

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

Кафедра генетики

**ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЖЕНСКОГО ГАМЕТОФИТА У МУТАНТНЫХ
ЛИНИЙ *NICOTIANA TABACUM L.***

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 422 группы

направление подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология


биологического факультета

Парфировой Ирины Владимировны

Научный руководитель

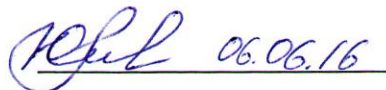
Зав. кафедрой генетики,

д. б. н., доцент

 06.06.16 Л.П. Лобанова

Зав. кафедрой генетики,

д. б. н., профессор

 06.06.16 О.И. Юдакова

Саратов 2016

Введение. Женский гаметофит, или зародышевый мешок (ЗМ), является важнейшим элементом системы размножения покрытосеменных растений, в котором проходят процессы оплодотворения, эмбрио- и эндоспермогенеза. Осуществление этих событий и судьба следующего поколения зависят от структурно-функциональной организации ЗМ.

Нарушение функции ЗМ нередко связано с его аномальной структурой, которая может быть обусловлена изменением числа митотических делений при формировании ЗМ, нарушениями цитокинеза и дифференциации клеток. Фенотипически это проявляется в изменении размеров и формы клеток, увеличении или уменьшении числа ядер, появлении ценоцитных и атипично дифференцированных ЗМ.

Исследование связи генетических особенностей растения с модификациями в строении ЗМ представляет собой одну из наиболее интересных проблем биологии развития растений. Всестороннее изучение данного вопроса представляется достаточно актуальным и для практических целей, так как определенные генетически обусловленные изменения типичного строения ЗМ способны оказывать влияние на способ размножения растений (половой или апомиктический). Получение большого количества данных по этой проблеме будет способствовать прогрессу в понимании генетического контроля апомиксиса и возможности целенаправленного воздействия на способ размножения культурных растений.

Растения *Nicotiana tabacum* L. характеризуются рядом особенностей, делающих их чрезвычайно удобными для подобных исследований. В частности, растения табака характеризуются обильным длительным цветением, крупными размерами цветков, позволяющими легко проводить кастрацию. Растения табака могут быть вегетативно размножены путем почкования или микроклонирования, поэтому выделенные перспективные экземпляры могут длительное время поддерживаться в коллекции. Табак широко используется как универсальный модельный объект молекулярно-

генетических исследований, поэтому полученные мутации в дальнейшем могут быть идентифицированы на уровне ДНК.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании фенотипического проявления гаметофитных мутаций у двух экспериментально полученных линий табака М-2 и М-3 на стадии зрелого зародышевого мешка.

В задачи экспериментальной работы входило:

- 1) определение спектра изменчивости зародышевых мешков у полученных мутантных линий;
- 2) количественная и качественная оценка зародышевых мешков нормального и субнормального строения;
- 3) количественная и качественная оценка зародышевых мешков аномального строения.

В качестве исходного материала использовались растения *Nicotiana tabacum* L. двух мутантной линии М-2 и М-3, полученные методом радиационного мутагенеза в отделе генетики и цитологии Ботанического сада СГУ. Контролем послужила гомозиготная линия БГ-6, характеризующаяся высокой константностью в проявлении цитологических признаков ЗМ.

Все растения выращивались на опытном участке в Ботаническом саду СГУ. Всего было проанализировано 4 растения линии М-2 и 8 растений линии М-3. У каждого растения исследовалось по 100 ЗМ. Препараты для изучения зрелых зародышевых мешков готовили методом ферментативной мацерации до клеточной суспензии (Еналеева, Тырнов, Хохлов, 1972).

Анализ препаратов проводили на микроскопе “Axiostar-plus” при увеличении 10×40 . Статистическую обработку проводили в соответствии с общепринятыми методами статистики и использованием программ Microsoft Excel и Statistica 6.0.

Бакалаврская работа состоит из следующих глав: введение, обзор литературы, материал и методы исследования, результаты исследования, заключение, выводы. Список использованных источников включает 47 работ.

Основное содержание работы. В разделе, посвященном обзору литературы, приводится анализ литературы по вопросам, касающимся развития и строения зародышевых мешков у покрытосеменных растений (Поддубная-Арнольди, 1976; Джори, 1990). Описываются особенности макроспорогенеза, макрогаметогенеза и строения зародышевых мешков *Poligonum*-типа у покрытосеменных растений (Ботыгина, 1994; Huyghe, 1987; Чеботарь, 1987), а также влияние мутаций и внешних факторов на развитие зародышевых мешков (Тырнов, 2000; Лобанова, 2003).

В экспериментальной части представлены данные цитоэмбриологического анализа 1200 ЗМ у мутантных линий и 500 ЗМ у контрольных растений линии БГ-6. Все ЗМ были разделены на 3 группы: нормальные, субнормальные и аномальные. В основу деления ЗМ на эти группы положены морфологические критерии. Результаты анализа ЗМ у исследованных мутантных линий и контрольной представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Частота зародышевых мешков различного строения у трех линий табака

Линия	Строение зародышевых мешков, %		
	нормальные	субнормальные	аномальные
БГ-6	98,2 ± 0,2	0,0	1,8 ± 0,2
М-2	56,2 ± 6,0	4,3 ± 0,6	39,5 ± 6,6
М-3	9,3 ± 1,6	2,3 ± 0,4	88,4 ± 1,3

Зрелые ЗМ табака нормального строения биполярны и содержат 7 клеток: 3-х клеточный яйцевой аппарат, центральную клетку и 3 антиподы. Яйцевой аппарат находится на микропиллярном полюсе ЗМ и состоит из яйцеклетки и 2-х синергид. Центральная клетка содержит два полярных ядра или, после их слияния, одно центральное ядро. Три антиподы располагаются на халазальном конце ЗМ.

В ходе анализа прежде всего определялось соотношение ЗМ нормального строения и с различными отклонениями от нормы. Установлено, что все три линии достоверно различаются по количеству ЗМ нормального строения. У не мутантной линии БГ-6 они составили 98 %, у М-2 в среднем 58 %, а у М-3 всего 12 % (рисунок 1).

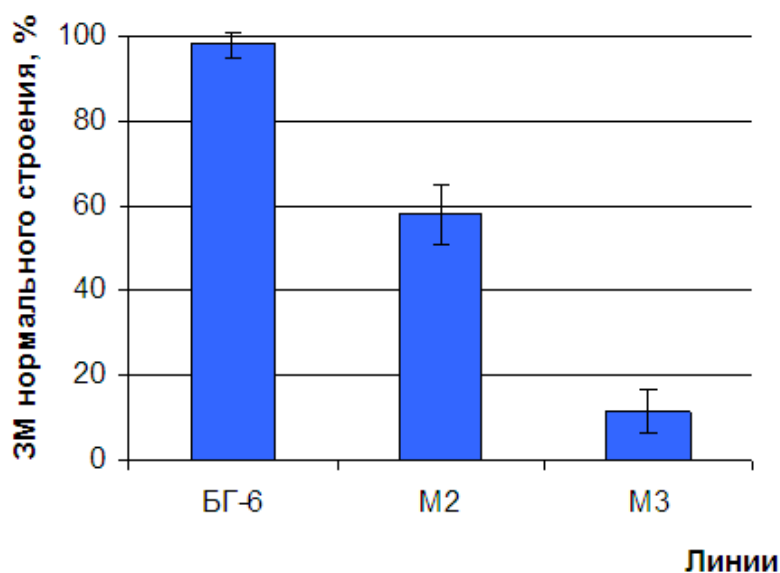


Рисунок 1 – Частота зародышевых мешков нормального строения у трех линий табака

У мутантных растений нормальные ЗМ варьировали в отношении размера, формы, положения полярных ядер, наличия или отсутствия антипод. Яйцеклетки и полярные ядра часто содержали по 2-3 ядрышка, вместо одного в норме. У мутантных линий были зарегистрированы зародышевые мешки с изменением локализации ядер и вакуолей в клетках яйцевого аппарата, такие ЗМ были отнесены к субнормальным. У линии М-3 они представлены ЗМ с яйцеклеткоподобными синергидами и ЗМ с синергидоподобными яйцеклетками.

Аномальные зародышевые мешки имели нетипичный план строения и значительно различались по количеству ядер, их расположению относительно друг друга и по наличию или отсутствию клеточных перегородок. Такие аномальные ЗМ были условно разделены по числу ядер

на три группы: малоядерные (с числом ядер менее 7), клеточные (с 7-8 ядрами) и многоядерные (число ядер более 8). В каждой группе были также выделены ЗМ с клеточной дифференцировкой и с отсутствием клеточной дифференцировки (ценоцитные). У контрольной линии БГ-6 в среднем частота аномалий не превышала 2-х % (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты анализа зародышевых мешков аномального строения у трех линий табака

Вариант	Номер растения	Число анализированных ЗМ, шт.	Аномальные ЗМ, шт.	ЗМ с числом ядер, %			
				менее 7		7-8	более 8
				ценоцитные	клеточные	клеточные	клеточные
БГ-6	1	200	2,0	1,0	0,6	0,40	0,00
	2	255	2,4	1,2	0,00	1,20	0,00
	3	240	1,6	0,8	0,00	0,80	0,00
	4	170	1,4	0,4	0,40	0,80	0,00
	5	412	1,4	0,00	0,00	0,80	0,60
	Среднее		1,76	0,68	0,20	0,80	0,12
М-2	12	100	46	5,00	0,00	1,00	40,00
	19	100	40	0,00	0,00	0,00	40,00
	28	100	28	3,00	0,00	0,00	25,00
	56	100	52	0,00	0,00	1,00	51,00
	Среднее		41,5	2,0	0,0	0,1	39,5
М-3	5.7	100	83	50,79	31,54	0,00	0,00
	5.8	100	93	64,28	29,19	0,00	0,00
	5.16	100	87	64,68	20,01	0,00	2,01
	5.20	100	93	66,29	27,12	0,00	0,00
	7.1	100	91	66,06	24,02	0,00	1,01
	7.2	100	85	61,18	22,06	1,03	1,03
	7.4	100	86	65,84	18,95	0,00	0,96
	7.5	100	89	59,81	27,91	0,00	0,99
	Среднее		88,4	62,3	25,2	0,11	0,8

Примечание: * различия с линией БГ-6 достоверны на уровне значимости 0,001

У растений мутанта М-2 основное нарушение типичного хода цитологических процессов при развитии ЗМ заключалось в увеличении числа клеточных делений в гаметогенезе. Количества всех типов аномальных ЗМ у этой мутантной линии составило 42 %, а количество многоядерных – 39,5 % (см. таблица 1). Цитокинез в этом случае не нарушался и все многоядерные мешки были клеточными. Число ядер в таких ЗМ

варьировало от 9 до 16. В основном все многоядерные мешки линии М-2 были биполярными, но встречались единичные ЗМ с хаотичным расположением клеток по всей полости ЗМ. У растений мутантной линии М-2 встречались также единичные ценоцитные малоядерные ЗМ.

У мутантной линии М-3 количество аномальных ЗМ было значительно выше, чем у линии М-2 и в среднем равнялось 85,5 %. (см. таблица 1). Количество ядер в таких мешках варьировало от 2 до 6. Среди них доминировали малоядерные ценоцитные (62,3%). Количество ядер в таких мешках варьировало от 2 до 6, среди которых преобладали 2-ядерные (51,6%). Расположение ядер в мешке чаще было биполярным, реже монополярным или аполярным.

Второй по встречаемости группой аномальных ЗМ у мутантной линии М-3 были 2-6-клеточные. Их средняя частота составила 25,2 %, из которых 20,4 % были 3-ядерными. В ЗМ этого типа осуществлялся цитокинез, образовавшиеся клетки становились вакуолизированными и приобретали характерную округлую форму.

От 40,2 до 61,5 % аномальных ЗМ содержали увеличенные ядра с дополнительными ядрышками. Появление таких ядер указывает на нарушения при прохождении митозов или на замену митотических делений эндомитозами. Следовательно, у мутанта М-3 возможно появления ядер разного уровня ploидности и с разным числом хромосом.

Обобщенные данные соотношения малоядерных и многоядерных ЗМ у мутантных линий наглядно отражают специфику вариаций аномальных гаметофитов по признаку "число ядер" в зависимости от генотипа (рисунок.2).

На основе кластерного анализа учитывающего два основных признака: число ядер и наличие или отсутствие цитокинеза, были выделены 3 группы растений, сходных по распределению аномальных ЗМ с различным числом ядер и наличием или отсутствием клеткообразования. Показано, что каждая группа организована растениями одной линии, что свидетельствует о

значительных межлинейных различиях по сравниваемым признакам (рисунок 3). Внутрелинейная изменчивость растений невелика.

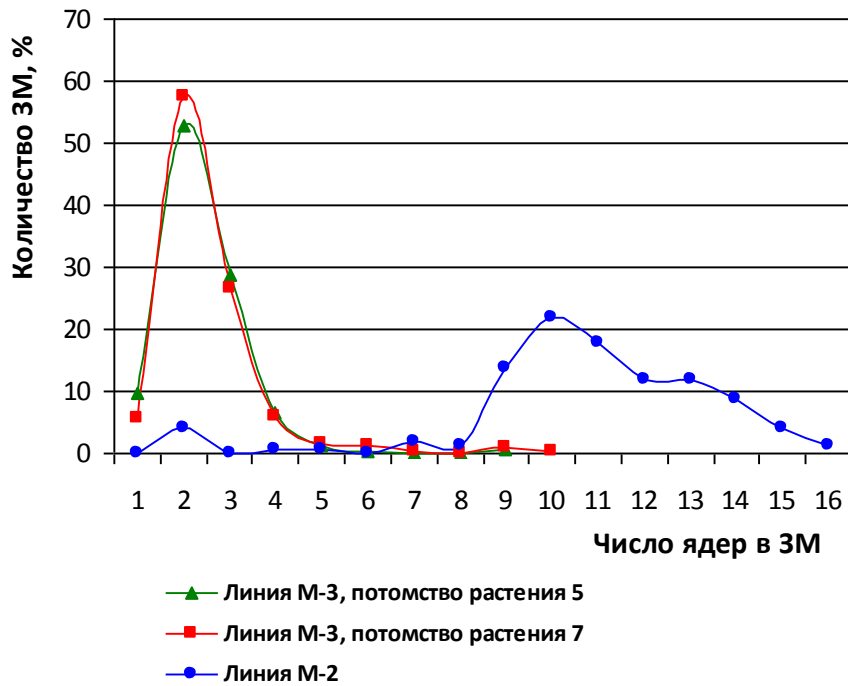


Рисунок 2 – Распределение аномальных ЗМ по количеству ядер у линий М-2 и М-3

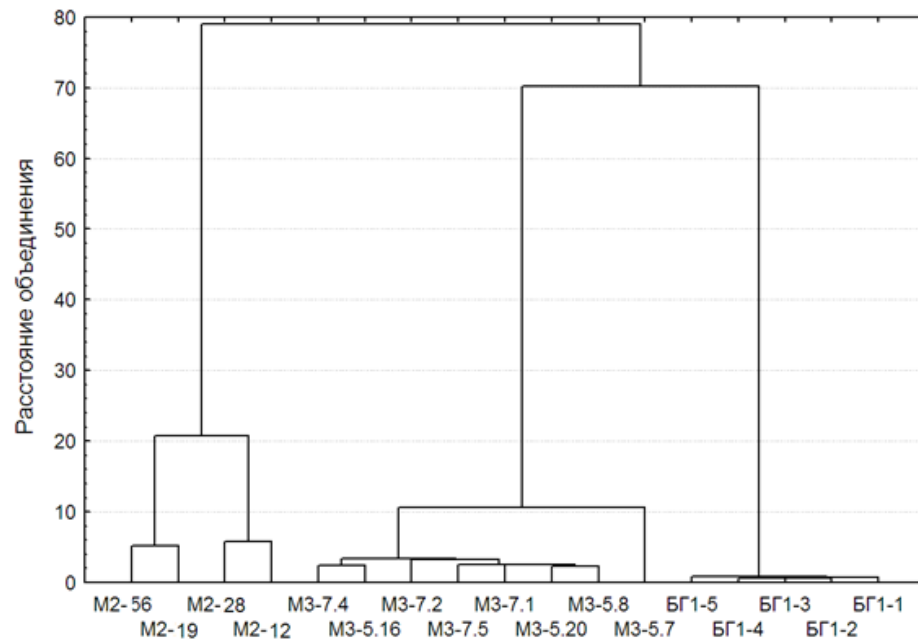


Рисунок 3 – Кластерная диаграмма распределений ЗМ аномальных по количеству ядер и цитокинезу у разных линий

Таким образом, обе мутантные линии характеризуются широким диапазоном изменчивости ЗМ и четко отличаются от контрольной линии и между собой по ряду признаков. Специфика проявления мутаций у разных линий заключается в следующем: мутация у линии М-2 проявляется в стимуляции митотических делений и, напротив, мутация линии М-3 подавляет митозы и цитокинез.

Заключение. Формирование женского гаметофита представляет собой сложный и насыщенный цитологическими событиями процесс, включающий у табака в норме три митотических деления, поляризацию после первого митоза, цитокинез, дифференцированный рост клеток и их специализацию. Сочетание различных нарушений в гаметогенезе может привести к большому числу фенотипических вариантов ЗМ. Анализ морфологических вариаций ЗМ показывает, что они могут быть обусловлены нарушениями одного или нескольких цитологических процессов в гаметогенезе. В результате проведенного исследования показаны возможные варианты строения ЗМ двух мутантных линий табака (М-2 и М-3) и одной не мутантной линии (БГ-6).

Для ЗМ аномального строения характерны более разнообразные варианты организации ЗМ. Максимальное количество отклоняющихся от нормы ЗМ зарегистрировано у мутантной линии М-3, у которой они составляют 88,4 %. Редукция числа элементов в ЗМ этой линии, вероятно, обусловлена выпадением 1-2-х митозов в процессе формирования мешка. Нельзя также исключить и возможность замены митотических делений эндомитозами. На вероятность последнего варианта указывает образование более 50 % ЗМ с многоядрышковыми ядрами. Специфика строения аномальных ЗМ (2-6-ядерные и в основном циноцитные), свидетельствует об их полной стерильности. Однако, как показали полевые наблюдения, небольшое количество образовавшихся семян достаточно для воспроизводства линии, которая при этом сохраняет мутантный фенотип зародышевых мешков.

Линия М-2 характеризуется развитием 39,5 % многоядерных клеточных ЗМ, причем большинство из них имеют от 1 до 5 дополнительных клеток в яйцевом аппарате. Такие дополнительные клетки часто по морфологии идентичны яйцеклетке. Имеющиеся данные свидетельствуют, что возможно их оплодотворение и, следовательно, развитие дополнительных зародышей.

Таким образом, в ходе проведенного исследования получена информация о диапазоне и цитологических закономерностях изменчивости ЗМ у двух мутантных линий табака. Показано, что морфологические вариации структурной организации ЗМ обусловлены изменениями в проявлении его основных признаков – числа клеточных элементов, полярности, клеточной дифференциации. Полученные данные позволили сделать следующие выводы.

1. Установлен диапазон внутрилинейной изменчивости зародышевых мешков для двух мутантных линий *Nicotiana tabacum* L. В зависимости от характера проявления основных морфологических признаков (числа элементов и клеточной дифференциации) зародышевые мешки подразделяются на нормальные и аномальные.

2. Зародышевые мешки нормального строения у мутантных линий развиваются значительно реже, чем в контроле: у растений М-2 с частотой 58 %, а у растений М-3 – 12 %. Зарегистрированы изменения дифференцировки клеток яйцевого аппарата с образованием яйцеклеткоподобных синергид и синергидоподобных яйцеклеток.

3. Максимальный уровень аномальных зародышевых мешков у растений линии М-2 составляет 54%, у растений линии М-3 - 93 %. Количественная выраженность структурных вариаций в аномальных зародышевых мешках и соотношение их типов у разных мутантных линий значительно варьирует.

4. Доминирующим типом зародышевых мешков аномального строения у линии М-3 являются ценоцитные с уменьшенным числом элементов, что

вызвано уменьшением числа митозов в гаметогенезе и подавлением

образования клеточных перегородок.

5. У растений М-2 доминирующий тип аномалий представлен клеточными зародышевыми мешками с увеличенным числом клеток и ядер, что обусловлено увеличением числа митозов в ценоцитной стадии гаметогенеза.

