

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

Кафедра генетики

**ОЦЕНКА ЛИНИИ КУКУРУЗЫ ЗМС-П НА СКЛОННОСТЬ К
АНДРОГЕНЕЗУ**

Автореферат бакалаврской работы

Студентки 4 курса 422 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Морозовой Виолетты Сергеевны

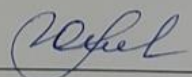
Научный руководитель:

старший преподаватель

17.06.24  О. В. Гуторова

Зав. кафедрой генетики:

д.б.н., доцент

17.06.24  О. И. Юдакова

Саратов 2024

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Андрогенез у покрытосеменных растений – это явление возникновения гаплоидов (особей с одинарным набором хромосом), содержащих геном отцовской формы и материнскую цитоплазму. В его основе лежит замещение ядра яйцеклетки ядром спермия при оплодотворении. При этом собственное ядро яйцеклетки в дальнейшем полностью элиминируется.

В природе андрогенез является очень редким явлением, с частотой от 0,001 до 0,0001 %. В искусственных же условиях, селекционеры добились получения андрогенных гаплоидов с частотами, достаточными для проведения селекционных работ. С другой стороны, андрогенез – молодое понятие для генетиков, изучение которого до сих пор продолжается.

В области практической селекции и биотехнологии андрогенез позволяет быстро получать ядерно-цитоплазматические гибриды или аллоплазматические линии. Создание таких линий значительно повышает эффективность селекционного процесса. Двойственная генотипическая структура андрогенных растений позволяет выявлять и изучать вклад ядра и цитоплазмы в проявление генотипических и фенотипических признаков. Известно, что цитоплазматические факторы влияют на многие важнейшие признаки: иммунитет, длину вегетационного периода, продуктивность, устойчивость к биотическим и абиотическим факторам, скороспелость и др. Цитоплазматические факторы могут даже изменять экспрессию ядерных генов и играть важную роль в нестабильности генома. Поэтому роль цитоплазмы следует учитывать во всех случаях, когда происходят новые сочетания ядра и цитоплазмы, например, у отдаленных гибридов.

Кроме того, зависящие от цитоплазмы гетерозис и продолжительность вегетационного периода могут повысить конкурентоспособность андрогенетических форм и способствовать расширению их ареала и вытеснению других видов. Следовательно, андрогенез в ряде случаев может приводить к усилению формообразовательного процесса.

Поэтому работы по изучению андрогенеза, разработке методов его индукции и повышению частоты андрогенеза до сих пор остаются актуальными и проводятся в большом количестве научных центров мира.

Цель данной работы: выявление склонности линии кукурузы ЗМС-П к образованию андрогенных гаплоидов.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1) провести отбор зерновок с гаплоидным зародышем среди сухих зерновок, полученных от скрещивания линии кукурузы ЗМС-П с линиями ГЛ 1, ГЛ 2, ГЛ 4, ГЛ 5, ГЛ 6, ГЛ 8, ГЛ 9, ЛИЗ и среди зерновок, полученных от свободного опыления линии ЗМС-П;

2) прорастить отобранные зерновки до стадии 3-5 листьев, отобрать среди проростков предположительно гаплоидные растения и зафиксировать их корешки;

3) провести цитогенетический анализ зафиксированных корешков;

4) посчитать частоту андрогенеза у разных вариантов линии ЗМС-П.

Структура и объём работы. Выпускная квалификационная работа состоит из введения, двух глав, заключения, выводов, списка использованных источников и содержит 6 рисунков и 2 таблицы. Общий объем работы составляет 56 страниц. Количество использованных литературных источников составило 53 шт., из них 20 шт. на иностранном языке.

Научная новизна и значимость работы. Получены данные о склонности некоторых вариантов линии кукурузы ЗМС-П к андрогенезу и частота его появления.

Публикации. По теме выпускной квалификационной работы опубликовано 2 работы, которые были представлены на международной научной конференции «Исследования молодых ученых в биологии и экологии» в 2024 г. (г. Саратов) и на V научно-исследовательской конференции, посвященной 85-летию А. И. Заварзина.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Гаплоидия. Методы получения и выявления гаплоидов. В этой главе были рассмотрены разные типы гаплоидии, приведена классификация по методам получения и выявления гаплоидов.

2 Андрогенез. Его виды и происхождение. В главе представлено описание видов андрогенеза, их особенности. Также были рассмотрены вероятные причины появления андрогенных гаплоидов и способы их выявления на основе генетического маркирования.

3 Материал и методы.

Материалом исследования послужило потомство 21 семьи линии-гаплоиндуктора кукурузы ЗМС-П и 29 гибридов между семьями линии ЗМС-П и обычными линиями (ГЛ 1, ГЛ 2, ГЛ 4, ГЛ 5, ГЛ 6, ГЛ 8, ГЛ 9, ЛИЗ), не склонными к наследуемой и ненаследуемой форме партеногенеза и не имеющими доминантные гены окраски. ЗМС-П в скрещиваниях использовалась как материнский организм. Свободное опыление осуществлялось естественным путем при совместном выращивании линии ЗМС-П с другими линиями коллекции. Гибриды получали путем опыления предварительно изолированных женских соцветий линии ЗМС-П пыльцой обычных линий, собранной в пергаментный пакет.

Линия кукурузы ЗМС-П (Зародышевый маркер Саратовский – Пурпурный) обладает способностью индуцировать возникновение гаплоидов материнского типа с частотой до 10 % у разных материнских форм при использовании ее в качестве опылителя. При использовании ее в качестве индуктора андрогенных гаплоидов, частота гаплоидии неизвестна.

Эксперименты по опылению проводили в 2022 и 2023 годах в полевых условиях. Полученное потомство анализировали в 2023 году.

Для анализа линии кукурузы использовали несколько этапов: 1) предварительное получение материала для анализа с использованием линии ЗМС-П; 2) отбор на сухих зерновках; 3) проращивание отобранного материала; 4) отбор проростков на стадии 3-5 листьев; 5) фиксация предполагаемых

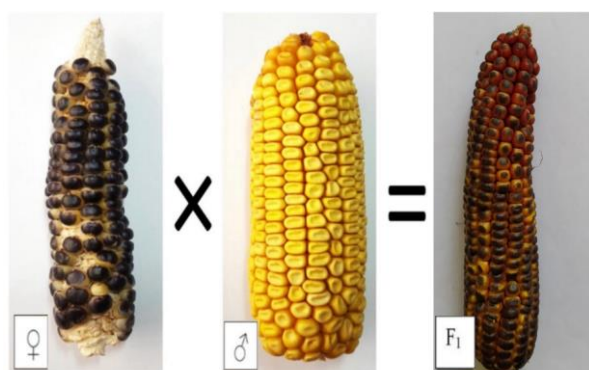
гаплоидов; б) цитогенетический анализ зафиксированных корешков; 7) расчет частоты андрогенеза.

В работе на каждом этапе были свои особенности.

1 этап: предварительное получение материала для анализа с использованием линии ЗМС-П.

На этом этапе было произведено скрещивание между семьями линии ЗМС-П и обычными линиями (ГЛ 1, ГЛ 2, ГЛ 4, ГЛ 5, ГЛ 6, ГЛ 8, ГЛ 9, ЛИЗ), не склонными к наследуемой и ненаследуемой форме партеногенеза и не имеющими доминантные гены окраски (рисунок 1). В качестве материнского растения использовали ЗМС-П, так как данная линия обладает доминантными генами маркерами и андрогенез зависит от особенностей генетического материала материнского растения.

В случае, когда нужно получить андрогенные растения и опознать их, необходимо чтобы растение, использованное в качестве материнского организма, имело в норме окрашенные части растения. В данном случае окраска проявляется в пурпурном цвете верхушки проростка. Отцовское растение данными свойствами не должно обладать и соответственно при замене ядра в яйцеклетке на ядро спермия, должны проявляться именно отцовские признаки.



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

Рисунок 1 – Схема скрещивания

Перед опылением женские соцветия растений изолировали до начала появления первых рылец. В качестве изолятора использовался пергаментный пакет. Перед изоляцией рыльца подрезали. Впоследствии до выхода первых рылец было наблюдение за ними для исключения случайного опыления. После появления рылец было произведено искусственное опыление, которое заключалось в сборе пыльцы с растений опылителей и в распылении их над рыльцами материнского растения. Затем опыленные початки также накрывались изоляторами для исключения появления зерновок с другим генотипом.

При свободном опылении процедуру изоляции не осуществляли, и в таком случае на один початок могла попасть пыльца с разных растений и в том числе могло происходить самоопыление растения.

Все полученные початки свободноопыленных растений были несколько крупнее по сравнению с полученными принудительным опылением гибридами и имели также более крупные зерновки.

2 этап: отбор на сухих зерновках.

Анализ зерновок, полученных при свободном опылении растений линии ЗМС-П, и зерновок, полученных в результате опыления растений этой линии пыльцой других линий, проводили отдельно. Этапы отбора гаплоидов были одинаковыми в обоих экспериментах.

На этом этапе отобрали из имеющихся зерновок, используя метод генетического маркирования, предполагаемые андрогенные гаплоиды. Гаплоиндуктор ЗМС-П имеет доминантные гены-маркеры 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 окрашенным (гибридным), а зародыш неокрашенным (как у

материнской формы). Таким образом, при опылении гаплоиндуктором материнских форм с рецессивными генами-маркерами, возникают матроклинные гаплоиды. При использовании гаплоиндуктора в качестве материнского растения, которое опыляют пыльцой растений с рецессивными генами, возникающие гаплоиды с рецессивными признаками можно считать андрогенными (рисунок 2).



Рисунок 2 – Отбор андрогенных гаплоидов с помощью генетического маркирования: слева – зерновки с диплоидным зародышем, справа – с предполагаемым андрогенным гаплоидным зародышем

Эксперимент со свободноопыленными растениями: в связи с тем, что в окружении растений гаплоиндуктора росли растения линий, имеющих маркерные гены в рецессивном состоянии, гаплоиды материнского типа должны быть окрашенными, отцовского – неокрашенными. То есть, из полученного в результате свободного опыления потомства были отобраны зерновки с маркированным эндоспермом и немаркированным зародышем.

При анализе зерновок, полученных в результате принудительного опыления линии ЗМС-II пыльцой обычных линий с рецессивными маркерными генами, также отбирали зерновки с маркированным эндоспермом и немаркированным зародышем (предполагаемые андрогенные гаплоиды).

Часть зерновок имела слишком плотные покровы, что затрудняло анализ. Позже данные особенности зерновок учитывали и они также проращивались для более точного исследования. При проращивании окраска должна проявляться на первом листочке.

3 этап: отбор проростков на стадии 3-5 листьев.

Все зерновки проростили, в том числе, полностью маркированные. Проращивание происходило на протяжении двух недель, в течение которых отбраковывали проростки, которые имели типичные признаки диплоидных растений. Зерновки таких растений первые проклевывались и соответственно росли быстрее гаплоидных. Также у них был сравнительно толстый длинный главный корень.

Отобранные морфометрическим методом проростки выращивали до стадии 3-5 листьев, так как на этой стадии наиболее четко прослеживаются различия между гаплоидами и диплоидами (рисунок 3).



Рисунок 3 – Отбор проростков на стадии 3-5 листьев: слева – предполагаемый гаплоидный проросток, справа – диплоидный проросток

4 этап: фиксация предполагаемых гаплоидов.

Были зафиксированы корешки предполагаемых гаплоидов (матроклинных и андрогенных). Гаплоиды как правило, имели меньшего размера корешки и побеги, короткий и широкий первый лист (рисунок 4).

Для этого использовали фиксатор Кларка, который состоит из одной части уксусной кислоты и трех частей спирта. Готовился он непосредственно перед фиксацией и использовался только свежим.

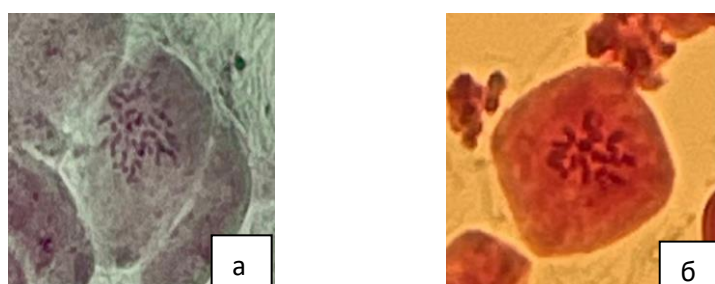
Часть корешка с апикальной меристемой помещали на сутки перед анализом в раствор и хранили в нем до анализа.



Рисунок 4 – Типичные гаплоидные растения (2 и 3 растение) в сравнении в диплоидным (первое слева растение)

5 этап: цитогенетический анализ.

Плоидность растений была подтверждена с использованием цитогенетического метода (рисунок 5). Приготовление давленных препаратов корешков проводилось с использованием ацетокармина. Зафиксированные корешки для этого помещали в тигель с раствором и нагревали до состояния кипения. Нагревание до вскипания происходило 10-15 раз, и затем окрашенные корешки давили под покровным стеклом с использованием 45 % уксусной кислоты. Давленные препараты корешков анализировали за микроскопом Zeiss «Primo Star».



а – диплоидная клетка, б – гаплоидная клетка

Рисунок 5 – Цитогенетический анализ клеток корешков

4 Результаты и их обсуждение

Частота матроклинных и андрогенных гаплоидов рассчитывалась как отношение количества гаплоидных проростков к общему количеству анализируемых проростков, умноженное на 100 % для каждой семьи и общая для каждого эксперимента.

В эксперименте со свободным опылением среди 6626 проростков было выявлено 26 гаплоидов, из которых 24 маркированных (матроклинных) и 2 немаркированных (андрогенных) (таблица 1). Частота гаплоидных проростков материнского типа (маркированных) среди всех проанализированных вариантов составила 0,36 %, а андрогенных (немаркированных) – 0,03 %. Гаплоиды материнского типа в потомстве тринадцати семей вероятнее всего возникли в результате самоопыления, или опыления пылью других семей данной линии. Андрогенные гаплоиды присутствовали в потомстве двух вариантов: 6.9.3 (с частотой 0,25 %) и 6.16.4 (с частотой 0,27 %). На стадии 3-5 листьев андрогенные гаплоиды не имели окрашенных частей растения, были полностью зелеными.

Таблица 1 – Количество гаплоидов среди проростков свободноопыленных растений семей линии ЗМС-П

Вариант (семья)	Количество гаплоидных проростков				Количество диплоидных проростков, шт.	Всего, шт.
	маркированные		немаркированные			
	шт.	%	шт.	%		
6.7.1	0	0,00	0	0,00	332	332
6.7.2	0	0,00	0	0,00	5	5
6.7.3	1	1,45	0	0,00	68	69
6.8.1	1	0,18	0	0,00	558	559
6.8.2	1	0,24	0	0,00	413	414
6.8.3	1	0,41	0	0,00	240	241
6.8.4	0	0,00	0	0,00	278	278
6.9.1	0	0,00	0	0,00	180	180
6.9.2	4	0,66	0	0,00	601	605
6.9.3	1	0,25	1	0,25	406	408

1	2	3	4	5	6	7
6.9.4	0	0,00	0	0,00	171	171
6.10.1	2	0,38	0	0,00	517	519
6.10.2	2	0,65	0	0,00	307	309
6.10.4	1	0,83	0	0,00	120	121
6.15.1	1	0,09	0	0,00	1055	1056
6.15.3	0	0,00	0	0,00	101	101
6.15.4	0	0,00	0	0,00	25	25
6.16.1	0	0,00	0	0,00	89	89
6.16.3	2	0,53	0	0,00	378	380
6.16.4	1	0,27	1	0,27	373	375
7.15.4	6	1,54	0	0,00	383	389
всего	24	0,36	2	0,03	6600	6626

В эксперименте с гибридами между ЗМС-П и обычными линиями среди 2384 зерновок 14 были с маркированным гаплоидным зародышем (матроклинными) и 2 с немаркированным (андрогенным) гаплоидным зародышем (таблица 2). Соответственно, частота матроклинных гаплоидов составила 0,59 %, андрогенных – 0,08 %. Андрогенные гаплоиды были обнаружены в семьях 5.3.3 и 5.3.4 с частотами 0,18 % и 0,17 % соответственно. Матроклинные гаплоиды были обнаружены в шести семьях с частотой от 0,37 до 8 %.

Происхождение матроклинных гаплоидов в данном эксперименте точно не известно. Из проведенных ранее цитозембриологических исследований женского гаметофита линии ЗМС-П следует, что она не склонна к наследуемому партеногенезу, то есть, при опылении чужеродной пылью негаплоиндуцирующих линий, в ее потомстве не должны возникать гаплоиды материнского типа. Не исключаем, что могло произойти случайное опыление собственной пылью растений [53].

Таблица 2 – Частота гаплоидов среди проростков, полученных от скрещивания линии ЗМС-П с обычными линиями

Вариант (семья)	Количество гаплоидных проростков				Количество диплоидных проростков, шт.	Всего, шт.
	маркированные		немаркированные			
	шт.	%	шт.	%		
5.1.1 x ГЛ 1	0	0,00	0	0,00	19	19
5.1.2 x ГЛ 1	0	0,00	0	0,00	8	8
5.2.1 x ГЛ 1	0	0,00	0	0,00	211	211
5.3.1 x ГЛ 2	2	1,56	0	0,00	126	128
5.3.2 x ГЛ 2	0	0,00	0	0,00	149	149
5.3.3 x ГЛ 2	2	0,37	1	0,18	536	539
5.3.4 x ГЛ 2	3	0,49	1	0,17	600	604
5.3.4 x ГЛ 8	1	0,69	0	0,00	143	144
6.2.1 x ГЛ 1	0	0,00	0	0,00	4	4
6.2.2 x ГЛ 1	0	0,00	0	0,00	3	3
6.3.1 x ГЛ 1	0	0,00	0	0,00	1	1
6.4.2 x ЛИЗ	0	0,00	0	0,00	5	5
6.4.4 x ГЛ 4	0	0,00	0	0,00	1	1
6.5.1 x ГЛ 5	0	0,00	0	0,00	23	23
6.5.2 x ГЛ 5	0	0,00	0	0,00	55	55
6.6.1 x ГЛ 4	0	0,00	0	0,00	18	18
6.6.2 x ГЛ 4	4	4,04	0	0,00	95	99
6.7.2 x ГЛ 9	0	0,00	0	0,00	2	2
6.8.2 x ГЛ 4	0	0,00	0	0,00	71	71
6.8.2 x ГЛ 9	0	0,00	0	0,00	15	15
6.9.1 x ГЛ 4	0	0,00	0	0,00	10	10
6.9.2 x ГЛ 4	0	0,00	0	0,00	20	20
6.10.1 x ГЛ 4	0	0,00	0	0,00	154	154
6.10.2 x ГЛ 4	0	0,00	0	0,00	9	9
6.11.1 x ГЛ 9	0	0,00	0	0,00	11	11
6.12.1 x ГЛ 6	0	0,00	0	0,00	1	1
6.12.2 x ГЛ 6	2	8,00	0	0,00	23	25
6.13.1 x ГЛ 6	0	0,00	0	0,00	21	21
6.14.1 x ГЛ 6	0	0,00	0	0,00	12	12
6.14.2 x ГЛ 6	0	0,00	0	0,00	4	4

1	2	3	4	5	6	7
6.15.1 x ГЛ 9	0	0,00	0	0,00	18	18
всего	14	0,59	2	0,08	2368	2384

По результатам исследования можно сделать вывод, что линия ЗМС-П обладает способностью к андрогенезу, частота которого в результате исследования потомства от свободного опыления линии составила 0,03 %; среди гибридных зерновок, полученных от скрещивания линии ЗМС-П с другими линиями – 0,08 %.

ВЫВОДЫ

- 1) для получения гибридных зерновок провели ручное опыление растений 29 семей линии ЗМС-П линиями ГЛ 1, ГЛ 2, ГЛ 4, ГЛ 5, ГЛ 6, ГЛ 8, ГЛ 9, ЛИЗ; для получения свободноопыленного потомства, растения 21 семьи линии ЗМС-П возделывались без предварительной изоляции женских соцветий. Осуществили отбор зерновок с предполагаемым гаплоидным зародышем среди сухих зерновок, полученных в выше описанных экспериментах, используя метод генетического маркирования;
- 2) было проанализировано 2384 зерновки гибридов и 6626 зерновок, полученных при свободном опылении, на стадии сухих зерновок, и пророщено до стадии 3-5 листьев; были зафиксированы корешки предположительно гаплоидных растений;
- 3) был проведен цитогенетический анализ зафиксированных корешков предполагаемых гаплоидных растений на стадии 3-5 листьев и определена их плоидность;
- 4) линия ЗМС-П оказалась склонной к индукции андрогенных гаплоидов и частота андрогенеза составила при свободном опылении 0,03 %, при опылении пыльцой других линий 0,08 %.