

Министерство образования и науки Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра генетики

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЫЛЬЦЫ У  
ТЕТРАПЛОИДНЫХ ФОРМ КУКУРУЗЫ  
АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ**

студента 4 курса 422 группы


направление подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

биологического факультета

Джалилова Эльдара Хандадаш Оглы

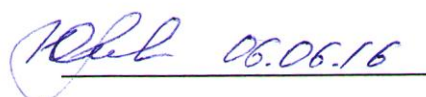
Научный руководитель

к. б. н., доцент

 Л.П. Лобанова

Зав. кафедрой генетики,

д. б. н., доцент

 О.И. Юдакова

Саратов 2016

**Введение.** Система полового размножения растений служит для передачи генетической информации в ряду поколений. В зависимости от структурно-функциональной организации ее элементов и характера их взаимодействия, качественные характеристики передаваемой потомству информации могут варьировать. Это означает, что, индуцируя мутации, в том числе геномные, изменяющие параметры системы размножения, можно получать формы с заданными генетическими характеристиками. Поэтому экспериментальное получение полиплоидов имеет важное научное и прикладное значение.

Получение полиплоидных форм является одним из важных направлений в селекции многих культур, в том числе селекции кукурузы. В результате увеличения числа хромосом, меняется выраженность признаков, характер наследования признаков, пластичность формы, ее адаптационные возможности. Полиплоиды также часто обладают большой вегетативной массой, крупными размерами семян, повышенной урожайностью.

Актуальность изучения развития и строения пыльцы у полиплоидных растений обусловлена рядом причин. Во-первых, такие исследования позволяют выявить цитогенетическую причину мужской стерильности полиплоидов. Во-вторых, определить зависимость микроспорогенеза и микрогаметогенеза от числа наборов хромосом. В-третьих, служат основой для селекционного отбора по цитогенетическим признакам у экспериментально созданных тетраплоидов культурных растений.

Пыльцевой анализ позволяет определять репродуктивный потенциал растений по характерным морфологическим особенностям пыльцевых зёрен: клеточному строению, размеру, рисунку экзины, их фертильности и жизнеспособности. Все эти характеристики очень важны при проведении селекционных работ с целью получения продуктивного потомства. Пыльцевой анализ является обязательным при оценке фертильности полиплоидных растений, в том числе кукурузы.

Целью данной работы явилось изучение строения зрелой пыльцы и ее морфометрических характеристик у диплоидной и тетраплоидных форм кукурузы Краснодарской селекции.

Для достижения данной цели были поставлены и решены следующие задачи:

- 1) определение степени дефектности пыльцы;
- 2) изучение особенностей строения зрелых пыльцевых зерен;
- 3) определение изменчивости размеров выполненной пыльцы.

Объектом исследования послужили растения кукурузы (*Zea mays* L.), которая является культурным, однолетним злаком и относится к классу однодольных (Monocotyledones, или Liliopsida), порядку злаков (Poales), семеству злаков (Poaceae), роду *Zea*, виду *Zea mays* L.

Материалом исследования послужила пыльца двух тетраплоидных форм кукурузы КрП-1 и КрП-4, которые были получены в Краснодарском научно – исследовательском институте сельского хозяйства. Контролем послужила пыльца диплоидной линии краснодарской селекции Кр-440. Для определения СДП (степени дефектности пыльцы) смесь пыльцы из фиксатора пипеткой переносили на предметное стекло в каплю ацетокармина и препаповальной иглой перемешивали. Каплю закрывали покровным стеклом и анализировали с помощью микроскопа «Primo Star» при увеличении 10×40. Измерение диаметра ПЗ проводили с помощью программного обеспечения «Axiovision». Анализ строения ПЗ проводили на временных препаратах, приготовленных по стандартной методике, которая включала окраску ацетокармином. Статистическую обработку проводили в соответствии с общепринятыми методами и использованием программы Statistica 6.

Бакалаврская работа состоит из следующих глав: введение, обзор литературы, материал и методы исследования, результаты исследования, заключение, выводы и список использованных источников.

**Основное содержание работы.** Качество пыльцы считается основным критерием при оценке фертильности растений и тесно связано с плодовитостью растений. У всех исследованных тетраплоидных растений степень дефектности пыльцы оказалась высокой (таблица 1) и в среднем у разных тетраплоидных форм составила 30, 35 и 47 %. У КрП-1 отмечена зависимость СДП от года фиксации пыльцы (разница составляет около 17 %) и генотипа.

Таблица 1 – Степень дефектности пыльцы у тетраплоидных растений кукурузы

Вариант, пloidность	№ растения	Число проанализированных ПЗ, шт.	ПЗ, %				СДП, %
			выполненные			дегенерирующие+пустые	
			мелкие	средние	крупные		
Кр-440, 2015 г., 2n	1	530	1,2	95,4	0,4	3,0	4,6
	2	480	0,5	94,0	0,0	5,5	6,0
	3	300	0,8	95,9	0,2	3,1	4,1
	4	520	1,4	94,6	0,0	4,0	5,4
	среднее			1,0	95,0	0,1	3,9
КрП-1, 2009 г., 4n	1	1323	6,4	80,8	6,4	6,5	19,2
	2	1014	11,6	61,1	6,1	21,2	38,9
	3	1000	17,1	66,7	11,4	12,9	33,3
	среднее			11,7	70,0	8,0	13,5
КрП-1, 2015 г., 4n	1	1023	12,2	55,7	10,7	21,4	44,3
	2	869	18,1	57,7	5,9	18,3	42,3
	3	625	16,9	58,5	13,7	10,9	41,5
	4	1000	20,9	53,1	11,5	14,5	46,9
	среднее			17,0	56,2	10,5	16,2
КрП-4, 2015 г., 4n	1	928	10,1	69,4	3,9	16,6	30,6
	2	1150	14,6	61,1	6,2	18,1	39,0
	3	1038	9,9	65,6	6,6	17,9	34,5
	среднее			11,5	65,3	5,5	17,5

Примечание: \* - различия с диплоидной линией достоверны на уровне значимости 0,01  
 \*\* - различия с диплоидной линией достоверны на уровне значимости 0,001

В 2015 г., то есть при совершенно одинаковых условиях произрастания, у тетраплоида КрП-4 СДП пыльцы была в среднем на 10 % ниже, чем у тетраплоида КрП -1. Следует отметить, что вариабельность пыльцы по размеру достаточно значительна и поэтому визуальная оценка размера пыльцы не вызывала затруднений. Обнаружено, что основная доля

дефектной пыльцы представлена выполненной пылью мелкого или крупного размера. Только в варианте № 2 хорошо представлен класс плазмолизированной пыльцы (см. таблица 1).

Во всех исследованных вариантах доминируют выполненные ПЗ. И хотя вероятность выше, что выполненные мелкие и крупные ПЗ имеют иной, чем в норме, уровень ploидности, они могут участвовать в оплодотворении. Поэтому все выполненные и хорошо окрашенные ПЗ были отнесены к «условно фертильным». По количеству выполненной пыльцы все тетраплоидные растения достоверно отличаются от диплоидных. Количество выполненной пыльцы у тетраплоидов варьирует от 79 до 89 % (рисунок 1).

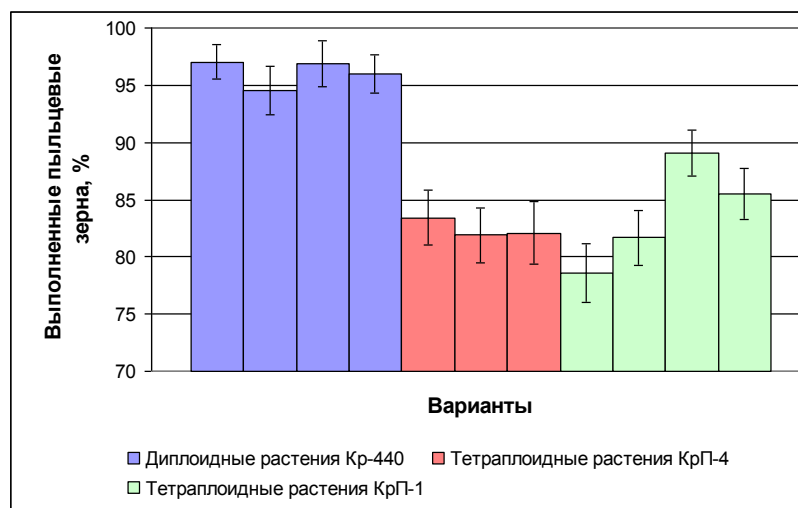


Рисунок 1 – Частота выполненных пыльцевых зерен у растений разной ploидности

Сравнение данных по строению пыльцы разных вариантов показало, что максимальное количество ПЗ аномального строения встречается у тетраплоида КрП-1 и достигает 10 % (рисунок 2). Причем количество аномальной пыльцы у данного тетраплоида было практически одинаковым в разные годы. У тетраплоида КрП-4 и диплоида Кр-440 аномальной пыльцы в 2 раза меньше. Между собой растения тетраплоидной формы КрП-1 имели недостоверные различия, что указывает, вероятно, на их выравнивание по этому признаку (рисунок 3).

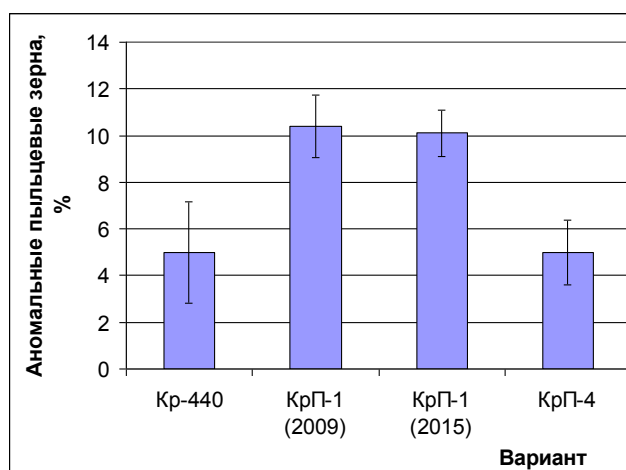


Рисунок 2 – Частота пыльцевых зерен аномального строения в вариантах разной ploидности

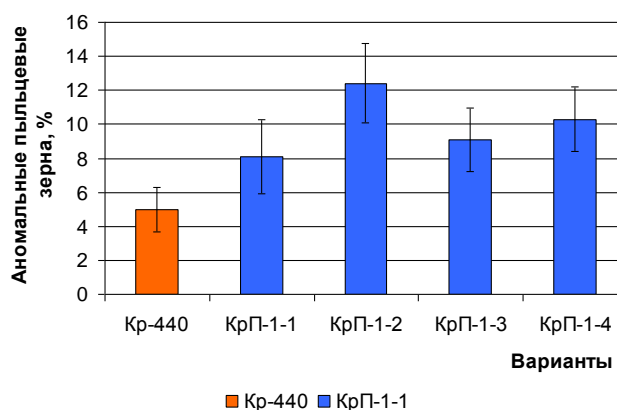


Рисунок 3 – Частота аномальных пыльцевых зерен в выборке растений тетраплоидной кукурузы КрП-1

Анализ клеточной организации пыльцы разных вариантов показал, что аномалии представлены двумя основными типами: изменением числа ядер и клеток и образованием ПЗ нетипичной формы. Однако последний класс ПЗ с атипичной формой встречается только у тетраплоида КрП-1. У диплоидных растений и тетраплоидных КрП-4 последний класс ПЗ отсутствовал.

Частота разных типов аномальных ПЗ в разноploидных вариантах представлена в таблице 2, а спектр обнаруженных аномалии на рисунке 4. Количество пыльцы аномального строения у диплоидных растений Кр-440 варьировало от 2,9 до 7,6 %. Большинство аномалий было представлено пыльцой, содержащей одно или два ядра вегетативного типа. Это указывает

на остановку развития и подавление митотических делений в микрогаметогенезе. У трех из четырех растений встречались ПЗ с дополнительными спермиями или чаще с фрагментацией спермиев. Именно диплоидная линия содержала максимальное количество ПЗ (3,2 %) с дополнительными спермиями или с их фрагментацией.

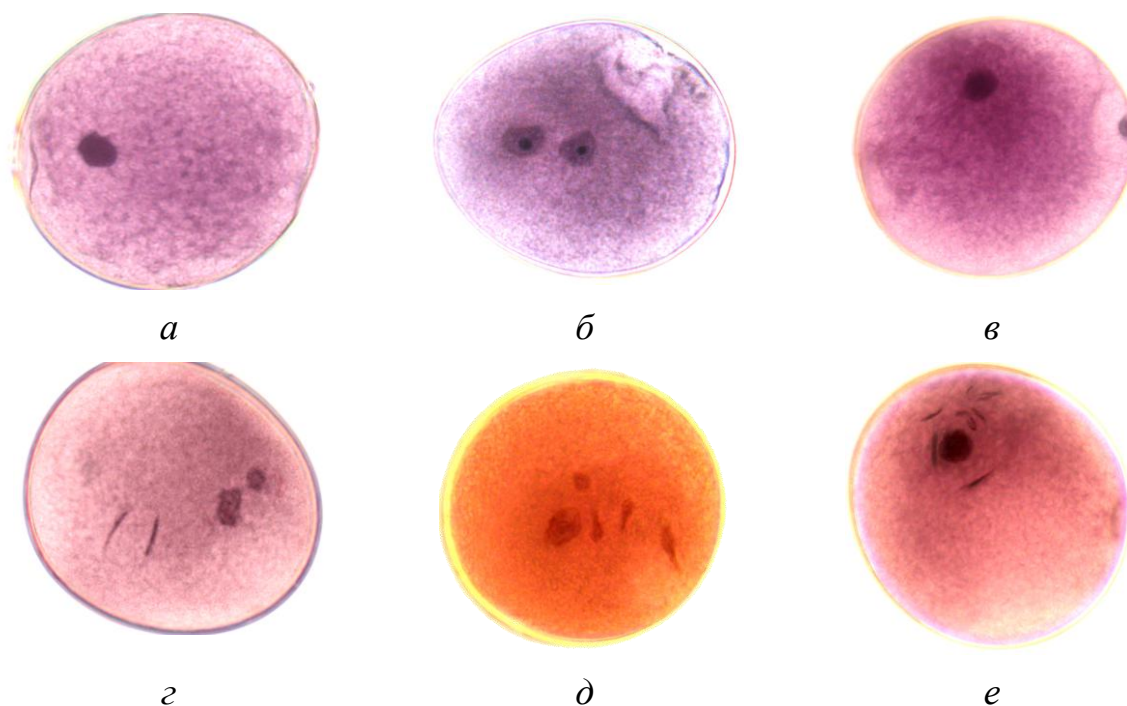
Таблица 2 – Результаты анализа выполненной пыльцы у диплоидных и тетраплоидных растений кукурузы

Вариант, плоидность	№ растения	ПЗ нормального строения, %	Количество ПЗ, %						ПЗ с атипичной формой
			с измененным числом ядер и клеток						
			всего	1-ядерных	2-ядерных с 2 ВЯ	1ВЯ и 1ГЯ	с 2ВЯ и 2СП	с 1ВЯ и 3-4 СП	
Кр-440, 2015 г., 2n	1	97,0	3,0	2,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0
	2	94,0	6,0	1,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0
	3	97,1	2,9	1,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	92,4	7,6	0,9	0,0	0,0	0,0	6,7	0,0
	среднее	95,0	5,0	1,3	0,5	0,0	0,0	3,2	0,0
КрП-1, 2009 г., 4n	1	90,6	9,4	2,5	3,2	2,1	1,3	0,3	1,0
	2	91,9	8,1	2,2	2,8	0,8	2,0	1,3	0,5
	3	90,0	10,0	1,9	3,4	2,2	1,7	0,8	2,1
	среднее	91,8	9,2*	2,2	3,2	1,7	1,7	0,8	1,2
КрП-1, 2015 г., 4n	1	92,8	6,2	0,8	1,4	0,0	2,1	1,8	1,9
	5	90,7	11,3	2,7	2,6	2,6	2,1	1,3	1,1
	6	91,4	7,6	2,1	2,0	1,5	1,0	1,0	1,5
	7	92,1	7,9	2,9	1,9	1,8	0,9	0,4	2,4
	среднее	91,7	8,3*	2,4	2,0	1,3	1,6	1,2	1,7
КрП-4, 2015 г., 4n	1	94,1	5,9	1,4	1,4	0,1	2,1	0,9	0,0
	2	95,0	5,0	0,2	0,0	0,0	1,9	2,9	0,0
	3	95,7	4,3	1,5	0,8	0,0	1,7	0,3	0,0
	среднее	95,0	5,0	1,0	0,8	0,0	1,8	1,4	0,0

Примечание: \* различия с диплоидной линией достоверны на уровне значимости 0,05

У тетраплоидных растений КрП-4 общее количество аномалий сравнимо с данными, полученными для диплоидных растений. Однако, спектр отклонений в строении пыльцы шире: появляются ПЗ с остановкой развития на стадии хорошо сформированного генеративного ядра, а также ПЗ

с дополнительными вегетативными ядрами. С частотой 0,8 % встречались ПЗ с 3-4 дополнительными спермиями.



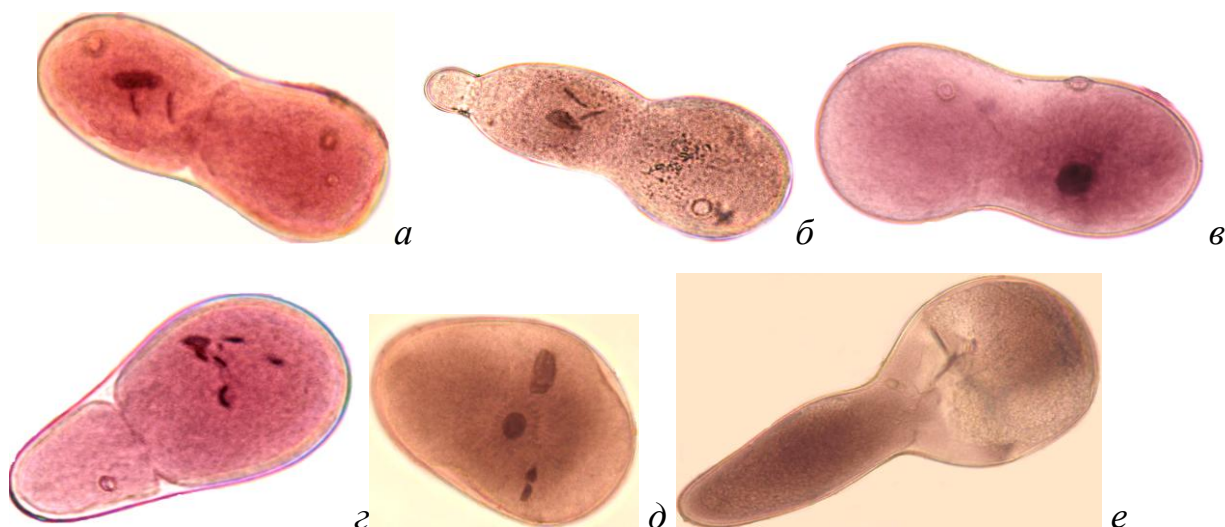
*a* – одноядерное; *б* – с двумя ядрами вегетативного типа; *в* – с вегетативным и генеративным ядром; *г* – с двумя вегетативными ядрами и двумя спермиями; *д* – с дополнительными спермиями; *е* – с фрагментацией спермиев

Рисунок 4 – Пыльцевые зерна аномального строения. Увеличение  $\times 400$

Только у тетраплоидных растений КрП-1 встречались крупные пыльцевые зерна неправильной формы: овальные, каплевидные, гантелевидные и более сложной формы (рисунок 5). Пыльцевые зерна атипичной формы зарегистрированы в материале разных лет фиксации и в среднем их количество составляет 1,2 % (2009 г.) и 1,7 % (2015 г.). ПЗ атипичной формы обычно содержали одно вегетативное ядро и два спермия. Однако при этом ядра и клетки ПЗ могли иметь совершенно различное взаимное расположение и быть сосредоточены как на одном полюсе, так и на разных. Реже встречались ПЗ атипичной формы безъядерные, одноядерные,



с двумя вегетативными ядрами и двумя спермиями, с дополнительными спермиями (таблица 3).



*a, б* – с одним вегетативным ядром и двумя спермиями; *в* – одноядерное; *г* – с 4-мя спермиями; *д* – с двумя вегетативными и двумя спермиями; *е* – безъядерное

Рисунок 5 – Пыльцевые зерна атипичной формы. Увеличение × 400

Таблица 3 – Соотношение пыльцевых зерен атипичной формы у тетраплоидных растений КрП -1 в 2015 г.

№ растения	Количество пыльцевых зерен атипичной формы, %					
	всего	1ВЯ+2СП	1-2 ядрами	3-4 ядрами	1ВЯ+3-4 СП	1ВЯ+2-4 СП
1	1,90*	1,51	0,00	0,00	0,00	0,39
2	1,42*	1,00	0,05	0,10	0,07	0,20
3	2,56*	2,31	0,11	0,50	0,09	0,00
4	2,49*	1,83	0,41	0,00	0,00	0,25

Примечание: \* различия между растениями не достоверны

Важным критерием при оценке качества пыльцы является ее размер. Показано, что увеличение ploidy приводит к некоторому увеличению диаметра пыльцевых зерен. У тетраплоидных растений размеры пыльцы варьировали в больших пределах, чем у диплоидных. Это отражено значениями минимальных и максимальных размеров ПЗ и значениями

коэффициента вариации (таблица 4). Коэффициенты вариации у растений линии Кр-440 и КрП-1 были небольшими (7-10 %). Это позволяет говорить о незначительной изменчивости различных растений по диаметру пыльцы в данных вариантах. Только в варианте КрП-4 он был немного выше и равнялся почти 13 %. В пыльниках растений этого варианта визуально довольно легко выделялись три типа пыльцы: мелкая, средняя и крупная.

Таблица 4 – Результаты морфометрического анализа пыльцевых зерен у диплоидных и тетраплоидных растений кукурузы

Вариант	Число растений	Число пыльцевых зерен	Диаметр пыльцевых зерен, мкм		Коэффициент вариации (v), %
			$\bar{x} \pm m$	lim	
Кр-440, 2n	4	424	92,9 ± 0,5*	73,6 – 124,8	7,8
КрП-4, 4n	3	340	105,2 ± 0,5*	70,1 – 156,4	12,6
КрП-1, 4n	4	804	104,0 ± 0,5*	65,2 – 143,2	9,8

Примечание: \* различия между вариантами недостоверны

**Заключение.** Проведенное исследование качества пыльцы в потомстве разных растений тетраплоидных форм кукурузы показало невысокую и статистически недостоверную изменчивость растений разных вариантов по данному признаку. Это свидетельствует о достаточно высокой стабильности изученных тетраплоидных форм, которые длительное время подвергались отбору на повышение фертильности. Однако анализ качества пыльцы у тетраплоидных форм кукурузы обнаружил ряд отклонений в развитии и структуре зрелых ПЗ не встречающихся у диплоидной линии. У растений КрП-1 также были обнаружены специфические аномалии, не зарегистрированные в других исследованных вариантах. Это пыльцевые зерна атипичной формы. Не исключено, что исследованная тетраплоидная форма является уникальным материалом для исследования развития пыльцы и может пополнить генетическую коллекцию эмбриологических мутаций.

Различия с диплоидной линией по качественным признакам пыльцы носят принципиальный характер и указывают на специфику и даже

---

уникальность ряда характеристик пыльцы тетраплоидов, которые следует учитывать как в селекционном процессе, так и изучении онтогенеза пыльцы. Зарегистрированная полиспермия и фрагментация спермиев у диплоидной линии также представляет несомненный интерес и может использоваться в селекционных программах по созданию генетически разнообразного исходного материала. По результатам исследования были сделаны следующие выводы.

1. Максимальная дегенерация пыльцы характерна для тетраплоидных вариантов и составляет 16-17%. В диплоидном варианте она значительно ниже и составляет около 4 %.

2. Наибольшая частота пыльцевых зерен аномального строения зарегистрирована у растений тетраплоидной формы КрП-1 (в среднем 10 %). Аномалии строения были представлены двумя основными типами: изменением числа клеточных элементов и атипичной формой ПЗ. Пыльцевые зерна атипичной формы обнаружены только у растений КрП-1.

3. Нарушения структуры пыльцы проявляются в уменьшении или увеличении числа ядер и клеток. У диплоидной линии Кр-440 зарегистрирована тенденция к образованию пыльцевых зерен с дополнительными спермиями и с фрагментацией спермиев.

4. Изменчивость между растениями в разноплоидных вариантах по диаметру пыльцы незначительна (коэффициент вариации не превышает 13 %) и недостоверна, что указывает на выравнивание выборок растений по данному признаку.

5. Увеличение пloidности генома приводит к увеличению размера пыльцы и размаха изменчивости пыльцевых зерен по диаметру. В тетраплоидных вариантах количество пыльцы с минимальными и максимальными размерами увеличено.

