале просто обрывали метелки у материнской формы до цветения. Затем стали использовать ядерно-цитоплазматическую мужскую стерильность. Массовое поражение гибридов кукурузы со стерильной цитоплазмой техасского типа, который использовали в США, заставило вновь вернуться к ручному обрыванию метелок.

У культур с обоеполюми цветками, у которых в плодах завязывается большое число семян, а нормы высева невелики, ручная кастрация до сих пор применяется широко (мак масличный, табак и др.). В Индии таким способом получают гибридные семена хлопчатника, в Болгарии применяют ручную кастрацию у томатов. Удаляют мужские цветки у однодомных раздельнополых овощных культур из семейства тыквенных. У двудомных культур (конопля, шпинат) из рядков, в которых посеяна материнская форма, удаляют до цветения мужские экземпляры.

Гетеростилия – это один из типов самонесовместимости у растений, обеспечивающий естественное перекрестное опыление внутри популяции. У гречихи имеется сложный ген, обозначаемый *S*, который состоит из пяти субгенов, каждый из которых контролирует свой признак (*G* – длину столбика, *I^s* – реакцию несовместимости столбика, *P* – реакцию несовместимости пыльцы, *R* – размер пыльцевых зерен, *A* – длину тычинок). Каждый субген имеет рецессивные и доминантные аллели. Поскольку субгены сцеплены в блок генов, то их обычно не выделяют отдельно, а пишут *Ss* – короткостолбчатый генотип, *ss* – длинно столбчатый генотип. При их естественном переопылении в потомстве всегда будет одинаковое количество растений с исходными сочетаниями аллелей гена несовместимости. Из сказанного следует, что явление гетеростилии может быть использовано для получения гибридных семян без ручной кастрации. Для этого нужно удалить из рядков материнской формы растения с одним из этих типов (либо длинностолбчатые, либо короткостолбчатые).

Как уже было отмечено выше, при опылении между растениями одного типа семена не завязываются. Поэтому опыление материнского компонента происходит исключительно за счет пыльцы отцовского. Наиболее важной культурой, у которой возможен такой способ получения гибридных семян, является гречиха. Однако применения он не получил из-за того, что гетеростильные типы не так просто отличить, а коэффициент размножения у гречихи невелик.

Иногда ручной способ получения гибридных семян не требует эмаскуляции. У некоторых форм томатов обнаружено явление лонгостилии – столбик пестика удлиннен и рыльца значительно выше тычинок. Это можно использовать для ручного опыления без кастрации цветков материнской формы. В селекции способ пока применения не нашел, потому что такие формы не обладают достаточно высокой комбинационной способностью. То же самое можно сказать и о протерогинии (более раннем созревании рылец по сравнению с пыльцой), которое наблюдается у некоторых культур (рапс).

Для культур с обоеполюми цветками, у которых в плоде образуется только одно семя (все зерновые, подсолнечник и др.) способ элиминации мужских элементов вручную в достаточно большом масштабе неприемлем. Кастрация слишком трудоемка, и необходимого количества семян таким путем получить нельзя. Для этого используют другие способы. Один из самых эффективных – применение мужской стерильности. Она, как отмечено выше, бывает четырех видов.

ЯЦМС у кукурузы обнаружили почти одновременно С. Родс (США) и М. И. Хаджинов (СССР). Позднее она была выявлена у сорго, сахарной свеклы, подсолнечника, риса, капусты и ряда других культур. У некоторых культур (пшеница, ячмень, лен) ЯЦМС найти не удалось, но она была получена в насыщающих межвидовых скрещиваниях (у льна скрещиванием подвидов), когда ядро перечисленных видов объединили с цитоплазмой других видов. Для этого провели серию беккроссов, используя в первом скрещивании другой вид в качестве материнского компонента, а в последующих в том же качестве – потомков очередного беккросса. Так, у мягкой

пшеницы для получения ЯЦМС в США использовали пшеницу Тимофеева, а в Японии – один из видов эгилопса. Этот вид стерильности зависит от дефектов митохондрий и передается только через цитоплазму. Внешне он проявляется в виде деградации пыльников или утраты пыльцой оплодотворяющей способности. Фертильность в линиях с ЯЦМС восстанавливается ядерными генами – восстановителями фертильности. Восстановление фертильности совершенно необходимо, потому что гибрид F_1 , получив от материнской формы стерильную цитоплазму, не завязывает семян, если отцовская форма не обладает геном (генами) восстановления фертильности.

В пределах одной культуры могут быть разные типы ЯЦМС. У кукурузы в настоящее время насчитывается более восьми типов, из которых используют только четыре: молдавский (*M*-тип), техасский (*T*-тип), бразильский (*C*- тип) и боливийский (*B*-тип). Они отличаются и фенотипически (молдавский, например, вызывает меньшую деградацию пыльников, чем техасский), и функционально (боливийский тип не отличается достаточной стабильностью и в определенной степени зависит от условий погоды). Но наиболее существенное для технологии селекции их отличие заключается в количестве генов-восстановителей, необходимых для восстановления фертильности и экологической устойчивости. Так, для молдавского типа достаточен один ген ($Rf3_{\downarrow}$), для техасского – два комплементарных гена ($Rf1_{\downarrow}$, $Rf2_{\downarrow}$), для бразильского три гена ($Rf4_{\downarrow}$, $Rf5_{\downarrow}$, $Rf6_{\downarrow}$). Восстановление фертильности осуществляют доминантные аллели, если их более одного – по типу комплементарности; необходимо присутствие всех доминантных аллелей, хотя бы по одному в локусе.

У кукурузы в настоящее время используются молдавский и бразильский типы ЯЦМС. Использование техасского типа ограничено районами, где нет угрозы эпифитотии. Боливийский тип начали использовать совсем не давно.

У различных культур установлено разное число генов-восстановителей фертильности. Например, у кукурузы – 1...3 гена, у свеклы – 2, у сорго – 1.

Важна также экологическая устойчивость восстановителей фертильности. У ряда культур (пшеница, ячмень) ЯЦМС не удается использовать, поскольку экспрессия генов-восстановителей сильно зависит от погодных условий. Самоопыленные линии свойством ЦМС не обладают (иначе, как бы удалось их получать). Его приходится передавать от доноров, обладающих ЯЦМС (цит^Sgrff), которые называют источниками стерильности. Они размножаются и поддерживаются благодаря опылению пыльцой линий с таким же генотипом, но нормальной цитоплазмой (цит^Ngrff). Такие линии называются **закрепителями стерильности**.

Линию, участвующую в гибриде в качестве матери, переводят на стерильную основу путем насыщающего скрещивания. Скрещивают ее с донором стерильности, взяв последний в качестве матери. Гибрид будет иметь стерильную цитоплазму. Далее его многократно беккроссируют с линией, которую переводят на стерильную основу, каждый раз беря гибрид как материнскую форму. В результате ядерный материал линии восстанавливается, цитоплазма обеспечивает ЯЦМС (схема 1). Размножают такую линию скрещиванием с фертильным аналогом (закрепителем стерильности), как сказано выше. Это возможно в том случае, если линия, выступающая в качестве материнской формы у гибрида, оказалась закрепителем стерильности (генотип цит^Ngrff). В других случаях (возможные генотипы линии – цит^{N/S}Rgrff и цит^{N/S}RfRf) параллельно с созданием стерильного аналога необходимо будет создавать закрепители стерильности также беккроссированием.

Схема 1. Создание стерильного аналога линии А.

	Соотношение ядерного материала И/А
1-й год: $I^* \times A \quad \text{♀} I\text{-цит}^S\text{rfrf} \times \text{♂} A\text{-цит}^N\text{rfrf} \rightarrow F_1\text{цит}^S\text{rfrf}$	50/50
2-й год: $(I \times A) \times A \quad \text{♀} F_1\text{-цит}^S\text{rfrf} \times \text{♂} A\text{-цит}^N\text{rfrf} \rightarrow F_{b1}\text{цит}^S\text{rfrf}$	25/75
3-й год: $(I \times A^2) \times A \quad \text{♀} F_{b1}\text{-цит}^S\text{rfrf} \times \text{♂} A\text{-цит}^N\text{rfrf} \rightarrow F_{b2}\text{цит}^S\text{rfrf}$	12,5/87,5
4-й год: $(I \times A^3) \times A \quad \text{♀} F_{b2}\text{-цит}^S\text{rfrf} \times \text{♂} A\text{-цит}^N\text{rfrf} \rightarrow F_{b3}\text{цит}^S\text{rfrf}$	6,25/93,75
5-й год: $(I \times A^4) \times A \quad \text{♀} F_{b3}\text{-цит}^S\text{rfrf} \times \text{♂} A\text{-цит}^N\text{rfrf} \rightarrow F_{b4}\text{цит}^S\text{rfrf}$	3,125/96,875
6-й год: $(I \times A^5) \times A \quad \text{♀} F_{b4}\text{-цит}^S\text{rfrf} \times \text{♂} A\text{-цит}^N\text{rfrf} \rightarrow F_{b5}\text{цит}^S\text{rfrf}$	1,5625/98,4375

* И — линия-донор стерильной цитоплазмы, А — линия, которой нужно передать ЯЦМС.

С помощью насыщающих скрещиваний придают отцовским линиям и восстановительную способность, используя донор генов восстановления, или донор фертильности (цит^{N/S}RfRf). Но здесь возникают трудности, связанные с идентификацией растений, несущих гены восстановления. Первый беккросс (второе скрещивание, первое беккроссом не является) такой идентификации не требует: ген (гены) восстановления находится у гибрида в гетерозиготном состоянии — доминантные аллели восстановления присутствуют (цит^NRfrf). Но в продуктах расщепления потомства этого беккросса встречаются растения и с генами восстановления, и без них (цит^{N/S}Rfrf и цит^Nrfrf). Последние в новое скрещивание вовлекать нельзя — гены восстановления отсутствуют. Различить растения по фенотипу с аллелями восстановления и без них невозможно.

Однако существуют методы, позволяющие это сделать. Один из них — получение линий восстановителей на стерильной цитоплазме (схема 2). Метод заключается в том, что используется донор генов восстановления фертильности на стерильной цитоплазме (цит^SRfRf). В первом скрещивании этот донор используется в качестве материнской формы, в беккроссах в качестве матери всегда используется гибрид (цит^SRfrf), который имеет стерильную цитоплазму. Благодаря этому в продуктах расщепления всегда можно идентифицировать растения, несущие аллели восстановления: они будут фертильны, в отличие от растений без таких аллелей (цит^SRfrf и цит^Srfrf). Метод относительно прост, но стерильная цитоплазма у отцовской формы гетерозисного гибрида со временем теряет восстановительную способность.

Схема 2. Создание аналога восстановителя фертильности линии В на стерильной основе.

1-й год: $A \times B \rightarrow \text{♀} A \text{ цит}^S\text{RfRf} \times \text{цит}^N\text{rfrf} \rightarrow F_1\text{цит}^S\text{Rfrf}$;
 2-й год: $(A \times B) \times B \rightarrow \text{♀} F_1\text{цит}^S\text{Rfrf} \times \text{B цит}^N\text{rfrf} \rightarrow F_{b1}\text{цит}^S\text{Rfrf} + \text{цит}^S\text{rfrf}$;
 3-й год: $(A \times B^2) \times B \rightarrow \text{♀} F_{b1}\text{цит}^S\text{Rfrf} \times \text{B цит}^N\text{rfrf} \rightarrow F_{b2}\text{цит}^S\text{Rfrf} + \text{цит}^S\text{rfrf}$;
 4-й год: $(A \times B^3) \times B \rightarrow \text{♀} F_{b2}\text{цит}^S\text{Rfrf} \times \text{B цит}^N\text{rfrf} \rightarrow F_{b3}\text{цит}^S\text{Rfrf} + \text{цит}^S\text{rfrf}$;
 5-й год: $(A \times B^4) \times B \rightarrow \text{♀} F_{b3}\text{цит}^S\text{Rfrf} \times \text{♂} B \text{ цит}^N\text{rfrf} \rightarrow F_{b4}\text{цит}^S\text{Rfrf} + \text{цит}^S\text{rfrf}$,

где А (цит^SRfRf) — донор генов восстановления фертильности на стерильной цитоплазме; В (цит^Nrfrf) — линия, которой надо придать восстановительную способность.

Можно обойтись и без стерильной цитоплазмы, создавая аналоги линий на фертильной основе (схема 3). Однако тогда для идентификации растений с аллелями восстановления в

поколениях беккроссов приходится использовать тестер – линию со стерильной цитоплазмой, это тот же способ, что и при оценке на ОКС в процессе создания линий или при рекуррентном отборе на высокую ОКС, описанный выше. Тестировать потомства беккроссов на присутствие аллелей восстановления, не прерывая беккроссирования, возможно только на следующий после скрещивания со стерильным тестером год, когда выяснится, какие потомства от скрещивания с тестером окажутся фертильными, а какие – стерильными. По результатам тестирования часть продуктов нового беккросса, у которой отсутствуют гены восстановления фертильности, будет исключена из дальнейшей работы. Этот метод гораздо сложнее, чем получение линий-восстановителей на стерильной основе, поскольку перед каждым насыщением приходится тестировать потомство на наличие гена восстановления фертильности.

Схема 3. Создание аналога восстановителя фертильности линии В на фертильной основе.

1-й ♀ год: $A \text{ цит}^N RfRf \times B \text{ цит}^N rfrf \rightarrow F_1 \text{ цит}^N Rfrf$; 2-й год: $(A \times B F_1 \text{ цит}^N Rfrf) \times B \text{ цит}^N rfrf \rightarrow$
 $\rightarrow Fb_1 \text{ цит}^N Rfrf + \text{цит}^N rfrf$;
 3-й год: ♀ $(A \times B^2 Fb_1 \text{ цит}^N Rfrf) \times B \text{ цит}^N rfrf \rightarrow$
 $\rightarrow Fb_2 \text{ цит}^N Rfrf + \text{цит}^N rfrf$;
 4-й год и т. д.: до 6...7-го поколения насыщения,
 где А ($\text{цит}^N RfRf$) – донор фертильности на фертильной цитоплазме; В ($\text{цит}^N rfrf$) – линия, которой надо придать восстановительную способность.

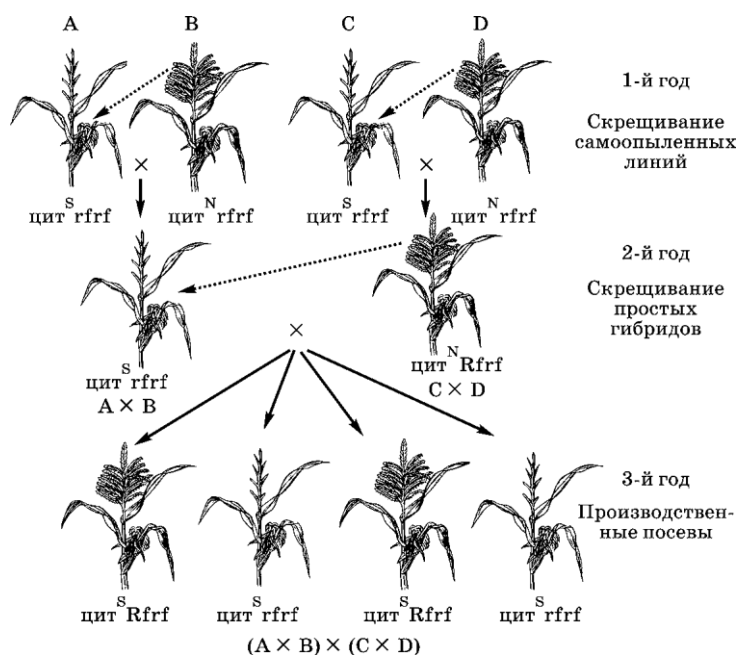
М. И. Хаджиновым и Э. И. Вахрушевой предложена комбинированная схема, использующая достоинства схем 2 и 3. Насыщение первоначально ведут на стерильной цитоплазме ($\text{цит}^S RfRf$) 6-7 лет. Потом получают аналог исходной линии с геном восстановления и стерильной цитоплазмой ($\text{цит}^S rfrf$). Чтобы избавиться от стерильной цитоплазмы, необходимо провести скрещивание полученного аналога с исходной линией, взяв последнюю в качестве материнской формы ($\text{цит}^N rfrf \times \text{цит}^S RfRf = \text{цит}^N rfrf + \text{цит}^N RfRf$). Поскольку оба полученных генотипа имеют фертильную цитоплазму и не различаются по фенотипу (оба фертильны), их следует скрестить со стерильным тестером для выявления формы с геном восстановления фертильности.

Комбинированная схема создания аналога восстановителя фертильности линии В.

1-й год: $A \times B \rightarrow + A \text{ цит}^S RfRf \times > B \text{ цит}^N rfrf \rightarrow$
 $\rightarrow F_1 \text{ цит}^S Rfrf$;
 2-й год: $(A \times B) \times B \rightarrow + F_1 \text{ цит}^S Rfrf \times > B \text{ цит}^N rfrf \rightarrow$
 $\rightarrow Fb_1 \text{ цит}^S Rfrf + \text{цит}^S rfrf$;
 3-й год: $(A \times B^2) \times B \rightarrow + Fb_1 \text{ цит}^S Rfrf \times > B \text{ цит}^N rfrf \rightarrow$
 $\rightarrow Fb_2 \text{ цит}^S Rfrf + \text{цит}^S rfrf$;
 продолжаем насыщение до 6...7-го поколения;
 8-й год: $B \times (A \times B_7) \rightarrow + B \text{ цит}^N rfrf \times > Fb_7 \text{ цит}^S Rfrf \rightarrow$
 $\rightarrow Fb_8 \text{ цит}^N Rfrf + \text{цит}^N rfrf$;
 9-й год: $+ \text{цит}^S rfrf \times > \text{цит}^N rfrf \rightarrow \text{цит}^S rfrf + \text{цит}^S rfrf$ (потомство стерильно) $+ \text{цит}^S rfrf \times >$
 $\text{цит}^N Rfrf \rightarrow \text{цит}^S Rfrf +$
 $+ \text{цит}^S rfrf$ (расщепление 1:1);
 10-й год: $Fb_8 \text{ цит}^N Rfrf \rightarrow$ самоопыление $\rightarrow \text{цит}^N RfRf +$
 $+ 2 \text{ цит}^N Rfrf + \text{цит}^N rfrf$;
 11-й год: тестирование потомств, отбор гомозигот $\text{цит}^N RfRf$, где А ($\text{цит}^S RfRf$) – донор генов восстановления фертильности на стерильной цитоплазме; В ($\text{цит}^N rfrf$) – линия, которой надо придать восстановительную способность.

Естественно, что для получения гомозигот по генам восстановления требуется самоопыление и новое скрещивание потомств со стерильным тестером. Полученная линия/восстановитель – аналог восстановителя фертильности исходной линии.

Если генов восстановления больше одного и контроль свойства восстановления идет по



типу комплементарности, введение этих генов в отцовскую линию усложняется, поскольку в расщеплении поколений беккроссов доля генотипов с полным набором аллелей восстановления сильно уменьшается. Но в принципе технология получения линии-восстановителя остается той же. Описанной процедуры удастся избежать, если отселектированная самоопыленная линия уже обладает свойством восстановления (генотип цит^NRfRf) и является восстановителем фертильности. Для кукурузы это редкий случай (5-10%). Как правило, вновь созданные линии свойством восстановления не обладают (генотип цит^Nrfrf). Их принято называть закрепителями стерильности. Однако у других культур дело может обстоять иначе. У капусты, например, линии-восстановители обычны, у ржи и свеклы в популяции преобладают растения с генами восстановления фертильности. Восстановители фертильности не нужны у культур, которые возделываются ради каких-либо вегетативных органов растения: свекла, капуста, морковь, лук и др. При получении семян двойных гибридов для производственных посевов на основе ЯЦМС возникают трудности. Что касается материнского простого гибрида, то его получают на основе стерильной цитоплазмы в отсутствие генов восстановления. При посеве на участке гибридизации двойного гибрида простой материнский гибрид оказывается мужски стерильным. Отцовский простой гибрид должен быть фертильным. Этого можно добиться, если отцовская линия простого гибрида имеет гены, восстанавливающие фертильность. Если материнская линия имеет стерильную цитоплазму, а гены-восстановители у нее отсутствуют, то простой гибрид можно получить, не прибегая к обрыванию метелок. Но тогда двойной гибрид будет гетерозиготен по гену восстановления и в производственном посеве вследствие расщепления половина растений окажется мужски стерильными. Пыльцы другой половины у кукурузы достаточно, чтобы все растения завязали зерно. Это так называемая схема неполного восстановления.

Если при получении простого отцовского гибрида материнская линия также обладает генами восстановления фертильности, то двойной гибрид будет гомозиготен по этому гену и в производственных посевах все растения окажутся фертильными. Тогда при получении простого отцовского гибрида приходится обрывать метелки у материнской линии, что не слишком обременительно, поскольку участки гибридизации, где получают простой гибрид, невелики. Эта схема называется схемой полного восстановления.

В случае отсутствия линий с генами восстановления фертильности используют схему смешения.

Простой материнский гибрид получают в двух вариантах: с использованием стерильной цитоплазмы и без нее (на основе фертильного аналога материнской линии). Во втором варианте

метелки приходится обрывать.

На участке гибридизации двойного гибрида в качестве материнского простого гибрида сеют оба варианта отдельными рядками и у второго варианта обрывают метелки. Из семян от опыления растений первого варианта в производственном посеве вырастают мужски стерильные растения, от второго – фертильные. Семян первого варианта производят в два раза больше, чем второго. Это позволяет уменьшить объем работы по обрыванию метелок. Такая же экономия получается и при производстве простого отцовского гибрида, поскольку на участке гибридизации его сеют в три раза меньше, чем материнского. Имеющихся в производственном посеве растений с нормальной пылью (треть растений) хватает и для опыления мужски стерильных экземпляров.

При насыщающих скрещиваниях с целью передать свойства мужской стерильности и восстановления фертильности (при использовании донора со стерильной цитоплазмой) стараются брать линии-доноры с хорошими хозяйственными признаками, в частности с высокой урожайностью, поскольку они могут зависеть от цитоплазмы. В поколениях беккроссов также ведут отбор по признакам рекуррентной линии, что позволяет сократить число возвратных скрещиваний.

Гибриды с ЯЦМС получены у риса, сорго, ржи, сахарной свеклы, капусты, перца и некоторых других культур. С ней связывают надежды на получение гибридной пшеницы.

Генная мужская стерильность контролируется ядерными генами Ms в рецессивном состоянии. Факторы стерильности цитоплазмы отсутствуют, и проблема восстановления отпадает. Зато возникает другая, более сложная проблема размножения стерильной формы. Линия с генотипом msms семян не дает. Приходится скрещивать ее с аналогом, имеющим генотип Msms. Гибрид расщепляется на стерильную рецессивную гомозиготу, которую можно использовать на участке гибридизации в качестве материнской формы, и фертильную гетерозиготу, применяемую в таком же скрещивании для получения новых семян. Как различить семена стерильной и фертильной формы? Это можно было бы сделать с помощью маркерных генов, тесно сцепленных с генами msms. Однако такие эффективные маркеры пока не найдены.

Ядерная мужская стерильность обнаружена у ряда культур: ячменя, сахарной свеклы и др.

При создании двойного гибрида возможна комбинация простых гибридов с ЯЦМС и ЯМС, как это делается у сахарной свеклы: на основе ЯЦМС получают материнский гибрид, а на основе ЯМС – отцовский. Материнская линия отцовского гибрида стерильна благодаря гомозиготности по рецессивным аллелям мужской стерильности, а отцовская имеет в гомозиготе доминантные аллели, обуславливающие фертильность. Простой гибрид будет иметь гетерозиготу по этому гену, что достаточно, чтобы обеспечить нормальную пыльцевую продуктивность при получении двойного гибрида.

Функциональная мужская стерильность определяется аномалией мужских органов цветка при полностью фертильной пыльце. Она обнаружена у томатов и имеет раз личные морфологические формы (в частности срастание пыльников с лепестками, в результате чего пыльники не вскрываются). Размножение таких линий не сложно: чтобы получить семена, достаточно вскрыть пыльники вручную. Но таких линий немного, и они не обладают достаточно хорошей комбинационной способностью.

У ряда перекрестноопыляющихся культур для получения в больших масштабах гибридных семян используется явление самонесовместимости, контролируемой серией множественных аллелей гена S. Этот способ получил распространение главным образом для различных культур капусты (кочанной, цветной и др.). Если растения имеют в генотипе одинаковый аллель S (S_1 , S_2 и т. д., их у капусты более 30), неважно, в гомо- или гетерозиготном состоянии, то пыльца каждого из них не прорастает на рыльце пестика другого растения, даже если в самой пыльце этот аллель отсутствует (спорофитная несовместимость). Для того чтобы получить гибридные семена, достаточно высадить рядом линии, имеющие разные гены несовместимости. Гибриды будут получены в обоих случаях. При создании таких линий необходимо контролировать самонесовместимость.

При самоопылении цветков семена не должны завязываться. Сама возможность самоопыления достигается опылением незрелых рылец в бутонах нормальной пыльцой из других раскрывшихся цветков того же растения. На этой основе можно получать простые, трехлинейные и двойные гибриды, необходимо только, чтобы аллельный состав линий был различен. Селекция гетерозисных гибридов на этой основе трудна, потому что сложно достичь однородности линий по аллелям несовместимости и потому что приходится попарно тестировать линии на совместимость.

Можно использовать линии, частично несовместимые или даже совместимые, если в их генотипе присутствуют маркерные гены. Доминантный аллель такого гена должен быть у отцовской формы. При посеве рядом материнской и отцовской формы семена на первой завязываются как от самоопыления, так и от опыления растениями отца. Растения из гибридных семян имеют маркерный признак. Не имеющие его должны быть удалены. Удобно применять этот способ на культурах, выращиваемых через рассаду (например, на капусте, здесь маркерный признак – антоциановая окраска). Негибридные растения удаляют при пикировке. Но возможно применять его и в случае прямого посева в поле, если культура имеет большую площадь питания растений и сами растения отличаются значительными размерами. Так, гибридные арбузы получают, высевая 5...6 семян в лунку, а затем по всходам выпалывая растения, не несущие маркерного признака. В этом случае рецессивный признак – нерассеченные листья – должна иметь женская форма, а маркерный доминантный – обычные листья – мужская.

У тыквенных (огурец, кабачок, дыня) обнаружены сорта с преимущественно женскими цветками. Из них получены женские самоопыленные линии, которые имеют только женские цветки. Но при обработке растений некоторыми веществами можно вызвать появление и мужских, поэтому такие линии можно размножать. У огурца для этой цели используют гиббереллин, у дыни – азотнокислое серебро. Указанные линии и сорта используют для получения гибридных семян.

У огурца есть и формы с преимущественно мужскими цветками, которые удобно использовать в качестве опылителей.

Еще один способ массового получения гибридных семян основан на разной чувствительности мужских и женских гамет к воздействию гаметоцидов – веществ, убивающих гаметы. Женские гаметы лучше защищены, чем мужские, от действия гаметоцидов. Применение последних в определенной дозе и в определенную фазу может устранить мужские гаметы, почти не повреждая женские. У пшеницы для этой цели пытались применить этрел, у подсолнечника – гиббереллин. В дальнейшем работы в этом направлении были развернуты в некоторых странах (Россия, Франция, Великобритания и др.). Были созданы технологии, рекомендованы вещества, время обработки и т. д. Недостатки данного способа: трудно точно выбрать фазу для обработки и концентрацию гаметоцида, потому что они зависят от погодных условий. Кроме того, способ экологически небезопасен. Хотя имеются посевы гибридной пшеницы во Франции, США, семена F_1 которых получены с помощью гаметоцидов.

Таким образом, способы получения гибридных семян многообразны. Часть из них нашла широкое применение, часть по разным причинам (недостаточная селекционная проработка, экономические причины и т. д.) не используется.

В настоящее время осуществлен перевод многих культур на гибридную основу (это не надо понимать так, что сортов не сеют, просто гибридами заняты большие площади). Из важнейших полевых культур – это кукуруза и рис. В США, Франции, Италии, Германии, Румынии сеют только гибриды кукурузы. Китай возделывает гибридный рис на площади свыше 9 млн га. На гибридную основу в Германии переведена рожь. Успешно ведется эта работа и в России. На гибридную основу переведено сорго (в США целиком, в России — частично), на значительных площадях – хлопчатник в Индии, сахарная свекла. Очень многие овощные культуры (капусту, томат, огурец, баклажан, морковь, лук и др.) сеют гибридными семенами. В США, Японии, западноевропейских странах гибридами занято 85-100% открытого грунта овощных культур.

1.4.7. Генетическая паспортизация сортов и гибридов сельскохозяйственных растений

Вопросы.

1. Электрофорез запасных белков на основе их полиморфизма и ДНК-паспортизация на основе ПЦР-анализа.
2. Типы молекулярно-генетических маркеров

1. Электрофорез запасных белков на основе их полиморфизма и ДНК-паспортизация на основе ПЦР-анализа.

Эффективность растениеводства в большей степени обусловлена потенциалом использования современных сортов, который реализуется с учетом факторов сортовой принадлежности и генетической чистоты. Применение генетических методов позволяет в короткие сроки создавать высокопродуктивные сорта растений с улучшенными пищевыми и технологическими свойствами, устойчивыми к неблагоприятным условиям окружающей среды и болезням.

Сорта растений относятся к объектам интеллектуальной собственности и охраняются патентами, если являются оригинальными, не имеют аналогов и успешно проходят испытания на отличимость, однородность и стабильность (ООС-тест). Традиционные методы сортовой идентификации на основе морфологических и биохимических признаков значительно уступают современным подходам, основанным на молекулярных ДНК-маркерах, по точности, разрешающей способности и воспроизводимости результатов анализа. Не исключено, что в ближайшее время система ДНК-идентификации будет принята и одобрена Международным союзом по защите новых сортов растений (UPOV) в качестве обязательного элемента тестирования при регистрации нового селекционного достижения. На основе ДНК-маркирования для каждого сорта можно составить генетический паспорт, который позволит определить уникальность сорта, провести анализ однородности семенного и посадочного материала.

Генетическая паспортизация сортов, линий и гибридов может значительно повысить эффективность регистрации и авторской защиты селекционных достижений. Она востребована в семеноводстве – при сертификации и коммерческом распространении семян и в селекционном процессе – при подборе родительских пар для скрещиваний и выявления генетических маркеров ценных признаков.

Для ДНК-идентификации необходимо предварительное создание эталонных генетических паспортов районированных сортов. Путем сличения с ними тестируемого образца можно установить подлинность сорта, гибридность, наличие примесей и т.п.

Современную биологию невозможно представить без молекулярно-генетических методов. Первыми были методы, основанные на полиморфизме белков. Изоферментный анализ позволяет выявлять уровень полиморфизма популяций, их генетическую структуру, определять уровень генетической закрытости или, наоборот, открытости популяций и многое другое. В настоящее время эти методы продолжают использоваться, но большинство исследователей и лабораторий переходят на анализ полиморфизма нуклеиновых кислот. Отчасти это связано с тем, что белки можно выделять только из живого материала или из замороженного при температуре $-70-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, тогда как ДНК можно выделять и из живого, и из высушенного материала. Кроме того, методы ДНК-анализа позволяют изучать как ядерный, так и пластидный и митохондриальный геномы. В связи с этим молекулярно-генетические методы, основанные на полимеразной цепной реакции и секвенировании ДНК, активно используются в таких областях исследования растений, как:

- генетический полиморфизм природных популяций;
- анализ чистоты сортов;
- выявление гибридов;
- выявление филогенетических связей видов, родов и таксонов более высокого уровня;
- анализ транскрипционной активности генов.

Метод электрофореза, предложенный еще в начале XX в., сейчас широко используют в биологии и медицине для разделения белков в исследовательских и клинических целях. С

помощью электрофореза можно разделить на отдельные компоненты белковую смесь, что позволяет установить молекулярную массу белка или его субъединиц, подтвердить чистоту выделенного белка.

Электрофорезом называют движение заряженных частиц в растворе под действием электрического поля.

Электрофоретический метод в биохимии – это способ пространственного разделения молекул, имеющих разный заряд и размеры, путем помещения их в электрическое поле.

Результатом проведения электрофореза является *электрофореграмма* – картина, полученная после разделения сложной смеси с помощью электрофореза и специфического проявления. Электрофореграммы белков-ферментов (зимограммы) позволяют изучать изменения активности и изоферментного спектра белков под действием внешних и внутренних факторов как у растений, так и у других организмов.

В растворе белки находятся в виде заряженных частиц. Заряд на поверхности белков возникает в результате диссоциации группировок, находящихся в боковых радикалах аминокислот (карбоксильных, amino-, имидазольных и других групп), а также при связывании ионов. Так как степень диссоциации группировок зависит от рН раствора, то величина и знак суммарного заряда белковой молекулы зависят от рН среды, а также от ионной силы (интенсивности электрического поля, создаваемого ионами в растворе).

Для электрофоретического разделения оптимально такое значение рН рабочего буфера, которое обуславливает максимальное различие зарядов разных белков, составляющих исходную смесь, а не их максимальный заряд. Обычно электрофорез проводят в среде (буфере) со значением рН, на 3–4 единицы отличающимся от среднего значения *pI* для белков данного типа. Это позволяет добиться хорошей электрофоретической подвижности и вместе с тем сохранить ощутимые различия молекул по заряду. Предпочтительно использовать буфер известной и постоянной ионной силы на основе однозарядных ионов. Именно различия в электрофоретической подвижности белков, содержащихся в анализируемой смеси, позволяют разделить эти белки в пространстве (в разных зонах электрофореграммы). Электрофоретическая подвижность белка зависит:

- от самой молекулы: ее размера (молекулярной массы);
- формы, электрического заряда, степени диссоциации и гидратации;
- концентрации молекул;
- среды: ее вязкости, рН, температуры и ионной силы;
- характеристик используемого электрического поля.

Основными типами электрофореза являются:

- зональный электрофорез;
- изоэлектрическое фокусирование;
- иммуноэлектрофорез.

Зональный электрофорез ведется при постоянном (неизменяющемся) значении рН буферного раствора, заполняющего данный носитель (бумагу, гель, др.). Исследуемый образец наносится пятном или тонким слоем на носитель, по которому и перемещается в электрическом поле.

Усложненным вариантом зонального электрофореза является **диск-электрофорез** (многофазный зональный электрофорез), при котором рН и другие характеристики, постоянные внутри одной «фазы», при переходе к другой «фазе» скачкообразно изменяются.

При **изоэлектрическом фокусировании** в среде для электрофореза создается плавный градиент рН. Белок останавливается в зоне, где значение рН равно его изоэлектрической точке (*pI*). Для создания градиента рН обычно используют раствор полиамино-поликарбоновых кислот, которым насыщают носитель. В отсутствии электрического поля эта смесь обычно имеет рН = 6,5. При наложении электрического поля указанные кислоты обеспечивают линейный градиент рН от 3 до 10.

Иммуноэлектрофорез сочетает в себе электрофоретическое разделение белков с иммунопреципитацией, основанной на реакции «антиген–антитело». Этот тип электрофореза превосходит остальные по чувствительности и разрешающей способности.

2. Типы молекулярно-генетических маркеров

На сегодняшний день технологии выявления молекулярных или ДНК-маркеров становятся важным стандартом селекции растений и получают все более широкое применение по всему миру. Их использование позволяет точно и быстро выявлять генетическое разнообразие популяций, подвидов, видов, и даже дифференцировать более высокие таксономические ранги - рода и семейства, а также делает возможным создание генетических отпечатков ("отпечатков пальцев") сортов, и эффективно, с точки зрения затрат, определять хозяйственно-ценные признаки еще на начальном этапе селекции на уровне ДНК. Эти же методы могут стать основой для генетической паспортизации сортов, линий и гибридов различных культурных растений.

Выведение новых сортов растений занимает в среднем от 7 до 12 лет. А это означает, что селекционер должен предвидеть потребности сельского хозяйства как минимум на десять лет вперед, и если он ошибется в прогнозах, то его многолетний труд может быть потрачен напрасно, и на исправление ошибки уйдут долгие годы. Поэтому, сейчас для ускорения селекционного процесса у растений, одними из важных направлений рассматриваются так называемые маркер-опосредованная селекция (Marker-Assisted Selection, MAS) и геномная селекция GS (Genomic Selection), в основе которых также лежит исследование ДНК-маркеров.

Изучение и сохранение генетических ресурсов культурных растений – ключевой момент устойчивого развития сельского хозяйства любой страны. Потеря таких ресурсов, а как следствие, и генетического разнообразия, является суровой реальностью современности. Все экономически развитые страны выделяют большие финансовые средства для сохранения генетических ресурсов как дикорастущей флоры, так и культурных растений.

В настоящее время важной составляющей при создании новых сортов культурных растений является их генетическая паспортизация, в основе которой лежит ДНК-фингерпринтирование (DNA fingerprinting) – совокупность методов создания генетических "отпечатков пальцев", основанных на анализе полиморфизма ДНК. Во всем мире современные стандарты селекции и семеноводства предполагают генетическую паспортизацию новых сортов культурных растений. Паспортизация сортов нужна, к примеру, при сертификации и коммерческом распространении семян. Однако методы, лежащие в основе генетической паспортизации, могут быть успешно применены селекционерами и при селекционной работе, например, для раннего выявления генетических маркеров ценных фенотипических признаков, а также для закрепления и сохранения селекционных достижений. Методы генетической паспортизации также применяются по всему миру в семеноводстве и при проверке закупаемых партий семян на соответствие заявленному сорту, так как случаи мошенничества в этой области встречаются нередко. Для паспортизации сортов культурных растений продолжают применять методы электрофоретического определения полиморфизма белков. Однако белковые маркеры на сегодняшний день считаются устаревшими из-за большого числа недостатков и их все реже используют при генетическом анализе культурных растений. Более перспективными представляются методы генетической паспортизации сельскохозяйственных растений, основанные на ДНК- маркерах. Для повышения эффективности селекционной работы и уменьшения необходимого для создания сорта времени представляется актуальным использование современных методов генетического анализа. При умелом сочетании фенотипических и генотипических методов времянеобходимое для получения новых сортов культурных растений может быть уменьшено в разы.

В настоящее время насчитывается несколько десятков типов молекулярных маркеров.

Основными инструментами для выявления ДНК-полиморфизма на уровне нуклеотидных последовательностей можно считать три базовых метода: рестрикционный анализ (с 1974 г.), полимеразная цепная реакция (ПЦР) (с 1988 г.) и секвенирование (с 1977 г.). Если в 90-е годы прошлого века и в начале XXI века в основном использовались методы, основанные на ПЦР, то на сегодняшний день наблюдается рост популярности методов изучения SNP (ДНК-чипы), а

также применяют методы прямого секвенирования отдельных участков ДНК. Можно предполагать, что при существенном снижении стоимости полногеномного секвенирования, именно эта методика может стать основой генетического анализа и паспортизации в обозримом будущем. Однако на сегодняшний день до сих пор более частое применение находят методы основанные на ПЦР, ввиду их дешевизны и простоты.

RFLP-маркеры (Restriction Fragment Length Polymorphism) – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов.

Для обнаружения изменчивости на уровне ДНК одним из первых (с 1980 г.) стали использовать анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ) или англ. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Анализ включает следующие этапы: выделение геномной ДНК, ее рестрикция специфической эндонуклеазой, электрофоретическое разделение образующихся фрагментов ДНК и идентификация фрагментов ДНК, содержащих полиморфный сайт рестрикции, путем блот-гибридизации по Саузерну. Если анализируемый участок имеет измененный состав нуклеотидных последовательностей, то рестриктаза не может его разрезать и на электрофореграмме наблюдается разделение фрагментов по длине. ПДРФ-анализ был значительно упрощен и стал более информативным после совмещения его с ПЦР. Поэтому многие исследователи ПДРФ-маркеры начали переводить в ПЦР-ПДРФ-маркеры.

Преимущества метода ПДРФ:

Надежная методология, которую можно повторить в разных лабораториях;

Наследуется кодоминантно, следовательно, может быть использован для оценки гетерозиготности;

Не требует информации о нуклеотидной последовательности;

Пригоден для филогенетического анализа родственных видов и родов, в пределах одного семейства;

Подходит для построения карт генетического сцепления;

При наличии подходящих зондов можно исследовать любые растения.

Недостатки метода ПДРФ:

Требуется большое количество ДНК;

Невозможность автоматизации;

Низкий уровень полиморфизма у некоторых видов;

Обнаруживается небольшое число локусов во время анализа;

Требуется больших временных затрат (при использовании гибридизации по Саузерну), в особенности с однокопийными пробами;

Дороговизна, связанная с использованием радиоактивных и нерадиоактивных меток и рестриктаз;

Необходимо распространение зондов между сотрудничающими лабораториями.

При помощи технологии ПДРФ-анализа удалось установить гомологию между хромосомами пшеницы (*Triticum tauschii*) и ячменя (*Hordeum vulgare*). Оказалось, что в геномах этих растений, принадлежащих к разным родам, более 95% малокопийных последовательностей сходны, но различие в умеренных повторах составляет 42%. Также, при помощи этого метода возможна идентификация генов устойчивости к абиотическим и биотическим стрессовым факторам. Так, например, на основе 10 групп сцепления сконструированных на 88 линиях овса идентифицированы гены устойчивости к стеблевой ржавчине, а у *Triticum spelta* в длинном плече 5А хромосомы идентифицировали три ПДРФ-маркера, сцепленных с генами *Vrn1* и *Fr1*, ассоциированных с яровизацией и морозостойкостью, соответственно.

CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) - полиморфизм рестрикционных фрагментов амплифицированной ДНК

Развитием RFLP-анализа явился метод CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence). По сути, он является объединением классического ПДРФ-анализа с методом ПЦР, что позволяет работать с определенным фрагментом ДНК, вместо использования всей геномной ДНК.

CAPS-анализ состоит из следующих этапов:

Выделение ДНК;

Проведение ПЦР со специфическими праймерами;
Гидролиз амплифицированных фрагментов спомощью рестриктаз;
Электрофоретическое разделение продуктов гидролиза в геле.

Различия проявляются в легко отличимых по длине продуктах - фрагментах ДНК при электрофорезе. CAPS-маркеры разрабатываются на основе известной нуклеотидной последовательности, являются кодоминантными и позволяют выявлять полиморфизм в большом количестве индивидуумов. CAPS-метод используют для изучения строения, функции, экспрессии и регуляции генов, а также этот метод является удобным инструментом для маркер-опосредованной селекции (MAS). Методику широко используют в отборе на устойчивость к фитопатогенам у таких культурных растений как соя, ячмень, картофель, пшеница, томаты др., в случае если CAPS-маркеры основаны на фрагментах ДНК, тесно сцепленных с генами устойчивости. Таким образом, CAPS-маркеры являются эффективным инструментом как в молекулярно-генетических исследованиях, так и в селекции растений.

CAPS-маркер, разработанный для идентификации гена *Vp-1* (*Viviparous-1*) пырейного происхождения в геноме пшенично-пырейных гибридов, является примером возможного успешного применения молекулярных маркеров данного типа в MAS. Было установлено, что гибрид пшеницы и пырея содержащий ген *Vp-1* пырея, обладает большей устойчивостью к прорастанию на корню, и может послужить донором данного гена для его интрогрессии в геном мягкой пшеницы (*T. aestivum*). Гены *Vp-1* пшеницы кодируют полноразмерный белок, но в результате некорректного сплайсинга первичного транскрипта образуются aberrантные продукты трансляции. Авторы считают, что внедрение пырейного ортолога, будет способствовать большей устойчивости пшеницы к прорастанию на корню, что поможет исключить потерю части урожая. Ряд исследователей занимались разработкой методов ДНК-типирования генов *nor*, *rin* и *alc* контролирующих задержку созревания плодов томата, что способствует лучшей лёжкости плодов, и предложили CAPS-маркер для идентификации гена *alc*.

AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism) – полиморфизм длин амплифицированных фрагментов ДНК

Метод AFLP состоит из нескольких этапов: геномная ДНК разрезается двумя рестриктазами (обычно, *EcoRI* и *MseI*) с образованием выступающих 3'-концов, затем лигируется с адаптером, содержащим "липкие" концы для данных сайтов рестрикции. Далее проводятся две последовательных ПЦР: в первой, так называемой преамплификации, используют полностью комплементарные адаптерам *EcoRI* и *MseI* праймеры. Их невозможно дифференцировать электрофоретически, во второй используют праймеры, содержащие на 3'-конце некомплементарные адаптерам дополнительные основания (от 1 до 3) - для селективной амплификации.

Преимущества AFLP:

Позволяет визуально оценить сразу сотни обработанных рестриктазой ампликонов ДНК;
Высокополиморфный фингерпринт (выше, чем при RAPD и ISSR);
Дает хорошо воспроизводимые результаты;
Позволяет определить точковые мутации в сайте рестрикции или в участках отжига затравки и небольшими вставками-делециями внутри рестриктов (изменение размера полосы в спектре);
Дает общую картину изменчивости генома;
Успешно применяется в генотипировании и таксономическом анализе;
Подходит для создания карт хромосом и геномов;
Возможно определение генетической дистанции между изогенными линиями одного сорта.

Недостатки AFLP:

Доминантный тип наследования;
Сравнительно сложный и дорогой (по сравнению с RAPD и ISSR);
Многие выявленные молекулярно-генетические маркеры, локализируются в центромерных и гетерохроматиновых районах хромосом, что может быть связано с неравновероятностным распределением сайтов узнавания используемых рестриктаз.

При подборе наиболее удачной комбинации праймеров при AFLP-анализе возможно выявление внутривидовой дифференциации сортов, например, сортов озимой пшеницы.

Метод AFLP довольно часто используется для выявления генетического полиморфизма между разными сортами и линиями культурных растений. К примеру, при помощи этого метода был оценен полиморфизм между прядильными и наркотическими сортами конопли, между разными сортами черного перца *Piper nigrum*, репы *Brassica rapa* и других культур.

RAPD-маркеры (Random Amplified Polymorphic DNA) – случайно амплифицированная полиморфная ДНК

RAPD ПЦР - полимеразная цепная реакция, основанная на использовании одного, обычно декануклеотидного праймера с произвольной нуклеотидной последовательностью. Начиная с 1990 г. метод RAPD активно используется, в частности, в генетике растений - для некоторых из видов растений с его помощью построены генетические карты. Как правило, исследования с использованием RAPD выполняются следующим образом: из большого количества декануклеотидов эмпирическим путем подбираются такие, которые дают у данного объекта исследований наиболее легко типизируемые продукты амплификации, воспроизводящиеся при повторных исследованиях ДНК, несколько раз выделенной из одного и того же источника, т.е. подбираются уже из имеющихся наиболее удобные праймеры. Причем для решения некоторых задач, например генетической паспортизации особей или сортов, удобнее подбирать праймеры, дающие большее число ампликонов, для межвидовых сравнений – с меньшим спектром продуктов амплификации.

К основным свойствам RAPD можно отнести следующие:

Доминантный тип наследования (присутствие /отсутствие);

Относительно низкая точность (праймер в 10 нуклеотидов может давать такой же спектр ампликонов, как и праймер в 15 или 8 нуклеотидов);

Зависимость от характеристик амплификатора и ДНК-полимераз (для большинства случаев максимальная длина амплифицируемого фрагмента 2500-3000 пар нуклеотидов);

Локализация в геноме неизвестна.

Преимущества RAPD:

Метод удобен для исследований разных видов при использовании одних и тех же праймеров;

Не требует предварительного клонирования и секвенирования фрагментов для подбора праймеров;

Позволяет быстро обнаружить вариабельность большого числа локусов по всему геному;

Дешевизна и простота.

Недостатки RAPD:

Чувствительность к изменениям условий реакции (буфер, полимеразы и концентрации компонентов реакции) и характеристик амплификатора (уменьшенная стабильность условий, например при отсутствии термостатированной крышки);

Температура реакции отжига достаточно низкая (30-37°C), что увеличивает вероятность образования продуктов амплификации (ампликонов) с большим количеством неспаренных оснований (ошибки отжига);

RAPD-маркеры, как правило, ведут себя как доминантные, и их гетерозиготное состояние не отличается от гомозиготного, при этом точность оценок по сравнению с кодоминантными маркерами снижается;

Для того чтобы уровень статистической достоверности данных, полученных при RAPD-анализе, соответствовал таковому при использовании кодоминантных маркеров, необходима довольно большая выборка;

В результате ошибок отжига праймера образуются тусклые полосы. Чем больше таких ошибок, тем хуже амплифицируются RAPD-продукты и тем сложнее воспроизводить их при изменении условий реакции.

RAPD-анализ был применен в качестве инструмента для оптимизации селекционного процесса при проведении отбора дивергентных перспективных пар гибридизации в селекции на

гетерозис образцов перца стручкового (*Capsicum annuum* L.) с целью изучения эффективности использования ДНК-скрининга. С помощью RAPD ПЦР был проведен анализ хозяйственно важных признаков диаллельных гибридов F₁ для изучения сопряженности уровня дивергенции родительских форм и эффекта гетерозиса в поколении F₁. Уровень выявленного полиморфизма составил 44,1%. Результаты ПЦР-анализа позволили исследователям разделить экспериментальные образцы перца на дивергентные классы и идентифицировать полиморфные пары скрещивания, которые характеризовались хорошим сочетанием хозяйственно важных признаков (урожайность, архитектура плода, срок созревания) и обладали достаточным уровнем генетической дивергенции.

RAPD-анализ хорошо подходит и для филогенетических исследований. С его помощью удалось выявить и рассчитать уровень внутри- и межвидового полиморфизма у представителей рода *Aegilops* L. - ближайшего сородича пшеницы, произрастающих на территории Таджикистана, и построить дендрограмму для сравнения генетического расстояния между ними. Данный метод также был применен для расчета уровня внутривидового полиморфизма у пяти дикорастущих и одной культурной формы однолетнего подсолнечника. Однако для более точного генетического анализа подсолнечника еще ранее применяли метод SSR.

SSR-маркеры (Simple Sequence Repeats) – простые повторяющиеся последовательности (микросателлиты)

SSR-локусы представляют собой простые повторяющиеся фрагменты генома, с единицей повтора 1-5 нуклеотидов. Они присутствуют в геномах всех высших организмов, как в ядерном, так и в геномах органелл, наследуются кодоминантно, достаточно легко детектируются и имеют более высокий уровень полиморфизма по сравнению с другими генетическими маркерами. Для многих видов растений составляются генетические карты сцепления SSR-маркеров с генами, кодирующими хозяйственно ценные признаки. Метод SSR-анализа является наиболее перспективным и пригодным для практического использования, благодаря таким критериям как высокая точность, надежность, а также хорошая воспроизводимость результатов.

С помощью метода SSR-анализа разработана система молекулярных методов для установления родственных связей, выделения уникальных генотипов и идентификации сортов, растений родов *Malus* и *Pyrus* из генофонда плодовых культур Беларуси на основе оценки уровня их генетического разнообразия и степени гомологии. В ходе работы были определены гомологичные SSR-локусы видов и межвидовых гибридов, что позволило создать универсальную систему ДНК-идентификации: для рода *Malus* из 6 высокоинформативных полиморфных маркеров, для рода *Pyrus* - из 7 SSR-маркеров. Разработанный метод позволил получить молекулярно-генетические формулы сортов яблони, вишни обыкновенной, сливы домашней, сливы диплоидной и абрикоса, и осуществить ДНК-идентификацию генотипов в соответствии с критериями Отличимости, Однородности и Стабильности (ООС-тест). Также были получены дендрограммы генетического сходства сортов этих плодовых культур. На основе 8 SSR-маркеров был предложен достаточно информативный метод генетической идентификации сортов земляники садовой (*Fragaria ananassa*), селекции Беларуси, России, Германии, Польши и других стран. Анализ позволил выявить 72 различных генотипа, 86 аллелей, в среднем 11 аллелей на маркер.

ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) – межмикросателлитные последовательности

Микросателлитные последовательности окружают многие гены и могут использоваться как якорные последовательности при подборе праймеров к этим генам, что и лежит в основе ISSR-анализа. Этот метод начал развиваться в 1994 г., а к настоящему времени получил широкое распространение, особенно в исследованиях генофондов различных видов растений.

Основные свойства ISSR:

В этом методе используется один или несколько праймеров длиной 15-24 нуклеотида;

Праймеры состоят из тандемных коротких 2-4 нуклеотидных повторов и одного селективного нуклеотида на 3'-конце праймера (например, 5'-CA CA CA CA CA CA CA CA G);

Продукты ISSR-амплификации содержат на флангах инвертированную микросателлитную последовательность праймера;

Относительно высокая точность и улучшенная воспроизводимость результатов по сравнению с RAPD в связи с большей длиной праймера и более высокой температурой отжига;

Локализация в геноме неизвестна;

Маркеры данного типа используются для выявления генетической идентичности, родословной, дифференциации клонов, микроклонов и линий, таксономии близкородственных видов.

Преимущества ISSR-анализа:

Для создания маркеров не требуется знание нуклеотидной последовательности;

Не требует предварительного клонирования фрагментов для подбора праймеров;

Полилокусность – наличие большого количества продуктов амплификации;

Выявляемый полиморфизм с помощью ISSR, как правило, выше и более четко воспроизводим, чем в RAPD;

Метод удобен для генетического анализа т. к. в геномах растений количество микросателлитных повторов очень велико;

Предполагается их относительно равномерное распределение по длине генома;

Дает четко воспроизводимые и стабильные результаты;

Дешевизна и простота.

Недостатки ISSR-анализа:

Необходимо подбирать последовательность ISSR-праймеров более строго и использовать в анализе только "яркие" продукты ISSR- амплификации;

Доминантный тип наследования, что не позволяет различать гомо- и гетерозиготы;

Эффект реамплификации – повторная амплификация, ведущая к увеличению количества ампликонов, вследствие изменения условий реакции, например, температуры отжига.

Данный метод удобен и оптимален для выявления межсортовых различий мягкой пшеницы. Метод ISSR- анализа наряду с RAPD применялся также при филогенетическом анализе десяти сортов ржи Португалии и Бразилии, при котором было изучено 342 ISSR-маркера.

У различных таксонов обнаружены принципиальные отличия спектров продуктов амплификации относительно их полиморфизма при использовании одних и тех же фрагментов микросателлитных локусов в качестве праймеров в ISSR. Для диких и культурных видов сои наибольшее количество продуктов амплификации и наиболее полиморфные спектры наблюдали при использовании динуклеотидных микросателлитных повторов по сравнению с тринуклеотидными повторами в качестве праймеров. И это свидетельствует об отличиях в распределении микросателлитных повторов по геномам видов, принадлежащих разным таксономическим группам.

SNP (Single Nucleotide Polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм

Известно, что однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) лежит в основе возникновения новых аллелей. Высокая плотность и эволюционная стабильность ОНП делают их одним из наиболее удобных генетических маркеров. SNP- анализ считается одним из наиболее эффективных ДНК-маркеров для выявления внутривидового полиморфизма, что имеет важное значение для генетической паспортизации сортов культурных растений. SNP почти равномерно распределены по геному и, на основе этого, Мовиссеном с соавт. был предложен упомянутый выше тип селекции – **GS** (Genomic Selection - геномная селекция). SNP можно обнаружить с помощью оборудования для DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography – денатурирующая высокоэффективная жидкостная хроматография) или посредством использования микрочипов (SNP-arrays).

Микрочип или ДНК-чип (DNA microarray) - миниатюрная пластина с нанесенными на нее в определенном порядке фрагментами одноцепочечной ДНК — ДНК-зондами с известной последовательностью, которые ковалентно пришиты к твёрдому основанию – кремниевой, стеклянной, силиконовой или пластиковой пластине.

Использование микрочипов предполагает три этапа:

1. Подготовка ДНК-чипа (или покупка);
2. Проведение реакции (выделение ДНК, подготовка ДНК и гибридизация с ДНК- чипом);
3. Сбор и анализ результатов.

Преимущества SNP-array:

Технология позволяет использовать сравнительно малое количество исходного материала;
Высокая плотность и эволюционная стабильность;
ОНП наблюдаются чаще любых других типов полиморфизмов;
Высокий уровень информативности;
Возможность полной автоматизации анализа;
Возможен одновременный многопараметрический анализ нескольких генов одного объекта исследований;

Подходят для геномной селекции;
SNP располагаются внутри или очень близко к генам интереса;
Кодоминантный тип наследования].

Недостатки SNP-array [Sassanfar et al., 2003]:

Слишком большой массив получаемых данных, требуется довольно много времени и трудозатрат для обработки результатов;

Результаты могут быть не всегда воспроизводимыми или слишком сложными для интерпретации;

Технология SNP-array остается дорогостоящей. Методы, основанные на SNP-анализе, характеризуются самым высоким уровнем информативности, так как позволяют одновременно выявлять сотни и даже тысячи ДНК-маркеров. К примеру, технологии ДНК- микрочипов стали основой для определения генотипа ржи с использованием 5234 SNP-маркеров. Однако имеются данные, что SNP-маркеры, разработанные и апробированные на основе одних сортов мягкой пшеницы (*T. aestivum*), не подходят для оценки сходства с сортами, имеющими другое географическое происхождение, а также с другими видами злаков (*Secale cereale*).

DArT (Diversity Array Technology) – ДНК- чиповая технология для изучения генетического разнообразия

Технология разнородных массивов (DArT) представляет собой маркерную систему на основе микрочипов. DArT- технология отличается от SNP тем, что не требует данных о последовательности генома для разработки чипов. Также как и при SNP-методе, при помощи DArT-аггау можно одновременно выявлять полиморфизм сразу в нескольких сотнях и тысячах локусах не только у диплоидных растений, но и, например, у гексаплоидной пшеницы (*T. aestivum*).

Исследователями из Китая был разработан DArT-чип для табака (*N. tabacum*), который был успешно применен ими для филогенетического анализа 267 культивируемых сортов курительного табака из Китая, Северной и Южной Америки и других стран, а также для составления генетической карты табака. DArT-маркеры могут быть использованы в геномной селекции, что продемонстрировано на примере пшеницы. Потенциал высокопроизводительного генотипирования методом DArT был рассмотрен на геноме риса, использованного в качестве модели. Данный метод также применяется при составлении генетических карт и изучении разнообразия, что показано в работе по картированию генома ячменя. DArT-маркеры также оказались полезными при мечении гена устойчивости к листовой ржавчине (*LrAeSh1644*) у *Aegilops sharonensis*. Выбранный ген был фланкирован двумя DArT- маркерами, что дает информацию о его хромосомном положении и, таким образом, облегчает передачу этого гена в геном пшеницы для ее улучшения.

Технология DArT является более точной и эффективной по сравнению с AFLP и SSR.

Таким образом, на смену маркерам, основанным на изучении полиморфизма белков пришли ДНК-маркеры, которые обладают рядом преимуществ при генетическом анализе сортов культурных растений. Ожидается, что в скором времени все основные стандарты генетической паспортизации сортов в нашей стране также будут переходить на ДНК-маркеры. Для выявления генетического полиморфизма между разными сортами и линиями культурных растений

применяют большое количество методов. Наиболее эффективными из рассмотренных методов для этих целей могут считаться ISSR, SSR, SNP-анализы. Методы полногеномного секвенирования, для оценки генетических различий между разными сортами и линиями культурных растений не применяются ввиду дороговизны, сложности эксперимента и интерпретации полученных данных. Можно предполагать, что методы полногеномного секвенирования будут дешеветь и в будущем вполне могут заменить многочисленные технологии выявления ДНК-маркеров. Самыми дешевыми и легко воспроизводимыми методами из перечисленных выше являются ISSR и SSR-анализы, возможно именно поэтому эти методы наиболее часто применяются у нас для выявления генетического полиморфизма сортов или линий культурных растений. Однако в ближайшие 10 лет вероятнее всего наибольшее распространение в нашей стране, как и во всем мире, получат методы выявления SNP, которые на сегодняшний день базируются на ДНК-чиповых технологиях, что позволяет проводить автоматизацию анализа.

1.4.8. Методы определения генотипической ценности популяций

Вопросы.

1. Случайные скрещивания в популяции (панмиксия).
2. Генетический дрейф генов.
3. Генетический груз и влияние естественного и искусственного отбора на популяции.

1. Случайные скрещивания в популяции (панмиксия).

Панмиксия означает равномерное случайное оплодотворение. Панмиктическая популяция – это популяция, в которой все потенциальные родители могут вносить равный вклад в гаметный пул, и эти гаметы равномерно распределены внутри гаметной популяции. Это предполагает, что в родительской популяции нет ограничений на гибридизацию, следовательно, рекомбинация (оплодотворение) всех гамет возможно единообразно.

Случайная гибридизация подразумевает независимо от каких-либо пространственных, физических, генетических, временных причин прохождение процесса оплодотворения. У панмиктического вида все особи одного вида являются потенциальными партнерами, и вид не накладывает ограничений на спаривание по всей популяции. Панмиксия позволяет видам более эффективно достигать генетического разнообразия.

Изоляция нарушает свободную панмиксию внутри популяции, а также ограничивает возможности скрещивания между особями, принадлежащими к разным популяциям. Различают три типа нарушения панмиксии внутри популяции:

- Ассортивное скрещивание – избирательность, при которой особи с одинаковыми генотипами образуют пары чаще, чем при случайном скрещивании. К положительному ассортивному скрещиванию может приводить отбор генотипов с крайним проявлением признака. Результатом такого скрещивания оказывается изменение частот генотипов.
- Инбридинг – возможен при повышенной частоте скрещивания между особями, относящимися к одной родственной группе. В этом случае идет гомозиготация по всем локусам.
- Селективное скрещивание – особи определенных генотипов чаще по сравнению с особями других генотипов вступают в любые скрещивания, что ведет к изменению в популяциях не только частоты генотипов, но и генов. Различают два типа межпопуляционной изоляции: территориальную и биологическую.

2. Генетический дрейф генов.

Генетический дрейф генов – это случайное изменение в генетическом составе популяции, что приводит к изменению частоты аллелей в популяции и может происходить в любой популяции, независимо от ее размера или типа. Может привести к потере генетического разнообразия в популяции: увеличению или уменьшению частоты определенных аллелей, т. е. увеличению гомозиготности и уменьшению гетерозиготности популяции.

Одним из основных механизмов генетического дрейфа является *эффект основателя*, это когда небольшая группа особей отделяется от исходной популяции и создает новую популяцию. Другим механизмом генетического дрейфа является *эффект бутылочного горлышка*. Возникает, когда популяция сокращается до очень низкого числа особей из-за природных катастроф, болезней или других факторов. В такой малочисленной популяции генетическое будет сильно сокращено и некоторые аллели могут быть потеряны или стать более распространенными из-за случайного разделения генов.

На генетический дрейф генов оказывает влияние размер популяции, случайное разделение генов, мутации, миграция и естественный отбор. Генетический дрейф оказывает влияние на популяцию и может приводить к уменьшению генетического разнообразия, увеличению генетической однородности, увеличению частоты редких генетических вариантов, увеличению риска вымирания.

Генетический дрейф может быть использован в селекции желательных генотипов, так как можно создать малые популяции с желательными генетическими характеристиками и позволить генетическому дрейфу привести к фиксации этих характеристик в популяции.

3. Генетический груз и влияние естественного и искусственного отбора на популяции.

Генетический груз – часть наследственной изменчивости популяции, определяющая появление менее приспособленных особей, подвергающихся избирательной гибели в результате естественного отбора. Генетический груз – неизбежное следствие генетического полиморфизма.

Существует три типа генетического груза:

- Мутационный;
- Сегрегационный;
- Субституционный.

Мутационный генетический груз – побочное действие мутационного процесса. Стабилизирующий естественный отбор удаляет вредные мутации из популяции.

Сегрегационный генетический груз – характерен для популяций, использующих преимущество гетерозигот. Удаляются хуже приспособленные гомозиготные особи. Если обе зиготы летальны – половина потомков погибает.

Субституционный генетический груз – происходит замена старого аллеля новым. Соответствует движущей форме естественного отбора и переходному полиморфизму.

Генетический полиморфизм создает все условия для протекающей эволюции. При появлении нового фактора в среде популяции способен адаптироваться к новым условиям (например, насекомые приобретают устойчивость к различным инсектицидам).

Наибольшее влияние на изменение генетической структуры популяции оказывает естественный и искусственный отбор, в результате действия которых изменяются частоты аллелей и генотипов и происходит нарушение генного равновесия. Естественный отбор обусловлен влиянием разнообразных факторов внешней среды на отдельные организмы и всю популяцию. Он способствует повышению приспособленности организмов к различным условиям жизни. Компонентами приспособленности являются показатели выживаемости, плодовитости, скорости развития, эффективности опыления и др.

Искусственный отбор осуществляет человек, изменяя условия возделывания, устраняя нежелательные признаки и свойства или вводя в популяцию необходимые для селекции индивидуумы.

В современном понятии отбор – это сохранение более приспособленных к определенным жизненным условиям и технологиям производства особей или выбор человеком объектов, соответствующих его требованиям и устранение менее приспособленных, худших экземпляров.

Изменение структуры популяции под действием отбора зависит от типа наследования (доминирование, неполное доминирование, рецессивность, сверхдоминирование), пенетрантности гена, типа отбора (естественный, искусственный). Отбор может способствовать сохранению популяции особей с определенными аллелями (отбор в пользу аллеля) или наоборот, вызвать их устранение (отбор против аллеля). При направленности отбора в пользу доминантных аллелей, имеющих приспособительную ценность, в популяции быстро повышается концентрация доминантных аллелей и существенно увеличивается доля гомозиготных доминантных генотипов. При этом гетерозиготы сохраняются. Концентрация рецессивных генотипов снижается.

Если доминантный аллель летален, то отбор будет направлен против этого аллеля и устраняет из популяции особей с этим аллелем уже в первом поколении. Если доминантный ген имеет полублетальное действие или неполную пенетрантность, то он устраняется отбором постепенно на протяжении ряда поколений.

Таким образом, естественный и искусственный отбор – это два важных процесса, которые влияют на эволюцию организмов. Естественный отбор происходит в природных условиях и основан на принципе выживания наиболее приспособленных особей к окружающей среде.

Искусственный отбор, с другой стороны, осуществляется человеком и направлен на отбор и размножение определенных признаков у растений и животных. Оба процесса имеют сходства, такие, как выбор наиболее приспособленных особей и изменение генетического состава популяции. Однако, есть и различия, такие как источник отбора (природа или человек) и цель (приспособление к среде или получение желаемых признаков).

Оба процесса играют важную роль в эволюции организмов, способствуя адаптации и изменению популяций в течение времени.

1.4.9. Биометрико-генетический анализ признаков

Вопросы.

1. Диаллельный анализ признаков
2. Определение эффекта гетерозиса

1. Диаллельный анализ признаков

Самый известный из указанных методов – диаллельный анализ. Он проводится путем скрещивания всех изучаемых образцов по принципу «каждый с каждым». Количество гибридных комбинаций при этом составляет $n \times (n - 1)$. Если не менять скрещиваемые образцы места ми, т. е. не использовать их и в качестве матери, и в качестве отца, что дает гибриды с одним и тем же ядерным материалом, но с разной цитоплазмой, то количество гибридных комбинаций уменьшится вдвое. Тем не менее при большом числе образцов это непосильная работа: например, если имеется 100 образцов, необходимо будет выполнить 4950 комбинаций. Далее требуется оценить первое гибридное поколение по интересующим селекционера признаков, т. е. заложить специальный опыт с повторениями. В результате будет получена оценка общей комбинационной способности (ОКС), и ее можно трактовать как уровень признака (например, продуктивности растения), который в среднем имеют все гибриды данного образца. ОКС сорта свидетельствует об особенностях его полигенной системы, контролирующей признак, – она сочетается с полигенными системами других образцов в соответствии с упомянутым выше полимерным наследованием. Высокая ОКС говорит о селекционной ценности образца в качестве родительской формы. Соответственно два таких образца представляют собой перспективную гибридную комбинацию.

Таким образом, метод очень трудоемок. Кроме того, из выполненных гибридных комбинаций можно использовать для дальнейшей работы только те, у которых высокая ОКС родителей, а семена остальных будут забракованы. Поэтому оказывается более выгодным использовать менее информативные способы подбора пар, при которых ценность гибридных комбинаций устанавливается попутно в процессе браковки потомств отобранных из них растений в оценочных питомниках селекционного процесса, и добиваться успеха за счет большого числа гибридных комбинаций. Постоянный анализ числа и ценности потомств элитных растений, отобранных из гибридных популяций, позволяет выявлять наиболее ценные родительские формы и использовать их для новых скрещиваний, а иногда даже для повторения уже полученных однажды гибридных комбинаций в большем объеме.

Диаллельный анализ может быть применен для исследовательских работ и, возможно, для оценки узкого круга образцов, если есть основания считать, что среди них окажутся наиболее перспективные для гибридизации. Этот метод используется также при селекции гетерозисных гибридов, о которых речь пойдет далее.

В селекции используют два типа скрещиваний: простые и сложные. Простые или парные скрещивания – это скрещивания двух родительских форм, сложные – скрещивания более двух родительских форм (разумеется, не одновременно) или повторные скрещивания с одним из родителей.

Простые скрещивания бывают **прямыми** и **обратными**. Используя буквенные символы родительских форм, их можно записать следующим образом: $A \times B$ и $B \times A$. Первая буква в формуле скрещивания означает материнскую форму, вторая – отцовскую. Первое скрещивание – прямое, второе – обратное. Но ничто не мешает считать второе скрещивание прямым, а первое – обратным, нужно только при записи поменять их местами.

Система прямого и обратного скрещивания носит название **реципрокного скрещивания**. И прямой, и обратный гибрид будут иметь одинаковый ядерный (хромосомный) материал, но отличаться цитоплазмой, поскольку та наследуется только по материнской линии.

В селекции реципрокное скрещивание применяется редко, поскольку селекционер заранее определяет, какую цитоплазму он хочет иметь в гибриде. Обычно отдают предпочтение местной

форме, поскольку считается, что адаптивность к почвенно-климатическим условиям в какой-то степени контролируется плазмогенами.

Кроме того, от выбора той или иной формы в качестве материнской или отцовской иногда зависит сам успех скрещивания. Это часто наблюдается при отдаленных скрещиваниях, но может иметь место и при внутривидовых. Например, важно, какая родительская форма будет выступать в качестве материнской, а какая – в качестве отцовской, если они цветут не одновременно. Обычно форму, цветущую позднее, используют в качестве отцовской: яйцеклетки дольше сохраняют способность к оплодотворению, чем спермии. Реципрокное скрещивание может быть применено, если неизвестно, какое из скрещиваний – прямое или обратное – обеспечит большее завязывание гибридных семян, а есть основания считать, что они в этом отношении неравнозначны. Или хотят, чтобы в гибридной популяции присутствовали генотипы и с той, и с другой цитоплазмой. Простые скрещивания могут складываться в системы скрещиваний, например такую, как описанная выше система диаллельного скрещивания.

Среди сложных скрещиваний различают ступенчатые, возвратные, насыщающие (поглощительные) и конвергентные.

Задача **ступенчатого скрещивания** заключается в том, чтобы объединить полезные признаки и свойства, присущие различным родительским формам, в один гибрид путем последовательного скрещивания гибридов между собой или с другими родительскими формами. В качестве примера можно привести ряд формул скрещивания:

$$(A \times B) \times B; (A \times B) \times (B \times \Gamma); \{(A \times B) \times (B \times \Gamma)\} \times D.$$

Нужно иметь в виду возможное неравенство вкладов родительских форм в конечный результат. Так, в первой формуле сорт В привнесет в гибрид 50% ядерного материала, а сорта А и Б – только по 25%. Здесь на последнем этапе целесообразно использовать наиболее ценный сорт.

Существуют два варианта проведения ступенчатых скрещиваний:

- скрещивают первые гибридные поколения – так называемые межгибридные скрещивания;
- получение второго или более поздних поколений, отбор рекомбинантов, ради которых скрещивание было проведено (сочетающих те признаки родителей, которые было намечено объединить), а затем дальнейшие скрещивания.

Оба варианта имеют достоинства и недостатки, которые отметим в предлагаемой ниже модели.

Поставлена цель объединить в одном генотипе доминантные аллели, которыми обладают четыре формы: AAbbccdd, aaBBccdd, aabbCCdd и aabbccDD, с целью отобрать в гибридной популяции генотип AABBCcDD.

В первом случае выполним эту задачу посредством ступенчатых скрещиваний.

1-й год Первые скрещивания:

$$(AAbbccdd \times aaBBccdd) \text{ и } (aabbCCdd \times aabbccDD).$$

2-й год

Выращивание

$$F_1: AaBbccdd \text{ aabbCcDd}.$$

3-й год

Отбор нужных генотипов в F₂:

AABVccdd и aabbCCDD.

Каждый из них встречается как 1/16 (расщепление при дигибридном скрещивании).

4-й год

Второе скрещивание:

AABVccdd × aabbCCDD.

Выращивание F₁:

5-й год

AaBbCcDd.

6-й год

Отбор нужных генотипов в F₂:

AABVCCDD.

Теоретическая встречаемость генотипа AABVCCDD в популяции равна 1/256.

Таким образом, работа может быть выполнена за шесть поколений с минимальной частотой встречаемости нужного генотипа не менее 1/256.

Выполним ту же задачу посредством межгибридных скрещиваний.

1-й год. Первые скрещивания:

(AAbbccdd × aaBVccdd) и (aabbCCdd × aabbccDD).

2-й год

Второе скрещивание:

Выращивание F₁:

AaBbccdd × aabbCcDd.

3-й год

AaBbCcDd.

Кроме указанного, в F₁ будут и другие генотипы. Встречаемость генотипа AaBbCcDd в популяции 1/16, так как гаметы ABcd и abCD родителей составляют

1/4 всего набора гамет ($1/4 \times 1/4 = 1/16$).

4-й год Отбор нужных генотипов в F₂:

AABVCCDD.

Теоретическая встречаемость генотипа AABVCCDD в популяции F₂ составит 1/16 (встречаемость генотипа AaBbCcDd в F₁) × 1/256 (встречаемость генотипа AABVCCDD в F₂ от расщепления AaBbCcDd). Следовательно, встречаемость искомого генотипа в популяции $1/16 \times 1/256 = 1/4096$.

В этой модели есть одна условность: можно заранее при ступенчатых скрещиваниях извлечь из популяции на третий год работы генотип AaBbCcDd и на четвертый год работы иметь дело только с расщеплением этого генотипа, а не со всей популяцией. И тогда искомым генотип будет выщепляться в отношении 1/256, как и во втором варианте. Но это – модель. В реальной селекции при полигенном наследовании выделить заранее генотип, который даст необходимое расщепление, невозможно или очень трудно. Таким образом, вариант межгибридных скрещиваний дает возможность завершить работу за четыре года,

но зато селекционер столкнется с большими трудностями при отборе из-за редкой встречаемости ценных рекомбинантов. При использовании ступенчатых скрещиваний работу придется вести на два года дольше, но отбор может быть более успешным. Последнее обстоятельство объясняет, почему селекционеры так редко прибегают к межгибридным скрещиваниям, несмотря на, казалось бы, очевидную возможность ускорить работу. Хотя такие примеры есть. Так, сорт озимой пшеницы Безостая 2 получен от скрещивания F_1 (Нойцухт \times Безостая 4) \times Безостая 1; сорт ячменя Степовый – F_1 (Одесский 14 \times Одесский 9) \times Уманский.

Следующий этап – определение комбинационной способности линий. Различают общую (ОКС) и специфическую комбинационную способность (СКС). Общая комбинационная способность определяется в отдельности для каждой линии, специфическая – для каждой пары линий, которая в случае высокой СКС может получить статус простого межлинейного гибрида. Высокая ОКС означает, что линия способна давать достаточно высокий гетерозис в скрещивании с любой линией. Но наилучшую комбинацию может указать только высокая СКС. Поэтому сначала нужно протестировать все линии на ОКС, а затем лучшие – на СКС в гибридных парах. Это можно сделать и за один прием в так называемых диаллельных скрещиваниях, т. е. скрещиваниях во всех возможных комбинациях – каждая линия скрещивается со всеми изучаемыми линиями. Далее проводится диаллельный анализ, математический аппарат которого рассматривается в курсах биометрии, позволяющий рассчитать ОКС и СКС. Этот анализ неудобен тем, что число комбинаций слишком велико. Оно выражается формулой $n \times (n - 1)$, где n – число линий. Если имеется 100 линий, а это еще не самое большое число для крупного селекционного учреждения, то число комбинаций – прямых и обратных – составит 9900. Если оставить только прямые скрещивания, то и это составит внушительный объем $n \times (n - 1) / 2$ (4950 комбинаций). Поэтому прибегают к топкроссам или тестерному методу.

Метод был предложен Дэвисом и заключается в том, что весь набор линий скрещивают с одним образцом – тестером, который представляет собой популяцию со средней комбинационной способностью (высокая не давала бы возможность дифференцировать линии по ОКС). Именно популятивность тестера дает возможность выявить ОКС, так как каждый образец скрещивается как бы с несколькими линиями. Далее определяют среднюю величину (т. е. x) ОКС как прибавку (в %) к урожайности исходных сортов-популяций по всем скрещиваниям. Выбирают линии, показавшие ОКС выше средней, и скрещивают их между собой по полной диаллельной схеме с целью определения СКС.

Не принципиально, будут ли испытываемые на ОКС линии при скрещивании с тестером взяты в качестве материнской или отцовской формы. Но второй вариант имеет то преимущество, что гибридные семена по крупности будут однородны, от чего во многом зависят начальные темпы роста всходов. Это будет способствовать более объективной интерпретации эффектов комбинационной способности. Недостаток данного варианта – необходимость ручного опыления.

В случае использования тестера в качестве отцовской формы каждую линию, испытываемую на ОКС, высевают в один рядок. Далее каждые три рядка линий чередуют с рядом тестера. Для большей надежности совмещения фаз цветения линий и тестера последний высевает в разные сроки. Перед началом цветения на материнских линиях обрывают метелки. Также необходимо обеспечить данное поле надежной пространственной изоляцией от других цветущих посевов данной культуры, а линии будут опыляться исключительно пылью тестера. Этот вариант исключает ручное опыление (т. е. парное скрещивание) и значительно сокращает объем работы. Однако в результате гибридные семена будут неоднородны по крупности. Использование двух и более тестеров повышает надежность оценки, но увеличивает трудоемкость.

Определение ОКС можно начинать, когда создание линий еще не завершено. Можно

оценивать ОКС, начиная с третьего инцухт-поколения, когда инбредные семьи достигли некоторой однородности, не прерывая самоопыления. Скрещивают с тестером лучшие растения, которые продолжают самоопылять. Можно скрещивать с тестером не все отобранные растения, а только часть или даже одно, по которому и судить о свойственной семье ОКС. Гибриды от скрещивания с тестером высевают на следующий год для определения ОКС. Каждый раз новые отборы будут оставлены для дальнейшей работы, если по результатам топкроссов семья окажется с высокой ОКС, или исключены из дальнейшей работы при противоположных результатах. Может быть проведено и повторное тестирование. После выделения линий с высокой ОКС необходимо провести испытание их на специфическую комбинационную способность по полной диаллельной схеме. При определении СКС целесообразно испытывать гибриды F₁ в различных почвенно-климатических условиях и в разные годы, поскольку специфическая комбинационная способность намного сильнее, чем ОКС, подвержена влиянию взаимодействий генотипа со средой.

С выявлением комбинации с высокой СКС, собственно селекционный процесс заканчивается, если конечной целью является создание простых межлинейных гибридов. Однако во многих странах мира по экономическим причинам весьма значительна доля двойных межлинейных гибридов. Известно, что не от каждой комбинации простых гибридов можно получить высокоурожайный и экологически пластичный двойной межлинейный гибрид. Из этого следует, что для достижения нужных результатов требуется провести диаллельные скрещивания большого количества простых гибридов и их испытания на комбинационную способность. Например, из 10 линий можно составить 45 простых и 630 двойных гибридов (без реципрокных). Выполнить эту работу не под силу даже крупному селекцентру.

Формула, позволяющая рассчитать все возможные комбинации двойных межлинейных гибридов:

$$K = \frac{n(n-1)(n-2)(n-3)}{8},$$

где n – число линий.

М. Дженкинс (М. Т. Jenkins, 1934) исследовал четыре метода, с помощью которых по продуктивности простых гибридов можно предсказать урожайность двойных межлинейных гибридов.

5. Определение средних показателей для всех шести комбинаций простых гибридов, в которых можно скомбинировать четыре линии: $A \times B$, $A \times C$, $A \times D$, $B \times C$, $B \times D$ и $C \times D$ (без реципрокных).

6. Определение средних показателей четырех гибридов из шести, которые не участвовали в двойном межлинейном гибриде. Для гибрида $(A \times B) \times (C \times D)$ – это комбинации $A \times C$, $A \times D$, $B \times D$ и $B \times C$.

7. Определение средних показателей для всех возможных простых гибридов. В нашем примере это $4 \times (4-1) = 12$: $A \times B$, $B \times A$, $A \times C$, $C \times A$ и т. д.

8. Определение средних показателей для четырех гибридов, в которых материнской формой является линия, а отцовской – тестер.

При проверке соответствия указанных методов с фактическими результатами Дженкинс получил следующие коэффициенты корреляции: для метода 1 – 0,75; 2 – 0,76; 3 – 0,73 и 4 – 0,61. На основании полученных данных он предложил метод 2, где фактическая урожайность двойного гибрида наиболее тесно коррелирует со средней урожайностью четырех простых гибридов, составленных из тех же линий в комбинациях, не входящих в данный двойной межлинейный гибрид. Таким образом, урожайность двойного гибрида можно довольно точно рассчитать по формуле:

$$(A \times B) \times (C \times D) = \frac{(A \times C) + (A \times D) + (B \times C) + (B \times D)}{4},$$

где A, B, C, D – линии, составляющие двойной межлинейный гибрид. Исходя из полученных данных, Дженкинс высказал мнение, что если средний урожай обоих простых гибридов $A \times B$ и $C \times D$ будет выше урожая двойного гибрида $(A \times B) \times (C \times D)$, то порядок сочетания линий выбран неправильно, иное их расположение дало бы более урожайный гибрид.

На основании урожайности, установленной для простых гибридов, можно также определять теоретический урожай трехлинейных гибридов по формуле

$$(A \times B) \times C = \frac{(A \times C) + (B \times C)}{2},$$

где A, B, C – линии, составляющие трехлинейный гибрид.

Формула, позволяющая рассчитать все возможные комбинации трехлинейных гибридов:

$$K = \frac{n(n-1)(n-2)}{2},$$

где n – число линий.

В случае если имеем 10 линий, можно получить 360 сочетаний трехлинейных гибридов (для простых гибридов в этом случае получим только 45).

Однако следует иметь в виду, что математически определенная урожайность гипотетических двойных гибридов не всегда соответствует реальности. Всевозможные эпистатические эффекты, и особенно взаимодействие генотипа со средой, могут вызвать отклонения от реальной урожайности. Теоретические расчеты ценности двойных межлинейных гибридов дают возможность исключить из дальнейшей работы явно неперспективные комбинации. А оставшееся небольшое количество лучших сочетаний самоопыленных линий следует подвергнуть дальнейшей оценке в поле.

От представленной выше схемы в практической селекции могут быть большие отклонения. Так, вместо тестера-популяции может быть применена перспективная линия, уже зарекомендовавшая себя в других гибридах. Таким образом, будет сразу определена специфическая комбинационная способность и предложены перспективные простые межлинейные гибриды.

2. Определение эффекта гетерозиса

Существуют разные способы расчета эффекта гетерозиса. Для целей селекции больше всего подходит урожайность гибрида, выраженная в процентах от урожайности наиболее урожайного родителя

$$\frac{F_1 - ЛР}{ЛР} \times 100\%, ЛР$$

где F_1 – среднее арифметическое показателя урожайности первого поколения (F_1) гибридов; ЛР – среднее арифметическое показателя урожайности лучшей родительской формы.

При малочисленности образцов прибегают и к сравнению продуктивности растений в предположении, что ценотические показатели мало отличаются (у культур, имеющих большую площадь питания, заведомо не отличаются) от продуктивности отдельного растения.

Величину гетерозиса часто определяют как отношение разницы между урожайностью гибрида F_1 со средней урожайностью обеих родительских форм:

$$\frac{F_1 - CP}{CP} \times 100\%$$

где CP – среднее арифметическое показателей урожайности обеих родительских форм.

Указанный показатель не всегда удовлетворяет селекционера. Лучший родитель может уступать лучшим современным сортам региона, в частности сорту-стандарту, а в случае, если речь идет о межлинейных гибридах перекрестноопыляющихся культур, разрыв очень велик, поскольку самоопыленные линии – продукты инбридинга – депрессивны. Поэтому введено понятие конкурсного гетерозиса – это превышение по урожайности стандарта и других сортов у гибридов в конкурсном сортоиспытании в абсолютных величинах или в процентах:

$$\frac{F_1 - st}{st} \times 100\%$$

где st – среднее арифметическое показателя урожайности стандарта.

Данный показатель, естественно, зависит не только от уровня гетерозиса, и потому не отражает точно гетерозисного эффекта, однако отвечает селекционной задаче — создать гибрид, который бы превышал по урожайности существующие сорта и гибриды. Это определяется на заключительном этапе селекции, в конкурсном сортоиспытании. На более же ранних этапах сравнение ведется сопоставлением со всеми образцами питомника, среди которых может быть и стандарт с использованием специальных методов.

