

УДК 575.133

ХРОМОСОМНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ – НАПРАВЛЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ

© 2014 г. Л.А. Першина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: pershina@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 29 июня 2013 г. Принята к публикации 1 февраля 2014 г.

Биотехнология как наука о практическом применении знаний о биологических процессах и достижениях биологии находится в постоянном развитии. В историческом смысле биотехнология возникла тогда, когда дрожжи и бактерии впервые стали использовать для производства продуктов (хлебопечение, пивоварение, виноделие, производство лекарств и т. д.).

В современном понимании *биотехнология* – это совокупность технологий и методов, использующих живые организмы (или их части) и биологические процессы для производства или модификации различных продуктов, улучшения свойств экономически ценных видов растений и животных, а также микроорганизмов, способных оказывать определенное воздействие на окружающую среду.

Термин «биотехнология» введен в 1917 г. венгерским инженером Карлом Эреки для описания крупномасштабного получения свинины (конечный продукт) с использованием дешевой сахарной свеклы (сырье) в качестве корма для животных (биотрансформация). В более широком понимании этот термин стали использовать в 70-е годы XX столетия.

К отраслям народного хозяйства, потребности которых обеспечивает биотехнология, относятся: медицина, сельское, лесное, рыбное хозяйство, пищевая промышленность, производство химических веществ, материаловедение, экология, электронное машиностроение, энергетика и т. д. В качестве биологических систем в биотехнологии используют микро-

биологические системы, соматические клетки млекопитающих, культуры изолированных клеток, органы и ткани растений.

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

Можно выделить два основных блока направлений биотехнологии растений.

1. Технологии, основанные на использовании культур клеток, тканей и органов растений: микроклональное размножение и оздоровление коммерчески ценных растений; клеточная селекция и мутагенез; сохранение генофонда с помощью криоконсервации; получение биологически активных соединений; создание гомозиготных линий на основе: а) индуцированного андрогенеза в культуре пыльников и изолированных микроспор; б) эмбриокультуры в результате селективной элиминации хромосом у одного из родительских видов при отдаленных скрещиваниях.

2. Технологии, связанные с генетическими манипуляциями (при необходимости и с использованием культур органов, тканей и клеток растений). К таким технологиям относятся генетическая инженерия, клеточная инженерия, хромосомная инженерия.

В задачу *генетической инженерии* входит получение клеток и генотипов с новыми свойствами растений за счет введения в геном клеток растений-реципиентов отдельных генов в составе рекомбинантных ДНК. Начало развития этого направления связано с выполнением

первых работ по созданию рекомбинантной ДНК в 1972 г.

Клеточная инженерия (соматическая гибридизация, парасексуальная гибридизация) направлена на конструирование клеток и генотипов растений нового типа на основе: а) слияния протопластов (клеток, лишенных клеточных стенок); б) введения в протопласты различных клеточных органелл (ядер, митохондрий, хлоропластов). Слияние протопластов обеспечивает не только гибридизацию ядерных геномов, но и объединение субклеточных структур (хлоропластов, митохондрий и др.) от разных родительских генотипов, что приводит к образованию соматических гибридов. Первый соматический гибрид в результате слияния протопластов разных видов табака *Nicotiana glauca* ($2n = 24$) + *N. langsdorfii* ($2n = 18$) был получен в 1972 г., а первый межродовой соматический гибрид (картофель + томат) в 1978 г. Перенос изолированных ядер петунии в протопласты табака осуществили в 1973 г.

Хромосомная инженерия описывает технологии, ориентированные на манипулирование с хромосомами, включая создание искусственных хромосом (мини-хромосом) растений и млекопитающих, с целью изменения наследования генетических признаков. Понятие «хромосомная инженерия» было введено американским исследователем Эрнестом Сирсом в 1972 г. на основании обобщения результатов его работ, выполненных в 1956 г. по индуцированному переносу сегмента хромосомы *Aegilops umbellulata* в геном мягкой пшеницы. Первая искусственная мини-хромосома кукурузы была синтезирована из отдельных «блоков» – центромеры, теломеры и инициаторов репликации в 2006 г. российским исследователем Е. Ананьевым с соавторами, работавшими в тот период в биотехнологической фирме «Пионер» (США).

ПОНЯТИЯ И ЗАДАЧИ ХРОМОСОМНОЙ ИНЖЕНЕРИИ РАСТЕНИЙ

В широком понимании *хромосомная инженерия* – это манипулирование с помощью различных методов с целыми наборами хромосом, индивидуальными хромосомами или сегментами хромосом с целью выполнения

научных исследований или улучшения признаков культурных растений. Из этого определения следует, что задачи хромосомной инженерии включают:

1. Кратное увеличение и уменьшение исходного набора хромосом, что соответствует получению полиплоидов и гаплоидов.

2. Изменение числа хромосом в сторону их уменьшения или увеличения (получение анеуплоидов).

3. Межсортовое и чужеродное замещение индивидуальных хромосом у культурных растений.

4. Встраивание сегментов чужеродных хромосом в хромосомы культурных видов растений и манипулирование этими сегментами.

Согласно работам Э. Сирса, понятие *хромосомная инженерия* представляется более специализированным. Это технологии, оптимизирующие а) направленный перенос чужеродных хромосом и б) индуцированный перенос сегментов хромосом в геном культурных растений от других видов с целью улучшения признаков культурных растений.

Необходимость проведения таких работ связана с тем, что в процессе длительной селекции, ориентированной на высокую продуктивность и качество, произошло сильное, по сравнению с дикорастущими сородичами, обеднение генофонда культурных растений по генам, контролирующим признаки устойчивости к биотическим (вредителям и возбудителям болезней) и разным абиотическим факторам. Например, сорта мягкой пшеницы, в том числе возделываемые в разных регионах, стали однотипными по основным генам, ответственным за устойчивость к грибным патогенам. Развитие вирулентных патотипов грибов приводит к быстрому их распространению и масштабному поражению сортов. Кроме того, изменения климата, воздействие техногенных и антропогенных факторов приводят к изменениям условий выращивания культур, что требует создания сортов, устойчивых ко многим абиотическим стрессам, в том числе к засухе, затоплению, высоким и низким температурам, засолению и т. п.

Реализация задач по хромосомной инженерии основывается на знаниях: 1) генетических особенностей культурных растений; 2) ме-

ханизмов несовместимости при отдаленной гибридизации и методах их преодоления; 3) механизмов интрогрессивной гибридизации; 4) генетического резерва видов растений, используемых в качестве источников новых генов для культурных растений; 5) методов и механизмов индуцированного переноса сегментов хромосом; 6) цитологических, молекулярно-цитологических и молекулярно-генетических методов выявления чужеродного генетического материала (в виде отдельных хромосом, их сегментов или отдельных генов), интрогрессивного (перенесенного и встроенного) в геном культурных растений.

ИНТРОГРЕССИВНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ КАК ОСНОВА ХРОМОСОМНОЙ ИНЖЕНЕРИИ РАСТЕНИЙ

В природных условиях между видами растений, у которых неполно проявляется изоляционный барьер, происходит перенос генов. Это способствует как образованию гомоплоидных видов (т. е. видов с числом хромосом, характерным для обоих родительских видов), так и поддержанию генетического разнообразия природных популяций. Механизмом такого переноса генов служит интрогрессивная гибридизация.

Интрогрессивная гибридизация – это процесс переноса генов между видами в результате межвидовой гибридизации и последующих возвратных (насыщающих) скрещиваний гибридов с одним из родительских видов (беккроссирование).

Среди потомков гибридов после беккроссирования могут образовываться новые формы растений с восстановленной фертильностью, несущие в ядерном геноме генетический материал другого вида. В результате этого процесса у образовавшихся интрогрессивных форм *не происходит изменения таксономической принадлежности*.

Экспериментальные принципы интрогрессивной гибридизации лежат в основе методов хромосомной инженерии растений и широко используются для увеличения генетического разнообразия культурных растений. Установлено, что при скрещивании полиплоидных видов

с диплоидными происходит однонаправленный перенос генов от диплоидных видов к полиплоидным. Это связано с тем, что геномы диплоидных видов более чувствительны к структурным изменениям, чем геномы полиплоидных видов. Для геномов растений, которые произошли в результате давних событий отдаленной гибридизации и последующей полиплоидизации, характерна «буферность», т. е. способность противостоять определенным его изменениям. Среди культурных видов растений аллотетраплоиды – твердая пшеница *Triticum durum* ($2n = 4x = 28$; *BBAА*), хлопчатник обыкновенный *Gossypium hirsutum* ($2n = 4x = 56$; *AADD*); аллогексаплоиды – мягкая пшеница *Triticum aestivum* ($2n = 6x = 42$; *BBAADD*), овес посевной *Avena sativa* ($2n = 6x = 42$; *AACCDD*) (обозначение одинаковыми буквами *A* и *D* субгеномов у видов разных родов не указывает на их общее происхождение).

В отличие от растений диплоидных видов у аллополиплоидов при определенных изменениях структуры генома могут сохраняться жизнеспособность и фертильность растений. Это дает возможность создавать и поддерживать моносомные линии. (*Моносомия* – отсутствие одной хромосомы из определенной пары хромосом).

В некоторых случаях возможно сохранение частичной фертильности у аллополиплоидов с отсутствием пары гомологичных хромосом. (Отсутствие одной пары хромосом – *нуллисомия*). Например, у мягкой пшеницы *T. aestivum* ($2n = 42$) моносомики имеют число хромосом $2n = 41$, а нуллисомики – $2n = 40$.

Кроме того, отдельные пары хромосом у аллополиплоидов могут замещаться на гомеологичные хромосомы дикорастущих или культурных сородичей. В случае если отсутствие собственных хромосом компенсируется замещением на чужеродные хромосомы, растения жизнеспособны и фертильны. Такие растения благодаря функционированию генов, локализованных на чужеродных хромосомах, приобретают новые признаки. Компенсационная способность хромосом проявляется в случаях, когда гомеологичные хромосомы разных видов не подверглись сильно выраженным структурным изменениям в процессе эволюции при расхождении от общего предка.

ЗНАЧЕНИЕ АНЕУПОЛОИДОВ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ И НАПРАВЛЕННОГО ПОЛУЧЕНИЯ ЗАМЕЩЕННЫХ ЛИНИЙ

Способность аллополиплоидов сохранять жизнеспособность в моносомном состоянии была использована Э. Сирсом для создания серий моносомных линий у сорта гексаплоидной пшеницы Чайниз Спринг. Эти линии затем использовались для получения моносомных линий других сортов пшеницы. Поскольку у аллополиплоидов общепринятый генетический анализ затруднен и не позволяет установить группы сцепления, для этих целей были использованы серии моносомных линий. Их изучение позволило генетически идентифицировать все хромосомы, установить гомеологические группы и отнести каждую хромосому к определенному геному. Была проведена оценка вклада каждой из хромосом в наследование различных признаков; на хромосомах локализованы гены, ответственные за проявление определенных признаков; произведено картирование генов по группам сцепления. Таким образом, хромосомный набор мягкой пшеницы был разбит на 7 гомеологических групп, по 3 пары хромосом в каждой группе, в зависимости от их принадлежности к субгеномам А, В и D.

Э. Сирс не акцентировал внимание на работах по созданию моносомных линий в рамках задач по хромосомной инженерии. Однако им вслед за другими исследователями были рассмотрены схемы по *направленному переносу чужеродных хромосом* с использованием моносомных линий и пшенично-чужеродных дополненных линий пшеницы (рис. 1).

С этой целью в скрещивание в качестве материнского генотипа включается моносомная линия, у которой отсутствует хромосома, гомеологичная чужеродной хромосоме, входящей в состав дополненной линии. Цель такого скрещивания — получить линии с дисомным чужеродным замещением.

Пшенично-чужеродные дополненные линии могут быть получены по следующей схеме (рис. 2).

Пшенично-чужеродные дополненные линии, в отличие от чужеродно замещенных линий, цитологиче-

ски нестабильны. Для поддержания чужеродно-дополненных линий необходим постоянный цитологический контроль.

Методом направленного переноса чужеродных хромосом или хромосом от других сортов пшеницы пользуются при наличии моносомных линий. Моносомные линии мягкой пшеницы созданы на основе более 40 сортов мягкой и твердой пшениц в Европе и около 10 сортов в Китае.

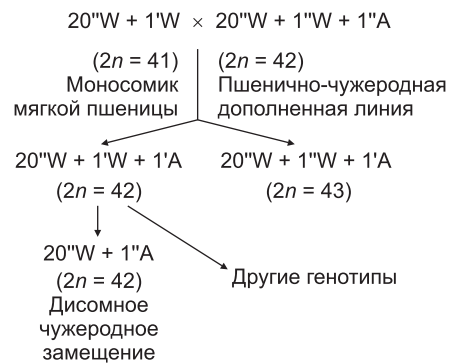


Рис. 1. Схема получения чужеродно-замещенной линии мягкой пшеницы в результате гибридизации моносомника мягкой пшеницы с пшенично-чужеродной дополненной линией.

20''W – 20 бивалентов пшеницы, 1''W – унивалент первой хромосомы пшеницы, 1''W – бивалент первой хромосомы пшеницы, 1''A – бивалент первой чужеродной хромосомы, 1''A – унивалент первой чужеродной хромосомы (Sears, 1981. P. 75–89).

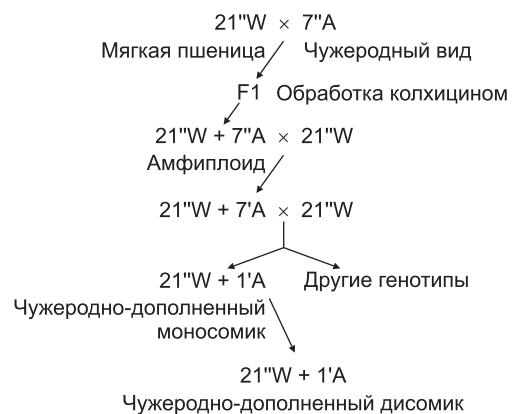


Рис. 2. Схема получения чужеродно-дополненной линии мягкой пшеницы в результате гибридизации мягкой пшеницы с 14-хромосомным (7''A) чужеродным видом.

В качестве чужеродного вида 7''A может использоваться рожь посевная *Secale cereale* (2n = 14). Могут использоваться для скрещивания с пшеницей 28-хромосомные чужеродные виды (14''A) (Sears, 1981. P. 75–89).

ГЕНОФОНДЫ СОРОДИЧЕЙ ПШЕНИЦЫ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НОВЫХ ФОРМ ПШЕНИЦЫ

При вовлечении в отдаленные скрещивания видов растений необходимо учитывать: 1) степень филогенетического родства между видами; 2) данные об особенностях проявления признаков у этих видов.

В лабораторных условиях собранные из природных популяций образцы изучают на проявление признаков, которые желателно передать культурным растениям, с тем чтобы улучшить их адаптивные и агрономические свойства.

Сородичи мягкой (гексаплоидной) пшеницы *T. aestivum* L. ($2n = 6x = 42$, BBAADD) на основе их таксономической принадлежности и геномной конституции классифицированы по трем группам геновых пулов (генофондов): первичный, вторичный и третичный. В эти группы виды распределены в зависимости от степени близости их геномов по отношению к геному мягкой пшеницы.

Первичный генофонд составляют виды пшеницы, геномы которых имеют общее происхождение с геномами мягкой пшеницы. Тетраплоидные виды: твердая пшеница *T. durum* ($2n = 4x = 28$, BBAA) и *T. turgidum* ($2n = 4x = 28$, BBAA), а также диплоидные виды: доноры *A* генома – *T. monococcum* (включая var. *urartu* и var. *boeoticum*) и *D* генома – *Aegilops squarrosa* (синоним *T. tauschii*). Мягкая пшеница и представители первичного генофонда хорошо скрещиваются между собой. В результате конъюгации между гомологичными хромосомами мягкой пшеницы и этих видов происходит рекомбинация, что обуславливает перенос чужеродных генов в геном мягкой пшеницы. Последующий отбор 42-хромосомных растений на фоне стрессовых факторов дает возможность выделять нужные генотипы.

Благодаря использованию первичного генофонда в геном мягкой пшеницы было перенесено значительное число генов, контролирующих устойчивость растений к стрессовым факторам и проявление хозяйственно ценных признаков. Например, от *T. tauschii* в мягкую пшеницу интрогрессировано около 10 генов, определяющих устойчивость к бурой ржавчине, а также

ряд генов, ответственных за устойчивость к стеблевой ржавчине, желтой ржавчине, мучнистой росе, септориозу. Австралийскими исследователями выделены образцы *T. monococcum* с высокой устойчивостью к засолению. Этот признак уже передан твердой пшенице.

Во *вторичный генофонд* входят близкие мягкой пшенице полиплоидные виды родов *Triticum* и *Aegilops*, у которых имеется один общий с мягкой пшеницей геном или геном, близкий по происхождению геному пшеницы. Например, *A*¹ геном *T. timopheevii* ($2n = 28$, *A*¹*A*¹*GG*), близкий по происхождению геному *A* пшеницы. *T. timopheevii* является источником многих генов, контролирующих устойчивость к грибным патогенам. К настоящему времени от *T. timopheevii* в геном мягкой пшеницы интрогрессированы гены, определяющие устойчивость к мучнистой росе, бурой и стеблевой ржавчине. Кроме того, во вторичный генофонд включены тритикале – *Triticale* ($2n = 56$, *AABBDDRR* и $2n = 42$, *AABBRR*), имеющие общие с мягкой пшеницей геномы.

Третичный генофонд представлен видами, филогенетически более далекими от мягкой пшеницы. Это роды трибы Triticeae: рожь – *Secale* L., ячмень – *Hordeum* L., пырей – *Elytrigia* Desv. (= *Agropyron* Gaertn.; = *Thinopyrum*) и др. Гибридизация мягкой пшеницы с представителями этого генофонда в той или иной степени затруднена из-за действия механизмов несовместимости, что может требовать необходимости применения методов их преодоления. Прогамная несовместимость, проявляющаяся в период прорастания пыльцевых трубок после опыления, может быть преодолена обработкой цветков до или после опыления растворами фитогормонов. Эмбриональная несовместимость, обусловленная ранней гибелью гибридных зародышей, преодолевается их культивированием на искусственных питательных средах.

Конъюгация между хромосомами мягкой пшеницы и хромосомами видов, входящих в третичный генофонд, не происходит. Однако могут происходить замещения между гомологичными хромосомами пшеницы и хромосомами этих видов или образовываться пшенично-чужеродные транслокации (образование одной хромосомы из плеч гомологичных хромосом разных видов). На рис. 3 представлена схема

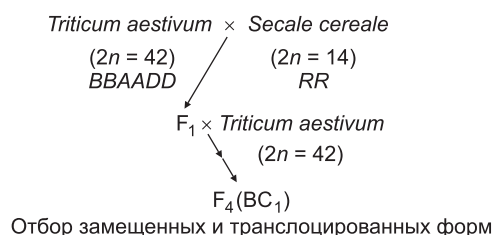


Рис. 3. Схема создания пшенично-ржаных замещенных и транслоцированных гексаплоидных форм с использованием для идентификации хромосом метода дифференциальной окраски (Щапова, Кравцова, 1990).

создания пшенично-ржаных замещенных и пшенично-ржаных транслоцированных форм.

Для того чтобы выделить пшенично-ржаные замещенные и транслоцированные формы, необходимо провести изучение потомков гибридов $F_4(BC_1)$ с помощью метода дифференциального окрашивания для идентификации индивидуальных пар хромосом ржи, заместивших определенные пары хромосом пшеницы, или плеч хромосом ржи, входящих в состав транслокаций. Транслоцированные хромосомы образуются у самоопыленных потомков генотипов, у которых в моносомном состоянии находятся одна хромосома пшеницы и одна хромосома ржи. В мейозе эти хромосомы будут представлены в виде унивалентов. При расхождении хромосом от экватора к полюсам у этих хромосом происходят разрывы по центромере, что приводит к образованию отдельных плеч хромосом. Соединение по центромере отдельных плеч хромосом пшеницы и ржи приводит к образованию транслоцированных хромосом.

В настоящее время известно около 650 сортов мягкой пшеницы, возделываемых в разных регионах мира, которые несут пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL, и около 20 сортов с пшенично-ржаным замещением 1R(1B). Исходные транслоцированные и замещенные линии были выделены среди беккроссных потомков пшенично-ржаных гибридов или среди потомков гибридов пшеницы с тритикале еще в 30-е годы прошлого столетия. Затем эти линии были вовлечены в скрещивания для получения новых сортов.

Столь широкое распространение сортов с транслокацией 1RS.1BL обусловлено тем, что

на коротком плече хромосомы ржи 1RS локализован комплекс генов, ответственных за устойчивость к грибным патогенам: бурой (листовой) ржавчине (*Lr26*), стеблевой ржавчине (*Sr31*), желтой ржавчине (*Yr9*) и мучнистой росе (*Pm8*). Однако в 1999 г. в Африке появилась агрессивная раса стеблевой ржавчины, названная Ug99 (Уганда 99), которая представляет в настоящее время потенциальную угрозу посевам пшеницы далеко за пределами этого континента. Появление этой расы связано с выращиванием на больших площадях сортов мягкой пшеницы – носителей гена *Sr31*, ранее эффективно контролировавшего устойчивость растений пшеницы к патогенам стеблевой ржавчины. К настоящему времени в результате гибридизации мягкой пшеницы с *T. timopheevii*, *Aegilops speltoides* и разными видами пырея получены замещенные и транслоцированные формы пшеницы с генами, контролирующими устойчивость к расе стеблевой ржавчины Ug99.

СИНТЕТИЧЕСКИЕ АМФИПЛОИДЫ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ПЕРЕДАЧИ ЧУЖЕРОДНОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА В ГЕНОМ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

С началом применения колхицина как индуктора удвоения числа хромосом на основе гибридов пшеницы с другими видами получено большое число аллополиплоидов (амфиплоидов). В качестве новых зерновых культур используют тритикале и тритордеум. Гексаплоидные ($2n = 42$) и октоплоидные ($2n = 56$) тритикале получены в результате удвоения числа хромосом пшенично-ржаных гибридов *T. durum* (*T. turgidum*) ($2n = 28$) \times *S. cereale* ($2n = 14$) и *T. aestivum* ($2n = 42$) \times *S. cereale* ($2n = 14$).

Исходными гибридами для получения гексаплоидных форм тритордеум послужили ячменно-пшеничные гибриды *Hordeum chilense* ($2n = 14$) \times *T. turgidum* ($2n = 28$), а для октоплоидных форм – ячменно-пшеничные гибриды *H. chilense* ($2n = 14$) \times *T. aestivum* ($2n = 42$) (*Hordeum chilense* – дикорастущий вид ячменя). Тритикале и тритордеум включают в скрещивания с мягкой пшеницей для получения дополненных, замещенных и транслоцированных линий мягкой пшеницы.

Кроме того, получено большое разнообразие синтетических гексаплоидов, которые используют в качестве «мостов» для передачи чужеродного генетического материала в геном мягкой пшеницы. Для получения синтетических гексаплоидов скрещивают диплоидных дикорастущих сородичей мягкой пшеницы с тетраплоидными видами пшеницы и удваивают число хромосом у полученных гибридов. Гибридизация между синтетическими гексаплоидами и мягкой (гексаплоидной) пшеницей из-за равного числа хромосом осуществляется легче, чем скрещивание мягкой пшеницы с диплоидными и тетраплоидными дикорастущими видами. Такими «мостами» для передачи генетического материала от *Ae. tauschii* служат синтетические гексаплоиды *T. durum* × *Ae. tauschii*, а от *T. timopheevii* – синтетические гексаплоиды *T. durum* × *T. timopheevii*.

В качестве примера практического использования синтетического гексаплоида можно привести создание иммунных линий сорта мягкой пшеницы Саратовская 29. Этот сорт пшеницы был создан в результате ступенчатой гибридизации и многократных отборов на адаптивные и хозяйственно ценные признаки при участии сорта твердой пшеницы Белотурка и сортов мягкой пшеницы Полтавка и Русак. Сорт Саратовская 29 был районирован в 1967 г., длительное время возделывался в разных регионах СССР и использовался при создании многих сортов мягкой пшеницы отечественной селекции. Сорт Саратовская 29 сочетает среднеспелость, засухоустойчивость, устойчивость к осыпанию и поражению пыльной головней, высокое качество зерна и высокие хлебопекарные качества муки. Однако сорт Саратовская 29 универсально чувствителен к бурой ржавчине и поражается стеблевой ржавчиной.

Ольгой Ивановной Майстренко в Институте цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск) была поставлена задача – передать сорту Саратовская 29 признаки устойчивости к грибным патогенам от синтетического гексаплоида *Triticum timopheevii* Zhuk. ($2n = 28$) × *Aegilops tauschii* Coss. ($2n = 14$), полученного в Болгарии. Были выполнены скрещивания между сортом Саратовская 29 и этим синтетическим гексаплоидом, а полученные гибриды F_1 включены в серию возвратных скрещиваний с сортом Сара-

товская 29. На основе цитологически стабильных 42-хромосомных растений беккроссных потомков BC_6 – BC_9 поколений, устойчивых к грибным патогенам, были созданы иммунные линии сорта Саратовская 29. Эти линии несут генетический материал и от *T. timopheevii*, и от *Ae. tauschii* и передают комплексную устойчивость к грибным патогенам при скрещивании с другими сортами мягкой пшеницы. В результате скрещивания яровой мягкой пшеницы сорта Ранг (Швеция) с одной из иммунных линий создан сорт яровой мягкой пшеницы Памяти Майстренко. Этот сорт характеризуют комплексная устойчивость к грибным патогенам, высокое качество зерна (за счет высокого содержания белка и сухой клейковины) и высокие хлебопекарные качества муки.

В результате манипулирования с целыми наборами хромосом в Краснодарском НИИ сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко создана серия уникальных геномно-замещенных форм. У этих форм один из субгеномов (геном *D*) мягкой пшеницы замещен на геномы следующих сородичей пшеницы: *Aegilops speltoides* (SS), *Ae. umbellulata* (UU), *Ae. sharonensis* ($S^{sh}S^{sh}$), *Ae. uniaristata* (NN) и др. Кроме того, была получена геномно-добавленная форма, названная *T. miguschovae*, у которой геном *D* *T. tauschii* был добавлен к геномам *AG Triticum militinae*. Ценность этих форм заключается также и в том, что они служат как для сохранения, так и для использования генофонда диких сородичей в селекции пшеницы. К 2012 г. с их использованием было создано 5 сортов мягкой пшеницы.

ИНДУЦИРОВАННЫЙ ПЕРЕНОС СЕГМЕНТОВ ЧУЖЕРОДНЫХ ХРОМОСОМ В ГЕНОМ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ

Среди большого разнообразия создаваемых интрогрессивных форм лишь ограниченное их число пригодно для практического использования в селекционном процессе. Одним из факторов, ограничивающих практическую ценность интрогрессивных форм, является избыточность чужеродного генетического материала. В этом случае могут переноситься не только гены, влияние которых приводит к улучшению признаков культурных растений, но и гены, оказывающие

негативное действие, например, на урожайность или качество продукции. Это определяет необходимость интрогрессии небольших сегментов хромосом, несущих только те гены, которые представляют непосредственный интерес. С этой целью Э. Сирс предложил методы индуцированного переноса сегментов чужеродных хромосом в геном мягкой пшеницы: 1) с помощью ионизирующего облучения, вызывающего разрывы хромосом у растений гибридного происхождения; 2) в результате подавления действия гена *Ph*, контролирующего конъюгацию строго гомологичных хромосом у пшеницы и ее гибридов. Кроме того, образование транслокаций между чужеродными хромосомами индуцируется в условиях культивирования *in vitro*. Так, в работах венгерских исследователей, работающих под руководством Марты Мольнар-Ланг, в результате культивирования молодых соцветий беккроссных потомков пшенично-ячменных гибридов *T. aestivum* × *H. vulgare* было получено разнообразие регенерантов, имеющих пшенично-ячменные транслокации (Molnar-Lang *et al.*, 2005).

Пример использования ионизирующего облучения для индуцированного переноса сегментов хромосом. Работа Э. Сирса, выполненная в 1956 г., посвящена интрогрессии в геном мягкой пшеницы сорта Чайниз Спринг сегмента хромосомы 6U *Aegilops umbellulata* ($2n = 14$). Первоначально в результате скрещивания Чайниз Спринг с *Ae. umbellulata* была получена моносомно дополненная пшенично-эгилопсная линия (к 42 хромосомам мягкой пшеницы была дополнена одна хромосома 6U *Ae. umbellulata*). Эта линия перед мейозом была подвергнута воздействию X-лучей, в результате чего произошли разрывы хромосом пшеницы и хромосомы 6U *Ae. umbellulata*. Пыльцой от облученной линии были опылены растения пшеницы сорта Чайниз Спринг. Среди потомков гибридов была выделена линия, названная Transfer, с пшенично-эгилопсной транслокацией: утраченный сегмент хромосомы 6B пшеницы был замещен на гомеологичный сегмент хромосомы 6U эгилопса. На этом сегменте хромосомы был выявлен ген (обозначенный *Lr9*), контролирующий устойчивость к бурой ржавчине. Линия Transfer была использована в скрещиваниях с сортами пшеницы для передачи новым сортам признаков

устойчивости к этому патогену. Эффективность гена *Lr9* у сортов пшеницы, созданных в США, была утрачена к 1971 г. В Западной Сибири сорта – носители гена *Lr9* – возделываются с 1996 г., но в ряде регионов в последнее время отмечены поражения некоторых из этих сортов патогенами бурой ржавчины.

Индукция конъюгации между гомеологичными хромосомами пшеницы и ее сородичей. У аллополиплоидов спаривание и конъюгация хромосом в мейозе происходят только между гомологичными хромосомами. Такое «диплоподобное» поведение хромосом у мягкой пшеницы контролируется геном *Ph*, локализованным на хромосоме 5B. У гибридов F_1 все хромосомы каждого из родителей представлены в единственном числе. При функционировании гена *Ph* хромосомы в мейозе отдаленных гибридов пшеницы образуют униваленты, так как спаривания между хромосомами не происходит. Если же функционирование гена *Ph* подавлено за счет мутации, наблюдается спаривание между гомеологичными хромосомами пшеницы и другого вида. Это приводит к переносу гомеологичных сегментов чужеродных хромосом в геном мягкой пшеницы.

Использование мутантных линий по гену *Ph* в скрещиваниях с отдаленными гибридами пшеницы или линиями пшеницы, несущими отдельные чужеродные хромосомы или их плечи, позволяет «укорачивать» чужеродные хромосомы, интрогрессированные в геном пшеницы. В результате отбора по целевым признакам и идентификации чужеродного генетического материала или отдельных генов с помощью методов хромосомного и молекулярного анализа производится отбор нужных генотипов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биотехнологический аспект хромосомной инженерии, используемой для увеличения генетического разнообразия культурных растений, направлен на оптимизацию переноса чужеродного генетического материала в геном культурных растений на основе интрогрессивной гибридизации. В перспективе в качестве векторов для переноса в клетки растений отдельных генов и их комплексов рассматриваются искусственные хромосомы (мини-хромосомы).

Работа выполнена в рамках бюджетного проекта VI.53.1.3 при финансовой поддержке РФФИ (проект 14-04-00674_а) и Интеграционного проекта СО РАН совместно с СО Россельхозакадемии (№ 61).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Клеточная инженерия растений. Киев: Наук. думка, 1984. 160 с.
- Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 2002. 589 с.
- Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян О.Р. и др. Синтетические формы как основа для сохранения и использования генофонда диких сородичей мягкой пшеницы // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2012. Т. 16. № 1. С. 44–51.
- Картель Н.А., Макеева Е.Н., Мезенко А.М. Генетика. Энциклопедический словарь. Минск: «Тэхналогія», 1999. 446 с.
- Лайкова Л.И., Белан И.А., Бадаева Е.Д. и др. Создание и изучение сорта яровой мягкой пшеницы Памяти Майстренко с интрогрессией генетического материала от синтетического гексаплоида *Triticum timopheevii* Zhuk. × *Aegilops tauschii* Coss. // Генетика. 2013. Т. 49. № 1. С. 103–112.
- Першина Л.А. Основные методы культивирования *in vitro* в биотехнологии: Уч. пособие. Новосибирск: НГУ, 2005. 142 с.
- Щапова А.И., Кравцова Л.А. Цитогенетика пшенично-ржаных гибридов. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1990. С. 219.
- Ananiev E.V., Wu C., Chamberlin M.A. *et al.* Artificial chromosome formation in maize (*Zea mays* L.) // Chromosoma. 2009. V. 118. No. 2. P. 157–177.
- Molnar-Lang M., Novotny C., Linc G., Nagy E.D. Changes in the meiotic pairing behavior of a winter wheat-winter barley hybrid maintained for a long term in tissue culture, and tracing the barley chromatin in the progeny using GISH and SSR markers // Plant Breeding. 2005. V. 124. P. 247–252.
- Nagy E.D., Molnar-Lang M., Linc G., Lang L. Identification of wheat-barley translocations by sequential GISH and two-color FISH in combination with the use of genetically mapped barley SSR markers // Genome. 2002. V. 45. P. 1238–1247.
- Qi L., Friebe B., Zhang P., Gill B. Homoeologous recombination, chromosome engineering and crop improvement // Chromosome Res. 2007. V. 15. P. 3–19.
- Sears E.R. The transfer of leaf rust resistance from *Aegilops umbellulata* to wheat // Brookhaven Symp. Biol. 1956. V. 9. P. 1–22.
- Sears E.R. Chromosome engineering in wheat // Fourth Stadler Symposia / Ed. G. Redei. Univ. of Missouri, Columbia, 1972. P. 23–38.
- Sears E.R. Transfer of alien genetic material to wheat // Wheat Science – Today and Tomorrow / Eds L.T. Ewans, W.J. Peacock. Cambridge Univ. Press, 1981. P. 75–89.
- Schlegel R.H.J. Dictionary of Plant Breeding. Second Ed. London; N.Y.: CRC Press, Tatlor and Fracis Group. Boca Raton, 2010. P. 82.
- Shlegel R.H.J. Current list of wheats with rye and alien introgression. 2013. V05-08, 1-14. <http://www.desicca.de/Wheat-rye-introgression>.