

ГЕНЕТИКА, ЦИТОЛОГИЯ И РЕПРОДУКТИВНАЯ БИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 581.331.2

КАЧЕСТВО ПЫЛЬЦЫ И ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА У ГАПЛОИНДУЦИРУЮЩИХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ И ИХ ГИБРИДОВ

О. В. Гуторова

*Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского
Роосия, 410012, Саратов, ул. Астраханская, 83
E-mail: olga.gutorova@mail.ru*

Поступила в редакцию: 15.10.2016 г.

Качество пыльцы и особенности строения мужского гаметофита у гаплоиндуцирующих линий кукурузы и их гибридов. – Гуторова О. В. – Одним из методов экспериментальной индукции гаплоидии у кукурузы является опыление растений пыльцой линий-гаплоиндукторов. Создание таких линий – длительный и трудоемкий процесс, интенсификации которого могло бы способствовать знание косвенных диагностических признаков способности к гаплоиндукции. С целью поиска таких признаков был проведён сравнительный цитозембриологический анализ качества пыльцы и особенностей строения мужского гаметофита у гаплоиндуцирующих линий (ЗМС-8, ЗМС-П, КМС), гибридов F_1 (ЗМgl×ЗМС-П, ЗМgl×ЗМС-8, КМ×КМС, КМ×ЗМС-8, ЗМС-П×КМС) и линий, неспособных к гаплоиндукции (КМ, ЗМgl). Достоверных отличий между изученными линиями по качеству пыльцы, ее морфологическим и морфометрическим характеристикам не обнаружено. Единственной специфичной для гаплоиндукторов особенностью является развитие в пыльниках незначительного процента очень мелкой пыльцы.

Ключевые слова: гаплоиндукция, индукция матроклиновых гаплоидов *in vivo*, пыльцевое зерно, *Zea mays*.

Pollen quality and peculiarities of male gametophyte structure in haplo-inducing corn lines and their hybrids. – Gutorova O. V. – One of the methods of haploidy experimental induction in corn is pollination of haploinducing lines plants pollen. Creation of such lines is a long and laborious process, which intensification

КАЧЕСТВО ПЫЛЬЦЫ И ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ

could be promoted by knowledge of indirect diagnostic features of haploid induction ability. For the purpose to find a such features comparative cytoembryological analysis of pollen quality and male gametophyte structural features of haploid-inducing lines (ZMS-8, ZMS-P, KMS), F1 hybrids (ZMgl×ZMS-P, ZMgl×ZMS-8, KM×KMS, KM×ZMS-8, ZMS-P×KMS) and the lines unable to haploid induction (KM, ZMgl) was carried out. Significant differences between the studied lines on pollen quality, their morphological and morphometric characteristics are not revealed. The single feature, specific to haploid inductor, is development of slight percent of very small pollen in anthers.

Key words: haploid induction, *in vivo* induction of matroclinal haploids, pollen grain, *Zea mays*.

Гаплоиды, или особи с одинарным набором хромосом, являются ценным материалом для решения различных прикладных и фундаментальных задач. В селекционном плане использование гаплоидов позволяет быстро оценивать растения по генотипу, поскольку у гаплоидов возможно проявление как доминантных, так и рецессивных признаков; вести окончательный отбор в первом поколении на провокационном фоне; эффективно осуществлять работы по экспериментальному мутагенезу, поскольку у гаплоидов уже в первом поколении проявляются все мутации; в короткий срок создавать гомозиготные линии путем диплоидизации гаплоидных растений и др. В плане фундаментальных исследований гаплоиды используются для решения таких проблем, как генетика количественных признаков и доза генов; генетика и морфология мейоза; изучение генетического груза и элиминации генотипов; гетерозис; получение анеуплоидов и транслокаций; генетическая регуляция полового и апомиктического способов размножения; управление полом и др. (Тырнов, 2005).

Низкая частота спонтанного возникновения гаплоидов у покрытосеменных растений (0.01 – 0.1%) делает актуальной разработку различных методов экспериментальной индукции гаплоидии. Один из таких методов основан на опылении материнских форм пыльцой растений линий-гаплоиндукторов. Часть завязывающихся семян при этом может содержать нормальный эндосперм и гаплоидный матроклиный зародыш.

Метод гаплоиндукции успешно используется на кукурузе, для которой создан целый ряд линий-гаплоиндукторов (Тырнов, 1984, 2002; Nu et al., 2016), позволяющих получать гаплоиды с частотой до 10%. Вместе с тем, создание новых более эффективных и адаптированных к разным условиям выращивания гаплоиндукторов является важной се-

лекционной задачей. Процесс создания линий-гаплоиндукторов трудоёмок и длителен. Гаплоиндуцирующую способность растений тестируют путем анализа их потомства от многократных скрещиваний с различными материнскими формами. Интенсификации отбора могло бы способствовать наличие фенотипических признаков, сцепленных с гаплоиндуцирующей способностью. В связи с этим нами были начаты работы по поиску возможных маркерных признаков, которые косвенно указывали бы на гаплоиндуцирующую способность. Поскольку способность к гаплоиндукции связывают с особенностями строения и функционирования мужского гаметофита (Еналеева и др., 1977; Былич, Чалык, 2000), мы предприняли попытку найти такие маркерные признаки, прежде всего, в мужской генеративной сфере. Для этого был проведён сравнительный анализ качества пыльцы и особенностей строения микрогаметофитов линий кукурузы, не обладающих гаплоиндуцирующей способностью, с линиями-гаплоиндукторами и их гибридами.

Материал и методы

Объектом исследования послужили растения линий-гаплоиндукторов кукурузы саратовской селекции (ЗМС-8, ЗМС-П, КМС), пяти гибридов F_1 (ЗМgl×ЗМС-П, ЗМgl×ЗМС-8, КМ×КМС, КМ×ЗМС-8, ЗМС-П×КМС) и линий, неспособных к гаплоиндукции (КМ, ЗМgl) (контроль). Пыльцу собирали в период открытого цветения растений в полевых условиях и фиксировали ацетоалкоголем (3:1). У каждой линии и гибрида было исследовано по 6000 пыльцевых зерен, окрашенных ацетокармином с предварительным протравливанием в железоаммонийных квасцах (Юдакова и др., 2012). Окрашенные пыльцевые зерна помещали в каплю глицерина и накрывали покровным стеклом. Заключение пыльцевых зерен в глицерин давало возможность при необходимости поворачивать их и анализировать в разных проекциях. Анализ препаратов проводили с использованием микроскопа LABOVAL 4 при увеличении 10×60 и 10×100. Размеры пыльцевых зерен измеряли с помощью окуляр-микрометра.

Результаты и их обсуждение

Строение зрелых пыльцевых зерен изученных линий и гибридов было типичным для кукурузы. Выполненные пыльцевые зерна содержали вегетативную клетку и два спермия (рис. 1, *a*).

КАЧЕСТВО ПЫЛЬЦЫ И ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ

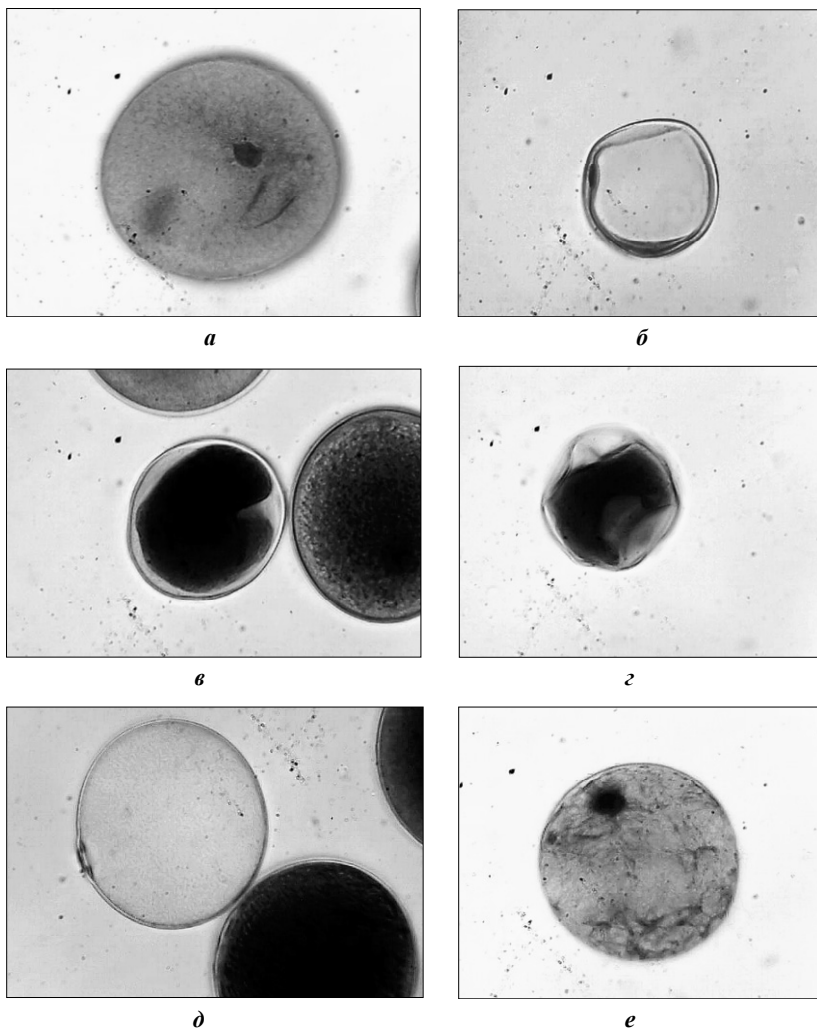


Рис. 1. Пыльцевые зерна кукурузы: *a* – выполненное нормального строения; *б* – пустое; *в, г* – с разной степенью плазмолиза; *д* – с неокрашенной цитоплазмой; *е* – с неоднородной цитоплазмой

Ядро вегетативной клетки имело округлую или слегка лопастную форму. В зависимости от того, в какой проекции находились при анализе пыльцевые зерна, спермии были большими, вытянутыми, веретеновидными или более компактными, широкими, треугольными.

Наряду с выполненными нормальными пыльцевыми зёрнами у всех изученных растений в пыльниках присутствовали дефектные пыльцевые зёрна: пустые, сморщенные, с плазмолизом (рис. 1, б – з). По степени дефектности пыльцы достоверных отличий гаплоиндукторов от других линий не обнаружено. В целом, все изученные линии и гибриды характеризовались высоким качеством пыльцы (табл. 1), характерным для амфимиктичных (половых) форм (Куприянов, 1989).

Таблица 1

Качество пыльцы изученных линий и гибридов кукурузы

Вариант	Количество пыльцевых зерен, %					Степень дефектности пыльцы, %	Количество исследованных ПЗ, шт.
	с неолнородной цитоплазмой	со светлой цитоплазмой	пустые	сморщенные	с плазмолизом		
Контроль							
КМ	0.77	0.12	0.10	0.02	0.79	1.80	6000
ЗМgl	3.50	0.11	0.00	2.62	0.95	7.18	6000
Эффективные гаплоиндукторы							
ЗМС-8	1.10	0.17	0.33	0.52	0.43	2.55	6000
ЗМС-П	1.24	0.03	0.19	0.35	1.04	2.85	6000
КМС	1.35	0.04	0.16	0.16	0.00	1.71	6000
Гибриды							
ЗМgl×ЗМС-П	0.72	0.20	0.20	0.21	0.00	1.33	6000
ЗМgl×ЗМС-8	1.12	0.27	0.10	0.33	0.00	1.82	6000
КМ×КМС	0.73	0.17	0.10	0.03	0.11	1.14	6000
КМ×ЗМС-8	0.30	0.07	0.07	0.07	0.70	0.51	6000
ЗМС-П×КМС	1.02	0.47	0.02	0.15	0.60	2.26	6000

У всех изученных растений среди зрелой пыльцы встречались однопорные, двупорные пыльцевые зерна, а также пыльцевые зерна с

КАЧЕСТВО ПЫЛЬЦЫ И ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ

вытянутым или фрагментированным вегетативным ядром. Присутствие одноядерной и двуядерной пыльцы, вероятнее всего, является следствием асинхронности развития пыльников в метелке. Фрагментированные вегетативные ядра могли быть результатом дегенеративных процессов, происходящих в пыльцевых зёрнах. Все вышеописанные отклонения носили случайный единичный характер.

Поскольку некоторые исследователи считают, что причиной гаплоиндукции могут быть односпермиевость и разноспермиевость пыльцы (Тырнов, 2002; Былич, Чалык, 2000), особое внимание в нашем исследовании было уделено анализу количества спермиев в пыльцевых зёрнах гаплоиндукторов и их гибридов. Пыльцы с одним спермием обнаружено не было, но в единичных случаях пыльцевые зёрна содержали три или даже четыре спермия. Однако эти редкие аномалии были присущи как линиям-гаплоиндукторам, так и обычным линиям. Также у всех изученных линий и гибридов зарегистрированы единичные пыльцевые зёрна, в которых спермии незначительно отличались друг от друга размером и интенсивностью окраски. Размеры пыльцевых зёрен варьировали от 120.1 ± 7.3 мкм у линии Змgl до 141.7 ± 8.8 мкм у гибрида ЗМС-П×КМС (табл. 2).

Таблица 2

Размеры пыльцевых зёрен изученных линий и гибридов кукурузы

Вариант	Средний размер пыльцевых зёрен, мкм	Коэффициент вариации, %
Контроль:		
КМ	136.3 ± 7.6	5.57
ЗМgl	120.1 ± 7.3	6.10
Эффективные гаплоиндукторы:		
ЗМС-8	129.4 ± 16.9	13.05
ЗМС-П	135.9 ± 9.7	7.17
КМС	137.2 ± 14.7	10.70
Гибриды:		
ЗМgl × ЗМС-П	124.1 ± 6.8	5.49
ЗМgl × ЗМС-8	132.9 ± 6.6	4.99
КМ × КМС	139.7 ± 14.6	10.46
КМ × ЗМС-8	133.2 ± 11.0	8.27
ЗМС-П × КМС	141.7 ± 8.8	6.22

В пределах каждой изученной формы также наблюдалось варьирование диаметра пыльцы, но, в целом, количество отклоняющейся от нормы пыльцы у всех было небольшим (см. табл. 2, 3). Были выделены следующие размерные классы пыльцевых зерен: очень мелкие (50 – 80 мкм), мелкие (81 – 120 мкм), средние (121 – 140 мкм), крупные (141 – 170 мкм). По показателю «средний размер пыльцевых зерен» линии-гаплоиндукторы и их гибриды достоверно не отличались от контрольных линий (рис. 2). Вместе с тем, очень мелкие пыльцевые зерна, размер которых почти вчетверо был меньше размера средних (рис. 3), встречались, в основном, в линиях с гаплоиндуцирующей способностью (ЗМС-8, ЗМС-П) и гибридах (ЗМgl×ЗМС-П, ЗМgl×ЗМС-8, КМ×КМС) с частотой от 0.58 до 1.67% (табл. 3).

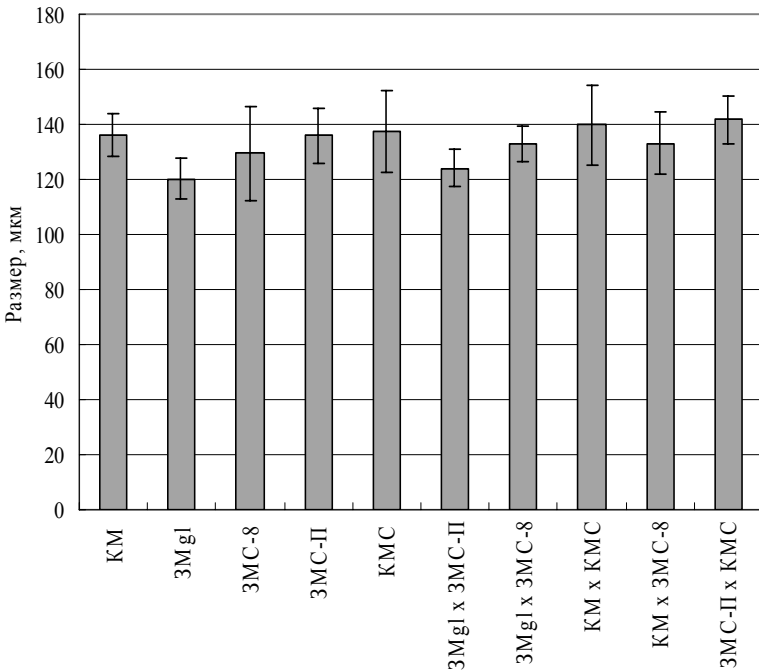


Рис. 2. Размер пыльцевых зёрен изученных линий и гибридов кукурузы

КАЧЕСТВО ПЫЛЬЦЫ И ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ

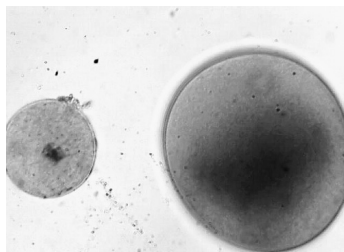


Рис. 3. Очень мелкое пыльцевое зерно и пыльцевое зерно среднего размера у линии-гаплоиндуктора ЗМС-П

Таблица 3

Варьирование размера пыльцевых зерен у изученных линий и гибридов кукурузы

Вариант	Количество ПЗ разного размера, %				Количество исследованных ПЗ
	очень мелкие, 50-80 мкм	мелкие, 81-120 мкм	средние, 121-140 мкм	крупные, 140-170 мкм	
Контроль					
КМ	0.00	3.86	92.72	3.40	6000
ЗМgl	0.00	5.55	91.45	3.00	6000
Эффективные гаплоиндукторы					
ЗМС-8	0.97	1.18	89.36	8.49	6000
ЗМС-П	1.67	3.34	93.28	1.71	6000
КМС	0.00	4.92	86.88	8.20	6000
Гибриды					
ЗМgl × ЗМС-П	0.58	0.15	98.69	0.58	6000
ЗМgl × ЗМС-8	0.88	2.98	93.86	2.28	6000
КМ × КМС	1.27	7.11	84.33	7.29	6000
КМ × ЗМС-8	0.00	0.15	95.36	4.49	6000
ЗМС-П × КМС	0.00	0.07	90.18	9.75	6000

Выводы

Проведенный цитоэмбриологический анализ показал, что по своим морфологическим и морфометрическим характеристикам пыльца линий-гаплоиндукторов кукурузы не отличается от пыльцы линий, не склонных к гаплоиндукции. Единственным специфичным для гаплоиндукторов признаком является развитие у них очень мелких пыльце-

вых зерен, диаметр которых в несколько раз меньше нормы. Однако использовать этот признак в качестве маркерного при отборе растений на гаплоиндуцирующую способность весьма проблематично из-за его крайне низкой частоты, следовательно, работы по поиску косвенных диагностических признаков должны быть продолжены.

Список литературы

Былич В. Г., Чалык С. Т. Наличие разнокачественных спермиев в пыльце у индукторов матроклинных гаплоидов у кукурузы // II съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров 1–5 февраля 2000 г., г. Санкт-Петербург: Тез. докл. 2000. Т. 2. С. 26.

Еналеева Н. Х., Тырнов В. С., Селиванова Л. П. и др. Одинарное оплодотворение и проблема гаплоиндукции у кукурузы // Докл. АН СССР. 1977. Т. 353, № 3. С. 405 – 407.

Курприянов П. Г. Диагностика систем семенного размножения в популяциях цветковых растений. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1989. 160 с.

Тырнов В. С., Завалишина А. Н. Индукция высокой частоты возникновения матроклинных гаплоидов кукурузы // Докл. АН СССР. 1984. Т. 276, №3. С. 735 – 738.

Тырнов В. С. Гаплоидия и апомиксис // Репродуктивная биология, генетика и селекция. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2002. С. 32 – 46.

Тырнов В. С. Гаплоидия у растений: терминология и классификация: учеб. пособие для студентов биол. фак. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2005. 44 с.

Юдакова О. И., Гуторова О. В., Беяченко Ю. А. Методы исследования репродуктивных структур и органов растений: учеб.-метод. пособие для студентов биол. фак. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2012. 44 с.

Hu H., Schrag T. A., Peis R. et al. The Genetic Basis of Haploid Induction in Maize Identified with a Novel Genome-Wide Association Method // GENETICS. 2016. Vol. 202, № 4. P. 1267 – 1276. DOI: 10.1534/genetics.115.184234