

УДК 591

МЕТОД ЗАКРЕПЛЕНИЯ ГЕТЕРОЗИСНОГО ЭФФЕКТА – РЕАЛИЗАЦИЯ НА РАСТЕНИЯХ (К СТОЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ В.А. СТРУННИКОВА)

© 2014 г. Ю. К. Гончарова

*Всероссийский научно-исследовательский институт риса
350921, Краснодар, Краснодарский край, пос. Белозерный
E-mail: serggontchar@mail.ru*

Поступила в редакцию 07.07.2014 г.
Окончательный вариант получен 10.07.2014 г.

Статья посвящена 100-летию со дня рождения выдающегося российского ученого с мировым именем Владимира Александровича Струнникова. Академика РАН, профессора, заведующего группой цитологии развития и регуляции пола Института биологии развития им. Н.К. Кольцова, руководителя генетических исследований на тутовом шелкопряде в ряде шелководческих институтов СНГ. Лауреата Государственной премии СССР (1981), Героя Социалистического Труда (1990), награжденного золотой медалью им. И.И. Мечникова АН СССР (1981). Создателя теории объясняющей происхождения гетерозиса и судьбе одного из наиболее значительных его достижений: “Методики закрепления гетерозисного эффекта”. Которая позволяет не только отказаться от производства гибридных семян и повысить урожайность многих культур на 20–50%, фиксирование комплексов генов, определяющих гетерозисный эффект, станет тем “трамплином”, который позволит на базе нового поколения сортов создавать еще более урожайные гетерозисные гибриды. В ГНУВНИИ риса показана эффективность метода на растительных объектах на организменном и молекулярном уровнях, разработана модификация метода позволяющая сократить его трудоемкость и эффективность.

DOI: 10.7868/S0475145014060044

15.07.2014 года исполнилось 100 лет со дня рождения академика Владимира Александровича Струнникова. Его долгая, богатая событиями жизнь в яркой художественной форме описана им самим (Струнников В.А., 2004). Достижения В.А. Струнникова в генетике и в практической селекции трудно переоценить. Он работал во многих направлениях и вопреки тысячам препятствий на его пути в каждом из них добивался успеха. Читал лекции по генетике, когда она была запрещена. Первый раз защитил кандидатскую диссертацию в 1947 г., второй – через пять лет. Повторная защита понадобилась потому, его и жену (она тоже была генетиком, селекционером), лишили уже защищенных кандидатских степеней, а заодно и ученых званий за отказ принять лысенковское “учение”. Жену к тому же уволили с работы, а его, в связи с крупными научными достижениями оставили... на должности младшего научного сотрудника. Во время войны, был ранен, в плену чудом остался жив. Защитил докторскую диссертацию во время “разгула лысенковщины”. Как он сам рассказывал: “Материала, не имеющего прямого отношения к ней, вполне хватало для диссертации. Однако у меня возникла дерзкая мысль открыто включить все генетиче-

ские исследования – с описанием и обозначением хромосом, генов и комбинаторики их передачи потомкам. Это был бы вызов Лысенко. Я решил на этот рискованный шаг и даже надеялся на успех, чувствуя проявления у лысенковцев не то страха, не то осторожности. Правда, одно из основных направлений работы – выведение маркированных по полу пород – было поручено мне Советом Министров СССР и Академией наук, и возражать против этого не осмелились ни Лысенко, ни ВАСХНИЛ, хотя такую новость встретили с ненавистью. В своем институте я защитил диссертацию успешно, а потом ВАК присудила докторскую степень даже без рецензирования, на основании 68 положительных отзывов, поступивших в комиссию” (Белянова Л.П., 2004).

С одним из наиболее значительных его достижений, методом закрепления гетерозисного эффекта, проблемы не решаются и до сегодняшнего дня. Огромная экономическая значимость гетерозиса очевидна всем. Закрепление гетерозисного эффекта позволит не только отказаться от производства гибридных семян и повысить урожайность многих культур на 20–50%, фиксирование комплексов генов, определяющих гетерозисный эффект, станет тем “трамплином”, который позволит

на базе нового поколения сортов создавать еще более урожайные гетерозисные гибриды. Патент и несколько статей, доказывающие эффективность метода закрепления гетерозиса, В.А. Струнников опубликовал еще в 1999–2003 гг. Они не подвергаются сомнению ни в печати, ни в устных выступлениях. Правлением Совета по генетике и селекции проверена эффективность на коммерческих гибридах тутового шелкопряда, во ВНИИ риса показана его эффективность на растительных объектах. Но реализация этого метода из-за недостатка финансирования продвигается очень медленно.

К сожалению, на судьбе изобретения пагубно сказался развал науки в России. Сразу после опубликования статей на русском и английском языках о способе закрепления гетерозиса и российском патенте на него американские и китайские фирмы сообщили, что заинтересованы в этом изобретении, но переговоры о его использовании возможны только после патентования во всех странах мира, занимающихся возделыванием зерновых. Согласие на широкое патентование авторы от Академии не получили. Следовательно, за использование изобретения России не скажут даже вежливого “Спасибо”.

Теоретическим базисом изобретения являются разработки В.А. Струнникова о природе гетерозисного эффекта. Остается надеяться на то, что “благоприятные времена для изобретательства в нашей стране”, о которых мечтал Владимир Александрович, уже настали и его изобретения еще послужат отечеству.

Мы хотели бы в этой статье рассказать о работах по подтверждению эффективности методики закрепления гетерозиса, предложенной Струнниковым, на растительном объекте – рисе (*Oryza sativa* L.) проведенных во ГНУВНИИ риса. Начаты эти работы были в 2003 году под его руководством и продолжают по сей день.

У гибридов риса на экспериментальных участках наблюдают гетерозис над средним родителем более 100%, в среднем в производстве гибриды превосходят по продуктивности сорта традиционной селекции на 30–40%, кроме того, они часто более адаптивны и устойчивы к болезням (Yuan L.P. 2002; Гончарова Ю.К., 2013). Однако в России гибриды производятся по технологиям, применяемым за рубежом, не могут из-за низкого выхода гибридных семян в следствие неустойчивых погодных условий во время цветения и отсутствия дешевой рабочей силы. Следовательно, необходимо было искать альтернативные пути использования гетерозисного эффекта. Но для их поиска нужно понимание его природы.

Анализ работ о генетическом базисе гетерозиса показывал, что природа гетерозисного эффекта у растений одна. По всем культурам есть сообщения как о межallelельных, так и о межгенных

взаимодействиях, определяющих гетерозисный эффект (Xiao J.H. et al., 1995; Meitzel, 2009). Понятно, что в большинстве случаев работают скоординированные комплексы генов, моногенный гетерозис также возможен, хотя и в этом случае ген может быть регуляторным (например мощным энхансером), определяющим эффективную работу целого комплекса генов.

В.А. Струнниковым в 1999 году предложена теория, которая позволяла объяснить природу гетерозиса, и ответить на основные вопросы гетерозисной селекции: как создаются комплексы генов, обеспечивающие проявление гетерозисного эффекта, и как можно “закрепить” гетерозисный эффект в последующих поколениях (Струнников В.А., 1994; Струнников В.А., 2000; Струнникова Л.В., Патент; Струнников В.А., 2003). Согласно теории природы гетерозиса В.А. Струнникова гетерозис возникает в результате двух главных причин: первая – интеграция в генотипе гибрида большого количества скоординированных в своем действии благоприятных генов, контролирующих жизнеспособность; вторая – переход в гетерозиготное состояние не всех генов генотипа, а только рецессивных леталей, полулеталей и субвиталей. Следовательно, для “закрепления гетерозисного эффекта” или другими словами сохранения комплекса генов, его определяющих, в последующих поколениях необходимо очистить генотип исходного гибрида от леталей и полулеталей и в тоже время сохранить аллели, повышающие жизнеспособность и продуктивность. Для этого он же предложил использовать создание гомозиготных особей на основе генотипа гетерозисного гибрида (Струнникова Л.В., Патент). Для получения гомозиготных особей (дигаплоидных линий) у растений используют культуру пыльников. Получение дигаплоидных линий через культуру пыльников связано с очень значительными трудностями, так как требуется специфическая предварительная обработка материала, подбор соответствующих сред, и т.д. Но даже при соблюдении всех оптимальных условий выход дигаплоидных линий в большинстве случаев не превышает 0.5% от посаженных на среду пыльников. Различия по количеству получаемых растений в культуре пыльников обусловлены генетически. И хотя у многих культур локализованы гены, повышающие отзывчивость генотипов на культуру пыльников, столь низкую выживаемость растений нельзя объяснить наличием небольшого количества генов, ее определяющих. Известно, что в пыльцевом зерне работают более 30% генов растения. На жизнеспособность генотипа в культуре пыльников влияет весь комплекс генов. Генотипы с комплексом генов, повышающих общую жизнеспособность организма и устойчивость к стрессам (каким и является культура пыльников), имеют значительные преимущества при культивирова-

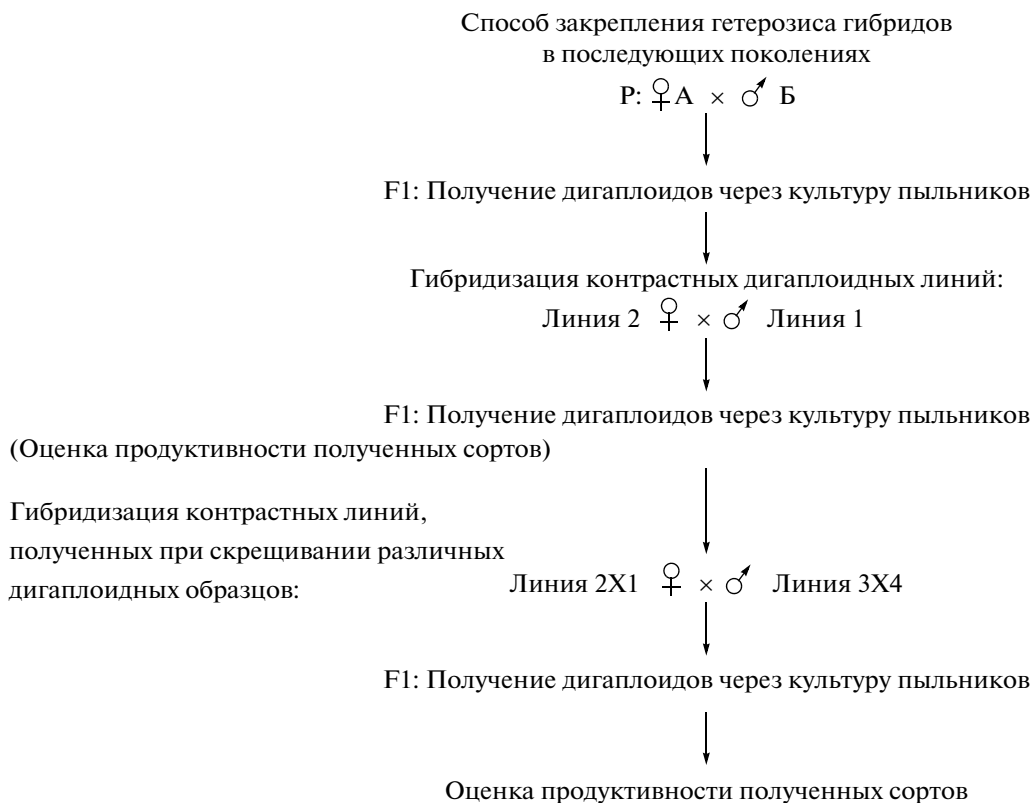


Рисунок.

нии. Пыльца растений содержит гаплоидный набор хромосом, но при культивировании пыльников иногда происходит спонтанное удвоение числа хромосом и появление гомозиготных организмов (дигаплоидных линий).

Гетерозис возникает при гибридизации особей, в генотипах которых сформировались комплексы генов, повышающих жизнеспособность. Такие комплексы генов формируются у родительских форм в противовес наличию леталей и полулеталей в генотипе (Струнников В.А., 2003). Следовательно, гетерозисный гибрид должен нести гены, снижающие жизнеспособность. Удалить эти гены из генотипа гибрида можно за счет рекомбинации. Сам процесс мы контролировать не можем, но в условиях стресса (в нашем случае культуры пыльников) выживает только та часть потомства гибрида, которая унаследовала от него большую часть благоприятных генов. Гомозиготные организмы, в генотипе которых содержится много леталей, полулеталей и субвиталей, в подавляющем большинстве погибают на ранних стадиях развития. Выживают только те особи, которым в результате мейоза не досталось, или досталось очень мало вредных генов. На организменном и молекулярном уровне нами получены данные о том, что при получении дигаплоидов в культуре происходит очищение исходного гибри-

да от леталей и полулеталей, принесенных родительскими формами (Гончарова Ю.К. и др., 2010; Goncharova Y.K. et al., 2009; Goncharova J.K., 2010; Гончарова Ю.К., 2013; Goncharova J.K., 2012).

Комплекс генов, определяющих гетерозис, распределяется по популяции получаемых на основе генотипа гибрида дигаплоидных линий. И задачей селекционера становится объединение лучших аллелей в одном генотипе для создания сорта с продуктивностью, аналогичной гетерозисному гибриду, который использовали для получения гомозиготных особей. Для закрепления гетерозисного эффекта Струнниковым В.А. было предложено проводить возвратные скрещивания гибридов с дигаплоидными линиями, полученными из пыльцы гетерозисного гибрида. Гибридизация особей, хотя бы одна из которых лишена вредных генов в гомозиготном и гетерозиготном состояниях, приводят к возникновению потомства, в генотипе которого также не может быть полулеталей в гомозиготном состоянии. Это и наличие большого числа генов модификаторов позволяет не только сохранить, но даже и усилить гетерозис по всех последующих беккроссных поколениях. Число вредных генов в каждом новом беккроссном поколении уменьшается вдвое по сравнению с предыдущим поколением.

Однако способ закрепления гетерозиса гибридов в последующих поколениях, предложенный В.А. Струнниковым, был достаточно трудоемким. Его реализация требует проведения 5–6 возвратных скрещиваний между дигаплоидом и исходной особью, то есть растением гетерозисного гибрида, пыльцу которого использовали для получения популяции дигаплоидных растений. Для проведения возвратного скрещивания необходимо поддерживать жизнеспособность гибрида в течение нескольких его обычных жизненных циклов, например для риса период его вегетации 3–5 месяцев, после чего растения погибают. Для удаления летальных и полулетальных генов, а также сохранения комплекса генов, определяющего гетерозисный эффект, необходимо получить гибрид между дигаплоидом и исходным растением гетерозисного гибрида, от которого получали пыльцу для создания дигаплоидов. Получение дигаплоидов требует продолжительного времени от 7 месяцев, цикл вегетации исходного растения к этому времени уже закончен и оно очень ослаблено. Гибридизация дигаплоидов на ослабленные материнские растения приводит к очень низкой завязываемости и жизнеспособности гибридных семян, а эта процедура повторяется 5–6 раз.

Нами предложена модификация метода, в которой повышается эффективность процесса восстановления комплекса генов исходного гибрида и удаления из его генотипа полулетальных, а также неэффективно действующих генов, приводящих к снижению продуктивности в последующих поколениях, уменьшается продолжительность процесса (Гончарова Ю.К., Патент).

Для закрепления гетерозисного эффекта по предлагаемому нами способу получают популяцию дигаплоидных линий из пыльцы гетерозисного гибрида (рисунок).

Оценивают их продуктивность и жизнеспособность, выделяют для дальнейшей работы наиболее продуктивные дигаплоидные линии. Для восстановления комплекса генов исходного гибрида проводят гибридизацию генотипически контрастных дигаплоидных линий, при этом в гибридизацию включают только наиболее продуктивные дигаплоидные линии.

Контрастность дигаплоидных линий оценивают по комплексу признаков морфологических, физиологических, биохимических, молекулярных маркеров (SSR, SNP, и т.д.), по вкладам генетических систем в продуктивность образца, и по совокупности всех предложенных методов.

В результате гибридизации различных дигаплоидных линий между собой, а не с исходным гибридом, происходит объединение “лучших” генов, обуславливающих высокую продуктивность исходного гибрида и, следовательно, восстановление комплекса генов, определяющих гетерозисный эффект, которые были распределены при

кроссинговере и получении дигаплоидов по различным образцам. Это дает возможность отказаться от продолжительного и очень сложного поддержания жизнеспособности растения (в течение нескольких обычных его жизненных циклов) исходного гибрида и избежать проблем, связанных с получением от него потомства.

Включение в гибридизацию только наиболее продуктивных дигаплоидных линий позволяет отбраковать образцы, сохранившие или получившие во время культивирования на питательной среде летальные, полулетальные и сублетальные гены, и тем самым, обеспечить более эффективное очищение генотипа исходного гибрида. Выделение контрастных дигаплоидных линий, позволяет выявить образцы, несущие различные гены, определяющие гетерозисный эффект, и в результате обеспечивает ускорение процесса их накопления в создаваемом генотипе.

Для успешного массового применения методики закрепления гетерозиса необходимо дальнейшее совершенствование методов получения дигаплоидов, значительное сокращение периода от высадки пыльников на среду до получения регенерантов, а также получение большего процента регенерации зеленых почек и растений в каждой гибридной комбинации, совершенствование методов генотипирования образцов (SNP маркирование, геномная селекция).

С использованием разработанной методики в период с 2010 по 2014 гг. нами были получены и переданы на госсортоиспытание сорта риса: длиннозерный – Ивушка; крупнозерный – Крепыш; среднезерный – Привольный – 4; среднезерный с окрашенным перикарпом (черный) – Мавр; длиннозерный с окрашенным перикарпом (черный) – Гагат; короткозерный с окрашенным перикарпом (красный) – Рыжик). Работа по созданию сортов риса с закрепленным гетерозисом с использованием методики Струнникова В.А. продолжается и мы надеемся, что в ближайшем будущем такая работа станет традиционной и для селекции других культур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Струнников В.А. Шелковый путь. М.: Наука, 2004. 276 с.
- Белянова Л.П. Ожидаю новых результатов. Природа, 2004. № 8.
- Yuan L.P. Future outlook on hybrid rice research and development // Abstracts 4th International Symposium on Hybrid rice. Hanoi. Vietnam. 2002. p. 3.
- Гончарова Ю.К. Использование культуры пыльников в селекции риса / Ю.К. Гончарова // Краснодар. 2013. 91 с.
- Xiao J.H., Li J.M., Yuan L.P., Tanksley S.D. Dominance is the major genetic basis of heterosis in rice as revealed by QTL analysis using molecular markers // Genetics. 1995. V. 140. P. 745–754.

- Yu S.B., Li J.X., Xu C.G., Tan Y.F., Gao Y.J., Li X.H., Zhang Q., Saghai Maroof M.A.* Importance of epistasis as the genetic basis of heterosis in an elite rice hybrid // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. P. 9226–9231.
- Zhao M.F., Li X.H., Yang J.B., Xu C.G., Hu R.Y., Liu D.J., Zhang Q.* Relationship between molecular marker heterozygosity and hybrid performance in intra- and inter-specific crosses of rice // *Plant Breed.* 1999. V. 118. P. 139–144.
- Hua J.P., Xing Y.Z., Xu C.O., Sun X.L., Yu S.B., Zhang Q.* Genetic dissection of an elite rice hybrid revealed that heterozygotes are not always advantageous for performance // *Genetics.* 2002. V. 162. P. 1885–1895.
- Abel S.* The effect of fixed heterosis in allopolyploid plants and implications for rape seed hybrid breeding / S. Abel, H.C. Becker // *International Conference on heterosis in Plant: Genetic and molecular causis and optimal exploitation in breeding.* 2009. P. 56–57.
- Dani Zamir.* Genes that drive heterosis / Dani Zamir, Uri Krieger, Zachary Lippman // *International Conference on heterosis in Plant: Genetic and molecular causis and optimal exploitation in breeding.* 2009. P. 34.
- Meitzel Tobias.* Molecular physiology and genetics of seed heterosis in the model “*Vicia faba* L.” / Meitzel Tobias, Ruslana Radchuk, Wolfgang Link, Hans Weber // *International Conference on heterosis in Plant: Genetic and molecular causis and optimal exploitation in breeding.* 2009. P. 167.
- Струнников В.А.* Природа гетерозиса и новые методы его повышения. М.: Наука, 1994. 108 с.
- Струнников В.А., Струнникова Л.В.* Природа гетерозиса, методы его повышения и закрепления в последующих поколениях без гибридизации // *Известия АН. Серия биологическая.* 2000. № 6. С. 679–687.
- Патент на изобретение № 2153253, Струнникова Л.В.; Струнников В.А., Способ закрепления гетерозиса гибридов в последующих поколениях / Дата приоритета 11.06.1999, опубликовано 27.07.2000.
- Струнников В.А., Струнникова Л.В.* Гетерозис можно закрепить в потомстве, Природа. 2003. № 1. С. 3–7.
- Гончарова Ю.К., Харитонов Е.М., Литвинова Е.В.* Природа гетерозисного эффекта // *Доклады РАСХН.* 2010. № 4. С. 10–12.
- Goncharova Y.K., Kharitonov E.M., Gronin V.V.* Removing of half-lethal genes from genotypes of heterosis hybrids is method which will give the possibility to raise radically the yield potential of crop // *3rd International Rice Congress and 28th International Rice Research Conference.* Hanoi.Vietnam. 2009. P. 4110.
- Goncharova J.K.* Creating varieties by fixing the heterosis effect in rice hybrids // *Accelerating Hybrid rice development.* Los Banos (Philippines): International Rice Research Institute. 2010. P. 109–117.
- Гончарова Ю.К.* Селективная элиминация аллелей при получении дигаплоидных линий в культуре пыльников риса / Ю.К. Гончарова // *Генетика.* 2013. Т. 49. № 2. С. 196–203.
- Goncharova J.K.* Molecular markers as the mechanism of fixing genes complex defining heterotic effect / J.K. Goncharova, E.M. Kharitonov // *Journal Science MED.* 2012. V. 3. T. 3. С. 235–238.
- Патент на изобретение № 2465771, Способ закрепления гетерозиса гибридов в последующих поколениях / Гончарова Ю.К., Харитонов Е.М. Дата приоритета 13.07.2011, опубликовано 10.11.2012. Бюл. № 31.

Method of Fixing the Heterotic Effect—Implementation on Plants (on the Hundredth Anniversary of the Birth of V.A. Strunnikov)

Yu. K. Goncharova

All-Russia Rice Scientific Research Institute, Krasnodar, 350921 Russia

e-mail: serggontchar@mail.ru

Received July 7, 2014; in final form, July 10, 2014

Abstract—The article is devoted to the 100th anniversary of the outstanding world-renown Russian scientist Vladimir Alexandrovich Strunnikov, Academician, Professor, Head of Group of Developmental Cytology and Sex Regulation at Koltzov Institute of Developmental Biology and Head of genetic studies on silkworms in a number of sericulture institutes in CIS. Laureate of the State Prize of the USSR (1981), Hero of Socialist Labor (1990), awarded the I.I. Mechnikov Gold Medal, Academy of Sciences of the USSR (1981), founder of the theory explaining the origin of heterosis. One of his most significant achievements is the “Methods of Fixing the Heterosis Effect,” which makes it possible to abandon the production of hybrid seed and increase the yield of many crops by 20–50%. Fixing the gene complexes that determine the heterosis effect will become the “springboard” that will allow obtaining even more productive heterotic hybrids on the basis of new-generation varieties. The efficiency of this method in plant objects at the organismal and molecular levels was shown in the All-Russia Research Institute of Rice. A modification of this method reducing its laboriousness and increasing its efficiency was developed.