

Министерство образования и науки Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

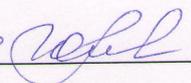
Кафедра генетики

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГАПЛОИНДУКЦИИ У КУКУРУЗЫ ПРИ  
НЕСОВПАДЕНИИ СРОКОВ МАССОВОГО ЦВЕТЕНИЯ  
ОТЦОВСКИХ И МАТЕРИНСКИХ ФОРМ**

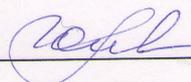
АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 422 группы  
Направления 06.03.01 Биология  
Биологического факультета  
Бадьянова Евгения Витальевича

Научный руководитель  
зав. кафедрой генетики  
д.б.н., доцент

06.06.2018  О.И. Юдакова

Зав. кафедрой генетики,  
д.б.н., доцент

06.06.2018  О.И. Юдакова

Саратов 2018

**Введение.** Явление гаплоидии, или образование особей с гаплоидным набором хромосом, может использоваться для решения различных теоретических и практических задач, в том числе для изучения наследования количественных признаков, ускоренного создания гомозиготных линий, необходимых для производства высокогетерозисных гибридов. В норме частота образования гаплоидов является крайне низкой, в среднем 1/1000. В связи с этим особый интерес представляют гаплоиндукторы. Опыление материнских форм пыльцой растений-гаплоиндукторов стимулирует у них партеногенетическое развитие зародышей. Этот метод успешно используется на многих важных сельскохозяйственных растениях, в частности, на кукурузе, для которой создан целый ряд линий с гаплоиндуцирующей способностью, позволяющих получать гаплоиды с частотой до 10%.

Успешное применение линий-гаплоиндукторов зависит не только от их способности к гаплоиндукции, но и от адаптированности скрещиваемых форм к географическим и климатическим условиям выращивания, синхронизации сроков цветения и других факторов. Таким образом, несмотря на достигнутые успехи в использовании гаплоиндукторов в селекции, теоретические и практико-ориентированные исследования в этой области до сих пор остаются актуальными. С одной стороны, необходимо изучать возможные механизмы гаплоиндукции, а с другой стороны, создавать новые линии-гаплоиндукторы, отвечающие различным требованиям селекции.

В связи с этим целью настоящего исследования явилось тестирование линий кукурузы, созданных на кафедре генетики Саратовского государственного университета, на способность индуцировать развитие гаплоидных семян *in vivo* у материнских форм с разными сроками цветения.

Для достижения цели были поставлены и решены следующие задачи:

- 1) изучение роста пыльцевых трубок гаплоиндуцирующей линии кукурузы в тканях столбика материнских форм;

- 2) проведение экспериментов по тестированию линий кукурузы на способность к формированию гаплоидных семян *in vivo* с использованием материала СГУ;
- 3) отбор гаплоидных семян кукурузы при условии успешного проявления антоцианового окрашивания зерна.

Бакалаврская работа состоит из следующих глав: введение, обзор литературы, материал и методы исследования, результаты исследования, заключение, выводы.

**Основное содержание работы.** В разделе «Обзор литературы» приводится анализ литературных источников по различным вопросам, связанных с явлением гаплоидии (образование особей с гаплоидным набором хромосом): механизмы образования гаплоидных растений, использование гаплоидов в селекционно-генетических программах, явление гаплоиндукции у кукурузы и генетическое маркирование.

Была выдвинута гипотеза, что одной из причин высокой гаплоиндуцирующей способности линии ЗМС-П мог послужить неизвестный механизм физиологической полунесовместимости. Для проверки этого предположения пылью линии ЗМС-П были опылены растения линий: По226, Белозерный и Белозерный 330. Через 1,5-2 ч столбики длиной 2-4 см срезали и фиксировали ацетоалкоголем (3:1).

Для окрашивания пылевых трубок использовали ацетокармин, приготовленный по стандартной методике, или смесь его с глицерином в равных частях. Пестики помещали в бюкс с красителем и слегка подогревали, не доводя до кипения. Время окрашивания подбирали эмпирически. При использовании этой методики пылевые трубки окрашиваются в красный цвет и хорошо видны на светло-розовом фоне проводящей ткани пестика. Для каждой материнской формы было приготовлено и проанализировано по 100 препаратов столбиков. Анализ препаратов проводили с помощью микроскопа «AxioStar» (C. Zeiss, Германия).

Материалом исследования гаплоиндуцирующей способности линий кукурузы при несовпадении сроков цветения отцовских и материнских форм послужили линии ВИР-44 ЗМ, ВИР-158 ТВ, Киз 23 ТВ, S-144, ЕС Лимес, Каз. Л.К. 171, ES Regain, Каз. Л.К. 178, Тургайская 5/87, которые использовали в дальнейших скрещиваниях в качестве материнских форм. Для получения семян с гаплоидными зародышами растения этих линий опыляли пыльцой двух линий-гаплоиндукторов: ЗМС-8 (Зародышевый маркер Саратовский – 8) и ЗМС-П (Зародышевый маркер Саратовский – Пурпурный). По 100 семян каждой линии 31 мая 2017 г. были высеяны в открытый грунт на экспериментальном участке делянками (квадратами), состоящими из 4 рядов по 25 растений.

До появления пестичных нитей, початки растений изолировали пергаментными пакетами. Перед опылением рыльца подрезали ножницами и наносили на них свежесобранную пыльцу линий-гаплоиндукторов. На изоляторах делали соответствующую запись простым карандашом о пыльцевом родителе и дате опыления.

Созревшие початки собирали в период с 26 сентября по 5 октября 2017 г., просушивали и анализировали. Отбор зерновок с предполагаемыми гаплоидными зародышами производили, используя метод генетического маркирования. Гаплоиндукторы ЗМС-8 и ЗМС-П имеют доминантные гены пурпурной окраски алейрона и зародыша. При опылении пыльцой гаплоиндукторов линий с рецессивными аллелями данных генов завязываются гибридные зерновки с окрашенным алейроновым слоем эндосперма и окрашенным диплоидным зародышем. В случае индукции партеногенеза образуются зерновки с окрашенным гибридным эндоспермом и с неокрашенным гаплоидным зародышем. Наличие у материнских форм генов окраски зародыша или генов-ингибиторов окраски не позволяет диагностировать плоидность зародыша на стадии сухих зерновок.

При анализе зерновок на початках обращали внимание на зерновки без зародыша. Такие зерновки являются одним из результатов нарушений,

происходящих на стадиях оплодотворения и эмбриогенеза. Наличие беззародышевых зерновок свидетельствует о том, что гаплоиндуктор индуцирует у данной линии процессы, приводящие к возникновению матроклиных гаплоидов. Если на початке присутствуют беззародышевые зерновки, но не встречаются зерновки с гаплоидным зародышем, можно сделать предположение, что у данной линии яйцеклетки не стимулируются к развитию или происходит дегенерация зародыша в развивающемся семязачатке.

В ходе анализа роста пыльцевых трубок линии ЗМС-П были выявлены аномалии в росте и развитии некоторых из них. Наиболее характерной аномалией явилось разветвление пыльцевой трубки на две самостоятельные структуры (рис.4). Одна из «ветвей» могла быть короче другой, что может свидетельствовать о торможении или полном прекращении ее роста. Подобная «развилка» может послужить причиной разделения спермиев в процессе их продвижения по пыльцевой трубке. В результате, зародышевого мешка достигает лишь один из них. Это в свою очередь может служить причиной одинарного оплодотворения.

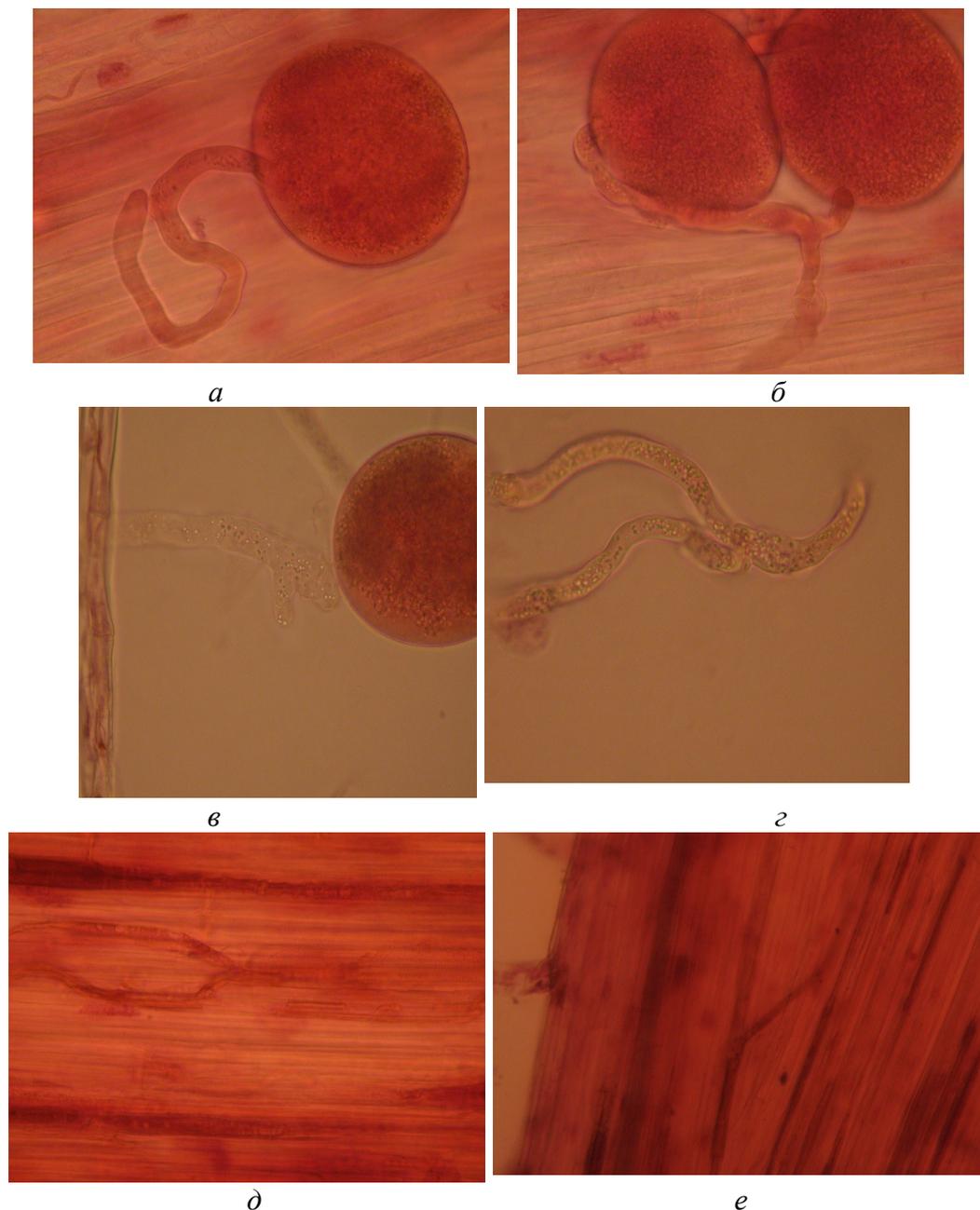
#### Линия По226

Линия была опылена гаплоиндуктором 12.08.16. в 8:35 по местному времени, столбик срезан в 11:36 в тот же день. Общее время для прорастания пыльцевых трубок в условиях *in vivo* – 181 мин. Из 100 исследованных пестиков только в 5 были обнаружены ветвящиеся пыльцевые трубки, что в процентном отношении к общему количеству найденных пыльцевых трубок составляет 0,35% (табл.1). Имеет наибольшее количество пыльцевых трубок, как в абсолютном значении, так и в расчете на один пестик.

#### Линия Белозерный

Линия была опылена гаплоиндуктором 14.08.17. в 9:19 по местному времени, столбик срезан в 11:47 в тот же день. Общее время для прорастания пыльцевых трубок в условиях *in vivo* – 128 мин. Из 100 исследованных пестиков ветвящиеся пыльцевые трубки были обнаружены в 8 из них

(табл.1). Линия имеет наибольшую частоту встречаемости ветвящихся пыльцевых трубок (0,61%) и может быть рекомендована, как объект для дальнейших исследований физиологической полунесовместимости гаплоиндуктора ЗМС-П.



*a* – проросшее пыльцевое зерно (норма); *б, в* – пыльцевые зерна с разветвляющимися пыльцевыми трубками; *г-е* – разветвление пыльцевых трубок в тканях пестика

Рисунок 4 – Пыльцевые трубки (линия ЗМС-П)

Таблица 1 – Рост пыльцевых трубок линии ЗМС-П в тканях пестиков различных материнских форм

Материнская линия	Количество измерений	Общее количество пыльцевых трубок, шт	Количество разветвленных пыльцевых трубок		Среднее количество пыльцевых трубок в пестике
			абс. ч.	%	
По226	100	1431	5	0,35	14
Белозерный		1322	8	0,61	13
Белозерный 330		717	1	0,14	7

### Линия Белозерный 330

Линия была опылена гаплоиндуктором 14.08.17. в 9:30 по местному времени, столбик срезан в 12:30 в тот же день. Общее время для прорастания пыльцевых трубок в условиях *in vivo* – 180 мин. Разветвленная пыльцевая трубка была найдена лишь в 1 из 100 исследованных пестиков. Линия имеет наименьшую частоту встречаемости ветвящихся пыльцевых трубок (0,14%), как и наименьшее количество проросших пыльцевых трубок вообще (табл.1), в разы уступая по этим показателям двум другим линиям.

Во время изучения способности к формированию гаплоидных семян *in vivo* при неспадении сроков массового цветения гаплоиндукторов и материнских форм сроки начала цветения у линий, которые использовались в качестве материнских форм, значительно варьировали. По данному признаку можно выделить две группы: 1) раннецветущие, у которых рыльца появлялись в конце июля – начале августа; 2) позднецветущие, с началом цветения в середине августа (13-15 августа) (табл.2).

Сроки цветения растений обеих групп частично не совпали со сроками массового цветения гаплоиндукторов (рис.5). В первой группе производили опыление изолированных початков со значительной задержкой, а во второй – соцветия опыляли пыльцой отцветающих растений гаплоиндукторов. Семена завязались во всех вариантах скрещиваний, однако при скрещивании позднецветущих линий Киз 23 ТВ и S-144 с гаплоиндуктором ЗМС-8 и

раннецветущей линии ES Regain с ЗМС-П были получены лишь единичные зерновки.

Таблица 2 – Сроки цветения изученных линий кукурузы

Линии	Время появления первых рылец	Окончание массового цветения
Линии, используемые в скрещиваниях в качестве материнских форм		
ES Regain	31 июля-1августа	7 августа
Каз. Л.К. 178	31 июля -1августа	7 августа
Тургайская 5/87	31 июля -1 августа	7 августа
ЕС Лимес	2-3 августа	10 августа
Каз Л.К. 171	2-3 августа	10 августа
S-144	13-14 августа	20 августа
ВИР-158 ТВ	14-15 августа	21 августа
ВИР-44 ЗМ	15-16 августа	23 августа
Киз 23 ТВ	15-16 августа	23 августа
Линии-гаплоиндукторы, используемые в скрещиваниях в качестве отцовских форм		
ЗМС-8 (1)	8-9 августа	16 августа
ЗМС-8 (2)	13-14 августа	19 августа
ЗМС-П	7-8 августа	19 августа

*Примечание:* Среди высаженных на опытном участке растений линии ЗМС-8 присутствовали экземпляры с разными сроками цветения: большинство растений цвели с 8 по 16 августа, они обозначены в таблице как ЗМС-8 (1), группа растений с более поздним сроком цветения обозначена как ЗМС-8 (2).

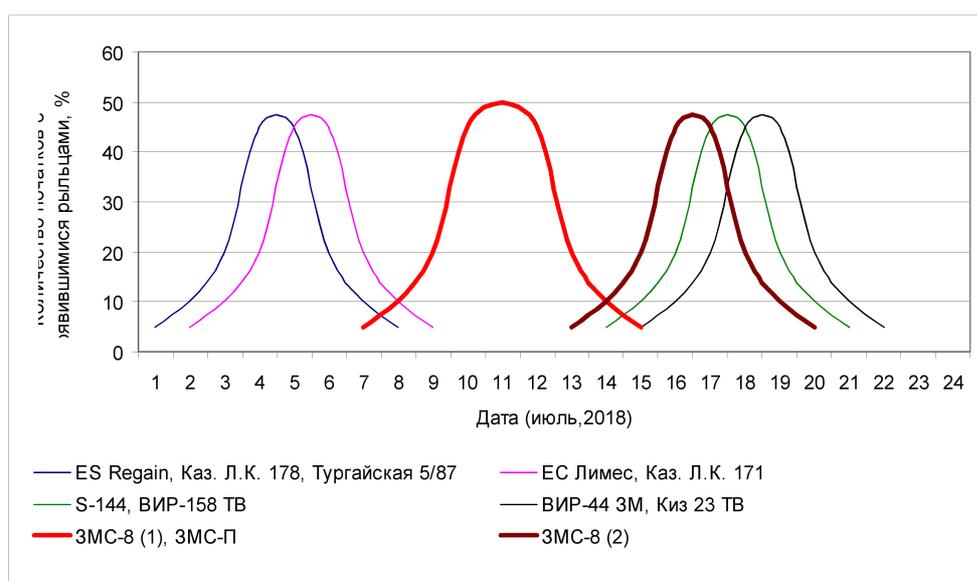
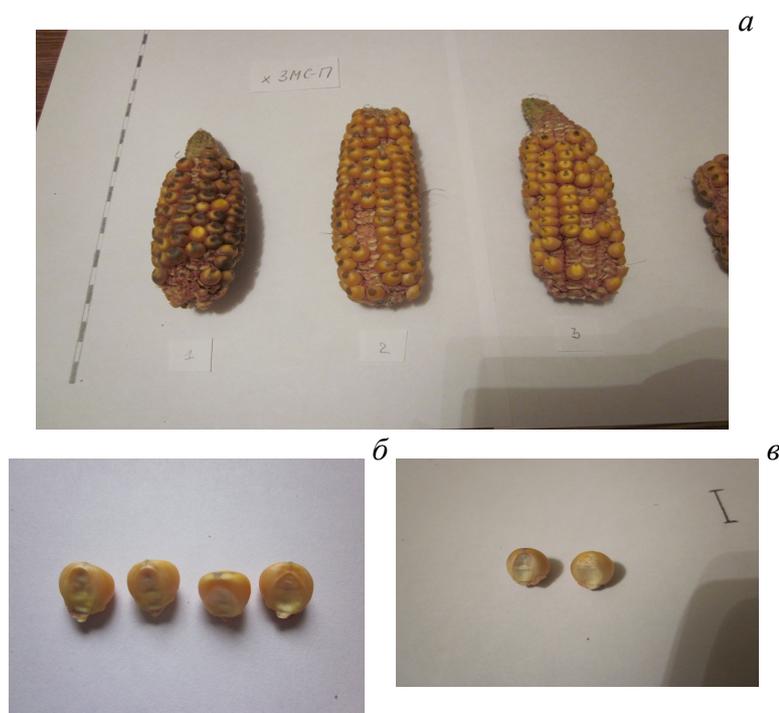


Рисунок 5 – Сроки цветения исследованных линий кукурузы в условиях Нижнего Поволжья

Антоциановая окраска завязавшихся гибридных зародышей и эндосперма свидетельствовали об отсутствии у всех изученных линий генов-ингибиторов окраски (рис.6). Однако отбор семян с предполагаемыми гаплоидными зародышами по маркерной антоциановой окраске в ряде случаев был осложнен особенностями окраски семян материнских линий. Так, сложность в отборе гаплоидов создавали темная окраска покровов семян в районе щитка у линий ВИР-44 ЗМ и S-144, а также пестрая окраска покровов зерновок у линий ЕС Лимес и ES Regain (рис.7). В потомстве данных линий диагностику предполагаемой ploидности зародыша проводили с использованием дополнительно морфометрического метода. Размер гаплоидных зародышей, как правило, в 1,5-2 раза меньше диплоидных.



*а* – початки с гибридными зерновками; *б* – зерновки с гибридным окрашенным зародышем (слева) и гаплоидным неокрашенным зародышем (справа), полученные после опыления пыльцой линии ЗМС-8; *в* – зерновки с гибридным окрашенным зародышем (слева) и гаплоидным неокрашенным зародышем (справа), полученные после опыления пыльцой линии ЗМС-П

Рисунок 6 – Зерновки линии ВИР-158 ТВ, полученные после опыления пыльцой линий-гаплоиндукторов

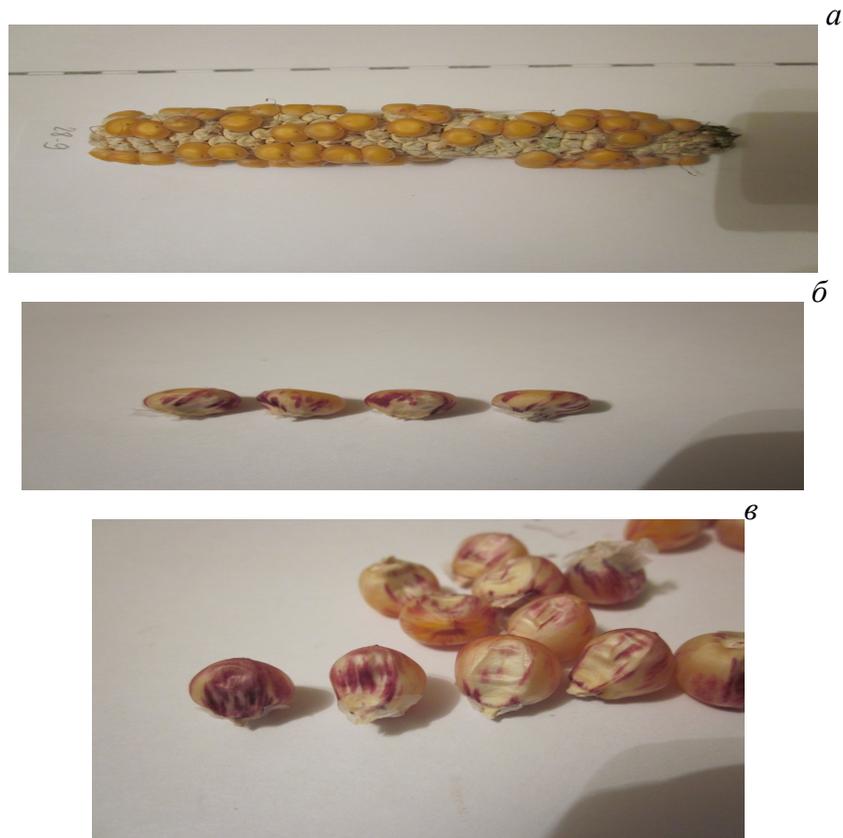


Рисунок 7 – Початок (а) и гибридные зерновки (б, в), полученные в скрещивании ЕС Лимес х ЗМС-П

Гаплоидные зародыши не были обнаружены только в тех случаях, когда из-за большого несовпадения по срокам цветения на материнских растениях завязались единичные зерновки. В остальных вариантах частота гаплоиндукции варьировала от 2,8 (Тургайская 5/87 X ЗМС-8) до 14,8% (S-144 X ЗМС-П) (табл.2). Для каждой конкретной линии частоты образования зерновок с гаплоидными зародышами достоверно не отличались при опылении обоими гаплоиндукторами.

**Заключение.** Проведенное исследование особенностей прорастания пыльцевых зерен линии-гаплоиндуктора ЗМС-П показало, что наиболее характерной аномалией роста пыльцевых трубок является их раздвоение. Данная аномалия была зарегистрирована во всех изученных вариантах скрещиваний, что свидетельствует о ее неслучайном характере. Несмотря на низкую частоту встречаемости раздвоенных пыльцевых трубок (0,14-0,61%), эту особенность можно рассматривать в качестве одной из возможных

эмбриологических предпосылок, объясняющих влияние мужского гаметофита на образование матроклинного гаплоидного потомства у кукурузы. Данное предположение требует более детальных исследований.

Таблица 2 – Количество зерновок с предполагаемыми гаплоидными зародышами у линий кукурузы после опыления пылью гаплоиндуцирующих линий ЗМС-8 и ЗМС-П

Материнская форма	Опылитель	Количество зерновок				
		с предполагаемым гаплоидным зародышем		без зародыша, шт	с диплоидным (гибридным) зародышем, шт.	Всего, шт.
		абс. ч.	%			
ВИР-158 ТВ	ЗМС-8	50	3,6*	133	1199	1384
	ЗМС-П	98	5,5	90	1597	1785
ВИР-44 ЗМ	ЗМС-8	23	5,7*	16	365	404
	ЗМС-П	26	7,3	16	312	354
Киз 23 ТВ	ЗМС-8	0	0,0	0	4	4
	ЗМС-П	40	5,5	21	665	726
Каз Л.К. 178	ЗМС-8	21	3,0*	53	627	701
	ЗМС-П	30	3,8	23	732	785
Тургайская 5/87	ЗМС-8	13	2,8*	40	416	469
	ЗМС-П	3	3,4	8	67	88
S-144	ЗМС-8	0	0,0	1	4	5
	ЗМС-П	16	14,8	16	96	108
Каз. Л.К. 171	ЗМС-8	6	3,1*	15	170	191
	ЗМС-П	6	3,2	8	174	188
ЕС Лимес	ЗМС-8	29	3,9*	62	654	745
	ЗМС-П	15	4,3	28	303	346
ES Regain	ЗМС-8	6	3,0	36	156	198
	ЗМС-П	0	0,0	3	17	20

Примечание: \* - различия по частоте гаплоиндукции при использовании в качестве опылителя растений линий ЗМС-8 и ЗМС-П не достоверны по критерию Фишера на уровне значимости  $p \geq 0.05$

Опыление отцветающих и запаздывающих растений у раннецветущих материнских форм и зацветающих растений у позднецветущих линий дало возможность получить гибридные семена с предполагаемыми гаплоидными зародышами во всех вариантах скрещиваний. Генетическое маркирование не

на всех материнских линиях (сортах) показало хорошие результаты. Сложность в отборе гаплоидов создавали темная окраска покровов семян в районе щитка у линии ВИР-44 ЗМ и пестрая окраска покровов зерновок у линии ЕС Лимес. В случае слабой интенсивности окраски зародышей, диагностику следует проводить с использованием дополнительно морфометрического метода. Кроме того, при скрещивании с индуктором ЗМС-П взрослые гибридные растения в дальнейшем будут иметь пурпурную окраску стебля и листьев, тогда как матроклинные гаплоиды – зеленый стебель и листья. Если по каким-либо причинам плоидность проростков не будет определяться цитогенетическим методом, отбор гаплоидов можно завершить в лабораторных и полевых условиях по морфологическим характеристикам растений. Таким образом, изученные линии ЗМС-8 и ЗПМ-П могут использоваться в качестве отцовских форм для получения гаплоидов *in vivo* даже при частичном несовпадении сроков их массового цветения с материнскими линиями. Это расширяет диапазон их применения в селекции.

#### **Выводы:**

1. Характерной аномалией процесса прорастания пыльцевых зерен линии-гаплоиндуктора ЗМС-П в тканях пестиков различных материнских форм является раздвоение пыльцевой трубки. Данное нарушение встречается с частотой 0,14-0,61%.
2. При значительном несовпадении сроков массового цветения на растениях завязывались единичные семена, среди которых гаплоидные зародыши не обнаружены.
3. При частичном несовпадении сроков массового цветения растений линий-гаплоиндукторов ЗМС-8 и ЗМС-П с материнскими формами частота образования семян с гаплоидными зародышами варьировала от 2,8 (Тургайская 5/87 X ЗМС-8) до 14,8% (S-144 X ЗМС-П).
4. Линии ЗМС-8 и ЗМС-П в проведенных экспериментах показали одинаковую эффективность гаплоиндукции. Для каждой материнской

формы частоты образования зерновок с гаплоидными зародышами достоверно не отличались при опылении обоими гаплоиндукторами.