

# МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ В КОММЕРЧЕСКОЙ СЕЛЕКЦИОННОЙ ПРОГРАММЕ

*Sam R. Eathington, Theodore M. Crosbie, Marlin D. Edwards, Robert S. Reiter, Jason K. Bull.  
Molecular markers in a commercial breeding program./Crop Science.- №47 (S3), 2007.- P.154-163*

*Перевод заведующей лабораторией молекулярных и гаметных методов ВНИИССОК,  
д.б.н. Балашовой И.Т.  
ГНУ «Всероссийский НИИ селекции и семеноводства овощных культур» РАСХН  
Россия, 143080, Московская область, п. ВНИИССОК, тел.: +7 (495) 599-24-42  
E-mail: vniissok@mail.ru*

*Молекулярное маркирование селекционно ценных признаков у сельскохозяйственных растений получило большое развитие в пребридинговых исследованиях 90-х годов прошлого и начала нынешнего столетия. С ДНК-маркерами, как с основными носителями информации о структуре генома, селекционеры связывали и связывают большие надежды. Однако внедрение MAS/MARS – технологий в селекционные программы в Российской Федерации крайне затруднено. Это обусловлено отчасти недостаточностью материально-технической базы, дороговизной молекулярных технологий и нехваткой кадров, подготовленных для проведения подобного рода исследований, а отчасти и неспособностью использовать на практике необходимую информацию, добытую, зачастую, весьма нелёгким путём. Участвуя в международной конференции «Традиционная и молекулярная селекция полевых и овощных культур» в г. Нови Сад (Сербия), мы познакомились с профессором Иллинойского университета Ритой Мамм, которая любезно предоставила нам доступную информацию об использовании молекулярных маркеров в коммерческих селекционных программах США. Статья была опубликована в журнале «Crop Science», №47 (S3), 2007, с. 154-163, издаваемом Crop Science Society of America (Научным обществом растениеводов Америки). Этой информацией мы хотели бы поделиться с читателями журнала «Овощи России».*

**В** 80-е годы XX века маркеры на основе ДНК были идентифицированы как имеющие определённый потенциал для селекции *Zea mays* L. Проведенные исследования продемонстрировали преимущества использования молекулярных маркеров для селекции просто наследуемых признаков, однако только некоторые из них, как было показано, обладали потенциалом для улучшения генетических характеристик количественных признаков. В конце 90-х годов XX века Monsanto решила вести селекцию с помощью молекулярных маркеров для количественных признаков в глобальных программах по селекции сельскохозяйственных растений. Были разработаны генотипирующие системы, информационные подходы и методологии селекции с помощью молекулярных маркеров, которые повышали бы их значимость в элитных селекционных популяциях.

Молекулярные маркеры на основе ДНК были идентифицированы как имеющие потенциальное применение в селекции кукурузы в 80-х годах XX века (Helentjaris et al., 1985; Paterson et

al., 1988). Идентификация полиморфизма длин фрагментов рестрикции (RFLP) (Botstein et al., 1980) открыла новую научную дисциплину, обычно обозначаемую как молекулярная селекция. Центральная идея молекулярной селекции – использование «фингерпринтов» («отпечатков пальцев») молекулярных маркеров для повышения эффективности селекции в программах по селекции растений.

Учёные исследовали применение молекулярных маркеров для характеристики генетической вариабельности, насыщения генетической информацией при беккроссировании, картирования локусов количественных признаков и селекции с помощью молекулярных маркеров (Charcosset and Gallais, 2003; de Vienne and Causse, 2003; Hoisington and Melchinger, 2004; Frish, 2004; Mohler and Singrun, 2004). Опубликованы результаты картирования ряда локусов количественной устойчивости для широкого круга фенотипических характеристик (Lawrence et al., 2004, 2005, 2007). Однако, после 20 лет исследований существует лишь ограниченное число публикаций, демон-

стрирующих результаты применения молекулярных маркеров в селекционных программах. Данная статья сфокусирована на применении технологий молекулярного маркирования в селекционных программах фирмы Monsanto с акцентом на селекции для количественных характеристик. Цели данной статьи:

- 1) определить основные компоненты, необходимые для широкомасштабного применения методологии селекции с помощью молекулярных маркеров;
- 2) сделать обзор структурных изменений в селекционных программах Monsanto для приспособления каждой из этих компонент (методологий);
- 3) обеспечить получение эмпирических результатов по методологиям селекции с помощью молекулярных маркеров для количественных характеристик;
- 4) изучить один из методов фирмы Monsanto для того, чтобы повысить точность в оценке генетического размещения локусов количественной устойчивости (QTL, ЛКУ) и численности популяций при ассоциативном картировании.

## Ключевые компоненты

Так как Monsanto продвигается от эксперимента до коммерческого применения методологий селекции с помощью молекулярных маркеров, необходимо 5 основных компонентов для успешного продвижения продукта:

- 1) структура селекционной программы
- 2) молекулярные маркеры
- 3) генотипируемая платформа
- 4) фенотипическая информация
- 5) системы информационных технологий.

## Структура селекционной программы

Информация, полученная с помощью молекулярных маркеров, повышает сложность селекционных программ. Дополнительно к стандартным процедурам селекции (таким, как получение семян, выращивание в питомнике и характеристика урожайности, опыление, сбор фенотипических данных, уборка урожая и анализ полученных данных) методологии селекции с помощью молекулярных маркеров требуют анализа и интерпретации генотипических данных и принятия решения об использовании информации, полученной с помощью молекулярных маркеров – всё это в тех же ограниченных временных рамках, в которых пребывают селекционеры, работающие с кукурузой, в Северной Америке после каждого кризиса. Селекционные программы, выстроенные на базе молекулярного маркирования, почти в 7 раз повышают количество данных, и такой анализ должен быть более полным по сравнению с обычными

**Рис. 1. Схема рекуррентной селекции с помощью молекулярных маркеров**



ми селекционными программами. С помощью ускоренных схем рекуррентной селекции на основе молекулярных маркеров (MARS) (рис.1) селекционер может провести селекционный процесс 3-4 раза в год по сравнению с обычным – 1-2 раза в год. Более комплексное решение, принятое на основе большего объема информации, объединённое с большей частотой селекционных процессов, требует затрат дополнительного времени перед началом селекционного процесса.

**Рис. 2. Структура процесса селекции кукурузы в фирме Monsanto Северной Америки и организация селекционной технологии**



**Структуризация процесса по компонентам для оптимизации его выполнения**

Селекционеры по кукурузе фирмы Monsanto в Северной Америке также разрабатывают и помогают разворачивать высокотехнологичные продукты для размножения по коммерческим каналам. Коммерческие учреждения имеют различные механизмы для обеспечения продукцией покупателей. Они могут включать национальные бренды, региональные бренды и генетические лицензионные модели. Комплексность текущей широкомасштабной программы по

тестированию урожая, объединённой с разработкой коммерческих продуктов для размножения, требует от селекционера затрат дополнительного времени в конце селекционного процесса.

Monsanto решила реструктурировать свою селекционную программу по кукурузе в Северной Америке для того, чтобы позволить селекционеру сфокусироваться либо на начале, либо на окончании селекционного процесса. Определены 2 группы исследователей в Североамериканской селекционной программе по кукурузе (рис.2).

Группа начала селекционного процесса, названного «Разработкой селекционных линий», ответственна за разработку новых инбредных линий с использованием всех доступных технологий и методологий селекции. Разработчики инбредных линий управляют процессом формирования новых селекционных популяций до получения гибридов первого года и широкомасштабной оценки урожайности. Группа окончания селекционного процесса, названная «Коммерческой селекционной группой», ответственна за разработку и коммерциализацию новых коммерческих гибридов и управление всеми характеристиками урожайности (агротехнику). Коммерческие селекционеры управляют процессом получения гибридов, начиная с первого года, когда компания расширит получение прибыли через коммерциализацию продукта. Коммерческие селекционеры также разрабатывают новые гибридные комбинации элитных инбредных линий. Разделение селекционного процесса позволяет разработчикам линий сфокусировать свои усилия на применении новых технологий, которые улучшают селекционный процесс, в то время, как коммерческие селекционеры могут сфокусировать

ся на повышении качественных характеристик урожая, продвижении гибридов и коммерческого продукта.

Кроме разработчиков линий и коммерческих селекционеров определены 2 другие ключевые группы. Перед группой разработчиков линий выделена группа организации технологии селекционного процесса. Эта организация объединяет ряд команд, которые ответственны за разработку молекулярных маркеров, оценку новых технологий для селекции растений, статистическую поддержку, интеграцию биотехнологических характеристик, управление программами в питомниках и фитопатологическую поддержку. Технологии, которые завершают проверку концепции с помощью эксперимента, проходят красной нитью от организации селекционной технологии, через разработчиков линий – для широкомасштабного обеспечения оборудованием и оптимизации процессов. При окончании процесса группа разработчиков продукта работает с коммерческими селекционерами и коммерческой службой Monsanto для оптимального размещения продукта по каждому направлению.

### **Молекулярные маркеры и геноטיפирующая платформа**

С изобретением полимеразной цепной реакции (ПЦР) государственные институты и коммерческие организации переключились на молекулярные маркеры, полученные на базе ПЦР, такие как сиквенсы простых повторов (SSR) (Akkaaya et al., 1992). Молекулярные маркеры на основе ПЦР, наряду с достижениями в автоматизации молекулярного геноטיפирования, значительно снизили стоимость одного молекулярного анализа (определяемую как стоимость геноטיפирования одного генетического образца одним молекулярным маркером). Так как геномные технологии улучшились, геноטיפирование продвинулось до оценки однонуклеотидного полиморфизма (SNP). В отличие от SSR SNP-определение не ограничено разделением фрагментов по размерам в геле или капилляре. С такими свободными от геля системами определения генотипов как MALDI-TOF MS (Sequenon, San Diego, CA), TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA), Invader (Third Wave Technologies, Madison, WI), SNPStream (Beckman-Coulter, Fullerton, CA), Pyrosequencing (Uppsala, Швеция) и Illumina (La Jolla, CA) стала возможной дополнительная автоматизация процессов молекуляр-

ного геноטיפирования (Jenkins and Gibson, 2002). Полностью автоматизированная система молекулярного маркирования – начиная с экстракции ДНК, через аллельное считывание флуоресцентной ДНК – в настоящее время стала реальностью.

Чтобы облегчить широкомасштабное применение методологий селекции с помощью молекулярных маркеров, мы идентифицировали и проанализировали тысячи SNP кукурузы. Большой процент этих SNP входил в состав потенциальных генов, и все SNP были собраны в консенсусной карте, основанной на множестве картируемых популяций, относящихся к обоим родителям. Наша консенсусная карта связей покрывает B73XMo17 популяции генетического материала (Lee et al., 2002), чтобы обеспечить лучшую генетическую точность местоположения индивидуальных SNP.

В 2000 году Monsanto переключилась на основанное на SNP геноטיפирование в нашем Анкени (IA-штат) с системой, свободной от геля детекции, и полной автоматизацией процессов геноטיפирования. С 2000 по 2006 годы общая база данных по молекулярным маркерам выросла в 50 раз, в то время как цена за геноטיפирование одного образца снизилась более, чем в 6 раз.

### **Фенотипическая информация**

Качество ассоциаций маркер-фенотип зависит и от качества фенотипической информации. Фокусируясь на начале селекционного процесса, разработчики линий могут потратить больше времени, собирая высококачественную фенотипическую информацию о своих селекционных популяциях. Эта информация обеспечивает лучшие характеристики селекционных линий и используется в последующих методологиях селекции с помощью молекулярных маркеров. Коммерческие селекционеры сфокусированы на окончании селекционного процесса и могут провести посев и уборку урожая на дополнительных участках. Monsanto инвестирует в разработку улучшенного технического обеспечения для эффективных программ по тестированию урожая. Комбинация специализированных селекционеров и улучшенного оборудования позволила на 80% повысить урожайность на специализированных участках в последние 4-5 лет. Эти дополнительные участки по выявлению потенциала урожайности обеспечили лучшую характеристику селекционных линий и

позволили собрать больше фенотипических данных для разработки ассоциаций маркер-фенотип.

### **Информационные системы селекционных технологий и алгоритмы**

Селекционер по кукурузе в Северной Америке связан с большим объемом информации (Crosbie et al., 2006). Селекционеры должны управлять в полном объеме своими селекционными процессами, включающими такие операции, как выяснение родословных, разработка и выращивание селекционных популяций и оценка урожайности, сбор фенотипической информации, анализ данных и принятие селекционных решений. Дочерние семенные компании Monsanto имеют множество программных обеспечений для селекционеров. Используя их, авторы построили глобальную систему по селекции растений для того, чтобы управлять всеми селекционными программами Monsanto. Эта централизованная база данных позволяет селекционерам управлять всеми аспектами их селекционных программ. Она также даёт возможность доступа для изобретения нового генетического материала, информации о родословных и фенотипических данных по всем культурам во всех наших глобальных селекционных программах. Система усиливает ключевые требования, такие как однородность номенклатуры родословных, определение характеристик и нормирование шкал, контроль данных по качеству продукции (QC). Каждое растение в этой системе идентифицируется и за его ростом и развитием можно проследить со дня его создания.

Сходная информационная система была разработана для лабораторий молекулярного геноטיפирования. Эта система проводит образцы тканей через процесс геноטיפирования и подтверждает, что геноטיפическая информация корректно связана с генетическим материалом. Учёные могут управлять всеми аспектами процесса геноטיפирования, включая такие, как разработка списка маркеров, каталог проектов по геноטיפированию, управление изобретением молекулярных маркеров, изучение прогресса в геноטיפировании, просмотр данных по качеству генотипов и выделение необходимых молекулярных маркеров. Каждый образец ткани уникально идентифицируется, и связывается с нашей полевой селекционной системой.

После построения фенотипической

и генотипической систем авторы строят интегрированную систему по скринингу маркеров. Это система на основе Web, которая позволяет быстрое методологическое расширение и применение в любой компьютерной системе компании. Эта система анализа данных позволяет селекционеру подбирать популяции для молекулярного маркирования, проводить их через проекты, разрабатывать модели генетических маркеров для селекции и принимать селекционные решения. Решения селекционера возвращаются в полевую IT (информационно-технологическую) – и/или в лабораторную IT-систему для обеспечения бесперебойного протекания следующей стадии селекционного процесса.

### Селекция по комплексу характеристик

Количественные характеристики, такие как урожайность зерна, являются основой для успешного продвижения коммерческого продукта (Crosbie et al., 2006). Покупатели хотят получать продукты, которые объединяют благоприятные характеристики по комплексу показателей, таких как урожайность зерна, влажность зерна при уборке, стандартность продукции и весовые характеристики. Эти показатели являются первыми селекционными мишенями для селекционных программ по кукурузе, следовательно, методологии селекции с помощью молекулярных маркеров должны быть направлены на улучшение эффективности селекции по комплексу характеристик. Базовый принцип селекции с помощью молекулярных маркеров следует концепции скоррелированности основных селекционных характеристик (Falconer, 1960). Методология, которая объединяет как фенотипическую, так и генотипическую информацию, описана Лэндом и Томпсоном (Lande, Thompson, 1990). Способность информации по молекулярному маркированию генома повышать эффективность фенотипической селекции продемонстрирована в нескольких работах (Stuber and Edwards, 1986; Edwards and Johnson, 1994; Eathington et al., 1997; Johnson, 2001, 2003).

В фирме Monsanto использовали как генотипическую, так и фенотипическую информацию в подходящей методологии для разработки пакета знаний, который селекционеры используют как базис для генетического моделирования в селекционных популяциях. Селекционер объединяет знания по зародышевой плазме и селекционной популяции с информацией о

молекулярном маркировании фенотипических характеристик для разработки селекционной модели молекулярного маркирования комплекса характеристик для каждой селекционной популяции. Эта селекционная модель используется для быстрого повышения частоты встречаемости молекулярно маркируемых аллелей, связанных с благоприятными фенотипическими характеристиками, внутри селекционных популяций. Селекционеры могут решить оставить селекционную популяцию на основе наблюдений и предварительной биометрической оценки или могут выбрать множественные селекционные модели для индивидуальной популяции.

После того, как селекционер разрабатывает селекционную модель для селекционной популяции, популяция расширяется посредством рекуррентной селекции с помощью молекулярных маркеров. В течение этого процесса потомство данной селекционной популяции маркируется ("фингерпринтируется") специфическими молекулярными маркерами для того, чтобы оценить генотипическую ценность каждого потомка (растения). Контролируемые опыления проводятся внутри группы уже отобранных потомков, чтобы обеспечить следующий цикл селекции с помощью молекулярных маркеров. С использованием продолжительных тепличных программ и генотипической информации, полученной до цветения, может быть проведено много циклов (3-4) селекции с помощью молекулярных маркеров и контролируемых опылений в течение года. Эта схема MARS (рекуррентной селекции с помощью молекулярных маркеров) быстро накапливает благоприятные молекулярно маркируемые аллели, связанные с желаемым локусами количественной устойчивости в селекционной популяции. Селекционер может отбирать различные MARS-схемы в зависимости от селекционной модели и желаемой генетической структуры (уровень инбридинга, генетический дрейф и частота накопления благоприятных аллелей) популяции после MARS. MARS-схемы оптимизируются для полевого и лабораторного использования с целью точного выполнения процесса и накопления частоты благоприятных аллелей с одновременной минимизацией генетического дрейфа. С повышением частоты встречаемости благоприятных аллелей в селекционной популяции возможность возвращения генотипов с комбинацией желаемых аллелей также повышается. С изменением частоты встреча-

емости благоприятных аллелей с 0,5 до 0,96, возможность получения идеального генотипа для 20 независимых регионов возрастает с одного на триллион до одного к пяти. Эти изменения в частоте встречаемости аллелей должны происходить в результате изменений в значении представленных в популяции селекционно ценных характеристик, которая оценивается Multiple trait index (индексом множества характеристик/признаков) (MTI), который объединяет значения множества характеристик в единственный индекс со вкладом каждой индивидуальной характеристики.

### Анализ данных

Методология селекции с помощью молекулярных маркеров, описанная в предыдущих разделах, применена селекционерами для селекционных популяций растений. Через год исследований с помощью MARS был получен набор линий, который происходил из MARS-популяции и был оценён в сравнении с линиями, отобранными с помощью традиционных селекционных схем из той же популяции. Селекционер принял все решения на основе селекционной модели, селекционных линий и линий, полученных с помощью MARS-технологий. Семена были получены в обычном питомнике и урожай оценивался в том же эксперименте – для минимизации ошибочных эффектов, связанных с источником получения семян и тестирования условий окружающей среды. Значение представленности традиционно селектируемых линий сравнивалось со значением представленности MARS-линий. Значение множественного индекса признаков (MTI) вычислялось для каждой из MARS и традиционно отбираемых линий с использованием параметров MTI (фенотипические характеристики и вклад каждой из них в этот общий показатель), определённых в селекционной модели, которая была выстроена для специальной селекционной популяции.

Для североамериканских и европейских программ по селекции кукурузы результаты заносились в компьютер для каждой из 248 селекционных популяций и затем усреднялись внутри года оценки (табл. 1). Значение MARS-линий оценивалось по отношению к нулю. В результате были выяснены три ключевых позиции. Во-первых, селекционные программы фирмы Monsanto повышают вклад генетической составляющей на самых ранних этапах селекции. Во-вторых, линии, полученные с помощью MARS-

технологий, представлены в селекционных популяциях выше (их вклад больше), чем линии, полученные с помощью традиционных методов. И, наконец, доходность обоих методов селекции варьирует по годам.

Результаты MARS в одной из европейских селекционных программ по подсолнечнику (*Helianthus annuus* L.) демонстрировали улучшение по урожайности зерна, влажности зерна при уборке и процентному содержанию

Для того, чтобы оценить возможности использования различных генетических моделей, 23 селекционных популяции кукурузы из 8 различных селекционных программ были отобраны для 2-х различных селекционных моделей (табл.3). Каждая популяция отбиралась с использованием модели МТИ, который усреднял 3,5 характеристики, и модели урожайности зерна, которая усредняла 1,9 характеристик и имела на 62% больший вклад в урожайность зерна, чем МТИ-модель. Оценили популяции, прошедшие через MARS и свободно отобранное потомство каждой селекционной модели. В среднем, потомство, отобранное по модели урожайности зерна, имело больший вклад в урожайность зерна по сравнению с потомством, отобранным по модели МТИ. Однако, коррелирующие характеристики, такие как урожайность зерна и тестируемая масса контролировались лучше моделью МТИ, чем моделью урожайности зерна.

**1. Сравнение значений индекса множества характеристик (МТИ) по одному году исследований, полученных в результате рекуррентной селекции с помощью молекулярных маркеров (MARS) (три цикла) и традиционных методов селекции (два цикла)**

Год	Число оценённых селекционных популяций	Индекс множества характеристик*	
		Традиционная селекция	MARS
–	–		
2002	79	0,63	1,10
2003	97	0,25	0,97
2004	72	0,76	1,62
<b>Всего</b>	<b>248</b>	<b>0,50</b>	<b>1,18</b>

\* Индекс множества характеристик оценивает вклад исходных линий по отношению к нулю. Этот индекс включает такие составляющие, как урожай зерна, влажность зерна, общий вес, стандартность и т.д.

Результаты MARS-технологий для 43 селекционных популяций сои (*Glycine max* (L.) Merrill) представлены в таблице 2. Различные селекционные схемы были использованы в селекционных популяциях сои, и результаты представляют средний вклад MARS-линий по сравнению с вкладом традиционно селекционируемых линий для таких ключевых характеристик, как урожайность зерна и степень зрелости. MARS-линии показали преимущество по урожайности на 37,6 кг/га по сравнению с традиционно селекционируемыми линиями и небольшое отставание по степени зрелости.

**2. Сравнение значений фенотипических характеристик, полученных по одному году исследований: рекуррентной селекции с помощью молекулярных маркеров (MARS) (три цикла) и традиционных методов селекции (два цикла) для сои, подсолнечника и кукурузы**

Культура	Регион	MARS минус традиционная селекция				
		Селекционный индекс	Сравнительная зрелость, d	Урожайность зерна, кг/га	Влажность зерна, г/кг	Содержание масла в зерновке, %
Соя	Северная Америка	–	0,06	37,6	–	–
Подсолнечник	Европа	–	–	10,0	- 11,0	0,5
Кукуруза	Бразилия	1,47	–	287,2	0,10	–

**3. Эффекты однолетней (три цикла) рекуррентной селекции с помощью молекулярных маркеров на примере 23 популяций кукурузы для двух селекционных моделей**

Тип селекционной модели	MARS* минус оригинальные линии (C0)			
	МТИ	Урожайность зерна, кг/га	Влажность зерна, г/кг	Общая масса, кг/м <sup>3</sup>
МТИ**	0,73	105,4	0,10	1,03
Урожай зерна	- 0,15	264,0	3,90	- 3,86

масла в зерновке по сравнению с традиционной селекцией. И, наконец, Бразильская селекционная программа Monsanto по кукурузе продемонстрировала преимущества MARS-линий по селекционному индексу, урожайю зерна и влажности зерна при уборке (табл.2).

\* – Рекуррентная селекция с помощью молекулярных маркеров  
 \*\* – Индекс множества характеристик – модель разработана для обеих популяций MARS

**Информационная база данных**

Приводя в исполнение процесс генетического картирования и MARS в наших коммерческих селекционных программах, авторы накопили очень большую базу данных по ассоциациям

маркер-фенотип. С 2000 года их ассоциативная база данных выросла в 50 раз. Эта информационная база данных представляет ядро следующей волны селекционных методологий. Её можно будет использовать в предварительных селекционных методологиях. С развитием этих новых методологий будет значительно повышена эффективность селекции с помощью молекулярных маркеров для беккроссирования, селекции просто наследуемых признаков, и селекции на комплекс признаков – они смогут использоваться на всех стадиях селекционных программ для растений.

Одно из применений этой ассоциативной базы данных заключается в предсказании появления потомства с заданными признаками до фенотипической оценки данного потомства. Авторы оценили эту концепцию для предсказания влажности зерна у гибридов перед уборкой в четырёх селекционных популяциях. Для каждой популяции была построена селекционная модель с использованием информации из ассоциативной базы данных, объединённой с молекулярными «фингерпринтами» родителей гибридов. Каждая родительская инбредная линия «вкладывала» свой геномный регион как с высокой, так и с низкой влажностью зерна. Дивергентная MARS-схема была применена к потомству каждой популяции с отбором гибридов с высокой и низкой влажностью зерна при уборке. Произвольный набор из 20-30 линий, каждая из которых произошла из дивергентных популяций, скрещивался с одним тестером противоположного гетерозисному образцу, и оценивался во многих местах. Все 4 популяции проявили ответ на селекцию. Все популяции, отобранные по признаку низкой влажности зерна перед уборкой, имели низкую влажность зерна перед уборкой по сравнению с популяциями, отобранными на высокую влажность зерна. Почти все гибриды имели изменение во влажности зерна перед уборкой до 2,5%, в то время как инбредные линии – до 3,9%. Дивергентные популяции изменялись по таким фенотипическим характеристикам, как степень роста до цветения и мягкость наружных оболочек.

### Ключевые знания

Информация, полученная с помощью молекулярных маркеров, представляет новое орудие в арсенале средств селекции. Это орудие наиболее эффективно, когда объединяется со знаниями о селекционной зароды-

шевой плазме и о селекционных популяциях. Для селекционера важно продолжать фенотипическую селекцию как таковую для того, чтобы в будущем иметь возможность пользоваться MARS-схемой. Кроме того, селекционеры нуждаются в длительной фенотипической оценке и отборе среди произведенных линий и после MARS.

Строя генетические модели по MARS-схемам, селекционеры должны переключаться с селекции на наблюдаемую фенотипическую информацию на селекцию в отношении желаемых фенотипов. Понимание того, как интерпретировать результаты фенотипических предсказаний, сделанных на основе использования молекулярных маркеров, и коррелируемых с ними характеристик ответа, очень важно для определения потенциального успеха каждой селекционной программы.

### Генетическое разрешение

Популяция  $F_2$  наследует от обоих родителей максимальное количество разнокачественных связей. Эта генетическая структура была важна для первоначального картирования локусов количественных признаков, т.к. цена «фингерпринтирования» с помощью молекулярных маркеров была сравнительно высокой. Следовательно, ограниченное число молекулярных маркеров можно было использовать при генетическом картировании. Однако, неблагоприятная популяционная структура  $F_2$  не давала возможности точно установить позиции локусов количественных признаков (QTL) (Kearsey and Farquhar, 1998). Этот недостаток точности отстраняет селекцию с помощью молекулярных маркеров и мешает возможности решения проблемы тесно связанных с фенотипом QTL из-за плейотропных эффектов. Наилучшее картирование позиции QTL может быть осуществлено в математической, рекомбинационной и построенной с помощью генетических замен карте (Paterson, 1998). Рекомбинационный метод может быть реализован в процедуре, когда генерируются рекомбинации для целей наилучшего картирования, и в процедуре, когда стараются использовать исторические рекомбинанты (Darvasi and Soller, 1995; Xiong and Guo, 1997).

Рендомизированное скрещивание является эффективным приёмом воспроизводства генома диких рекомбинантов. Рендомизированное скрещивание сортов Иллинойс высокомасличный (C70) и Иллинойс низкомасличный (C70) дало возможность для

10 поколений, следующих за предками 2 линий  $S_2$  от свободного опыления, создать картирующую популяцию со сравнительно низким уровнем разнокачественных связей (Laurie et al., 2004). Генетическое разрешение, как было оценено, находилось в пределах 2-3 сантиморганид, и было основано на оценках разнокачественности связей с помощью молекулярных маркеров. Это разрешение, объединённое с высокой плотностью генотипирования, которое сейчас возможно на базе тысячи анализов однонуклеотидного полиморфизма (SNP) и автоматизации процедуры генотипирования, позволило детально картировать QTL по проценту масла в зерновке. Повышенное генетическое разрешение помогло составить список возможных кандидатов генов в регионе, связанном с фенотипической вариабельностью. Существует большой интерес к использованию исторических рекомбинантов для наилучшего картирования. Исследователи берут образцы исторических рекомбинантов, которые присутствуют в коллекциях зародышевой плазмы, или используют генетический материал, который лежит в основе селекционных программ. Monsanto имеет большую коллекцию инбредных линий, на которых основаны селекционные программы, и которые могли бы использоваться для ассоциативных исследований с целью улучшения генетических разрешений.

Очень важно понимать природу разнокачественности связей на участке генетического материала, который может быть использован для ассоциативных исследований. Разнокачественность связей, которую можно обозначить, как гаметную разнокачественность, может быть вызвана факторами, иными, чем наличие связи. Ложные ассоциации в популяциях гермаплазмы (зародышевой плазмы) могут быть обусловлены разнокачественностью связей между несвязанными между собой геномными регионами и между геномными регионами на различных хромосомах. Эта концепция продемонстрирована на примере использования элитных линий сои фирмы Monsanto.

Всего 750 линий сои были генотипированы с помощью 100 SNP. Примерно половина из этих линий представляли собой сою Roundup Ready, которая устойчива к гербицидам глифосатной группы, таким как Раундап и др. Линии классифицировались на устойчивые и восприимчивые категории на основе их фенотипической реакции на глифосатный гербицид. С использованием стандартного анализа

ассоциаций установлено, что 49 молекулярных маркеров были существенно ( $P < 1 \times 10^{-9}$ ) связаны с фенотипической реакцией по применению глифосатного гербицида (рис.3). Существенные ассоциации были идентифицированы на 15 различных хромосомах. Посредством генетического картирования *de novo*, сегрегационного анализа и анализа сиквенса установлено, что трансгенное событие 40-3-2 (Padette et al., 1995) расположено в группе сцепления D1b (U19) на генетической карте сои USDA (Департамент по сельскому хозяйству США) (Cregan et al., 1999) и является единичной инсерцией (вставкой). Следовательно, почти все эти 49 (а точнее 48) молекулярно-маркерных ассоциаций ложно позитивны благодаря разнокачественной структуре связей на этом участке элитных соевых линий. Подходящий метод анализа данных для обчёта структуры данной популяции был применён к этому набору данных, в результате которого был идентифицирован только 1 существенный ( $P < 1 \times 10^{-9}$ ) геномный регион, содержащий 40-3-2-трансген в группе сцепления D1b.

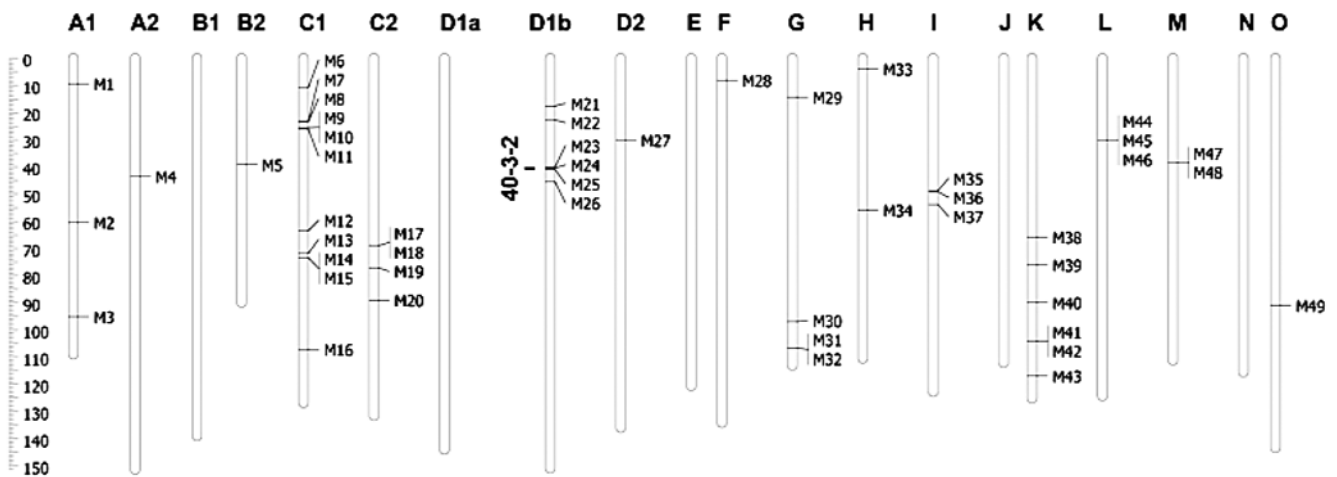
(2001), использует информацию по молекулярному маркированию для определения структуры популяции и подсчёта количества таких структур в анализе. Доступная программа, названная «Структура» (structure) (Falush et al., 2003; Pritchard et al., 2000b), была разработана для анализа ассоциативных исследований (Thornsberry et al., 2001). Другой метод заключается в передвижении разнокачественности связей в несвязанные участки одним поколением мейоза. Тест переноса разнокачественности (TDT) основан на принадлежности к семейству и используется для передвижения разнокачественных связей в несвязанные локусы хромосомы (Spielman et al., 1993). В этом тесте одно потомство, происходящее от гетерозисной особи, используется в ассоциативном анализе.

После оценки разнокачественности связей в структуре элитной гермаплазмы фирмы Monsanto, авторы решили использовать TDT-схему для исключения разнокачественности связей у несвязанных локусов. TDT-схема может применяться в

**Заклучение**

Первые молекулярные маркеры на основе ДНК были идентифицированы на кукурузе более 20 лет тому назад. С той поры исследователями выявлен ряд применений этих маркеров и продемонстрировано единообразие результатов этих применений. В фирме Monsanto авторы использовали в широком масштабе методологии селекции с помощью молекулярных маркеров в своих селекционных программах. Сегодня селекция с помощью молекулярных маркеров становится традиционным селекционным процессом. Авторы выстроили необходимые системы, включающие организацию селекционных программ, для того чтобы использовать возможности этих новых селекционных методологий. На сотнях селекционных популяций были проведены контролируемые эксперименты, включающие различные культуры, годы исследований, регионы мира и множество индивидуальных селекционных программ. Эти эксперименты показали, что методологии селекции с помощью молекулярных маркеров повысили количество потомков, представленных в следующих популяциях, по сравнению с

**КАРТА генетических связей для сои (сМ)**



**Рис. 3. Анализ ассоциаций для трансгена сои 40-3-2, обеспечивающего устойчивость к глифосатсодержащим гербицидам. Маркеры с правой стороны каждой хромосомы являются маркерами однонуклеотидного полиморфизма (SNP), которые связаны существенно ( $P < 1 \times 10^{-9}$ ) с характеристикой устойчивости к гербициду**

Структура популяции в ассоциативных исследованиях может быть вычислена разными способами. Метод, разработанный Pritchard et al., (2000a) and Thornsberry et al.,

коллекции инбредных линий для производства  $F_1$  из набора отобранных инбредных линий и получения потомства от свободного опыления от каждого  $F_1$ . Родительские линии или поколение  $F_1$ , наряду с его потомками, генотипируются набором молекулярных маркеров. Фенотипическая информация собирается по потомству от свободного опыления. TDT-анализ представляет – с помощью одного молекулярного маркера – только одного потомка, происходящего от одной гетерозиготы  $F_1$ .

традиционными методологиями селекции. И в заключение, Monsanto получила коммерческие продукты с помощью MARS-технологий для большинства культур.

В прошлом информационная база данных по селекции включала знания о предковых формах, фенотипическую информацию и информацию об общей и специфической комбинационной способности. Сегодня базы данных по селекции содержат информацию о молекулярных «фингерпринтах» и ассоциациях «маркер-фенотип», которые дают новую волну селекционных методологий.