**Лекция 2**

**Использование гаплоидии**

**в селекции растений**

Очень перспективны селекционные технологии, осно­ванные на использовании гаплоидов. Поскольку гаплоид имеет только один набор хромосом и поэтому не способен давать семена, удвоение этого набора путем колхицинирования дает гомозиготное плодовитое растение — удво­енный гаплоид. В этом заключается главный интерес селекции к использованию гаплоидов.

Если получить га­плоиды из гамет первого гибридного поколения, а потом перевести их на диплоидный уровень, у самоопылителей отпадает необходимость в повторных отборах с целью до­биться гомозиготности, что часто ускоряет селекционный процесс. Мало того, может быть резко уменьшен объем гибридных популяций для отбора при сохранении той же вероятности отбора ценных генотипов, что и из обшир­ных популяций диплоидов.

Это можно продемонстриро­вать на модели в виде дигибридного скрещивания. Если в F1 получена гибридная гетерозигота АаВК то она обра­зует четыре класса гамет: АВ, Аb, аВ и аb Это и есть генотипы гаплоидов, из которых путем полиплоидизации получаются четыре генотипа диплоидов: ААВВ, ААbb, ааВВ, ааbb. Если нас интересует любой из этих генотипов, то он встречается в популяции со среднеста­тистической вероятностью 1/4. Если же гаплоиды не получать, то при образовании диплоидных зигот гаметы объединятся во всех возможных комбинациях, которые можно усмотреть из решетки Пеннета. Теперь вероятность каждого гомозиготного генотипа будет уже 1/16. Эти ве­роятности соотносятся как 16 к 4. Нетрудно убедиться, что при любом количестве гибридных локусов размер популяции гаплоидов, содержащей требуемый гомозигот­ный генотип или генотипы, будет равен корню квадрат­ному из размера популяции диплоидов, содержащих тот же генотип или генотипы. Если, например, в F2 высевае­тся популяция диплоидов численностью 10 000 расте­ний, то для популяции удвоенных гаплоидов достаточ­но 100 растений.

Сокращение объемов популяции для отбора при ис­пользовании удвоенных гаплоидов доказано практически. Первые сорта, полученные на основе гаплоидии, отобраны из немногочисленных популяций. Так, сорт озимого ячме­ня Минго, полученный в Канаде методом гаплоидной се­лекции, был отобран среди потомства 40 удвоенных гап­лоидов. Сорта ячменя Исток и Одесский 115 полу­чены из подобной по численности популяции удвоенных гаплоидов. Эти сорта выведены за 6 лет, в то время как для обычной селекции требуется 10...12 лет. В России первый сорт ячменя, созданный с использованием удвоен­ных гаплоидов, — Биос 1. В последние годы создан це­лый «шлейф» сортов с помощью данного метода — Эльф, Дворан и др.

Имеется один отрицательный момент использования удвоенных гаплоидов в селекции. Казалось бы, можно провести отбор из первого гибридного поколе­ния удвоенных гаплоидов. Оно, в отличие от гибридов са­моопылителей, полученных на диплоидной основе, раз­нородно и содержит при достаточном объеме весь набор возможных генотипов. Однако отбор из первого поколения невозможен: растения сильно и не в одинаковой степени депрессированы колхицинированием. Так что приходится отбирать уже во вто­ром поколении и не отдельные элитные растения, а семьи.

Применение гаплоидов способно произвести настоя­щую революцию в селекции. Объемы популяций сильно уменьшатся, а вместе с ними и объемы оценочных питом­ников и сортоиспытаний. Селекция станет значительно более компактной. У самоопылителей отпадет необходи­мость повторных отборов. Что касается перекрестников, то в принципе возможно создание «чистых» линий, и составление из них сортов- популяций, в которых проявится эффект гетерозиса. Насколько это реализуемо, будет зависеть от затрат средств и времени.

Применение гаплоидов в селекции гибридов кукуру­зы при наличии больших масштабов позволило бы уско­ренно получать самоопыленные линии. Удвоение числа хромосом гаплоида дает гомозиготу. Правда, нужно иметь в виду, что многие из таких гомозигот оказывают­ся маложизнеспособными вследствие гомозиготации ле­тальных и полулетальных рецессивных аллелей, которые при получении самоопыленных линий обычным путем устраняются отборами из инбредных поколений.

Американская фирма DeKalb Agricultural Association Inc. использовала в селекционном процессе матроклинные гаплоиды для создания удвоенных гаплоидных ли­ний и новых гибридов. По комбинационной способности они не только не уступали линиям, созданным традици­онным самоопылением, но часто превосходили их. Уже в 1964 г. коммерческие гибриды фирмы DeKalb и лучшие но­вые гибриды включали 140 различных линий. При этом 84 линии были созданы фирмой DeKalb, и 56 линий взяты из общедоступных коллекций. Из 84 линий DeKalb 35 были созданы методом гаплоидии и 49 — методом самоопыле­ния. На издание 35 элитных линий гаплоидного происхо­ждения было потрачено значительно меньше средств, уси­лий и времени, чем на создание самоопыленных линий.

Одним из примеров успешного использования линий гаплоидного происхождения является гибрид DeKalb 640. Этот четырехлинейный гибрид широко использовался в кукурузном поясе США более десяти лет. Из его четырех родительских линий три были созданы методом матроклинной гаплоидии. Следует отметить, что он являлся ли­дером по устойчивости к высокой густоте стояния.

В настоящее время матроклинные гаплоиды широко применяются для селекции кукурузы в Краснодарском НИИСХ. Так, в 1993 г. было получено 1400 линий гап­лоидного происхождения, в 1994 г. — 1042, в 1995 г. — 1112 линий. Данные линии оценивают по ряду селекци­онно-ценных признаков и лучшие из них используют для создания новых гибридов. Испытание гибридов, получен­ных от скрещивания линий удвоенных гаплоидов, пока­зывает, что последние не уступают по комбинационной способности линиям, полученным обычным самоопыле­нием. При этом гаплоиды позволяют значительно сокра­тить время создания линий и гибридов.

Удвоенная гаплоидная линия Кр716, созданная в Крас­нодарском НИИСХ, входит в качестве родительской ли­нии в четыре гибрида, которые занесены в Госреестр се­лекционных достижений Российской Федерации, допу­щенных к использованию.

Создана удвоенная гап­лоидная линия кукурузы, названной Qun Hua. Эта линия сочетала такие признаки, как скороспелость, устойчивость к низким температурам, устойчивость к *Helminthosporium turcicum* и *Helminthosporium maydis*.

Кроме использования гаплоидов для получения гомо­зиготных линий, разработаны и разрабатываются спосо­бы их использования для отбора генотипов, содержащих ценные гены и сочетания генов.

Еще одно применение, правда очень ограниченное, гаплоидия нашла при отдаленной гибридизации. Есть рас­тения, имеющие целый ряд видов, отличающихся плоидностью. Если это автоплоидность, гаплоиды у видов с боль­шим числом хромосом могут оказаться в какой-то мере плодовитыми, поскольку у них сохраняются гомологич­ные (или в значительной мере гомологичные) хромосомы. Тогда можно уравнять число хромосом у разных видов, сохраняя их способность давать семена и получать меж­видовые гибриды, устраняя несовместимость (или плохую совместимость), связанную с различным числом хромо­сом. Это реализовано в роде *Solanum*. Наш обычный кар­тофель — природный тетраплоид. Он имеет в диплоидном наборе 48 хромосом. В этом роде имеются виды с дипло­идным набором в 24 хромосомы, устойчивые к некоторым болезням и вредителям. Перевод *Solanum tuberosum* на гаплоидный уровень облегчил гибридизацию с ними.

Гаплоидия может найти применение и в мутационной селекции. Обработка гаплоидов мутагенами с последую­щим восстановлением диплоидного числа хромосом позво­ляет выявить рецессивные мутации уже в первом мутант­ном поколении и сразу закрепить их. Это особенно важно для перекрестноопыляющихся растений, у которых вы­явление рецессивных мутантов — чрезвычайно трудная задача.

С. С. Хохлов и др. (1976) предложили использовать гаплоиды для так называемой аналитической селекции. Основная ее идея заключается в том, что расщепление генов у гаплоидов соответствует гаметическому и значи­тельно упрощено по сравнению с диплоидами и поли­плоидами. Поэтому предлагается использовать гаплои­ды для отбора благоприятных генов и их сочетаний. Дан­ная аналитическая селекция состоит из трех основных этапов:

* получение гаплоидов;
* селекция на гаплоидном уровне, включая отбор, гиб­ридизацию и экспериментальный мутагенез;
* ресинтез диплоидов илиполиплоидов, а также отбор и гибридизация между полиплоидами в целях получе­ния эффекта гетерозиса.

Метод получения гаплоидов и удвоенных гаплоидов широко используется в практической селекции картофе­ля, редьки и зерновых. Особый интерес представляет ис­пользование удвоенных гаплоидов у ячменя для передачи устойчивости к вирусу желтой мозаики. Новые сорта пше­ницы и риса были созданы с использованием удвоенных гаплоидов.

Считается, что использование уменьшения плоидности у картофеля с 4 до 2 позволяет отбирать ценные ре­комбинации генов. С. Чайз (1963) разработал подробную схему аналитической селекции картофеля на основе отбо­ра ценных генотипов на уровне дигаплоидов (дигаплои­ды — это гаплоиды, полученные от автотетраплоидов).

Создано несколько схем рекуррентной селекции ячме­ня с отбором ценных генотипов на уровне удвоенных гап­лоидных растений (Дж. Фороуги и В. Вензель, 1990). Пер­вая такая схема была разработана для передачи моногенно наследуемого признака между близкородственными генотипами. Она была использована для передачи устой­чивости к вирусу желтой мозаики BaYMV от одной линии озимого ячменя другой линии. Данная схема предусмат­ривает скрещивание двух линий ячменя между собой, по­лучение гаплоидов из гибрида F1, удвоение числа хромо­сом у гаплоидов и отбор удвоенных гаплоидов по селек­тируемому признаку. Затем предполагается провести обычную полевую оценку генотипов, их размножение и испытания. Авторы считают, что данную схему селекции можно с успехом использовать не только для передачи моногенного признака, но и для передачи различных коли­чественно наследуемых признаков. В их эксперименте от­бор среди удвоенных гаплоидов проводился по комплексу признаков, включая урожайность.

Они же разработали схему рекуррентной селекции с чередующимися гаплоидными этапами для передачи моногенно или количественно наследуемых признаков меж­ду неродственными генотипами. Эта схема предусматри­вает скрещивание двух родительских линий и получение гаплоидов и удвоенных гаплоидов из гибрида F1. В тепли­це и/или полевых условиях отбирают лучшие по селекти­руемому признаку удвоенные гаплоиды и скрещивают их с рекуррентным родителем. Из беккроссного потомства опять получают гаплоиды и удвоенные гаплоиды и снова проводят отбор на уровне удвоенных гаплоидов, лучшие из которых скрещивают с улучшаемым родителем. Обыч­но после третьего беккросса полученные линии размно­жают и испытывают для дальнейшего использования в традиционной селекции.

Рекуррентная схема селекции с чередующимися гап­лоидными этапами была успешно использована для пере­дачи устойчивости к болезням листа, к вирусу BaYMV и для увеличения массы 1000 зерен у ячменя.

С. Т. Чалык, В. Ротаренсо (1999) предложили исполь­зовать гаплоидные растения для рекуррентного отбора у кукурузы. Каждый цикл такого отбора состоит из двух этапов: первый — получение гаплоидов из синтетических популяций, второй — выращивание гаплоидов, опыление их пыльцой, взятой с диплоидных растений той же синте­тической популяции, и отбор. Отбор проводили по круп­ности початков гаплоидных растений. К 1999 г. были проведены два цикла гаплоидного рекуррентного отбо­ра, в результате которых улучшены две синтетические популяции SP и SA. Определение эффективности данной схемы гаплоидного рекуррентного отбора показало, что она практически в три раза выше для улучшения зерно­вой продуктивности синтетических популяций, чем обыч­ные схемы рекуррентной селекции с отбором благоприят­ных генотипов на уровне диплоидных растений.

**Методы получения** **гаплоидов**

Хотя изредка встречаются спонтанные гаплоиды, например у кукурузы один из проростков в двух- и трех­ зародышевых семенах может оказаться гаплоидом, час­тота их появления настолько мала, что гаплоидная се­лекция на этой основе строиться не может.

Низкая частота спонтанно получаемых гаплоидов дол­гое время сдерживала использование гаплоидии.

Экспериментально гаплоиды могут быть получены мно­гими путями. В частности, можно побудить делиться неоплодотворенную яйцеклетку опылением убитой пыльцой. К значительному увеличению частоты выхода гаплоидов приводит задержка опыления. Наиболее эффективной у кукурузы, например, была задержка опыления до 20 дней, в результате было получено 0,35% гаплоидов. Воздейст­вие высокой температурой на растения также может при­вести к увеличению частоты получения гаплоидов.

Но практическое применение нашли два способа:

* матроклинная гаплоидия (метод гаплопродюсера и га- плоиндуктора);
* андроклинная гаплоидия.

**Метод гаплопродюсера** был применен в селекции яч­меня и в селекции пшеницы. Он заключается в том, что F1 скрещивают с другим видом, хромосомы которого впо­следствии спонтанно элиминируются. В случае ячменя это был *H. bulbosum* — ячмень луковичный. Для пше­ницы применили *S. montanum* — рожь горную. Первые селекционные результаты достигнуты путем скрещива­ния гибридов F1 культурного ячменя с *Н. bulbosum* L., который выступает в этом случае в качестве гаплопродюсера. Хромосомы *Н. bulbosum* в ходе развития зародыша эли­минируются. Завязавшиеся зерновки спустя 11...16 дней после опыления вынимают из колосьев, стерилизуют, из­влекают зародыш под микроскопом и помещают его на твердую питательную среду. Пробирки с зародышами дер­жат около 3 недель в темноте, чтобы развилась корневая система. С появлением колеоптиле их переносят в росто­вые камеры, где выращивают растения до фазы 2...3 ли­стьев.

Для получения удвоенных гаплоидов растения прямо в пробирках заливают раствором колхицина. Корни в этом случае защищены питательной средой.

Пробирки помещают в вакуум-камеру, что способст­вует хорошему проникновению раствора в ткани растений, которые затем пересаживают в маленькие горшочки со стерилизованной смесью земли, песка и торфа. Когда рас­тения окрепнут, их пересаживают в большие вазоны и до­водят до созревания.

Выход гаплоидов зависит от генотипа культурного яч­меня и *Н. bulbosum*. Последний может иметь 14, 28 и 42 хромосомы. Для скрещивания берут 14-хромосомные образцы *Н. bulbosum*. Отбор ведут среди потомств удвоен­ных гаплоидов.

**Метод гаплоиндуктора** широко применяют в селекции кукурузы. Имеются линии-гаплоиндукторы, часть пыль­цы которых содержит только один спермий. При опыле­нии такой пыльцой может оплодотвориться либо яйце­клетка (летальный вариант), либо центральная клетка. В последнем случае индукция развития эндосперма при­водит к партеногенетическому развитию зародыша из неоплодотворенной яйцеклетки.

**Андроклинные гаплоиды** развиваются из клеток муж­ского гаметофита, они имеют цитоплазму и ядро от одной особи. Гаплоиды этого типа получают только эксперимен­тально из культуры пыльников. Можно предположить, что получение гаплоидов из культуры пыльников — ос­новной путь, по которому пойдет гаплоидная селекция. Именно здесь наблюдается заметный прогресс. Если рань­ше этим путем получали единичные гаплоидные растения, то теперь у некоторых культур процент гаплоидов, полу­чаемых из пыльников, достигает достаточно больших зна­чений. Так, число гаплоидов, получаемых из пыльцы на питательных средах, достигло 30 на 100 пыльников.

**Вопросы для самоконтроля знаний по теме**

1. Как используется гаплоидия в селекции растений? Какие получены достижения на основе применения данного метода.
2. Какие известны методы получения гаплоидов для решения селекционных задач?
3. Что такое «гаплопродюсер»?