



СОЗДАНИЕ F1-ГИБРИДОВ - КОНТРОЛЬ ГИБРИДИЗАЦИИ В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ

Рассматриваемые вопросы:

1. Типы наследования мужской стерильности
2. Молекулярные основы CMS
3. ЦМС в селекционной схеме
4. Трехлинейная схема семеноводства на основе ЦМС
5. Ядерная мужская стерильность
6. Механический контроль опыления – ручная кастрация
7. Химически индуцированная мужская стерильность
8. Мужская стерильность посредством технологии рекомбинантной ДНК

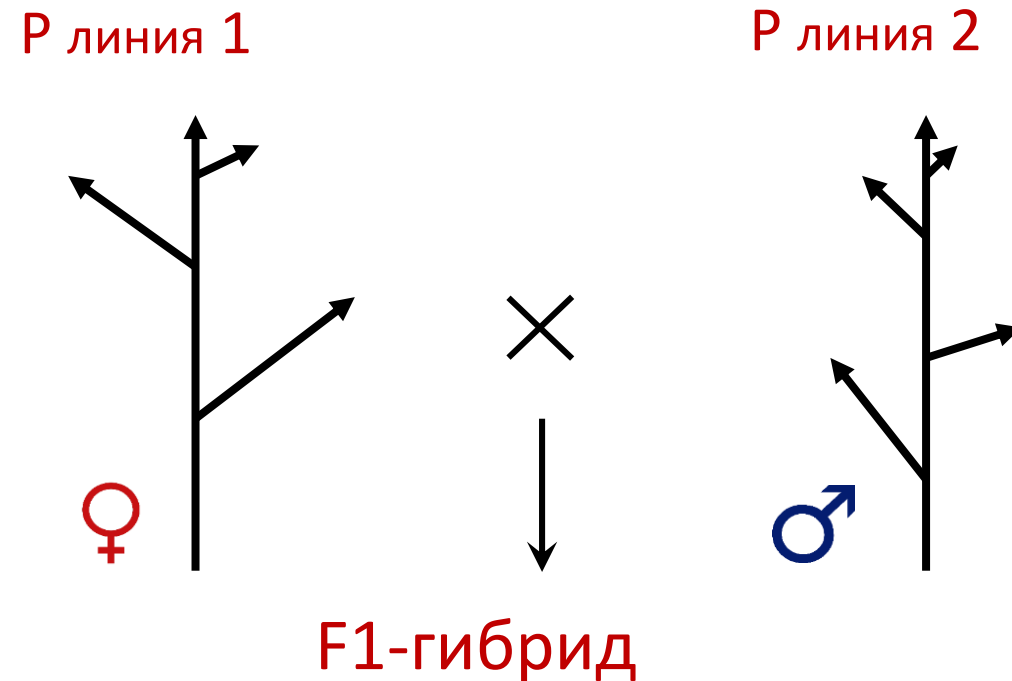


Монахос Сократ Григорьевич
д.с.-х.н., профессор

ПРОИЗВОДСТВО F1-ГИБРИДНЫХ СЕМЯН

Проблема:

- растения гермафродитны
- формируют мужские и женские генеративные органы
- завязывают семена от самоопыления
- В итоге - высокая доля сибсовых (негибридных) семян в потомстве
- В итоге – низкая коммерческая ценность произведенных семян



Решение:

для промышленного производства гибридных семян используют системы контроля опыления растений, исключая/препятствующие самоопылению и опылению растений внутри линии

КОНТРОЛЬ ГИБРИДИЗАЦИИ В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ

Важнейшим аспектом гибридной селекции и гибридного семеноводства является контроль опыления/гибридизации. В производстве гибридных семян успех зависит от наличия эффективной, надежной, практичной и экономически оправданной системы контроля опыления/гибридизации.

Опыление/гибридизацию контролируют тремя основными способами:

1 Механический контроль

Механическая/ручная кастрация для производства гибридных семян у Пасленовых (кукуруза, томат, перец, баклажан)

2 Химический контроль

Химическая кастрация. Примеры гаметоцидов: Dalapon[®], Estrone[®], Ethephon[®], Hybrex[®], и Generis[®]. Применение этих агентов вызывает мужскую стерильность у растений, тем самым, предотвращая самоопыление материнской линии.

3 Генетический контроль

Биологические генетически предопределенные особенности цветения и размножения: двудомность, самонесовместимость и мужская стерильность, используют в качестве инструмента контроля гибридизации в гибридной селекции растений.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ КОНТРОЛЯ ОПЫЛЕНИЯ

В коммерческом гибридном семеноводстве большинства культур используют *генетические системы* контроля опыления:

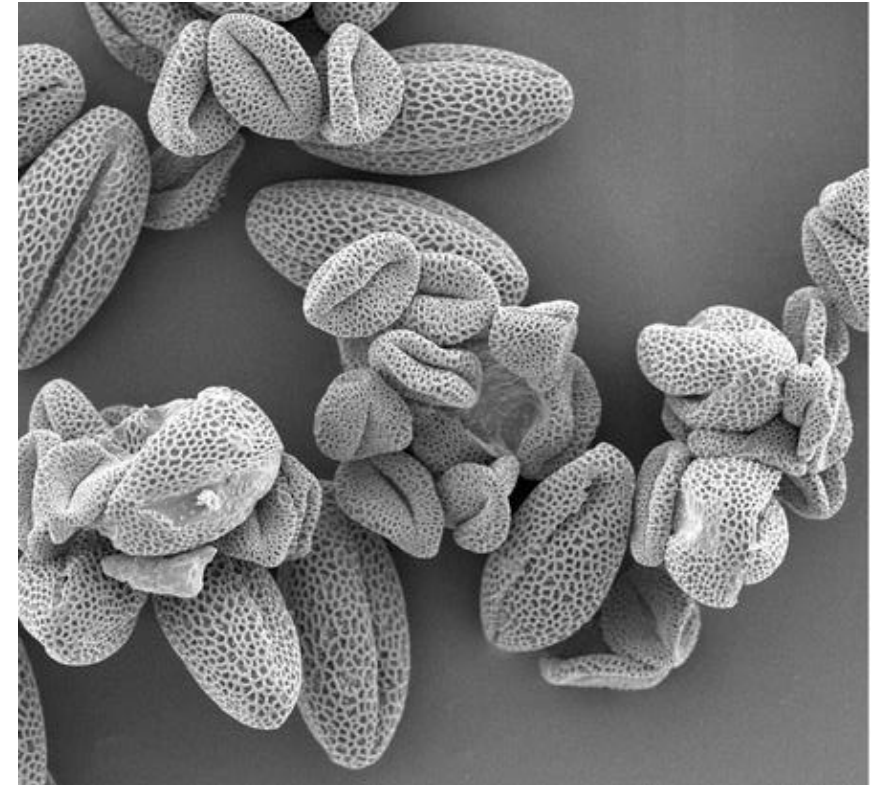
- мужская стерильность
- самонесовместимость
- генно-инженерные генетические системы «убийцы пыльцы» (“pollen killer”)

МУЖСКАЯ СТЕРИЛЬНОСТЬ

Мужская стерильность - это явление, при котором у растения пыльники или пыльца нефункциональны

Проявляется в виде отсутствия фертильной пыльцы, редукции мужских генеративных органов или отсутствия цветков или тычинок, или невозможности растрескивания пыльников

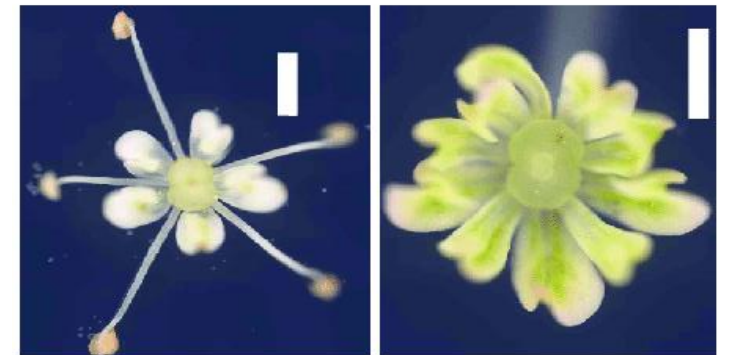
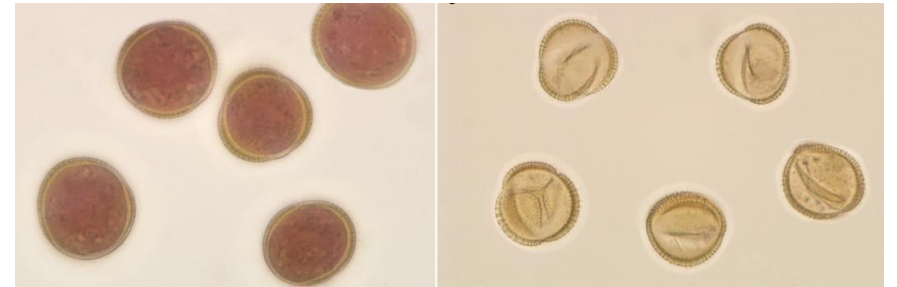
Мужская стерильность обеспечивает перекрёстное опыление при производстве семян F1 гибридов



МУЖСКАЯ СТЕРИЛЬНОСТЬ

Типы мужской стерильности:

- 1. Истинная мужская стерильность.** Связана с аномальным развитием микроспор и абортацией пыльцы у обоеполых цветков или с формированием однополых цветков, у которых отсутствуют тычинки у раздельнополых однодомных растений
- 2. Функциональная мужская стерильность.** Пыльники не растрескиваются, пыльца фертильна (Врбычанский тип, Джон Бер тип у томата)



ТИПЫ НАСЛЕДОВАНИЯ МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТИ

- а) **ядерная** МС, контролируемая только генами ядра (ЯМС), менделевское наследование
- в) **цитоплазматическая** МС, определяемая только генами цитоплазмы (ЦМС), наследование только по материнскому растению
- б) **ядерно-цитоплазматическая** МС, определяемая взаимодействием генов ядра и цитоплазмы (ЯЦМС), сложное наследование

Генотипические составляющие различных типов мужской стерильности

Тип мужской стерильности	Генотипы стерильных (S) растений	Генотипы фертильных (F) растений
Ядерная (рецессивная)	<i>msms</i>	<i>Ms-</i>
Цитоплазматическая	<i>S</i>	<i>N</i>
Ядерно-цитоплазматическая	<i>S rfrf</i>	<i>S Rf-, N Rf-, N rfrf</i>

ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ МУЖСКАЯ СТЕРИЛЬНОСТЬ

- ✓ Ядерный генетический контроль ЦМС преимущественно определяется одним или большим числом рецессивных генов, но может определяться доминантными генами, также полигенами
- ✓ Аберрантная рекомбинация митохондриальной ДНК приводит к модификации существующих генов или формированию новых, что определяет мужски стерильный фенотип

Недостатки:

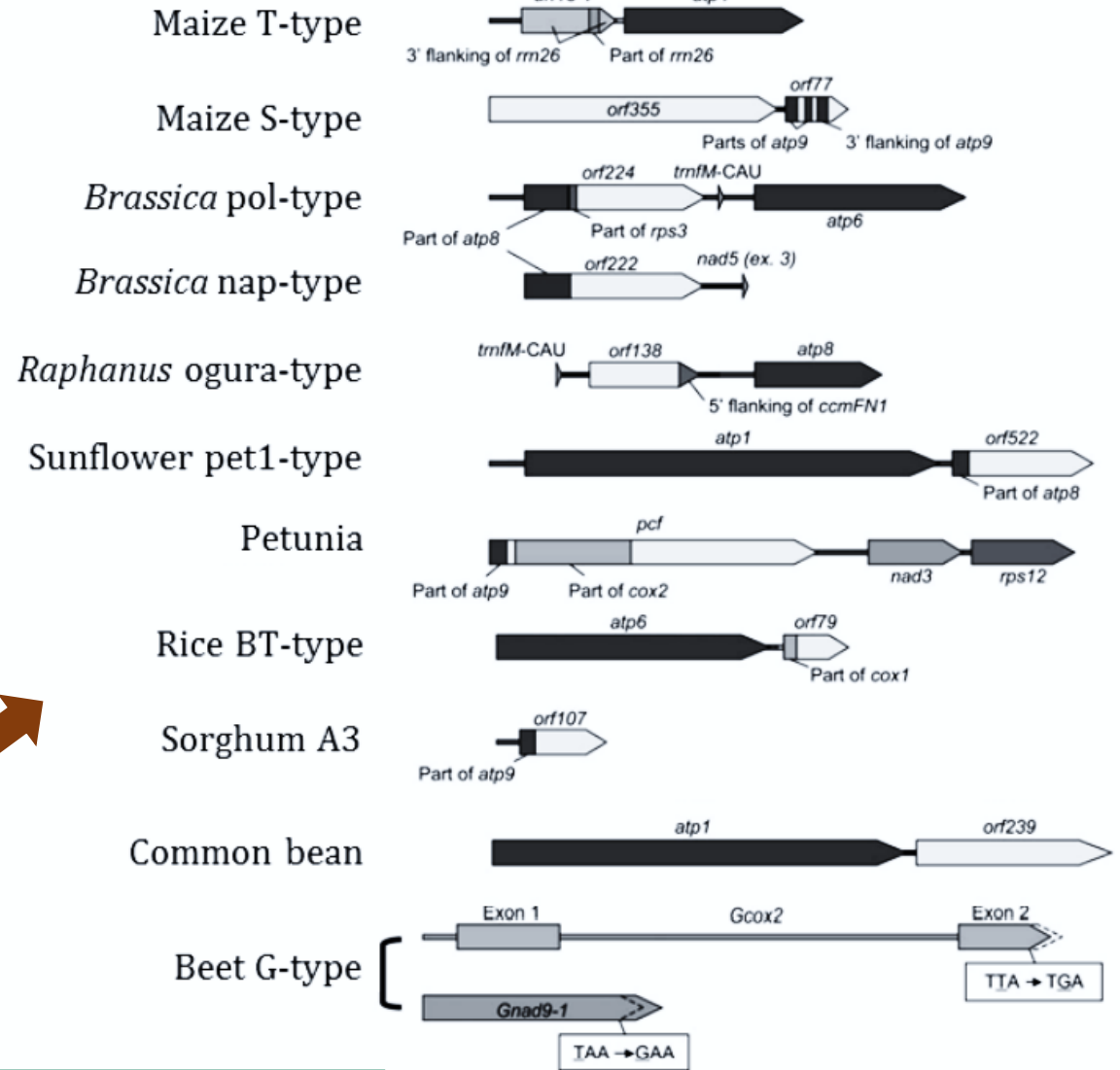
1. Недостаточная или нестабильная МС
2. Сложности с системой восстановления фертильности
3. Сложности в семеноводстве
4. Нежелательные плейотропные эффекты

Species name	Designation of the CMS systems	Origin of the CMS systems	Fertility restorer gene	Gene(s) responsible for respective CMS system	Differential expression between male-sterile and fertile mitochondrial genomes
<i>Beta vulgaris</i>	G	Spontaneous	<i>RfG1</i>	<i>nad9</i> and <i>coxII</i>	34.5-kDa protein encoded by <i>coxII</i>
	Owen	Spontaneous	<i>Rf1</i>	<i>coxII</i> , <i>Norf246</i>	Transcript variation, 35-kDa protein
<i>Brassica juncea</i>	Hau	Spontaneous	NA	<i>atp6</i>	<i>atp6/HindIII</i> band pattern variation
<i>Brassica napus</i>	Nap	Intraspecific	<i>Rfn</i>	<i>orf222/nad5c/orf139</i>	Transcript variation
	Ogura	Spontaneous (cybrids, a)	<i>Rfo</i>	<i>orf138</i>	1.4-kbp CMS-specific transcript
	Polima (pol) Tour	Intraspecific Unknown	<i>Rfp</i> <i>Rft</i>	<i>pol-orf (orf224)</i> <i>orf263</i>	Transcript variation 32-kDa protein
<i>Helianthus annuus</i>	CMS3	Interspecific	NA	<i>coxIII</i> and <i>atp6</i>	14, 18 and 38-kDa protein
	CMS89	Interspecific	NA	<i>orfH522</i> , <i>orfC</i>	16-kDa protein, 15-kDa protein
<i>Lolium perenne</i>	PET1	Interspecific	<i>Rf1</i>	<i>orfH522</i>	16-kDa protein
	MSL	Mutagenesis	NA	NA	NA
	Unknown	Interspecific	NA	<i>atp6</i> and <i>coxI</i>	Transcript variation
<i>Oryza sativa</i>	Unknown	Intergeneric	NA	<i>atp9</i>	45-kDa protein
	Bo	Spontaneous (cybrids, c)	<i>Rf1</i>	<i>B-atp6</i>	Transcript variation
	BT WA	Interspecific Interspecific or inter-racial	<i>Rf1</i> or <i>lfr1</i> <i>Rf4</i>	<i>atp6-orf79</i> <i>orf156</i> , <i>orfB</i>	2.0-kbp transcripts Transcript variation
<i>Petunia parodii</i>	CMS3688	Spontaneous (cybrids, b)	<i>Rf</i>	<i>S-pcf</i>	25-kDa protein
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Sprite	Intraspecific	<i>Fr</i> or <i>Fr2</i>	<i>pvs-atpA</i>	Transcript variation
<i>Raphanus sativa</i>	Ogura	Spontaneous	<i>Rfo</i>	<i>atp6</i>	Transcript variation
<i>Sorghum bicolor</i>	A3 (IS1112C)	NA	<i>Rf3</i> and <i>Rf4</i>	<i>orf107</i>	Transcript variation
	Milo (A1)	Intraspecific	<i>Rf1</i> and <i>Rf2</i>	<i>coxI</i>	38-kDa protein
	9E	Intraspecific	NA	<i>coxI</i>	42-kDa protein
<i>Secale cereale</i>	Pampa (P)	Spontaneous	<i>Rfp1</i> and <i>Rfp2</i>	<i>pol-r</i>	Transcript variation
	Gülzow (G)	Spontaneous	<i>Rfg1</i>	NA	NA
<i>Zea mays</i>	C	Spontaneous	<i>Rf4</i> , <i>Rf5</i> and <i>Rf6</i>	<i>atp6</i> , <i>atp9</i> and <i>coxII</i>	Transcript variation
	S	Spontaneous	<i>Rf3</i>	<i>orf355</i> or <i>orf77</i>	130-kDa protein (S2)
	T	Spontaneous	<i>Rf1</i> and <i>Rf2</i>	<i>T-urf13</i>	13-kDa protein

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ CMS

Генетически определяется взаимодействием генов ядра и абберантных митохондриальных генов (образуются в результате частых перестроек митохондриального генома), нарушающие нормальное функционирование митохондрий и процесс микроспорогенеза.

Химерные гены ассоциированные с цитоплазматической мужской стерильностью



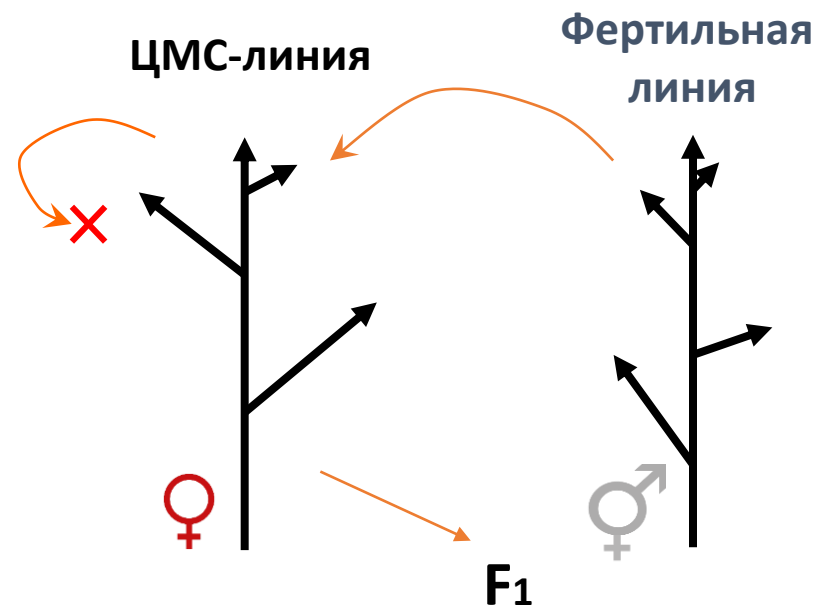
ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ МУЖСКАЯ СТЕРИЛЬНОСТЬ

ЦМС является частным случаем ядерно-цитоплазматической, когда в популяции используемых для скрещивания со стерильной формой нет растений, содержащих специфичный ген-восстановитель фертильности.

Для растений, продуктивным органом которых является вегетативная часть (кочан, корнеплод, лист, черешок), ЦМС-система может быть использована без восстановителей фертильности.

Для культур, продуктивным органом которых являются репродуктивные органы (плоды, семена), фертильность гибридного потомства должна быть восстановлена генами-восстановителями фертильности отцовской линии, или андростерильные гибриды должны быть опылены.

Принцип производства гибридных семян на основе ЦМС



- Самоопыление МС линии невозможно
- Фертильную отцовскую линию удаляют с семенного участка после опыления

ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ МУЖСКАЯ СТЕРИЛЬНОСТЬ

а. Автоплазматическая

ЦМС возникшая в результате возникновения и накопления спонтанной мутации в митохондриальной ДНК вида

б. Аллоплазматическая

ЦМС возникшая в результате половой или соматической межродовой, межвидовой гибридизации. Объясняется несовместимостью или плохим взаимодействием ядерного генома одного вида и органельным геномом другого.

МОРФОЛОГИЯ

- ✓ Разнообразна (полное отсутствие мужских генеративных органов – формирование нормальных тычинок с фертильной пылью, неспособной к высвобождению)
- ✓ ЦМС растения не отличимы от фертильных, за исключением строения цветка
- ✓ Мужски стерильные цветки как правило меньше по размеру в сравнении с фертильными
- ✓ Размер тычинок в основном уменьшен

фертильные

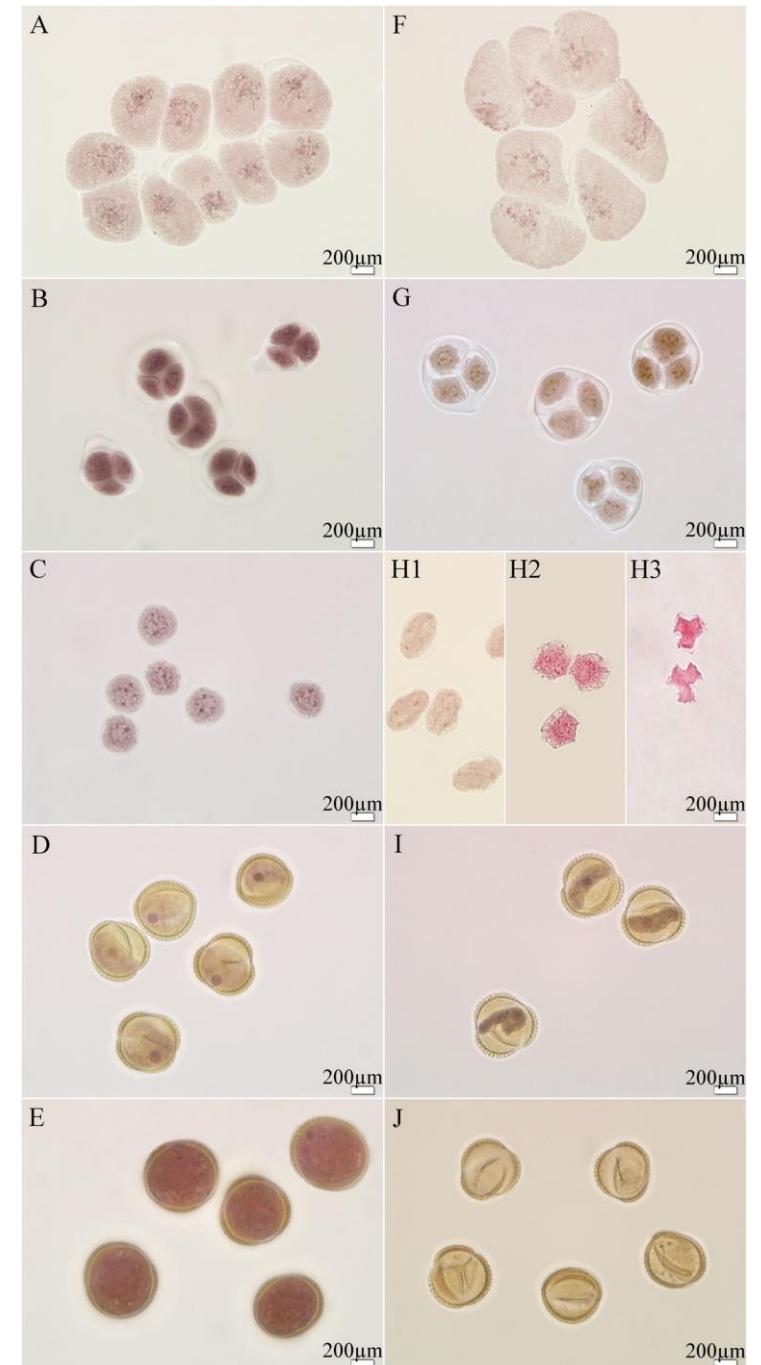
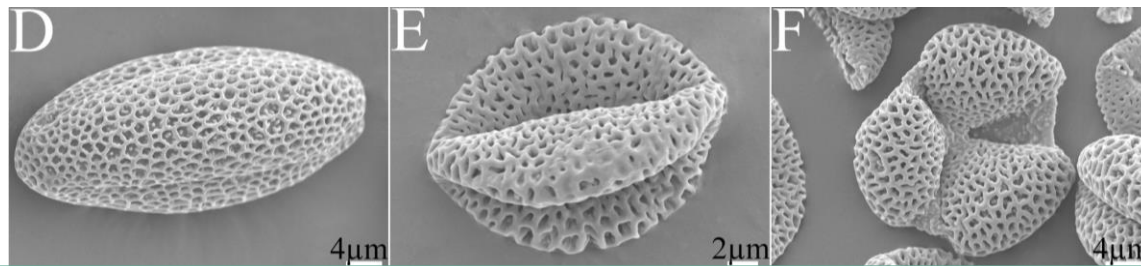
стерильные



ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ

Нарушение микроспорогенеза может происходить в различных пре- и постмейотических стадиях:

- ✓ во время мейоза
- ✓ формирования тетрад
- ✓ высвобождения микроспор из тетрад (растворение каллозы)
- ✓ в стадии микроспор
- ✓ в стадии зрелой или почти зрелой пыльцы



ЦМС В СЕЛЕКЦИОННОЙ СХЕМЕ

- ✓ ЦМС обеспечивает механизм контроля опыления растений, что позволяет производить в промышленных масштабах семена коммерческих F1-гибридов
- ✓ Включает мужски стерильную линию (линия А), изогенную линию закрепитель стерильности (линия В), и при необходимости линию восстановитель фертильности (линия R)
- ✓ Линию А создают 4-6 кратным беккроссированием отобранной линии В с донором ЦМС
- ✓ Линию R создают 4-6 кратным беккроссированием линии с донором генов восстановителей фертильности

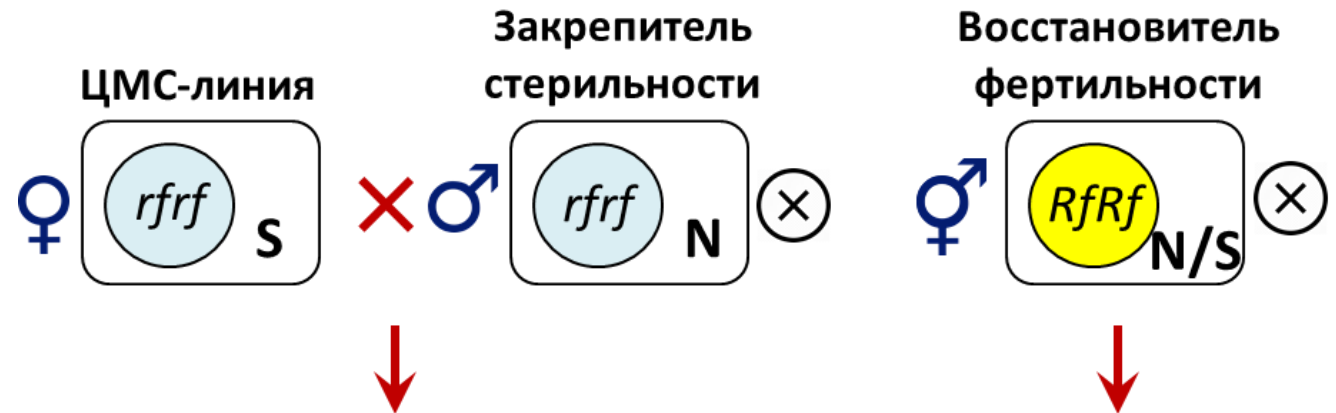
1 создание исходного материала
2 создание чистых линий
3 оценка КС линий, отбор ГК
4 беккроссирование, **создание изогенных пар: фертильная линия – ЦМС-аналог; создание линии восстановителя фертильности**



ТРЕХЛИНЕЙНАЯ СХЕМА СЕМЕНОВОДСТВА НА ОСНОВЕ ЦМС с восстановлением фертильности

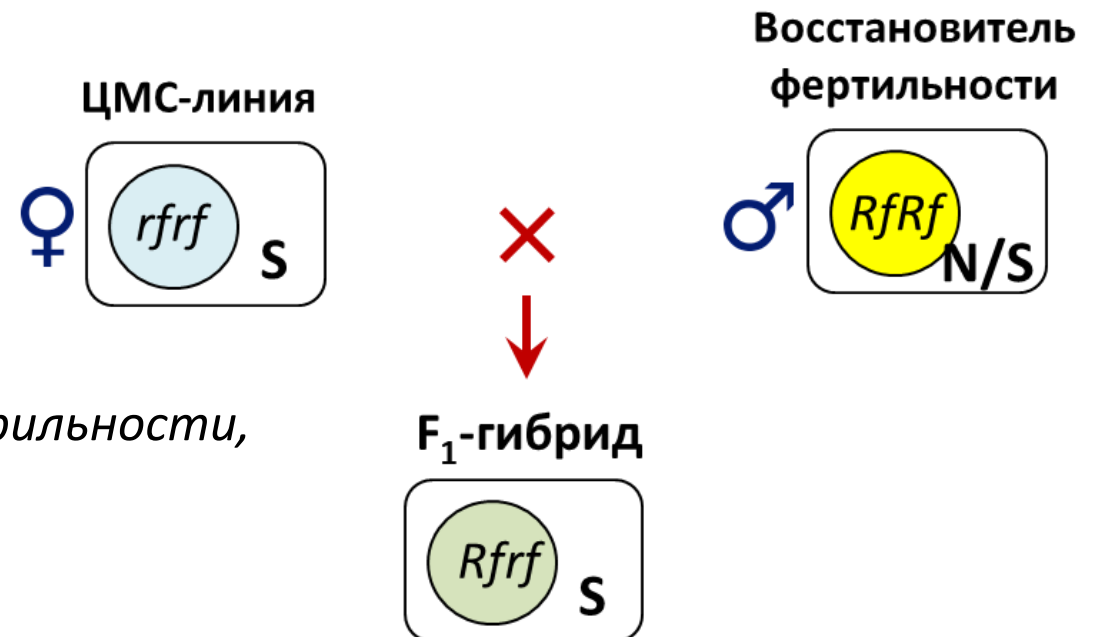
1 этап

Поддержание и размножение
родительских линий



2 этап

Производство F₁-гибридных
семян



S – цитоплазма с генами стерильности,

N – нормальная цитоплазма, без генов стерильности,

rf – ядерный ген стерильности,

Rf – ядерный ген фертильности

ТРЕХЛИНЕЙНАЯ СХЕМА СЕМЕНОВОДСТВА НА ОСНОВЕ ЦМС **без** **восстановления** фертильности

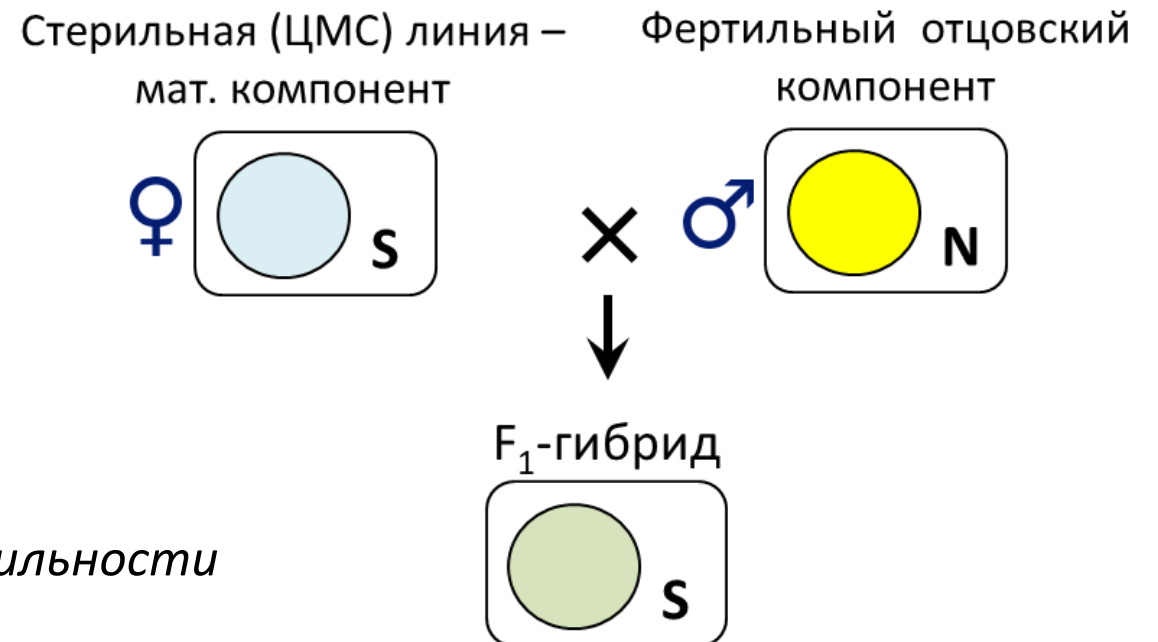
1 этап

Поддержание и размножение
родительских линий



2 этап

Производство F1-гибридных семян



S – цитоплазма с генами стерильности,

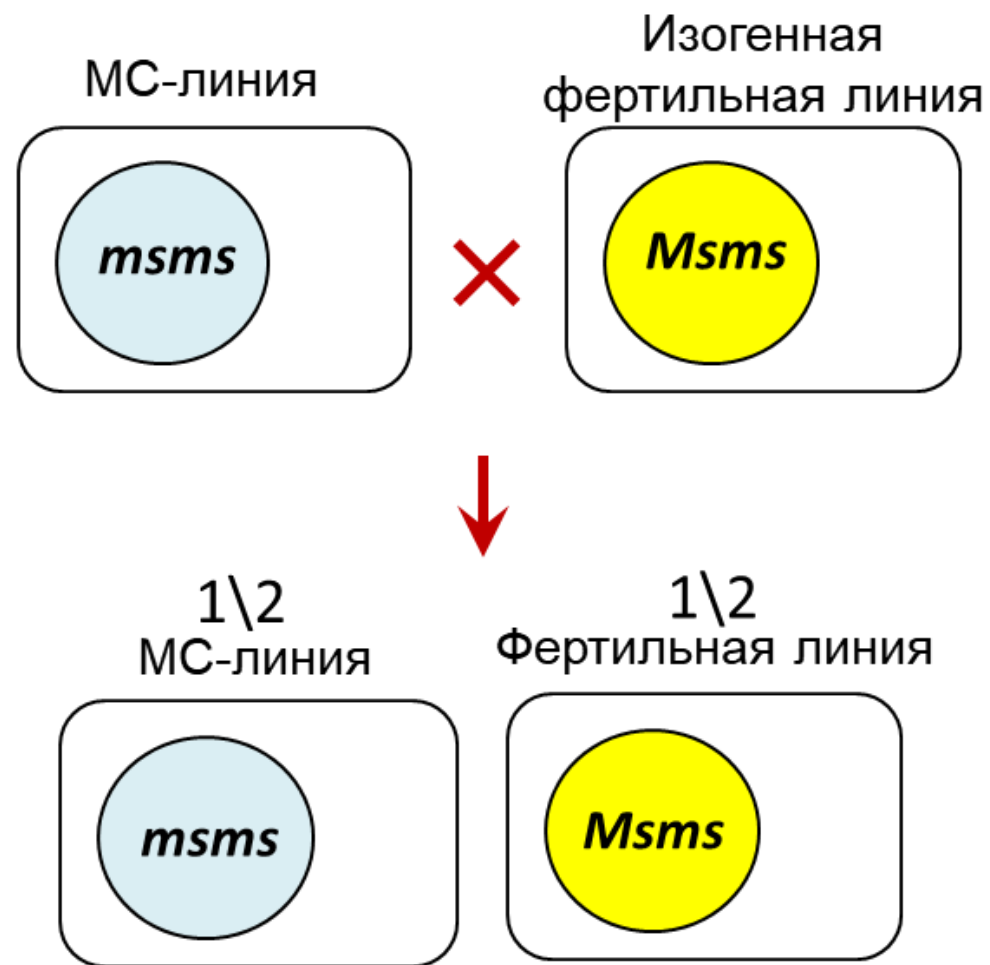
N – нормальная цитоплазма, без генов стерильности

ЯДЕРНАЯ МУЖСКАЯ СТЕРИЛЬНОСТЬ

Определяется одним или несколькими рецессивными генами *ms* в гомозиготном состоянии, реже - доминантными *Ms*

При размножении стерильной линии потомство от скрещивания стерильных растений с фертильным аналогом, несущим гетерозиготу *Msms*, представляет собой популяцию стерильных и фертильных растений в соотношении 1:1.

Рецессивная стерильность может быть использована, если стерильные и фертильные растения легко различимы на ранних стадиях, например с использованием молекулярных маркеров, сцепленных с геном мужской стерильности.



ЯДЕРНАЯ МУЖСКАЯ СТЕРИЛЬНОСТЬ – ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ МУЖСКАЯ СТЕРИЛЬНОСТЬ (ФМС)

Функциональная мужская стерильность – явление, при котором пыльники, содержащие фертильную пыльцу, не вскрываются и самоопыление не происходит

ФМС – частный случай ядерной мужской стерильности, открытый и используемый в селекции F1 гибридов **томата**

Типы ФМС томата :

1. Тип «Джон Бер», лепестки на 2/3 срастаются с тычинками, цветок полностью не раскрывается, в пыльниках не образуются продольные щели, пыльца не высыпается, контролируется рецессивным геном *rs* на 2-й хромосоме
2. Тип «Врбычанский низкий», пыльники не вскрываются, при этом цветки имеют нормальную морфологию, контролируется рецессивным геном *rs-2* на 4-й хромосоме



Недостатки

в конце вегетации, в период жаркой и сухой погоды возможно вскрытие пыльников, самоопыление; при гибридном семеноводстве – причина засорения гибридных семян

ЖЕНСКИЙ ТИП ЦВЕТЕНИЯ, CASE: ОГУРЕЦ

ЖТЦ – явление, при котором у однодомных раздельнополых растений преобладают или формируются только женские цветки

Явление впервые обнаружено Н.Н. Ткаченко в 1929 г.

Генетика пола огурца: три гена, сочетание доминантных и рецессивных гомозигот которых определяют пять типов его проявления.

MMFF-гиноэцийный — все цветки женские

mmFF-гермафродитный — все цветки обоеполые

MMff-моноэцийные — цветки мужские и женские

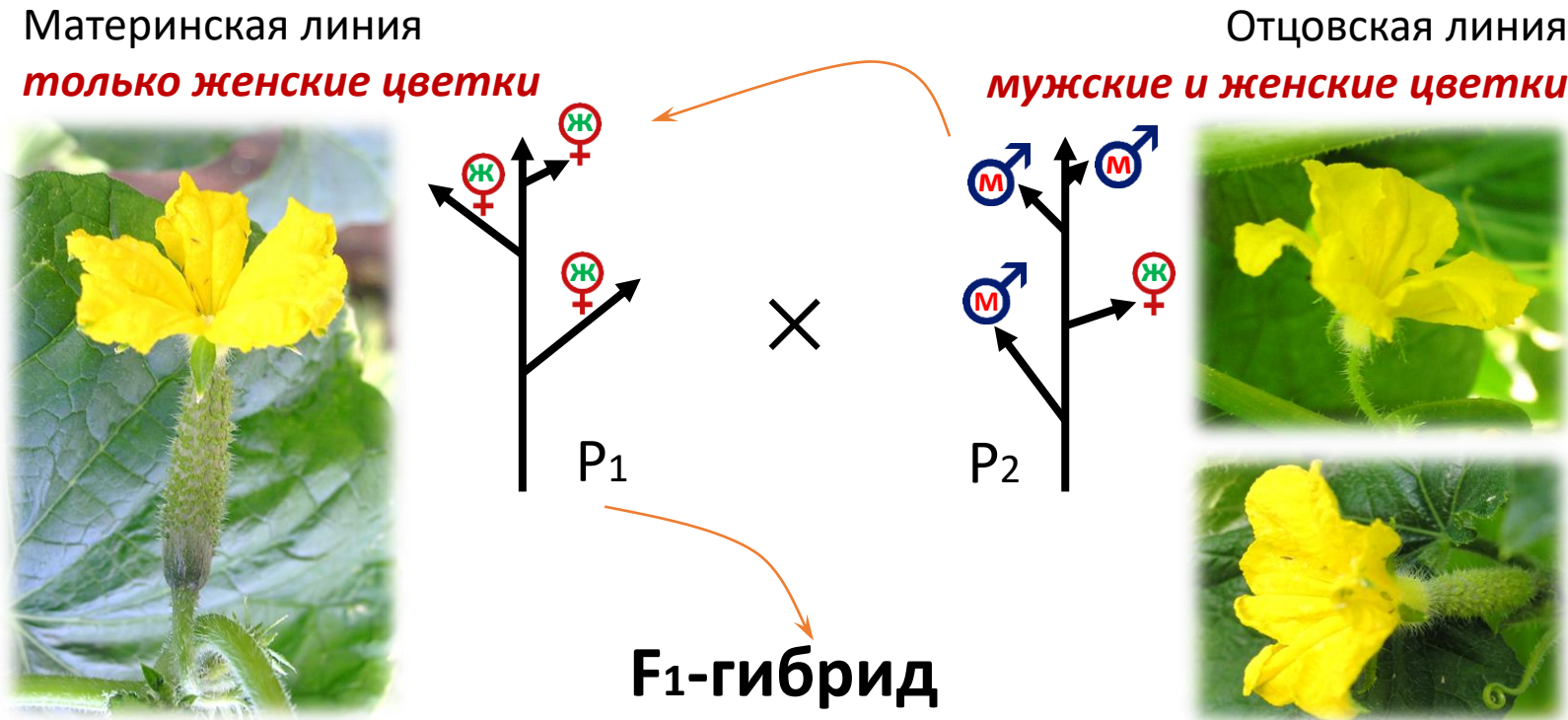
mmff-андромоноэцийные — цветки обоеполые и мужские

aa - - - андрозэцийные — все цветки мужские

Активность генов/проявление пола зависит от условий среды, генотипа сорта и генов-модификаторов; слабая освещенность и низкая температура способствуют увеличению числа женских цветков на растении.

ПРОИЗВОДСТВО ГИБРИДНЫХ СЕМЯН НА ОСНОВЕ ЖЕНСКОГО ТИПА ЦВЕТЕНИЯ

Используется в селекции F1-гибридов огурца *Cucumis sativus* (потенциально у всех *Cucurbitaceae*)



Размножение линий с женским типом цветения проводят самоопылением мужскими цветками, стимулируемыми к образованию опрыскиванием растений раствором нитрата серебра или гиббереллина

МЕХАНИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ОПЫЛЕНИЯ – РУЧНАЯ КАСТРАЦИЯ

Кастрация материнских линий при производстве гибридных семян кукурузы



МЕХАНИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ОПЫЛЕНИЯ – РУЧНАЯ КАСТРАЦИЯ

Кастрация материнских линий при производстве гибридных семян кукурузы





Химически индуцированная мужская стерильность

Монахос Сократ

ТРЕБОВАНИЯ К ХИМИЧЕСКОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ

- Высокая эффективность и селективность
- Стабильность действия во время развития цветка или колоса
- Низкая стоимость
- Допустимые уровни токсичности для людей и окружающей среды
- Низкая общая фитотоксичность
- АгронOMICESкие показатели полученных гибридных семян не уступают, полученным генетическими методами

СНАs И РАЗВИТИЕ ПЫЛЬЦЫ

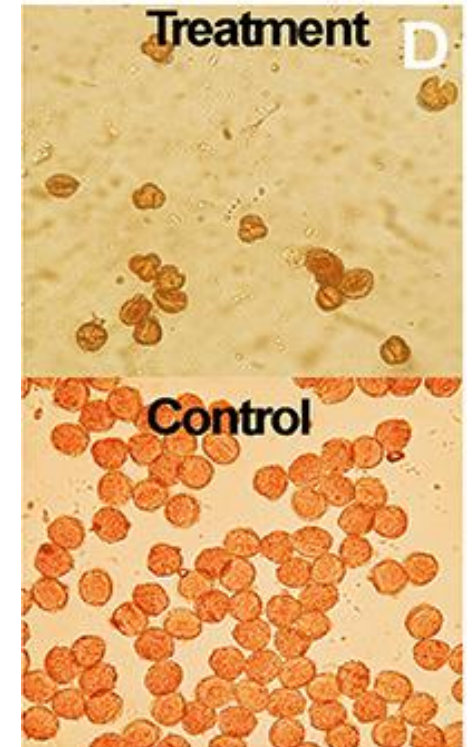
Пыльца возникает в результате последовательной и определенной программы развития в пыльнике. Эти программы контролируются биохимически и могут подвергаться воздействию одного или нескольких химических агентов.

Существует как минимум **4 класса химических агентов**:

- а. Регуляторы роста растений и вещества, нарушающие развитие цветков
- б. Метаболические ингибиторы
- с. Ингибиторы развития микроспор
- д. Ингибиторы фертильности пыльцы

ХИМИЧЕСКИЙ ГИБРИДИЗИРУЮЩИЙ АГЕНТ (СНА)

- Может быть использован в промышленном коммерческом производстве гибридных семян
- Применяются только на определенной критической стадии развития мужского гаметофита
- Их действие может быть результатом целого ряда механизмов:
 1. Избирательное гаметоцидное действие на мужские гаметы или ингибирование развития пыльников
 2. Селективный перенос токсичных или ингибирующих рост веществ в пыльники
 3. Метаболическая детоксикация токсичных или ингибирующих рост веществ после того, как они подавили мужскую фертильность





Мужская стерильность посредством технологии рекомбинантной ДНК

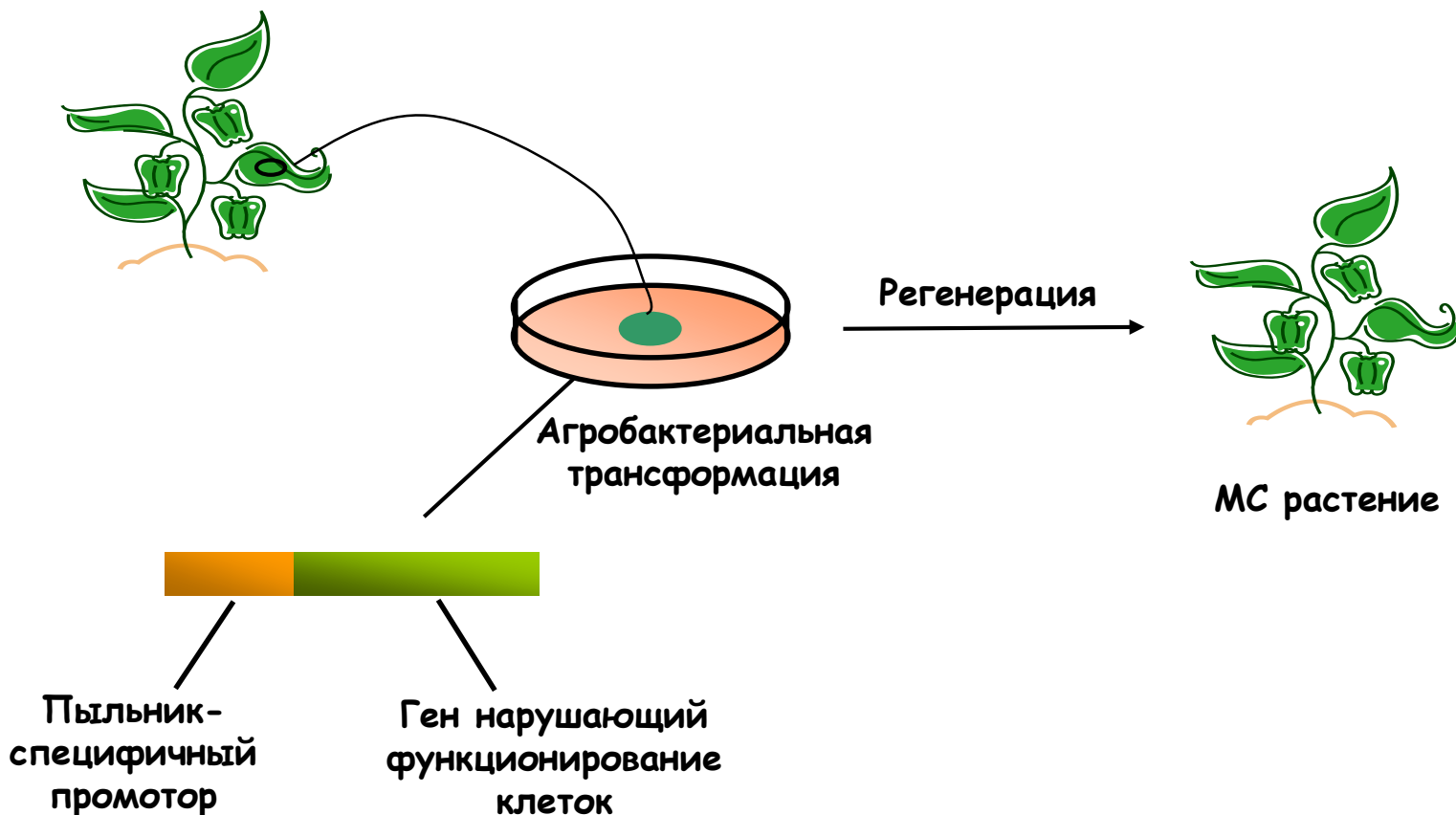
Монахос Сократ

ГЕНО-ИНЖЕНЕРНАЯ МУЖСКАЯ СТЕРИЛЬНОСТЬ

Доминантная ядерная мужская стерильность (ЯМС)

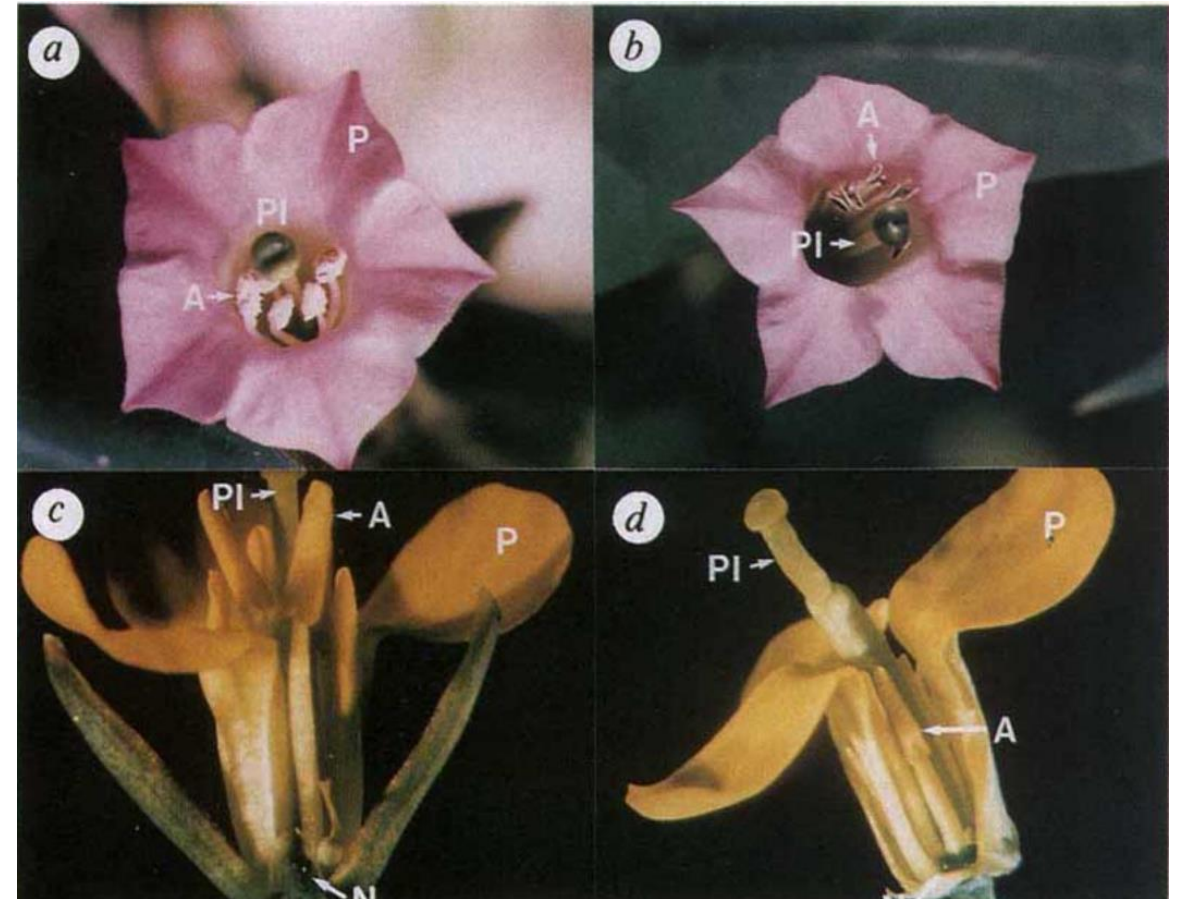
Экспрессия гена, кодирующего цитотоксин, под контролем пыльник-специфичного промотора (промотора гена TA29)

Экспрессия гена, кодирующего рибонуклеазу (химически синтезированный ген РНКазы-T1 из *Aspergillus oryzae* и природного гена барназы из *Bacillus amyloliquefaciens*)



ГЕННО-ИНЖЕНЕРНАЯ МУЖСКАЯ СТЕРИЛЬНОСТЬ

Выработка РНКазы приводит к преждевременной дегенерации клеток тапетума, остановке развития микроспор и мужской стерильности



Mariani, C., Beuckeleer, M., Truettner, J. *et al.* Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* **347**, 737–741 (1990). <https://doi.org/10.1038/347737a0>

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

Вопросы?