

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

Кафедра генетики

**ЦИТОЭМБРИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
ГАПЛОИНДУЦИРУЮЩЕЙ ЛИНИИ КУКУРУЗЫ ЗМС-П**

Автореферат бакалаврской работы

Студентки 4 курса 421 группы

Направления 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Алексеевой Елены Олеговны

Научный руководитель

Зав. кафедрой генетики

д.б.н., доцент

 14.06.17 О.И.Юдакова

Зав. кафедрой генетики

д.б.н., доцент

 14.06.17 О.И.Юдакова

Саратов 2017

ВВЕДЕНИЕ

Гомозиготные диплоидные линии растений широко используются в селекционно-генетических программах многих институтов и селекционных станций мира по улучшению хозяйственно-важных культур. Кроме практического использования, гаплоиды так же важны для научных исследований. У гаплоидов каждый ген представлен единственным аллелем, и рецессивные аллели одних генов проявляются наряду с доминантными аллелями других, благодаря этому гаплоидные растения можно успешно использовать в мутационной селекции, также можно получать гомозиготные диплоиды путем удвоения хромосом, происходящего спонтанно или после обработки колхицином. Получая линии удвоенных гаплоидов из гибридов ранних поколений, можно сократить селекционный процесс на несколько лет. Однако частота возникновения гаплоидов низка, поэтому на данный момент исследователи создают и улучшают методы получения.

Образование гаплоидов материнского типа обусловлено партеногенетическим развитием яйцеклетки. Это явление может носить наследственный характер, а может быть индуцировано различными факторами, например, опылением пыльцой гаплоиндуцирующих линий. У кукурузы, одной из основных культур современного мирового земледелия, существуют формы как с наследуемым, так и ненаследуемым типом партеногенеза.

Эффективное использование в селекции линий кукурузы с разными типами партеногенеза невозможно без знания их эмбриологических особенностей.

Цель данной работы заключалась в изучении цитоэмбриологических особенностей растений линий кукурузы ЗМС-П.

Задачами исследования является:

- 1) проведение анализа структуры и качества пыльцевых зерен линий кукурузы ГПЛ-1 и ЗМС-П;

2) изучение структуры зрелых женских гаметофитов из неопыленных завязей растений линий кукурузы 3Mgl и 3МС-П.

Краткая характеристика материалов и методов.

Объектом исследования послужили линия кукурузы (*Zeamays*L.) 3МС-П и две контрольных линии ГПЛ-1 и 3Mgl.

Линия 3МС-П обладает сильной гаплоиндуцирующей способностью. Линия была получена при скрещивании растения линии 3МС-8 с нелинейными формами кукурузы с пурпурной окраской стеблей, листьев и метелок.

Линия 3Mgl не обладает гаплоиндуцирующей способностью и не склонна к наследуемому партеногенезу. Её особенностью является наличие гена *glossy*, который дает глянцевые листья на проростке.

Линия ГПЛ-1 имеет гаплоидное происхождение, также не обладает гаплоиндуцирующей способностью и не склонна к наследуемому партеногенезу.

Растения выше описанных линий выращивали в открытом грунте. В разгар цветения с растений собирали пыльцу. Свежесобранную пыльцу фиксировали в ацетоалкоголе (3:1). Початки изолировались до появления пестичных нитей пергаментными пакетами. Цветки изолированных и неопыленных початков фиксировали на 5 сутки после появления пестичных нитей в ацетоалкоголе (3:1).

Анализ структуры и качества пыльцевых зерен проводили на временных препаратах, методика приготовления которых включала в себя окрашивание пыльцевых зерен ацетокармином.

Для изучения структуры зрелых женских гаметофитов из неопыленных завязей использовалась методика выделения целых зародышевых мешков с помощью ферментативной мацерации и последующей диссекцией семязачатков.

Анализ препаратов проводился на микроскопе «PrimoStar»(Zeiss). Фотографирование проводили при том же увеличении на микроскопе «Axiostar-plus» (Zeiss) с помощью программы визуализации «Zoombrowser».

Структура и объем работы. Работа изложена на 39 страницах машинописного текста и включает в себя введение, 3 главы с таблицами, рисунками, выводы. Список использованных источников содержит 30 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

3 Результаты исследования

Для проведения сравнительного анализа структуры микрогаметофитов и качества пыльцы были использованы растения линий ЗМС-П и ГПЛ-1. Проведенный анализ показал, что строение зрелых пыльцевых зерен у обоих изученных линий было типичным для кукурузы. Среди пыльцевых зерен встречались выполненные и дегенерирующие (рис. 1). Выполненные пыльцевые зерна содержали вегетативную клетку с хорошо окрашенной цитоплазмой, ядром и двумя спермиями. Вегетативное ядро большинства нормальных пыльцевых зерен имеет округлую или слегка лопастную форму. Дегенерирующие пыльцевые зерна легко определяется визуально по степени разрушения содержимого. Среди дегенерирующей пыльцы встречались пустые пыльцевые зерна и зерна с различной степенью плазмолиза.



a – выполненное нормального строения; *б* – пустое; *в* – дегенерирующее

Рисунок 1 – Пыльцевые зерна кукурузы

У всех исследованных растений кукурузы большая часть пыльцы имела вегетативное ядро, два спермия и хорошо окрашенную цитоплазму, без признаков дегенерации (табл. 1). Различий между выполненными пыльцевыми зернами кукурузы линии ЗМС-П и ГПЛ-1 обнаружено не было

(рис. 2). По сравнению с контрольной линией ГПЛ-1, для линии ЗМС-П в среднем было характерно большее количество дегенерирующей пыльцы. У ГПЛ-1 количество дегенерирующих пыльцевых зерен составило 9,2%, а у ЗМС-П среднее значение составило 13,3%.

Таблица 1 – Качество пыльцы растений изученных линий кукурузы

Линия	№ растения	Количество пыльцевых зерен				
		всего исследованных	нормального строения, %	с фрагментацией ядер, %	двуядерных, %	дегенерирующих, %
ЗМС-П	1	136	74,0	6,0	2,2	17,8
	2	121	84,3	7,4	0,0	8,3
	3	157	80,9	5,4	0,0	13,7
	среднее		79,7	6,3	0,7	13,3
Контроль						
ГПЛ-1	1	212	89,6	1,2	0,0	9,2

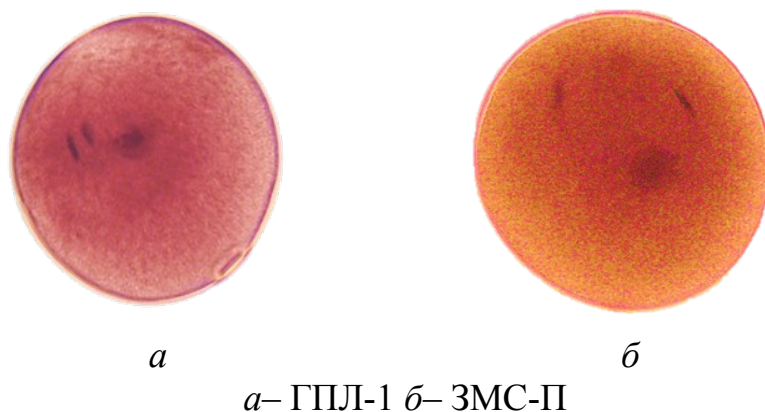


Рисунок 2 – Выполненные пыльцевые зерна

Среди пыльцевых зерен с аномальным строением встречались зерна с двумя вегетативными ядрами и зерна с фрагментацией ядер. Пыльца с двумя вегетативными ядрами (рис. 3) имела случайный единичный характер (0,7%). Присутствие двуядерной пыльцы, вероятнее всего, является следствием асинхронности развития пыльников в метелке.

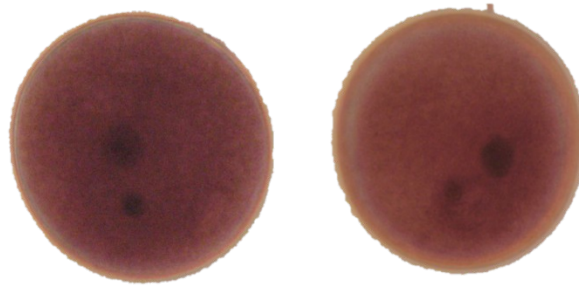
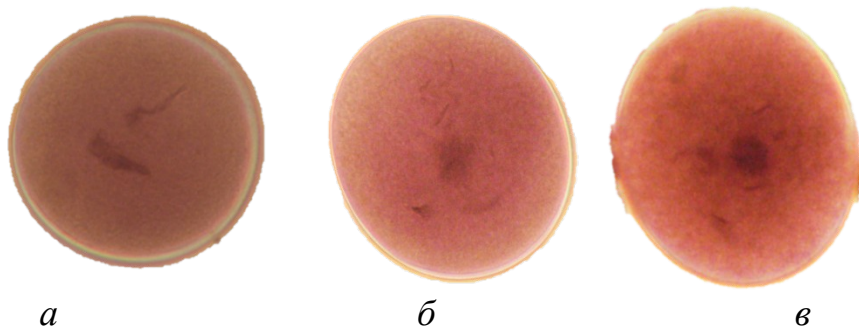


Рисунок 3 – Пыльцевые зерна с двумя ядрами растений линии ЗМС-П

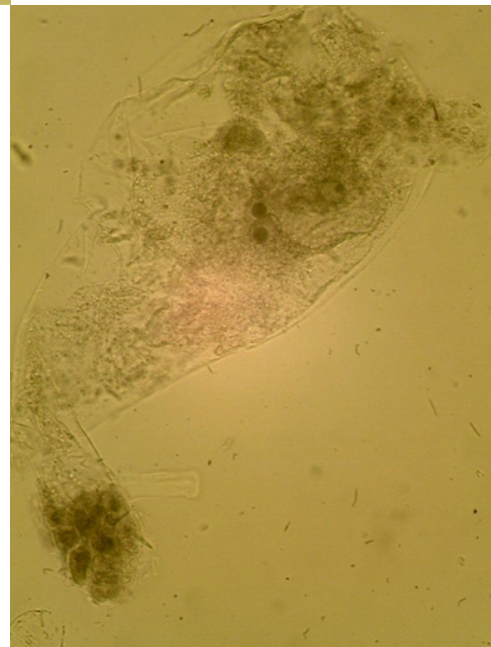
По сравнению с контрольной линией ГПЛ-1, для линии ЗМС-П в среднем было характерно увеличение количества пыльцевых зерен с фрагментацией ядра, которая встречалась в двух разных вариантах (рис. 4): фрагментация вегетативного ядра и фрагменты ядер спермиев. Вторые были отнесены условно к аномальным трехклеточным пыльцевым зернам, так как содержали обычно типичное вегетативное ядро, два спермия и, вероятно, фрагменты ядер спермиев. Фрагментированные вегетативные ядра могли быть результатом дегенеративных процессов, происходящих в пыльцевых зернах. У ГПЛ-1 количество фрагментирующих пыльцевых зерен составило 1,2%, а у ЗМС-П среднее значение составило 6,3%.



а – с фрагментацией вегетативного ядра; *б* и *в* – с фрагментами ядер спермиев

Рисунок 4 – Пыльцевые зерна с фрагментацией ядра

Строение зародышевых мешков из неопыленных завязей контрольной линии кукурузы ЗМgl имели типичное строение Polygonum-типа (рис. 5а). Они содержали яйцеклетку, две синергиды, центральную клетку с двумя полярными ядрами и комплекс антипод, состоящий в среднем из 15-20 одноядерных антипод.



a

б

Рисунок 5 – Зародышевый мешок Polygonum-типа у кукурузы линии 3Mgl (*a*) и 3МС-II (*б*)

Гаметофитных аномалий и партеногенетического развития яйцеклеток у изученных растений линии 3Mgl не обнаружено (табл. 2).

Зародышевые мешки линии 3МС-II в основном имели также типичное для злаков строение (рис. 5*б*). Выделенные из неопыленных завязей зародышевые мешки содержали либо неслившиеся полярные ядра (85,4%), либо одно центральное ядро (14%). Наряду с женскими гаметофитами

нормального строения были обнаружены зародышевые мешки с дополнительной яйцеклеткой (рис. 6). Зародышевых мешков аномального строения встречались крайне редко (0,6%). Это были мегагаметофиты с дополнительными яйцеклетками. Дополнительные женские гаметы формировались за счет нарушения процессов поляризации и дифференцировки элементов зародышевого мешка.

Таблица 2 – Структура зародышевых мешков из неопыленных завязей изученных линий кукурузы

Линия / початок	Часть початка	Количество зародышевых мешков						всего исследованных	
		с двумя полярными ядрами		с одним центральным ядром		аномального строения			
		шт.	%	шт.	%	шт.	%		
ЗМ gl	ниж.	42	91,3	4	8,7	0	0,0	46	
	сред.	81	91,0	8	9,0	0	0,0	89	
	верх.	89	95,6	4	4,4	0	0,0	93	
	всего	212	92,6	16	7,4	0	0,0	228	
ЗМС-П	С22	ниж.	65	79,3	17	20,7	0	0,0	82
		сред.	51	79,6	12	18,9	1	1,5	64
		верх.	48	94,1	3	5,9	0	0,0	51
		всего в початке	164	84,4	32	15,1	1	0,5	197
	С38	ниж.	17	50,0	17	50,0	0	0,0	34
		сред.	37	65,0	19	33,3	1	1,7	57
		верх.	46	77,9	13	22,1	0	0,0	59
		всего в початке	100	64,3	49	35,1	1	0,6	150
	С2	ниж.	57	96,6	1	1,7	1	1,7	59
		сред.	54	98,2	0	0,0	1	1,8	55
		верх.	52	98,2	1	1,8	0	0,0	53
		всего в початке	163	97,6	2	1,2	2	1,2	167
	С6	ниж.	32	84,3	5	13,1	1	2,6	38
		сред.	49	94,3	3	5,7	0	0,0	52
		верх.	32	97,0	1	3,0	0	0,0	33
		всего в початке	113	91,9	9	7,3	1	0,8	123
	С62	ниж.	67	97,2	2	2,8	0	0,0	69
		сред.	81	89,1	10	10,9	0	0,0	91
		верх.	73	95	3	3,8	1	1,2	77
		всего в початке	221	89,0	15	6,3	1	0,4	237
Всего		761	85,4	107	14,0	6	0,6	874	

Из более чем 800 проанализированных зародышевых мешков ни в одном из них не обнаружено партеногенетического развития яйцеклеток.

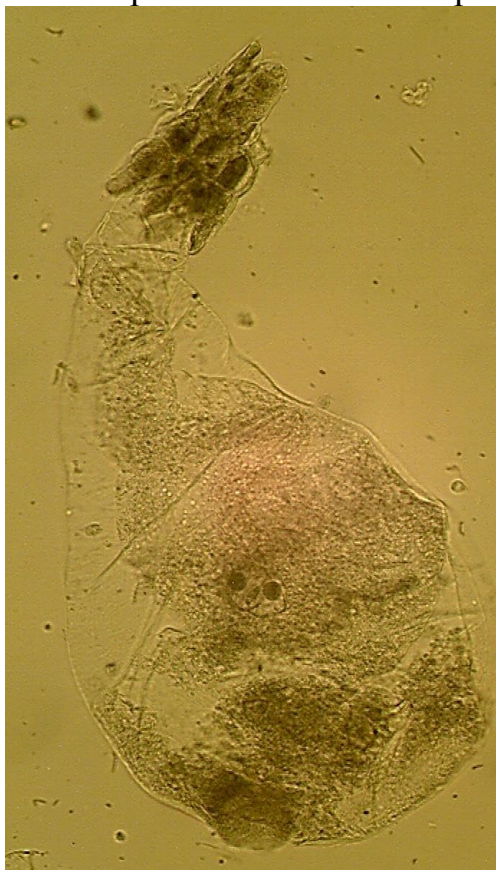


Рисунок 5 –Зародышевый мешок линии ЗМС-П с двумя яйцеклетками в яйцевом аппарате

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный цитоэмбриологический анализ показал, что по своим морфологическим характеристикам пыльцевые зерна линии-гаплоиндуктора ЗМС-П не отличаются от пыльцы линий кукурузы, несклонных к гаплоиндукции.

Структура зародышевых мешков гаплоиндуцирующей линии ЗМС-П также не отличается от структуры мегагаметофитов линий, не способных к

гаплоиндукции. Кроме того, не зарегистрировано ни одного случая образования партеногенетического зародыша в неопыленных зародышевых мешках линии ЗМС-П.

Выявленные эмбриологические особенности линии ЗМС-П свидетельствуют о том, что у нее отсутствует склонность к наследственному партеногенезу, но способна образовывать гаплоидные зародыша при опылении собственной пылью.

ВЫВОДЫ

1. Проведенный анализ структуры и качества пыльцевых зерен линий кукурузы ГПЛ-1 и ЗМС-П показал, что пыльца обеих линий имеет нормальное строение. Уровень аномалий у линии ГПЛ-1 составил 1,2%, у линии ЗМС-П – 7%. Таким образом, пыльца линии ЗМС-П обладает высоким качеством.
2. Зародышевые мешки у кукурузы линии ЗМС-П развиваются без отклонений от нормы, процент аномалий низкий и составляет 0,6%.
3. Партеногенетического развития зародышей в неопыленных завязях растений линии ЗМС-П не обнаружено, что свидетельствует об отсутствии склонности линии к наследуемому партеногенезу.

