

Хохлов С.С., Зайцева М.И., Куприянов П.Г. Выявление апомиктических форм во Флоре цветковых растений СССР. Саратов, 1978. 224 с.

Haig D., Westoby M. Genetic imprinting in endosperm – its effect on seed development in crosses between species, and between different ploidies of same species, and its implication for the evolution of apomixis // Phil. Trans. Roy. Soc. London (B) Biol. Sci. 1991. N 333. P.1-13.

УДК 581.163

ПОЛУЧЕНИЕ ФОРМ КУКУРУЗЫ С ЗАМЕЩЕННОЙ ЦИТОПЛАЗМОЙ МЕТОДОМ АНДРОГЕНЕЗА *IN VIVO*

А.Н. Завалишина, В.С. Тырнов

Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского

Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) широко используется в селекции при получении гетерозисных гибридов растений. Кроме того, цитоплазма может оказывать влияние на устойчивость к факторам внешней среды и заболеваниям, длительность вегетационного периода, качество белка, урожайность и ряд других признаков (Орлов, 2001). Все это свидетельствует о важной роли цитоплазмы в изменении признаков и необходимости исследования закономерностей их проявления.

Изменчивость признаков под влиянием цитоплазмы исследуют, как правило, в потомстве, полученном путем реципрокных и насыщающих скрещиваний. Однако эти методы не позволяют достаточно полно и точно дифференцировать вклад генома и плазмона, так как этим методам может сопутствовать ряд явлений, искажающих результаты – кроссинговер, предпочтительное отхождение отдельных хромосом материнской формы в женские гаметы, влияние спорфита и др. Более привлекательно использование для создания аллоплазматических линий явления андрогенеза *in vivo*. Его суть заключается в следующем. При оплодотворении, в силу ряда причин, спермий замещает ядро яйцеклетки. В результате развивается андрогенный зародыш, имеющей материнскую цитоплазму и ядро отцовского родителя. Среди андрогенных растений встречаются гаплоиды и диплоиды. Частота встречаемости андрогенных особей в норме в природе крайне низкая. Для кукурузы установлена средняя частота встречаемости андрогенеза от 1:80000 до 1:800000 (Chase, 1969; Тырнов, 1986). Вместе с тем у этой культуры была обнаружена линия, имеющая ген *ig* (indeterminate gametophyte), у которой андрогенез встречался с частотой свыше 2% (Kermicle, 1969, 1971, 1994). Такая частота позволяла использовать эту линию в практической селекции для ускоренного создания аналогов линий с ЦМС.

Линия с геном *ig* (W23 *ig*) была получена нами из Краснодарского НИИСХ. Однако она оказалась крайне позднеспелой. Начало цветения наступало только в конце августа в нашей зоне Юго-Востока. Поэтому было необходимо создать более скороспелые, вызревающие андрогенезиндуцирующие формы кукурузы, которые можно было бы использовать как для практической селекции, так и для фундаментальных исследований. Это, естественно, требо-

вало выяснения, какими будут эффекты гена *ig* при перемещении его в иную генотипическую среду. Далее необходимо было создать андрогенезиндуцирующие аналоги с цитоплазмами разных типов и, наконец, получить андрогенные гаплоиды или диплоиды и на их основе - линии, имеющие одинаковые геномы на разных цитоплазмах. Дополнительной задачей было введение в андрогенезиндуцирующие линии доминантных генов пурпуровой окраски зародыша, что позволяет выявлять андрогенные особи в сухих зерновках.

Материал и методы

Линия Wisconsin 23 *ig* (W23*ig*) была использована в качестве источника гена *ig*. Этот ген способствует не только возникновению андрогенных зародышей, но и дает плейотропный эффект, который является следствием ряда отклонений в строении женского гаметофита (Lin, 1978, 1981; Тырнов и др., 1980; Enaleeva et al., 1995; Еналеева и др., 1998) и проявляется в возникновении полиэмбрионии и зерновок с дефектным эндоспермом (Kermicle, 1969, 1971; Тырнов, 1986). Опираясь на эти легко диагностируемые признаки, было несложно вести отбор особей, несущих ген *ig*. Окраска зародыша и зерновки обусловлена генами *A C R nj:cu du*. Эти гены имеет исходная линия W 23 *ig*.

Нами ранее была получена линия Зародышевый маркер (ЗМ), которая зацветала в конце июля - начале августа и полностью вызревала в местных условиях. Она была отобрана в самоопыленных потомствах гибрида РЕМ x АД-3. РЕМ (Purple embryo marker) - широко используемый генетический маркер (Chase, 1969); линия АД-3 - среднеспелая линия из коллекции отдела генетики Ботанического сада Саратовского университета. Эта линия несет рецессивный ген *gl1* - glossy (глянцевые листья у проростков). Благодаря этому гену можно контролировать случайное переопыление пылью других линий, а также легко выявлять матроклинные особи моно- и полиэмбрионного происхождения.

Линии W 23 *ig* и ЗМ *gl1* были скрещены и самоопылены. Для создания более скороспелых форм с геном *ig* и маркирующей системой *A C R nj:cu du* были использованы среднеспелые линии АД-2, Гл-1 и С188002 как источники нормальной цитоплазмы. Как источники ЦМС техасского (Т) и молдавского (М) типов использовали линии WF9Т, WF9М, W155Т, Слава М и Г23Т.

В качестве мужских родителей (доноров ядра) при получении андрогенных растений использовали линии - Коричневый маркер (КМ), Коричневый маркер Саратовский (КМС), Рисовая 645, Stock 6, ВГ-10, ВГ-12, Тестер Мангельсдорфа (ТМ) и новые линии из Отдела селекции кукурузы НИИСХ Юго-Востока, обозначенные номерами 2309, 2366, 2374. Создание андроиндуцирующих форм проходило в несколько этапов: скрещивание, самоопыление или бэккроссы и отбор по желательным признакам.

Для получения андрогенных растений проводилось следующее. Андроиндукторы с геном *ig* изолировались пергаментными пакетами. Приблизительно на 3-4 день после появления пестичных нитей производили опыление. Полученные зерновки разделяли на 2 партии - с окраской зародыша и ее отсутствием. Затем все зерновки проращивали в кюветах на фильтровальной бумаге. Ок-

рашенные зерновки проращивали для выявления случаев полиэмбрионии и андрогенных и матроклинных растений среди близнецов.

Число хромосом подсчитывалось в ацетокарминовых препаратах давленных корешков проростков на стадии 2-х – 3-х листьев.

Результаты и обсуждение

Скрещивание $W 23 ig A C Rnj:cu du \times 3M gl I A C R nj:cu du$ предотвратило возможность расщепления по генам окраски и позволило значительно упростить работы по отбору. Уже в следующем поколении были получены гомозиготы по генам ig и $gl 1$, и дальше отбор велся только по разным другим признакам – высота, устойчивость к болезням, длина вегетационного периода и др.

Таким путем была получена линия $3M ig, gl 1$, позволяющая легко выявлять андрогенные и матроклинные растения и по скороспелости сходная с линией $3M$. На базе этой линии на следующем этапе работы были созданы аналоги андроиндукторов на разных цитоплазмах, включая вызывающие ЦМС типа $T, -S, -C$. Для этого использовали линии, указанные в разделе "Материал и методы". Каждую из них опыляли пылью линии $3M ig gl 1$. Затем производили насыщающие скрещивания и отбор до тех пор, пока на указанных цитоплазмах не были получены линии-аналоги $3M ig gl 1$.

Получение андрогенных растений на разных цитоплазмах при использовании форм с геном ig .

Линии-аналоги с геном ig были использованы в качестве материнских форм для получения андрогенных растений. Результаты представлены в таблицах 1 и 2 и 3. При использовании 7 различных мужских родителей и материнской линии $3M ig gl 1$ на цитоплазме $W23$ (нормального типа) андрогенные гаплоиды получены во всех вариантах (Табл.1). Всего выявлено 65 андрогенных гаплоидов и один диплоид среди 139931 проростков. Средняя частота андрогенеза составила 1: 2120. Самая высокая встречаемость андрогенных гаплоидов отмечена для линии ВГ-12 (1: 693), наиболее редкая - для линии Тестер Мангельсдорфа (ТМ) (1:11868).

В таблице 2 даны результаты, полученные при использовании одного мужского родителя (линии КМ) для опыления разных материнских форм, представленных линиями аналогами $3M ig gl 1$ на разных цитоплазмах, включая стерильные T и M типов. Андрогенные гаплоиды получены на всех стерильных и нормальных цитоплазмах. Всего из 80339 проростков выявлены 31 гаплоид и 6 андрогенных диплоидов, 4 из них - на цитоплазме с ЦМС молдавского типа, 2 - на нормальных цитоплазмах.

Частота андрогенеза в этом опыте варьировала от 1: 718 до 1: 6170 и в среднем составляла 1: 2171.

Таблица 1. Частота андрогенеза при использовании линии 3M ig, gl1 с нормальной цитоплазмой линии W23

| Мужской родитель | Число | | Число зерновок на гаплоидах |
|------------------|------------|----------------|--------------------------------|
| | проростков | андрогаплоидов | |
| КМ | 67723 | 25 | 4, 6, 7, 12, 19, 25 |
| КМС | 7994 | 2 | 2,3 |
| Рисовая 645 | 6530 | 2 | |
| Stock 6 | 32448 | 16+1* | 1, 7, 8, 11, 13, 18, 20, 21,24 |
| ВГ-10 | 1590 | 2 | |
| ВГ-12 | 11778 | 17 | 2, 2, 3, 3, 5, 6 |
| ТМ | 11868 | 1 | 19 |
| Всего | 139931 | 65+1* | |

Примечание: * андрогенный диплоид

В таблице 3 представлены данные по использованию явления андрогенеза *in vivo* для практических целей – создания стерильных аналогов линий. Андрогенезиндуцирующие формы с ЦМС были использованы в качестве материнских форм и опылены линиями, предоставленными Отделом селекции кукурузы НИИСХ Юго-Востока.

В результате были получены андрогенные гаплоиды на цитоплазмах с ЦМС техасского и молдавского типов и один андрогенный диплоид на цитоплазме техасского типа. Всего в этом опыте среди 30950 проростков выявлены 9 гаплоидов и 1 диплоид андрогенного происхождения. Средняя частота андрогенеза – 1: 3095, ее варьирование – от 1:1688 до 1: 7355.

Всего во всех опытах выявлено среди 251220 проростков 105 гаплоидов и 8 диплоидов андрогенного происхождения. Таким образом, средняя частота андрогенеза составила 1: 2223. Это намного ниже, чем наблюдалось (Kermicle, 1969, 1971, 1994) у исходной линии в США. Связано ли это с внешними факторами, использованием других отцовских родителей, влиянием на ген *ig* каких-то генов, полученных при создании новых андроиндукторов, предстоит уточнить. Однако необходимо отметить, что у исходной линии в условиях г. Саратова (Тырнов, Хохлов, 1974; Тырнов и др., 1980; Тырнов, 1986) и г. Краснодара (Чумак, 1977) высокие частоты андрогенеза не отмечались. Они лежали в пределах 0,1-0,2 %. Андроиндуцирующая способность новых аналогов с геном *ig*, полученных М.В. Чумаком, проявлялась в пределах частот, наблюдаемых нами – до 1: 2000 (Чумак, 1977; Конформе, 1985).

В США были получены новые линии с геном *ig*, индуцирующие андрогенез

Таблица 2. Андрогенез у аналогов линии 3М ig, gl 1 с разными цитоплазмами при использовании пыльцы линии КМ

| Источник цитоплазмы | Число | | | Число зерновок на гаплоидах |
|---------------------|------------|----------------|----------------|-----------------------------|
| | Проростков | андрогаплоидов | андродиплоидов | |
| АД-2 (N) | 6170 | 0 | 1 | |
| ГЛ-1 (N) | 3692 | 1 | 1 | |
| CJ 880 O2 (N) | 5490 | 1 | 0 | |
| Г23 (T) | 9540 | 5 | 0 | 1,10 |
| WF9 (T) | 12696 | 10 | 0 | 1,1,2,2,2,3,6,8,10 |
| WF9 (M) | 4306 | 6 | 0 | 1,3,3,4,8,12 |
| Слава (M) | 38445 | 8 | 4 | 1,3,4,6,7,9 |
| Всего | 80339 | 31 | 6 | |

Таблица 3. Андрогенез у аналогов линии 3М ig gl 1 с ЦМС

| Источник цитоплазмы | Мужской родитель | Число | | Число зерновок на гаплоидах |
|---------------------|------------------|------------|----------------|-----------------------------|
| | | проростков | андрогаплоидов | |
| WF9 (T) | Л 2309 | 8442 | 4+1* | 14,30,34,40 |
| WF9 (T) | Л 2374 | 5341 | 2 | 25,35 |
| WF (T) | Л 2366 | 4611 | 1 | 70 |
| Слава (M) | Л 2309 | 7355 | 1 | 30 |
| Слава (M) | Л 2374 | 5201 | 1 | 14 |
| Всего | | 30950 | 9+1* | |

Примечание: * андрогенный диплоид

нез с частотами 2,6 – 8 % (Kindiger and Hamman, 1992). В Краснодаре средняя частота андрогенеза у этих линий была – 0,19 %, в лучшем варианте – 0,51 %. Созданные новые аналоги, соответствующие условиям Краснодара индуцировали андрогенез с еще более низкими частотами (0,01 – 0,11 %) (Шацкая, Щербак, 1999). Тем не менее, частоты андрогенеза даже в пределах 1: 2000 – 1: 5000 значительно превышают таковые для обычных линий – 1: 80000 – 1: 800000 (Chase, 1969; Тырнов, 1986).

Поскольку для создания аллоплазматических линий может быть достаточно одного-двух андрогенных гаплоидов, то требуется анализировать менее 10000 зерновок, что не является слишком сложной процедурой. Следует отметить, что по окраске зародыша можно отбраковать более 90 % гибридов. Поэтому проращивать приходится значительно меньшее количество зерновок. Проращивание всего материала, видимо, целесообразно при решении научных

задач, например, для выявления всех случаев андрогенеза. Так, нами при прощивании зерновок было выявлено более 3000 полиэмбрионов и среди них найдены двойни, в которых андрогенные гаплоидные близнецы сочетались в одном случае с матроклинным гаплоидом, в другом – с гибридным диплоидом.

Получение потомства на андрогенных гаплоидах и диплоидах.

Андрогенные гаплоиды и диплоиды были выращены в грунте на экспериментальном участке. Фенотипически они полностью соответствовали их мужскому родителю, за исключением того, что гаплоиды были их уменьшенной копией. Получить потомство андрогенных диплоидов было несложно. Они были самоопылены или, при наличии ЦМС, опылены соответствующим мужским родителем. Как правило, початки были полностью озерненными.

Большинство андрогенных гаплоидов было опылено соответствующим опылителем, то есть пылью той линии, которая являлась его мужским родителем. Несколько гаплоидов не были опылены вследствие отсутствия пыльцы необходимой линии во время их цветения. При опылении андрогенных гаплоидов нормальной пылью диплоидных растений на них завязалось небольшое число зерновок с нормальными диплоидными зародышами. В таблицах 1, 2 и 3 в колонке справа представлены цифры, которые соответствуют количеству зерновок, завязавшихся на андрогенных гаплоидах. Оно варьировало от 1 до 70 зерновок на один початок. Из 56 полученных початков лишь на 6 завязалось по одной зерновке, на остальных их было значительно больше и вполне достаточно для практической работы. В сгруппированном виде завязываемость выглядит следующим образом: 1-5 зерновок дали 41 % початков, 6-10 зерновок – 23 %, 11-20 зерновок – 18 %, 21- 40 зерновок - 16 %. На одном початке завязалось 70 зерновок.

Возможно, завязываемость на гаплоидах зависит от генотипа. В тех случаях, когда в качестве мужского родителя (донора ядра андрогенных гаплоидов) использовалась одна и та же линия КМ, то завязываемость на гаплоидах находилась в пределах от 1 до 12 зерновок (Табл. 2). При других генотипах она выше, в частности, у линии Stock 6 - от 1 до 24 зерновок на гаплоид, причем в большинстве случаев - от 7 до 20 (Табл.1). Наибольшая завязываемость отмечена для андрогенных гаплоидов, полученных от линий НИИСХ Юго-Востока (от 14 до 70). Механизмы формирования нормальных зародышевых мешков у гаплоидов достаточно хорошо изучены (Звержанская, Шишкинская, 1976). У гаплоидов кукурузы нормальные макрогаметофиты возникают с частотами 3 – 10 %, на отдельных растениях – до 28 %. Они развиваются вследствие нередукции, отхождения хромосом к одному полюсу, нарушения цитокинеза, деления унивалентов, спонтанной диплоидизации макроспор и, возможно, еще каких-то других причин. Видимо, от действия отдельных факторов или их совокупности, возможность формирования полноценных макрогаметофитов может меняться в значительной степени.

Как правило, андрогенные гаплоиды представляют уменьшенную копию отцовской формы. Однако отмечен случай, когда при опылении типичного ан-

дрогенного гаплоида пыльцой его мужского родителя возникло потомство, которое несколько отличалось от мужской родительской линии. Андрогенный гаплоид КМ на цитоплазме с ЦМС молдавского типа был опылен пыльцой исходной линии КМ. На гаплоиде завязалось 5 зерновок, из которых выросло 5 растений, имеющих все признаки КМ, кроме цвета растений. Они имели светло-коричневую окраску в отличие от интенсивно коричневой окраски, как самого андрогенного гаплоида, так и растений исходной линии КМ. При последующем опылении этих растений пыльцой с коричневых растений линии КМ в потомстве возникали еще более светлые растения, хотя они сохраняли все другие признаки линии КМ.

Ранее при проведении беккроссов с целью перевода линии КМ на цитоплазмы Т и М типов стерильности мы неоднократно наблюдали подобное явление. Однако предположительно объяснять его можно было изменением ядерных генов вследствие гибридизации, кроссинговера и других причин. Появление аналогичных признаков у андрогенных гаплоидов указывало на то, что цитоплазма может влиять на экспрессию ядерных генов. Таким образом, использование андрогенеза открывает перспективы не только для создания стерильных аналогов, но и для исследований в новом направлении ядерно-цитоплазматических эффектов, их роль в эволюции, селекции и возможности прикладного использования.

Работа выполнена при поддержке грантом НП «Университеты России» (№ УР.07.01.0601).

Литература

- Еналеева Н.Х., Отъкало О.В., Тырнов В.С. Фенотипическое проявление мутации *ig* в мегагаметофите кукурузы линии Зародышевый маркер // Генетика. 1998. Т.34, № 2. С. 259 – 265.
- Звержанская Л.С., Шишкинская Н.И. Мейоз и формирование мужского и женского гаметофитов у гаплоидов // Гаплоидия и селекция. М.: Наука. 1976. 221 с.
- Конформе Ч.Ц.И. Изучение гаплоидного апомиксиса и комбинационной способности автодиплоидных линий кукурузы // Автореферат дисс. ... канд. с.-х. наук. Краснодар, 1985. 23 с.
- Орлов П.А. Взаимодействие ядерных и цитоплазматических генов в детерминации развития растений. Минск, 2001. 170 с.
- Тырнов В.С. Андрогенез *in vivo* у растений // Биология развития и управление наследственностью. М., 1986. С. 138 – 164.
- Тырнов В.С., Хохлов С.С. Андрогенез у покрытосеменных растений // Генетика. 1974. Т.10, № 9. С.154 – 167.
- Тырнов В.С., Завалишина А.Н., Образцова О.А. Фенотипическое проявление гена *ig* у кукурузы // Генетика развития растений. Ташкент, 1980. С.14 – 15.
- Чумак М.В. Получение и выделение матроклиных и андрогенных гаплоидов кукурузы // Автореферат дисс. ... канд. биол. наук. Л., 1977. 18 с.

Шацкая О.А., Щербак В.С. Использование модифицированной *ig*-системы для создания новых форм кукурузы с повышенным андрогенезом // Генетика, селекция технология возделывания кукурузы. Красноар, 1999. С. 211 – 218.

Chase S.S. Monoploids and monoploids-derivatives of maize // Bot. Rev., Vol.35, № 2. P.117 – 167.

Enaleeva N., Otkalo O., Tyrnov V. Cytological expression of *ig* mutant in megagametophyte // Maize Genetics Coop. NL. 1995. Vol.69. P.121.

Kermicle J.L. Androgenesis conditioned by a mutation in maize // Science. 1969. Vol.166, № 3911. P. 1422 – 1424.

Kermicle J.L. Pleiotropic effects on seed development of the indeterminate gameto-phyte gene in maize // Amer.J.Bot. 1971. Vol.58, № 1. P. 1 – 7.

Kermicle J.L. Indeterminate gametophyte (*ig*): Biology and use. In: The Maize Handbook. M. Freeling and V. Walbot (eds). New York, Springer-Verlag. 1994. P. 388 – 393.

Kindiger B. and Hamann S. Generation of haploids in maize: a modification of the indeterminate gametophyte (*ig*) system // Report of Southern Plains Range Research Station (USA). 1992.

Lin B.Y. Structural modifications of the female gametophyte associated with the indeterminate gametophyte (*ig*) mutant in maize // Can.J.Genet. and Cytol. 1978. Vol.20, № 2. P.249 – 257.

Lin B.Y. Megagametogenetic alterations associated with the indeterminate gametophyte (*ig*) mutation in maize // Rev. brasil. biol. 1981. Vol.41, № 3. P. 557 – 563.

УДК: 575.42 + 581.3

ЦИТОЭМБРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ АПОМИКСИСА У КУКУРУЗЫ ЛИНИИ АТ-3 ПОСЛЕ ОПЫЛЕНИЯ

Н.В. Апанасова, В.В. Титовец

Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского

Линии кукурузы с генами партеногенеза (АТ-1 и АТ-3) были получены на кафедре генетики Саратовского государственного университета (Тырно, Еналеева, 1983; Тырно, 1997). Они используются для изучения закономерностей апомиксиса, а также для получения гаплоидов и создания нередуцированных апомиктов (Тырно, 2002). Проводилось также цитоэмбриологическое исследование изолированных неопыленных початков (Enaleeva, Тырно, 1997; Титовец и др., 2002).

Вместе с тем, представляют интерес данные об особенностях зародышевых мешков (ЗМ) и происходящих в них процессах при опылении. Необходимость изучения предрасположенности к партеногенезу при опылении и потенциальном или реальном оплодотворении может определяться разными причинами. Так, в результате плохой изоляции, разрыва изолятора, проникновения насекомых и других неконтролируемых причин может происходить случайное