

The background of the slide is a close-up photograph of several ears of yellow corn. The kernels are bright yellow and arranged in neat rows on the cobs. The lighting is warm, highlighting the texture of the corn.

Биотехнология в селекции растений

Часть 4.

**Селекция на устойчивость к
гербицидам.**

**Использование маркеров в
селекции**

Потери в растениеводстве до **100 млн. т** в год, на долю **сорняков** приходится до **40 млн. т**

Для **сокращения засоренности** обосновывается **увеличение обрабатываемых площадей** в 2 раза. Разрабатываются технологии выращивания **трансгенных растений**, устойчивых к гербицидам, в **сочетании с высокоактивными гербицидами**

В Московской области **50-75 % посевных площадей** заражены сильно и очень сильно. На посевах сахарной свеклы зарегистрировано **более 160 видов сорных растений 33 семейств**

(Астровые 29 видов, Мятликовые 25, Капустные 17, Гречишные 10, Маревые 8)

50-60 % пахотных земель Западной Сибири засорены в сильной и средней степени. Использование **противодвудольных гербицидов** может привести к нарастанию засоренности **злаковыми видами**.

Видовой состав **многолетников** в НЧЗ вдвое меньше числа однолетних видов, но вред от многолетников значительно выше, чем от **однолетников**.

В мире различные фирмы, внедряя семена трансгенных культур, стремятся к **расширению продаж своих гербицидов**.

В 60-70-е гг. соли и эфиры **2,4-Д** хорошо справлялись с двудольными, сократилась численность сорняков, устойчивых к 2,4-Д.

**Посевы растений, устойчивых к гербицидам – 80 %
площадей трансгенных растений**

Замена гена-мишени на ген, делающий атаку гербицида неэффективной
(устойчивость к глифосату на основе мутации)

Введение гена, инактивирующего гербицид
(устойчивость к гербицидам дифенилэфирового ряда
бактериального гена)

**Кукуруза, пшеница, картофель, хлопчатник, рис,
соя, сахарная свекла, томат и др.**

1. **Прямая селекция** (скрещивания с дикими устойчивыми видами)

2. **Получение трансгенных растений**

Молекулярные механизмы устойчивости

Выделение генов бактериального и растительного происхождения

Гербициды: **ингибирование биохимических процессов**, прежде всего фотосинтеза (атразин, симазин, диурон), и синтеза аминокислот (глифосат, сульфонилмочевина, биалофос)

Устойчивость: изменение сродства гербицида с его ферментом-мишенью или ингибирование молекулы гербицида

Получение растений, устойчивых к гербицидам:

Выявление мишеней

Отбор устойчивых растений/бактерий

Идентификация и клонирование генов устойчивости

Изучение экспрессии генов

Атразин

Связывается с хлоропластным мембранным белком, который кодируется геном *pbcsA*. Этот ген выделен из генома некоторых сорняков.

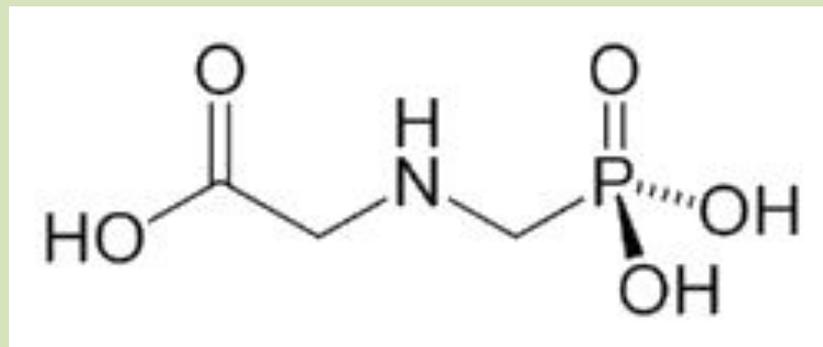
Устойчивость связана с возникновением точечной мутации в гене, что приводит к замене в белке **серина** на **глицин** – резкое уменьшение связывания гербицида. Мутантный ген был встроен в вектор.

Ген, кодирующий **протопорфириногенсинтетезу** (Protox) из *B. subtilis* - повышение устойчивости к гербицидам дифенилэфирового ряда. Повышенная экспрессия гена нейтрализует действие гербицида. Прямая зависимость между числом встроенных копий гена и уровнем устойчивости.

В геном с/х культур вводились мутантные гены, кодирующие синтез ферментов, на которые гербициды (атразин, биалофос, бромоксилин, имидазол) не оказывают негативного действия.

Глифосат (N-фосфонометилглицин) синтезирован в 1970 г. фирмой Монсанто.

Глифосат – слабая кислота, плохо растворимая в воде

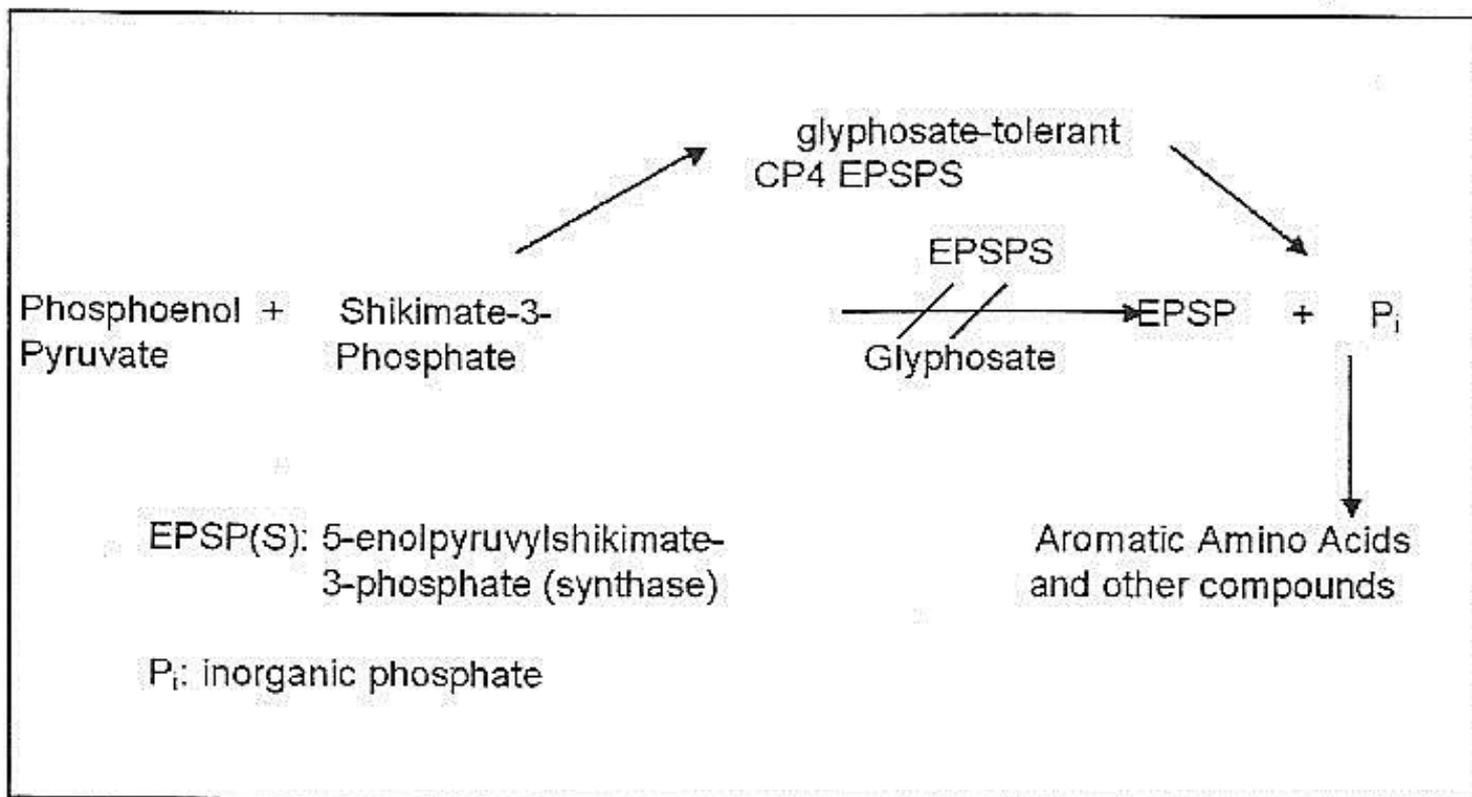


Глифосат адсорбируется через кутикулу листа и переносится от листа по всем частям растения.

Глифосат относится к гербицидам общего действия. Его мишенью в растении является фермент **EPSPS (енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтаза)**, который играет важную роль в синтезе ароматических аминокислот.

Под действием глифосата неустойчивые к нему растения из-за недостатка ароматических аминокислот погибают в течение двух недель.

Figure 1. Mechanism of glyphosate activity and tolerance in glyphosate-tolerant sugar beet.



Не было выявлено мутационных эффектов, хромосомного воздействия, канцерогенного эффекта.

Глифосат не несет опасности для животных и человека, так как его «мишень» имеется только у растений, грибов и

Были обнаружены бактерии, у которых из-за **точковой мутации** произошла замена одной аминокислоты в области фермента EPSPS, где происходит его связывание с гербицидом глифосатом: гербицид не может дезактивировать такой **мутантный фермент**, и бактерии **устойчивы к его действию**.

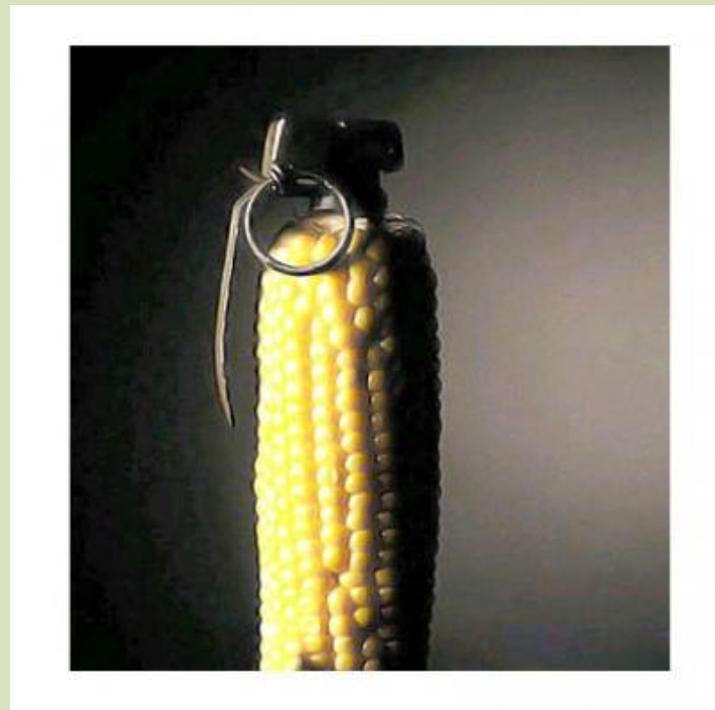
В настоящее время выделены гены EPSPS с мутацией мишени от бактерий рода *Agrobacterium* (ген **cp4**), *Salmonella* (ген **sm1**) и др.

Например, соя: мутантный ген **cp4** от почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*. Для доставки гена EPSPS к хлоропластам (месту синтеза ароматических аминокислот) к нему присоединен фрагмент ДНК от петунии, кодирующий небольшой транзитный пептид, который быстро разрушается в процессе переваривания и также не несет опасности для организма животных и

Замена **аланина** на **аргинин** в белке EPSP-синтетазы (ген *aroA* *E. coli*) – устойчивость к глифосату (табак, томат, сахарная свекла и картофель)

Первые эксперименты с трансгенной кукурузой RR в Центральной Европе и СНГ – 1997 год

Первая регистрация для коммерческого выращивания – Болгария, 1998

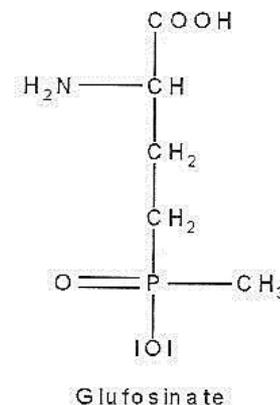
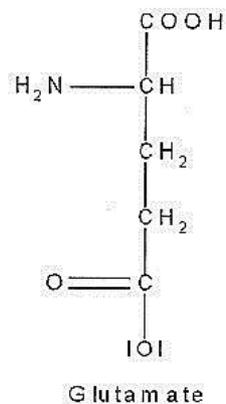


Глюфосинат – фосфинотрицин

Глюфосинат блокирует действие **глутаминсинтетазы**, которая превращает **аммиак** из фотодыхания в **глутамин**, а затем глутамин-оксоглутарат-аминотрансфераза (GOGAT, глутаматсинтаза) превращает 1 молекулу **глутамина** и 1 молекулу **оксоглутарата** в две молекулы **глутамата**, которые либо включаются обратно в цикл, либо используются для биосинтеза **а/к** и **н/к**.

Блокирование глутаминсинтетазы приводит к быстрому истощению запаса глутамина, накоплению аммиака и отравлению растения.

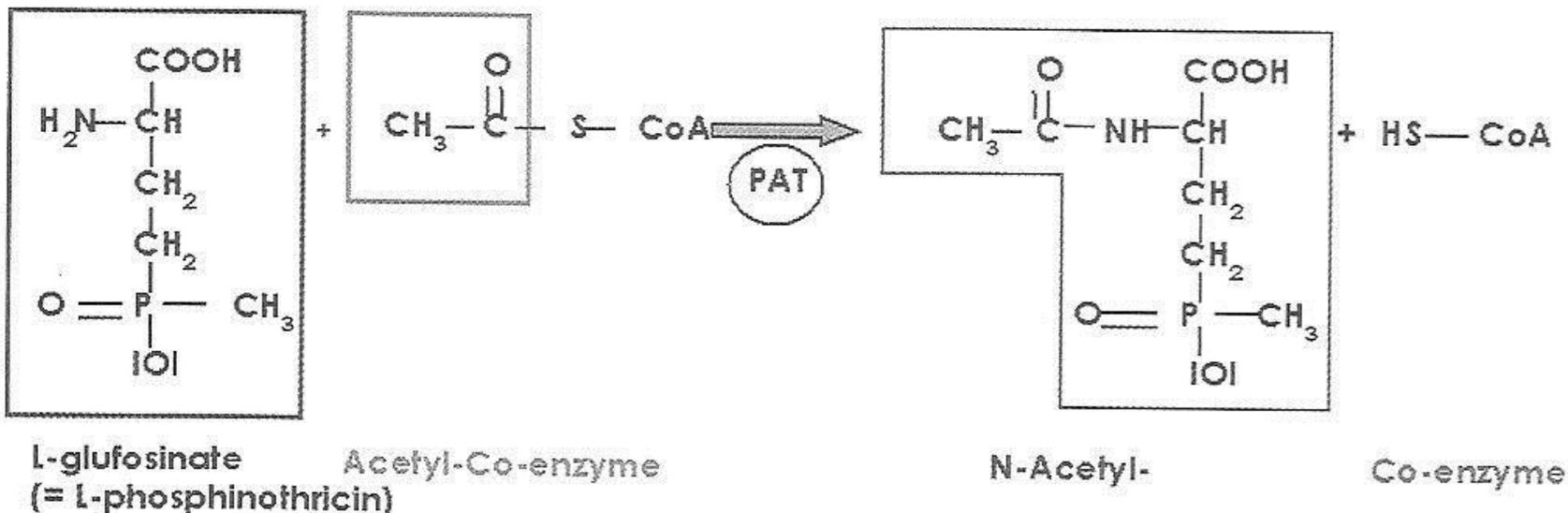
Figure 1 - Glufosinate as an analogue of glutamate (glutamic acid)



Ген устойчивости выделен в 1986 г., первый перенос 1988 У м/о *Streptomyces viridochromogenes*, бактериальный ген *bar* кодирует **фосфинотрицинацетилтрансферазу (PAT)**, которая ацетилирует свободную NH₂-группу фосфинотрицина (PPT)

PAT инактивирует глюфосинат, превращая его в биологически инертный **N-ацетил-глюфосинат**, высокоспецифичная реакция, протеиногенные а/к не подвержены ацетилирующему действию PAT

Figure 2 -Inactivation of glufosinate

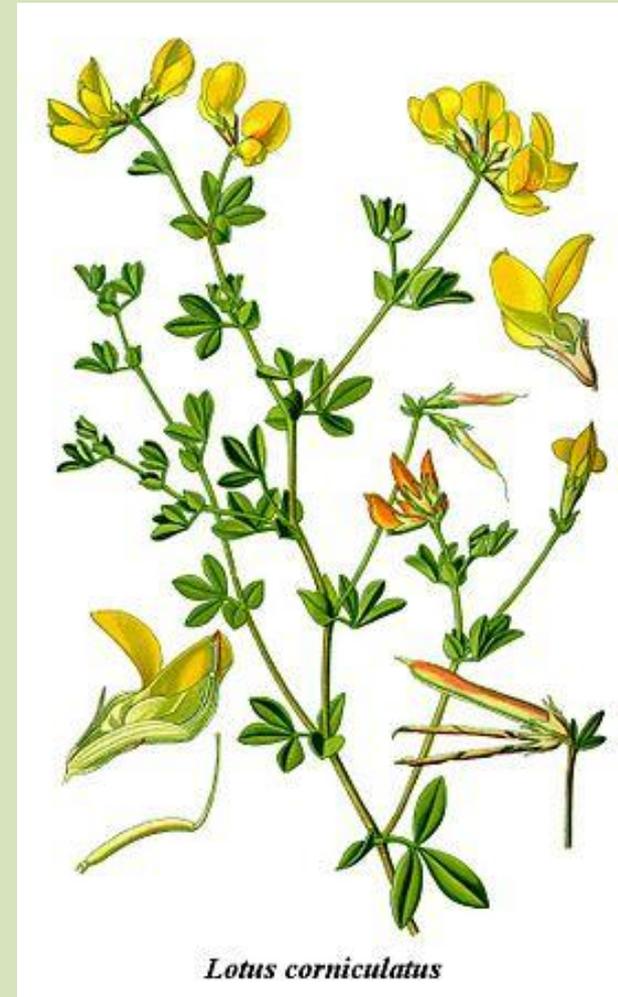


Предотвращает токсичность гербицидов Баста и Биалофос (рис, 1995, сорго, 1995, пшеница, 1994, яровой рапс, 2010)

Лядвенец рогатый (*Lotus corniculatus*),
штамм A281/pCBE21, плаزمида с
геном *bar*, кодирующим **PAT**.

Трансгенные растения
невосприимчивы к гербициду, но в
тканях таких растений наблюдается
накопление гербицидов и
использовать эти растения можно
только в технических целях.

Но введение генов, кодирующих
другие ферменты, позволяет
проводить детоксикацию гербицидов,
создавая таким образом растения,
пригодные в пищу.



Lotus corniculatus

Из примерно **80 ферментов синтеза протеиногенных а/к** ингибирование только 3 из них (ацетолактатсинтазы, 5-енолпируватшикимат-3фосфатсинтазы и глутаминсинтетазы) использовано для создания практически значимых гербицидов (сульфонилмочевина, глифосат, фосфинотрицин)

Гербицид **паракват Pq**, или **метилвиологен**, редокс-циклический агент, восстанавливающий O_2 до O_2^- в клетках аэробных организмов

Акцептор электрона от ФСІ и восстановитель кислорода до токсичного радикала – **мощный ингибитор роста** фотосинтезирующих организмов на свету

Один из наиболее вероятных путей развития устойчивости к параквату – **усиление компонентов антиоксидантной защиты клеток**

Мутанты, устойчивые к параквату, - конститутивно высокая экспрессия генов *soxR* и/или *soxS* и генов *SoxRS*-регулона.

Защитные функции по крайней мере **5 генов регулона** могут иметь отношение к развитию устойчивости:

MnSOD – продукт гена *sodA* – катализирует реакцию дисмутации O_2^- , в результате образуется H_2O_2 и O_2 .

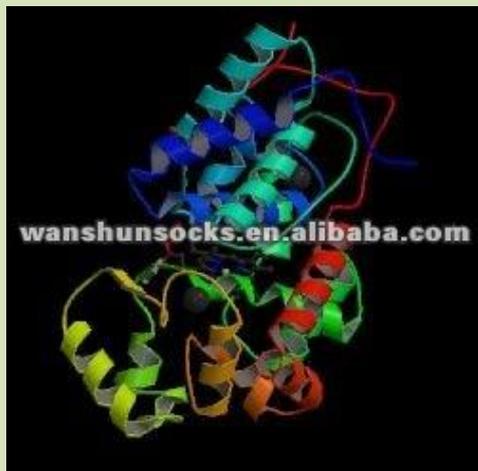
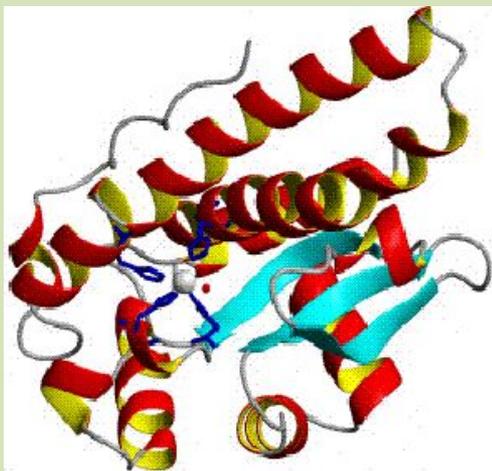
tolC – кодирует белок наружной мембраны

acrA, *acrB* – кодируют компоненты выкачивающего мембранного насоса, ответственного за фенотип множественной лекарственной устойчивости

micF – кодирует регуляторную РНК, репрессирующую синтез порина наружной мембраны, что нарушает проницаемость клеточной стенки для ряда антибиотиков

emrE – ген белка-антипортера множественной лекарственной устойчивости.

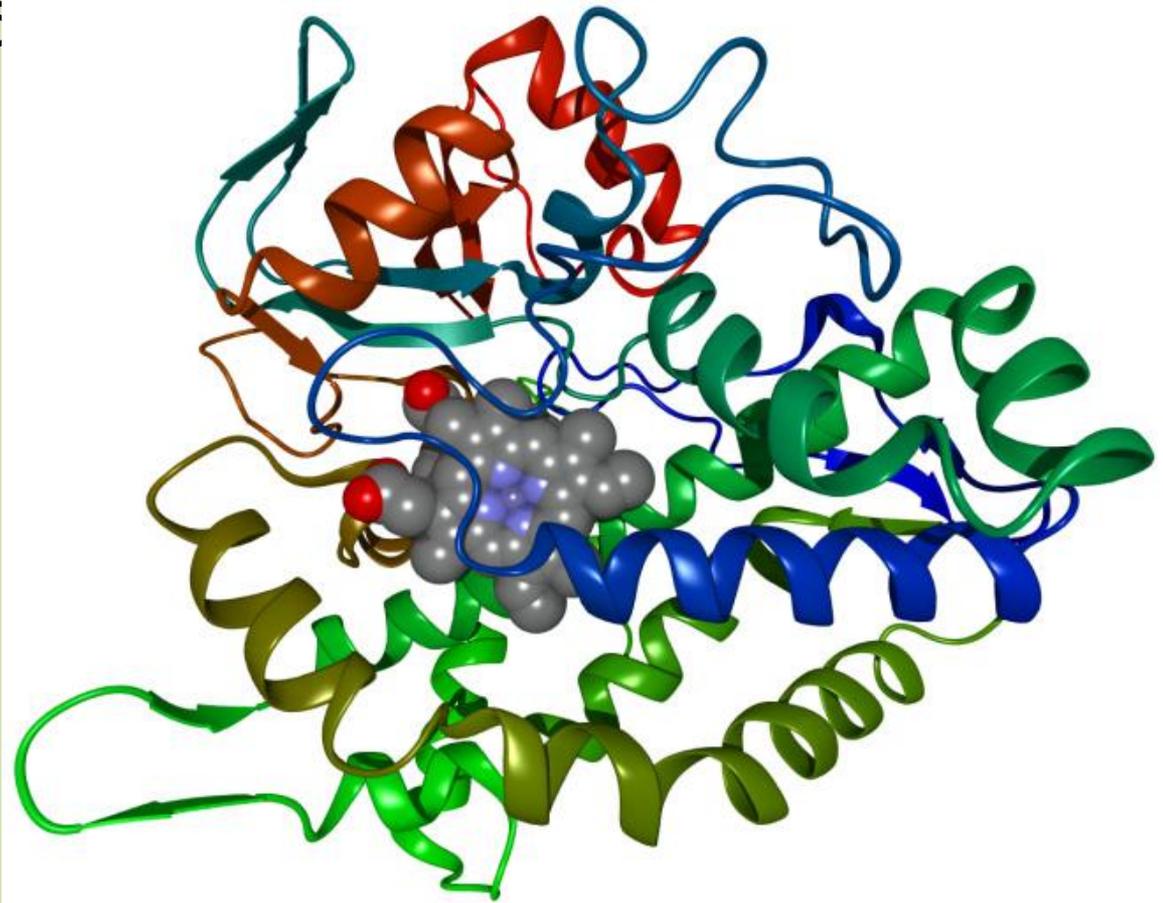
Самыми эффективными системами защиты от ОС должны быть вооружены организмы с оксигенным фотосинтезом. Для нейтрализации активных форм кислорода клетки используют **неферментативные антиоксиданты** (аскорбиновая к-та, альфа-токоферол, глутатион, каротиноиды), а также **набор ферментов** (супероксиддисмутазы, пероксидазы, редуктазы, каталазу в пероксисомах).



Цитохром Р450 – широко распространенные гемопротейды (археи, бактерии, дрожжи, грибы, растения, млекопитающие)

Локализованы во внутренней мембране митохондрий или мембранах ЭР

Окисление эндогенных и экзогенных соединений - важная роль в метаболизме



Трансгенные картофель, табак, рис, **экспрессирующие P450 животных**, проявили ускоренный метаболизм определенных гербицидов и обнаружили устойчивость к гербицидам. Можно использовать для фоторемедиации окружающей среды

Трансгенный рис, экспрессирующий **CYP2B6 человека**, проявил устойчивость к ряду гербицидов различных по химической природе и механизму действия.

Трансгенный табак и арабидопсис с геном **CYP76B1 *Helianthus tuberosus*** были устойчивы к различным гербицидам.

МАРКЕРЫ В СЕЛЕКЦИИ

Маркер – ген известной локализации, по которому можно выявить присутствие других генов.

На практике ученый имеет дело, как правило, с фенотипическим проявлением гена – **признаком**.

Морфологические маркеры

Сцепление четких морфологических признаков с генами хозяйственно-ценных признаков и свойств

Большинство морфологических маркеров применяется **на ранних этапах** селекционного процесса

Однако экспрессия маркеров **зависит от внешних условий**

Маркерные **признаки могут быть негативными** (карликовость, аллелизм)

Селекционер отбирает элитные растения по **морфологическим признакам**, тесно сцепленным с другими, на которые селекция не ведется

D/R-замещения у тритикале – **красная окраска ушек листового влагалища** (ускорение колошения, улучшение хлебопекарных качеств, сцепленность с замещением не тесная, так что необходима дальнейшая селекционная доработка)

Черная окраска панцирного слоя семян подсолнечника – устойчивость



ЯМС подсолнечника – антоциановая окраска проростков

Фасоль: связь между размером семени и пигментацией оболочки

Засухоустойчивые сорта пшеницы – узкие листовые пластинки, тонкая соломина, светлая окраска листьев
Остистые формы засу



Биохимические маркеры

Изоферменты – множественные формы одного фермента, катализирующие одну и ту же реакцию, но различающиеся по структуре, физико-химическим свойствам и регуляции.

Полиморфизм аминокислотной последовательности – маркер

Недостаток – малая вариативность

Используют для **идентификации генотипов** (пшеница, ячмень, кукуруза, сорго, горох), **идентификации сортов** в семеноводстве (ячмень, кукуруза), **оценки генетического разнообразия**

Белковые маркеры

Белки и н/к генотипичны, не опосредованы плейотропией. Кодоминантно наследуются. Обладают разносторонней биологической специфичностью, методы доступны.

Электрофоретические маркеры

Генетической анализ внутривидовой

дифференциации – идентификация сортов, биотипов, инбредных линий, анализ популяций

Генетически полиморфные белки маркируют

аллельные варианты гена, позволяют выявлять его аллельную структуру в пределах вида или популяции

Множественные мономорфные белки

идентифицируют генные локусы, маркеры вида, генома, отдельных популяций и генных групп в пределах вида.

Иммунохимические маркеры

Геномный анализ при идентификации геномов, оценке геномного состава аллополиплоидов и геномных преобразований, при определении геномных отношений между видами, филогения

Видоспецифичные белки-антигены или получаемые из них антитела (популяции молекул или моноклональные антитела)

Геном D – хлебопекарные свойства мягкой пшеницы

Геном A – иммунитет к грибным заболеваниям

На реакции узнавания антигена антителом основан **иммунохимический метод** идентификации вида и генома

Мономорфность белка по антигенным свойствам

По белкам-антигенам проведен **геномный анализ** всех основных групп культурных растений и их диких сородичей с целью выявления природы и происхождения геномов, определения геномного состава аллополиплоидных видов и оценки степени их родства

Классификация белков зерна (Осборн, 1916):

Альбумины растворимы в воде

Глобулины растворимы в солевых растворах

Проламины растворимы в водно-спиртовых растворах

Глютелины растворимы в щелочных растворах

Как белковые маркеры пшеницы используются чаще глиадины и глютелины

Запасные белки семян множественны, генетически полиморфны и видоспецифичны, содержатся в относительно большом количестве, локализованы в морфогенетически однородной ткани, легко выделяются для анализа, характеризуют строго фиксированную фазу развития семени в онтогенезе

Другие белки могут использоваться как дополнительные или вспомогательные маркеры

Белки как маркеры – при идентификации вида и генома, геномном анализе амфидиплоидов, анализе генома и плазмона, выявлении филогении

Основные принципы **молекулярно-генетического маркирования** для селекции и семеноводства были разработаны на белках.

Большой полиморфизм запасных белков в пределах вида и популяций, **генотип-специфичность**

Блоки компонентов глиадины наследуются кодоминантно в соответствии с дозой гена в триплоидном эндосперме. Для каждого блока существуют различные аллельные состояния

Подробно изучена генетика **запасных белков пшеницы** (глиадин, глютеин)

Установлена роль определенных **блоков белков** в определении хлебопекарных качеств, морозостойкости, засухоустойчивости, устойчивости к заболеваниям

Gld 1B4, 1D3, 6A6 - адаптивность

Gld 1D3 – крупность зерна

Gld 1A1 – низкое качество клейковины, но высокая морозостойкость

Gld 1A2 – более высокое качество клейковины

Gld 1B2 – высокая морозостойкость

Gld 1B3 – наличие ржано-пшеничной транслокации (продуктивность и адаптивность)

Gld 1B1, 1B3 – маркер устойчивости к стеблевой ржавчине

Устойчивость к желтой ржавчине сопряжена с наличием компонентов, контролируемых глиадинкодирующим локусом хромосомы **1B**

Компоненты, контролируемые глиадинкодирующим локусом хромосомы **1A** с геном *Lr10*, - устойчивость мягкой пшеницы в первой расе ржавчины *Puccinia recondita*

Gld 1A1, 1A2, 1D6, 6A3, 6D2 - морозостойкость

Белковое маркирование в изучении исходного материала:

- филогенетический анализ
- идентификация генома
- оценка геномного состава диплоидных видов
- идентификация сортов, биотипов и линий
- регистрация генетических ресурсов селекции
- анализ морфологически однородных естественных и сортовых популяций
- создание вспомогательных генетических систем селекции
- поиск источников ценных признаков

Белковое маркирование в селекции:

- отбор ценных генотипов по белковому биотипу
- анализ гибридных популяций
- контроль за включением желаемых генетических систем в сорта, гибриды и аллополиплоиды
- получение родительских форм, видов-посредников при отдаленной гибридизации
- контроль после насыщающих скрещиваний

Белковое маркирование в сортоиспытании:

- определение происхождения сорта
- оценка на генетическую однородность
- оценка состава сортовых популяций у перекрестников
- оценка однотипного состава самоопылителей
- регистрация и документация районированных сортов в виде «белковых формул»

Белковое маркирование в семеноводстве:

- контроль за генетическим составом популяции при улучшающем семеноводстве перекрестников
- маркирование линий в семеноводстве гибридных семян
- оценка уровня (процента) гибридности

Белковое маркирование в клеточной и хромосомной инженерии:

- маркирование клеточных линий
- выявление хромосомных преобразований
- идентификация генетического материала в соматических гибридах

Белковое маркирование в генной инженерии:

- поиск в геноме локусов и генетических систем, кодирующих биологические свойства и хозяйственные признаки растений
- оценка генной функции выделенных фрагментов ДНК генома или плазмона

Генетические маркеры

Молекулярные маркеры (ДНК-маркеры) используют полиморфизм нуклеотидов молекул ДНК.

Не зависят от внешних условий, стадий роста растений, позволяют анализировать сразу много признаков

Маркеры на основе гибридизации:

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (детекция точковых мутаций, инверсий, делеций, транслокаций)

VNTR (Variable Number Tandem Repeat) – полиморфизм длин тандемно повторенной ДНК (различия в количестве повторов)

Маркеры на основе ПЦР

RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) – на основе случайно амплифицированных полиморфных участков ДНК

CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) – рестрикционный анализ амплифицированных последовательностей

SSR (Simple Sequence Repeat) – на основе полиморфизма длины простых повторов

ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) – полиморфизм длин межмикросателлитных участков ДНК

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) – полиморфизм длин амплифицированных фрагментов

Каждый сорт имеет уникальный молекулярный профиль, выявляемый с помощью ДНК-маркеров (**ДНК-фингерпринт**)

ДНК-маркеры в сортовом контроле в России не используются

Неясна генетическая разнородность сорта полевой культуры

Если совмещать с фенотипической оценкой, то **какой системе больше доверять**

При использовании ДНК-маркеров есть **вариации в оценках в зависимости от лаборатории**

Для контроля **гибридности** семян используют **изозимный анализ или RFLP**

Маркеры на основе микросателлитов наиболее полиморфны

Варьирование числа повторов в локусе

Кодоминантны

Кукуруза, соя, рапс, пшеница, ячмень, хлопчатник, томат, перец, огурец, сорго

Для оценки линий в селекционных программах используют

маркеры на основе однонуклеотидных полиморфизмов (SNP-маркеры)

Маркеры на основе ретротранспозонов (IMP-маркеры)

Использование маркеров позволяет

- отказаться от создания провокационных фонов для проведения отбора,
- проводить его вне зависимости от погодных условий и степени проявления признака,
- сократить объем отбора неценных генотипов

Молекулярные маркеры широко используются для интрогрессии отдельных локусов, но селекция с помощью маркеров количественных признаков развита меньше.

Технологии на основе ДНК-маркеров имеют следующие преимущества:

- высокая воспроизводимость результатов
- независимость от стадии роста и развития
- достаточность небольшого количества растительного материала
- отсутствие необходимости использовать инфекционный фон
- возможность протестировать несколько признаков одновременно
- возможность эффективной защиты сорта

Устойчивость к генетически изученным болезням томата – фузариоз, вертициллез, нематоды, альтернариоз, ВТМ и др. **Полигенная устойчивость** к мучнистой росе, бактериальному увяданию и др. **требует разработки интрогрессии**

Любые аллельные признаки, наследуемые и расщепляющиеся как менделевские, могут быть **маркерами**

Наибольшее количество молекулярных маркеров разработано на **томате**

Генетический потенциал геномов диких видов намного выше, чем современных сортов и гибридов с/х культур