

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

Кафедра генетики

**ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЖЕНСКОГО ГАМЕТОФИТА ТАБАКА ПОД
ВЛИЯНИЕМ ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

Направления 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Варламовой Татьяны Евгеньевны

Научный руководитель,

к.б.н., доцент кафедры генетики 9.06.2017г. Лобанова Л.П. Лобанова

Зав. кафедрой генетики,

д.б.н., профессор 9.06.2017г. Юдакова О.И. Юдакова

Саратов 2017

Введение. Женский гаметофит или зародышевый мешок (ЗМ), является ключевым элементом системы размножения. В нем происходит оплодотворение и развития зародыша и эндосперма, и по сути ЗМ выполняет роль связующего звена между двумя поколениями, обеспечивая непрерывность наследственной информации; от особенностей формирования и функционирования ЗМ в значительной степени зависит не только гарантия передачи этой информации, но и генетическая конституция потомства.

Один из перспективных подходов изучения женской генеративной сферы может заключаться в изучении потенциальной фенотипической изменчивости ЗМ. На этой основе может быть получена информация, проливающая свет на проблемы морфогенеза, исторического развития, дискретности признаков, а также могут быть выявлены факты, представляющие практический интерес.

Особый интерес представляет возможность индукции внешними факторами таких структурно-функциональных изменений женского гаметофита, которые являются предпосылками гаплоидии, полиплоидии, диплоидного апомиксиса, имеющих прикладное значение. Таким образом, проблема изменчивости ЗМ тесно связана с вопросами фертильности и генетической конституции потомства.

Известно, что тип развития и признаки зрелого ЗМ учитываются при ботанической характеристике вида и имеют таксономическое значение. Знания особенностей строения и изменчивости женских генеративных структур, вызванных экологическими факторами, позволят точнее использовать информацию о фенотипических вариациях в систематике и филогении.

Литературные данные о влиянии температуры на формирование женского гаметофита немногочисленны и не дают полного представления о конкретных цитологических процессах, осуществляющихся под влиянием термических воздействий. Недостаточно данных и об особенностях влияния высоких температур на материнскую клетку макроспор, стадии спорогенеза и гаметогенеза.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании влияния высокой температуры на различные этапы развития зародышевого мешка линии табака БГ-6.

В задачи работы входило:

- 1) исследовать особенности развития зародышевых мешков табака в условиях *in vitro* при оптимальных температурных условиях;
- 2) исследовать влияние высокой температуры на спорогенез;
- 3) изучить особенности формирования материнской клетки зародышевого мешка под влиянием высокой температуры;
- 4) определить влияние высокой температуры на гаметогенез и строение зрелых зародышевых мешков.

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 (Батыгина, 1994; Huyghe, 1987; Чеботарь, 1987), а также влияние мутаций и внешних факторов на развитие зародышевых мешков (Тырнов, 2000; Лобанова, 2003).

В экспериментальной части для изучения особенностей мегаспорогенеза использовали завязи, изолированные на стадии МКМ и стадиях мейоза. Результаты цитологического анализа стадии тетрад в завязях, мейоз которых проходил при разных температурах, представлен в таблице 1.

При развитии завязей от стадии МКМ до образования тетрады макроспор при 37°C увеличилось общее число аномалий и спектр отклонений от нормального хода спорогенеза. Количество нормальных линейных тетрад в этом варианте уменьшилось до 49% (таблица 1, рисунок 1).

Таблица 1 - Макроспорогенез табака при разных температурах

Вариант	Т°С	Число семязачатков, шт.	Тетрады макроспор, %		Выпадение цитокинеза, %			Выпадение мейотических делений, %		
			нормального строения	атипичными клеточными перегородками	после М	после ПМ	полное	ПМ в одной споре	ПМ в двух спорах	ИИи ПМ
МКМ	25	240	67,2	5,5	0,0	25,8	0,0	1,5	0,0	0,0
	37	195	49,1*	6,5	2,2**	21,4	5,8***	5,5**	4,0*	5,5**
мейоз	25	92	69,2	5,8	0,0	24,8	0,0	1,0	0,0	0,0
	37	75	63,4	5,0	0,0	25,1	3,0	2,0	1,3	0,0

Примечание: * различия с вариантом «МКМ, 25оС» достоверны на уровне значимости 0,05

** различия с вариантом «МКМ, 25оС» достоверны на уровне значимости 0,01

*** различия с вариантом «МКМ, 25оС» достоверны на уровне значимости 0,001

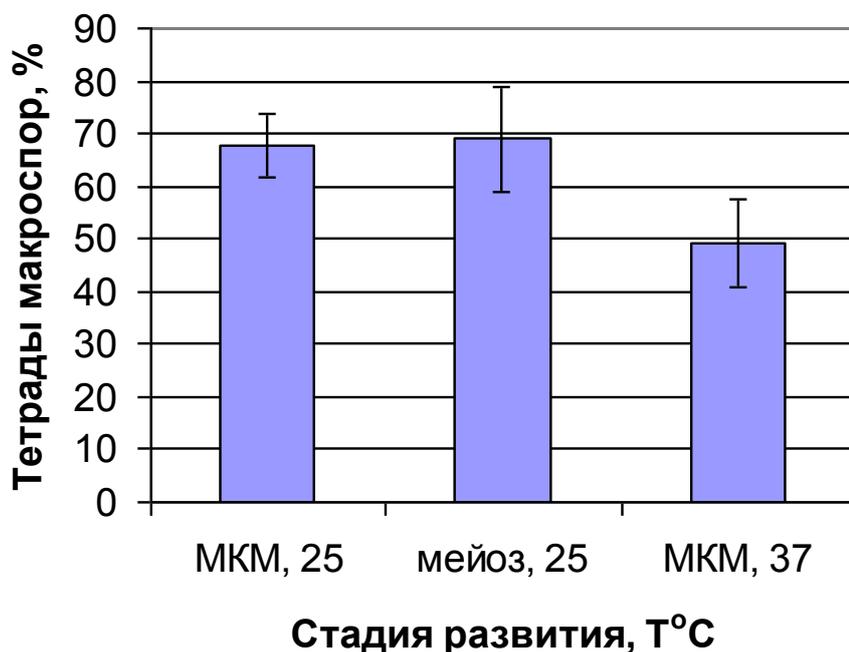


Рисунок 1 – Частота нормальных тетрад макроспор, образование которых проходило при разных температурах

Нарушение кариокинеза при 37°С проявились в полном или частичном подавлении мейотических делений. Это приводило к образованию трех, двух

или только одной макроспоры. В последнем случае МКМ непосредственно становилась материнской клеткой ЗМ. При воздействии высокой температуры на более позднюю стадию, стадию мейотических делений, наблюдается заметное снижение число аномалий в спорогенезе (см. таблица 1). Снижается также и спектр зарегистрированных аномалий.

Влияние температур на формирование материнских клеток ЗМ. При нормальных температурных условиях (25°C) материнская клетка зародышевого мешка формировалась, в основном, из халазальной макроспоры, а три верхние дегенерируют. Частота встречаемости семязачатков с таким развитием составила 95-96% (таблица 2). Отклонения развития при температуре 25°C были представлены редкими случаями одновременного развития 2-х макроспор или одной ценомакроспоры, обычно двухъядерной.

Таблица 2 – Формирование материнских клеток зародышевого мешка при разных температурах

Вариант	Т°C	Число семязачатков	Формирование МКЗМ (%) из:							
			одной споры		одновременно из 2, 3 и 4-х спор			2,3 и 4-ядерных спор	монады или диады спор	триады спор
			халазальной	не халазальной	2-х	3-х	4-х			
МКМ	25	190	95,8	0,0	2,1	0,0	0,0	2,1	0,0	0,0
	37	135	48,5***	5,1***	5,5	1,7*	10,5***	10,0**	12,5***	6,5**
мейоз	25	110	96,2	0,0	2,8	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0
	37	130	82,0**	0,0	1,1	0,0	2,8*	9,5*	1,8	2,8*

Примечание: * различия с вариантом «МКМ, 25oC» достоверны на уровне значимости 0,05

** различия с вариантом «МКМ, 25oC» достоверны на уровне значимости 0,01

*** различия с вариантом «МКМ, 25oC» достоверны на уровне значимости 0,001

Максимальная изменчивость формирования материнских клеток ЗМ наблюдалось, как и следовало ожидать, исходя из результатов анализа спорогенеза, при действии температуры 37°C (таблица 2). При действии

высокой температуры на стадию МКМ количество семязачатков с развитием ЗМ из не халазальной одноядерной увеличилось до 47%. То есть в этом варианте менее 50% ЗМ развивалось из халазальной споры нормально развитой тетрады макроспор. Отмеченная разница двумя температурными вариантами достоверна с вероятностью $P > 0,999$.

Влияние высокой температуры на более поздние стадии (стадии мейотических делений) привело к уменьшению количества МКЗМ, сформированных из не халазальной макроспоры, но их количество было значительно выше, чем при нормальной температуре (82 %). Зарегистрированная разница между температурными вариантами достоверна ($P > 0,99$).

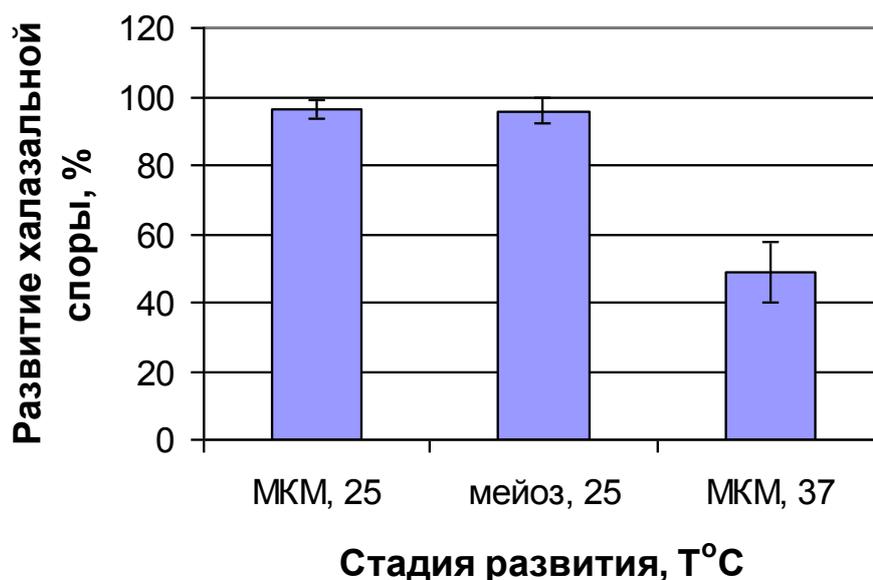


Рисунок 4 – Частота развития халазальной макроспоры в материнскую клетку ЗМ при действии разных температур на стадии МКМ и спорогенеза

Вследствие полного подавления мейоза некоторые МКМ при высокой температуре непосредственно становились материнскими клетками ЗМ. Значительно увеличилось вероятность формирования материнских клеток ЗМ из диады и триады спор. Нарушение цитокинеза в спорогенезе были причиной

формирования материнских клеток ЗМ из спор, содержащих 2, 3 или 4 ядра. Причем в этом случае при формировании материнских клеток ЗМ наблюдались разные варианты, обусловленные расположением ценоспор в споре.

Влияние температуры на макрогаметогенез и строение зрелых зародышевых мешков. Макрогаметогенез зародышевых мешков табака начинается с развития одноядерного ЗМ, который образуется в результате разрастания материнской клетки ЗМ. Этот этап развития ЗМ включает в норме три митотических деления с образованием 8-ядерного биполярного ценочита. Затем проходит заложение клеточных перегородок и дифференциация образовавшихся клеток. Нормальные ЗМ биполярны и содержат 7 клеток. При температуре 25°C образуется 2-3% аномальных ЗМ (рисунок 7). В основном это клеточные ЗМ с числом ядер равным или менее 8. Воздействие температуры 37°C на гаметогенез приводит к резкому повышению количества аномальных ЗМ (до 56,4%).

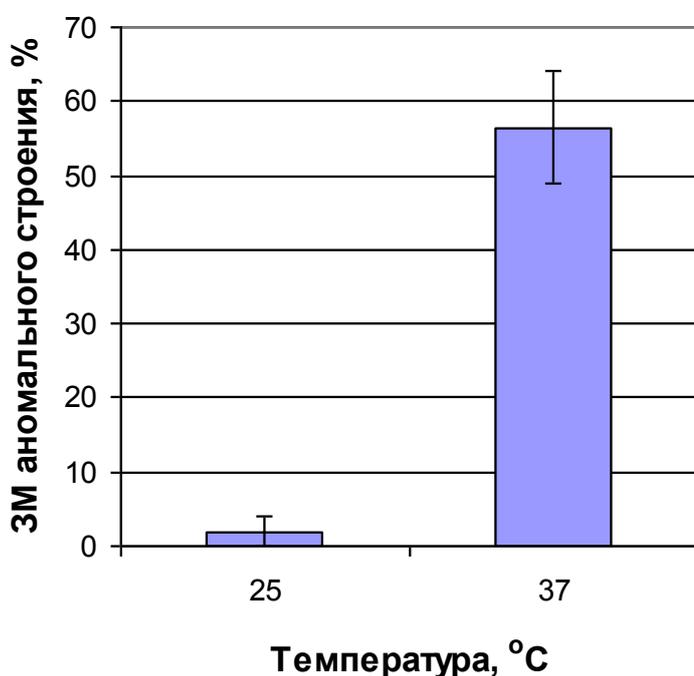


Рисунок 7 – Частота развития аномальных ЗМ при разных температурах

Среди аномальных ЗМ этого варианта доминируют клеточные многоядерные ЗМ (с числом клеток более восьми) (таблица 3).

Таблица 3 – Результаты анализа аномальных ЗМ, гаметогенез которых проходил при разных температурах

Температура	Число анализируемых ЗМ, шт	Аномальные ЗМ, %	Аномальные ЗМ с числом ядер, %					
			менее 8		7-8		более 8	
			ценоцитные	клеточные	ценоцитные	клеточные	ценоцитные	клеточные
25°C	200	3,0	0,5	1,0	0	0,5	0	1,0
37°C	200	56,4***	1,0	5,1*	1,1*	1,7	19,9***	27,6***

Примечание: * различия с контролем достоверны на уровне значимости 0,05

*** различия с контролем достоверны на уровне значимости 0,001

При анализе ЗМ, гаметогенез которых проходил при температуре 37°C, обнаружена изменчивость признаков в ЗМ типичного строения: 8-ядерных, биполярных с клеточной дифференцировкой. Эта изменчивость касалась особенностей дифференцировки клеток яйцевого аппарата и состояния полярных ядер (таблица 4). Такие ЗМ ряд авторов называют субнормальными.

Таблица 4 – Результаты анализа ЗМ типичного строения, гаметогенез которых проходил при разных температурах

Температура	Число анализируемых ЗМ	ЗМ со следующими признаками, %					
		яйцеклетки		синергиды		состояние полярных ядер	
		типичная	синергидоподобная	яйцеклеткоподобные	типичные	не слились	слились
25°C	93	100	0	0	100	89,8**	10,2**
37°C	78	75,6***	24,4***	2,6**	97,4**	97,4***	2,6***

Примечание: * различия с контролем достоверны на уровне значимости 0,05

** различия с контролем достоверны на уровне значимости 0,01

*** различия с контролем достоверны на уровне значимости 0,001

Таким образом, при воздействии высокой температуры на гаметогенез, ЗМ имели очень разнообразную организацию. Однако всё разнообразие можно было свести к трем основным типам: ЗМ нормального строения, «субнормальные ЗМ» с нарушенной дифференцировкой клеток яйцевого аппарата и ЗМ аномального строения.

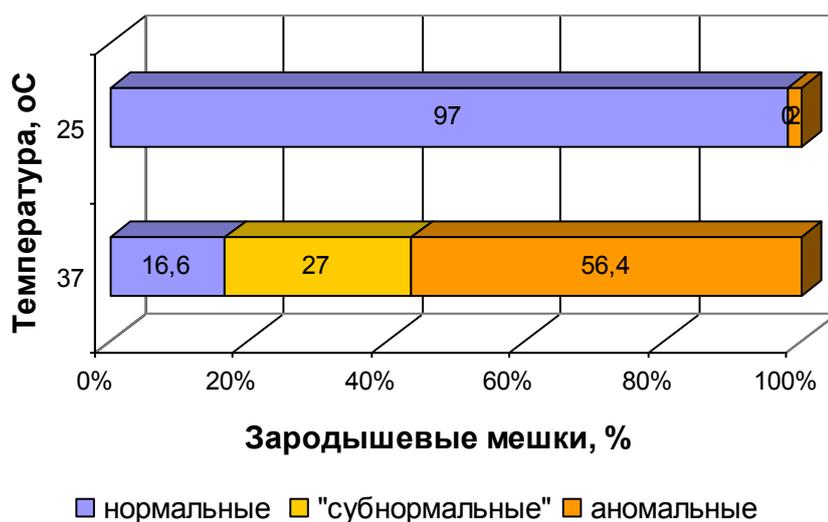


Рисунок 12 – Соотношение нормальных, аномальных и «субнормальных» зародышевых мешков при разных температурах

Заключение. Проведенное исследование выявило высокую изменчивость процессов макроспоро- и гаметогенеза под влиянием высокой температуры. При этом в макроспорогенезе высокой частотой подавляются I и II деления мейоза и образование клеточных перегородок между спорами. Следствием является индукция развития би-, три-, тетраспорических, а также нередуцированных зародышевых мешков. В гаметогенезе высокая температура стимулирует митотические деления и частично подавляет цитокинез, что может приводить к развитию многоядерных клеточных и ценоцитных ЗМ. Полученные данные показали также возможность получения с высокой частотой при температуре 37°C таких направленных изменений структуры субнормальных ЗМ, как ЗМ с синергидоподобными яйцеклетками.

Выявленные изменения, индуцированные высокой температурой, представляют интерес для понимания механизмов развития ЗМ и могут быть полезны при решении ряда проблем цитоэмбриологии, в частности, экологической эмбриологии.

Полученные данные позволили сделать следующие выводы.

1. Эмбриологические процессы в ходе формирования женского гаметофита табака при оптимальной температуре в условиях *in vitro* проходят нормально, что позволяет использовать культуру завязей для экспериментальных цитоэмбриологических исследований.
2. Действие высокой температуры на стадии спорогенеза в значительной степени подавляет I и II деления мейоза, что приводит к появлению ценомакроспор, монад, диад и триад.
3. Изменчивость формирования материнских клеток ЗМ под влиянием высокой температуры обусловлена предшествующими процессами в спорогенезе и возможностью одновременного развития нескольких спор.
4. В гаметогенезе повышение температуры приводит к индукции митотических делений, подавлению цитокинеза и формированию синергидоподобных яйцеклеток.
5. Процессы формирования женского гаметофита подвержены фенотипической изменчивости и влияние экологических факторов следует учитывать при диагностике систем размножения, в систематике и эмбриологии.

Варшавина

