

INFLUENCE OF EXTERNAL FACTORS OF MEDIUM ON FUNCTIONING POD-RHIZOBIAL SYMBIOSIS OF PEAS

G. P. Gurjev

FGBNU «THE ALL-RUSSIA RESEARCH INSTITUTE OF LEGUMES AND GROAT CROPS»

E-mail: office@vniizbk.orel.ru

Abstract: *Role of such environmental factors as predecessors and influence of pests on formation of nodules on roots of peas and their further functioning in system of symbiotic nitrogen fixation. Winter wheat was the best predecessor for peas in comparison to black fallow. Indispensable condition of successful pod-rhizobial symbiosis is sitonas control also.*

Keywords: peas, symbiotic nitrogen fixation, predecessor, sitonas.

УДК 575.164:575.174.5:631.527

*К 150-летию открытия законов наследственности
и 100-летию хромосомной теории*

СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ В ЭПОХУ ФАКТОРИАЛЬНОЙ КОНЦЕПЦИИ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ

А.А. СИНЮШИН, кандидат биологических наук
КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА МГУ
ИМ. М.В. ЛОМОНОСОВА

На примере гороха посевного кратко рассмотрены основные перспективы, открывающиеся для селекции по мере развития факториальной концепции наследственности. Проанализированы возможные последствия использования в селекции культуры принципов, действующих в природных популяциях. Обсуждается роль маркер-опосредованного отбора в выведении новых сортов.

Ключевые слова: горох посевной, эволюция, мутация, изоляция, факториальная концепция наследственности

На рубеже 150-летнего юбилея генетики логично выделить некоторые особенности ее развития и подвести итоги.

Вся история представлений о наследственности – это успешное применение методологического редуционизма: разделение сложных явлений на более простые компоненты. От представлений о «слитном наследовании» признаков и абстрактном «веществе наследственности» молодая наука проделала путь к познанию структуры гена и тонких молекулярных механизмов реализации генетической информации. Рождение генетики фактически реанимировало первоначальный дарвиновский эволюционизм, мучимый «кошмаром Дженкина», и современные представления об эволюции немислимы без осознания закономерностей генетики.

Едва ли не самое ценное в классической работе Грегора Менделя «Опыты над растительными гибридами» – это демонстрация того, что наследование признаков связано с дискретными и неизменяемыми (в первом приближении) факторами, «задатками». Полвека спустя Вильгельм Иогансен назовет их генами, и все дальнейшее победоносное шествие генетики – это нарастающая детализация, выявление все более тонких – но доступных изучению – нюансов процесса передачи информации в живых системах. В работе Менделя родилась *факториальная гипотеза наследственности*, составляющая суть генетики и современной эволюционной биологии.

Достижения генетики во все времена становились достоянием и прикладных областей, среди которых на первом месте необходимо назвать селекцию. С другой стороны, именно селекция как никакой другой из родов человеческой деятельности вызывает интерес с точки зрения моделирования эволюционных событий, движущей силой делаая искусственный

отбор. Теоретические основы селекции были предметом неоднократных обобщений. Среди них хронологически и по смыслу одно из первых мест принадлежит труду Ч. Дарвина «Изменение животных и растений в домашнем состоянии» (1868 г.), русский перевод которого был опубликован раньше английского оригинала (1867 г.) [1] – исторический курьез, в котором при желании можно усмотреть некоторую символичность.

Настоящая работа призвана вкратце рассмотреть основные перспективы, открывающиеся перед селекцией в свете современного состояния факториальной концепции наследственности. По соображениям юбилейного для генетики года и меры собственной компетентности автора, основная часть работы будет проиллюстрирована примерами из генетики и селекции гороха (*Pisum sativum* L.) – объекта, с которого начиналась генетика как самостоятельная дисциплина.

Роль мутаций в селекции культуры

Грегор Мендель не занимался экспериментальным получением мутаций: он просто взял для работы уже имевшиеся в распоряжении фермеров формы гороха. Это означает, что по крайней мере семь рецессивных морфологических (и очевидно, спонтанных) мутаций уже активно использовались в селекции этой культуры.

Одомашнивание гороха, как и любой культуры, началось с закрепления в его геноме нескольких спонтанных мутаций, которые сделали возможным сам процесс доместикации. Среди них особенное значение имеют те, которые нарушают нормальные для дикого гороха свойства: вскрывание боба с разбрасыванием семян, длительный период покоя семян, обильное ветвление, развитие толстой и плохо проницаемой для воды семенной кожуры, особенности фотопериодизма [2]. Позднее к этому списку добавились некоторые «менделевские» мутации: нарушение нормальной антоциановой окраски цветка, укороченный стебель, морщинистые семена, зеленая окраска семядолей [3]. Некоторые особенности характерны только для определенных направлений селекции – к ним относятся, например, рецессивные мутации *p* и *v*, нарушающие образование пергаментного слоя в бобе овощных сортов. Для некоторых селекционных центров определенные мутации стали частью профессионального «стиля» – например, многие сорта гороха селекции ВНИИЗБК (г. Орел) несут мутацию *def*, вызывающую прирастание семяножки к семенной кожуре. Большое значение имеют мутации, повышающие устойчивость к патогенам.

Этот список можно было бы продолжать – но недолго. Назовем две важные особенности использования морфологических мутаций в селекции гороха.

1. Из нескольких сот известных у гороха мутаций (как спонтанных, так и индуцированных) в селекции использованы лишь несколько десятков.

2. Все без исключения названные мутации охарактеризованы **на факториальном уровне** очень точно: известна их хромосомная локализация, а для некоторых – и молекулярная структура гена, включая собственно природу мутантного аллеля (нуклеотидная замена, вставка/выпадение фрагмента и т.д.).

Ниже рассмотрим следствия из этих наблюдений.

Влияние морфологических мутаций на приспособительную ценность фенотипа

Селекция с использованием морфологических мутаций идет методом проб и ошибок. Так, были созданы – но не получили распространения и в итоге утратили значимость – сорта с наследственно закрепленной фасциацией побега (например, отечественный сорт Штамбовый 2). Внедренная в генотип британского сорта Filby мутация *st*, приводящая к редукции прилистников, более не была использована в селекции, так как вызывает уменьшение фотосинтезирующей поверхности.

По мере исторического развития селекции, сорта гороха включают в свой генотип все большее количество морфологических мутаций. На материале сортов гороха двух отечественных селекционных центров, ВНИИССОК и ВНИИЗБК, показана эта зависимость (рис. 1 А). Однако, при увеличении числа рецессивных морфологических мутаций в генотипе отмечается негативный эффект, который выражается в некотором снижении фертильности пыльцы (рис. 1 Б) и выполненности боба (рис. 1 В). Этот феномен требует глубокого

изучения с привлечением более широкого спектра сортов и линий, но тенденция обращает на себя внимание.

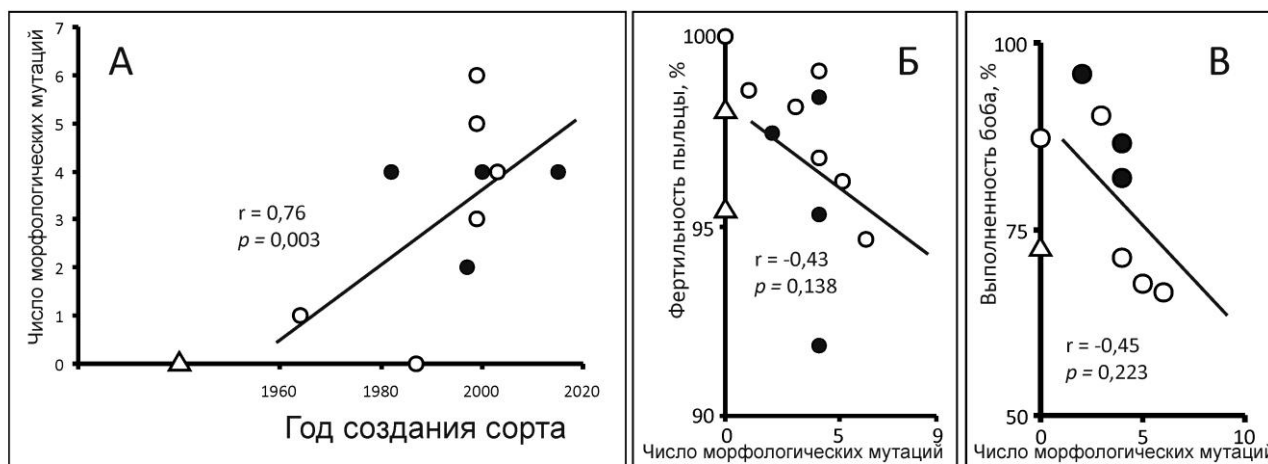


Рис. 1. Динамика накопления морфологических мутаций в генотипах отечественных сортов (А) и влияние этого процесса на фертильность пыльцы (Б) и выполненность бобов (В). Черными точками показаны сорта селекции ВНИИССОК, белыми – сорта ВНИИЗБК. Для сравнения взяты неокультуренные формы гороха, показанные треугольниками. Приведены коэффициент корреляции (r) и p-значение.

Фенотип каждого мутанта, имеющего потенциальную хозяйственную ценность, должен быть детально описан. Методологическая проблема работы с горохом (и, пожалуй, со всеми модельными объектами генетики) – очень слабая изученность фенотипа, особенно нормального. Мы очень мало знаем об изменчивости нормы и о том, какие последствия влечет за собой включение в генотип даже единственной мутации, которая, как кажется, нарушает развитие лишь одного органа (например, изменяет окраску венчика).

В этом смысле показательно, что практически все наследственные заболевания у человека, за которыми стоят конкретные мутации, классифицируют как *синдромы – совокупности* симптомов с *общим* патогенезом. Это связано исключительно с тем, что нормальный фенотип человека изучен по сравнению с другими видами очень хорошо, разработаны методики его описания и диагностики нарушений.

В свете этого необходимо тщательно изучить все возможные фенотипические проявления хозяйственно-ценных мутаций гороха. Так, формы с высоким «биоэнергетическим потенциалом» имеют сочетания рецессивных мутаций, которые изменяют морфологию листа. В первом приближении можно было бы ожидать повышение продуктивности как следствие увеличение площади фотосинтезирующей поверхности: это относится к двойным мутантам *af tac^A* (рассеченнолисточковый фенотип), *af uni^{tac}* (морфотип хамелеон), *af tl* (многократно непарноперистый морфотип).

При изучении двойного мутанта *af tac^A* («Рас-тип») в сравнении с контролем (усиковый сорт Батрак, *af TAC^A*) нами получены предварительные данные, которые указывают на ограниченность применения рассеченнолисточкового морфотипа в селекции. Так, характеристики фотосинтеза в видоизмененных листочках у формы «Рас-тип» сходны с таковыми в нормальных листочках и превышают параметры усиков. Однако на более поздних стадиях листья «Рас-типа» начинают уступать усикам сорта Батрак, т.е. высокая эффективность фотосинтеза оказывается недолговечной [5]. Первый раунд изучения накопления биомассы и испарения воды на ранних стадиях (полное развитие 4-5 листьев) показал, что у мутанта «Рас-тип» формируется *меньшая* биомасса, чем у сорта Батрак, причем ценой потребления достоверно *большого* количества воды [6]. На обеих сторонах прилистников мутанта «Рас-тип» устьиц достоверно больше (в среднем более чем в 2 раза),

чем у сорта Батрак [7]. Эти интересные результаты во многом пока остаются неопубликованными, однако очевидно, что область применимости нового морфотипа существенно уже, чем у исходного сорта. Можно прогнозировать, что он будет более чувствителен к водному дефициту. Аналогичное заключение было сделано и в отношении двойных мутантов *af tl* [8].

Не касаясь последствия этих мутаций для жизнеспособности растения (очевидно, это последствие негативно), можно заключить, что и в селекции их ценность ограничена. Напрашивается аналогия с далеко зашедшей в ходе естественного отбора специализацией, когда адаптивный диапазон сужается, и выход за его пределы грозит элиминацией соответствующих генотипов. Морфологические мутации гороха и других объектов – это интересный материал для генетики развития уже потому, что они *никогда* не подвергались действию естественного отбора, они лишь иллюстрируют «число степеней свободы» той или иной структуры. Так, у разных мутантов вместо лепестка может развиваться тычинка, чашелистик, плодолистик – но это не имеет никакого адаптивного значения, а лишь информативно в плане установления морфогенетических закономерностей.

То, что новые мутации не прошли через «сито» естественного отбора, – скорее аргумент против их использования в селекции просто потому, что их жизнеспособность и адаптивный диапазон могут существенно уступать таковым у форм, существующих в дикой природе или хотя бы длительное время бывших «в обороте» селекции.

В рамках концепции ароморфозного направления в селекции [4] была высказана идея о том, что повышение жизнеспособности форм, содержащих в генотипе морфологические мутации, должно происходить путем формирования комплекса компенсаторных генов (ККГ) по аналогии с тем, как это предположительно происходит в условиях естественного отбора. Рассмотрим возможность подобного процесса применительно к искусственному отбору у гороха.

Если полагаться исключительно на спонтанное мутирование, то имеющиеся данные указывают на крайне редкую частоту подобного события. У человека вероятность возникновения спонтанных мутаций, усредненная для нескольких локусов, составляет $2,88 \times 10^{-5}$ мутаций на локус на поколение; у дрозофилы оценки сходны – $7,48 \times 10^{-7}$ мутаций на локус на поколение [9: 33-35]. К.К. Сидорова [10] приводит данные о том, что у зернового сорта гороха Торсдаг без обработки мутагенами доля растений с вновь возникшими морфологическими и хлорофильными мутациями составляет около $2,00 \times 10^{-4}$. Очевидно, что в эту категорию попадают спонтанные мутанты по сотням (или даже тысячам) генов, имеющие хорошо отличимый фенотип. При пересчете на один локус значение оказалось бы куда меньше.

Предположим, что в простейшем случае ККГ состоит всего из одного гена – вернее, одной мутации, поскольку в большинстве случаев в результате мутаций возникают не новые гены, а новые аллели уже существовавших генов. Допустим, у гомозигот *aa* негативное действие какой-то уже имеющейся мутации (например, *tac^A*) компенсируется полностью. Если вновь возникшая мутация возникает спонтанно как рецессивная у одного растения в выборке из десяти растений с генотипом *AA tac^A tac^A* (понятно, что это очень умозрительные величины), получаем соотношение в этой модельной популяции $9/10 AA tac^A tac^A$: $1/10 Aa tac^A tac^A$. Чтобы рецессивная мутация проявилась в фенотипе, она должна оказаться в гомозиготе. При условии строгого самоопыления уже в следующем поколении появятся гомозиготы *aa*: в популяции соотношение генотипов будет иметь вид $37/40 AA$: $2/40 Aa$: $1/40 aa$ (все гомозиготы по мутации *tac^A*). Чтобы на практике обнаружить хотя бы одно растение с генотипом *aa tac^A tac^A*, минимальный размер выборки должен составить $\lg(0,05)/\lg(1-1/40)$, т.е. примерно 118 растений¹.

¹ Последовательное применение факториальной концепции позволяет прогнозировать результаты скрещиваний с математической точностью. Аналогично с приведенным расчетом, можно определить причины редкости получения люпиноидов с рассеченными листочками (*af det fa tac^A*) или с листом хамелеон (*af det fa uni^{tac}*). Так, среди гибридов F_2 от скрещивания люпиноидов с нормальным листом (*AF det fa TAC^A*) и хамелеонов с нормальным соцветием (*af DET FA tac^A*) ожидаемая частота требуемого фенотипа – гомозиготы по 4 мутациям – составит $1/4^4$ (0,39 %), а минимальный размер популяции F_2 должен быть около 765 растений.

Эта величина кажется небольшой, однако необходимо учесть несколько обстоятельств:

1. Частота спонтанного мутирования *конкретного* гена очень мала (см. выше).

2. Не любая мутация гена может привести к изменению его функции; возможны мутации в некодирующих областях (интронах) или синонимические замены (изменения в последовательности нуклеотидов, не приводящие к изменению последовательности аминокислот в белковом продукте).

3. Гипотетический ККГ может включать не только один, но и большее количество генов, каждый из которых должен мутировать.

4. Чтобы оценить «компенсирующее» влияние мутации на проявление количественного признака (количество накопленной биомассы, потребление воды, скорость испарения, и даже просто продуктивность), необходим детальный анализ *каждого* растения с учетом всех соображений корректного статистического подхода.

Определенные надежды возлагаются на мутации в гетерозиготе – у гетерозигот по индуцированным мутациям часто наблюдается гетерозис [10]. Однако у самоопылителя доля гетерозигот будет неуклонно снижаться. Несложный расчет показывает, что в поколении F_n , полученном от самоопыления растений поколения F_{n-1} , частота гетерозигот будет составлять $p_n = p_0 \times 2^{-n}$, где p_0 – начальная частота гетерозигот. Чем меньше доля редкого генотипа в популяции, тем выше вероятность его утраты за счет случайных причин.

В свете этих соображений, время ожидания того момента, когда ККГ сформируется за счет спонтанных мутаций, приобретает астрономические масштабы, а выявление этого события требует невообразимых трудозатрат. Будь иначе, *любая* не летальная мутация успешно «сбирала» бы некий компенсаторный комплекс, который поддерживал бы генотип с ее участием.

Вероятность появления необходимых мутаций можно повысить с применением индуцированного мутагенеза, но и в этом случае мутации возникают в произвольных местах генома, и все вышеперечисленные ограничения остаются актуальными.

Другим, более эффективным источником аллелей для формирования ККГ мог бы стать весь генофонд культивируемого гороха. В природных популяциях перекрестно опыляемых растений устанавливается близкая к панмиксии (свободному скрещиванию) ситуация, когда в каждом поколении за счет преимущественно комбинативной изменчивости возникают новые генотипы. Эти генотипы сразу оказываются под селективным давлением естественного отбора. Вновь возникающие мутации, если не элиминируются, быстро «становятся достоянием» всей популяции. Если ККГ реально возможен, таким путем он мог бы формироваться более эффективно. Однако горох является почти исключительно самоопылителем, и для него эти процессы затруднены даже в природных популяциях. Сортопопуляции обычно достаточно выровнены генетически, и состав аллелей в них варьирует в очень небольших пределах. Кроме того, в рамках концепции ароморфозного направления указывается на необходимость «*изоляции*» от существующей мегапопуляции возделываемого гороха» [4: 16]. Данная концепция предполагает сведение роли комбинативной изменчивости к минимуму. Вклад мутационного процесса в становление ККГ рассмотрен выше.

«Свободные» гены, гипотетически способные оптимизировать гибридный геном [4], могли бы иметь значение при макроэволюционных событиях. Можно предположить, например, что гены предковой группы рептилий, имевших конечности, у различных безногих рептилий (некоторых ящериц, змей, амфисбен) приобретают иные функции. Однако в пределах одного вида едва ли остаются гены, которые были бы постоянно активны у одних разновидностей (в том числе видов) и постоянно неактивны – у других. Речь в этом случае не идет о мутантных аллелях. Так, не существует «генов формы семян» у овощных сортов гороха. Есть локус V группы сцепления, который может быть «занят» или функциональным аллелем R , или нефункциональным r . Доминантный аллель кодирует нормальный по структуре и функции фермент, образующий 1,6-связи в молекуле крахмала. У форм с морщинистыми семенами в том же локусе находится рецессивный аллель r ,

неспособный к выполнению нормальной функции. В результате этого дефекта не образуется нормальный крахмал-разветвляющий фермент, крахмал в семенах формируется в виде коротких олигосахаридных цепочек, и при высыхании семена сморщиваются. Эта мутация была первой «менделевской», идентифицированной у гороха на молекулярном уровне [11]. Таким образом, у конкретного сорта присутствует или хотя бы одна функциональная копия гена (**RR** или **Rr**), или ни одной (**rr**). Функция или выполняется нормально, или нет – но нет возможности «перевербовки» гена в пределах одного вида.

Определенный вклад в «адаптации» генотипа к мутациям, снижающим жизнеспособность, могут вносить эпигенетические события – например, модификации ДНК и гистонов, не связанные напрямую с изменением нуклеотидной последовательности. Однако они нестабильны, во многом зависят от условий среды и легко обратимы.

Особенности динамики генетического разнообразия у культивируемого гороха

За тысячелетия возделывания гороха накоплено значительное разнообразие его форм. Динамика генетического полиморфизма во времени для этой культуры имеет ряд особенностей, которые в целом плохо сводимы к известным для природных популяций закономерностям.

Процесс создания сорта ориентирован на получение сколь возможно чистой линии, т.е. однородного в генетическом плане материала. При помощи контроля над однородностью, отличимостью и стабильностью удается добиться фенотипического единообразия – по крайней мере, по качественным признакам. Большинство возделываемых сейчас сортов гороха содержат значительное число рецессивных мутаций, и привнесение в их генотип новых аллелей (например, за счет редких событий перекрестного опыления) с высокой вероятностью приведет к выщеплению новых – нехарактерных для первоначального сорта – фенотипов.

На молекулярном уровне добиться полной гомозиготности генома по всем локусам и однородности сорта представляется трудно выполнимой задачей. Скорее всего, большинство локусов (но не все) представлено единственным аллелем. Если за счет изначальной неоднородности материала, спонтанного мутирования или заноса какие-то локусы переходят в гетерозиготное состояние (например, появляется новый аллель), то при условии самоопыления доля гетерозигот остается малой, а частота гомозигот по каждому из аллелей возрастает.

Если доля растений с редкими аллелями в популяции невелика, то случайные колебания численности могут привести к полной элиминации этих аллелей, как это происходит в природных популяциях за счет генетического дрейфа.

Для ряда культур накоплены обширные данные о динамике генетического разнообразия. Так, для ячменя показано, что «селекция, направленная на создание генетически однородных сортов, приводит к утрате внутрисортного и аллельного разнообразия на ареале... налицо элементы генетической эрозии» [9: 351-394]. Аналогичная тенденция показана и для пшеницы, между сортами которой по мере исторического развития возрастает степень генетического сходства. Это связано с использованием «в селекционных центрах ограниченного набора выдающихся по урожайности сортов» [9]. И пшеница, и ячмень – преимущественно самоопылители, поэтому отмеченную динамику можно считать присущей и гороху.

Таким образом, от года к году вероятность «сборки» ККГ для новой мутации из генофонда культурных форм гороха даже при условии нарушения изоляции снижается. Если гипотетический ККГ не существует уже в генотипе сорта, в котором морфологическая мутация была получена, то шансы сформировать его путем комбинативной изменчивости с привлечением «внешних ресурсов» также невелики.

Проиллюстрировать динамику изменчивости внутри одного сорта можно на следующем примере. В ходе работы [12] изучали ДНК-полиморфизм в пяти образцах одного и того же сорта Filbu, полученных из разных источников: ВНИИЗБК, ВИР, John Innes Centre (Великобритания), коллекция кафедры генетики МГУ – репродукции 2010 и 1993 г. (в

последнем случае ДНК выделяли из невсхожих семян). Каждый образец включал по 20 растений, морфологически все изученные растения были сходны. Для анализа использовали 6 микросателлитных маркеров, каждый из которых характеризует по одному уникальному некодирующему локусу с известной хромосомной локализацией. Для 4 маркеров все образцы оказались гомозиготами по единственному аллелю, в 2 случаях наблюдали полиморфизм. Частоты аллелей приведены в таблице.

Таблица

Частоты аллелей ДНК-маркеров в пяти образцах сорта Filby. Буквенные обозначения аллелей присвоены условно

Маркер	Аллель	Образец				
		МГУ-2010	МГУ-1993	ВИР	ВНИИЗБК	ЛС
AD141	А	1,00	0,570	0,95	1,00	1,00
	В	0,00	0,185	0,00	0,00	0,00
	С	0,00	0,185	0,05	0,00	0,00
AA430942	А	1,00	0,55	0,91	0,98	1,00
	В	0,00	0,45	0,09	0,02	0,00

Микросателлитные локусы принадлежат к числу высокополиморфных, их мутирование в основном связано с ошибками репликации при удвоении ДНК или неравным кроссинговером при мейозе. Эти локусы не кодируют никаких продуктов. Мутации в них происходят чаще, чем в генах, и могут быть легко выявлены с помощью ПЦР и электрофореза.

Приведенные в таблице данные показывают, что только две группы, МГУ-2010 и ЛС, представляют собой чистые линии в отношении изученных локусов. У остальных образцов наблюдается тот или иной уровень полиморфизма. За 17 лет поддержания в коллекции кафедры генетики произошло сокращение первоначального разнообразия, приведшее к фиксации единственного аллеля каждого локуса. По всей видимости, такой же процесс произошел и в коллекции John Innes Centre. Так как аллель «В» локуса AA430942 присутствует в четырех образцах из шести, сложно предположить, что он возник в результате мутаций независимо в 4 коллекциях. Скорее всего, имел место «эффект основателя»: исходный полиморфизм сорта Filby, созданного в Великобритании в 1978 г., сохранился в части коллекций, а в других фондах произошла эрозия разнообразия.

Важно отметить, что даже один сорт, воспроизводимый в разных коллекциях, не представляет собой единой популяции. Наблюдаются характерные последствия фрагментации первоначальной популяции: элиминация части аллелей в одних группах, изменение частот в других. Это еще в большей степени относится ко всему генофонду культивируемого гороха, воспринимаемому как единое целое. Единая «мегапопуляция» (термин из работы [4]) лишена признаков панмиксии, внутри нее существуют очевидные изоляционные барьеры. Обмен генетическим материалом происходит на стадии создания нового сорта (и, как это было показано выше на примере злаков, приводит к эрозии разнообразия), а вновь созданный сорт и даже его образцы в разных коллекциях представляют собой надежно изолированные популяции, в которых высока вероятность снижения полиморфизма. В таких условиях формирование ККГ для новых мутаций представляется сомнительным. Формам, которые человек отбирает в ходе селекции, (в том числе и новым листовым морфотипам) просто не из чего «соотбирать» - изящный термин Н.В. Тимофеева-Ресовского – «оптимальную генотипическую среду» (цит. по [4]). Это

связано, прежде всего, с тем, что закономерности селекции лишь отчасти могут быть сведены к тенденциям естественного отбора.

Приведенные доводы не являются чем-то принципиально новым, они логично вытекают из основ факториальной гипотезы наследственности и генетики популяций. Предположение, что для «выгодных» человеку мутаций эти тенденции будут иными, означает следование антропному принципу в одной из самых одиозных его формулировок: природа с ее законами существует исключительно на благо человека.

Маркер-опосредованный отбор в современной селекции

Альтернативой пассивному ожиданию «милостей от природы» может стать применение еще одной ценной возможности, которая открывается в русле факториальной гипотезы наследственности – маркер-опосредованного отбора (marker-assisted selection, MAS).

По мере изучения частной генетики гороха происходит идентификация на молекулярном уровне все большего числа его генов – в том числе имеющих большое значение в селекции. Если установлена нуклеотидная последовательность гена и природа мутации в нем, можно вести предварительный отбор не по фенотипу, а путем прямого генотипирования.

Приведем пример из селекции близкой культуры – бобов (*Vicia faba* L.). У этого вида, как и у гороха, известна мутация, которая в гомозиготе приводит к детерминантному типу роста (ДТР). Интересно, что мутации в сходном гене ответственны за ДТР и у других бобовых – гороха, фасоли, «голубинового гороха», вигны [13]. У бобов обнаружена мутация в гене *VfTFL1a*, ассоциированная с ДТР. С помощью ПЦР, обработки эндонуклеазой рестрикции и электрофореза можно точно установить генотип растения по этому локусу на любой стадии – даже у проростков, у которых еще не произошло заложение соцветия. Эти процедуры стали рутинными во всем мире. С их применением реально пройти путь от выделения ДНК из растительного материала до однозначного генотипирования нескольких сотен образцов за один рабочий день. По итогам анализа можно уверенно сказать, какие из растений гибридной популяции проявят признак ДТР, какие гетерозиготны по этому локусу, а какие – гомозиготны по доминантному аллелю. В результате, возможно осуществить выбраковку части материала, сэкономив время, усилия и посевную площадь.

У гороха было независимо получено две мутации по одному и тому же гену (*det*), которые приводят к ДТР [15]. На молекулярном уровне они еще не идентифицированы (сейчас нами ведется эта работа), но, как только это будет сделано, можно будет осуществлять маркер-опосредованный отбор по этому локусу.

Это относится не только к морфологическим признакам, но и, например, к признакам устойчивости к патогенам. Например, были идентифицированы ДНК-маркеры, сцепленные с локусами, которые контролируют устойчивость к фузариозу, мучнистой росе и вирусу обыкновенной мозаики [14]. Отбирая по этим маркерам, можно создать линии с высоким уровнем устойчивости, фактически не прибегая к отбору по фенотипу по степени зараженности.

Во многих случаях природа целевого гена неизвестна. Это часто относится к так называемым локусам количественных признаков (ЛКП, quantitative trait loci, QTL). Однако, если положение такого локуса на генетической карте установлено (для очень многих признаков гороха это именно так), то можно вести маркер-опосредованный отбор по маркерам, сцепленным с этим локусом (рис. 2). Применение молекулярных маркеров имеет множество известных плюсов – в частности, возможность генотипирования на любой стадии.

Большое значение имеет скорейшая идентификация локусов, которые не имеют самостоятельного фенотипического проявления, но модифицируют выраженность других признаков. Известно, например, что ценная в селекционном плане мутация *determinate habit* (*deh*) в разной степени проявляется на фоне разных генотипов [15]. Другая мутация детерминантного типа роста, *determinate* (*det*), у разных линий приводит к образованию 2 или 3-5 пазушных соцветий [15]. Важная задача состоит в том, чтобы свести анонимные формулировки типа «ряд генов-модификаторов», «компенсаторный комплекс» или

«генотипическая среда» к конкретным факторам, которые можно анализировать статистическими методами и в отношении которых можно вести маркер-опосредованный отбор.

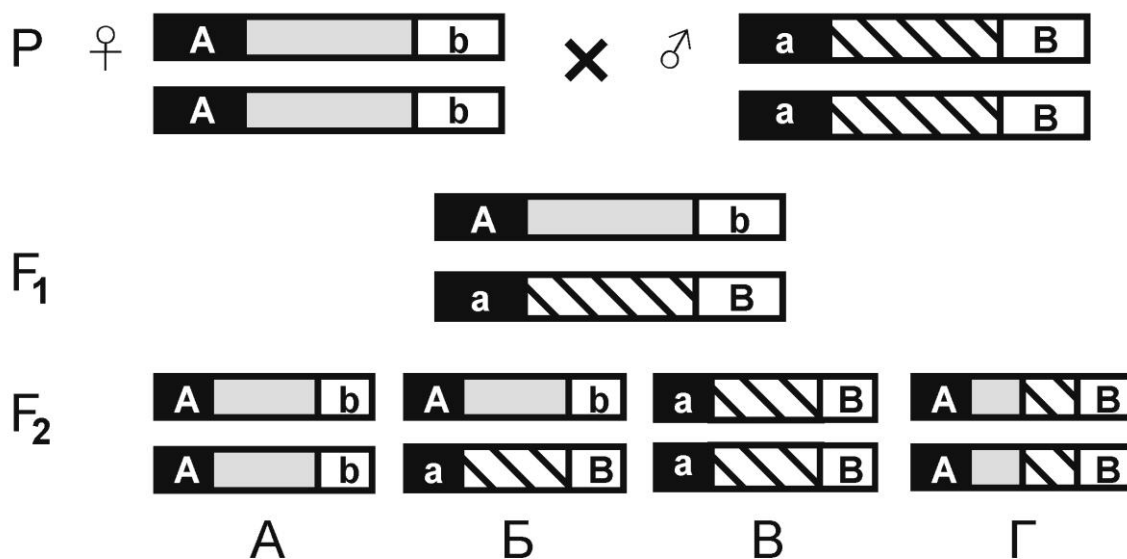


Рис. 2. Схема маркер-опосредованного отбора. Материнское растение несет ценный вариант локуса количественного признака (ЛКП, показан серым), который сцеплен с двумя маркерами (генотип по ним – AAbb). Отцовское растение является донором ценного качественного признака, но лишено необходимых аллелей ЛКП (локус выделен штриховкой); генотип по сцепленным маркерам aaBB. Можно оценить чистоту гибридов F₁, проведя генотипирование по одному из двух маркерных локусов и выбраковав гомозиготы. В расщепляющейся популяции F₂ необходимо отобрать для дальнейшей работы растения, унаследовавшие морфотип от отцовского растения и генотип по ЛКП – от материнского (А, генотип AAbb). Гетерозиготы (АаВb, В), гомозиготы по отцовским аллелям (ааВВ, В) и различные генотипы, возникшие вследствие кроссинговера внутри ЛКП (например, ААВВ, Г), могут быть выбракованы, не прибегая к анализу фенотипа по количественному признаку.

В современной генетике человека проблема моногенных и наследующихся по менделевским закономерностям патологий уже фактически закрыта. У подавляющего большинства таких заболеваний уже известна молекулярная основа, гены и мутации в них идентифицированы, разработаны простые тест-системы, определяющие генотип пациентов. Такая же простота и точность анализа – цель генетики растений, ориентированной именно на практические приложения.

К настоящему времени число идентифицированных на молекулярном уровне генов гороха неуклонно растет, этому способствует получение нуклеотидных последовательностей (секвенирование) полных геномов родственных бобовых – люцерны, лядвенца, нута, «голубинового гороха», арахиса. В ближайшее время будет завершён идуций полным ходом проект по секвенированию генома гороха, и селекция получит действенный инструмент для еще более эффективного применения на практике достижений факториальной гипотезы наследственности.

Заключение

Противостояние нарастающей нехватке продовольствия возможно лишь с усовершенствованием подходов к селекции. При современном уровне развития генетики, молекулярной биологии и биотехнологии селекция должна стать процессом с гарантированно положительным результатом, который зависит не от случайной возможности, интуиции селекционера или иных плохо формализуемых причин.

Представления о физиологических механизмах основных процессов растения, генетических факторах, регулирующих эти механизмы, характере взаимодействия между ними и внешней средой способны сделать селекцию еще более продуктивной. Современная биология располагает множеством инструментов для этого – от маркер-опосредованного отбора до трансгенеза. Основы для такого совершенствования были заложены 150 лет назад одновременно с рождением генетики – в виде факториальной концепции наследственности.

Автор благодарит А.С. Белякову за плодотворное обсуждение работы, а также замечания по тексту рукописи.

Литература

1. Галл Я.М. Владимир Ковалевский как переводчик и издатель труда Чарльза Дарвина «The variation of animals and plants under domestication» // Вестник ВОГиС. – 2007. – Т. 11. – С. 40-44.
2. Weeden N.F. Genetic changes accompanying the domestication of *Pisum sativum*: Is there a common genetic basis to the “domestication syndrome” for legumes? // Ann. Bot. – 2007. – V. 100. – P. 1017-1025.
3. Ellis T.H.N., Hofer J.M.I., Timmerman-Vaughan G.M., Coyne C.J., Hellens R.P. Mendel, 150 years on // Trends Plant Sci. – 2011. – V. 16. – P. 590-596.
4. Зеленов А.Н. Основные положения концепции ароморфозного направления в селекции гороха // Зернобобовые и крупяные культуры. – 2015. – №2. – С. 12-20.
5. Avercheva O.V., Sinjushin A.A., Zelenov A.N. A spontaneous mutation in a semi-leafless pea cultivar restores leaflet formation and improves photosynthetic function. – VI International Conference on Legumes Genetics and Genomics (Hyderabad, India, October 2-7, 2012). Program and abstract book. – P. 391.
6. Belyakova A.S., Sinjushin A.A. Gene *TENDRILLED ACACIA-A* affects leaf development in pea and may have practical contribution // Research in Plant Genetics (from Mendel’s Peas to Present). Abstracts for poster session (September 7-10, 2015, Brno, Czech Republic). – Brno: Masarykova univerzita, 2015. – P. 3.
7. Кривошеева И.А. Изучение роли гена *TENDRILLED ACACIA-A* в развитии листа у гороха посевного (*Pisum sativum* L.). Курсовая работа (рукопись). – М.: МГУ, 2014. – 28 с.
8. Зеленов А.Н., Наумкина Т.С., Щетинин В.Ю., Задорин А.М., Зеленов А.А. Достоинства и перспективы использования многократно непарноперистой формы гороха // Зернобобовые и крупяные культуры. – 2014. – №3. – С. 12-19.
9. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Под ред. Ю.П. Алтухова. – М.: Наука, 2004. – 619 с.
10. Сидорова К.К. Генетика мутантов гороха. – Новосибирск: Наука, 1981. – 168 с.
11. Синюшин А.А. Горох Грегора Менделя 150 лет спустя: судьба первых семерых // Потенциал. – 2015. – В печати.
12. Калегина А.В. Изучение последствий изоляции в сортопопуляциях гороха посевного (*Pisum sativum* L.) с использованием молекулярных маркеров. Курсовая работа (рукопись). – М.: МГУ, 2012. – 45 с.
13. Sinjushin A.A. Mutations of determinate growth and their application in legume breeding // Legume Perspectives. – 2015. – V. 6. – P. 14-15.
14. Dirlewanger E., Isaac P.G., Ranade S., Belajouza M., Cousin R., de Vienne D. Restriction fragment length polymorphism analysis of loci associated with disease resistance genes and developmental traits in *Pisum sativum* L. // Theor. Appl. Genet. – 1994. – V. 88. – P. 17-27.
15. Кондыков И.В., Зотиков В.И., Зеленов А.Н. Кондыкова Н.Н., Уваров В.Н. Биология и селекция детерминантных форм гороха. – Орел: Картуш, 2006. – 119 с.

PLANT BREEDING IN SCOPE OF THE FACTORIAL CONCEPT OF HEREDITY

A.A. Sinjushin

M.V. LOMONOSOV MOSCOW STATE UNIVERSITY

Abstract: *The main perspectives of progressive development of the factorial concept of heredity in breeding are briefly reviewed and illustrated with an experience of a garden pea. Possible consequences of usage of principles initially formulated for natural populations in pea breeding are analyzed. Role of marker-assisted selection in production of new cultivars is discussed.*

Keywords: garden pea, evolution, mutation, isolation, factorial concept of heredity.