

СИВОЛАП Ю.М.

*Селекционно-генетический институт НЦ НС
Україна, 65036, Одесса, Овидіопольська дорога, 3*

ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМА И МАРКЕРНАЯ СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

Познание организации, изменчивости и специфичности генома является одной из весьма существенных проблем современной науки. Представления о возникновении генома связаны с зарождением жизни на Земле и находятся на уровне гипотез. С позиций современной науки нет реальных походов и методического обеспечения для их разрешения. А вот вариабельность и эволюция геномов доступны для исследования и имеют большое теоретическое и практическое значение. Известно выражение великого генетика Н.И.Вавилова о том, что селекция, это эволюция управляемая человеком. Селекция имеет длительную историю, однако на научную основу она встала после возникновения науки генетики, т.е. немногим более ста лет. Генетика и селекция находятся в непростых взаимоотношениях, успехи в улучшении растений во многом зависят от развития генетики, а анализ селекционных популяций дает бесценный материал для генетических исследований. Генетика и селекция, находясь в постоянном диалоге, взаимно дополняют друг друга. Предметом общего внимания является геном, его изменчивость и эволюция. Темпы прогресса биологических наук генетики, молекулярной генетики, молекулярной биологии, биохимии значительно опережают становление новых технологий улучшения растений. На создание сорта или гибрида уходит 12–15 лет, как и 60 лет тому назад, до установления материального носителя наследственности. Такая ситуация связана не только с консерватизмом селекции, но и с недостаточно полным исследованием структуры и вариабельности генома, генетики количественных признаков, гетерозиса и др.

Вариабельность и генетические взаимоотношения геномов культурных растений и их диких сородичей, изменчивость в пределах вида и специфичность сортов представляют интерес для классических и молекулярных генетиков и селекционеров. Большой вклад в развитие представления о геноме был сделан в связи с исследованием ДНК. Ряд исследователей (Мирский, Рис, Манн, МакКарти) еще до знаковой публикации Дж. Уотсона и Ф. Крика 1953 года о структуре молекулы ДНК и ее функции в качестве гена, использовали данные о содержании ДНК в ядре клетки в качестве эволюционного

показателя.

Одним из первых видовых параметров явились количество хромосом и содержание ДНК в ядре клетки. Известны работы М. Bennet, установившего количество ДНК в ядрах клеток многих видов растений. С-value в дополнение к данным о числе хромосом использовалось в качестве показателя «размера генома». По мнению авторов [1] количественные данные по размеру генома всегда должны указывать на числовой префикс С-уровня, такой как 1С, 1СХ, 2С, В цитируемой статье М. Bennet с коллегами констатируют, что термин «размер генома» не стабилизировался. Во многом это обусловлено недостаточным изучением генома, неоднозначностью эволюционных показателей и во многих случаях несоответствием количества ДНК в ядре эволюционной продвинутой вида. С-парадокс стимулировал исследования молекулярной организации и изменчивости ДНК. Открытие фракции повторяющихся последовательностей ДНК Р.Бриттеном показало, что значительная роль в эволюционной изменчивости количества ДНК принадлежит повторам. При построении схемы эволюции живых организмов без фракции повторяющихся последовательностей несоответствия устраняются. В последующем, М. Bennet а также нашей сотрудницей Е. Бойко [2] показано количественное варьирование ДНК между сортами злаков.

Значительный прогресс в исследовании молекулярной организации и изменчивости генома связан с анализом кинетики реассоциации ДНК, позволившим выделить фракции, различающихся по копийности и выполняемым в генетической системе клетки функциям. Сателлитная, минисателлитная, микросателлитная ДНК, мобильные генетические элементы, рибосомная, транспортная, гистоновая ДНК, представляющие значительную часть повторяющейся ДНК, подвержены видовой и внутривидовой изменчивости и явились важной составляющей частью новейших биотехнологий дифференциации и идентификации видов (геномов) и генотипов. Во второй половине 20-го и начале 21 века начались исследования организации и меж- и внутривидовой изменчивости с применением молекулярных маркеров. Внедрение в 1987 году Маллис и Фалоне ПЦР-анализа [3] в прак-

тику исследования ДНК создало возможность изучения молекулярно-генетического полиморфизма в селекционных масштабах. Прогресс молекулярной генетики дал толчок к развитию различных типов ДНК-маркеров, основанных на анализе полиморфизма нуклеотидной последовательности ДНК. В настоящее время развиты RAPD, IRAP, REMAP, AFLP, STR, SSR, SNP и другие типы маркерных систем. Их использование коренным образом изменило методы оценки генетического разнообразия, идентификации и классификации сортов растений, картирования и определения физической природы генов, интрогрессии новых генов и генетического мониторинга в селекции и генетике сельскохозяйственных растений.

В генетико-селекционные проекты задействованы такие ДНК-технологии, как MAS-отбор по молекулярным маркерам и MAB-селекция с помощью молекулярных маркеров. Эти технологии позволяют значительно сократить популяцию растений, находящихся в селекционных питомниках, отобрать генотипы, несущие необходимые гены или аллели генов, и выбраковать остальные растения. При использовании одного маркера в F₂ для дальнейшего изучения остается 25 %, а скрининг с двумя маркерами оставляет около 6 % растений, несущих нужный ген (аллель). Отбор можно проводить на любой стадии развития растений. В зависимости от поставленной задачи анализируют проростки, листья или фрагмент эндосперма зерна. В последнем случае отбор на стадии зерен также способствует сокращению термина селекционного процесса. Автоматизация процессов отбора и штрих кодирования образцов зерна для ДНК-типирования и ПЦР анализа ДНК значительно повышает эффективность селекции. На рис. представлен сконструированный специалистами Монсанта аппарат Corn Chipper для отбора для ДНК типирования образцов из семян растений. За смену отбираются несколько тысяч образцов для ПЦР анализа. Важным показателем является уменьшение сроков создания сорта за счет отбора при помощи кодоминантных маркеров гомозиготных форм.

Маркирование простых признаков. Наибольший прогресс в маркировании агрономически ценных генов отмечается при изучении могогенных или олигогенных признаков, оказывающих существенное влияние на фенотип и относительно нечувствительных к воздействию окружающей среды. Для маркирования практически могут быть использованы как моно – так и полилокусные системы. В качестве генетическо-

го материала предпочтительны близко изогенные линии, рекомбинантные инбредные линии, однако чаще всего анализируют расщепляющиеся по интересующему признаку популяции. Маркер может быть эффективен только для одной популяции, поэтому большое значение приобретает совместная работа по созданию и анализу расщепляющейся популяции молекулярных генетиков и селекционеров. В Украине пионером и центром молекулярного маркирования признаков сельскохозяйственных растений явился Южный биотехнологический центр (ЮБЦ), где объектами исследования стали гены, детерминирующие устойчивость к патогенам, стрессам, определяющим качество зерна и др. Сорта украинской селекции охарактеризованы по генам, определяющим тип и темп развития Vrn, Eps, Vtd, реакцию на длину дня Ppd и др. В ЮБЦ разработана ДНК-технология определения качественных показателей зерна мягкой пшеницы: твердозерность/мягкозерность, низкое содержание амилозы. Сорта Мироновская 33, Мирлебен, Оксана и линия Б16 показали аллельный состав пуриноидинов, наиболее распространенный в мире среди мягкозерных сортов (Pina-D1a; Pinb-D1a). 93 % исследованных сортов имели аллельный состав пуриноидинов Pina-D1a; Pinb-D1b, т.е. характеризовались как твердозерные сорта *Triticum aestivum* L. Выявле-

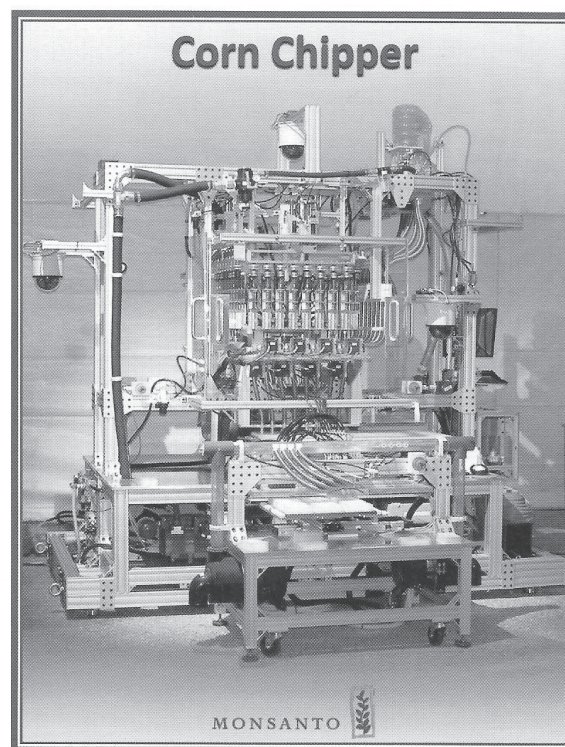


Рис. Corn Chipper фирмы Монсанта

ны молекулярно-генетические особенности и аллельные характеристики гена β -амилазы сортов ячменя украинской селекции ПЦР-анализ позволил охарактеризовать исследованные сорта по аллелям β -амилазы, оказывающие влияние на пивоваренные свойства сорта. Маркированы гены СВF-регулона, которые отвечают за низкотемпературную толерантность ячменя и пшеницы.

Проанализированы локусы, которые ассоциируются с белками теплового шока: *umc1546*, *umc1610*, *hsp18a*, *cpn2*, *hsp26/l*, *hsp70/l* в наборе контрастных по жаростойкости линий кукурузы. Выбранные полиморфные локусы являются потенциальными маркерами для оценки генотипов кукурузы на жаростойкость. Маркирующую способность локуса ORS1036, для которого установлено сцепление с геном устойчивости к заражению расы *C Or 3* на расстоянии 8 см, проверено ПЛР-анализом набора инбредных линий и гибридов. Маркер признака «устойчивость подсолнечника к заражению расы *C*» может быть рекомендован для использования в селекционном процессе.

Локализован на молекулярно-генетической карте мягкой пшеницы ген устойчивости к твердой головне *Vt*, который перенесен от *Ae. cylindrica*, в интеркалярный участок длинного плеча хромосомы 1В пшеницы на расстоянии 7.6–8.5 см дистальнее маркера *Xgwm 259*. Проведен маркерный анализ цитогенетически модифицированной центрической транслокации 1RS.1BL мягкой пшеницы с целью эффективного использования в селекции. Осуществлен анализ гибберелин-чувствительных генов короткостебельности в генотипах сортов мягкой пшеницы Украины.

Установлены аллельные характеристики сортов мягкой пшеницы, которые были созданы и используются в селекционных программах в Украине в 1912–2002 гг, по локусу *Xgwm261 (2DS)*, который является диагностическим маркером к гену короткостебельности *Rht8c*. В 98 % современных сортов мягкой пшеницы СГИ детектировано диагностический для гена *Rht8c* аллель *Xgwm261–192* п.н.

Маркирование локусов количественных признаков. Большинство агрономически ценных признаков является количественными, т.е. их генетический контроль полигенный, фенотипическое проявление непрерывно, что значительно усложняет их контроль в селекционном процессе. Определение локусов количественных признаков (QTL) является важным моментом при маркировании и картировании признаков. В

Украине первые работы по маркированию QTL ячменя проведены в 1997 году при помощи полилокусных маркеров [4]. Анализ расщепляющейся популяции для маркирования QTL кукурузы осуществлены в работе В. Доменюка и др. В связи с тем, что отбор в селекции начинается с F_2 , то объективным критерием проверки маркирующей способности полиморфных локусов ДНК остается оценка неравновесия сцепления между аллелями маркеров QTL у родителей и рекомбинантов F_2 . Изучение сегрегирующей популяции, где разные генотипы имеют одинаковую возможность развития, позволил рассмотреть основу генотипической изменчивости и определить каркасные QTL, которые сохранили влияние в контрастных условиях выращивания. Создание маркеров к таким локусам открыли перспективу прогноза и маркерного отбора генотипов с оптимальными уровнями развития количественных признаков. Для использования ДНК маркеров необходимо создание адекватной генетико-статистической модели отбора по полигенным признакам. В 2007 году в Реестре сортов Украины впервые зарегистрирован гибрид кукурузы, созданный селекционерами СГИ с участием сотрудников ЮБЦ, осуществившим маркирование QTL.

Генотипирование сортов. Важным элементом селекционного процесса является оценка исходного селекционного материала, установление молекулярной структуры сорта и генетического сходства – удаления от форм растений предлагаемых для гибридизации. В ЮБЦ разработана система дифференциации и идентификации сортов, линий, гибридов сельскохозяйственных растений. В соответствии с утвержденным UPOV DUS-тестом, ДНК-типирование пока не является обязательным условием при регистрации сорта. Однако, представление сорта в виде молекулярно-генетической формулы дает представление о структуре сорта, его соответствии требованиям однородности и стабильности. Причем, для характеристики сорта нет прямой необходимости в затратных полевых анализах фенотипических признаков, которые подвержены влиянию условий выращивания. Идентификационная составляющая формулы создает возможность решить проблему новизны сорта и дифференциации его от сортов, находящихся в базе данных. Информационная часть формулы дает сведения об аллельном составе агрономически ценных локусов. После вступления Украины в ВТО возросла необходимость защиты прав селекционеров.

Литература

1. Greilhuber J., Dolezel J., Lysak M., Bennet M. The Origin, Evolution and Proposed Stabilization of the Terms «Genome Size» and «C-Value» to Describe Nuclear DNA // Contents Oxford Journals Life Sciences Annals of Botany. – 2005. – Vol. 95, Issue 1. – P. 255–260.
2. Бойко Е.В., Бадаев Н.С., Фактор В.М., Сиволап Ю.М., Зеленин А.В., Бродский В.Я. Сравнительное определение количества ДНК в ядрах клеток сельскохозяйственных злаков // Цитология. – 1985. – Т. 27, N 5. – С. 611–614.
3. Mullis K.B, Faloona F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via the polymerase alysed reaction. *Meth Enzymol.* – 1987. – Vol. 255. – P. 335–350.
4. Сиволап Ю.М., Календарь Р.Н., Нецветаев В.П., Чапля А.Е. Маркерный анализ некоторых QTL ячменя с помощью RAPD и изоферментов // Цитология и Генетика. – 1997. – Т. 31. – С. 39–45.

SIVOLAP YU.M.

Plant Breeding and Genetics Institute

Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopolskaya doroga str., 3, e-mail: genome2006@mail.ru

GENOME EVOLUTION AND MARKER ASSISTED PLANT BREEDING

Study variability and evolution of the genome is of great theoretical and practical significance. Plant breeding using the knowledge of the genome and genes to create a more productive and resistant varieties. The development of molecular genetics contributed to the creation of new technologies to increase the efficiency of the breeding process. In practice genetiics – breeding research have been implemented MAS and MAB technology, which can significantly reduce the scale of field plots and accelerate to select genotypes with the right combination of genes (alleles). Genetic markers of playing an important role in studying the genetic constitution of the varieties, and in particular, the evaluation of the initial selection of the material, because it easier to control the incorporation of genetic factors from parent forms produced varieties and hybrids. A pioneer and a development center in Ukraine marker technology was South Plant Biotechnology Center where developed and put into practice marking simple and quantitative agronomy valuable genes and the system of identification and registration crop varieties.

Key words: evolution, genome, plant breeding, marker, South Plant Biotechnology Center, Ukraine.

СИДОРЧУК В.И.¹, КУЛИК Л.А.²

¹ *Белоцерковская опытно-селекционная станция*

Украина, 09176, Киевская обл., Белоцерковский р-н, п.о. Малая Ольшанка

² *Институт биоэнергетических культур и сахарной свеклы*

Украина, 03141, г. Киев, ул. Клиническая, 25

О ВЛИЯНИИ ЭДАФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА СЕЛЕКЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС (ИЗ ИСТОРИИ СЕЛЕКЦИИ ВИКИ ЯРОВОЙ НА БЕЛОЦЕРКОВСКОЙ ОПЫТНО-СЕЛЕКЦИОННОЙ СТАНЦИИ)

Важной составляющей сельскохозяйственной экосистемы являются эдафические (почвенные) условия жизнедеятельности растений. Почвенный комплекс включает кроме минеральных и органических соединений воды и воздуха еще большое количество микроорганизмов, которые находятся в динамическом взаимодействии с растениями.

Как показала многолетняя практика реализации селекционных программ по вике яровой на Белоцерковской опытно-селекционной станции, эффективность их выполнения зависит от репрезентативности оценок, полученных в процессе изучения продуктивности селекционных

номеров. Однако, для каждого вида растений есть лимитирующие эдафические факторы, которые усложняют такую оценку. Наличие даже одного такого фактора может вызвать депрессию продуктивности, что в итоге снижает эффективность селекционной работы. Так, недостаток Р в почве приводит к уменьшению кущения, угнетению роста корней, ослаблению поглощения влаги, снижению хлорофилла в листьях ячменя [1, 2]. Каждому виду почв свойственны свои особенности нарушения сбалансированности минерального питания растений, обусловленные их генезисом. Разбалансированность их химического состава Fe, Ca, и Si при-