

ОСОБЕННОСТИ ЦМС У ГИБРИДОВ ОЗИМОГО РАПСА УКРАИНСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

А.Д. Лисняк, А.Ф. Першин, М.В. Иванов

Институт масличных культур НААН

На основе комплексного цитологического и генетического изучения селекционного материала ИМК НААН с целью определения закономерностей функционирования системы ЦМС-Rf озимого рапса выявлено, что все три исходных типа ЦМС *B-009*, *CMS-301* и *CMS-305* относятся к типу *CMS-ogura*. Установлена доминантная моногенная природа восстановления фертильности у гетерозисных гибридов – действие гена *Rfo*. Уровень глюкозинолатов у гибридных потомств различных поколений имеет жёсткое генетическое сцепление со степенью восстановления фертильности, независимо от генетического фона и исходных родительских форм.

Ключевые слова: гетерозис, гибрид, глюкозинолаты, рапс озимый, цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС).

Введение. У главных сельскохозяйственных культур, у которых широко используются гетерозисные гибриды (кукуруза, подсолнечник, рапс), открыто и мобилизовано по нескольку типов ЦМС. Разности в их функционировании определяют как различные пути селекционного создания родительских линий, так и особенности семеноводства на участках гибридизации [1]. У озимого рапса селекционные программы по созданию гибридов базируются на таких основных типах ЦМС: *CMS ogura* (Франция), *CMS polima* (Китай) и *MSL-CMS* (патент „NPZ Lembke”, Германия), а также *CMS napus*, и *CMS junsea* [2]. Украинская программа в Институте масличных культур НААН имеет в своей основе ЦМС-источники, полученные из Института овощных и полевых культур г. Нови Сад (Сербия), которые представляли собой гетерогенные селекционные семьи без точной идентификации типа плазмы. Поэтому реализация собственной украинской селекционной программы по выведению гетерозисных гибридов озимого рапса потребовала проведения работы по цитолого-эмбриологическому и генетическому анализу восстановления фертильности имеющейся системы ЦМС-Rf.

Целью нашей работы была идентификация типов ЦМС селекционного материала, установление особенностей восстановления их фертильности и наследования основных хозяйственных признаков. Только наличие такой информации могло помочь созданию эффективной селекционной программы по выведению гетерозисных гибридов.

Материал и методы исследований. Источниками ЦМС послужили пять селекционных потомств: ([*B-009* x *Falcon*] x *Alligator*), ([*B-009* x *Falcon*] x *Orkan*), ([*B-009* x *Sremica*] x *Valeska*), (*CMS-305* x *Banacanka*) и (*CMS-301* x *Sremica*), полученных в 2004 году из Института овощных и полевых культур, г. Нови Сад (Сербия). Материал отличался крайней неоднородностью как по морфологии, так и по доле стерильных растений. На этой основе за шесть лет были получены беккросные потомства самоопыленных линий с устойчивой

100% стерильністю. В 2007 году среди расщепляющихся по стерильности образцов также удалось выделить фертильные растения, имеющие восстановительную способность. Их самоопыление и гибридизация дали нам за два года более 120 семей, из которых получена линия-восстановитель фертильности RRF. Она характеризовалась не только способностью восстанавливать фертильность в получаемых с ней гибридах, но и высоким уровнем глюкозинолатов: 40-65 мкМоль/г. Однако у рапса пищевого направления, так называемого «двунулевого» качества, допускается не более 20-25 мкМоль/г, поэтому с 2008 г. начата селекционная работа по выведению отцовских линий улучшенного биохимического качества.

Генетический анализ проводили на селекционном материале, который позволил сделать это из-за индивидуального описания каждого растения, а также из-за принципа формирования гибридных семей: отдельная делянка – потомство одного растения. Каждая семья насчитывала от 10 до 28 растений, в среднем – 16-17. Недостаточность растений в каждой семье для корректного статистического анализа компенсировали большим количеством подобных (однотипных) семей, данные по которым суммировали в процессе генетического анализа. Для минимизации и контроля средовых отличий весь материал высевали единым блоком.

Гибридологический анализ проводили стандартными статистическими методами. Соответствие гипотез фактическим данным расщепляющихся семей оценивали по критерию Пирсона «хи-квадрат» [3].

Биохимический анализ материала проводили в лаборатории биохимии и массовых анализов ИМК НААН. Пробы семян для него брали как среднюю пробу с делянки.

Результаты исследований и их обсуждение. Определение типа ЦМС начали с цитолого-эмбриологических исследований [4]. Выявили три различных механизма реализации эффекта ЦМС у озимого рапса. У MSL-типа наблюдали гипертрофию клеток тапетума, развивающуюся в пре-мейотический – ранний мейотический период. В отличие от него, на плазмах CMS-301 и CMS-305, которые показали идентичный друг другу механизм: гипертрофия клеток тапетума протекала в постмейотическом периоде. У стерильных растений на плазме В-009 не наблюдали никаких морфофункциональных отклонений в развитии тапетума. Стерильность в данном случае была обусловлена не реорганизацией тапетума, а нарушением целостности микроспор с последующим их лизисом.

Выявленные различия механизма формирования ЦМС между В-009 и CMS-301, CMS-305 постоянно учитывали при тестировании восстановительной способности материала на всех этапах работы. С 2005 по 2011 гг. испытали сотни гибридов коллекционного материала различного происхождения с этими типами плазмы. Все они имели 100% стерильность. Восстановление фертильности наблюдали только при скрещиваниях с линией RRF или с гибридами на её основе. Более того, в ходе селекционных и генетических работ многократно реализовывали ситуацию, когда пыльцу одного и того же растения-восстановителя брали для скрещиваний с линиями на разных плазмах (В-009, CMS-301 и CMS-305). Результаты внутри пар таких скрещиваний всегда были идентичны: либо полное восстановление фертильности, либо расщепление 1:1. Следовательно, все три плазмы имеют одинаковый механизм восстановления фертильности. Такая ситуация, когда при единых генах восстановления фертильности наблюдаются эмбриологические различия в онтогенезе этого

признака, описана в литературе только для типа CMS-ogura [5], что делает его наиболее вероятным источником для всех наших трех доноров стерильности.

В рамках программы по биохимическому улучшению линии RRF её скрестили с наилучшими по качеству сортами: уровень глюкозинолатов 14-18 мкМоль/г, содержание эруковой кислоты в масле – 0%. Скрещивания провели с использованием ручной кастрации линии RRF, что позволило сохранить у последующих гибридов её стерильную цитоплазму и эффективно контролировать наличие генов-восстановителей *Rf* в следующих поколениях.

В гибридах поколения F_1 уровень глюкозинолатов имел промежуточные значения между родителями, и составлял 25-40 мкМоль/г. Во всех 54 семьях поколения F_2 , испытанных в 2009 г., наблюдали доминантное моногенное наследование восстановления фертильности, классическое менделевское расщепление 3:1 (табл.1).

Таблица 1

**Соответствие фактических данных математической модели 1:3
в семьях F_2**

Математическая модель (1:3) фенотипического расщепления 0,25:0,75				Соответствие модели, P
Диапазон доли стер.раст.	Количество семей	Раст. всего	Диапазон χ^2	
0,10-0,14	6	128	0,86-2,68	0,35-0,10
0,15-0,21	16	357	0,46-1,28	0,50-0,25
0,22-0,30	24	501	0,00-0,46	1,00-0,50
0,31-0,45	8	149	0,33-2,97	0,55-0,10

Моногенную модель проверили в 2010 году, когда были высеяны тест-гибриды всех трех стерильных плазм непосредственно с линией RRF. Всего было испытано 44 гибрида F_1 , 15 из которых были полностью восстановленными, а остальные 29 имели ожидаемое при моногенном наследовании расщепление 1:1 (табл. 2). Таким образом, было подтверждено наличие одного доминантного гена восстановления фертильности *Rf*.

Таблица 2

**Соответствие фактических данных математической модели 1:1
в тест-гибридах F_1**

Математическая модель (1:1) фенотипического расщепления 0,50:0,50				Соответствие модели, P
Диапазон доли стер.раст.	Количество семей	Раст. всего	Диапазон χ^2	
0,33-0,44	9	192	0,25-1,39	0,60-0,25
0,45-0,55	14	305	0,00-0,14	1,00-0,70
0,56-0,65	6	122	0,15-0,58	0,70-0,50

Среди 54 потомств только 26 принадлежали растениям с полным восстановлением фертильности на всех генетических фонах, и только они были взяты в дальнейшую работу. Каждое из фертильных растений F_2 самоопылили и в 2010 г. испытали 709 потомств F_3 .

Среди этих потомств отобрали такие, у которых уровень глюкозинолатов составлял менее 30 мкМоль/г, и при этом они имели восстановленные фертильные растения. Таких делянок было 80 из 709; от них получили самоопыленные потомства. Те из них, где доля фертильных растений превышала 50%, также использовали для получения тест-гибридов со стерильными материнскими ЦМС-линиями. Всего было получено 378 самоопыленных семей поколения F_4 и 170 тест-гибридов. Они были изучены в 2011 г.

Среди 170 тест-гибридов 42 расщеплялись по признаку мужской стерильности. Соотношение стерильных и фертильных растений у них в целом составило 52% к 48%. Критерий Пирсона χ^2 соответствия этих данных теоретическому соотношению 50% : 50% составил $\chi^2=0,80$, что соответствует $P=0,40$. Данный критерий был намного ниже стандартного уровня $\chi^2=3,84$ при $P=0,05$. Это свидетельствовало о том, что имеющиеся отличия носили случайный характер. Следовательно, моногенная модель подтверждалась в каждом поколении. Причем, расщепление фиксировали и у соответствующих потомств F_4 от растений, послуживших отцовскими формами этих гибридов, что тоже предусмотрено моделью.

Уровень глюкозинолатов составил 25-40 мкМоль/г у обеих групп образцов со средними 27,6±6,0 мкМоль/г у тест-гибридов и 28,9±5,6 мкМоль/г у самоопыленных потомств. Статистически достоверной разницы между ними не было. Уровень глюкозинолатов остальных, полностью восстановленных, гибридов составлял 30-60 мкМоль/г со средней 37,9±5,8. Соответствующие им самоопыленные потомства F_4 имели среднюю 46,6±11,6 мкМоль/г и размах изменчивости 40-65 мкМоль/г. Эти данные практически целиком совпали с параметрами линии RRF и её гибридов F_1 . Таким образом, не смотря на то, что уровень глюкозинолатов у родительских форм составлял всего 14-18 мкМоль/г, и для получения потомств F_4 использовали F_3 -делянки с уровнем менее 30 мкМоль/г, содержание глюкозинолатов у потомств F_4 со свойством полного восстановления фертильности вновь достигло максимальных 40-65 мкМоль/г. После четырёх поколений отборов из гетерогенного материала в сторону наименьших значений содержания глюкозинолатов, генетическая система, тем не менее, вернулась к своему исходному состоянию. Это прямо указывает на полное генетическое сцепление обоих признаков, на практически полное отсутствие комбинационной изменчивости между ними.

Приведенные данные полностью соответствуют предположению, что наши три источника ЦМС относятся к типу CMS-ogura, выведенному на цитоплазме редьки. В одном и том же опыте был получен не только эффект ЦМС, но также и эффект восстановления фертильности [6]. Восстановление связано с хромосомой редьки, которая интегрирована в геном рапса. Между нею и гомологичной ей рапсовой хромосомой нет конъюгации и кроссинговера в мейозе, что приводит к полному отсутствию комбинаторики между ними [7-9]. Поэтому локализованный в хромосоме редьки ген восстановления фертильности *Rfo* здесь прочно ассоциирован с сотнями других генов, в том числе и с пулом генов синтеза глюкозинолатов. Следовательно, решение проблемы совмещения восстановления фертильности и требуемого низкого уровня глюкозинолатов не

может быть осуществлено при стандартном подходе комбинирования обоих признаков в потомстве от родителей – источников этих двух признаков. Следует либо использовать мутагенез для разрушения генов синтеза глюкозинолатов в самой речечной хромосоме, либо найти механизмы ингибирования этого синтеза продуктами генов других хромосом рапса, либо использовать иные подходы.

Выводы. Весь комплекс данных многолетнего изучения особенностей ЦМС, использующейся в селекционной программе гибридов озимого рапса в ИМК НААН, прямо указывает на то, что все три различных исходных источника В-009, CMS-301 и CMS-305 относятся к типу CMS-ogura. Установленная нами доминантная моногенная природа восстановления фертильности является проявлением известного в мировой научной литературе идентифицированного гена *Rfo*, находящегося в хромосоме редьки, интегрированной в геном рапса. Это не только объясняет обнаруженный нами факт прочного сцепления признаков восстановления и высокого уровня глюкозинолатов, но и позволяет наметить новые, альтернативные пути решения имеющейся селекционной проблемы.

Литература.

1. Hanson M.R., Bentolila S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. //The Plant Cell . – 2004. –16, – P.154-169.
2. Fan Z., Stefansson B.R., Sernyk J.L. Maintainers and restorers for three male sterility inducing cytoplasmic in rape (Brassica napus L.)// Canad. J. Plant Sci. – 1986. – 66. – P.229-234.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М: Высшая школа, 1990, – 352 с.
4. Плетень С.В. Эмбриологические особенности реализации различных типов ЦМС у рапса и подсолнечника: Материалы международной конференции: [«Биология развития: морфогенез репродуктивных структур и роль соматических, стволовых клеток в онтогенезе и эволюции»...] / М.В. Иванов, А.Ф. Першин, А.Д. Лисняк (С.-Пб, 13-16.12.2010 г.). – С. 104-106.
5. Gourret J.P., Delourme R., Renard M.. Expression of ogu cytoplasmic male sterility in cybrids of Brassica napus.// Theoretical and Applied Genetics. – 1992. – 83. – P. 549-556.
6. Bannerot, H., Bouldard, L., Couderon, Y. & Temple, J. Transfer of cytoplasmic male sterility from Raphanus sativus to Brassica oleracea. In: Wills, A.B. & North, C. (Eds) Proceedings Eucarpia Meeting of Cruciferae. Scottish Horticulture Reserch Institute, Invergavrie, UK,1974 - pp 52-54.
7. Brown, G.G. Unique aspects of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in Brassica napus. Journal of Heredity, 1999 - 90, 351-356.
8. Brown, G.G., Formanová, N., Jin, H., Wargachuk, R., Dendy, C., Patil, P., Laforest, M., Cheung, W. & Landry, B.S. The radish *Rfo* restorer gene of Ogura cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. The Plant Journal, 2003 - 35, 262-272.
9. Delourme, R., Eber, F. & Renard, M. Radish cytoplasmic male sterility in rapeseed: breeding restorer lines with a good female fertility. In: 8th International rapeseed conference (Saskatoon, Saskatchewan, Canada), 2001 - Vol. 5, p. 1056.

THE FEATURES OF CMS FOR UKRAINIAN BREEDING WINTER RAPE HYBRIDS

A.D. Lisnyak, A.F. Pershin, M.V. Ivanov

It was showed that all three types of CMS source B-009, CMS-301 and CMS-305 relate to the type of *CMS-ogura* on base of comprehensive study of cytological and genetic breeding material IOC NAAS in order to determine patterns of functioning of the CMS-Rf winter rape system. A dominant monogenic nature of fertility restoration in heterosis hybrids was established as the action of *Rfo* gene. The level of glucosinolates in the hybrid progenies of different generations, has a rigid genetic linkage with the level of fertility restoration, regardless of genetic background and the original parental forms.

ОСОБЛИВОСТІ ЦЧС У ГІБРИДІВ ОЗИМОГО РІПАКУ УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

Г.Д. Лісняк, О.Ф. Першин, М.В. Іванов

На основі комплексного цитологічного та генетичного вивчення селекційного матеріалу ІОК НААН з метою визначення закономірностей функціонування системи ЦЧС-Rf озимого ріпаку виявлено, що усі три вихідних джерела ЦЧС B-009, CMS-301 та CMS-305 відносяться до типу *CMS-ogura*. Встановлено домінуючу моногенну природу відновлення фертильності у гетерозисних гібридів – дія гену *Rfo*. Рівень глюкозинолатів у гібридних потомств різних поколінь має міцне генетичне зчеплення зі ступенем відновлення фертильності, незалежно від генетичного фону та вихідних батьківських форм.

Рецензент: К.О. Домбровский, кандидат биол. наук, доцент кафедры общей и прикладной экологии и зоологии Запорожского национального университета.