

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра генетики

**СОЗДАНИЕ ГОМОЗИГОТНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ ПУТЁМ
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТЕХНОЛОГИИ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

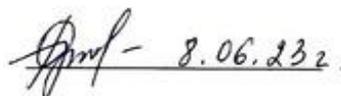
студентки 4 курса 422 группы

направления 06.03.01 Биология

биологического факультета

Трофименцевой Екатерины Владимировны

Научный руководитель
старший преподаватель

 8.06.23

О. В. Гуторова

Зав. кафедрой генетики
д.б.н., доцент

 8.06.23

О. И. Юдакова

Саратов 2023

Введение. Кукуруза занимает третье место по экономическому значению среди хлебных злаков и является одной из основных культур мирового земледелия. Зерно используется на кормовые, продовольственные и технические цели. В пищевой промышленности кукурузное зерно является сырьем для производства крупы, муки, масла, крахмала, спирта. Из надземной части урожая кукурузы вырабатывают разнообразную продукцию – клей, краски, лак, картон, изоляционные прокладки, линолеум, целлюлозу, фурфурол и др. Благодаря высокой урожайности, разностороннему использованию и успехам селекции, мировые площади под этой культурой постоянно расширяются.

Немаловажную роль сыграло ее постоянное генетическое и селекционное улучшение. Высокий спрос и уровень потребления данной культуры обозначает проблему создания новых сортов кукурузы. На создание линий с долей гомозиготных селекционно значимых локусов в геноме равной 99,9 % селекционер затрачивает 10 лет.

Для селекционера важна гомозиготность родительских линий, так как она отвечает за выровненность важного для селекционера признака. Однако такой довольно длительный срок неприемлем, учитывая востребованность культуры.

Использование гомозиготных (дигаплоидных) линий в селекционных схемах значительно упрощает и ускоряет процесс создания новых сортов кукурузы. За короткий срок, используя гаплоиндукцию, можно создать гомозиготную линию по необходимым генам.

Благодаря таким линиям впоследствии создаются высокогетерозисные гибриды, которые характеризуются скороспелостью, высокой устойчивостью к болезням и повышенной урожайностью. Метод, нацеленный на скорость воспроизводства, не снижает качество полученного селекционером продукта.

Цель работы: получить гомозиготные линии кукурузы на основе удвоенных матроклинных гаплоидов.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Провести опыление растений разных сортов кукурузы пылью гаплоиндукторов для получения гибридных зерновок, среди которых отобрать зерновки с гаплоидным зародышем.
- 2) Провести диплоидизацию гаплоидных растений на стадии 3-5 листьев, используя метод колхицинирования, в полевых условиях.
- 3) Изучить морфологические особенности гаплоидных растений, подвергшихся обработке колхицином на стадии 3-5 листьев, на стадии взрослого растения.

Оценить эффективность применяемого метода колхицинирования для получения гомозиготных линий кукурузы.

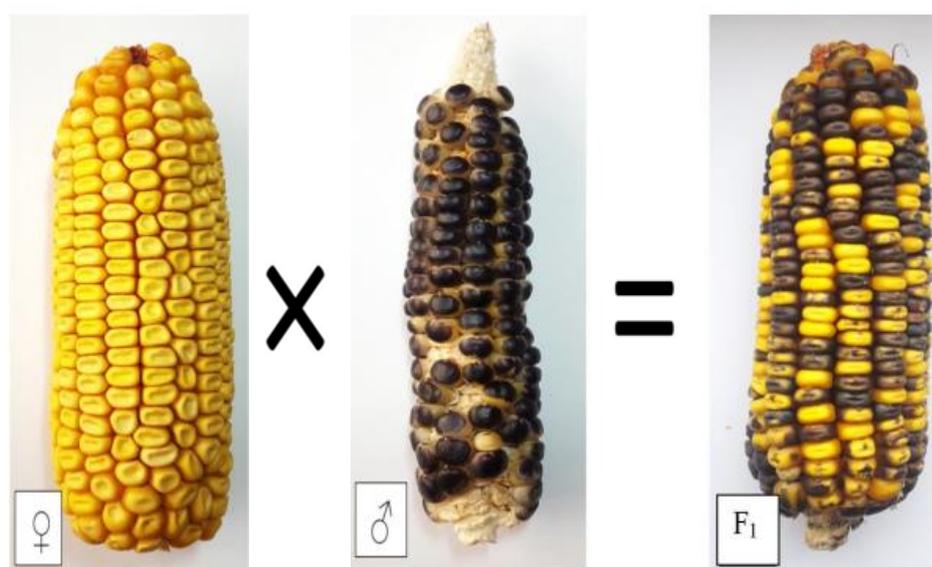
Структура и объем работы. Работа изложена на 68 страницах машинописного текста и включает 6 разделов: введение, обзор литературы, экспериментальную часть, заключение, выводы, список использованных источников, содержащий 74 наименования.

Основное содержание работы: Экспериментальная часть проводилась на опытном поле ФГБНУ РосНИИСК «Россорго» и в лаборатории биотехнологии и репродуктивной биологии кафедры генетики СГУ им. Н.Г. Чернышевского.

Ход работы.

1 этап: получение гаплоидов у разных материнских форм. Растения 18 материнских форм были высажены в поле в мае 2021 года. До начала цветения растений, во избежание переопыления чужой пылью или самоопыления, женские соцветия до появления первых пестичных нитей изолировали пергаментными пакетами. В период массового цветения материнских и отцовских растений осуществляли гибридизацию. Пыльцу отцовского родителя (гаплоиндуктора ЗМС-П) собирали в пергаментный пакет и высыпали на предварительно обрезанные рыльца женского соцветия. Затем быстро накрывали его пергаментным пакетом и завязывали веревкой. На изолятор простым карандашом наносили дату опыления. В среднем, было опылено по 8 початков каждого варианта. Початки с завязавшимися зерновками собирали в сентябре.

2 этап: отбор гаплоидов среди гибридных зерновок. Чтобы качественно произвести отбор гаплоидов на стадии зерновок использовали метод генетического маркирования. Гаплоиндуктор имеет доминантный ген-маркер (*R-nj:cludu*) окраски эндосперма и зародыша. При опылении его пыльцой растений материнских форм, имеющих данные гены в рецессивном состоянии, гибридные зерновки имеют маркированный темным пятном эндосперм и окрашенный диплоидный зародыш. В случае, когда сформирован гаплоидный зародыш, эндосперм оказывается маркированным (гибридным), а зародыш неокрашенным (как у материнской формы) (рисунок 1).



♀ – материнская форма с неокрашенными зерновками; ♂ – опылитель-гаплоиндуктор с маркированными зерновками; F1 – початок с гибридными зерновками

Рисунок 6 – Схема скрещивания

Взрослые гибридные растения, полученные от скрещивания с гаплоиндуктором ЗМС-П, имеют пурпурную окраску метелок, стеблей и листьев.

3 этап: посадка предполагаемых гаплоидных семян в поле и диплоидизация всходов на стадии 3-5 листьев. Семена с предполагаемыми гаплоидными зародышами были высажены 20 мая 2022 года в поле. Затем,

выросшие из посаженных зерновок растения (рисунок 2) на стадии 3-5 листьев двукратно обработали раствором колхицина (0,125 %) по методике Шацкой О.А. Состав раствора для удвоения гаплоидов в расчете на 500 мл: 625 мг колхицина, 15 мл диметилсульфоксида (ДМСО), 5 мл глицерина, 480 мл дистиллированной воды.



Рисунок 2 – Гаплоидные растения на стадии 3-5 листьев

Раствор вводили с помощью шприца в проводящую систему стебля растения как показано на рисунке 3.



Рисунок 3 – Обработка гаплоидных растений раствором колхицина

На стадии взрослых растений, чтобы избежать произвольного самоопыления, женские соцветия изолировались, путём надевания изоляторов (пергаментных пакетов) (рисунок 4). Пергаментные пакеты изготавливали заранее путем пошива на швейной машинке. Дату изоляции указывали пакете простым карандашом.



Рисунок 4 – Растения с початком, накрытым изолятором

После того как растения выпустили пестичные нити, провели их самоопыление. Из мужского соцветия растения вытряхивали пыльцу в пергаментный пакет. Аккуратно снимали изолятор с женского соцветия и высыпали на него ранее собранную пыльцу. Затем сразу же надевали изолятор обратно, крепко перевязав его веревкой. Простым карандашом на пакете отмечали дату самоопыления. Урожай собирали в конце сентября.

Результаты и обсуждение

На первом этапе были получены гаплоиды материнского типа с помощью опылителя ЗМС-П, обладающего способностью индуцировать гаплоиды. Используя ранее упомянутый метод генетического маркирования (рисунок 5), было отобрано 617 зерновок с гаплоидным зародышем в 18 вариантах (таблица 1).



а – початок, полученный от опыления растения желтозерной линии кукурузы пылью гаплоиндуктора ЗМС-П; б – гибридные зерновки с окрашенным зародышем и предполагаемые гаплоиды с неокрашенным зародышем

Рисунок 5 – Проявление генов-маркеров гаплоиндуктора ЗМС-П

Таблица 1 – Анализ зерновок початков, полученных в результате опыления разных материнских форм гаплоиндуктором ЗМС-П

Материнская форма	Количество гаплоидов, шт.	Количество зерновок с диплоидным зародышем, шт.	Количество немаркированных зерновок, шт.	Всего
Белозерный 300	57	656	10	723
Ладожский 250	27	311	0	338
Краснодарский 296 МВ	29	551	0	580
Р 9578	34	816	0	850
КС 215	58	909	15	982
Кр 212	59	679	2	740
Ик 204	17	326	0	343
Кр 210	22	293	0	315
Ладожский 298 АМВ	23	388	0	411
Кр 208	115	1528	50	1693
КС 300-18	26	494	0	520
АК 200-50	26	346	0	372
К 350	29	616	0	645
Кр 300-10	30	575	0	605
Зерноградский 282 МВ	20	283	2	305
PR37N01	13	175	1	189
Панора	12	228	0	240
Ладожский 191 МВ	20	338	0	358
Всего	617	9512	80	10209

Отобранные зерновки с предполагаемыми гаплоидами 18-ти вариантов в количестве 617 штук высадили в грунт 20 мая 2022 года. Для диплоидизации выжившие предполагаемые гаплоидные растения (205 шт.) на стадии 3-5 листьев были обработаны раствором колхицина (0,125 %) двукратно – 16 и 17 июня. Раствор вводили с помощью шприца в проводящую систему стебля растения по методике, описанной ранее.

Данные о посеве, всходах и количестве обработанных колхицином растений были занесены в таблицу (таблица 2).

Таблица 2 – Гаплоиды разных материнских форм: количество взошедших и обработанных раствором колхицина

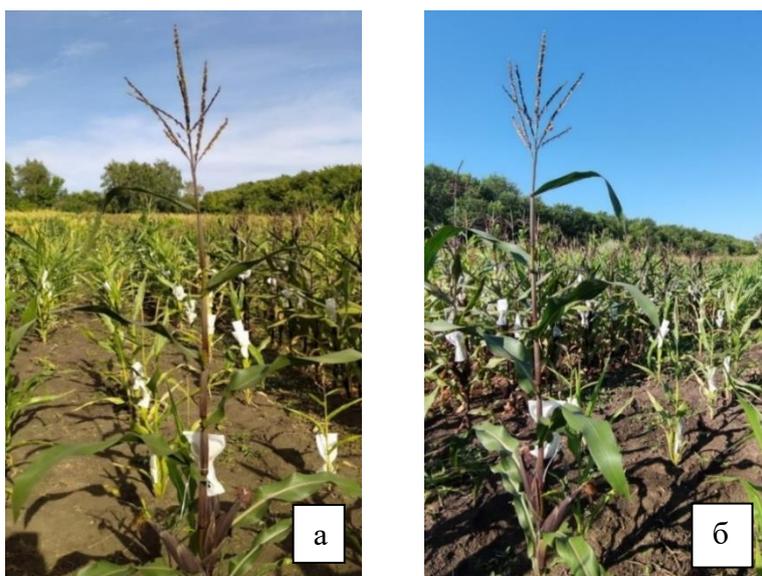
№	Материнские формы, у которых были получены гаплоиды	Количество посаженных семян с гаплоидным зародышем, шт.	Количество растений на стадии 3-5 листьев, шт.	Количество обработанных растений на стадии 3-5 листьев, шт.
1	Белозерный 300	57	0	0
2	Ладожский 250	27	1	1
3	Краснодарский 296 МВ	29	11	11
4	Р 9578	34	2	2
5	КС 215	58	12	12
6	Кр 212	59	13	13
7	Ик 204	17	3	3
8	Кр 210	22	1	1
9	Ладожский 298 АМВ	23	11	11
10	Кр 208	115	28	28
11	КС 300-18	26	16	16
12	АК 200-50	26	24	24
13	К 350	29	13	13
14	Кр 300-10	30	25	25
15	Зерноградский 282 МВ	20	18	18
16	PR37N01	13	12	12
17	Панора	12	7	7
18	Ладожский 191 МВ	20	8	8
	Всего	617	205	205

Зерновки предполагаемых гаплоидов прорастали не одновременно, на момент обработки колхицином было 205 растений на стадии 3-5 листьев. Это могло быть обусловлено несколькими причинами: низкая жизнеспособность проростков гаплоидов, недостаток влаги, высокая температура воздуха и др. Позднее, уже в конце июня-июле появились запоздалые растения. Как правило, такие растения были очень маленькими. Обработку колхицином данных растений не осуществляли.

Всего стадии взрослых растений достигло 205 растений. Из них 3 растения оказались гибридными. Такой вывод можно сделать, исходя из морфологических особенностей растения: они были высокими, имели пурпурную окраску частей растения. Наличие окраски служит доказательством гибридности, так как при гибридизации отцовский родитель содержал доминантные аллели генов окраски, а материнские растения – рецессивные аллели данных генов и были зелеными.

Обработанных колхицином гаплоидов на стадии взрослых растений будем называть «диплоидизированными гаплоидами», предполагая успешное прохождение диплоидизации, но одновременно в кавычках, так как не все растения на самом деле могут содержать удвоенное количество ДНК в клетках.

В варианте Панора одно растение было пурпурное и высокое (рисунок 6 а), в Ладожском 298 АМВ – 2 растения (рисунок 6 б).



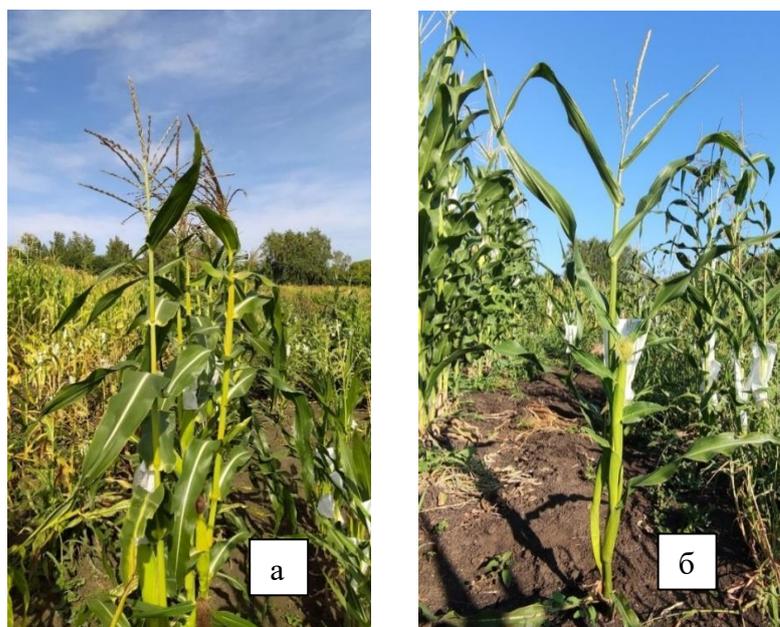
а – вариант Панора; б – вариант Ладожский 298 АМВ
Рисунок 6 – Высокие пурпурные гибридные растения

Таким образом, из предполагаемых гаплоидов на первом этапе при отборе на сухих семенах 3 зерновки оказались с диплоидным гибридным зародышем. Отсутствие окраски гибридного зародыша, скорее всего, связано с наличием генов-ингибиторов окраски у исходных материнских форм, в результате чего гибридный диплоидный неокрашенный зародыш был принят за гаплоидный. В варианте КР 212 четыре растения были очень высокими и зелеными, у КС 215 – 3 таких растения (рисунок 7 а, б), у Кр 300-10 – 4 растения, у Зерноградского 282 МВ – 5 растений (рисунок 8 а, б).



а – вариант Кр 212; б – вариант Кр 215

Рисунок 7 – Высокие зеленые растения «диплоидизированных гаплоидов»



а – вариант Кр 300-10; б – вариант Зерноградский 282 МВ

Рисунок 8 – Высокие зеленые растения «диплоидизированных гаплоидов»

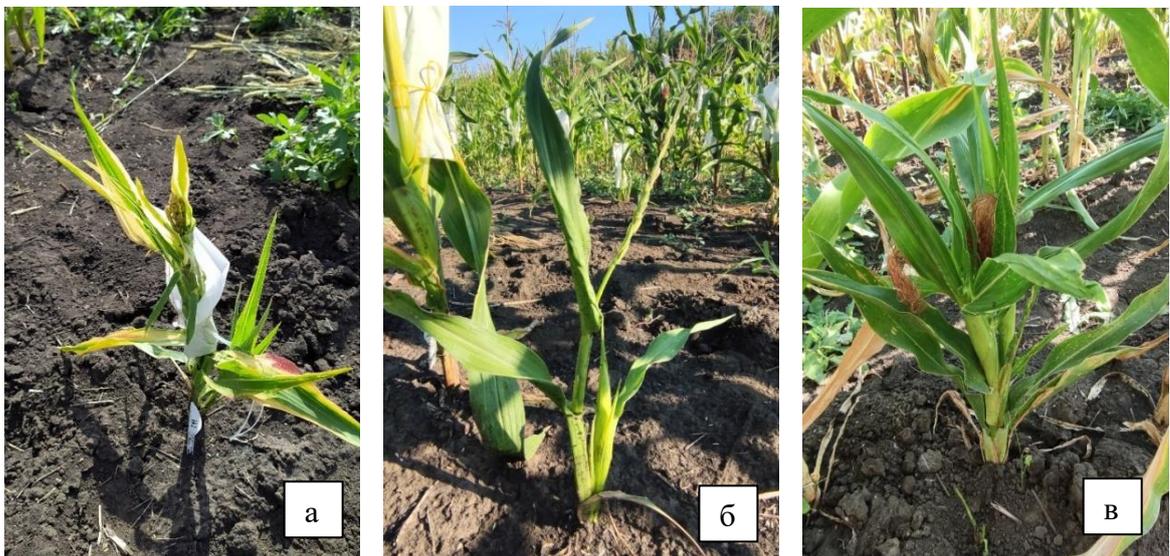
Вероятно, зародыши, из которых развились данные растения, исходно были диплоидными. Либо произошла спонтанная диплоидизация изначально гаплоидного зародыша; либо, не проявились гены окраски у гибридного диплоидного зародыша, и растение, в которое он развился, оказалось зеленым. О гибридном происхождении говорит большой размер этих зеленых растений. Также нельзя исключать, что они могут оказаться тетраплоидами, получившимися после обработки колхицином диплоидов.

Взрослые растения «диплоидизированных гаплоидов» имели в основном типичные размеры и морфологию, свойственные гаплоидным растениям: размеры растений в 1,5-2 раза меньше, чем у диплоидов, стерильная метелка и др. (рисунок 9).



Рисунок 9 – Взрослое растение, сходное по морфологии с гаплоидным растением (Ладожский 191 МВ)

Часть растений в каждом варианте имела уродливую форму (низкие, кустистые, кривые и др.), что, вероятно, является последствием обработки проростков раствором колхицина (рисунок 10 а-в).



а – Кр 208; б – Ик 204; в – Кр 210

Рисунок 10 – Взрослые растения «диплоидизированных гаплоидов» уродливой формы

Часть растений имела нормальный фенотип и размеры, свойственные диплоидам (рисунок 11).



Рисунок 11 – Взрослое растение PR37N01

Среди взрослых растений были такие, которые давали щуплые пыльники, как правило, в небольшом количестве, так и растения с полноценными пыльниками с обильной пылью (рисунок 12 а-в). На нескольких растениях сформировались метелки с женскими цветками и на них позднее завязались зерновки (рисунок 12 г).





а – щуплые пыльники (КС 300-18); б – щуплые пыльники (АК 200-50); в – нормальные пыльники (Кр 212); г – метелка с женскими цветками (АК 200-50)

Рисунок 12 – Метёлки «диплодизированных гаплоидов»

Из 205 взрослых зеленых растений 198 сформировали женские соцветия и выпустили пестичные нити, из которых только 28 растений были самоопылены (таблица 3). Принудительное самоопыление было затруднено по ряду причин:

- асинхронность цветения женских и мужских соцветий (при наличии пыльцы у растения не было пестичных нитей, или наоборот);
- стерильность метелки,
- отсутствия пыльцы в пыльниках (пустые дефектные пыльники)
- высохшая нежизнеспособная пыльца и др.

Таблица 3 – Данные по цветению и опылению гаплоидов, обработанных на стадии проростков колхицином

№	Материнские формы, у которых были получены гаплоиды	Количество взрослых растений, шт.	Количество растений, сформировавших женские соцветия, шт.	Количество самоопыленных растений, шт.	Количество завязавшихся зерновок, шт.
1	Белозерный 300	0	0	0	0
2	Ладожский 250	1	1	0	0
3	Краснодарский 296 МВ	11	10	3	4

Продолжение таблицы 3 - Данные по цветению и опылению гаплоидов, обработанных на стадии проростков колхицином

4	Р 9578	2	2	1	2
5	КС 215	12	9	2	100
6	Кр 212	13	12	0	0
7	Ик 204	3	3	0	0
8	Кр 210	1	1	0	0
9	Ладожский 298 АМВ	11	11	3	31
10	Кр 208	28	26	8	116
11	КС 300-18	16	16	0	0
12	АК 200-50	24	24	1	2+1 окр
13	К 350	13	13	0	0
14	Кр 300-10	25	25	6	337
15	Зерноградский 282 МВ	18	18	0	0
16	PR37N01	12	12	2	12
17	Панора	7	7	1	0
18	Ладожский 191 МВ	8	8	1	0
	Всего	205	198	28	605

Зерновки завязались только на 14 початках (рисунок 13), что, вероятно, также связано с влиянием ряда факторов, затрудняющих оплодотворение, в том числе высокой температурой и отсутствием осадков в период роста и цветения растений.





а – Краснодарский 296 МВ; б – Р 9578; в, г – Ладожский 298 АМВ;
 д – Кр 208; е – АК 200-50; ж – PR37N01; з – Кр 300-10
 Рисунок 13 – Початки самоопыленных растений разных вариантов

Таким образом, всего среди диплоидизированных гаплоидов было самоопылено 28 растений 10 вариантов. Полноценные зерновки завязались на початках 14 растений в 8 вариантах в количестве 605 штук. Данные результаты являются положительными, а метод кохицинирования доказывает свою успешность.

Полученные зерновки можно использовать для воспроизводства 14 новых дигаплоидных линий, на основе которых потенциально можно получить только простых гибридов около 364 комбинаций.

Выводы

1) Проведено опыление растений 18 материнских форм кукурузы (гибридов и сортов) пыльцой гаплоиндуктора ЗМС-П для получения гаплоидов. Среди гибридных зерновок с помощью метода генетического маркирования было отобрано 617 зерновок с гаплоидным зародышем.

2) Проведена посадка семян и обработка 205 гаплоидных растений на стадии 3-5 листьев методом введения раствора колхицина в проводящую систему растения двукратно в полевых условиях.

3) Изучены морфологические особенности гаплоидных растений, подвергшихся обработке колхицином на стадии 3-5 листьев, на стадии взрослого растения. Растения имели разную морфологию: а) сходные с гаплоидами, б) уродливые, в) нормальные, сходные с диплоидными растениями.

4) Метод колхицинирования оказался эффективным для получения гомозиготных линий кукурузы в полевых условиях. Было получено 605 зерновок у 14 растений 8 разных материнских форм. Таким образом, получено 14 новых гомозиготных линий кукурузы, на основе которых в перспективе можно получить 364 простых гибрида.

