

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

Кафедра генетики

**НАЧАЛЬНЫЕ ЭТАПЫ СОЗДАНИЯ
РИСОВОЙ И САХАРНОЙ ФОРМ КУКУРУЗЫ
С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ АНТОЦИАНОВ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 241 группы

Направления 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Подсевалова Сергея Дмитриевича

Научный руководитель

Зав. кафедрой генетики,

д.б.н., доцент

12.06.2018  О.И. Юдакова

Зав. кафедрой генетики,

д.б.н., доцент

12.06.2018  О.И. Юдакова

Саратов 2018

Введение. Кукуруза (*Zea mays* L.), наряду с пшеницей и рисом, является одной из самых важных сельскохозяйственных культур. Это наиболее распространенная зерновая злаковая культура, имеющая продовольственное, кормовое и агротехническое значение. Кроме того, кукуруза — классический объект генетических исследований, направленных на создание гетерозисных форм, отличающихся высокой урожайностью.

Кукуруза имеет высокую питательную ценность. В ее состав входит большое количество витаминов, особенно много в ней витаминов группы А, В, Е, Н. В кукурузе присутствует большое количество углеводов, легко растворимых сахаров, белков, пищевых волокон и крахмала. Много в ней и различных минералов: калия, фосфора, кальция, серы, натрия, хлора, железа и др. Селен, содержащийся в кукурузе, способен замедлять процессы старения и предупреждать развитие раковых опухолей. В этом неоценимая польза кукурузы для здоровья человека. И народная, и официальная медицина активно используют кукурузные рыльца для лечения различных заболеваний. Доказано, что они могут снижать уровень сахара крови, оказывать желчегонное и мочегонное действие, нормализовать работу желудка.

Большой ценностью обладают пурпурные (антоциановые) формы кукурузы, которые наряду со всеми выше перечисленными полезными веществами также содержат целый комплекс биологически активных веществ с положительным фармакологическим действием. Установлена антимикробная активность водно-спиртового экстракта антоциановой формы кукурузы в отношении тест-штаммов синегнойной палочки и стафилококка. Химический состав данной фармакологической композиции свидетельствует о ее потенциальной противоопухолевой, антиоксидантной и другой фармакологической активности. Антоцианы, выделенные из пурпурной кукурузы, могут использоваться как пищевые красители, так и фармакологические средства.

В настоящее время все более популярным продуктом питания становится

сладкая кукуруза и продукты ее переработки. Выведение линий кукурузы с повышенным содержанием сахара и антоцианов может открыть перспективы по созданию новых продуктов питания, сочетающих в себе хорошие вкусовые качества и пользу для здоровья человека.

Такими новыми продуктами питания могут стать пурпурная вареная кукуруза и попкорн, приготовленный из сортов рисовой (попкорновой) кукурузы с высоким содержанием антоцианов в зерновках. В настоящее время американскими селекционерами была создана одна линия попкорновой формы кукурузы с антоциановой окраской алейронового слоя эндосперма.

Целью настоящей работы являлся отбор исходного материала и проведение начальных этапов селекционных работ по созданию рисовой и сахарной форм кукурузы с повышенным содержанием антоцианов.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Для отбора исходного материала для селекции провести биохимический анализ на содержание сахаров в соке, полученном из стеблей, и в экстрактах кроющих листьев диплоидных и тетраплоидных растений кукурузы линии ПС (Пурпурная Саратовская).

2. Разработать схемы селекции рисовой и сахарной форм пурпурной кукурузы с использованием современных технологий удвоенных гаплоидов (ДН-технологии).

3. Для выведения сахарной формы пурпурной кукурузы провести скрещивание растений линии ПС с растениями нелинейного гибрида, гомозиготного по генам, детерминирующим развитие сахарного эндосперма.

4. Для выведения рисовой формы пурпурной кукурузы провести скрещивание растений линии ПС с растениями нелинейного гибрида рисовой кукурузы.

Работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов, списка использованных источников и приложения. Основная часть работы включает 3 главы: Обзор литературы, материал и методы и результаты исследования.

Основное содержание работы. В обзоре литературы приводится анализ литературы по вопросам, касающихся биологической и хозяйственной ценности пурпурной кукурузы (Pedreschi, 2007; Aoki, 2002; Lago, 2012), структуры и фармакологического действия антоцианов (Шоева, 2013; Ananga, 2013; Белянин, 2010; Наволокин, 2013; Коноплева, 2007; Полуконнова, 2010), содержания сахаров в растительной продукции (Новиков, 2012; Филиппова, 2004), использования полиплоидии в селекции (Лаптев, 1984; Фадеева, Варивода, 2015; Брюбейкер 1966, Жуковский 1972, Матвеева, 1965; Бормотов, 1972 Дубинин 1965, Турбин, 1972), а также о перспективах создания линии попкорновой пурпурной кукурузы (Martin, 2011; Lippi, 2010; Escribano-Bailón, 2004; Pilu, 2011; Pilu, 2003, Ziegler, 1984)

В разделе «Материал и методы исследования» описывается объект исследования и использованные методы исследования. В качестве объекта изучения были использованы диплоидные и тетраплоидные растения кукурузы линии ПС (Пурпурная Саратовская), которые характеризуются пурпурной окраской зерен, листьев и эпидермиса стебля. При этом у растений сердцевина могла быть как окрашенной, так и неокрашенной.

Первым этапом работы стал отбор исходного материала для селекции с повышенным содержанием сахаров. Для этого был проведен анализ сока и экстрактов растений на содержание сахарозы, редуцирующих сахаров и общее количество сахаров в расчете на г/100мл по Лэну и Эйнону.

Проведенное исследование показало, что в экстрактах листьев кукурузы редуцирующие сахара и сахароза отсутствуют.

В соке растений общее количество сахаров значительно варьировало по годам от 5,6 до 15,6 г/100 мл. Корреляции между количеством сахаров и плоидностью растений, а так же между количеством сахаров и окраской сердцевины стебля растений не обнаружено.

В соке всех изученных растений преобладали редуцирующие сахара (глюкозы, фруктозы). Их содержание превышало содержание сахарозы. У

диплоидных растений количество редуцирующих сахаров было относительно постоянным, тогда как у тетраплоидных растений содержание редуцирующих сахаров значительно варьировало по годам: от 5, 6 до 15,6 г/100 мл.

По содержанию сахарозы наблюдалось колебание по годам как у диплоидных, так и у тетраплоидных растений. Эти колебания, скорее всего, связаны с разными погодными условиями в период вегетации в изученные годы.

Корреляций между содержанием сахарозы и уровнем пloidности растений и окраской сердцевины не обнаружены. Однако у тетраплоидных растений общее количество сахаров в соке стеблей варьирует по годам более существенно по сравнению с диплоидами. Коэффициент вариации признака у тетраплоидов составил 44,1%, у диплоидов с зеленой сердцевиной 21,6%, у диплоидов с пурпурной сердцевиной – 17,2%.

Исходя из полученных результатов, в качестве исходного материала для дальнейшей работы были отобраны диплоидные растения с пурпурной сердцевиной стебля.

В работе были разработаны схемы селекции пурпурных форм сахарной кукурузы и пурпурных форм рисовой кукурузы.

Для получения пурпурных форм кукурузы необходимо присутствие в генотипе растений сразу двух доминантных генов В и Р1. При этом в генотипе создаваемой рисовой пурпурной кукурузы должны присутствовать доминантные гены антоциановой окраски и доминантный ген, детерминирующий лопающийся эндосперм; в генотипе сахарной пурпурной формы доминантные гены окраски должны сочетаться с рецессивным геном, отвечающим за развитие сахарного эндосперма. При создании линий с такой комбинацией генов методами традиционной селекции сначала проводят гибридизацию растений с нужными генами, после чего используют так называемые насыщающие (возвратные) скрещивания в 6-12 поколениях. В нашей климатической зоне, где получение урожая возможно только один раз в

год, на создание таких линий затрачивается соответственно не менее 6-12 лет. При самоопылении гибридов первого поколения будет получено указанное на рисунке 1 расщепление по фенотипу и генотипу.

B, Pl – гены отвечающие за пурпурную окраску

L – ген, детерминирующий развитие лопающегося эндосперма

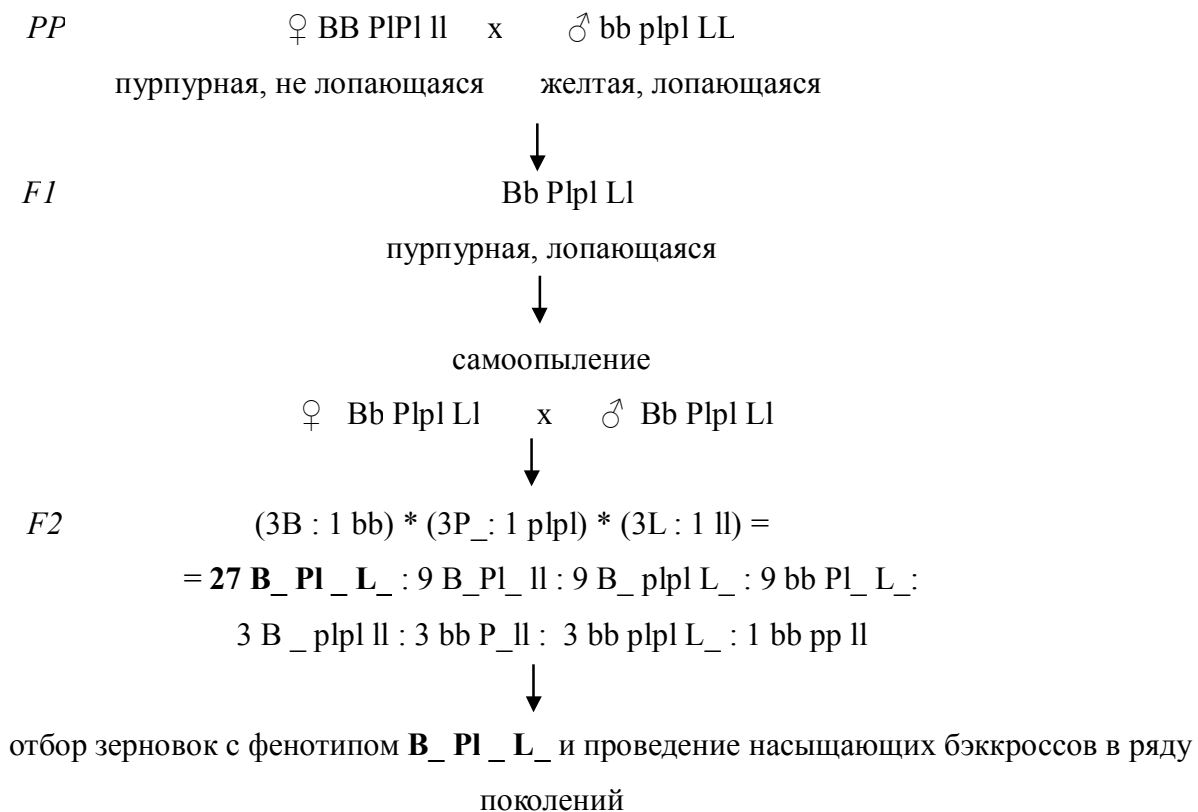


Рисунок 1 — Схема выведения линии рисовой пурпурной кукурузы с использованием методов классической селекции

Растения с фенотипом $B_ P_ L_$ будут встречаться с частотой 27/ 64, и одно из этих 27 растений будет гомозиготным по доминантным генам, причем визуально его определить не представляется возможным. В связи с трудоемким процессом отбора гомозигот возрастает необходимость разработки схемы селекции с использованием современных технологий удвоенных гаплоидов (ДН-технологии). Данные технологии позволяют сократить время на создание

гомозиготных линий и значительно ускорить селекционный процесс.

Для создания гомозиготных растений пурпурных форм кукурузы мы разработали приведенную на рисунке 2 схему.

1-й год – гибридизация пурпурных форм с рисовой формой

PP ♀ $BB PIP1 l1$ х ♂ $bb plp1 LL$
пурпурная, нелопающаяся желтая, лопающаяся



$F1$ $Bb Plpl Ll$

2-ой год – опыление гибридов первого поколения пылью гаплоиндуцирующих линий и получение семян с гаплоидными зародышами

♀ диплоид, $2n$ ($Bb Plpl Ll$) х ♂ гаплоиндуктор ($2n$)

$F2$ – гаплоидные зародыши с генотипами:

$B Pl L$ пурпурная, лопающаяся

$B pl l$ желтая, не лопающаяся

$b Pl L$ желтая, не лопающаяся

$B Pl l$ пурпурная, не лопающаяся

$b pl L$ желтая, лопающаяся

$B p l$ желтая, не лопающаяся

$b Pl l$ желтая, не лопающаяся

$b p l$ желтая, не лопающаяся

Отбор зерновок с генотипом $B Pl L$ (пурпурная, лопающаяся)

3-й год – диплоидизация проростков с генотипом $B Pl L$ и их самоопыление

гаплоид ($B Pl L$) → колхицинирование ($BB PIP1 LL$) → инцухт

4-й год – размножение полученных гомозиготных растений с генотипом $BB PIP1 LL$

Рисунок 2 — Схема селекции рисовой формы пурпурной кукурузы с использованием технологии удвоенных гаплоидов

Для получения пурпурной сахарной формы кукурузы в генотипе создаваемой линии должны присутствовать доминантные гены антоциановой окраски и ген сахаристости в рецессивном состоянии.

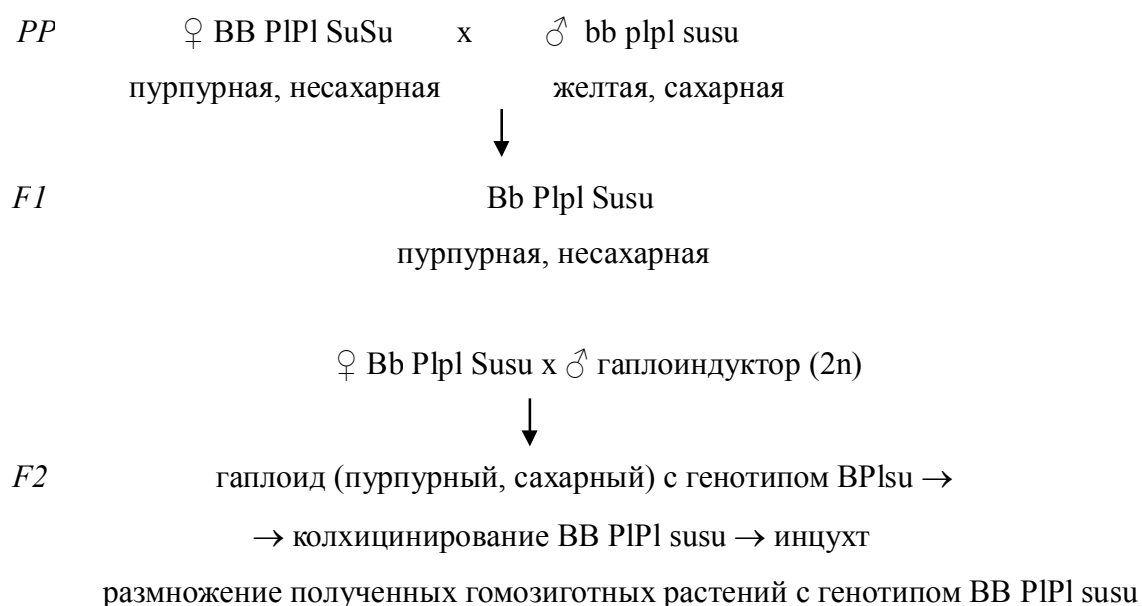


Рисунок 3 — Схема селекции сахарной формы пурпурной кукурузы с использованием технологии удвоенных гаплоидов

В ходе работы были произведены скрещивания кукурузы линии ПС с нелинейными гибридами сахарной и рисовой кукурузы.

Исходя из полученных результатов биохимического анализа сахаров в соке растений линии ПС, для дальнейших селекционных работ в качестве исходного материала были отобраны диплоидные растения с пурпурной окраской сердцевины стебля. Данные растения опылили пылью растений сахарной формы кукурузы.

В результате проведенного скрещивания были получены гибриды первого поколения (рис. 4), характеризующиеся красной окраской початка и, вследствие проявления доминантного гена Su, нормальным эндоспермом.

В 2018 году, для последующего получения семян с гаплоидными зародышами, было высажено 160 гибридных семян.



Рисунок 4 – Початки родительских форм (линия ПС (а) и сахарный гибрид (б)) и гибрида $F1$ BB PlPl SuSu x bb plpl susu (в)

Для создания попкорновой формы пурпурной кукурузы были скрещены коммерческий гибрид рисовой кукурузы (рис.5) и линия ПС (рис.4 а).

В результате скрещивания были получены гетерозиготные по генам окраски гибриды с лопающимся эндоспермом Bb Plpl Ll (рис. 6).

Для последующего получения гаплоидных зерновок в 2018 году было высажено 160 гибридных семян.

Таким образом, можно получить линию кукурузы с высоким содержанием антоцианов. Попкорн, приготовленный из семян кукурузы такого сорта, будет отличаться от неокрашенных аналогов целым рядом полезных для здоровья человека свойств.

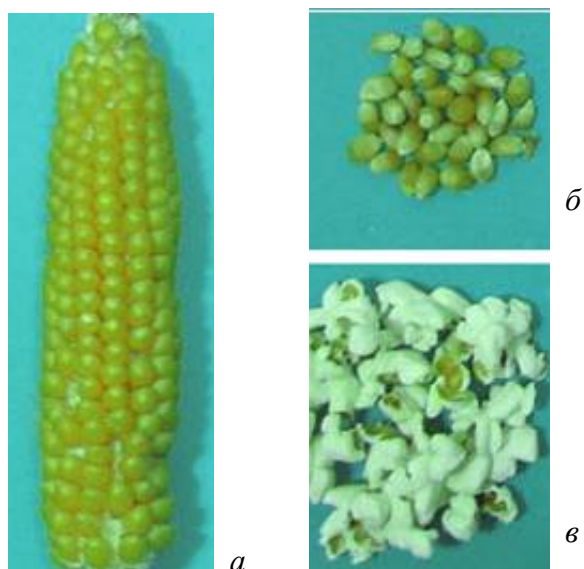


Рисунок 5 — Початок (а), зерна (б) и хлопья (в) родительской формы попкорновой кукурузы



Рисунок 6 — Початок (а), зерна (б) и хлопья (в) гибрида F1 BB P1P1 ll x bb plpl LL

Заключение. Проведенный биохимический анализ на содержание сахаров в растениях кукурузы линии ПС показал, что содержание сахаров в соке из стеблей составляет в среднем $8,9 \pm 1,9$ г/100 мл у диплоидов с зеленой сердцевинкой, $9,6 \pm 1,6$ г/100 мл у диплоидов с пурпурной сердцевинкой и $9,1 \pm 4,0$ г/100 мл у тетраплоидов с зеленой сердцевинкой стебля. Тетраплоиды содержат примерно такое же количество сахаров, что и диплоиды. В экстрактах из кроющих листьев кукурузы линии ПС, использованным методом исследования, сахара не обнаружены. Исходя из полученных результатов, для дальнейшей селекции сахарной формы пурпурной кукурузы были взяты диплоидные растения с пурпурной сердцевинкой стебля.

Для создания сахарной и рисовой форм пурпурной кукурузы разработана схема селекции с использованием современных технологий удвоенных гаплоидов (ДН-технологии). В соответствии с данной схемой проведено скрещивание растений линии ПС с растениями нелинейного гибрида, гомозиготного по генам, детерминирующим развитие сахарного эндосперма. Получены гибриды первого поколения, характеризующиеся пурпурной окраской початка и, вследствие проявления доминантного гена Su, нормальным эндоспермом.

В результате скрещивания растений линии ПС с растениями нелинейного гибрида рисовой кукурузы получены гибриды гетерозиготные по генам окраски BbP1r1 и гену «лопающийся эндосперм» (L1).

Для последующих селекционных работ по созданию новых линий пурпурной кукурузы в 2018 году было высажено по 160 растений каждого из полученных гибридов.

Выводы:

1. В водных и спиртовых экстрактах растений кукурузы линии ПС сахара отсутствуют. Содержание сахаров в соке из стеблей кукурузы линии ПС составляет в среднем $8,9 \pm 1,9$ г/100 мл у диплоидов с зеленой сердцевинной, $9,6 \pm 1,6$ г/100 мл у диплоидов с пурпурной сердцевинной и $9,1 \pm 4,0$ г/100 мл у тетраплоидов с зеленой сердцевинной стебля. В соке преобладают редуцирующие сахара (глюкоза и фруктоза). Количество сахаров варьировало по годам у диплоидных растений с зеленой окраской сердцевинной стебля – от 6,8 до 10,6 мг/100мл; у диплоидных растений с пурпурной сердцевинной стебля – от 7,9 до 11,2 мг/100мл; у тетраплоидных растений с зеленой окраской сердцевинной стебля 5, 6 – 15,6 г/100 мл; у тетраплоидных растений с пурпурной сердцевинной стебля – 6,3 г/ 100 мл.
2. Для создания сахарной и рисовой форм пурпурной кукурузы разработана схема селекции с использованием современных технологий удвоенных гаплоидов (DH-технологии).
3. В результате скрещивания растений линии ПС с растениями нелинейного гибрида, гомозиготного по генам, детерминирующим развитие сахарного эндосперма, получены гибриды первого поколения, которые будут использованы в селекционных работах по созданию гомозиготных линий сахарной формы пурпурной кукурузы.
4. В результате скрещивания растений линии ПС с растениями нелинейного гибрида рисовой кукурузы получены гибриды первого поколения, на основе которых будет проводиться селекционная работа по созданию гомозиготных линий рисовой формы пурпурной кукурузы.

