

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

Кафедра генетики

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ РАЗВИТИЯ АНДРОГЕННЫХ
ГАПЛОИДОВ У НЕКОТОРЫХ СОРТОВ КУКУРУЗЫ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 422 группы

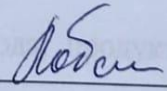
направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

биологического факультета

Гавричевой Екатерины Евгеньевны

Научный руководитель:

доцент каф. генетики, к.б.н.

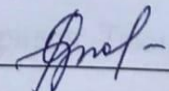
 17.06.22 г. Л.П. Лобанова
подпись, дата

Консультант:

ведущий биолог лаб.

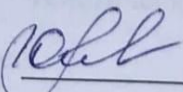
биотехнологии и репродуктивной

биологии СГУ

 17.06.22 г. О.В. Гуторова
подпись, дата

Зав.кафедрой генетики:

д.б.н., доцент

 17.06.22 г. О.И. Юдакова
подпись, дата

Саратов 2022

Введение. Гаплоидия у растений – это явление возникновения особей с половинным числом хромосом. Главным практическим значением гаплоидии является создание гомозиготных линий путем диплоидизации гаплоидов и их использование в селекционной работе. Экспериментальное получение гаплоидов связано также с решением ряда общебиологических задач по генетике, цитологии, эмбриологии, позволяет получать информацию по морфогенезу, митозу и мейозу, генетике систем размножения, отдаленной гибридизации, несовместимости геномов и другое. Гаплоиды могут различаться по своему происхождению, генетическим и цитологическим особенностям.

Особый интерес представляет получение и использование андрогенных гаплоидов, содержащих геном отцовской формы и материнскую цитоплазму. 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. Таким образом, андрогенез *in vivo* может использоваться для решения не только прикладных задач, но и для решения ряда фундаментальных генетических проблем, имеющих эволюционное и селекционное значение.

Поэтому работы по изучению андрогенеза, разработке методов его индукции и повышению частоты андрогенеза до сих пор остаются актуальными и проводятся во многих научных центрах мира.

Цель настоящей работы заключалась в оценке возможности образования андрогенных растений у разных материнских форм кукурузы при их опылении гаплоиндуцирующей линией ЗМС-П.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) отобрать зерновки, полученные в результате гибридизации, с матроклинными гаплоидными зародышами;
- 2) выявить и оценить частоту андрогенеза по морфологическим признакам проростков;
- 3) оценить частоту андрогенеза цитогенетическим методом на давленных препаратах корешков;
- 4) сравнить разные линии кукурузы по частоте формирования в их потомстве андрогенных гаплоидов.

Структура и объем работы. Работа изложена на 47 страницах машинописного текста и включает 6 разделов: введение, обзор литературы, экспериментальную часть, заключение, выводы, список использованных источников, содержащих 51 наименование.

Научная новизна и значимость работы. Впервые проведено исследование по возможности развития андрогенных гаплоидов у 10 сортов кукурузы. Получены гаплоидные растения у семи сортов. Данные гаплоиды могут использоваться для получения аллоплазматических линий, что ускоряет селекцию в несколько раз.

Основное содержание работы. В обзоре литературы приведены: характеристика явления андрогенеза, его распространение и классификация, также подробно описан процесс андрогенеза *in vivo*, возникновение гаплоидов при различных факторах и теоретическое и практическое значение этого явления.

В качестве объекта исследования использовались сорта кукурузы гибридного происхождения. Материнскими формами послужили 10 сортов, у которых корешки, проростки и зерновки были неокрашенными. В качестве

отцовской формы использовалась линия ЗМС-П (Зародышевый маркер Саратовский пурпурный), содержащая доминантные гены, которые обуславливали пурпурную окраску зародыша и верхушки зерновки.

Растения выращивались на экспериментальном поле в сравнительно однородных условиях. Початки изолировали пергаментными пакетами на которых отмечалась дата появления первых пестичных нитей. Учитывая, что сроки задержки опыления могут сильно влиять на частоты возникновения матроклинных гаплоидов, опыление производили через 5–6 суток, в соответствии с первыми отмеченными датами.

При скрещивании отобранных сортов с линией ЗМС-П по проявлению генов можно было судить о путях происхождения потомства – гибридного или матроклинного. О матроклинном происхождении судили по наличию признаков материнского родителя на стадии сухих зерновок. Матроклинные гаплоиды выявлялись по отсутствию пурпурной окраски у зародыша. Зародыши диплоидных гибридов и андрогенных гаплоидов были окрашены.

Выявление андрогенных гаплоидов проходило в два этапа. Вначале на стадии сухих зерновок отделяли зерновки с неокрашенными матроклинными зародышами. Затем все остальные зерновки проращивались.

Проращивание зерновок производилось в темноте при температуре 20–25°C.

Первичный отбор андрогенных гаплоидных проростков с окрашенными корешками среди диплоидных гибридных проводился по морфологическим признакам. Известно, что гаплоидные проростки обычно имеют более короткие и тонкие корешки, у них короче боковые корни и их значительно меньше. Также отмечено, что, если у проростка кукурузы первый лист более чем вдвое короче листа исходной линии, то есть вероятность, что этот проросток – гаплоид.

Однако основным и прямым методом определения пloidности проростков является подсчет числа хромосом в корневых меристемах на давленных ацетокарминовых препаратах.

На готовом препарате под микроскопом отыскивали метафазные пластики

и вели подсчет хромосом. Метафазные пластинки с числом хромосом равным 10 свидетельствовали, что данные корешки зафиксированы с гаплоидного проростка.

Анализ препаратов проводился на микроскопе «Primo Star» при увеличении 10×40 либо 10×63 . Фотографирование проводили при тех же увеличениях на микроскопе «Axiostar-plus» (Zeise) с помощью цифрового фотоаппарата «Canon AC» и программы визуализации «Zoombrowser».

Гаплоиндуцирующая линия ЗМС-П, созданная на кафедре генетики Саратовского госуниверситета, содержит доминантные гены, определяющие пурпурную окраску зародыша и эндосперма. Гибридное потомство, полученное в результате опыления линией ЗМС-П также содержит окрашенный эндосперм и зародыш. И только матроклинные гаплоидные зародыши будут неокрашены.

Гибридные зерновки, полученное от скрещивания различных материнских форм с линией ЗМС-П, во всех вариантах подразделяли на две группы. Первая группа имела маркированные окрашенные эндосперм и зародыш (гибридные), а вторая – зерновки с маркированным эндоспермом и немаркированным зародышем (предполагаемые матроклинные гаплоиды, гибридный только эндосперм).

Гаплоидные матроклинные зародыши обнаружены в потомстве всех исследованных сортов при опылении их гаплоиндуктором ЗМС-П.

Максимальная частота гаплоидных зародышей (12,77 %) зарегистрирована у сорта Ладожский 191 МВ, минимальная (0,56 %) – одного из растений сорта Машук 350 МВ.

Для выявления андрогенных гаплоидов проращивались все зерновки с окрашенными эндоспермом и зародышами, оставшиеся после отбора зерновок с матроклинными зародышами. Всего проросло 5774 зерновок.

Таблица 1 - Частота образования зерновок с гаплоидными матроклинными зародышами в потомстве от скрещивания разных материнских форм с гаплоиндуктором ЗМС-II

Материнская форма	№ початка	Зерновки с окрашенными эндоспермом и зародышем, шт.	Зерновки с неокрашенным (гаплоидным) зародышем	
			шт.	%
Клинок	1	170	3	1,73
	2	119	10	7,75
	3	276	10	3,50
	4	173	18	9,42
	5	201	13	6,07
Машук 350 МВ	6	179	1	0,56
	7	190	16	7,77
	8	142	4	2,74
	9	358	4	1,10
	10	323	11	3,29
	15	406	16	3,79
	28	393	9	2,24
Краснодарский 206 МВ	11	288	2	0,69
	12	141	19	11,87
Краснодарский 196 МВ	18	130	7	5,11
	20	237	30	11,23
	21	102	16	13,56
Ладожский 221 АМВ	13	194	9	4,43
	24	239	19	7,36
	16	165	17	9,34
Ладожский 298 АМВ	22	260	19	6,81
	23	253	31	10,91
Ладожский 191 МВ	26	198	29	12,77
Радуга	14	149	2	1,32
	17	239	8	3,24
Докучаевский 190 СВ	19	164	4	2,38
	25	188	6	3,12
Зе 235	27	169	2	1,17

Всхожесть зерновок была хорошей у большинства растений. Однако отдельные початки разных материнских форм имели пониженную всхожесть (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты анализа проращивания зерновок разных материнских форм

Материнская форма	№ початка	Число зерновок (шт.)		
		проросших	непроросших	всего
Клинок	1	165	3	168
	2	120	1	121
	3	266	6	272
	4	159	14	173
	5	162	37	199
Машук 350 МВ	6	180	1	181
	7	184	5	189
	8	142	0	142
	9	318	28	346
	10	321	3	324
	15	401	5	406
	28	337	61	398
Краснодарский 206 МВ	11	263	5	268
	12	134	7	141
Краснодарский 196 МВ	18	120	10	130
	20	198	27	225
	21	237	69	306
Ладожский 221 АМВ	13	191	3	194
	16	158	9	167
	24	226	14	240
Радуга	14	145	4	149
	17	232	6	238
Докучаевский 190 СВ	19	150	13	163
	25	166	30	196
Ладожский 298 АМВ	22	255	8	263
	23	236	17	253
Ладожский 191 МВ	26	187	10	197
Зе 235	27	119	50	169

Предполагаемые андрогенные гаплоидные проростки отбирались по морфологическим признакам. Они были меньше по размеру с тонкими и короткими корешкам, которых было значительно меньше. Еще одним признаком гаплоидного проростка был укороченный более чем в два раза первый лист по сравнению с диплоидным проростком.

Всего по перечисленным признакам было отобрано 95 проростков с потенциально гаплоидными андрогенными зародышами. Только у растений № 20 (Краснодарский 196 МВ) и № 27 (Зе 235) таких растений не обнаружено.

Отобранные проростки доращивались до стадии 3-4 листьев и у них фиксировались корешки для дальнейшего цитологического анализа.

Плоидность растений подтверждали, используя метод подсчета хромосом на временных давленных препаратах кончиков корешков, фиксированных в ацетоалкоголе (3:1) и окрашенных ацетокармином.

При исследовании митоза в клетках апикальной меристемы кончиков корней 3-4-х суточных проростков было установлено, что процесс клеточного деления проходит в целом нормально. На давленных препаратах, как изображено на рисунке 5, обнаруживались клетки на всех стадиях митотического деления: профазы, метафазы, анафазы и телофазы. Следует отметить, что клетки диплоидных и гаплоидных проростков достаточно четко отличались по размеру.

Точная плоидность проростков определялась по числу хромосом в метафазных пластиках. Диплоидные пластики содержали 20 хромосом, а гаплоидные – 10.

В таблице 3 представлены данные цитологического анализа. Гаплоидные проростки были обнаружены в 13 початках из 28 проанализированных.

Анализ кариотипа показал, что среди отобранных по морфологическим признакам потенциальных гаплоидов, чаще встречаются диплоидные проростки. Это свидетельствует об относительной точности данного метода предварительной оценки плоидности растений. Однако его использование значительно сужает круг поиска гаплоидов и поэтому его применение в

экспериментальной работе оправдано.

Таблица 3 – Результаты анализа кариотипа у проростков кукурузы разных материнских форм

Материнская форма	№ початка	Число проростков (шт.)			
		с зафиксиро- ванными корешками	диплоидных (2n)	гаплоидных (n)	с неопреде- ленной плоидностью
Клинок	1	6	3	1	2
	2	2	1	-	1
	3	4	3	-	1
	4	7	5	1	1
	5	5	3	1	1
Машук 350 МВ	6	2	2	-	-
	7	8	4	4	-
	8	7	5	-	2
	9	4	2	1	1
	10	8	5	3	-
	15	6	4	-	2
	28	2	1	1	-
Краснодарский 206 МВ	11	4	2	-	2
	12	2	1	1	0
Краснодарский 196 МВ	18	2	1	-	1
	20	0	-	-	-
	21	2	1	-	1
Ладожский 221 АМВ	13	2	2	-	-
	16	2	-	1	1
	24	2	1	1	-
Ладожский 298 АМВ	22	2	-	-	2
	23	2	-	1	1
Ладожский 191 МВ	26	1	-	1	
Радуга	14	6	3	-	3
	17	2	-	-	2
Докучаевский 190 СВ	19	3	-	2	1
	25	2	-	-	2
Зе 235	27	0	-	-	-

В корешках некоторых проростков не удалось обнаружить метафазные пластинки, пригодные для подсчета числа хромосом и определить их плоидность (таблица 3). Нельзя исключить присутствие среди них гаплоидов,

Средняя частота образования андрогенных гаплоидных проростков у разных материнских форм кукурузы представлена в таблице 4. У двух сортов (Радуга и Краснодарский 196 МВ) не обнаружено ни одного андрогенного гаплоидного проростка.

Таблица 4 – Частота андрогенных гаплоидных проростков у разных материнских форм кукурузы

Материнская форма	Число проросших зерновок (шт.)	Частота андрогенных гаплоидов	
		число (шт.)	количество (%)
Клинок	872	3	0,34
Машук 350 МВ	1885	9	1,03
Краснодарский 206 МВ	397	1	0,25
Ладожский 221 АМВ	575	2	0,35
Радуга	377	0	0,00
Краснодарский 196 МВ	555	0	0,00
Докучаевский 190 СВ	316	2	0,63
Ладожский 298 АМВ	491	1	0,20
Ладожский 191 МВ	187	1	0,52

У других материнских форм частота андрогенеза варьирует от 0,2 до 1,03 %. Самая высокая встречаемость андрогенных гаплоидов отмечена для сорта Машук 350 МВ, наиболее редкая - для сорта Ладожский 298 АМВ.

Заключение. В представленной работе рассматривается способ получения и выделения андрогенных гаплоидов кукурузы. Показано, что при опылении разных материнских форм гаплоиндуктором ЗМС-П наряду с многочисленными матроклинными гаплоидами могут появляться андрогенные гаплоиды. При этом частота андрогенеза значительно превышает спонтанную частоту андрогенеза и зарегистрированную в других экспериментальных работах. Связано ли это с использованием данного отцовского родителя как донора ядра или особенностями генотипа материнских форм, предстоит

уточнить.

Обнаруженные в проведенном экспериментальном исследовании материнские формы с достаточно высокой частотой андрогенеза свидетельствуют прежде всего о возможности их использования для получения аллоплазматических линий. Полученные результаты также указывают на перспективность поиска новых андрогениндуцирующих форм у кукурузы.

ВЫВОДЫ

1. Зерновки с гаплоидными матроклинными зародышами обнаружены в потомстве всех исследованных сортов. Их частота в разных початках варьировала от 12,77 до 0,56 %.
2. Средняя частота потенциально андрогенных гаплоидных проростков, отобранных по морфологическим маркерным признакам, составила 95:5774 или 1,65 %.
3. Анализ кариотипов подтвердил гаплоидное состояние у пятой части отобранных по морфологическим признакам проростков. Средняя частота андрогенной гаплоидии варьировала у разных материнских форм от 0 до 1,03 %.
4. Максимальное количество андрогенных гаплоидных проростков обнаружено у сортов Машук 350, Докучаевский 190 и Ладожский 191. У трех сортов андрогенных гаплоидов не обнаружено.
5. Обнаруженные андрогенные гаплоиды у исследованных сортов указывают на перспективность продолжения работ по выявлению новых андрогенезирующих форм у кукурузы.

