

Государственное бюджетное общеобразовательное учреждение города Москвы  
«Школа №185 имени Героя Советского Союза,  
Героя Социалистического Труда В.С. Гризодубовой»

## **ПРОЕКТНО – ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ РАБОТА**

### **«Определение типов ЦМС в коллекции новых селекционных образцов ярового рапса»**

Автор: Пинаев Всеволод Андреевич,  
ученик 11 «М» класса ГБОУ Школа №185

Руководитель:

Пырников Андрей Сергеевич,  
Научный сотрудник ВНИИСБ, кандидат  
сельскохозяйственных наук.

Немеева Ирина Анатольевна,  
Учитель биологии ГБОУ Школа №185

Москва  
2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	3
1. Литературный обзор .....	3
1.1 Цитоплазматическая мужская стерильность .....	3
1.2 Использование .....	4
1.3 Открытие. 1.4. Опыт Роудса .....	4
1.5 Системы ЦМС рапса .....	4
2 Методы исследования. 2.1 Выделение ДНК 2.2 Постановка ПЦР .....	5
2.3 Программа ПЦР .....	6
2.4 Постановка электрофореза .....	7
2.5 Анализ результатов .....	8
3. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ .....	8
3.1 Выделение ДНК, Подбор праймеров .....	8
3.2 Постановка ПЦР .....	8
3.3 Постановка электрофореза .....	9
3.4 Анализ результатов .....	9
ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ .....	12
ПРОДУКТ ПРОЕКТА .....	11
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	14
ПРИЛОЖЕНИЕ .....	1

## **ВВЕДЕНИЕ**

**Актуальность темы:** Создание гетерозисных гибридов является наиболее эффективным подходом к решению проблемы повышения продуктивности рапса (*Brassica napus* L.) - одной из ведущих масличных культур. При получении гибридных семян рапса широко используется цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС), позволяющая проводить контролируемую гибридизацию материнских и отцовских линий.

Для ускорения процесса получения семян с помощью цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) был идентифицирован целый ряд последовательностей митохондрий ассоциированных с разными типами цитоплазмы. Были определены гены митохондрий, ответственные за стерильность растений.

В настоящее время разработаны системы молекулярных маркеров для идентификации индуцирующих ЦМС и восстанавливающих мужскую фертильность генов. При получении промышленных гибридов рапса в мире преимущественно используются системы ЦМС *ogu*, *pol*, *MSL* и *inap*. В Госреестре РФ сортов растений представлены гибриды рапса в основном иностранной селекции.

Установлено, что при переводе материнских линий гибридов на стерильную цитоплазму признаки структуры урожая не ухудшаются, но при переносе генов восстановления фертильности пыльцы в отцовские линии повышается содержание биологически активных веществ.

### **Цель работы:**

Анализ коллекции, состоящей из образцов *Brassica Napus* на определение типов цитоплазм (*ogura*, *napus*, *camelina*, *polima*).

### **Задачи:**

- 1) Охарактеризовать рапс, как важную масличную кормовую культуру;
- 2) Проанализировать научную литературу по теме исследования;
- 3) Освоить молекулярно-генетические методы анализа растительного

материала;

- 4) Дать характеристику исследуемых образцов по типам ЦМС (ogura, napus, camelina, polima).

**Объект исследования:** Коллекция новых селекционных сортов ярового рапса.

**Предмет исследования:** тип ЦМС

**Методы и методики исследования:** выделение ДНК, подбор праймеров, постановка ПЦР и электрофореза.

**Гипотеза:** Выявление разных типов ЦМС позволит контролировать эффект гетерозиса для повышения урожайности рапса гибридных сортов.

## **1. Литературный обзор**

### **1.1 Цитоплазматическая мужская стерильность**

Ученые отредактировали митохондриальный геном риса и рапса. Посредством белков mitoTALEN они выключили у растений гены, приводящие к цитоплазматической мужской стерильности, и полученные растения были способны к самоопылению. Результаты исследования опубликованы в Nature Plants.

Митохондрии имеют свой геном, представленный кольцевой молекулой ДНК. У растений он в сотни раз больше, чем у животных, в нем находятся важные гены, продукты которых участвуют в метаболизме и синтезе белков в митохондриях. Он более разнообразен, так как содержит множество повторов, обеспечивающих рекомбинацию. Геном митохондрий животных клеток удалось изменить посредством mitoTALENs — белков, специфически узнающих последовательность митохондриальной ДНК и вносящих в нее разрыв. Тем не менее, до сих пор не было возможности редактировать геном растительных митохондрий для более подробного изучения функций их генов.

Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) — явление нарушения формирования пыльцы у растений. Оно используется для получения гибридов первого поколения в сельском хозяйстве — ЦМС одного из родительских

растений нужна для предотвращения самоопыления.

Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) – наследуемый по материнской линии признак, при котором растение не способно продуцировать жизнеспособную пыльцу.

## **1.2 Использование**

При получении гибридных семян рапса широко используемая цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС), позволяющая проводить контролируемую гибридизацию материнских и отцовских линий.

Существуют разные способы индукции мужской стерильности, которые используются в селекции *Brassica L.* Помимо химического метода (применения гаметоцидов), возможно использовать генетически обусловленные системы: самонесовместимость (SI), ядерную мужскую стерильность (NMS, ЯМС), иначе называемую генной мужской стерильностью (GMS, ГМС), и цитоплазматическую мужскую стерильность (CMS, ЦМС).

Феномен ЦМС, выражающийся в неспособности растения продуцировать жизнеспособную пыльцу и обусловленный экспрессией абберрантных (химерных) генов, возникающих в результате перестроек митохондриального генома, описан у различных видов растений (Hanson, Bentolila, 2004; Ivanov, Dymshits, 2007). ЦМС возникает в популяциях спонтанно (гомоплазматическая или аутоплазматическая ЦМС) либо при отдаленной (межвидовой, межродовой) половой или соматической гибридизации (аллоплазматическая ЦМС) (Li et al., 2019; Sang et al., 2019). Признак мужской стерильности супрессируют ядерные гены восстановления фертильности.

## **1.3 Открытие**

Явление ЦМС было открыто Маркусом Муртоном Роудсом – американским цитогенетиком в 1931 году. А так же независимо от него в 1932 году советским генетиком Михаилом Ивановичем Хаджиновым.

## 1.4 Опыт Роудса

С целью испытания влияния генов ядра родителей, обладающих мужской фертильностью, Роудс скрестил форму с мужской стерильностью с линиями, обладающими мужской фертильностью, причём у последних каждая из 10 хромосом была мечена сигнальным геном. При обратном скрещивании гибридов с мечеными линиями каждую из 10 хромосом линии с мужской стерильностью можно было заменить гомологичными хромосомами линий с мужской фертильностью. Никакого влияния любой из 10 хромосом родителей, обладающих мужской фертильностью, на фертильность не было обнаружено. И на этом основании был сделан вывод, что мужская стерильность не зависит от генов ядра.

## 1.5 Системы ЦМС рапса

Существуют различные способы индукции мужской стерильности, которые используются в селекции. Помимо химического метода, возможно использовать генетически обусловленные системы: самонесовместимость, ядерную мужскую стерильность, иначе называемую генной мужской стерильностью, и цитоплазматическую мужскую стерильность.

Феномен ЦМС выражается в неспособности растения продуцировать жизнеспособную пыльцу и обусловлен экспрессией химерных генов, возникающих в результате перестроек митохондриального генома.

**Таблица №1. «Типы ЦМС и их характеристики»**

Тип ЦМС	Источник стерильности	Значение в селекции
Napus	Внутривидовая гибридизация женских линий	Стерильность неполная, не используется в селекции
Polima/Camilina	Спонтанная внутривидовая стерильность	Стерильность чувствительна к высоким температурам, используется частично
Ogura	Стерильность перенесена в рапс от неизвестного сорта редиса	Наиболее подходящий вариант, можно использовать в селекции

## **2 Методы исследования**

В работе использованы методы, применяемые в наши дни в молекулярной биологии: выделение ДНК, постановка ПЦР, постановка электрофореза.

### **2.1 Выделение ДНК**

Выделение ДНК происходит следующим образом: в пробирку с растительным материалом вносим 500 мкл. лизирующего раствора и либо с помощью гомогенизатора, либо вручную пестиком измельчаем эту смесь до гомогенного состояния. Данная процедура проводится для того, чтобы разрушить клеточную стенку и билипидный слой.

1. Помещаем пробирки в термостат на 65°C на 25 минут.
2. Центрифугируем пробирки при 13000 об./мин в течение 5 мин.
3. Отбираем супернатант (400-600 мкл) в новую пробирку.
4. Приливаем 140 мкл 7.5М ацетата аммония или 60 мкл ацетата калия.
5. Перемешиваем на Vortex и помещаем в холодильник на 5 мин (+4°C)
6. Центрифугируем пробирки при 13000 об./мин в течение 5 мин.
7. Отбираем супернатант.
8. Осаждаем изопропанолом (соотношение к супернатанту 1:1).
9. Перемешиваем и центрифугируем при 13000 об./мин в течение 5 мин.
10. Сливаем супернатант.
11. Промываем 700 мкл 70% этанола.
12. Центрифугируем 13000 об./мин в течение 2 мин.
13. Сушим до полного испарения этанола.
14. Приливаем 100 мкл ТЕ-буфера.
15. Помещаем в термостат на 65°C на 5 минут.

### **2.2 Постановка ПЦР**

Постановка полимеразно – цепной реакции: Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) является искусственной многократной амплификацией фрагмента ДНК с использованием специфичных маркеров и позволяет добиться

колоссального (до  $10^8$  раз) увеличения числа копий определенного фрагмента ДНК.

Границы фрагмента задают нуклеотидными последовательностями праймеров, поэтому копированию подвергается только определённый ген (ДНК-мишень), а не вся ДНК как при репликации *in vivo*. Основоположником метода считается Кэрри Муллис.

ПЦР включает три циклически повторяющиеся стадии:

1. Денатурация ДНК – расплетение двойной спирали и расхождение полинуклеотидных цепей;
2. Отжиг праймеров – гибридизация праймеров и одноцепочечной ДНК-мишени с образованием двухцепочечных комплексов «праймер-матрица», необходимых для инициации синтеза ДНК из мономеров–дезоксирибонуклеозидтрифосфатов;
3. Полимеризацию – достраивание (удлинение, элонгацию) комплементарных цепей ДНК ферментом ДНК-полимеразой в направлении  $5' \rightarrow 3'$  начиная от  $3'$ -ОН концов присоединённых праймеров. Т.е. матричный синтез ДНК.

Многократное (циклическое) повторение этих трёх стадий приводит к экспоненциальному обогащению реакционной смеси молекулами ДНК-мишени, поскольку в каждом новом цикле в качестве матрицы выступает не только исходная ДНК, но и вся ДНК, синтезированная в предыдущих циклах. Поэтому реакция относится к цепным. Теоретически за  $N$  циклов может получиться  $2^N$  молекул ДНК-мишени. Протекание ПЦР, т.е. переход от стадии к стадии и от цикла к циклу, регулируется изменением температуры.

Температура денатурации ДНК. Для любой высокомолекулярной геномной ДНК обычно задают  $95^\circ\text{C}$ . Для продуктов амплификации, а тем более комплексов «праймер-матрица» эта температура ниже.

Температура отжига праймера-температура, при которой возможно связывание праймерного олигонуклеотида с одноцепочечной ДНК-матрицей при охлаждении реакционной смеси, следующем за стадией денатурации. Для



каждого конкретного праймера она рассчитывается отдельно и лежит в пределах 50–65°C. Это переменная температура.

Температура элонгации зависит от типа используемого фермента. Для ферментативной активности ДНК-полимеразы Taq из термофильной бактерии *Thermus aquaticus* температурный оптимум составляет 72°C. Иногда, в случае близкого значения температуры отжига праймеров и температуры оптимума работы фермента, становится возможным использовать двухэтапную ПЦР, совместив отжиг и элонгацию.

Для нашего исследования необходимо было многократно амплифицировать фрагменты гена *HAR-3*, для определения устойчивости изучаемых сортов подсолнечника к возбудителю *Plasmopara halstedii* (рис. 3).

### 2.3 Программа ПЦР

Программа ПЦР: (амплификатор Thermal Cycler Bio-Rad T-100)

- 1) денатурация – 95°C 2 мин. 35 циклов:
- 2) денатурация – 95°C 1 мин.
- 3) отжиг праймеров – 54°C 1 мин.
- 4) элонгация 72°C – 2 мин.
- 5) конечная элонгация – 10 мин.
- 6) хранение – 4°C ∞

### 2.4 Постановка электрофореза

Электрофорез – это электрокинетическое явление перемещения частиц дисперсной фазы (коллоидных растворов) в жидкой среде под действием электрического поля.

Электрофорез в агарозном геле является стандартным методом для разделения, идентификации и очистки интактных молекул ДНК и их фрагментов (высокомолекулярная хромосомная ДНК всегда фрагментируется при изоляции из клетки). Агароза – фракция природного полисахарида агара.

ДНК – это слабая кислота, поэтому она движется к аноду (+) за счёт отрицательно заряженных фосфатных групп. За движением ДНК (РНК) в

пластине геля можно следить, так как полосы окрашенной флуоресцентными красителями ДНК, формируемые молекулами одного размера при продвижении через поры геля, видны в УФ свете. Для окрашивания ДНК применяют краситель бромистый этидий. Молекулы бромистого этидия интеркалируют в молекулы ДНК, т.е. встраиваются между соседними парами нуклеотидов. Интенсивность флуоресценции связанного этидия в 20 раз выше, чем свободного. Скорость движения ДНК (РНК) через поры агарозного геля при электрофорезе определяется размером молекул и их конформацией. Молекулы линейной двухцепочечной ДНК перемещаются в толще геля со скоростями обратно пропорциональными десятичному логарифму их молекулярных масс. Впереди мигрируют низкомолекулярные фрагменты, крупные молекулы движутся медленнее из-за большего сопротивления.

Агароза легко плавится при нагревании до 95°C (в электрофорезном буфере). При выливании расплава в форму и его застывании получают прозрачные упругие гели. Лунки для внесения ДНК на гель-электрофорез формируются путём вставки тefлоновой гребёнки с зубьями в незастывший гель и её извлечением после полимеризации пластины геля.

Раствор ДНК в лунки геля вносят в буфере, содержащем глицерин или сахарозу, чтобы ДНК сразу опустилась на дно лунки, а не растворилась в электрофорезном буфере еще до включения тока и вхождения в гель. Чтобы следить за прохождением фронта фореа в буфер добавляют специальные красители. Электрофоретическая подвижность бромфенолового синего (БФС) лежит в районе 100 оснований. Синее пятно БФС движется на уровне тРНК, это лидирующий краситель. Обычно применяют буферы: ТАЕ; ТВЕ и SB.

Мы будем использовать ТАЕ буфер (Трис-ацетатный буфер – содержит трис, уксусную кислоту и ЭДТА - этилендиаминтетрауксусную кислоту) - 100 мл., в котором растворил 1,8 г. агарозы (в соответствии с объемом используемой форезной камеры). Далее раствор нужно перемешать и довести до кипения в микроволновой печи для полного растворения агарозы. После этого полученный раствор остудить до 50-60 градусов по Цельсию и добавить бромистый этидий,

вылить полученный раствор в полдожку и дать ему застыть 30-40 минут, после этого переместить в форежную камеру, вытащить гребёнки и внести по 5 мкл. окрашенного ПЦР-продукта.

## **2.5 Анализ результатов**

Спустя время, результаты электрофореза детектируются с помощью ультрафиолетовой камеры (трансиллюминатора).

## **3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**

### **3.1 Выделение ДНК, подбор праймеров**

Четыре пары праймеров были подобраны из литературных источников и адаптированы под условия работы. Были использованы следующие сорта: P21/22, P21/32, MSS.

Праймеры:

P21: AGCTGTCTGGAGGGAATC

P22: GCGGTCTCACGCACTAATC

Целевые фрагменты 510 и 1102 п.н. (ogu., nar., pol., sam)

P21: AGCTGTCTGGAGGGAATC;

P32: ACGACATCAAGGAGGAAC;

Целевой фрагмент 747 п.н. (nar., pol., sam)

MSS6: CAGAGGGCAAACTGTATGA;

MSS6: CATCTGGCTGAGAGTAGCATGG;

MSS6 (амплификация у sam- и pol-типов ЦМС, целевые фрагменты ~1387 п.н.)

MSS14: GCTCGTTTCGATTAAGCTCAA;

MSS14: GAATTCCTCTTTCATTGCGG;

MSS14 (ogu-тип ЦМС, целевые фрагменты 342 п.н.)

### **2.2 Постановка ПЦР**

Состав реакционной смеси (объём 25 мкл):

1. 50-100 нг ДНК
2. 3 mM MgSO<sub>4</sub>
3. 10 mM каждого праймера

4. 2 ед. Taq-полимеразы
5. 2х стандартный ПЦР буфер

Формулы расчёта объёма ПЦР-смеси

$$V_{\text{общ}} = (n \text{ образцов} + 1) \cdot 25 \text{ (мкл)}$$

$$V_{\text{pc}} = \frac{V_{\text{общ}}}{2,5} \text{ (мкл)}$$

$$V_{\text{pol}} = \frac{2 \cdot (n \text{ образцов} + 1)}{5} \text{ (мкл)}$$

$$V_f = 0,1 \text{ мкл} \cdot (n \text{ образцов} + 1)$$

$$V_r = 0,1 \text{ мкл} \cdot (n \text{ образцов} + 1)$$

$$V_{\text{H}_2\text{O}} = V_{\text{общ}} - V_{\text{pc}} - V_{\text{pol}} - V_f - V_r - n \text{ образцов}$$

Мои расчёты ПЦР смеси на 10 образцов:

$$V_{\text{общ}} = 10 \times 24 = 240 \text{ мкл}$$

$$V_{\text{pc}} = 240 / 2 = 120 \text{ мкл}$$

$$V_{\text{pol}} = 2 \times 10 / 5 = 4 \text{ мкл}$$

$$V_f = 1 \text{ мкл}$$

$$V_r = 1 \text{ мкл}$$

$$V_{\text{H}_2\text{O}} = 240 - 120 - 4 - 2 - 10 = 104 \text{ мкл}$$

### 3.2 Постановка электрофореза

Для визуализации результатов ПЦР был применён электрофорез. Он проводится в специальной форежной камере. Образцы, прошедшие ПЦР-анализ, окрашиваются флуоресцентным красителем и закапываются в лунки, в заранее приготовленный агарозный гель, содержащий 1,8% агарозы а так же 1х ТАЕ буфер. Так же в гель добавляется бромистый этидий, для возможности просмотра результатов электрофореза под УФ излучением. Бромистый этидий – органическое соединение, применяемое в молекулярной биологии для выявления нуклеиновых кислот. Имеет вид тёмно-красных кристаллов. Химическая формула:  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$ .

Программа электрофореза: вольтаж – 120В, время – 60 минут.

### 3.3 Анализ результатов

Результаты были проанализированы при помощи трансиллюминатора (ультрафиолетовой камеры). Для этого применяли прибор Gel Doc 2000,

разработанный американской компанией Bio-Rad Laboratories, Inc. Фотографию результатов можно увидеть в приложении фото №1.

### **Размеры исследуемых фрагментов и типы их ЦМС:**

#### MSS

4,5,7,8 – MSS6 – 1387 п.н.

1,2,5 – MSS14 – 342 п.н.

#### Типы ЦМС

6 – Napus

1,2,3 – Ogura

4,5,7,8 – Polima/Camelina

#### P21/22

1,2,3,6 – 1102 п.н.

4,5,7,8 – 510 п.н.

#### Типы ЦМС

1,2,3,6 – Ogura, Napus

4,5,7,8 – Polima, Camelina

#### P21/32

7,8 – 747 п.н.

#### Типы ЦМС

7,8 – Camelina

1,2,3,4,5,6 – Polima, Napus, Ogura.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ**

В ходе выполнения работы была проанализирована коллекция новых селекционных сортов ярового рапса. В итоге были выявлены типы ЦМС у каждого сорта.

### **Выводы:**

- В ходе выполнения проекта освоены молекулярно-генетические методы анализа растительного материала.
- В результате анализа пары праймеров MSS-6 и MSS-14 позволили амплифицировать фрагменты ДНК размером 1387 п.н. и 342 п.н. С помощью

пар праймеров P21/22 и P21/32 амплифицировали фрагменты 1102 п.н., 510 п.н. и 747 п.н. к генам orf222 и orf224 соответственно.

- У образцов 1,2,3 с фрагментами 342 п.н. и 1102 п.н. был подтверждён тип ЦМС Ogura.
- У образцов 4,5,7,8 с фрагментами 1387 п.н. и 510 п.н. идентифицирован тип Polima, так же у образцов 4,5,7 и 8 были обнаружены фрагменты 1387 п.н., 510 п.н. и 747 п.н. – тип Camelina.
- В 4-х образцах 1,2,3 и 6, у которых присутствовал только один фрагмент 1102 п.н. был идентифицирован тип ЦМС Napus.

Наиболее перспективным путем повышения продуктивности рапса является создание гетерозисных гибридов. Использование признака мужской стерильности, позволит проводить контролируемую гибридизацию материнских и отцовских форм рапса. Выявленные сорта, имеющие тип ЦМС Ogura, Camelina и Napus будут использоваться для ускорения селекционного процесса гетерозисной селекции рапса.

**Теоретическая значимость:** Выявлены типы ЦМС у каждого сорта рапса.

**Практическая значимость:** Знание сортов с необходимым типом ЦМС будет использовано работниками сельского хозяйства для выращивания более урожайных сортов рапса. Гипотеза была подтверждена.

## **ПРОДУКТ ПРОЕКТА**

Сорта с выявленным необходимым типом ЦМС

## **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Анисимова И.Н., Дубровская А.Г. Системы ЦМС у рапса и их использование в селекции отечественных гибридов. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2020; 181(3):171-180. DOI: 10.30901/2227-8834-2020-3-171-180
2. Бондарева Л.Л. Определение типа цитоплазмы у растений семейства

- Капустные (Brassicaceae Burnett) с помощью ДНК маркеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):529-537). DOI: 10.18699/VJ15.069
3. Уильямс У. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ. Пер. с англ. Е. Н. Волотова и Н. А. Емельяновой. Под ред. и с предисл. д-ра биол. наук Б. Н. Сидорова. М., «Колос», 1968. – 448с.
4. Вайцман, Джонатан. Генетика / Д. Вайцман, М. Вайцман; [пер. с англ. М. Нижарадзе]. – М. : РИПОЛ классик, 2018. – 160 с. : ил.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

**Фото 1.**







