

УДК 633.15:631.5/9:576.356.52

Э.Б. Хатефов, канд. биол. наук,
ГНУ Кабардино-Балкарский НИИСХ Россельхозакадемии
kbniish2007@yandex.ru

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГАПЛОИНДУКТОРОВ В МОНОПЛОИДНЫХ И ГЕТЕРОПЛОИДНЫХ СКРЕЩИВАНИЯХ КУКУРУЗЫ

*Проведены гетероплоидные скрещивания между диплоидной и тетраплоидной кукурузой с использованием мутации *igl*. Получены початки с различным сочетанием в зерновке пloidности зародыша и эндосперма. Произведены расчеты неменделевского расщепления при использовании мутации *ig* в моноплоидных и гетероплоидных скрещиваниях. При применении приведенных схем скрещивания возможно получение зерновок сочетающих пloidность эндосперма от $0n$ до $6n$ и зародыша от $0n$ до $4n$. Ведутся исследования по генетическому маркированию зерновок с различной пloidностью.*

*These are carried out heteroploid crossings among double ploid and tetraploid maize with *igl* mutation usage. These are received ears with different combinations of germ and endosperm ploidity in grains. These are made calculations of non-Mendelian split while using *igl* mutation in monoploid and heteroploid crossings. While using given schemes of crossings it is possible to receive grains combined endosperm ploidity from $0p$ till $6p$ and germ from $0p$ till $4p$. These are made researches in genetic marking of grains with different ploidity.*

Ключевые слова: кукуруза, тетраплоидная кукуруза, диплоидная кукуруза, моноплоидные и гетероплоидные скрещивания, зародыш, эндосперм, зерновка.

Keywords: *maize, tetra ploid maize, double ploid maize, monoploid and heteroploid crossings, germ, endosperm, grains.*

Введение. Классическая работа С.Г. Навашина [1] по двойному оплодотворению явилась крупнейшим вкладом в биологическую науку. Одно из главных значений двойного оплодотворения заключается в том, что при слиянии двух разнокачественных гамет (яйцеклетки и спермия) происходит обогащение наследственности растений, повышение жизнеспособности и приспособляемости к условиям окружающей среды. Кукуруза является третьим по экономическому значению хлебным злаком в мировом производстве зерна, в чем немаловажную роль сыграло ее постоянное селекционно-генетическое улучшение. Основным селекционным методом улучшения кукурузы, за последние несколько десятилетий, является использование гетерозиса.

Зародыш, образующийся в результате слияния двух гаплоидных гамет – яйцеклетки и одного из спермиев, является диплоидным ($2n=2x$) и имеет одинаковое соотношение геномов обоих родителей. Эндосперм же образуется в результате слияния диплоидного центрального ядра с гаплоидным вторым спермием, в результате чего образуется триплоидная ($2n=3x$) клетка, из которой в дальнейшем развивается триплоидная ткань эндосперма. При этом на один геном отца приходится два генома матери. Нарушения же нормального хода процесса слияния гамет у диплоидов могут привести к возникновению либо гаплоидных, либо полиплоидных зерновок.

У тетраплоидных форм соотношение геномов, в отличие от диплоидов, сохраняется с той лишь разницей, что с увеличением генома в два раза, зародыш зерновки формирует тетраплоидную ($2n=4x$), а эндосперм – гексаплоидную ($2n=6x$) ткань. Соответственно тычинки (пыльники) формируют пыльцу с диплоидным набором хромосом вместо гаплоидного, а пестики (столбики) – диплоидную яйцеклетку и тетраплоидное центральное ядро.

Мутация “indeterminate gametophyte” [5] известна давно и используется для получения гаплоидных зерновок на диплоидных початках кукурузы. Использование *ig1* мутации в моноплоидных ($\text{♀}2x \times \text{♂}2x$; $\text{♀}4x \times \text{♂}4x$) и гетероп-

лоидных ($\text{♀}2x \times \text{♂}4x$; $\text{♀}4x \times \text{♂}2x$) скрещиваниях между диплоидной ($2x$) и тетраплоидной ($4x$) кукурузой позволяет получить неменделевское соотношение плоидности зародыша и эндосперма, тогда как при обычном скрещивании без мутации *ig1* оно ограничено всего 4-мя вариантами. При этом в широких пределах изменяются соотношения геномов родительских пар и сочетание различных состояний аллелей в зародыше и эндосперме. Остается пока сложным вопрос маркировки компонентов зерновки (зародыш, эндосперм) различной плоидности для цитологического анализа.

Материалы и методы. В опыте были использованы диплоидный и тетраплоидный гаплоиндуктор кукурузы ЗМК селекции КНИИСХ им. П.П.Лукьяненко, диплоидная и тетраплоидная линии кукурузы, триплоидные гибридные растения и початки кукурузы.

Результаты. При гетероплоидном скрещивании ($\text{♀}4x \times \text{♂}2x$, $\text{♀}2x \times \text{♂}4x$) без использования мутации *ig1* формируются дефектные зерновки с невыполненным либо слабовыполненным эндоспермом и триплоидным (обычно стерильным) зародышем (рис.1).



Рис. 1. Развитие триплоидных зародышей без эндосперма на початке при гетероплоидном скрещивании

Причем, при схеме скрещивания $\text{♀}4x \times \text{♂}2x$ формируется триплоидный зародыш и пентаплоидный эндосперм, а при схеме $\text{♂}4x \times \text{♀}2x$ формируется триплоидный зародыш и тетраплоидный эндосперм. В изученных гетероплоидных схемах скрещивания эндосперм зерновки, в отличие от зародыша, не развивается.

В гетероплоидных скрещиваниях без использования мутации *ig1* соотношения геномов изменяются в зависимости от схемы скрещивания (таблица 1). При моноплоидных скрещиваниях нормальные соотношения геномов родителей у зародыша и эндосперма сохраняются согласно закономерности механизма двойного оплодотворения. В гетероплоидных скрещиваниях эти соотношения незначительно изменяют баланс геномов.

1. Соотношение геномов родительских пар в компонентах зерновки кукурузы при моноплоидных и гетероплоидных скрещиваниях

Гибридные комбинации (♂x♀)	Соотношения геномов в компонентах зерновки			
	эндосперм		зародыш	
	♂	♀	♂	♀
2x x 2x	1	2	1	1
4x x 4x	1	2	1	1
2x x 4x	1	4	1	2
4x x 2x	1	1	2	1

Так, по схеме ♀2x x ♂4x зародыш имеет на один геном матери два генома отца, а эндосперм – одинаковое соотношение материнских и отцовских геномов. По схеме ♀4x x ♂2x зародыш имеет на два генома матери один геном отца, тогда как эндосперм содержит в четыре раза больше генома матери, чем отца. Несмотря на то, что триплоидная кукуруза имеет слабо развитый эндосперм, триплоидные растения при благоприятных условиях нормально растут и проходят все основные фенологические фазы. При наступлении фазы цветения большая часть мужских соцветий (метелок) оказывается стерильной, но часть растений нормально цветет и дает фертильную пыльцу. Початки же в основном фертильны и легко завязывают семена с пыльцой любой ploидности. Завязавшиеся на триплоидных початках зерна имеют как нормальный, так и слаборазвитый и неразвитый эндосперм. Тестирование растений из таких зерновок показало, что нормального развития эндосперма достигают в основном диплоидные и тетраплоидные зерновки.

Зерна со слабо развитым или неразвитым эндоспермом чаще всего оказываются эу- и анеуплоидными (рис. 2).



Рис. 2. Развитие зерновок различной ploидности на триплоидных (3x) початках, опыленных гаплоидной (слева) и диплоидной (справа) пыльцой

Изучению вопроса взаимодействия между зародышем и эндоспермом в настоящее время уделяется недостаточно внимания. В основном исследователи сосредоточили свои усилия на получении гаплоидов [2,3,4]. Получение беззародышевых зерновок либо зерновок только с зародышами без эндосперма нашло бы свое применение в перерабатывающей промышленности. Так, одним из обязательных этапов технологического процесса при получении крахмала и кукурузного масла из зерна является механическое отделение зародыша от эндосперма. Кроме механических повреждений и недостаточной чистоты отделения этот прием сопровождается большими затратами энергии и средств.

При развитии кукурузного растения содержание белка в зерновках часто зависит от выполненности початка [9]. На слабоозерненных початках содержание белка было выше, чем на хорошо выполненных початках. При развитии на початке зерновок только с эндоспермом или только с зародышем, несомненно, приведет к накоплению тех или иных биохимических компонентов, содержащихся в этих частях зерновки. В настоящее время выявлено и изучено достаточное количество мутаций эндосперма и некоторые из них используются в селекции для изменения биохимического состава зерна. При гетероплоидных скрещиваниях, использование таких мутаций позволяет получать наравне с зерновками с необычным сочетанием ploидности зародыша

и эндосперма также и необычные сочетания в этих частях родительских геномов (таблица 2, 3). С возрастанием ploидности геномов, в моноploидных и гетеропloидных скрещиваниях с использованием *ig*-мутации, количество зерновок различается по соотношению состояния аллелей одного локуса в эндосперме и зародыше одной зерновки.

1. Частоты изменения состояния аллелей в локусе в компонентах зерновки кукурузы при использовании *ig1* мутации в моноploидных и гетеропloидных скрещиваниях

Состояние аллелей (эндосперм-зародыш)	Схема скрещивания (♂x♀)				Сумма
	2x x 2x	4x x 2x	2x x 4x	4x x 4x	
AA-AA	1	1	1	1	4
AA-aa	1	1	1	1	4
AA-Aa	2	4	4	7	17
Aa-AA	4	7	8	13	32
Aa-Aa	8	28	32	111	179
Aa-aa	4	7	8	13	32
aa-Aa	2	4	4	7	17
aa-AA	1	1	1	1	4
aa-aa	1	1	1	1	4
итого	24	54	60	155	293

С возрастанием ploидности геномов, в моноploидных и гетеропloидных скрещиваниях с использованием *ig*-мутации, количество зерновок различается по соотношению состояния аллелей одного локуса в эндосперме и зародыше одной зерновки. Количество гетерозиготных состояний аллелей в зародыше и эндосперме одной зерновки возрастает с увеличением ploидности родителей с 8 до 111 зерен при моноploидном скрещивании. При гетеропloидных скрещиваниях количество зерновок с гетерозиготными аллелями в зародыше и эндосперме колеблется от 28 до 32 для (♂4x x ♀2x) и (♂2x x ♀4x) соответственно.

При введении в геном диплоидов и тетраploидов мутации *ig1* расширяется разнообразие не только соотношения геномов гибридизируемых генотипов, но и соотношения ploидности зародыша и эндосперма в зерновке кукурузы. В этом случае возникает проблема – как отличить зерновки с разными

по ploидности эндоспермом и зародышем? Кроме того, многие зерновки могут вообще не развиваться, несмотря на факт оплодотворения яйцеклетки спермием (рис. 4). Наиболее вероятный путь в разрешении этой проблемы, возможно, кроется в использовании мутаций окраски основных компонентов зерновки в качестве генетических маркеров.

3. Частоты сочетаний ploидности эндосперма и зародыша в зерновках при моноploидном и гетеропloидном моногибридном (ig) скрещивании.

Плоидность компонентов зерновки		Схема скрещивания (♀x ♂)				Сумма
эндосперм	зародыш	2x x 2x	2x x 4x	4x x 2x	4x x 4x	
6	0	-	-	-	1	1
5	0	-	-	1	2	3
4	0	-	1	2	3	6
3	0	1	2	2	3	8
2	0	2	3	2	3	10
1	0	2	2	2	2	8
0	0	1	1	1	1	4
6	1	-	-	-	2	2
5	1	-	-	2	4	6
4	1	-	2	4	6	12
3	1	2	4	4	6	16
2	1	4	6	4	6	20
1	1	4	4	4	4	16
0	1	2	2	2	2	8
6	2	-	-	-	3	3
5	2	-	-	2	6	8
4	2	-	2	4	9	15
3	2	1	4	4	9	18
2	2	2	6	4	9	21
1	2	2	4	4	6	16
0	2	1	2	2	3	8
6	3	-	-	-	2	2
5	3	-	-	1	4	5

Продолжение таблицы 3

Плоидность компонентов зерновки		Схема скрещивания (♀x ♂)				Сумма
эндосперм	зародыш	2x x 2x	2x x 4x	4x x 2x	4x x 4x	
4	3	-	1	2	6	9
3	3	-	2	2	6	10
2	3	-	3	2	6	11
1	3	-	2	2	4	8

0	3	-	1	1	2	3
6	4	-	-	-	1	1
5	4	-	-	-	2	2
4	4	-	-	-	3	3
3	4	-	-	-	3	3
2	4	-	-	-	3	3
1	4	-	-	-	2	2
0	4	-	-	-	1	1
Итого		24	54	60	155	293

Исследователями выделено множество доминантных генов, контролирующих окраску различных частей растения и зерновок в том числе. Удобнее всего использование сигнальных генов-маркеров, способных проявляться в фенотипе гаплоидных зерновок. Для удобства обнаружения гаплоидов в гаплоиндукторах используются гены окраски зерновки – ACR-nj, обуславливающий сильную пигментацию алейрона и зародыша, хорошо заметную на сухих зерновках (рис. 3). Такие гаплоиндукторы (ЗМК-1, ЗМК-2) в настоящее время синтезированы и используются для получения гаплоидов и стерильных аналогов кукурузы и в Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко [6,7,8].



Рис. 3. Гаплоиндуктор (ЗМК-1) с генетически маркированным алейроном и зародышем

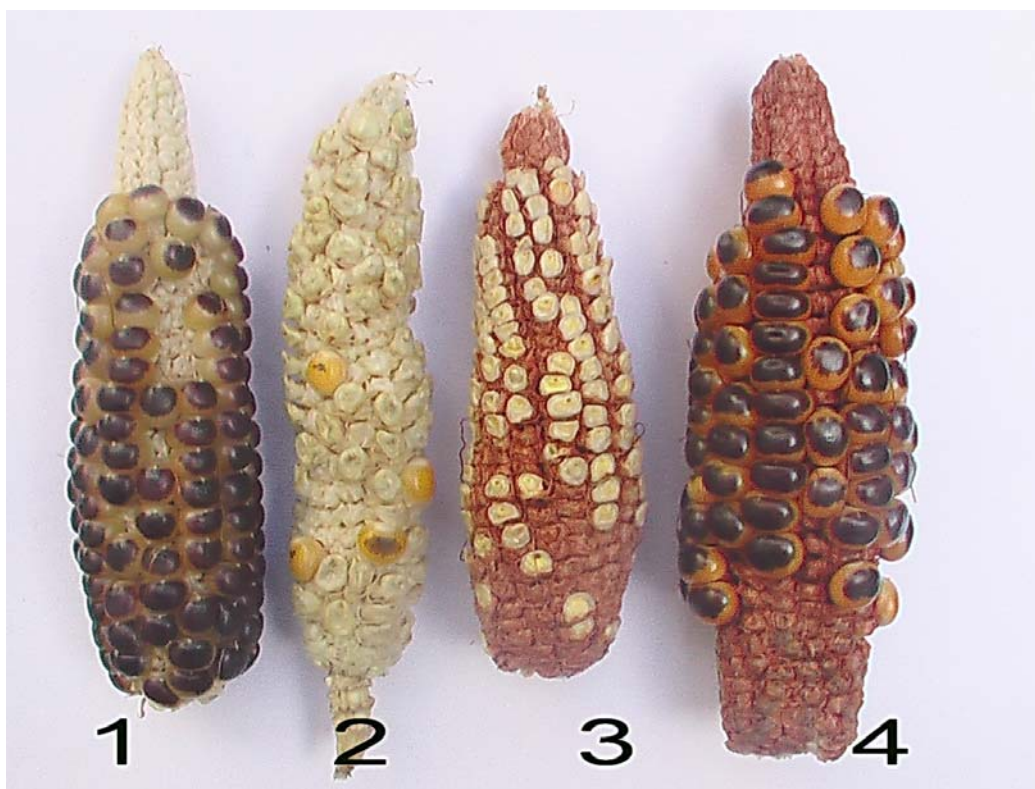


Рис. 4. Початки диплоидного (1) и тетраплоидного (4) гаплоиндукторов и результатов их диаллельных скрещиваний (2 - ♀2x x ♂4x, 3 - ♀4x x ♂2x)

Обсуждение. Использование гаплоиндукторов с *ig*-мутацией в моноплоидных и гетероплоидных скрещиваниях между 2x и 4x кукурузой позволяет получить 293 варианта различных сочетаний ploидности зародыша и эндосперма в зерновке, тогда как при скрещивании без мутации *ig1* оно ограничено 4-мя вариантами. Использование *ig*-мутации позволяет изменять в широких пределах соотношения родительских геномов в гибридных зерновках и состояния аллелей в одном локусе в зародыше и эндосперме зерновки. Разрешение проблемы генетического маркирования состояния аллелей в локусе и ploидности различных компонентов зерновки в гетероплоидных и моноплоидных скрещиваниях позволит получить новые знания о взаимодействии разноploидных компонентов зерновки кукурузы и разработать технологии для его практического применения.

Литература

1. Навашин, С.Г. Избранные труды / С.Г. Навашин.–Т.1.- М.-Л., Изд-во. АН СССР, 1951.– 364с.
2. Chase, S.S.. Monoploid frequencies in a commercial double cross hybrid maize and in its component single cross hybrid and inbred lines.-Genetica.– 1949.–№34: p.328-332.
3. Chase, S.S. Monoploids in maize.-In: Goven J.W. Heterosis Iowa State Coll. Press. 1952a.
4. Chase, S.S. Production of homozygous diploid of maize from monoploids.- Agronomy Journal, –1952b.–№44–p.263-267.
5. Kermicle, J.L. Indeterminate gametophyte (ig): Biology and use. In: The Maise Handbook. M.Freeling and V.Walbot (eds). – New York, Springer-Verlag,- 1994 – p.388-393.
6. Shatskaya, O.A., Zabirowa E.R., Shcherbac V.S.,Chumak M.V. Mass induction of material haploids in corn.- Maize Genetic Cooperetion. News Letter 1994, v68,p.51.
7. Shatskaya, O.A., Zabirowa E.R., Shcherbac V.S. The use of gen ig in sterile counterparts production of corn lines.- Maise Genetic Cooperetion. News Letter.- 1977,-v.71,p.45.
8. Забирова, Э.Р., Технология массового ускоренного получения гомозиготных линий кукурузы/ Э.Р. Забирова, М.В.Чумак, О.А. Шацкая, В.С. Щербак // Кукуруза и сорго.– 1996.– №4.– С.17-19.
9. Павлов, Н.П. Накопление белка в зерне пшеницы и кукурузы/ Н.П. Павлов.– М., 1968.– 136с.