

ПРОБЛЕМЫ ГЕНЕТИКИ РАСТЕНИЙ

В.К. Шумный

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

e-mail: shumny@bionet.nsc.ru

Наиболее впечатляющим и видимым в практической жизни человека объектом генетического преобразования и селекционного улучшения является растение как основа самовоспроизводящегося продовольственного потенциала.

Основными факторами мощнейшей генетической модификации генома растений в течение последних 10–12 тысяч лет поэтапно были и есть:

- 1) популяционное генетическое разнообразие;
- 2) индуцированное экспериментальным путем генетическое разнообразие (мутация, полиплоидия, гибридизация, в том числе отдаленная);
- 3) развитие генетики признаков и целенаправленное их улучшение;
- 4) развитие генно-инженерных и клеточных технологий для внесения в геном растений новых генов, а тем самым и формирование новых признаков.

Успех современного этапа генетико-селекционного улучшения растений и модификации их геномов зависит от эффективного и в меру необходимого знания и использования всех перечисленных факторов, особенно генетики признаков и сложных функциональных систем.

Именно эту идеологию я и заложил в основу своей научной биографии. Но, естественно, все зависит от школы, где начинаешь свою работу, и первого Учителя. Мне повезло. Первым моим учителем, вышедшим из вавилонской школы, прошедшим аспирантуру у Н.И. Вавилова, был Юрий Петрович Мирюта, человек сложный, одаренный и неординарный. Главным его научным кредо было – подвергать сомнениям установившиеся в науке догмы и оригинальными находками существенно их модифицировать; поменьше забивать себе голову чтением малополезных работ и побольше думать, для чего достаточно детального знания основных законов и тенденций в генетике.

Первым научным заданием в 1958 г. для меня было: получить у кукурузы на гибридном материале тетраплоидные формы и на них проверить схему закрепления гетерозиса, предложенную Ю.П. Мирютой и позднее получившую название "эффект Мирюты".

В основу этой схемы заложена идея предпочтительной–избирательной конъюгации сестринских хромосом после их удвоения у исходных диплоидных гибридов (рис. 1).

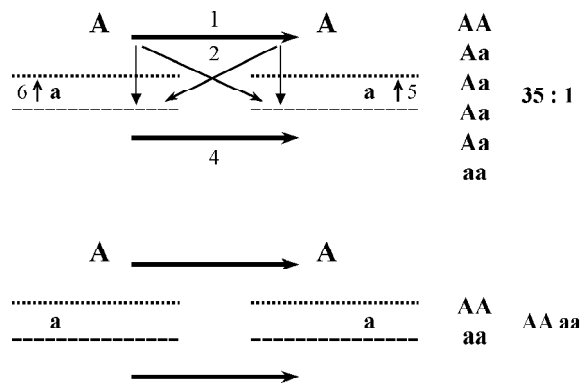


Рис. 1. «Эффект Мирюты».

Нами были получены тетраплоидные формы кукурузы на гибридном материале от скрещивания зубовидных, кремнистых форм с рисовыми формами зерна, т.е. наиболее дивергировавших внутри вида по форме и консистенции зерна.

В результате этого цикла работ были получены тетраплоидные формы простых гибридов кукурузы, выделены нерасщепляющиеся формы с соотношением бивалентов-тетравалентов при конъюгации хромом порядка 8 : 6 и сохранением гетерозиса по высоте растений и зеленой массе в ряду поколений (до 4–5). Однако мы не смогли полностью восстановить семенную фертильность, что и стало существенным ограничением этой модели закрепления гетерозиса. Поэтому с учетом дан-

ных по предыдущей модели по инициативе Д.К. Беляева мы развернули работы по моногибридному гетерозису, которые начались с обзорной статьи Д.К. Беляева, В.И. Евсикова и В.К. Шумного в журнале "Генетика". К этому времени было накоплено много фактов о благоприятном действии отдельных генов в гетерозиготном состоянии. Мы проанализировали порядка 100 работ. Стало ясно, что моногенный, или более точно, моногибридный гетерозис является своеобразным маркером сложного взаимодействия генов, определяющего комбинационную способность или связанного с ней и в конечном итоге приводящего к гетерозисному эффекту.

Уже было ясно, что источников в селекции на высокую комбинационную способность не так много. И если моногибридный гетерозис является действительно маркером на комбинационную способность в гетерозиготном состоянии, то его наличие заслуживает самого пристального внимания исследователей. Мы подобрали довольно обширные коллекции мутаций у гороха, кукурузы, ячменя, томатов и провели большой цикл исследований по анализу многих параметров у исходных и полученных из них мутантных линий и гетерозигот по мутантному гену.

Было показано, что действительно по отдельным генам (а мы проверили порядка 300 комбинаций) наблюдается устойчивое и существенное преимущество гетерозигот перед гомозиготами, и что механизм или гипотеза сверхдоминирования имеет существенное значение в формировании эффекта гетерозиса. Но вот по каким генам гетерозиготность обеспечивает гетерозис, остается неясным и по настоящее время, хотя сегодня возможности выяснить это значительно расширены в связи с развитием такого направления, как геномика.

В процессе этой работы нами совместно с моим дипломником и аспирантом Б.И. Токаревым была получена у ячменя мутация по активности фермента нитратредуктазы, важного звена в восстановлении растениями нитритов в аммонийную форму. Эта мутация у ячменя с блоком нитратредуктазной активности стала важным звеном в изучении механизмов азотного метаболизма растений и была широко использована отечественными и зару-

бежными исследователями. В такой же мере были использованы и модели моногибридного гетерозиса для изучения механизмов сверхдоминирования в ряде лабораторий института.

Эти два цикла работ были опубликованы в 76 статьях, из них 19 в журнале "Генетика".

Как исследователь, начавший свою работу с изучения проблемы гетерозиса и посвятивший ей почти 15 лет, я убежден, что и сегодня мы не до конца понимаем, что это сложнейшее и весьма значимое для эволюции и селекции явление, обеспечивающее преимущества как для естественного, так и для искусственного отбора, и виной этому исходная стратегическая ошибка - найти универсальный стратегический механизм, определяющий в ряде случаев существенное преимущество гибридов перед исходными формами. Поэтому и гипотезы гетерозиса сводились к двум основным - доминированию и сверхдоминированию. На самом деле гетерозис является сложным генетическим признаком, на проявление которого влияют многие гены и их сочетания. Центральным звеном в этом признаке являются гены, определяющие высокую комбинационную способность. Доказательством этому являются все эмпирически выстроенные схемы селекции на комбинационную способность, в основе которых лежит периодический отбор и целью которых является увеличение концентрации "генов гетерозиса" в исходных линиях. По аналогии это напоминает технологию обогащения руды концентратом извлекаемых компонент. Результаты крупномасштабной селекции на комбинационную способность, затронувшую, например, у кукурузы тысячи линий и длящуюся более 50 лет, позволяют предположить, что источников "генов высокой комбинационной способности" немного, в пределах десятков, если не менее. Анализ родословных линий, определяющих высокую комбинационную способность, показывает, что в их основе лежит не более десяти первоисточников. Это заставляет несколько переосмыслить природу гетерозиса, т.е. эффект превышения параметров над исходными формами. Ближе всего к этому подошел В.А. Струнников со своей гипотезой компенсационного комплекса генов, т.е. наличия в геноме комплекса генов или отдельных генов, способных частично нивелировать неблагопри-

ятное действие мутантных аллелей и сохранять свой эффект в гетерозиготах.

Короче говоря, как по проблеме гетерозиса, так и по другим нужно возвращаться к детальному анализу генетики признаков. Несмотря на огромные возможности генно-инженерных, хромосомных, клеточных технологий в изучении геномов, расшифровка механизмов гетерозиса затормозилась где-то на уровне 1980-х гг. Нужны новые идеи и использование мощи классических методов генетики на новом уровне.

С начала 1980-х гг. мы выстроили новую стратегию исследований лаборатории, включающую три основных направления:

- 1) реконструкция генома растений методами отдаленной гибридизации, хромосомной инженерии и клеточных технологий;
- 2) трансгенез у растений;
- 3) системы размножения у растений.

Первое направление по отдаленной гибридизации мы основали совместно с Л.А. Першиной, которое значительно расширило возможности переноса генетического материала между далекими в систематическом отношении видами и родами растений для получения уникального в генетическом и селекционном смысле исходного материала – дополненных и замещенных линий, аллоплазматических форм, новых комбинированных геномов. Необходимо отметить, что отдаленная гибридизация, особенно межродовая, является первым этапом трансгенеза, так как главной ее целью является перенос генетического материала крупными блоками, а то и целыми геномами, как в случае амфидиплоидии. Мы выбрали довольно далекие в систематическом отношении виды злаковых: ячмень, пшеницу, рожь, и с использованием методов культивирования *in vitro* получили гибриды между ними. Материалы по этому большому циклу работ широко опубликованы и хорошо известны исследователям в этой области. Без преувеличения можно сказать, что эти работы реанимировали интерес к отдаленной гибридизации уже на новом технологическом уровне, особенно с использованием культуры клеток и тканей растений (рис. 2–4).

Главными результатами данного цикла работ является получение новых комбинаций межродовых ячменно-пшеничных и ячменно-

рожных гибридов растений, новых аллоплазматических и замещенных линий. Наиболее существенным и новым результатом является восстановление фертильности у части межродовых гибридов путем целенаправленного подбора исходных форм для гибридизации.

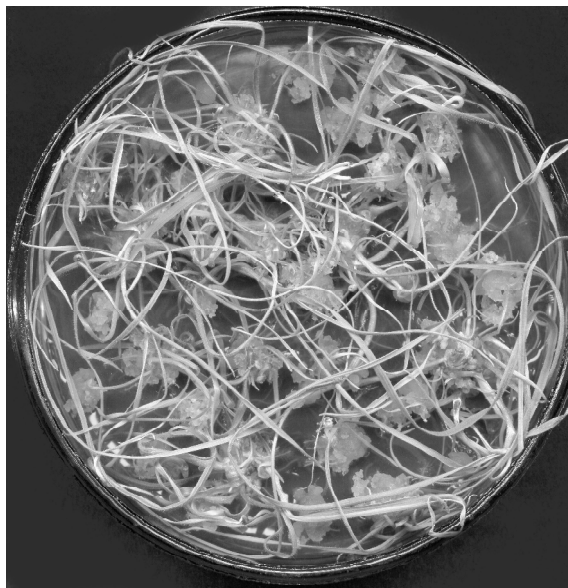


Рис. 2. Вегетативное размножение ячменно-пшеничных гибридов по циклу молодые соцветия–каллус-регенеранты.

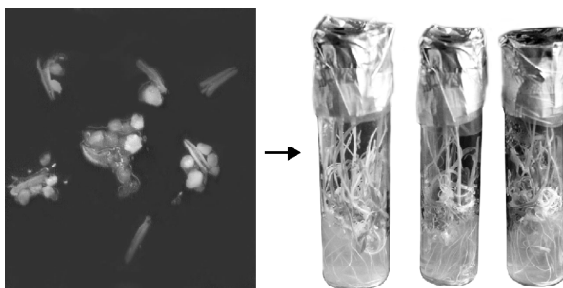


Рис. 3. Регенерация проростков при культивировании пыльников, использованном для ускоренного получения рекомбинантных гомозиготных линий ячменно-пшеничных гибридов.

Наличие такого гибридного материала открыло новые возможности для сравнительного изучения генома растений, интрогрессии чужеродного материала, взаимодействия генома и цитоплазмы с использованием аллоплазматических линий. Методы флуоресцентной



Рис. 4. Колосья дикорастущего ячменя. 1 – *H. geniculatum* All.; 2–3 – аллоплазматические дополненные линии мягкой пшеницы, полученные на основе ячменно-пшеничных гибридов *H. geniculatum* x *T. Aestivum*; 4 – мягкая пшеница сорта Пиротрикс 28.

микроскопии, которые в ИЦиГ поставлены на хорошем уровне, позволяют проследить всю динамику интрогрессии при взаимодействии разных геномов, уровень их гомологии.

Несомненно, что проблема реконструкции генома растений методами отдаленной гибридизации с использованием культуры клеток и тканей на злаковых в ИЦиГ проработана основательно.

Однако отдаленная гибридизация в сочетании с клеточными технологиями открывает новые перспективы и для хромосомной инженерии как важнейшего раздела биотехнологии растений. Значимый для эволюции формообразовательный процесс состоял из комбинативной, мутационной изменчивости и интрогрессии на межвидовом, межродовом уровнях генетического материала как дополнительного источника изменчивости. Полученные в результате этого цикла работ уникальные формы представляют новые возможности более полного моделирования формообразовательных процессов в эволюции и в последующем в селекции.

Этот цикл работ логически взаимосвязан с исследованиями по трансгенезу, где

речь идет о переносе уже не больших фрагментов генома, а целевых избранных генов.

Следующий цикл работ был обоснован совместно с Е.В. Дейнеко, начат сравнительно недавно и посвящен трансгенезу у растений, что хорошо вписывалось в общую концепцию лаборатории о реорганизации генома растений методами хромосомной и геномной инженерии, клеточных и тканевых культуральных технологий.

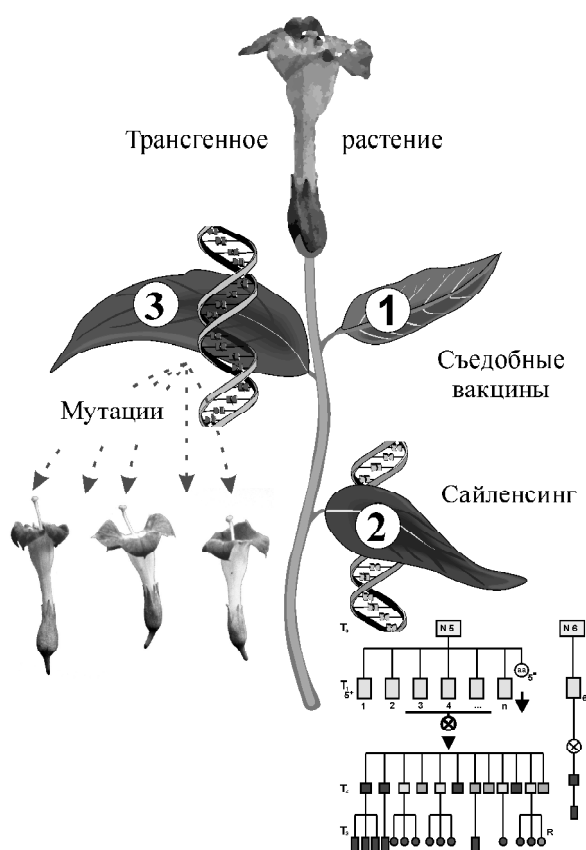


Рис. 5. Основные направления исследований по трансгенным растениям в ИЦиГ СО РАН.

1 – синтез специфических белков (съедобные вакцины); 2 – молекулярно-генетические механизмы инактивирования чужеродных генов; 3 – индукция мутаций.

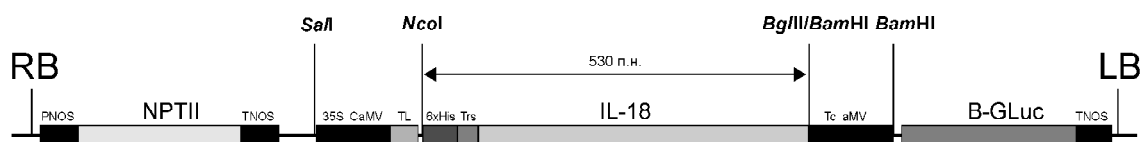
Для нас трансгенез у растений является прежде всего научной проблемой для решения следующих вопросов: 1) оптимизация безопасных векторных и репортерных систем; 2) клонирование "полезных" генов и создание генно-инженерных конструкций; 3) анализ экспрессии генов, проблема сайленсинга; 4) исследо-

вание изменчивости, индуцируемой inserциями чужеродных генов, в том числе встройки векторных (бактериальных) ДНК (рис. 5).

Именно эти вопросы являются основными в наших планах по изучению трансгенеза у растений. Естественным является и наш интерес к практическим аспектам проблемы трансгенеза у растений. Основные результаты по трансгенным растениям следующие. Получены: 1) трансгенные растения табака и люцерны с геном интерферона человека; 2) растения табака и моркови с генами интерлейкинов 10 и 18 (рис. 6); 3) растения табака и картофеля с геном неспецифической бактериальной нуклеазы; 4) растения таба-

ка с геном "оболочки" туберкулезной бактерии и с генами возбудителя гепатита; 5) растения табака с повышенным содержанием пролина, несущие антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы.

Перечень полученных нами трансгенных растений свидетельствует о нашем интересе к проблеме устойчивости растений к инфекциям и стрессам, созданию продуцентов белков медицинского назначения. Но это практический аспект нашей работы с трансгенными растениями. Главный результат этого цикла работ заключается в изучении экспрессии чужеродных генов, феномена сайленсинга и генетической из-



Саузерн

Вестерн

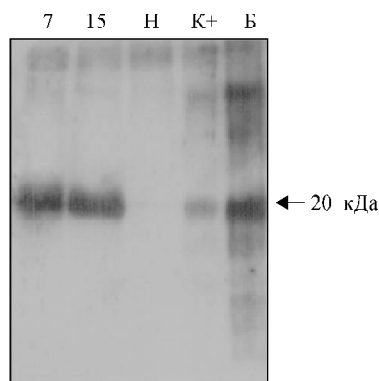
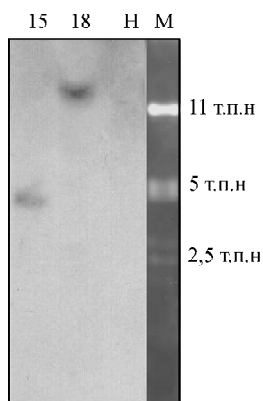
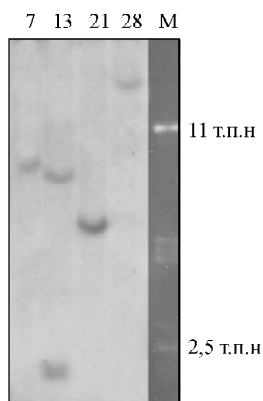


Рис. 6. Трансгенные растения – продуценты белков медицинского назначения (интерлейкины 10 и 18).

менчивости, вызванной инсерциями при трансгенезе. Выявлены частотные характеристики "замолкания" генов, прослежена динамика их экспрессии в ряду поколений в зависимости от числа копий и независимых встроок. Получена коллекция мутаций, вызванных инсерциями чужеродной ДНК, затрагивающих системы размножения и структуру цветка (появление стерильности, лонгостилии и др.). Показано, что многие из этих мутаций связаны с нарушением разных стадий мейоза.

Говоря о трансгенных организмах в целом и растениях в частности, следует отметить, что это супермощная технология для изучения геномов и их преобразования. Однако в этой проблеме имеются еще многие нерешенные фундаментальные вопросы. Некоторые из них были перечислены выше.

Теперь о дискуссиях вокруг генетически модифицированных организмов. Они связаны в основном с использованием трансгенных организмов. Сегодня только у растений трансгенные формы получены более чем у 100 видов, под ними занято более 60 млн га посевных площадей. Продовольственный рынок ежегодно получает миллионы тонн зерна трансгенных сои, кукурузы, рапса и других культур. Сегодня они являются компонентами многих продуктов, которые идут на экспорт, в том числе и в Россию. Естественно, такие продукты не всегда имеют маркировку о наличии в их составе ГМО (генетически модифицированных организмов). Самое печальное в этом то, что в России нет ни одного собственного трансгенного растения, разрешенного к использованию. Лучшим способом обезопасить себя от проникновения на рынок неизвестных и часто немаркированных продуктов является использование трансгенных растений, полученных на отечественных сортах, хорошо проверенных по всем критериям и безопасных для применения. Для этого нужна организация специальной программы по получению таких сортов, всестороннему изучению и проверке их на биобезопасность при использовании. Процесс создания и использования генетически модифицированных организмов уже не остановить, без него у человечества

нет шансов справиться с продовольственной проблемой при современной демографической ситуации.

Следующий цикл работ связан с генетикой систем размножения у растений. Основоположником этого направления в ИЦиГ был Ю.П. Мирюта. Под его руководством был создан первый районированный гибрид кукурузы Сибирский 4 на стерильной основе. Но главным достижением Ю.П. Мирюты было провозглашение закона "О периодической смене инбридинга и кроссбридинга в популяциях растений". Суть этого закона состоит в том, что в популяциях как самоопылителей, так и перекрестников имеется генетическая система, которая регулирует уровни инбридинга и кроссбридинга, а следовательно, и уровни гомозиготности и гетерозиготности.

Экспериментальная методика исследования этого явления на кукурузе была довольно проста. На белозерную форму наносится в равных или кратных долях смесь пыльцы желтозерной и белозерной форм и по ксености зерен определяется доля своей или чужой пыльцы, участвовавшей в оплодотворении. У других культур степень участия своей и чужой пыльцы определялась по доле гибридных растений, фиксированных по иным признакам.

Анализируя данные по избирательности своей и чужой пыльцы, Ю.П. Мирюта пришел к заключению, что и у самоопыляющихся, и перекрестноопыляющихся растений инбридинг и кроссбридинг чередуются по определенным временным циклам. Отсюда были сделаны далеко идущие практические выводы об использовании в схемах гетерозиса для получения гибридных семян не только ЦМС, но и эффекта избирательности чужой пыльцы, достигающего у отдельных линий, особенно самоопылителей, 80–90%. Но эти идеи и схемы Ю.П. Мирютой реализованы не были.

Нами с Э.В. Квасовой был задуман и проведен эксперимент с люцерной – самонесовместимым перекрестноопыляющимся видом со сложной структурой цветка, гарантирующей перекрестное опыление. Используя самофертильность и псевдосовместимость, характерные для небольшой части растений, мы прове-

ли глубокий инбридинг, к настоящему времени его глубина составляет 50 поколений. Целью этой работы были получение высокосамофертильных форм и полная реорганизация цветка – получение форм с самораскрывающимися цветками (автотриппинг) и с самоопылением в закрытом цветке (автогамия).

Такие формы были получены в 5–10 инбредных поколениях. Инбредная депрессия наиболее сильно была выражена в первых 5 поколениях, затем стабилизировалась до 15-го поколения инбридинга. А вот дальше, до 30-го поколения инбридинга мы отметили резкий всплеск изменчивости по многим морфологическим и репродуктивным признакам, среди них значительную долю составляют разные типы хлорофилльных мутаций. После 30-го поколения уровень изменчивости понизился, но повысился уровень самофертильности, что и являлось нашей целью – получение для генетических и селекционных исследований самофертильных форм с высоким уровнем автотриппинга и ксеногамии.

О том, что инбридинг связан с процессами изменчивости, говорит и цикл работ, выполненных нами совместно с Г.А. Похмельных на кукурузе при изучении гетерохроматических узелковых районов (ГУР) хромосом. Первоначально ставилась задача – получить контрастные многоузелковые и малоузелковые линии условно в гомо- и гетерозиготном по узелкам состоянии и выявить некоторые взаимосвязи между количеством и состоянием ГУР и морфофизиологическими признаками. Однако в процессе инбридинга при создании линий, условно гомозиготных по узелкам, мы столкнулись с необычным эффектом. Гомозиготизация по ГУР у многоузелковых форм привела к ярко выраженной протерандрии, т.е. одновременному цветению метелки и початка в пределах растения, что фактически исключает дальнейшее самоопыление, а следовательно, и инбридинг. Таким образом неожиданно выявлена необъяснимая пока взаимосвязь между состоянием гетерохроматина (по ГУР) и системами размножения.

Значительные исследования были выполнены по системам размножения у ржи

И.С. Поповой, а у гречихи и люцерны – В.И. Коваленко. Они также были связаны с самофертильностью и структурой цветка.

Мной совместно с сотрудниками и в большинстве случаев в соавторстве с коллегами СО РАСХН создано и районировано 7 сортов: 2 – ячменя, 2 – люцерны, 1 – пшеницы, 1 – ржи, 1 – амаранта.

Наиболее целенаправленной в практическом плане работой была программа Президиума СО АН СССР "Лизин". По этой программе я работал в Швеции (Лунд и Свалеф) и привез весь исходный материал с высоким содержанием лизина и белка. Была создана специальная группа, в которую, кроме меня, вошли М.И. Голышева, Л.П. Солоненко, А.В. Аксенович. Был осуществлен перенос необходимых генов в местные сорта ячменя. Две формы были доведены до сортов Ранний 1 и Ифтихор и районированы в Сибири и Таджикистане.

Дальше мне хотелось бы остановиться на некоторых общих проблемах развития генетики растений. За последние 45 лет в генетике в целом, в том числе и в генетике растений многое изменилось. Полностью расшифрован геном человека, ряда видов животных, микроорганизмов; у растений – полный геном *Arabidopsis thaliana*, частично риса и кукурузы. Появилась новая наука геномика. Резко возросли методические и технологические возможности. Но несмотря на все это, я бы выстроил для ИЦиГ приоритеты генетики растений в следующем порядке (прежде всего с учетом возможностей самого института):

1. Молекулярно-генетическое картирование генома растений, прежде всего злаковых. Чем полнее будет картирован геном, тем быстрее мы поймем его структурно-функциональную организацию в определении как простых, так и особенно сложных количественных признаков. Положительным моментом для этого является и созданная в институте теория генных сетей, позволяющая понять взаимодействие как генов, так и их продуктов при формировании признаков. В ряде лабораторий института эта работа идет на хорошем уровне и с эффективной интеграцией, в том числе и на международном уровне.

2. Детальная генетика признаков и функций как следствие картирования генома растений. В институте подробно изучаются такие признаки, как системы размножения, устойчивости к заболеваниям, адаптационного потенциала, симбиотической азотфиксации и другие. Для этого используются методы мутагенеза, моносомного анализа, изогенных линий и другие. Только хорошее знание генетической структуры признаков позволяет понять целостные характеристики растения и возможности их реорганизации. Это в полной мере относится и к такому сложному признаку, как гетерозис, с которым связаны многие генетические системы.
3. Хромосомная инженерия растений, основанная на отдаленной гибридизации и технологиях культивирования клеток, тканей и органов. В данном случае речь идет о переносе крупных блоков генетического материала на межвидовом и межродовом уровнях и создании на этой основе уникального генетического материала – дополненных, замещенных и аллоплазматических линий. Можно уверенно утверждать, что это направление в ИЦиГ имеет хороший задел и является приоритетным.
4. Генная инженерия на растениях представлена в ИЦиГ получением и исследованием трансгенных форм. Если при отдаленной гибридизации мы переносим крупные блоки генетического материала, то трансгенез позволяет целенаправленно интегрировать избранные целевые гены, и в фундаментальном плане эти исследования необходимо расширять.
5. Генетическое разнообразие и теория селекции. Для нас очень важно наличие уникального генетического материала, доноров устойчивости к экстремальным факторам сибирской экологической ниши. Создание такого исходного материала может осуществляться двумя путями – поиском естествен-

ных источников среди культурных растений и их диких сородичей и экспериментальным созданием разными методами, в том числе и вышеперечисленными.

Для нас также очень важно совершенствование старых и создание новых, более эффективных методов селекции. Генно- и хромосомно-инженерные, клеточные и тканевые технологии позволяют это сделать.

В последние годы идет серьезный пересмотр роли регуляторных механизмов в экспрессии генетических систем, эпигенетических процессов, что может иметь серьезные последствия, в том числе и в селекции. В этой связи в ИЦиГ поддерживаются исследования по созданию препаратов из природного растительного сырья или бактериальных, стимулирующих рост, развитие и защитные функции растений.

Пять направлений развития современной генетики растений, по которым в ИЦиГ ведутся исследования, естественно, не исчерпывают весь диапазон развития этой важнейшей области генетики.

Основной негатив в развитии генетики, в том числе и генетики растений, сегодня заключается в наметившемся разрыве между общей генетикой на организменном, популяционном и эволюционном уровнях и молекулярной генетикой на уровне структурно-функциональной организации генетических систем. Отрицательные последствия изоляции общей и молекулярной генетики – в непонимании необходимости оценивать весь имеющийся как в общей, так и в молекулярной генетике фактический материал с популяционно-эволюционных позиций, потому что эволюционирующей единицей является именно популяция. Поэтому, если мы понимаем процессы, в том числе и генетические, происходящие на уровне популяций, и их значение для эволюции, то мы способны сделать правильные обобщения. В противном случае нам грозит анализ не связанных между собой частных.