

Izmailow R. Reproductive strategy in the *Ranunculus auricomus* complex (*Ranunculaceae*) Source // *Acta Soc. Bot. Pol.* 1996. Vol. 65. N 1-2. P. 167-170.

Quarin C. L., Espinoza F., Martinez E. J., Pessino S. C., Bovo O. A. A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum* // *Sex.Plant Reprod.* 2001. Vol. N 5. P.243-249.

Naumova T. N., Hayward M. D., Wagenvoort M. Apomixis and sexuality in diploid and tetraploid accessions of *Brachiaria decumbens* // *Sex. Plant Reprod.* 1999. Vol. 12. N 1. P. 43-52.

Smith H. H. The genus as a genetic resource // *Nicotiana. Procedures for experimental use.* Techn. Bul. 1979. Vol. 1. N 1586. P. 1-16.

Weigel D., Meyerowitz E. M. Activation of floral homeotic genes in *Arabidopsis* // *Science.* 1993. Vol. 261. P. 1723-1726.

УДК: 581.165.1

ВЫЯВЛЕНИЕ ГАПЛОИДОВ У ПУРПУРНЫХ ФОРМ КУКУРУЗЫ

Ю.В. Смолькина, Л.В. Сериков, Э.В. Калашникова

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского

У кукурузы известны линии, у которых окраска стебля и листьев отличается от типичной зелёной. Она может иметь разные оттенки коричневого или пурпурного цвета. Розовыми, красными или пурпурными могут быть первичные корешки проростков, причем такая окраска у одних форм проявляется при прорастивании зерновок только при освещении, у других – как при освещении, так и в темноте. У некоторых линий может быть окрашенным перикарп, алейрон и зародыш. Окраска и её степень определяется рядом генов (индивидуально или при взаимодействии друг с другом), контролирующих синтез пигментов (Сое et al., 1988). Такие линии часто используются как генетические маркёры для получения гаплоидов у обычных «зелёных» линий, сортов и гибридов. Пурпурная окраска по отношению к зелёной или белой у корней является доминантным признаком. Поэтому гибридное потомство F₁, полученное после опыления «зелёных» форм пыльцой «пурпурных» маркёров будет также пурпурным. Гаплоиды не будут нести генов пурпурной окраски, и поэтому возможна их лёгкая диагностика среди гибридных растений (Сое, 1969; Хохлов и др., 1976). Полученные таким образом гаплоиды успешно используются для практических целей – ускоренного создания гомозиготных линий, мутантов, повышения эффективности отбора и проведения ряда биотехнологических операций (Тырнов, 1988).

Вместе с тем, в последнее время пурпурные линии стали представлять интерес как самостоятельный объект селекции, поскольку они содержат ряд ценных химических соединений, которые могут использоваться в пищевой и фармацевтической промышленности; у некоторых линий подтверждено наличие не менее 4 антоцианов, 13 флавоноидов и 11 фенольных кислот (Купчак и др., 1996). Поэтому встала проблема получения матроклиных

гаплоидов для селекционных целей у самих пурпурных линий, когда они используются в качестве материнских форм.

Материал и методы

В качестве материнской формы использовалась типичная пурпурная линия – Пурпурный тестер (ПТ) и трёх (ПТ-1 – ПТ-3) производных от него более скороспелых (на 7 – 12 дней) линий, полученных путём самоопыления между ПТ и «зелёными» скороспелыми линиями селекции кафедры генетики СГУ. Все эти линии имеют гены A1 A1 A2 A2 BB PIPr PrPr R-gR-gCC, вызывающие в совокупности интенсивную пурпурную окраску стебля, листьев, метёлки и покраснение корней в темноте.

В качестве пыльцевого родителя использовали линии ЗМ-gl и ЗМС-8. Использование пыльцы ЗМ-gl ведёт к возникновению матроклиных гаплоидов с частотой около 0,05%, ЗМС-8 – до 5 – 10% (Гырнов, Завалишина, 1984; Zavalishina, Gyrnov, 1992). То есть, использовались низко- и высокоэффективные гаплоиндукторы. Эти опылители имеют аллель гена R-R nj:Cudu, который вместе с другими генами (A A2 C C2 pr P-wr b Pl) вызывает сильную пигментацию алейрона, щитка и зародыша (Chase, 1969).

Початки линии ПТ и её скороспелых производных изолировали до появления пестичных питей пергаментными пакетиками, и после появления пестичных питей их опыляли пыльцой линий ЗМ-gl и ЗМС-8. Полученные зерновки проращивали на фильтровальной бумаге. Среди них на разных стадиях прорастания выявляли гаплоиды.

Результаты и обсуждение

Основная теоретически ожидаемая трудность состояла в том, что как материнская, так и отцовская линия несли гены окраски. Гибридные зерновки имели окраску близкую к тёмно фиолетовой. Поэтому цвет зародыша не просматривался как при наличии гена R-g, так и аллеля Rnj: Cudu. Следовательно, браковка заведомо гибридных особей в сухих зерновках практически невозможна.

Снятие перикарпа у зерновок всех линий серии ПТ показало, что зародыш у них имеет слабо-желтоватую окраску. Однако гибридные зародыши были пигментированы с разной степенью интенсивности, но достаточной для надёжной идентификации их гибридной природы. Это открывало принципиальную возможность выявления гаплоидов. Однако, снятие перикарпа над зародышем – достаточно трудоёмкая процедура и занимает много времени. Частично это могло бы быть оправдано при очень высокой частоте гаплоидии, например, около 10%. Однако, как известно, частота гаплоидии может зависеть от ряда генотипических особенностей материнских форм и паратипических факторов (Гырнов, 1976; Гырнов, Завалишина, 1984). В перспективе же предполагается работа именно с разнообразными формами, поскольку селекционная работа связана с аккумуляцией в одной линии разных признаков, что решается, как правило, путем гибридизации разного исходного материала.

Далее нами были проанализированы набухшие зерновки после 18 часов замачивания в обычной водопроводной воде. Среди них лишь в единичных случаях можно было определить, что зародыш окрашен. Это, в основном, касалось тех случаев, когда зародыш как бы приподымал перикарп в виде валика. Возможно, это связано с высокой степенью набухания зародыша, расположением на самой поверхности щитка или ещё какими-то причинами. Снятие перикарпа у набухших зерновок значительно легче, чем у сухих, но, тем не менее, остаётся достаточно трудоёмким процессом.

Положительные результаты проявились лишь после начала прорастания зерновок. Оптимальной стадией является та, когда лопается перикарп или колеоптиле равно 3 - 5 миллиметрам. Обычно это наблюдается на вторые сутки после начала прорастания предварительно замоченных (12 - 24 часов) зерновок. В это время окраска зародыша достаточно хорошо выражена. При дальнейшем росте колеоптиле до 1 - 3 сантиметров окраска может исчезать или сохраняться в еле-заметном состоянии на самом кончике. В разных вариантах количество отобранных зерновок с гибридными (окрашенными) зародышами варьировало в пределах 85-95 процентов. Дальнейший анализ показал, что среди оставшихся непигментированных проростков наряду с диплоидами встречаются также и гаплоиды. Причина появления неокрашенных диплоидов неясна. Их выращивание и самоопыление показало, что они являются гибридами и наблюдается расщепление на зерновки с пигментированными и непигментированными зародышами, что соответствует теоретически ожидаемому результату. Не исключено, что ингибирование окраски связано с какими-то временно действующими физиолого-биохимическими причинами, ограничением питания или разной степенью освещённости (например, полное отсутствие таковой в некоторых точках между стеблем и початком). Как было отмечено выше, при наличии некоторых генотипов окраска может проявляться при освещении и отсутствовать в темноте. Перечисленные вопросы нуждаются в дополнительных специальных исследованиях.

Возникновение непигментированных гибридов не является существенно значимым отрицательным фактором. Во-первых, их количество не слишком велико и лежит в пределах 5-14 процентов (Таблица). Кроме того, при использовании ЗМС-8 непигментированные зародыши встречались в 2-3 раза реже, что указывает на явную зависимость данного явления от отцовской формы. Не исключено, что путём дальнейшей селекции можно будет ещё больше улучшить маркирующую способность пыльцевых форм. Во-вторых, ранее было показано, что гаплоиды и диплоиды существенно отличаются друг от друга по размерам на стадии колеоптиле (3-й 5-й день) и особенно на стадии 2-х - 3-х листьев. Гаплоиды значительно меньше, что хорошо выявляется визуально. На этой основе был предложен так называемый морфометрический метод диагностики гаплоидов (Гырнов, 1969). Линии с генами окраски подчиняются тем же закономерностям, и использование морфометрического метода позволяет легко и быстро, практически ещё на стадии колеоптиле, избавиться почти от всех диплоидов. Небольшое количество уменьшенных проростков включают в себя мутантов, триплоидов, анеуплоидов и

поражённых какими-то болезнями особей. Все они, тем не менее, отличаются от типичных гаплоидов. Они более тонкие и имеют, как правило, более длинный первый лист. Все сомнительные особи лучше браковать, чтобы не увеличивать объём достаточно трудоёмких цитологических работ.

Необходимо было также проверить, как наличие генов пурпурной окраски влияет на частоту возникновения гаплоидов.

Встречаемость гаплоидов у пурпурных линий при использовании высоко- и низкоэффективных гаплоиндукторов - линий – опылителей ЗМ-г1 и ЗМС-8

Материн- ская форма	Опылитель	количество			Количество неокрашенных гибридных диплоидов	
		зерновок	гаплоидов		шт.	%*
			шт.	%		
ПТ	ЗМ-г1	2640	2	0,08	356	14
	ЗМС-8	1742	76	4,36	156	9
ПТ-1	ЗМ-г1	1920	1	0,05	230	12
	ЗМС-8	1346	58	5,05	67	5
ПТ-2	ЗМ-г1	2004	2	0,09	362	16
	ЗМС-8	1218	73	6,07	133	11
ПТ-3	ЗМ-г1	2421	2	0,08	193	8
	ЗМС-8	1406	62	4,40	98	7

*Проценты округлены до целых значений

Их возникновение практически полностью соответствовало закономерностям установленным для многих обычных линий кукурузы. То есть, при использовании неэффективного опылителя ЗМ-г1 гаплоиды возникали крайне редко (сотые доли процента). Напротив, при использовании пыльцы высокоэффективного опылителя ЗМС-8 частоты гаплоидии возросли до 4-6 процентов, то есть в 50-100 раз. При этом также изменилось соотношение гаплоид: не пигментированный диплоид. При использовании ЗМ-г1 оно лежало в пределах 1:100 – 1:230. В вариантах с ЗМС-8 оно не превышало 1:2, что значительно облегчает работу по выявлению гаплоидов.

Уровень в 4-6% можно считать очень хорошим показателем, вполне достаточным для получения гаплоидов в количестве достаточном для практической селекционной работы.

Литература

Купчак Т.В., Николаева Л.А., Тырнов В.С. Новое лекарственное сырьё – трава гибридной формы кукурузы // Современное состояние и перспективы научных исследований в области фармации. Самара, 1996.С.145-146

Тырнов В.С. О возможности визуальной диагностики гаплоидов кукурузы среди проростков // Научн. Докл. Высшей школы .Биол. Науки. 1969.№7. С.111-114.

Тырнов В.С. Генетические закономерности возникновения гаплоидов // Гаплоидия и селекция. М., 1976. С.121-131.

Тырнов В.С. Гаплоидия у растений: научное и прикладное значение. М., 1998. 54 с.

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

Хохлов С.С., Тырнов В.С. Методы диагностики гаплоидов // Гаплоидия и селекция. М., 1976. С.14-25.

Chase S.S. Monoploids and monoploid derivatives of maize (*Zea mays* L.) // The botanical review. 1909. Vol.35, N 2. P.117-167.

Coe E.H., Jr, neuffer M.G., Hoisington D.A. The Genetics of Corn // Corn and Corn Improvement. Agronomy Monograph no.18, 3rd edition .1988. P.81-258.

Zavalishina A.N., Tyrnov V.S. Inducyion of matroclinal haploidy in maize in vivo // Reproductive biology and plant breeding: XIII EUCARPIA Congr., July 6-11, 1992. Angers , 1992 .P. 221-222.