

УДК 631.52:575.12:633.31

СЕЛЕКЦИЯ ЛЮЦЕРНЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНОВ САМОСОВМЕСТИМОСТИ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

А.Ф. Бобер, доктор биол. наук, профессор,
О.М. Корягин, кандидат с.-х. наук, **М.В. Повыдало**
ННЦ «Институт земледелия НААН», Украина

(Поступила 18.09.2014 г.)

Аннотация. Сообщается о возможности селекции люцерны путем применения насыщающих скрещиваний и самоопыления. Для достижения этих целей предлагается совместить применение межвидовой гибридизации и метода насыщающих скрещиваний, видоизменив последний путем использования мутантного гена самосовместимости «sf» и контрастных геномных маркеров, таких как цвет лепестков цветка, форма боба и число оборотов спирали боба, что позволяет контролировать часть того или иного генома в конкретном генотипе растения. На основе данного метода насыщающих скрещиваний создана новая популяция, которая получила название *Наречена Пивночи*.

Введение. В природе существует немало видов люцерны. В культуре одними из наиболее распространенных являются люцерна посевная (*Medicago sativa* L.), люцерна серповидная (*Medicago falcata* L.) и люцерна северная (*M. borealis* Grossh). Известны сорта и виды люцерны серповидной, которые в культуре встречаются в диком состоянии, они имеют такие важные признаки, как долголетие, высокая зимостойкость, морозостойкость, засухоустойчивость и т.д. Однако эти виды мало распространены в культуре. Наиболее распространенным видом является люцерна посевная, которая характеризуется удовлетворительным плодо- и семяобразованием, имеет хорошее отрастание надземной массы.

Перенос признаков одного вида в геном другого с целью объединения лучших из них – одна из важнейших задач селекции люцерны. Объединения признаков сативного и фалькатного генотипов можно достичь путем проведения межвидовой гибридизации, благодаря которой становится возможным сочетание генов отдельных признаков, когда гибриды или их потомки будут иметь преимущество над обоими родителями по тем или иным показателям. К тому же привлечение новых признаков зародышевой плазмы к селекции любой культуры яв-

ляется положительным с точки зрения обогащения ее генофонда. Использовать межвидовую гибридизацию пытались селекционеры на протяжении всего начального периода селекции люцерны [1]. Как гласит теория селекции растений, каждый обособленный признак, имеющий четкий генетический контроль, можно передать без изменений только насыщая скрещиваниями (беккросами) по определенной методике [2], которая имеет особенности и зависит от генетической природы признака (его контроль осуществляется ядерными генами или генами цитоплазмы, одним или несколькими генами, доминантными или рецессивными генами), который пытаются передать.

Целью работы была попытка объединения лучших признаков вышеупомянутых видов в одном генотипе. Выполнить эту задачу путем обычных парных скрещиваний не удалось. В то же время опыт селекции других культур показывает, что поставленной цели можно достичь путем применения межвидовых повторных, насыщающих скрещиваний (беккросов). Однако эти три многолетних культурных вида люцерны являются облигатными перекрестноопыляемыми культурами со строгой генетической системой противодействия самоопылению, которая контролируется оппозиционными генами *ssss*. Растения этих видов практически не способны к самоопылению, т.к. гомозиготация генов контроля признаков, которые передаются насыщающими скрещиваниями, очень затруднена. При этом для гомозиготации передаваемых признаков используется близкородственное скрещивание среди F_1 , F_2 растений каждого цикла насыщения. Эта работа возможна в том случае, если признак, который подвергается трансгрессии, имеет простой генетический контроль, т.е. определяется в основном одним локусом, доминантным или рецессивным геном. Такая работа требует большого объема анализа и оценки растений, а в случае передачи сложных многогенных признаков объемы работ усложняются до невозможности их выполнения. Так, например, чтобы обнаружить и отобрать одну гомозиготу с одним рецессивным геном с вероятностью 0,95, необходимо проанализировать 100 растений, а в случае пяти генов – 867 растений. Несложно предположить, что в случае передачи признаков с многогенным контролем насыщающие скрещивания у люцерны могут стать процедурой такой сложности, что ее осуществление будет невозможным. Из этого следует вывод, что использованию метода насыщающих скрещиваний в селекции люцерны должна предшествовать процедура передачи генов по крайней мере одному из компонентов скрещивания, которые обеспечивают результативное самоопыление (или самосовместимость).

Методика проведения исследований. Полевые исследования, насыщающие скрещивания и контролируемое самоопыление.

Результаты и их обсуждение. Предлагается процедуру насыщения, самоопыления и отбора гомозигот, носителей признаков трансгрессии осуществлять в два этапа [3]. На первом этапе ведутся насыщающие скрещивания и осуществляется подбор растений по генетическим маркерам, к которым относятся следующие требования:

1. Маркеры должны быть многогенными, чтобы по их проявлению в зародышевой плазме иного вида можно было контролировать большой объем перенесенной информации;

2. Маркеры должны иметь четкий генетический контроль;

3. Маркеры должны легко визуально или аналитически идентифицироваться;

4. Наличие у одного из компонентов, в нашем случае у синецветковых, генов самофертильности в гомозиготном состоянии (*sf sf sf sf*) с высокой способностью к самоопылению и самооплодотворению.

Требованиям первых трех позиций у люцерны соответствуют такие маркеры, как цвет лепестков цветка, форма и структура строения боба. Их генетическая природа установлена. Один из компонентов скрещивания может иметь синий цвет лепестков, а другой – желтый. Генетическая формула синецветкового растения такова: *ССССРРРРуууу*. Второй компонент скрещивания может иметь желтый цвет лепестков цветка с соответствующей *ССССррррУУУУ* генетической формулой. Гибриды между этими компонентами имеют генетическую формулу *ССССРРррУУуу*. Их цветки имеют пеструю окраску (сине-желто-зеленую), поэтому легко идентифицируются визуально. Тетрасомная конъюгация хромосом гибрида люцерны и сосредоточенность олигогенов цвета цветка в разных хромосомах позволяет в потомстве F_2 выделить растения, несущие признаки геномов обоих видов, которые достаточно легко распознаются, несмотря на низкую частоту расщепления по цвету цветка. Форма и длина боба является вторым четким морфологическим признаком.

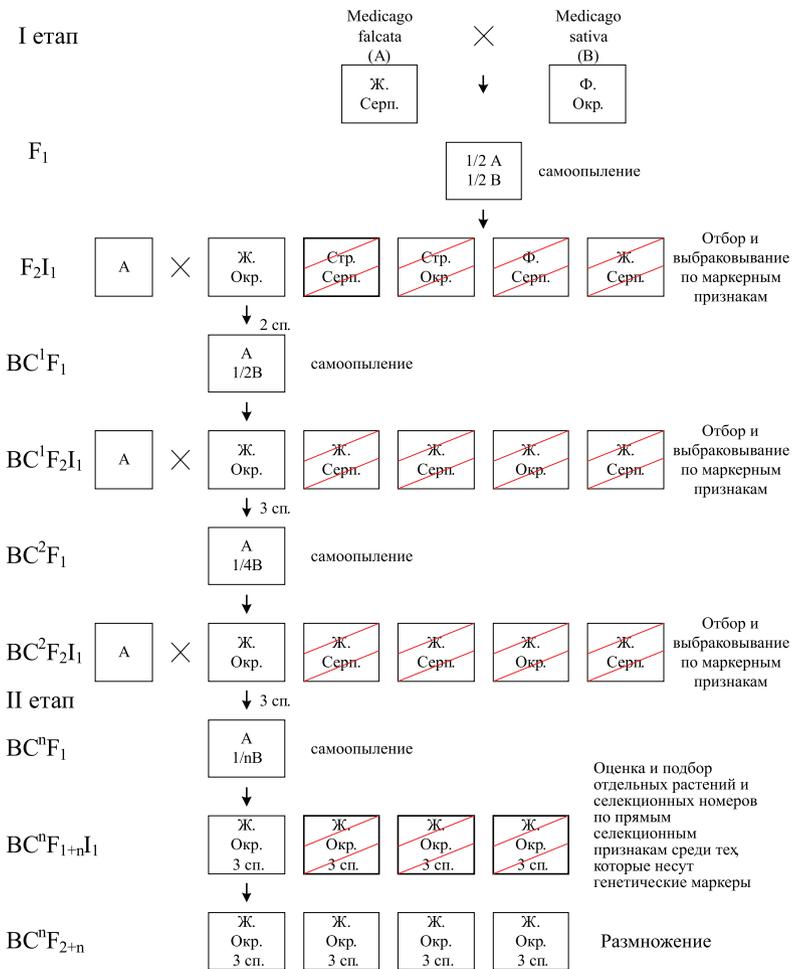
Два желтоцветочных вида (люцерна серповидная и люцерна северная) имеют четкий серпообразный боб, который по размерам не превышает 0,5 длины кольца. Люцерна посевная имеет округлую форму боба, с 2-3 и более оборотами спирали. Гибриды между видами, несущими эти альтернативные признаки, будут иметь округлые промежуточные формы боба не более 1,5 кольца. В поколении F_2 происходит расщепление с появлением растений с сочетанием альтернативных признаков (желтого цвета с 2-3 оборотами боба). Длина боба контролируется 3-4 количественными генами, которые сосредоточены в разных хромосо-

мах. Вероятность появления признака многоспирального боба в F_2 составляет 1:22,4, что соответствует нашим теоретическим расчетам. Итак, форма и длина боба могут быть использованы как альтернативные, с помощью которых можно маркировать компоненты межвидовых скрещиваний. С одной стороны, это боб серповидной формы, который имеет лишь S длины спирали, а с другой – это округлый боб длиной 3-4 и более оборотов спирали. Их скрещивание ведет к появлению округлого боба в F_1 с одним оборотом спирали. Следует заметить, что среди известных сортов-популяций встречаются очень редко формы растений с 4 и более оборотами спирали. Проведенная поисковая работа позволила выделить такие растения и сформировать популяцию, растения которой имеют округлый боб с 4-5 оборотами спирали.

Последняя, четвертая позиция является очень важным признаком, поскольку после каждого цикла насыщающих скрещиваний необходимо проведение самоопыления растений гибридного поколения для гомозиготации генов определенных структурных сочетаний (рисунок). Этот признак выявлен в процессе многолетней работы, изучена его генетика, и доказана возможность передачи селекционным путем от одной формы к другой. А в последние годы доказана возможность его функционирования в зародышевой плазме всех трех видов культурной люцерны как в гомозиготном, так и в гетерозиготном состоянии ($sf\ sf\ sf\ sf\ u\ ss\ ss\ sf\ sf$). В целом самосовместимость, имеющая такую генетическую структуру как $sf\ sf\ sf\ sf$, в гомозиготном состоянии обеспечивает завязывание бобов до 80% от числа самоопыленных цветков и 4-6 полноценных семян на боб.

На основе этого материала получен донор Гермафродита 2, имеющий синий цвет лепестков цветка, округлый боб с тремя оборотами спирали и уровнем самосовместимости 80% бобов от числа самоопыленных цветков и 4-6 полноценных семян на боб. Этот донор может быть использован в неизменном состоянии при межвидовой гибридизации с использованием упомянутых признаков. Не возникает сомнения, что только по данным генетическим маркерам, которые хорошо распознаются визуально, можно выделить формы с сочетанием многогенных признаков обоих геномов.

Для подтверждения возможности обоснования способа выполнено несколько серий опытов. Их результаты дают основание для утверждения действенности работы способа. Установлено, что виды люцерны серповидной (*M. falcata*) и люцерны северной (*M. borealis*) хорошо скрещиваются с люцерной посевной (*M. sativa*). Серия включала 3 формы люцерны северной, 8 – люцерны серповидной. Действие результативных насыщающих скрещиваний изучалось при использовании



F₁, F₂, F_n – гибриды первого, второго и последующих поколений;
 I₁ – поколение после первого контролируемого самоопыления;
 BC¹, BC², BCⁿ – гибриды после первого, второго и последующих насыщающих скрещиваний

Рисунок – Схема осуществления процессов в селекции люцерны с использованием межвидовой гибридизации и насыщающих скрещиваний

в качестве одного из компонентов (мать) широко известного сорта Павловская 7, который несет четкий серповидный боб и желтый цвет лет-

пестков цветка, а в качестве второго компонента (отец) использовался донор Гермафродита 2, который имел темно-синий цвет лепестков, округлый с 2-3 оборотами спирали боб и высокую самофертильность (80% и 3-4 семени на боб). Гибриды F_1 первого насыщения имели пестрый цвет лепестков и округлую форму боба с одним оборотом спирали. Гибриды F_2 первого насыщения содержали желтоцветковые растения с вероятностью 1:264 и желтоцветковые растения с одним оборотом спирали с вероятностью 1:525. Гибриды F_2 второго и третьего насыщения содержали растения с желтым цветом лепестков и округлым бобом с тремя оборотами спирали и встречались с вероятностью 1/800-1/1000. По мере увеличения числа повторных скрещиваний росло число спиралей боба. После третьего насыщения создана гибридная популяция, которая несет признаки двух видов (четкая прямостоящая форма стебля, хорошее отрастание и самосовместимость), встречаются растения с признаками хорошей семенной продуктивностью. Эта популяция получила название Наречена Пивночи. В результате проведенных исследований открываются возможности для дальнейшей результативной работы по улучшению кормовой и семенной продуктивности. Нашла подтверждение возможность наследования признака самофертильности у гибридов межвидового скрещивания. Большинство гибридных растений F_1 показали хорошее завязывание бобов и семян при самоопылении.

Выводы

1. Выявление и применение эффективных генов самосовместимости открывает возможности достаточно просто создавать гомозиготные линии и применять их для повторных скрещиваний, а также проводить самоопыление полученных гибридов в последующих поколениях для рекомбинации генов.

2. В процессе исследований после каждого насыщающего скрещивания или самоопыления удалось получить многочисленный селекционный материал, среди которого выделить рекомбинантные генотипы нужной генетической структуры.

3. Исследования дали возможность совместить применение межвидовой гибридизации и метода насыщающих скрещиваний, видоизменив последний путь использования мутантного гена самосовместимости «sf» и контрастных генетических маркеров.

4. Применение геномных маркеров, таких как цвет лепестков цветка, формы боба и числа оборотов спирали боба, позволяет контролировать долю того или иного генома в конкретном генотипе растения. Система-

тические отборы в гибридных поколениях по признаку «максимальное количество оборотов спиралей боба» способствовали существенному росту проявления признаков семенной продуктивности, таких как число семян на боб и масса семян с растения, что свидетельствует об эффективности трансгрессии определенной доли генома одного вида другому.

5. На основе данного метода насыщающих скрещиваний создана новая популяция, которая получила название Наречена Пивночи. Сорт занесен в Реестр сортов растений Украины [4].

Литература

1. Культурная флора СССР: в 13 т. / под ред. Е.Н. Синской – М.-Л.: Сельхозгиз., 1948-1950. – Т. 13: Многолетние бобовые травы. Люцерна (*Medicago L.*) / П.А. Лубенец [и др.]. – 1950. – 570 с.
2. *Briggs, F.* Научные основы селекции растений / Ф. Бриггс, П. Ноулз. – М.: Колос, 1972. – 398 с.
3. Спосіб подолання генетичної системи протидії самозапиленню у видів культурної люцерни: пат. № 30229 Україна, МПК А01Н 1/04. / А.Ф. Бобер, О.М. Корягін, М.В. Повидало; заявник: ННЦ «І-т землеробства УААН». – №а200600700; заявл. 26.01.06; опубл. 25.02.08 // Укр. бюл. «Пром. Власність» / Держ. департамент інтелект. власності. – 2008. – №4. – С. 22.
4. Люцерна серповидна сорт Наречена Півночі: а. с. 0773 Україна, від 2007 / О.М. Корягін, А.Ф. Бобер, М.В. Повидало, О.О. Мордовець, М.Б. Ракович; ННЦ «І-т землеробства УААН». – №05462001; заявл. 28.11.05; опубл. 11.01.07 // Реєстр сортів рослин України. – 2007.

ALFALFA BREEDING USING SELF-COMPATIBILITY GENES and genetic markers

A.F. Bober, O.V. Koryagin, M.V. Povydalo

The possibility of alfalfa breeding using saturation crosses and self-pollination is discussed. To achieve these aims, it is proposed to combine the use of interspecific hybridization and a method of saturation crosses, modifying the latter through the use of “sf” self-compatibility mutant gene and contrast genomic markers, such as the colour of flower petals, bean shape and the turnover number of a bean coil what allows controlling a part of a genome in a particular plant genotype. On the basis of the method of saturation crosses, a new population called Narechena Pivnochi has been developed.