

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение  
высшего профессионального образования  
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ»

**СОВРЕМЕННЫЕ ГЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ  
В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ**

Методические указания

по проведению практических занятий  
для аспирантов по направлению: 06.06.01 – биологические науки

Краснодар, 2015

Составитель: С.В. Гончаров

Современные генные технологии в селекции растений: метод. указания по проведению практических занятий / сост. С.В. Гончаров. – Краснодар, 2015. – 19 с.

В методических указаниях изложены основные вопросы по проведению практических занятий аспирантов направления: 06.06.01 – биологические науки

Рассмотрено и одобрено методической комиссией агрономического факультета Кубанского государственного аграрного университета, протокол № \_\_\_\_ от \_\_\_\_ . \_\_\_\_ . 2015г.

Председатель  
методической комиссии

В.П. Василько

© Гончаров С.В., 2015  
© ФГБОУ ВПО «Кубанский  
государственный аграрный  
университет», 2015

## Содержание

1 Цель и задачи дисциплины .....	4
2 Содержание дисциплины.....	5
3. Контрольные вопросы .....	15
4. Основная, дополнительная и нормативная литература .....	18

## **1 Цель и задачи дисциплины**

Целью дисциплины «Современные генные технологии в селекции растений» является формирование знаний и практических навыков в области современной генетики и селекции сельскохозяйственных культур.

Дисциплина «Современные технологии в селекции растений» входит в число специальных учебных дисциплин.

Преподавание дисциплины «Современные генные технологии в селекции растений» строится исходя из требуемого уровня базовой подготовки в области генетики и селекции сельскохозяйственных культур. Конечная цель изучения дисциплины - формирование у обучающихся твердых теоретических знаний и практических навыков по селекционной технологии важнейших сельскохозяйственных культур с учетом их генетических особенностей.

В системе профессиональной подготовки обучающихся в области селекции дисциплина «Современные генные технологии в селекции растений» занимает ведущее место, является одной из профилирующих. Полученные аспирантами знания являются итогом всего обучения по специальности, включающей в себя элементы всех ранее полученных знаний в области генетики, общей селекции, семеноводства и сортоведения.

## 2 Содержание дисциплины

Тематический план практических занятий представлен в таблице 1.

Таблица 1

№ темы лекции	Наименование практического занятия
1	Биохимические и молекулярные маркеры
2	ПЦР
3	Поиск и создание маркеров
4	Основы маркерной селекции
5	Маркерная селекция при создании аналогов
6	Картирование генов QTL
7	Использование QTL в практической селекции
8	Хромосомная инженерия – моносомики, трисомики и нуллисомики
9	Генетическая инженерия
10	ГМО

**Тема 1. Генетика как научная основа селекции растений. Понятие о маркерах. Биохимические и молекулярные маркеры.**

Понятие о селекции и семеноводстве. Связь ее с другими науками. История и этапы развития селекции. Коллекционный, исходный материал и его значимость для практической селекции. Виды исходного материала и

способы его получения (естественные популяции, гибридные популяции, самоопыленные (инцухт) линии, искусственные мутации и полиплоидные формы). Понятие о маркерах. Биохимические и молекулярные маркеры.

## **Тема 2. ПЦР – полимеразная цепная реакция**

Понятие о ПЦР. Методы ПЦР. Методика проведения. Используемые маркеры. Паспортизация сортов. Возможности метода.

Использование в селекции. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является одним из наиболее широко используемых методов молекулярной биологии поскольку она позволяет быстро и с небольшими затратами материальных ресурсов и времени получить более 10 миллионов копий определенной последовательности ДНК, первоначально представленной всего несколькими молекулами.

Стартовым материалом для ПЦР может служить ДНК или РНК из различных источников, например, геномная ДНК, матричные РНК, плазмидная ДНК, клонированная ДНК, сами ПЦР-продукты, ДНК из клинического или архивного материала. Различные модификации метода ПЦР широко используются в различных областях биологии, медицины и криминалистики.

В селекции и семеноводстве сегодня это основной метод паспортизации селекционных достижений, определения генетической чистоты линий и гибридов различных культур, основа маркерной селекции.

Благодаря ПЦР можно надежно установить происхождение семенного материала, установить отцовство, идентифицировать любые органические следы.

Аллель – маркер генетического анализа. Геномика "видит" аллель как маркер физический – один из альтернативных вариантов последовательности нуклеотидов данного локуса. ДНК маркер это одновременно маркер и генотипа и фенотипа (как наблюдаемый вариант последовательности нуклеотидов).

### **Тема 3. Поиск и создание маркеров**

Использование ДНК маркеров в селекции растений с помощью Маркер Опосредованной Селекции (МОС) может увеличить точность и эффективность селекции и приведет к ускорению создания новых сортов. В мире созданы десятки таких лабораторий, их необходимо создавать и в нашей стране.

Как знание генома модельного объекта помогает найти хозяйственно значимые гены и аллели на растении, важном для сельского хозяйства?

Пример:

В геноме риса найдены ортологи (гомологи) практически для всех генов, выявленных на модельном объекте (арабидопсис), как определяющие устойчивость к болезням или стрессовым условиям среды. Поскольку геном риса секвенирован, то гены риса, выявленные биоинформатически по гомологии с генами арабидопсиса, сразу и без экспериментальной работы точно ложатся на физическую и генетическую карту риса, и сразу доступны в клонированном виде, поскольку их рек ДНК из конкретной пробирки была использована для сиквенса.

### **Тема 4. Основы маркерной селекции**

Marker assisted selection (MAS) = Маркер Ориентированная Селекция (МОС). Преимущества в сравнении с традиционным скринингом по фенотипу.

Однотипна для всех видов, индивидов и локусов. Экономит время, усилия и ресурсы. Неразрушающий метод анализа. Данные для отбора м.б. получены из любой ткани и на любой стадии развития. Возможность удаления всех нецелевых индивидов и сохранения только целевых для дальнейшей работы после анализа (напр. на этапе проростков). Возможность отбора единичного растения и точное определение его генотипа, включая гомо или гетерозиготность.

20 программ MAS в США идут с 2001 года

## **Тема 5. Маркерная селекция при создании аналогов**

Создание аналогов – неотъемлемая часть селекционной работы. Одна из самых рутинных и длительных процедур (занимает от трех лет при получении двух поколений за год до 6 лет и более) – осуществляется при помощи возвратных скрещиваний. Единственный метод селекции, дающий гарантированный результат. Применяется при создании стерильных аналогов, аналогов восстановителей фертильности, а также для придания существующему сорту (линии, гибриду) нового (обычно моногенного) признака, чаще всего устойчивости к какому-либо патогену или признака качества.

Использование маркера позволяет в самом простом случае (при наличии одного маркера – маркера гена переносимого признака) контролировать наличие нужного гена на ранних стадиях развития, выбраковывая ненужные особи сразу, и таким образом значительно уменьшив выборку и объем работ в целом.

Использование значительного количества маркеров, маркирующих большую часть генома сорта-реципиента, позволяет в принципе ограничиться двумя беккроссами и просто выбрать нужный вариант из большой выборки. В этом случае создание аналога может быть осуществлено за год-два.

## **Тема 6. Картирование генов QTL**

Полимерное взаимодействие генов (полимерия) – тип неаллельного взаимодействия генов, при котором разные локусы (гены) производят одинаковый или сходный фенотипический эффект. Такие гены, в свою очередь, называют полимерными и обозначают одной латинской буквой с указанием индекса для разных генов:  $A_1$ ;  $A_2$ ;  $A_3$  и т.д.

Полимерия делится на два класса – кумулятивная полимерия (при которой степень проявления признака зависит от количества доминантных полимерных генов, так как их действие суммируется) и некумулятивная полимерия, при которой достаточно одной доминантной аллели любого из генов, чтобы вызвать развитие признака.



Примером некумулятивного действия полигенов может служить наследование формы плода (стручка) у пастушьей сумки. У этого вида обычно встречаются растения с треугольной и очень редко – с яйцевидной формой плода. От скрещивания этих форм между собой в  $F_1$  появляются растения, плоды у которых треугольной формы, а в  $F_2$  наблюдается расщепление в отношении 15 : 1, так как яйцевидную форму стручка будет иметь единственный генотип из 16 в решетке Пеннета, не имеющий ни одной доминантной аллели ( $a_1a_1a_2a_2$ ), а остальные 15/16 растений будут формировать стручки треугольной формы.

При тригибридном скрещивании расщепление при некумулятивной полимерии будет 63 : 1 (так как тригибрид будет давать восемь классов гамет, то решетка Пеннета будет состоять из 64 ячеек).

Действие полимерных генов при некумулятивной полимерии фактически определяет формирование привычных для нас по предыдущим главам альтернативных признаков. Такие признаки в генетике называются качественными. Цветок, например, может быть либо красным, либо белым (при неполном доминировании появляются еще и розовые цветки), и четко различаются между собой.

Однако такие четко различимые альтернативные формы существуют не для всех признаков. Признаки, которые можно измерить, подсчитать, взвесить называются количественными. Они контролируются многими генами, которые действуют суммирующе, эквивалентно. Примерами таких признаков могут служить высота растений, количество и масса плодов или семян, продолжительность вегетационного периода, длина колоса или метелки.

Для таких признаков характерна *непрерывная* изменчивость. Непрерывная изменчивость обусловлена, во-первых, *взаимодействием* между различными генами и, во-вторых, взаимодействием между генами и окружающей средой (генотип  $\times$  среда).

Генетикой количественных признаков, к которым относятся большинство хозяйственно полезных занимается биометрическая генетика, широко использующая методы статистики.

Разделение на количественные и качественные признаки может быть достаточно условно. Например, если можно четко определить каждое

растение в потомстве как карликовое, нормальной высоты или гигантское, можно анализировать признак «высота растения» как качественный, если нет и высота каждого растения будет выражена в сантиметрах – то как количественный.

При кумулятивной полимерии приходится иметь дело с количественными признаками, и степень выраженности признака зависит от количества доминантных аллелей любого из полимерных генов. По такому типу наследуются в основном все количественные признаки: высота растения, длина колоса, метелки или початка, урожайность, содержание белка или жира.

Изучая наследование перечисленных признаков, можно заметить, что  $F_1$  характеризуется промежуточным фенотипом, а в  $F_2$  образуется непрерывный вариационный ряд по внешнему проявлению данного признака, то есть нельзя выделить четких фенотипических классов, как при наследовании альтернативных признаков (красная или белая окраска цветка, гладкие или морщинистые формы семян у гороха).

Изменчивость количественного признака в отличие от альтернативного оценивается амплитудой его варьирования.

Рассмотрев составленную ранее решетку Пеннета с позиций кумулятивной полимерии, обнаружим, что классы с самой высокой ( $A_1A_1A_2A_2$ ) и самой низкой степенью проявления признака ( $a_1a_1a_2a_2$ ) составляют по 1/16 общего объема выборки каждая. При этом выделяются еще три класса: 4/16 составляют особи с тремя доминантными аллелями ( $A_1A_1A_2a_2$  и  $A_1a_1A_2A_2$ ), 6/16 – с двумя доминантными аллелями ( $A_1A_1a_2a_2$ ;  $a_1a_1A_2A_2$  и  $A_1a_1A_2a_2$ ) и оставшиеся 4/16 – с одной доминантной аллелью ( $A_1a_1a_2a_2$  и  $a_1a_1A_2a_2$ ). Если построить гистограмму, отражающую характер изменчивости при кумулятивной полимерии, мы получим грубое подобие колоколообразной кривой, при этом с увеличением числа действующих полимерных генов она будет приближаться к идеальной.

Кумулятивная полимерия убедительно описывает наследование многих количественных признаков. Непрерывная изменчивость объясняется большим количеством полимерных генов, контролирующих признак, а также малым эффектом действия каждой отдельной аллели, что приводит к сглаживанию границ между классами.

В основе большинства селекционных программ, направленных на увеличение или уменьшение количественных признаков, лежит идея получения трансгрессий – выщепления в потомстве гибридов особей с более сильным или слабым проявлением количественных признаков. Явление трансгрессии характерно для кумулятивной полимерии.

Таким образом, если скрещиваются две родительские формы, обладающие в равной степени каким-нибудь желательным признаком, то в результате расщепления в потомстве могут образовываться формы, превосходящие обоих родителей по этому признаку. Частота трансгрессивных форм зависит от числа полигенов, контролирующего признак: чем больше генов – тем меньше трансгрессивных форм.

Отрицательные трансгрессии нужны при селекции на сокращение вегетационного периода, высоты растений и т.д., положительные – в селекции на повышение урожайности, массы 1000 семян, колоса, содержания белка и других полезных веществ.

## **Тема 7. Использование QTL в практической селекции**

На современном этапе развития генетики широко используются QTL – ДНК-маркеры генов количественных признаков. При этом селекция на повышение урожайности строится по принципу маркерной селекции.

Сначала осуществляют поиск локусов количественных признаков в расщепляющихся популяциях. После их обнаружения и картирования возможно использование принципов маркерной селекции для повышения урожайности.

Сложность работы заключается в необходимости контролировать огромное число локусов одновременно. Это возможно только на современном высокопроизводительном оборудовании.

## **Тема 8. Хромосомная инженерия – моносомики, трисомики и нуллисомики**

Отдаленная гибридизация (межродовые скрещивания). В селекции пшеницы используют межродовую гибридизацию. Еще на полях бывшей

Саратовской опытной станции были обнаружены гибриды от спонтанного скрещивания пшеницы и ржи. Был районирован сорт пшеницы яровой мягкой Лютесценс 230, полученный от скрещивания с рожью. В настоящее время в селекции пшеницы широко используют ржано-лшеничную транслокацию *1B/1R*, полученную от ржи через так называемый «тритикальный мостик», т. е. в результате тритикально-пшеничных скрещиваний (*AABBDD* × *AABBRR*, *AABB* × *AABBRR*).

Большой размах в 60—70-е годы XX в. приобрели работы по скрещиванию пшеницы мягкой и пырея [*E. intermedia* (Host) Nevski, *E. elongata*]. Под руководством Н. В. Цицина был создан ряд сортов — пшенично-пырейных гибридов: ППГ 599, ППГ 186 (озимые), Восток и др.

Пшеницу скрещивают также с различными видами эгилопса, элимусом, хайнальдией. Гибридизация с видами, отличающимися по числу хромосом от пшеницы, которые к тому же негомологичны ее хромосомам, в конечном счете приводит в результате расщепления к исходным родительским формам (то же наблюдается при межвидовых скрещиваниях внутри рода *Triticum*, если геномы родителей различны). Этот процесс ускоряется путем возвратных скрещиваний гибридов с пшеницей для преодоления бесплодия первого поколения и получения в потомстве большого числа форм, уклоняющихся в сторону пшеницы. Скрещивания ведут в расчете на интрогрессию отдельных генов или участка хромосомы родственного вида в геном пшеницы. Однако при гибридизации пшеницы мягкой с пыреем иногда возникают константные 56-хромосомные формы (42 хромосомы пшеницы и 14 хромосом пырея или по 28 хромосом того и другого вида), сочетающие явные признаки двух видов. Среди таких форм отобрана многолетняя пшеница.

Использование анеуплоидии. Получение у пшеницы мягкой (гексаплоидной) моносомных и нуллисомных линий открыло широкие перспективы для использования хромосомной инженерии в селекционных целях. Оказалось возможным замещать у какого-либо сорта пару хромосом гомологичными хромосомами другого сорта и даже хромосомами родственных видов (рожь, эгилопс), добавлять хромосому этих видов к геному пшеницы, а также добиваться путем транслокации включения сегментов хромосом других видов в хромосомы пшеницы.

Наиболее проста схема внутривидового замещения хромосом с использованием нуллисомиков (рис. 1.2). Процедура сводится к скрещиванию нуллисомика сорта-реципиента с донором и серии беккроссов для вытеснения ядерного материала донора с сохранением замещающей хромосомы. Потомство каждого беккросса подвергают цитологическому анализу, чтобы выделить для дальнейшей работы моносомик, который несет замещающую хромосому. Такой же анализ ведут для выделения дисомика с замещающими хромосомами в расщеплении после заключительного самоопыления.

Схема с использованием моносомиков сложнее (см. рис. 1.2), но применяется чаще, так как они более жизнеспособны, чем нуллисомики, у которых нередко проявляется мужская стерильность. При этом способе в расщепляющихся поколениях после каждого скрещивания следует отбирать моносомики, а в потомстве от их самоопыления — дисомики для дальнейшего скрещивания.

Схема может быть упрощена, если вместо моносомиков использовать монотелосомики, т. е. линии, у которых единственная хромосома представлена только одним плечом с центромерой. Это дает возможность распознать ее при цитологическом анализе и исключает необходимость самоопыления моносомиков в потомстве каждого скрещивания (см. рис. 1.2).

Замещение хромосом пшеницы мягкой хромосомами родственных видов осуществляют в два этапа. Вначале пару хромосом другого вида добавляют к хромосомному набору пшеницы, а затем производят замещение. Первый этап складывается из скрещивания пшеницы и другого вида и получения амфидиплоида путем удвоения числа хромосом гибрида. Затем скрещивают амфидиплоид с исходной формой пшеницы. В  $f_1$  родственной пшенице вид представлен гаплоидным набором хромосом. При самоопылении можно отобрать растения с одной чужеродной хромосомой, а при самоопылении последних — с гомологичной парой. На этом первый этап заканчивается: линия с добавлением хромосом получена. Далее опыляют нуллисомик той же линии пыльцой линии с добавлением. В расщеплении могут быть отобраны растения, у которых отсутствующая пара хромосом нуллисомика замещена парой хромосом чужеродного вида.

Линии пшеницы с добавлениями хромосом могут иметь самостоятельное селекционное значение. Однако следует иметь в виду, что дополнительные хромосомы при репродуцировании склонны к элиминации. Замещение пары хромосом пшеницы парой хромосом другого вида ведет к сильным фенотипическим изменениям, во многом неблагоприятным с хозяйственной точки зрения. Гораздо более желателен обмен небольшого участка хромосомы пшеницы на сегмент хромосомы чужеродного вида, несущий ценные гены (транслокация). Этого можно добиться, используя для второго этапа замещения не нуллисомик той же линии, к хромосомам которой добавлена пара чужеродных хромосом, а моносомик. Тогда можно получить растения, у которых одна хромосома пшеницы сочетается с чужеродной. Если они частичные гомологи (гомеологи), то возможна транслокация хромосомных сегментов. Затем отбирают растения с такой транслокацией.

При использовании облучения вероятность транслокаций увеличивается. Она возрастает и в результате устранения хромосомы *5B*. Описанными методами были получены формы пшеницы мягкой, в хромосомы которых включены сегменты чужеродных видов, содержащие гены устойчивости к таким болезням, как бурая и желтая ржавчина, мучнистая роса. К таким формам относятся Трансфер, созданный известным американским генетиком Э. Сирсом, в одну из хромосом которой включен сегмент хромосомы *A. umbellulata*, Трансек — с сегментом ржи и др.

## **Тема 9. Генетическая инженерия**

Генетическая инженерия – совокупность техник, позволяющих направленно изменять генотип живого организма путем встраивания в его геном чужеродных генов. Эти гены могут быть искусственно синтезированы или взяты от других организмов, скрещивания с которыми обычным путем невозможны.

Организм, полученный с помощью генной инженерии, называется генетически модифицированным (ГМО). Целью создания ГМО является улучшение сельскохозяйственных растений, животных и микроорганизмов, невозможное методами традиционной селекции.

На сегодняшний день созданы генетически модифицированные сорта растений, устойчивые к системным гербицидам, вредителям и болезням, которые занимают очень существенные площади в мировом земледелии.

## **Тема 10. ГМО**

### Основные этапы создания ГМО:

1. Получение изолированного гена.
2. Введение гена в вектор для переноса в организм.
3. Перенос вектора с геном в модифицируемый организм.
4. Преобразование клеток организма.
5. Отбор генетически модифицированных организмов и устранение тех, которые не были успешно модифицированы.

Чтобы встроить ген в вектор, используют ферменты — рестриктазы и лигазы. С помощью рестриктаз ген и вектор можно разрезать на кусочки. С помощью лигаз такие кусочки можно «склеивать», соединять в иной комбинации, конструируя новый ген или заключая его в вектор.

Техника введения генов в бактерии была разработана на основе бактериальной трансформации, открытой Ф. Гриффитом, в ходе которой осуществляется обмен плазмидами (небольшими фрагментами хромосомной ДНК). Плазмидные технологии легли в основу введения искусственных генов в бактериальные клетки. Для введения готового гена в наследственный аппарат клеток растений и животных используется процесс трансфекции.

### **3. Вопросы для контроля.**

1. Понятие о семеноводстве, селекции, сорте.
2. Генетика как научная основа селекции растений
3. Охарактеризовать требования, предъявляемые к сорту производством.
4. Понятие и классификация исходного материала. Ботаническая и

- эколого-географическая классификация, их значение для селекции.
5. Понятие о коллекции, научные основы ее сбора, способы хранения и использования. Понятие об интродукции растений.
  6. Центры происхождения культурных растений.
  7. Маркерная селекция
  8. Маркерная селекция при создании аналогов
  9. ЦМС и ее использование в селекции на гетерозис
  10. Аналоги сортов и линий – методы создания.
  11. Методы скрещиваний: простые (парные, диаллельные) и сложные (тройные, двойные, ступенчатые, возвратные, конвергентные), их сущность, применяемость.
  12. Аналоги сортов и линий – стерильный аналоги, аналоги-восстановители фертильности, аналоги по устойчивости к патогенам и признакам качества.
  13. Модификации метода педигри.
  14. Понятие и классификация полиплоидии, роль в эволюции и селекции.
  15. Автотетраплоидия: получение автотетраплоидов, особенности фенотипа, расщепление, примеры селекционного использования.
  16. Триплоидия: получение триплоидов, особенности фенотипа, примеры использования.
  17. Аллополиплоидия, роль в эволюции, использование в селекции.
  18. Анэуплоидия, роль в эволюции и улучшении культурных растений.
  19. Гаплоидия, роль в эволюции и селекции самоопылителей и перекрестников.
  20. Методы индуцирования гаплоидов и культура пыльников.
  21. Межвидовая гибридизация, понятие, задачи, использование.
  22. Причины нескрещиваемости видов, пути их преодоления.
  23. Особенности расщепления межвидовых гибридов.
  24. Хромосомная инженерия при межвидовой гибридизации.
  25. Хромосомная инженерия при внутривидовой гибридизации.
  26. Понятие об оценке селекционного материала.
  27. Классификация методов оценки.
  28. Гены количественных признаков.



29. Картирование QTL-генов.
30. ПЦР-анализ.
31. ГМО.
32. Генетическая инженерия.
33. Методы генетической трансформации.
34. Основные принципы селекции и оценки сортов на устойчивость к вредителям.

#### **4. Основная, дополнительная и нормативная литература**

##### **Основная литература:**

1. Сорты и гибриды Краснодарского НИИСХ им. П.П. Лукьяненко. – Краснодар, 2015
2. Каталог – сорта и гибриды масличных культур, технологий возделывания и средств механизации – ВНИИМК. Краснодар, 2015 г.
3. Пыльнев В.В., Коновалов Ю.Б., Хупацария Т.И. Частная селекция полевых культур. – М.: Колосс, 2005 г., 552 с.
4. Гуляев Г.В. Частная селекция полевых культур. – М.: Колос, 2007

##### **Дополнительная литература:**

1. Романенко А.А., Беспалова Л.А., Кудряшов И.Н., Аблова И.Б. Новая сортовая политика и сортовая агротехника озимой пшеницы. – Краснодар, 2005
2. **Журналы:** «Селекция и семеноводство», «Масличные культуры», «Зерновое хозяйство России».

## **СОВРЕМЕННЫЕ ГЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ**

Методические указания

Составитель: Гончаров Сергей Владимирович

Подписано в печать \_\_\_\_\_ формат 60x84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>.

Усл. печ. л. – 1,04. Уч.-изд. л. – 0,07

Тираж 50 экз. заказ № \_\_\_\_\_

Типография Кубанского государственного аграрного  
университета.

350044, г. Краснодар, ул. Калинина, 13