

Учредитель ООО «Биоактуаль»

Главный редактор

д.б.н., профессор О.С. Корнеева

Редакционный совет

д.б.н., профессор Ф.К. Алимова

д.т.н., профессор В.В. Бирюков

д.т.н., профессор Л.А. Иванова

д.б.н., профессор Л.П. Лазурина

д.б.н., профессор Е.Г. Новосёлова

д.х.н., профессор Т.В. Овчинникова

д.т.н., профессор А.Н. Остриков

д.б.н., профессор В.Н. Попов

д.т.н., Член-Корр. РАСХН Л.В. Римарева

Ответственный редактор

к.т.н. А.А. Дерканосова

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций:

Свидетельство о регистрации ПИ № ФС77-62393 от 14 июля 2015 г.

Журнал «Актуальная биотехнология» выходит 4 раза в год

Подписной индекс издания в агентстве «Роспечать» 58012

По каталогу «Издания органов научно-технической информации» физические и юридические лица могут оформить подписку во всех отделениях почтовой связи Российской Федерации и странах СНГ и Балтии.

Адрес редакции и издательства

394026, г. Воронеж, пр-т Труда, д. 48, корп. 4, оф. 11

E-mail: actbio@mail.ru

Сдано в набор 10.09.2019. Подписано в печать 18.09.2019.

Дата выхода в свет: 21.09.2019

Формат 60×84 1/8

Усл. печ. л. 4,6. Тираж 1500 экз. Заказ 47

Цена – свободная.

УДК 633.367.2:631.526.3

**ТЕХНОЛОГИЯ ХРАНЕНИЯ МАКСИМАЛЬНОГО КОЛИЧЕСТВА ГЕНОВ ВИДА
РАСТЕНИЙ В МИНИМАЛЬНОМ КОЛИЧЕСТВЕ КОМПОНЕНТОВ ЕГО
БИОЛОГИЧЕСКОГО БАНКА ГЕНОВ**

Н.С. Купцов, Е.Г. Попов

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

Современное сельхозпроизводство в связи с глобальными изменениями климата Земли и тем фактом, что в Европе этот процесс идёт более высокими темпами, чем в среднем по миру, поставило перед селекцией нашего времени в качестве стратегической задачи создание у сельскохозяйственных культур интенсивных сортов различного типа развития (яровых, факультативных, озимых, многолетних), обладающих высоким потенциалом продуктивности и адаптивности, приспособленных к технологиям возделывания в разных системах земледелия (классической, No-Till, Strip-Till, Mix-Crop, Rot-Mix). Однако время, которое отводится селекционерам на решение сегодняшних задач и ближайшего будущего, значительно короче, чем это было в прошлом. Дальнейшее успешное продвижение в области практической селекции всё более зависит от оперативного вовлечения в работу генофонда, хранящегося в мировых коллекциях. За последние десятилетия объёмы этих коллекций резко возросли, что затрудняет работу с ними, а именно, инвентаризацию, хранение, воспроизведение, выдачу потребителю, использование потребителем и др. [1–5]. Поэтому весьма актуально создание таких технологий, которые позволяют существенно сокращать объёмы коллекций, сохраняя при этом количество генов, подлежащих хранению.

С целью значительного сокращения объёмов коллекций, несущих подлежащие хранению гены, а также для удобства и ускорения работ по созданию необходимого для селекции генотипического разнообразия, нами были созданы для 4-х видов люпина (узколистного [*Lupinus angustifolius* L.], жёлтого [*L. luteus* L.], белого [*L. albus* L.], тарви [*L. mutabilis* Sweet]) биологические банки генов (ББГ), состоящие из 14 компонентов каждый [5–7]. При этом теоретическим базисом ББГ стал заложенный в молекуле ДНК общеизвестный принцип комплементарности полинуклеотидов, используемый природой для хранения и воспроизводства генетической информации разных организмов. Этот принцип с успехом применён нами в ББГ видов люпина для хранения и воспроизводства контролируемых генов вида в минимальном количестве компонентов. Комплементарные друг другу по многим генам 14 компонентов ББГ по генетической функции являются своего рода аналогами полинуклеотидов ДНК.

Гибридизация компонентов между собой (– ++×++ –) в результате неаллельного взаимодействия генов (–+ ±) и их рекомбинации позволяет значительно увеличить в потомстве гибридов генотипическое разнообразие по тому или иному элементарному признакам. Так, наряду с выщеплением родительских генотипов (– ++ и ++ –) происходит реверсия блока диких генов (+++) и образование новых блоков мутантных генов (– –).

Рекомбинации генов разных признаков приводят к образованию генотипов с новыми ассоциациями генов, которые являются принципиально новыми только в случаях, если в них включены новообразования при взаимодействии неаллельных генов [4, 5, 8].

Процесс создания ББГ указанных видов люпина включал следующие 5 этапов: изучение и инвентаризация мировой коллекции; формирование стержневых коллекций; составление изопризнаковых групп; инвентаризация генов, подлежащих хранению; создание с помощью гибридизации биологического банка генов.

Биологический банк генов каждого из указанных видов люпина представляет собой систему из 14-ти комплементарных друг другу компонентов (ББГ-1... ББГ-14), в которой экспериментально с помощью гибридизации сконцентрированы и хранятся контролируемые и необходимые для практической селекции гены, ранее дисперсно разбросанные по отдельным образцам мировой коллекции. Каждый из компонентов ББГ сформирован на генетической основе того или иного геотипа (Иберийского, Апеннинского, Балкано-Азиатского и др.) или агрогеотипа (Австралийского, Северо-Американского, Польского и др.).

Число компонентов в ББГ (14) определено с учётом числа неаллельных генов по признаку "окраска семян" (11), а также необходимости иметь 1 компонент (ББГ-12) с полным набором доместициационных генов и 2 тестера для гибридологического анализа. Компонент ББГ-12 используется в процессе доместикации желательных диких форм вида и выведения на их генетической основе современных интенсивных сортов. Компонент ББГ-13 служит тестером, содержащим мутантные (рецессивные и доминантные аллели) генов большинства контролируемых признаков, а компонент ББГ-14 является тестером, содержащим набор диких (нормальных) генов.

Необходимо подчеркнуть, что на современном этапе селекционерами в процессе создания сортов самоопыляющегося вида люпина узколистного постоянно контролируется около 100 генов по 35 признакам, а у факультативных перекрёстников (люпинов жёлтого, белого и тарви) – около 30 генов по 20 признакам.

Сравнительный ISSR-анализ сортов, образцов и диких форм мировой коллекции люпина узколистного и компонентов ББГ этого вида, установил, что последние полностью отражают спектр его внутривидового разнообразия, равномерно распределяясь на дендрограмме генетического сходства [9]. Использование двух молекулярно-генетических методов (WPGMA и UPGMA) также показало, что биологический банк генов люпина узколистного обладает высоким генетическим разнообразием его 14 компонентов [5, 10]. Эти результаты молекулярно-генетического анализа и опыт использования ББГ люпина узколистного в практической селекции дают нам основание сделать заключение о том, что его объём в 14 компонентов является достаточным для хранения контролируемых генов в настоящее время, а также в обозримом будущем. Для идентификации компонентов ББГ люпина узколистного, а также защиты авторских прав на ББГ и на сорта, создаваемые в результате его использования в практической селекции, разработаны с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР, PCR) и двух ISSR-праймеров (IS3 и UBC810) молекулярно-генетические паспорта компонентов ББГ этого вида [5, 10]. Следует отметить, что молекулярно-генетические паспорта компонентов ББГ являются важными и необходимыми элементами при их идентификации, коррекции и использовании в селекционной работе.

Для результативного отбора желательных генотипов из гибридных популяций ББГ ($F_2... F_n$) разработана и используется система сигнальных генов, в том числе и молекулярно-генетических ДНК-маркеров [3, 5, 10].

Воспроизведение генов и их ассоциаций в ББГ осуществляется путём гибридизации между собой его компонентов и отбора растений с желательными генами во втором и последующих поколениях. В поколениях гибридов от скрещивания компонентов ББГ воспроизводится колоссальное разнообразие генотипов, превышающее по некоторым признакам таковое вида. Среди новых форм выделяются даже такие, которые имеют признаки, характерные для других видов люпина.

В ББГ исключается эрозия генетического материала, так как при гибридизации его компонентов между собой в результате неаллельного взаимодействия генов и их рекомбинаций происходит синтез принципиально новых генотипов, а также реверсия (возврат) как диких признаков вида, так и таковых, характерных для рода.

Указанное явление мы целенаправленно используем для экспериментального синтеза новых разновидностей у того или иного вида люпина. Так, у люпина узколистного (Средиземноморский генцентр) синтезирована новая разновидность (var. *anastasi* Kuptzov. var. *nova*), таксономические признаки которой близки к таковым разновидностей тарви (Южно-Американский генцентр) [3].

Кроме того, гибридизация между собой компонентов ББГ, которые созданы на генетической основе отдалённых геотипов и агрогеотипов, открывает возможности целенаправленного использования естественного тетраплоидного уровня видов люпина для экспериментального синтеза максимальной (4-х аллельной) гетерозиготности по желательным элементарным признакам, которая в поколениях обеспечивает высокий уровень их выраженности и, возможно, незатухающий гетерозис [11].

Малое количество компонентов ББГ значительно облегчает работу с ним. ББГ позволяет оперативно проводить инвентаризацию генов, закладку новых генов на хранение, воспроизводство желательных генов и их использование в селекции.

Биологический банк генов постоянно пополняется новыми аллелями генов. Этот процесс осуществляется в следующей последовательности. В случае появления в коллекции образца люпина с новым выражением того или иного признака, он скрещивается с тестером ББГ-14, содержащим в своём генотипе комплект диких (нормальных) генов. Это скрещивание даёт возможность выяснить происхождение гена, обуславливающего изучаемый признак (дикий, мутантный доминантный или мутантный рецессивный). Затем изучаемый ген проверяется на аллельность путём скрещивания изучаемого образца с соответствующими ему по признаку компонентом биологического банка генов. Доказательством неаллельности изучаемого гена является восстановление дикого выражения признака в F_1 в случае его рецессивности, а в случае его доминантности – появление в F_2 доли растений с диким выражением признака. Отсутствие восстановления дикого выражения признака в F_1 и F_2 гибридов свидетельствует об аллельности изучаемого гена таковому компоненту ББГ. В случае выявления у тестируемого образца нового аллеля, последний, путём гибридизации, включается в наиболее подходящий для него тот или иной компонент ББГ, где он в дальнейшем хранится.

Следует также отметить, что ББГ даёт возможность вести селекционный процесс в соответствии с основными положениями классической генетики по трансформации признаков. Известно [3–5], что процесс выведения сортов состоит из создания путём рекомбинации генов уравновешенных (сбалансированных) полигенных комплексов, обеспечивающих новые сочетания признаков и свойств, наиболее соответствующих целям селекции. Указанные полигенные комплексы определяют повышение реакции на отбор и ускоряют трансформацию признаков в тем большей степени, чем больше объём популяций используется для отбора, большее число одновременно трансформируемых аллелей различных локусов, меньшее селективное преимущество каждого локуса, выше интенсивность рекомбинационных процессов, меньше элиминация рекомбинантов в жизненном цикле и выше интенсивность отбора. Биологический банк генов полностью удовлетворяет всем перечисленным требованиям классической генетики по трансформации признаков. Так, небольшое количество компонентов ББГ позволяет значительно увеличить объём желательных комбинаций скрещивания и использовать для отборов большие по численности гибридные популяции $F_2... F_n$. Вовлечение большего числа желательных аллелей в процессы трансформации обеспечивается их экспериментальной концентрацией в компонентах ББГ. Снижение селективного преимущества каждого локуса достигается использованием в компонентах ББГ в основном мутантных аллелей контролируемых локусов. Мы полагаем, что колоссальное генотипическое разнообразие потомства гибридов ББГ отражает существующее на сегодня разнообразие того или иного изучаемого нами вида люпина в дикой флоре и в коллекциях научных учреждений разных стран, как собранное описанное, так и несобранное и неописанное, а также, вероятно, ещё то разнообразие, которое имело место в процессе эволюции, но не закрепилось и элиминировало. Возможно и такое, которое может ещё появиться в дикой флоре, а также в процессе селекции.

По методическому подходу технология создания ББГ, хранения в нём генов, их воспроизводства и использования является принципиально новой, по своей сути "космической", технологией [5]. Космическая сущность этой технологии заключается в её способности обеспечить закладку, хранение, воспроизводство и транспортировку колоссального генетического разнообразия (на уровне вида) в минимально возможном количестве его компонентов. Эти свойства ББГ полностью отвечают требованиям, предъявляемым к банкам генов, которые могут быть использованы при освоении Космоса (на других планетах и космических станциях).

Включение ББГ в селекционный процесс позволило в короткие сроки создать разнообразный исходный для селекции материал и вывести серию сортов кормового узколистного люпина (Данко, Миртан, Першацвет и др.), жёлтого люпина (Пава, Владко, Алтын и др.), белого люпина (Эллин, Геракл и др.), тарви (Визент).

В коллекцию люпина Национального банка генетических ресурсов растений Республики Беларусь передано 112 образцов люпина узколистного, 82 – люпина тарви, 19 – люпина жёлтого, 2 – люпина белого [5].

Необходимо отметить, что компонент ББГ-12 биологического банка генов того или иного вида люпина, являясь донором набора доместикационных генов, с успехом используется в процессе доместикации их диких форм. Так, скрещивание дикого люпина греческого (подвида люпина белого, Subsp. *graecus* Bois. et Sprun.) с ББГ-12 люпина белого (*L. albus* L.) позволило в **короткие сроки** (7 лет) осуществить его доместикацию и создать интенсивный кормовой сорт Эллин, который с 2019 года проходит Государственное сортоиспытание.

Следует также указать, что имеющееся разнообразие образцов люпина, созданного на основе гибридного материала от скрещивания компонентов ББГ, позволило нам установить и описать у люпина узколистного – 20 новых разновидностей, 11 подразновидностей и 19 форм, у люпина жёлтого – 3 новых разновидности, 4 подразновидности, 4 формы, у люпина белого – 1 новую разновидность и 1 форму [12].

Таким образом, у каждого из 4-х видов люпина (узколистного, жёлтого, белого, тарви) сформированы биологические банки генов, состоящие из 14-ти компонентов, в которых экспериментально сконцентрированы и хранятся контролируемые гены, ранее дисперсно разбросанные по отдельным образцам мировых коллекций. Эти банки генов с успехом используются как в процессе доместикации диких форм указанных видов люпина, так и в селекционном процессе по синтезу новых внутривидовых таксонов и выведению интенсивных сортов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Купцов, Н.С. Энергоплантации: Справочное пособие по использованию энергетических растений / Н.С. Купцов, Е.Г. Попов. Минск: ЗАО «Конфида», 2015. 128 с.
2. Топинамбур в Беларуси (монография) / Титок В.В. [и др.]. Минск: РУП "Беларуская навука", 2018. 263 с.
3. Купцов, Н.С. Люпин генетика, селекция, гетерогенные посеы / Н.С. Купцов, И.П. Такунов. Брянск, Клины: Клиновская городская типография, 2006. 576 с.
4. Купцов, Н.С. Люпин узколистный / Н.С. Купцов, Т.П. Миронова // Генетические основы селекции в 4-х томах, Т.2: Частная генетика растений / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; науч. ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылёва. Минск: Бел. наука, 2010. С. 369–421.
5. Купцов, Н.С. Стержевая генетическая коллекция *Lupinus angustifolius* L. Генетика, формирование биологического банка генов, использование / Н.С. Купцов [и др.] / РУП "НПЦ НАН Беларуси по земледелию". Минск: ИВЦ МФ РБ, 2014. 127 с.
6. Купцов, Н.С. Результаты и перспективы акклиматизации люпина тарви в Беларуси / Н.С. Купцов, П.А. Пашкевич, Д.А. Бугрова, В.Н. Купцов // Роль ботанических садов и дендрариев в сохранении, изучении и устойчивом использовании разнообразия растительного мира: Материалы Международной научной конференции, посвящённой 85-летию Центрального ботанического сада НАН Беларуси (Минск, 6–8 июня 2017 г.). Минск : «Медисонт», 2017. Часть 1. С. 143–146.
7. Купцов, Н.С. Результаты и перспективы селекции люпина тарви / Н.С. Купцов, П.А. Пашкевич П.А., Д.А. Бугрова // Новые сорта люпина, технология их выращивания и переработки, адаптация в системы земледелия и животноводство: Сб. материалов Междунар. научн.-практич. конф., посвящённой 30-летию со дня основания Всероссийского научно-исследовательского института люпина. Брянск: «Изд-во "Читай-город"», 2017. С. 125–135.
8. Kuptsov, N.S. Non-allelic gene recombination and its use in breeding of *L. angustifolius* / N.S. Kuptsov, B. Joernsgaard // Wild and cultivated lupins from the Tropics to the Poles : Proceedings of the 10th Int. Lupin Conference. Laugarvatn, Iceland, 19–24 June 2002. / E. van Santen & G.D. Hill (eds.). Canterbury (N.Z.): International Lupin Association, 2004. P. 53–55.
9. Артюхова, А.В. Паспортизация сортов люпина методами ISSR-PCR и RAPD-PCR для биотехнологических исследований: автореф. дис... канд. биол. наук: 03.01.06; 03.02.07 / А.В. Артюхова; Институт биологии Уфимского научн. центра РАН. Уфа, 2011. 23 с.
10. Nam, I.I. Identification and certification of lupine cultivars using molecular markers / I.I. Nam [et al.] // World Appl. Sci. J. 2014. Vol. 30, № 7. P. 796–801.
11. Купцов, Н.С. Изучение гетерозиса по признаку «масса тысячи семян» у гибридов люпина узколистного / Н.С. Купцов, В.Ч. Шор, А.А. Козловский // Земледелие и селекция в Беларуси. Сб. науч. тр. РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию». Минск: «ИВЦ Минфина», 2012. вып. 48. С. 358–367.
12. Унифицированный классификатор рода *Lupinus* L. / Ф.И. Привалов [и др.]; Национальная академия наук Беларуси, РУП "Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию". Минск: ИВЦ МФ РБ, 2013. 63 с.