УДК 581.1:631.53:633.174

ПОЛУЧЕНИЕ АПОМИКТИЧНЫХ И ГИБРИДНЫХ РАСТЕНИЙ В ДИПЛОИДНО-ТЕТРАПЛОИДНЫХ СКРЕЩИВАНИЯХ У СОРГО

Цветова М.И., Эльконин Л.А., Фадеева И.Ю.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока», Саратов,
e-mail: lelkonin@gmail.com

Впервые показана возможность выявления нередуцированного псевдогамного апомиксиса у диплоидных линий сорго благодаря использованию в качестве опылителей тетраплоидных линий сорго. У двух изученных ЦМС-линий с геномом Желтозерного-10 (Ж10) – А3 Ж10 и 9Е Ж10 при опылении автотетраплоидными линиями АС-1-30-тетра и НТ-3366/2 получены зерновки с гибридным эндоспермом, давшие растения материнского типа. Такие растения были полностью идентичны материнским линиям по высоте, окраске листьев, жилки листа, форме метёлки, остистости, окраске колосковых чешуй и пыльников. Гибридная природа эндосперма зерновок, из которых получены матроклинные растения, доказана с помощью SDS-электрофореза белков эндосперма. Наряду с апомиктичными зерновками в диплоидно-тетраплоидных скрещиваниях были получены нормально сформированные зерновки с диплоидными гибридными зародышами, которые возникли вследствие наличия в пыльце тетраплоидов гаплоидных пыльцевых зерен, образующихся, возможно, вследствие соматической редукции. Полученные результаты свидетельствуют, что использование тетраплоидных опылителей является перспективным подходом для выявления апомиксиса и может быть использовано в работе с разными видами покрытосеменных растений.

Ключевые слова: диплоидно-тетраплоидные скрещивания, эндосперм, псевдогамный апомиксис, сорго

OBTAINING OF APOMICTIC AND HYBRID PLANTS IN DIPLOID-TETRAPLOID CROSSES IN SORGHUM

Tsvetova M.I., Elkonin L.A., Fadeeva I.Yu.

Agricultural Research Institute of the South-East Region, Saratov, e-mail: lelkonin@gmail.com

The possibility of isolation of unreduced pseudogamous apomixis in diploid sorghum lines with usage of tetraploid sorghum line as pollinators was shown for the first time. In two studied CMS-lines with genome of Zheltosernoe 10 (Zh10) – A3 Zh10 and 9E Zh10, pollinated by the pollen of AS-1-30 and NT-3366/2 tetraploid lines, the kernels with hybrid endosperm, which produced maternal-type plants were obtained. These plants were completely identical to maternal lines. They characterized by the same height, leaf and midrib coloration, panicle shape, awns, coloration of glumes and anthers. The hybrid nature of endosperm of the kernels, from which the plants of maternal type had been obtained, was proved by SDS-electrophoresis of endosperm proteins. Alongside with the apomictic kernels in diploid-tetraploid crossings there were obtained normally developed kernels with diploid hybrid embryos, which aroused because of the presence of haploid pollen grains in the pollen of tetraploid lines, which appeared in tetraploids probably due to somatic reduction. These results testify, that the use of tetraploid pollinators is perspective approach for isolation of apomixis, it and may be used in different angiosperms.

Keywords: diploid-tetraploid crosses, endosperm, pseudogamous apomixis, sorghum

У многих видов покрытосеменных существует апомиксис – формирование семян, в которых зародыш образуется из неоплодотворённой яйцеклетки в результате партеногенеза, а эндосперм из оплодотворённых (псевдогамный апомиксис) или неоплодотворённых (автономный апомиксис) полярных ядер зародышевого мешка. Существует точка зрения, что апомиксис может быть полезен для селекции, так как потомство апомиктов полностью сохраняет удачные комбинации генов в ряду поколений [1, 2]. В то же время есть мнение, что апомиксис полностью отсутствует у диплоидных видов [3], а большинство культивируемых видов являются именно диплоидами.

Одним из таких возделываемых видов является сорго (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), у которого с использованием генетических и эмбриологических методов было показано формирование семян на основе апомикси-

са [4–8]. Некоторые из этих работ были позднее подвергнуты критике [3].

Цель данного исследования – выявление нередуцированного апомиксиса у диплоидных линий сорго.

Известно, что у подавляющего большинства видов покрытосеменных растений жизнеспособные семена развиваются при условии, что в эндосперме содержится два набора материнских хромосом и один набор отцовских хромосом (2м:1о). У злаков при нарушении такого соотношения родительских геномов развиваются шуплые зерновки с неразвитым эндоспермом, способные к прорастанию лишь в редких случаях [9]. Однако при опылении нередуцированного зародышевого мешка материнской формы, в котором два диплоидных полярных ядра оплодотворяются диплоидным спермием тетраплоида, возникает гексаплоидный эндосперм со сбалансированным числом

хромосом 2m:1o. Поэтому для выявления у диплоидных линий сорго нередуцированных зародышевых мешков, на основе которых могут формироваться апомиктичные семена, нами было предложено в качестве опылителей использовать тетраплоидные линии. В качестве материнских родителей в этом исследовании было решено использовать диплоидные линии, лишенные собственной фертильной пыльцы (линии со стабильной цитоплазматической мужской стерильностью, ЦМС). Для доказательства участия отцовского генома в формировании эндосперма у семян, развившихся на основе псевдогамного апомиксиса, был использован электрофоретический анализ белков эндосперма, как известно, являющихся надежными генетическими маркерами [10, 11].

Материалы и методы исследования

Растительный материал. В качестве материнских родителей использовали ЦМС-линии зернового сорго (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) 9E Желтозёрное-10 (Ж10) и АЗ Ж10, несущие разные типы стерильных цитоплазм: 9E и АЗ соответственно. Проростки этих линий лишены антоциановой окраски. В качестве пыльцевых родителей использовали автотетраплоидные линии АС-1-30-тетра (АСТ) – тетраплоидная линия, полученная на основе линии АС-1, происходящей от регенеранта из культуры тканей, и НТ-3366/2 (НТ) – автотетраплоидная линия, индуцированная колхицином у образца Негритянское кремово-бурое к-3366/2. Проростки этих отцовских линий обладают интенсивной антоциановой окраской. Метелки материнских растений, участвовавших в скрещиваниях, тщательно изолировали до цветения и опыляли по достижении цветения нижнего яруса. Контролем служили изолированные неопылённые метелки. У полученных зерновок отделяли часть эндосперма для электрофоретического анализа спектров запасных белков, а другую часть зерновки с зародышем помещали для прорастания на влажную фильтровальную бумагу. Полученные проростки высаживали в вегетационные сосуды, а после укоренения растения переносили в поле.

Цитологический анализ. Для определения плоидности полученных проростков фиксировали кончики корешков в ацетоалкоголе (1:3) и окрашивали в 4% ацетогематоксилине после проведения через серию растворов в следующей последовательности: соляная кислота 3,6% (1N) – 10 мин.; соляная кислота 50% – 20 мин.; дистиллированная вода – 1–2 мин.; уксусная кислота 45% – 20 мин.; ацетогематоксин 4% – 30–60 мин.; дистиллированная вода – 1–2 мин.; смесь мацерирующих ферментов цитаза – 1,5 часа. Временные препараты готовили с использованием смеси 45% уксусной кислоты и 70% хлорал-гидрата (1:1), подкрашенной ацетогематоксилином.

Анализ запасных белков эндосперма семян. Белки эндосперма семян анализировали методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Острым инструментом отделяли часть эндосперма. Опыт показал, что одинаковые результаты получают при использовании как сухих, так и замоченных (не более чем на 24 часа) зерновок. Электрофорез

в ПААГ проводили в денатурирующих условиях по методу Лэммли. К образцам измельченных эндоспермов добавляли равный объем буфера следующего состава: 0,125 M трис·HCl (pH 6,8), 4% SDS (додецилсульфат натрия), 20% глицерин, 0,05% 2-меркаптоэтанол. Образцы прогревали на кипящей водяной бане (5 мин), после чего вносили в лунки с 4% концентрирующим гелем. Разделяющий гель содержал 12,5% раствор акриламида. Электрофорез проводили при постоянном напряжении 70 В. Гели окрашивали раствором нитрата серебра. Для этого гели выдерживали в растворе тиосульфата натрия (0,2 г/л, 1 мин); промывали водой 3 раза по 20 сек. и оставляли на 20 минут в 0,2%-ном растворе нитрата серебра с добавлением формалина (750 мкл/л). Затем гели промывали водой 2 раза по 20 сек. и проявляли в растворе следующего состава: 6 г карбоната натрия, 50 мкл формалина, 0,4 мг тиосульфата натрия в 100 мл раствора.

Статистическую обработку данных проводили путем сравнения долей по методу Фишера, применяемому для малых, а также неравновеликих выборок [12].

Результаты исследования и их обсуждение

ЦМС-линии, использованные в данной работе, отличались стабильностью в течение ряда лет. Однако в некоторых случаях на изолированных неопылённых метёлках отмечали одиночные зерновки. В дальнейшем из них развивались диплоидные мужские-стерильные растения материнского типа.

При опылении метёлок ЦМС-линий пыльцой тетраплоидов число метёлок, на которых завязались семена, статистически значимо возросло; наблюдались метёлки, на которых завязалось от 10 до 70 зерновок, что никогда не наблюдалось в контроле (табл. 1).

Анализ потомства, полученного от опыления диплоидных ЦМС-линий пыльцой тетраплоидов, выявил гибридные и матроклинные (фенотипически полностью сходные с материнским родителем) диплоидные растения (табл. 2). Матроклинные растения были полностью идентичны материнской линии по высоте, окраске листьев, жилки листа, форме метёлки, остистости, окраске колосковых чешуй и пыльников (у ЦМС-линий, включённых в эксперимент, пыльники внешне не отличаются от фертильного аналога, но не растрескиваются при цветении).

Зерновки с гибридным диплоидным зародышем возникают в таких скрещиваниях за счёт гаплоидных пыльцевых зёрен, которые, как это было показано ранее, регулярно образуются у некоторых автотетраплоидных линий сорго, возможно, за счёт соматической редукции [13]. В пыльце тетраплоидов, использованных в нашем эксперименте, содержались пыльцевые зёрна, размер которых соответствует гаплоидным пыльцевым зёрнам, что подтверждает сделанное предположение.

Таблица 1

Результаты опыления ЦМС-линий сорго пыльцой тетраплоидов

Комбинация скрещивания	Число проанализированных метёлок	Число метёлок с выполненными зерновками				
		всего	1–5 ²	6–15	16–30	≥ 30
АЗ Ж10, контроль	23	2 (8,7%) ¹	2	–	–	–
АЗ Ж10 × НТ	19	3 (15,8%)	3	–	–	–
АЗ Ж10 × АСТ	4	2 (50,0%)**	2	–	–	–
9Е Ж10, контроль	49	9 (18,4%)	9	–	–	–
9Е Ж10 × НТ	17	7 (41,2%)*	47	–	3	1
9Е Ж10 × АСТ	8	8 (100,0%)*	2	2	2	2

Примечание. ¹ процентное отношение к числу опылённых метёлок; ² число зерновок на метёлке; *, **, *** $P \geq 0,95$, $P \geq 0,99$, $P \geq 0,999$, по сравнению с контролем (неопылёнными метёлками), в соответствии с *F*-критерием.

Таблица 2

Характеристика потомства, полученного при диплоидно-тетраплоидных скрещиваниях у сорго

Комбинация скрещивания	Число диплоидных растений		
	всего	матроклинных	гибридных
9Е Желтозерное 10 × НТ	51	49 (96,1) ¹	2
9Е Желтозерное 10 × АС-тетра	57	24 (42,1)	33
АЗ Желтозерное 10 × АС-тетра	3	1 (33,3)	2

Примечание. ¹ процентное отношение к числу опылённых метёлок.

Матроклинные растения в таких скрещиваниях могли возникнуть а) за счет спонтанного восстановления фертильности в отдельных цветках метёлки; б) за счёт автономного апомиксиса; в) за счет псевдогамии (формирования семени, в котором зародыш образуется путём партеногенеза неоплодотворённой яйцеклетки, а эндосперм – в результате оплодотворения центральной клетки зародышевого мешка). При опылении нередуцированного зародышевого мешка материнской формы, в котором два диплоидных полярных ядра оплодотворяются диплоидным спермием тетраплоида, возникает гексаплоидный эндосперм со сбалансированным числом хромосом 2м:1о.

Анализ генетической природы эндосперма дает возможность уточнить его происхождение. Для этой цели использовали электрофоретический анализ спектров запасных белков, которые у злаков являются четкими генетическими маркерами [10, 11]. Наличие в эндосперме белков, свойственных исключительно материнской форме, свидетельствует об его образовании за счет самоопыления либо автономного развития. Выявление в эндосперме белков, свойственных отцовской форме, или появление новых белков в результате взаимодействия родительских генов в гетерозиготе свидетельствует о гибридной природе эндосперма.

В наших исследованиях в электрофоретических спектрах зерновок, завязавшихся в диплоидно-тетраплоидных скрещиваниях, из которых развились матроклинные растения, были выявлены белки, характерные для отцовского родителя, но отсутствовавшие у материнской линии, а также белки, отсутствовавшие у обоих родителей, что указывало на гибридную природу эндосперма этих зерновок и свидетельствовало об их происхождении путем псевдогамного апомиксиса. На рисунке представлены результаты SDS-электрофореза белков эндосперма материнской ЦМС-линии 9Е Желтозерное 10 (1 трек), тетраплоидной линии-опылителя НТ (4 трек) и семян, из которых развились растения материнского типа, завязавшихся на метелке ЦМС-линии 9Е Желтозерное 10, опыленной пыльцой линии НТ (треки 2, 3). Результаты электрофореза наглядно демонстрируют, что в эндосперме зерновки, из которой получено растение материнского типа (трек 2), присутствуют полипептиды, отличающие его от эндосперма материнской ЦМС-линии и указывающие тем самым на его гибридное происхождение. В то же время электрофоретический спектр белков эндосперма другой зерновки, давшей растение материнского типа (трек 3), соответствовал спектру белков материнской ЦМС-линии.

Электрофореграмма запасных белков эндосперма зерновок сорго: 1 – 9Е Желтозёрное-10; 2, 3 – зерновки, завязавшиеся от скрещивания 9Е Желтозёрное-10 x НТ-3366/2; 4 – НТ-3366/2; М – маркеры молекулярной массы. Стрелкой отмечены белки, не свойственные материнской линии

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что у некоторых зерновок, давших растения материнского типа, эндосперм образовался в результате оплодотворения центральных ядер зародышевых мешков, что свидетельствует о формировании этих зерновок путем псевдогамного апомиксиса. Развитие других зерновок, давших растения материнского типа, у которых электрофоретические спектры белков эндосперма были идентичны материнской линии, могло произойти на основе автономного апомиксиса. Ранее у линии сорго АС-1а при эмбриологическом исследовании выявлены апоспорические зародышевые мешки и автономные зародыши. При опылении этой линии пылью диплоидной линии Волжское-4 восковидное, гомозиготной по генам *Rs*, обуславливающим пурпурную окраску колеоптиля и первого листа проростков, были получены растения материнского типа. Примечательно, что в некоторых скрещиваниях частота таких растений соответствовала частоте цитологически выявленных автономных зародышей или апоспорических зародышевых мешков [8].

Интересно отметить, что ранее предположки апомиксиса были выявлены у фертильной линии сорго Желтозёрное 10, стерильные аналоги которой использовали в данных экспериментах. Так, у этой линии

выявлена относительно высокая частота полиэмбрионии [14]. При этом у некоторых диплоидно-диплоидных двоен близнецовые проростки были расположены под углом 90 или 180° по отношению друг к другу, что в литературе трактуется как признак апомиксиса [15]. Результаты данного исследования показывают, что способность к апомиктичному развитию семян сохранилась при переносе генома этой линии на цитоплазмы, индуцирующие мужскую стерильность.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о наличии апомиксиса у диплоидных линий сорго. Использование тетраплоидных опылителей является перспективным подходом для выявления апомиксиса и может быть использовано в работе с разными видами покрытосеменных растений.

Список литературы

1. Naumova T.N. Apomixis and amphymixis in flowering plants // Cytology and Genetics. – 2008. – vol. 42. – P. 179–188.
2. Barcaccia G, Albertini E. Apomixis in plant reproduction: a novel perspective on an old dilemma // Plant Reprod. – 2013. – vol. 26. – P. 159–179.
3. Соколов В.А. Существует ли гаметофитный апомиксис у диплоидных цветковых растений? / В.А. Соколов, П.А. Панихин, Т.К. Тараканова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – т. 1. – С. 80–101.
4. Hanna W.W., Schertz K.F., Bashaw E.C. Apospory in Sorghum bicolor (L) Moench. Science. – 1970. – vol. 170. – P. 338–339.
5. Murty U.R. Appraisal on the present status of research on apomixes in sorghum. Curr. Sci. – 1993. – vol. 64. – P. 315–318.
6. Wu Shu-biao et al. Embryological study on apomixis in a sorghum line SSA-1. Acta Bot. Sinica. – 1994. – vol. 36. – P. 833–837.
7. Ping J.-A. et al. A study on the properties of autonomous seed setting and embryology in sorghum apomictic line. Acta agron. sinica. – 2004. – vol. 30. – P. 714–718.
8. Эльконин Л.А. Проявление апомиктичных потенций и отбор на апомиксис в линии сорго АС-1а / Л.А. Эльконин, Е.В. Беляева, И.Ю. Фадеева // Генетика. – 2012. – Т. 48. – С. 40–49.
9. Birchler J.A. Interploidy hybridization barrier of endosperm as a dosage interaction // Front. Plant Sci. – 2014. – no. 5. – P. 281.
10. Панин В.М. Глиадины как генетические маркеры в генетике и селекции озимой твердой пшеницы / В.М. Панин // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 3. URL: <http://www.science-education.ru/97-4680>.
11. Поморцев А.А., Лялина Е.В. Оценка сортовой принадлежности и сортовой чистоты семян ячменя методом электрофоретического анализа запасных белков зерна. – М.: «Цифровичок», 2011. – 87 с.
12. Зайцев Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике / Г.Н. Зайцев. – М.: Наука, 1990. – 295 с.
13. Цветова М.И. Нестабильность уровня плоидности у аутотетраплоидов линии сорго с вариабельной мужской стерильностью / М.И. Цветова, Л.А. Эльконин // Генетика. – 2002. – т. 38. – С. 1–5.
14. Tsvetova M.I. Investigation of polyembryony in sorghum in connection with induced polyploidy and apomixis. Apomixis Newsletter. – 1994. – no. 7. – P. 36–38.
15. Tan Zhijun, Huang Yiolung, Deng Hongde. Study on embryo location and seedlings of polyembryonic rice (Oryza sativa L.). Apomixis Newsletter. – 1982. – no. 4. – P. 41–42.