

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


Кафедра генетики

**ФЕНОТИПИРОВАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ГАПЛОИНДУКТОРОВ ВИР
ПО МАРКЕРНЫМ ГЕНАМ R-NJ, B1 и P11**

Автореферат магистерской работы
студента 2 курса 241 группы
направления 06.04.01 Биология
биологического факультета
Карлова Андрея Владиславовича

Научный руководитель:

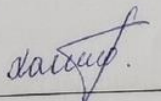
доцент, док. биол. наук,

5.06.2023 

О. И. Юдакова

Научный консультант:


в.н.с., док. биол. наук,

5.06.2023 

Э. Б. Хатефов

Зав. кафедрой:

доцент, док. биол. наук,

5.06.2023 

О. И. Юдакова

Саратов 2023

Введение. Широкое использование в мировом земледелии кукурузы требует её постоянного селекционно-генетического улучшения, и, в частности, создания гибридов на основе инбредных родительских линий. Одним из современных способов создания таких линий является технология получения дигаплоидных линий, ДН, основанная на удвоении числа хромосом у гаплоидных растений. Дигаплоидные линии существенно ускоряют селекционный процесс и повышают качество семеноводческой продукции гибридной кукурузы. Гаплоиндукция - это способность пыльцы некоторых растений вызывать партеногенетическое развитие яйцеклеток у материнских форм. В результате при использовании в скрещиваниях линий-гаплоиндукторов в качестве отцовских форм на материнских растениях образуются зерновки с гаплоидными матроклинными зародышами.

На сегодня актуальным является выведение новых высокоэффективных линий-гаплоиндукторов, адаптированных к различным климатическим условиям. Важно, чтобы новые линии имели хорошо фенотипически проявляемые маркерные признаки, позволяющие легко отбирать в потомстве гаплоидные растения на разных стадиях развития, от зрелых семян до взрослого растения.

Цель: Выявление эффективных линий-гаплоиндукторов кукурузы из коллекции ВИР с ярко выраженными маркерными фенотипическими признаками пурпурной окраски вегетативных и генеративных органов и структур.

Для достижения данной цели, были поставлены следующие задачи:

1. Провести анализ гаплоиндуцирующей способности линий кукурузы по частоте образования семян с гаплоидным зародышем при скрещивании их с тестером ГК-26М.

2. Оценить фенотипическое проявление у линий-гаплоиндукторов кукурузы маркерных генов *R-nj*, *B1* и *Pil*, детерминирующих антоциановую окраску органов и структур растений на ювенильной и генеративной стадии развития.

Структура и объем работы. Работа изложена на 67 страницах машинописного текста и включает 6 разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение, выводы, список использованных источников, содержащий 52 наименования.

Основное содержание работы: В первой главе представлен обзор современной литературы по вопросу гаплоидии у растений и использования этого явления в генетике и селекции. В ней рассматриваются методы получения гаплоидов *in vivo* и *in vitro*, особое внимание уделено явлению гаплоиндукции и технологии ДН у кукурузы. Во второй главе обзора современной литературы представлены данные о предполагаемых цитозэмбриологических и молекулярно-генетических механизмов гаплоиндукции. Во второй главе особенно подробно описаны генетические механизмы гаплоиндукции и проблемы маркирования гаплоидных зерновок.

Материалы и методы: Материалом для исследования послужили 300 линий-гаплоиндукторов из мировой коллекции ВИР, из которых для более детального исследования было отобрано 18 линий отечественной селекции (ГИ-2, ГИ-128, ГИ-59, ГИ-148, ГИ-16, ГИ-23, ГИ-133, ГИ-146, ГИ-10, ГИ-143, ГИ-19, ГИ-13, ГИ-20, ГИ-43, ГИ-51, ГИ-135, ГИ-21, ГИ-1150-1), и 2 линии зарубежной селекции (ГИ-Китай и ГИ-Мексика), которые были созданы на основе линии Stock 6.

В качестве материнской формы для тестирования частоты гаплоиндукции использовали тестерную линию ГК26М, характеризующаяся ЦМС.

Полевые опыты были проводимы в степной зоне Кабардино-Балкарской республики, на территории селекционно-семеноводческой компании ООО ИПА ОТБОР НИИСХ в 2022-2023 гг. Лабораторные исследования проходились в Саратовском национально-исследовательском государственном университете имени Н. Г. Чернышевского, на кафедре генетики в 2023 г.

Методика исследования: тест кроссы проводили в период цветения растений в июле-августе 2022 г. Для этого свежесобранную пыльцу гаплоиндуктора переносили на рыльца тестера и фиксировали опыленный початок пергаментным изолятором до уборки урожая. Уборка производилась вручную, после полного созревания початков. Учет гаплоидных зерновок и частоту гаплоиндукции проводили на спелых початках, по высушенным зерновкам 13% влажности в лаборатории.

После зацветания гаплоиндукторов кукурузы, осуществляли фенотипирование растений по маркерным генам *R1-nj*, *B1* и *P11*. Фенотипирование проводилось по признакам: атоциановая окраска стебля, листа, пыльников, шелковки, колосковых чешуек и оснований колосковых чешуек.

Все линии были маркированы генами: *R1-nj*, *B1* и *P11*. Гомозиготный доминантный ген *R1 - Navajo (R1-nj)*, детерминирует антоциановую окраску зародыша и алейронового слоя эндосперма, он экспрессируется в самом внешнем слое эндосперма кукурузы, а также на щитке (зародыше).

Ген *P11 (Purple1)* проявляется на корнях растений и зависит от освещения. Действие гена *P11* является дополнительным способом различия между гаплоидными и диплоидными генотипами.

Совместное действие генов *P11* и *B1 (Booster1)* приводит к темно-пурпурной окраске в coleoptile и немного окрашивает первичный корешок. У растений гомозиготных по аллелям генов *B1* и *P11*, антоциановая окраска проявляется на стебле, листьях, метелки, шелковки, початка и пыльников.

Оценку окраски антоцианом зерновок и частей растений гаплоиндукторов кукурузы проводили по методике ВИР. При фенотипировании семян гаплоиндукторов по гену *R1-nj*, использовали показатели: антоциановая окраска эндосперма, зародыша и щитка.

При фенотипировании проростков кукурузы использовали два параметра, окраска coleoptile и первичного корешка. Ген *P11* отвечает за накопление антоциана в первичных корешках растений. Сочетание генов *P11*

и *B1*, отвечают за окраску колеоптиля. В опыте с каждой линии было пророщено по 20 проростков, среди них подсчитывалось количество окрашенных по взятым признакам и неокрашенных.

Маркерными генам отвечающими за антоциановую окраску у взрослых растений являются гены *P11* и *B1*. Фенотипирование взрослых растений проводили по трехбалльной шкале, где 1 – слабая окраска, 2 – средняя окраска, 3 – выраженная окраска, «-» - окраска отсутствует.

Следующим этапом исследования было выращивание в лабораторных условиях 20 линий-гаплоиндукторов до стадии шильца. С каждой линии взяли по 20 высушенных гаплоидных зерновок. Они выращивались в кюветах, во влажной камере в течение 7 суток, на 8 сутки фиксировались результаты. Сначала проращивали 5 суток без света с закрытой крышкой, а с 6 суток убрали крышку и проращивали зерновки под фитолампой для того, чтобы лучше проявилась антоциановая окраска на проростке и корне (гены *P11* и *B1*). Длина дня для проростков под фитолампой составляла 9 часов, так как кукуруза растение короткого светового дня.

Результаты исследования: Для определения частоты гаплоиндукции линии-гаплоиндукторы, маркированные геном окраски зародыша *R1-nj*, были скрещены с тестером ГК-26М, используемым в качестве материнской формы. При использовании разных опылителей на початках материнских растений линии ГК-26М завязывалось разное количество зерновок: от 130 до 250 штук. Проведенный анализ показал, что частота гаплоиндукции у изученных линий варьировала в небольших пределах от 3 и до 5,5% (таблица 1), что характерно для стандартных гаплоиндукторов. Максимальное количество семян с гаплоидными зародышами было зарегистрировано у линий ГИ-135 и ГИ-133 - 5,2 и 5,5 %, соответственно.

Анализ исследованных семян показал, что у линий-гаплоиндукторов маркерный ген *R1-nj* проявляется в разной степени. У четырех линий (ГИ-13, ГИ-20, ГИ-143 и ГИ-128) выявлена максимальная экспрессия гена *R1-nj*, контролирующего антоциановую окраску зародыша и алейронового слоя

эндосперма. У данных линий зерновки были ярко окрашены в темно-пурпурный цвет.

Таблица 1 – Частота гаплоиндукции у исследуемых линий гаплоиндукторов

№ п/п	Название линии	Частота гаплоиндукции, %
1	ГИ-2	4,2
2	ГИ-128	4,5
3	ГИ-59	3,6
4	ГИ-148	5,0
5	ГИ-16	5,0
6	ГИ-23	4,3
7	ГИ-133	5,5
8	ГИ-146	4,0
9	ГИ-10	3,4
10	ГИ-Мексика	3,0
11	ГИ-143	5,0
12	ГИ-19	4,5
13	ГИ-13	3,0
14	ГИ-20	4,2
15	ГИ-43	3,0
16	ГИ-Китай	3,0
17	ГИ-51	5,0
18	ГИ-135	5,2
19	ГИ-21	3,6
20	ГИ-1150-1	4,2

Еще у четырех линий (ГИ-10, ГИ-16, ГИ-43, ГИ-148), несмотря на присутствие в генотипе гена *R1-nj*, зерновки были практически не окрашенными. У остальных исследуемых линий степень фенотипического

проявления гена *R1-nj* варьировала по интенсивности окраски от розового до темно-фиолетового, либо окрашенными у них были только отдельные части зерновок, например эндосперм или только часть эндосперма.

Для изучения степени фенотипического проявления генов *P11* и *B1* у каждой из исследованных линий проращивали по 20 зерновок в лабораторных условиях. Из 20 исследованных линий только у 7 линий (ГИ-128, ГИ-13, ГИ-20, ГИ-43, ГИ-Китай, ГИ-51) проростки были полностью окрашенными (таблица 2), 6 линий (ГИ-135ГИ-2, ГИ-23, ГИ-133, ГИ-19, ГИ-21 и ГИ-1150-1) характеризовались наименьшей частотой выраженности маркерных признаков.

Таблица 2 – Частота фенотипического проявления антоциановой окраски у проростков линий-гаплоиндукторов

Название линии	Количество проростков, шт.						
	Всего	С окрашенным колеоптилем		С окрашенным первичным корешком		Полностью окрашенные	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%
ГИ-2	20	6	30	20	100	6	30
ГИ-128	20	20	100	20	100	20	100
ГИ-59	20	18	90	20	100	18	90
ГИ-148	20	13	65	20	100	13	65
ГИ-16	20	15	75	20	100	15	75
ГИ-23	20	6	30	20	100	6	30
ГИ-133	20	6	30	20	100	6	30
ГИ-146	20	10	50	20	100	10	50
ГИ-10	20	18	90	20	100	18	90
ГИ-Мексика	20	15	75	20	100	15	75
ГИ-143	20	11	55	20	100	11	55

Продолжение таблицы 2

ГИ-19	20	5	25	5	25	5	25
ГИ-13	20	20	100	20	100	20	100
ГИ-20	20	20	100	20	100	20	100
ГИ-43	20	20	100	20	100	20	100
ГИ-Китай	20	20	100	20	100	20	100
ГИ-51	20	20	100	20	100	20	100
ГИ-135	20	20	100	20	100	20	100
ГИ-21	20	5	25	5	25	5	25
ГИ-1150-1	20	7	35	20	100	7	35

Анализ результатов по антоциановой окраске вегетативных органов растений показал, что у большинства линий большая выраженность антоцианового маркера наблюдается на стебле и лишь затем на листьях (рисунок 1). Максимально выраженными маркерными признаками стебля характеризуются гаплоиндукторы: ГИ-128, ГИ-59, ГИ-Мексика, ГИ-13, ГИ-20, ГИ-43, ГИ-Китай, ГИ-51, ГИ-135 (таблица 3), а максимальной выраженностью маркеров на листьях обладали гаплоиндукторы: ГИ-59, ГИ-43, ГИ-51, ГИ-1150-1.

При анализе женских частей соцветия, был взят один показатель, антоциановая окраска рыльца растения. По данному признаку хорошо проявились маркерные свойства у всех линий, исключение составляет ГИ-133, у которого на рыльце отсутствует антоциановая окраска. Максимальные маркерные свойства рыльца проявили линии: ГИ-128, ГИ-148, ГИ-16, ГИ-10, ГИ-143, ГИ-13, ГИ-Китай и ГИ-51 (таблица 3).

В исследовании мужских генеративных органов и частей соцветия, были изучены следующие показатели: окраска колосковых чешуек исключая основание, оснований колосковых чешуек, пыльников. Большинство изученных линий имеют хорошие показатели по данному признаку, в

основном на 2-3. У линий ГИ-21 и ГИ-133 отсутствует антоциановая окраска по данным показателям. Максимальные значения по этим двум признакам показали гаплоиндукторы: ГИ-128, ГИ-43, ГИ-Китай и ГИ-51.

Таблица 3 – Фенотипическое проявление антоциановой окраски на различных частях растений у линий-гаплоиндукторов

Название линии	Антоциановая окраска, балл					
	частей мужского соцветия			частей женского соцветия (рылец)	вегетативных органов	
	колосковых чешуй, исключая их основание	только оснований колосковых чешуек	пыльников		стебля	листьев
ГИ-2	1	1	2	2	1	-
ГИ-128	3	3	2	3	3	2
ГИ-59	2	3	-	2	3	3
ГИ-148	2	2	2	3	2	1
ГИ-16	2	2	2	3	2	2
ГИ-23	-	1	3	1	-	1
ГИ-133	-	-	1	-	1	1
ГИ-146	1	2	1	2	1	-
ГИ-10	2	3	3	3	3	1
ГИ-Мексика	3	1	3	2	3	2
ГИ-143	2	2	1	3	2	1
ГИ-19	2	1	1	2	-	1
ГИ-13	3	2	3	3	3	2
ГИ-20	2	3	3	2	3	2
ГИ-43	3	3	1	2	3	3
ГИ-Китай	3	3	2	3	3	2

Продолжение таблицы 3

ГИ-51	3	3	-	3	3	3
ГИ-135	3	2	3	2	3	2
ГИ-21	-	-	1	2	1	-
ГИ-1150-1	1	2	1	2	-	3

Примечание: Данные обозначенные 1 – слабая окраска, 2 – средняя окраска, 3 – выраженная окраска, «-» - окраска отсутствует.



Рисунок 1 – Максимальная выраженность антоцианового маркера на стебле (слева) и листьях (справа)

При анализе окраски пыльников у изученных линий можно сказать, что они демонстрируют в основном средние значения. Максимальными значениями обладали 6 линий, а 11 средними, у 2 линий (ГИ-59 и ГИ-51) окраска не проявилась совсем.

Из 20 исследованных линий-гаплоиндукторов кукурузы наилучшими маркерными признаками обладают линии ГИ-128, ГИ-13 и ГИ-20. Они характеризуются высокими показателями окраски на ювенильной и на генеративной стадии развития растения (таблица 4).

Таблица 4 – Фенотипическое проявление маркерных генов у изученных линий-гаплоиндукторов на ювенильной и генеративных стадиях развития

Линия	Наличие антоциановой окраски вегетативных и генеративных структур и органов							
	на ювенильной стадии				на генеративной стадии развития			
	зародыша	эндо-сперма	первичного корешка	колеоптиля	частей мужского соцветия	рыльца	стебля	листьев
ГИ-2								
ГИ-128								
ГИ-59								
ГИ-148								
ГИ-16								
ГИ-23								
ГИ-133								
ГИ-146								
ГИ-10								
ГИ-Мексика								
ГИ-143								
ГИ-19								
ГИ-13								
ГИ-20								
ГИ-43								
ГИ-Китай								
ГИ-51								
ГИ-135								
ГИ-21								
ГИ-1150-1								

Примечание: Бордовая заливка ячейки - яркая выраженность окраски (3 балла); красная - хорошая выраженность (2 балла); желтая - слабая выраженность окраски (1 балл); белая - отсутствие окраски (0 баллов).

Заключение: Анализ полученных нами в данной работе результатов позволяет сделать следующие выводы:

1. Анализ семян, полученных от скрещивания линии кукурузы ГК-26М с 20 тестируемыми линиями-гаплоиндукторами показал, что частота семян с гаплоидными зародышами варьирует у них от 3 и до 5,5%. Наиболее

высокой частотой гаплоиндукции характеризуются линии ГИ-135 и ГИ-133 (5,2 и 5,5%, соответственно).

2. Изученные линии-гаплоиндукторы различаются по степени фенотипического проявления у них маркерных генов *R1-nj*, *P11* и *B1* как на ювенильной, так и на генеративной стадии развития растений. Наибольшее выраженная экспрессия гена *R1-nj* установлена у гаплоиндукторов ГИ-13, ГИ-20, ГИ-143 и ГИ-128, наименее выраженная – у ГИ-10, ГИ-43, ГИ-16 и ГИ-148.

3. Анализ фенотипического проявления генов *P11* и *B1* показал, что антоциановая окраска coleoptily и первичного корешка одновременно проявлялась у проростков только 7 линий: ГИ-128, ГИ-13, ГИ-20, ГИ-43, ГИ-Китай, ГИ-51. Шесть линий (ГИ-135, ГИ-2, ГИ-23, ГИ-133, ГИ-19, ГИ-21 и ГИ-1150-1) характеризуются минимальной фенотипической выраженностью маркерных генов *P11* и *B1*.

4. Анализ проявления маркерных генов *P11* и *B1* у взрослых растений показал, что пурпурная окраска вегетативных и генеративных органов наиболее выражена у гаплоиндукторов ГИ-128, ГИ-10, ГИ-Мексика, ГИ-13, ГИ-20, ГИ-43, ГИ-Китай, ГИ-51, ГИ-135, и наименее выражена – у линий ГИ-2, ГИ-2, ГИ-23, ГИ-133, ГИ-146, ГИ-19, ГИ-21, ГИ-1150-1. У всех изученных линий пурпурная окраска в большей степени проявлялась на стебле растений и в меньшей степени на листьях. Рыльца практически всех линий, кроме ГИ-133, имели антоциановую окраску.

5. Сравнительный анализ степени фенотипического проявления маркерных генов *R1-nj*, *P11* и *B1* показал, что они одновременно хорошо экспрессируются на ювенильной и генеративной стадиях развития растений линий ГИ-128, ГИ-13 и ГИ-20. Эти линии могут быть рекомендованы для практического использования.

