

***ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ДИПЛОИДИЗАЦИИ ГАПЛОИДОВ
КУКУРУЗЫ ПРИ УСКОРЕННОМ ПОЛУЧЕНИИ
ГОМОЗИГОТНЫХ ЛИНИЙ***

В.Ю. Черчель¹, Т.Н. Сатарова², О.С. Мельничук¹, Е.Н. Гарькавая¹

¹ Институт зернового хозяйства УААН,

² Украинский государственный химико-технологический университет

Изучены особенности процесса диплоидизации матроклинных гаплоидов кукурузы, идентифицированных методом генетического маркирования. Исследовано влияние различных концентраций колхицина на выживаемость и образование дигаплоидных растений. Рекомендованы условия диплоидизации, обеспечивающие повышение частоты получения дигаплоидов и дигаплоидных линий.

Кукуруза, гаплоиды, диплоидизация, колхицинирование, дигаплоидные линии

Интенсификация селекционного процесса кукурузы требует ускорения такого важного этапа как получение гомозиготных линий. Традиционный метод их создания путем самоопыления требует длительного времени (6-7 лет) и значительных затрат труда для осуществления инбридинга. В настоящее время в практику селекционной работы с кукурузой широко внедряется альтернативный метод ускоренного получения гомозиготных линий, впервые предложенный С. Chase [6, 7]. Метод основан на выделении в исходной популяции гаплоидных растений, развившихся из неоплодотворенной яйцеклетки (матроклинных гаплоидов), их диплоидизации, самоопылении и получении, таким образом, в течение одного полевого сезона гомозиготных дигаплоидных линий. Технология массового ускоренного получения гомозиготных линий кукурузы с использованием матроклинной гаплоиды была разработана Э.Р. Забировой, М.В. Чумаком, О.А. Шацкой и В.С. Щербаком [2]. Широкое внедрение данного метода в селекционную практику потребовало создания маркерных генотипов-опылителей, которые стимулировали бы яйцеклетку к партеногенетическому развитию и позволяли бы легко и надежно выделять зерновки с гаплоидными зародышами. Пригодными для этой цели оказались

формы кукурузы, содержащие доминантные гены окраски плюмулы зародыша и эндосперма в темно-синий цвет. Усилиями селекционеров Краснодарского института сельского хозяйства имени П.П. Лукьяненко был создан маркерный генотип Зародышевый маркер краснодарский 1 (ЗМК-1) и некоторые другие, позволяющие выделять из различных исходных популяций гаплоиды с частотой до 14% [3]. В настоящее время данная технология широко апробирована в Украине [1, 8], России [2, 3, 10, 12.], Германии [9] и других странах [11].

Наряду с непосредственным применением, в селекционной практике продолжается адаптация предложенной технологии к различным зародышевым плазмам и зонам возделывания кукурузы, создаются новые высокоэффективные маркерные генотипы, расширяются исследования, направленные на повышение выхода гаплоидов и дигаплоидов. Одним из узких мест данной технологии остается низкая эффективность искусственного удвоения числа хромосом у гаплоидов. Поэтому оптимизация техники диплоидизации является на сегодняшний день актуальной задачей.

В технологии массового получения гомозиготных линий по Э.Р. Забировой и др. [2] для удвоения числа хромосом у гаплоидов рекомендуется двукратная обработка проростков в фазе 3-5 листьев раствором колхицина в концентрации 0,125%. Апробация данной техники в Украине, в селекционном питомнике Института зернового хозяйства УААН (Днепропетровск), показала низкую частоту выхода дигаплоидов после применения этой концентрации колхицина. Поэтому целью нашей работы стало совершенствование методики колхицинирования матроклиных гаплоидов кукурузы для повышения выхода дигаплоидов. Мы предположили, что выход дигаплоидов может быть увеличен путем повышения концентрации колхицина при обработке гаплоидов.

Исследования проводились в условиях Опытного хозяйства Института зернового хозяйства УААН в течение 2004-2007 г.г. Исходные популяции в первый год исследований опылялись маркерным генотипом Зародышевый маркер краснодарский 1 (ЗМК-1), любезно предоставленным Краснодарским институтом сельского хозяйства имени П.П. Лукьяненко. После уборки урожая в соответствии с методикой [2] отбирали зерновки с гаплоидным зародышем, которые высевали на следующий год в поле. В фазе 3-5 листьев гаплоидные проростки обрабатывали растворами, содержащими различные концентрации колхицина. Применяли колхицин марки Ascros производства фирмы Fluka, закупленный в год обработки. В состав раствора для диплоидизации входили колхицин в концентрациях от 0 до 0,4% в зависимости от варианта эксперимента, 0,5% агара и 3% диметилсульфоксида. Об-

работку растений раствором для диплоидизации проводили дважды, первый раз утром, с 8.00 до 10.00 часов, второй раз вечером, с 16.00 до 18.00 часов того же дня.

Известно, что гаплоидные растения из-за нарушений в мейозе являются стерильными, в частности, образуют дефектные пыльцевые зерна, тогда как дигаплоидные растения образуют нормальную пыльцу и фертильны [5]. Эту особенность использовали для массовой оценки растений в поле. Так, гаплоидными считали растения с неразвитой метелкой, дефектными пыльниками со стерильной пыльцой, не способные к процессу пыления. Дигаплоидными растениями считали растения, метелки которых содержали нормально развитые пыльники, фертильную пыльцу, и которые нормально пылили.

В процессе выращивания растений оценивали воздействие различных концентраций колхицина на выживаемость растений после обработки и эффективность получения дигаплоидов. Учеты проводили через неделю после обработки, в период цветения и в период уборки. Определяли процентное отношение числа растений, выживших после колхицинирования, к общему числу колхицинированных гаплоидов, а также процентное отношение числа дигаплоидных растений к общему числу колхицинированных гаплоидов и к числу растений, выживших к периоду цветения или уборки. Полученные дигаплоиды самоопыляли. В период уборки подсчитывали частоту дигаплоидных растений, озерненных после самоопыления, к общему числу колхицинированных гаплоидов и к общему числу растений, выживших к периоду уборки.

В первом цикле исследований в 2004 году путем скрещивания с ЗМК-1 были маркированы популяции (ДК633/266-59хДК267-4)F₂, (ДК633/266-112хДК267-4)F₂, ДК377(С2)хДК129, (ДК633/266-112хДК633/266-59)F₂. Выделенные из них гаплоиды высевали в поле в 2005 году и обрабатывали колхицином в концентрациях 0% (контроль), 0,125% и 0,2%.

Во втором цикле исследований в 2005 и 2006 годах проводили маркирование популяций 1 и 2 путем скрещивания с ЗМК-1. Выделенные из них гаплоиды высевали в поле в 2006 и 2007 годах и обрабатывали колхицином в концентрациях 0% (контроль), 0,125%, 0,2%, 0,3% и 0,4%.

Статистическая обработка результатов экспериментов проводилась по Г.Ф.Лакину [4]. Данные в таблицах представлены в виде $\bar{x} \pm m_{0,05}$, где \bar{x} – среднее арифметическое, m – ошибка среднего арифметического, $t_{0,05}$ – критерий Стьюдента при уровне значимости 0,05.

Характеристика процесса колхицинирования и оценка его эффективности в первом цикле исследований в 2004-2005 г.г. проводились на четырех исходных популяциях, принадлежащих к зародышевым плазмам Ланкастер и BSSS. Испытывали концентрацию колхицина 0,125%, предложенную в работе [2], и повышенную концентрацию 0,2%. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1
Результаты колхицинирования гаплоидных растений кукурузы, 2005 г.

Популяция	Концентрация колхицина, %	Число изученных растений	Выживаемость после колхицинирования, %*	Частота дигаплоидных растений, %**
(ДК633/266-59хДК267-4)F ₂	0	98	100	0
	0,125	92	71,7±9,4	9,1±7,1
	0,2	109	49,5±9,6	14,8±9,7
(ДК633/266-112хДК267-4)F ₂	0	60	100	6,4±5,5
	0,125	146	41,1±8,1	15,0±9,2
	0,2	121	44,6±9,0	25,9±11,9
ДК377(C2)хДК129	0	88	51,1±10,7	2,2±4,4
	0,125	134	38,8±8,4	23,1±11,7
	0,2	112	60,7±9,2	14,7±8,6
(ДК633/266-112хДК633/266-59)F ₂	0	98	81,6±7,8	10,0±6,7
	0,125	95	60,0±10,1	10,5±8,1
	0,2	106	66,0±9,5	25,7±10,4

*- процентное отношение числа растений, выживших после колхицинирования, к общему числу колхицинированных гаплоидов (в период цветения); ** - процентное отношение числа дигаплоидных растений к общему числу колхицинированных гаплоидов (в период цветения);

В течение 3-6 дней после колхицинирования наблюдали реакцию в виде утолщения в надземной части у 11,6-43,2% растений после обработки колхицином в концентрации 0,125% и у 32,1-36,7% растений после обработки колхицином в концентрации 0,2%. Таким образом, немедленная реакция на обработку проявлялась менее, чем у половины растений, что свидетельствовало о необходимости увеличения концентрации колхицина для более эффективного воздействия.

Выживаемость растений после колхицинирования – важный признак, который необходимо контролировать, так как слишком сильное воздействие колхицина может привести к гибели растений. В течение недели после обработки проростков диплоидизирующим раствором гибель растений в первом эксперименте не наблюдалась, их выживаемость оставалась на уровне 100%. Снижение выживаемости растений как результат последствия колхицина отчетливо проявилось позже, к периоду цветения. В варианте без обработки в период от всходов до цветения у отдельных популяций происходила определенная потеря гаплоидных растений. Такая естественная гибель является следствием общей сниженной жизнеспособности растений, содержащих в клетках одинарный набор хромосом. Выживаемость колхицинированных растений, изученная на момент цветения, по отношению к неколхицинированному контролю снижалась у всех популяций. С увеличением концентрации от 0,125% до 0,2% этот показатель не изменялся у популяций (ДК633/266-112хДК267-4)F₂ и (ДК633/266-112хДК633/266-59)F₂, снижался у (ДК633/266-59хДК267-4)F₂ и увеличивался у ДК377(C2)хДК129. В целом, у различных популяций выживаемость растений после колхицинирования колебалась в пределах от 40 до 70% и неоднозначно зависела от концентрации колхицина в диплоидизирующем растворе. Динамика развития этого признака имела разнонаправленный характер у различных популяций.

В первом цикле исследований под действием колхицина достоверно большее по сравнению с контролем число дигаплоидов было получено для популяций (ДК633/266-59хДК267-4)F₂, (ДК633/266-112хДК267-4)F₂ и ДК377(C2)хДК129. Для (ДК633/266-59хДК267-4)F₂ достоверной разницы между действием концентраций колхицина 0,125% и 0,2% не наблюдали, хотя отмечена тенденция увеличения числа дигаплоидов при обработке колхицином в концентрации 0,2%. Для (ДК633/266-112хДК267-4)F₂ достоверные отличия от контроля появлялись под действием концентрации колхицина 0,2%. Для ДК377(C2)хДК129 в действии двух изученных концентраций различия не наблюдались. Для (ДК633/266-112хДК633/266-59)F₂ количество дигаплоидных растений при обработке колхицином в концентрации 0,125% было на уровне контроля, для 0,2% - отмечена тенденция усиления эффекта диплоидизации.

Таким образом, обработка гаплоидов колхицином в концентрации 0,2%, то есть более высокой, чем предложенная в работе [2], позволила для одних популяций достоверно увеличить число полученных дигаплоидов, а для других выявить тенденцию к повышению

эффективности колхицинирования. При этом в большинстве изученных популяций с повышением концентрации колхицина в диплоидизирующем растворе практически не снижалась жизнеспособность обработанных растений.

Таблица 2
Результаты колхицинирования гаплоидных растений кукурузы (к периоду цветения), 2006 г.

Концентрация колхицина, %	Число изученных растений	Выживаемость после колхицинирования, %*	Частота дигаплоидных растений, %**	Частота дигаплоидных растений, %***
Популяция 1				
0	72	118,1±10,9	4,2±4,7	3,5±4,0
0,125	119	77,3±7,7	12,6±6,1	16,3±7,7
0,2	96	79,2±8,3	12,5±6,8	15,8±8,4
0,3	112	59,8±9,3	8,9±5,4	14,9±8,7
0,4	124	52,4±9,0	9,7±5,3	18,7±9,7
В среднем	523	71,1±4,0	9,9±2,6	13,5±3,5
Популяция 2				
0	173	100	1,7±2,0	1,7±2,0
0,125	152	100,7±1,3	23,7±6,9	23,5±6,7
0,2	129	89,9±5,3	33,3±8,3	37,1±9,0
0,3	86	103,5±4,1	33,7±10,2	32,6±9,9
0,4	121	56,2±9,0	25,6±7,9	45,6±12,1
В среднем	661	90,6±2,3	21,5±3,2	23,7±3,5

*- процентное отношение числа растений, выживших после колхицинирования, к общему числу колхицинированных гаплоидов;

** - процентное отношение числа дигаплоидных растений к общему числу колхицинированных гаплоидов; *** - процентное отношение числа дигаплоидных растений к общему числу растений, выживших к периоду цветения.

Во втором цикле исследований в 2006-2007 г.г. изучали влияние более высоких концентраций колхицина на эффективность диплоидизации гаплоидов кукурузы. Гаплоиды, выделенные из популяций 1 и 2, обрабатывались колхицином в концентрациях 0%, 0,125%, 0,2%, 0,3%, 0,4%. Результаты наблюдений за состоянием растений в 2006 году представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 3

Результаты колхичинирования гаплоидных растений кукурузы (к периоду уборки), 2006 г.

Концентрация колхицина, %	Число изученных растений	Выживаемость после колхичинирования, % *	Частота озерненных дигаплоидных самоопыленных растений, % **	Частота озерненных дигаплоидных самоопыленных растений, % ***
Популяция 1				
0	72	2,8±3,9	0	0
0,125	119	11,8±5,9	2,5±2,9	21,4±21,9
0,2	96	17,7±7,8	3,1±3,5	17,7±18,5
0,3	112	7,1±4,9	0	0
0,4	124	4,8±3,8	2,4±2,7	50,0±40,8
В среднем	523	9,0±2,5	1,7±1,1	19,1±11,2
Популяция 2				
0	173	50,9±7,6	1,2±1,7	2,3±3,2
0,125	152	36,2±7,8	8,6±4,5	23,6±11,5
0,2	129	33,3±8,3	6,2±4,2	18,6±11,9
0,3	86	40,7±10,6	11,6±6,9	28,6±15,3
0,4	121	20,7±7,4	7,4±4,8	36,0±19,2
В среднем	661	37,2±3,8	6,4±1,9	17,1±4,8

*- процентное отношение числа растений, выживших после колхичинирования, к общему числу колхичинированных гаплоидов;

** - процентное отношение числа дигаплоидных растений, озерненных в результате самоопыления (с 5 и более зернами), к общему числу колхичинированных гаплоидов;

*** - процентное отношение числа дигаплоидных растений, озерненных в результате самоопыления (с 5 и более зернами), к общему числу растений, выживших к периоду уборки.

Как видим, к периоду цветения выживаемость колхичинированных растений у популяции 1 с нарастанием концентрации колхицина постепенно снижалась. Для популяции 2 только при обработке колхицином в концентрации 0,4% происходило существенное снижение числа выживших растений. Небольшое увеличение числа растений на делянке для необработанного контроля у популяции 1 связано с тем, что гаплоиды продолжали всходить и после даты обработки. Частоты

дигаплоидных растений, оцененные в период цветения для популяции 1, достоверно не различались для различных концентраций. Это могло быть связано с небольшим количеством выживших растений, что не позволило сформировать достаточные выборки. Оценка эффективности диплоидизации по отношению к числу колхицинированных гаплоидных растений могла бы рассматриваться как единственный критерий, если бы выживаемость растений при различных концентрациях была бы одинаковой. Поскольку с увеличением концентрации колхицина увеличивается гибель растений и невозможно определить, гибнут ли в большей степени гаплоиды или дигаплоиды, необходимо рассмотреть различия в частотах дигаплоидных растений по отношению к числу колхицинированных растений, выживших к периоду цветения. Так, для популяции 2 в варианте без обработки частота дигаплоидных растений среди выживших к моменту цветения составила 1,7%, что можно считать результатом спонтанной диплоидизации. Обработка колхицином существенно увеличивала число дигаплоидных растений. Наблюдалась тенденция увеличения числа дигаплоидов с увеличением концентрации колхицина до 0,4%, достоверные различия имели место с увеличением концентрации до 0,2% и выше по сравнению с 0,125%.

К уборке количество выживших растений на делянке резко уменьшилось. Причем, в целом по опыту выживаемость растений популяции 1 была значительно ниже, чем в популяции 2, что, видимо, было следствием значительно более низкой выживаемости гаплоидов этой популяции. Так, в популяции 1 в варианте без обработки колхицином число выживших гаплоидов было в 18 раз меньше, чем в популяции 2. Частота дигаплоидных растений, озерненных после самоопыления, (то есть число полученных дигаплоидных линий) была снижена по сравнению с числом дигаплоидов в период цветения, так как у некоторых из них отмечалась препятствующая самоопылению десинхронизация цветения метелки и початка. Частоты дигаплоидных растений, озерненных после самоопыления, по отношению к общему числу колхицинированных гаплоидов для популяции 1 независимо от концентрации достоверно не отличались от нуля.

Для популяции 2 частота озерненных в результате самоопыления дигаплоидных растений в сравнении с общим числом колхицинированных гаплоидов и по отношению к числу растений, выживших к периоду уборки, была достоверно выше на фоне применения колхицина по сравнению с необработанным контролем, однако, достоверные различия в действии той или иной концентрации не установлены из-за малого числа выживающих к уборке растений. Необходимо отметить тенденцию увеличения эффективности диплоидизации с возрастанием концентрации колхицина до 0,3-0,4%.

Эксперимент по колхицинированию гаплоидов, отобранных из популяций 1 и 2, был повторен в 2007 году. В таблице 4 приводятся результаты колхицинирования гаплоидных растений в 2007 году, зарегистрированные в период уборки. Этот год отличался довольно засушливыми условиями в летний период, однако выживаемость гаплоидов и дигаплоидов к моменту уборки была значительно выше, чем в 2006 году. Причем, количество початков, озерненных от самоопыления, то есть количество полученных дигаплоидных линий, было существенно ниже в 2007 году, чем в 2006 году. Причиной этому послужили жесткие условия лета 2007 года которые, обусловили протерандричный тип цветения растений и препятствовали нормальному самоопылению при общем снижении жизнеспособности пыльцы.

Таблица 4
 Результаты колхицинирования гаплоидных растений кукурузы
 (к периоду уборки), 2007 г.

Концентрация колхицина, %	Число изученных растений	Выживаемость после колхицинирования, %*	Частота озерненных дигаплоидных самоопыленных растений, %**	Частота озерненных дигаплоидных самоопыленных растений, %***
Популяция 1				
0	152	58,55±7,99	0	0
0,125	166	74,10±6,80	2,41±2,38	3,25±3,20
0,2	153	77,78±6,72	1,31±1,84	1,68±2,36
0,3	148	64,19±7,88	0,68±1,35	1,05±2,09
В среднем	619	68,66± 3,73	1,10±0,84	1,50±0,26
Популяция 2				
0	83	97,59 ±3,37	0	0
0,125	79	81,01±8,83	1,27±2,52	1,56±2,40
0,2	85	64,71±10,37	0	0
0,3	88	55,68± 10,59	1,14±2,26	2,04±4,04
В среднем	335	74,75±4,75	0,60±0,84	0,9±1,20

*- процентное отношение числа растений, выживших после колхицинирования, к общему числу колхицинированных гаплоидов; ** - процентное отношение числа дигаплоидных растений, озерненных в результате самоопыления (с 5 и более зернами), к общему числу колхицинированных гаплоидов; *** - процентное отношение числа дигаплоидных растений, озерненных в результате самоопыления (с 5 и более зернами), к общему числу растений, выживших к периоду уборки.

В целом отмечено снижение выживаемости растений с увеличением концентрации колхицина и отсутствие существенных различий между концентрациями по количеству озерненных дигаплоидных самоопыленных растений.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют, что выживаемость растений и количество дигаплоидных растений после обработки колхицином зависят от концентрации колхицина, генетических особенностей популяции, а также погодных условий вегетационного периода. После всестороннего анализа полученных результатов для дальнейшей работы по ускоренному получению гомозиготных линий кукурузы с использованием матроклиных гаплоидов следует рекомендовать обработку колхицином в концентрации 0,3%. Эта концентрация приводит к повышению частоты дигаплоидов и дигаплоидных линий, существенно не снижая выживаемость растений.

Список использованных источников

1. *Дзюбецький Б. В.* Прискорення отримання гомозиготних ліній методом генетичного маркування // Б. В. Дзюбецький, В. Ю. Черчель, Т. М. Сатарова // Таврійський науковий вісник. –2004. – №30. – С. 24-31.
2. *Технология* массового ускоренного получения гомозиготных линий кукурузы / Забирова Э. Р., Чумак М. В., Шацкая О. А., Щербак В. С. // Кукуруза и сорго. – 1996. – № 4. – С. 17-19.
3. *Забирова Э. Р.* Эффективность метода гаплоидии при создании элитных линий кукурузы / Э. Р. Забирова, О. А.Шацкая // Генетика, селекция и технология возделывания кукурузы. – Майкоп : РИПО «Адыгя», 1999. – С. 219-226.
4. *Лакин Г. Ф.* Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М. : Высш.шк., 1990. – 352 с.
5. *Тоцький В. М.* Генетика / В. М. Тоцький : в 2-х т. – Одеса : Астропринт, 1998. – 476 с.
6. *Chase S. S.* Monoploids and monoploid derivatives of maize (*Zea mays* L.) / S. S. Chase // Bot. Rev. – 1969. – Vol. 35 – №2. – P.117-168.
7. *Chase S.S.* The monoploid method of developing inbred lines // Proc. 6 Annual Hybrid Corn Industry Research Conf, 1951. – P.29-34
8. *Electrophoretic analysis of progeny of maize matroclinal haploids / Dzubetskiy B. V., Satarova T. N., Cherchel V. Yu., Klyavzo S. P.* // Maize Genet. Coop. Newsletter. – 2004. – Vol.78. – P.15-16.
9. *Eder J.* In vivo haploid induction in maize / J. Eder, S. Chalyyk // Theor. Appl. Genet. – 2002. – Vol.104. – P.703-708.

10. *Enaleeva N. Ch.* Cytological manifestation of apomixes in AT-1 plants of corn / N. Ch. Enaleeva, V. S. Tyrnov // *Maize Genet. Coop. Newsletter.* – 1997. – Vol.71. – P.74-75.
11. *Liu Z.* New maize self-lines bred by stock-6 inducing haploid technique / Z. Liu // *Maize Genet. Coop. Newsletter.* – 1997. – Vol.71. – P. 41-42.
12. *Tyrnov V. S.* Producing of parthenogenetic forms of maize / V. S. Tyrnov // *Maize Genet. Coop. Newsletter.* – 1997. – Vol.71. – P.73-74.

Вивчені особливості процесу диплоїдизації матроклінічних гаплоїдів кукурудзи, ідентифікованих методом генетичного маркування. Досліджено вплив різних концентрацій колхіцину на виживання рослин та утворення дигаплоїдних рослин. Рекомендовані умови диплоїдизації, які забезпечують підвищення частоти одержання дигаплоїдів та дигаплоїдних ліній.

The peculiarities of diploidization process for maize matroclinal haploids, which have been identified by the method of genetic marking were studied. The influence of different concentrations of colchicine on plant viability and dihaploid formation was investigated. The conditions of the diploidization, which provide the increase of the frequency of dihaploids and dihaploid lines formation, are recommended.