

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

Кафедра генетики

**ЦИТОЭМБРИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ
ГЕНЕРАТИВНЫХ СТРУКТУР ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ФОРМ
КУКУРУЗЫ**

Автореферат бакалаврской работы

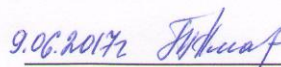
Студентки 4 курса 421 группы

Направления 06.03.01 Биология

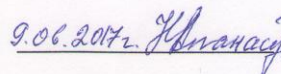
Биологического факультета

Харламовой Ирины Игоревны

Научный руководитель
доцент кафедры генетики,
к.б.н.

9.06.2017г.  Т.А.Алаторцева

Научный консультант
ведущий биолог
УНЦ «Ботанический сад СГУ»,
г. Саратов

9.06.2017г.  Н.В. Апанасова

Зав.кафедрой генетики,
д.б.н., профессор

9.06.2017г.  О.И.Юдакова

Саратов 2017

ВВЕДЕНИЕ

Явление гаплоидии широко используется в селекции. В норме у кукурузы гаплоиды встречаются с очень низкой частотой (1:1000). Предпринимались попытки увеличить частоты гаплоидии путем воздействия температур, радиации, различными физиологически активными веществами (Хохлов, 1976). В последнее время разработан ряд методов, позволяющих увеличить частоту возникновения гаплоидов. Основными методами является использование линий – гаплоиндукторов (Тырнов, Завалишина, 1984; Гуторова, Апанасова, Юдакова, 2016), получение гаплоидов в культуре *in vitro* изолированных пыльников и микроспор (Суханов, Тырнов, 1976; Круглова, 2002), метод гаплопродюссера, основанный на межвидовых скрещиваниях (Дьячук, 2003). Гаплоиды успешно используются для практических целей – ускоренного получения линий, мутантов, повышения эффективности отбора и проведения ряда биотехнологических операций (Тырнов, 1998).

Один из новых методов основан на получении линий доноров партеногенеза. Такие линии были получены в отделе генетики и репродуктивной биологии Саратовского государственного университета.

Изучение цитоэмбриологических характеристик полученных линий, в том числе и таких как особенности развития зародышевых мешков, склонность к апомиксису и полиэмбрионии, позволяет определить факт передачи им склонности к партеногенезу. Представляет интерес создание и всестороннее изучение генетически маркированных партеногенетических линий кукурузы с хорошо выраженными фенотипическими признаками растения и семян (Тырнов, 2002; Tyrnov, 1997). Получение новых генетически маркированных партеногенетических линий позволит упростить передачу генов партеногенеза в другие линии, контролировать гомо- и гетерозиготность апомиктов, автономное или половое происхождение эндосперма. Можно будет определять характер выпадения мейоза (в первом

или во втором делении) или наличие апоспории (Гуторова, Апанасова, Юдакова, 2016; Тырнов, 2002).

Цель настоящей работы: оценить проявления признаков партеногенеза у генетически маркированных линий кукурузы.

Задачи эксперимента:

1. Проанализировать зародышевые мешки (ЗМ) серии линий АТТМ и ее родительских форм (АТ-1 и Тестер Мангельсдорфа).
2. Выявить в зародышевых мешках все типы отклонений от типичного развития и определить их частоту.
3. Выделить характерные, наиболее часто встречающиеся признаки, которые можно использовать для диагностики партеногенеза.
4. Оценить размер и качество пыльцевых зерен у линий с проявлением различных маркерных генов и их родительских форм.

Краткая характеристика материалов и методов.

Объектами исследования являлись:

1. Партеногенетическая линия АТ-1, у которой частота развития автономного проэмбрио составляет до 82% (Еналеева, 1994; Тырнов, 1983). Линия характеризуется пурпурными зерновками и пурпурной окраской листьев.

2. Линия Тестер Мангельсдорфа (ТМ), имеющая хорошо проявляемые фенотипические признаки по всем 10 хромосомам и не склонная к проявлению партеногенеза.

3. Серия линий АТТМ: АТТМ-1 lg_1, bm_2, wx, y_1 ; АТТМ-2 lg_1, bm_2, y_1 ; АТТМ-3 bm_2, wx, y_1 , АТТМ-4 y_1, bm_2 АТТМ-5 lg, j, y АТТМ-6 y_1, bm_2, g_1 . Линии были отобраны в самоопыленном потомстве гибрида между линиями Тестер Мангельсдорфа и АТ-1, и имели различные фенотипы.

Посадка растений кукурузы производилась на экспериментальном поле НПО "Сорго". Кукуруза высаживалась по правилам селекционной работы (делянки 4 ряда по 15–20 растений). Перед появлением рылец початки

кукурузы линий АТТМ, АТ-1 и ТМ помещали под пергаментные изоляторы. На седьмые сутки после появления первых пестичных нитей початки фиксировали в смеси ацетоалкоголя (3 части этилового спирта: 1 часть ледяной уксусной кислоты) (Юдакова, 2012). Через месяц после фиксации из початков пинцетом извлекали завязи, которые затем переводили в 70 % спирт для длительного хранения.

Для проведения цитозембриологического анализа зародышевых мешков использовали метод ферментативной мацерации с последующей диссекцией семяпочек (Юдакова, 2012).

Для изучения микрогаметофитогенеза и структуры зрелых пыльцевых зерен используют метод приготовления ацетокарминовых препаратов зрелой пыльцы (Юдакова, 2012).

Просмотр препаратов пыльцы и зародышевых мешков проводили при использовании микроскопа Axio Star фирмы Zeis при увеличении 10×40.

Структура и объем работы. Работа изложена на 56 страница машинописного текста и включает в себя введение, 3 главы с таблицами, рисунками, выводы. Список использованных источников содержит 48 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Строение женского гаметофита

Всего было исследовано 600 зародышевых мешков (ЗМ) серии линий АТТМ: АТТМ-1 lg_1, bm_2, wx, y_1 ; АТТМ-2 lg_1, bm_2, y_1 ; АТТМ-3 bm_2, wx, y_1 , АТТМ-4 y_1, bm_2 АТТМ-5 lg, j, y АТТМ-6 y_1, bm_2, g_1 . Кроме того проанализировано по 100 мегагаметофитов родительских линий АТ-1 и ТМ. В результате микроскопического исследования препаратов выделены следующие основные группы ЗМ:

- 1) типичного строения;
- 2) с дополнительными яйцеклетками.
- 3) с партеногенетическим проэмбрио,
- 4) с дополнительными полярными ядрами

Зародышевые мешки типичного строения у всех изученных линий АТТМ, АТ-1 и ТМ по морфологии соответствуют описанию мегагаметофитов кукурузы других исследователей [15, 24]. Зародышевый мешок, как правило, имеет яйцевидно-удлиненную форму, в его микропилярной части расположен яйцевой аппарат. Яйцеклетка занимает центральное положение. По обеим сторонам расположены синергиды. Ядро яйцеклетки крупнее ядер синергид и занимает апикальное положение. Ядра синергид смещены к микропилярному концу и почти прилегают к нитчатому аппарату. Под яйцевым аппаратом находятся два полярных ядра. Комплекс антипод находится в халазальной части зародышевого мешка, их число может достигать 30 и более.

У линий АТ-1 и АТТМ встречались мегагаметофиты с дополнительными яйцеклетками, которые могли возникнуть в результате деления первичной яйцеклетки вследствие заложения первичной перегородки при митотическом делении. В таких ЗМ отчетливо были видны синергиды типичного строения. Другие мегагаметофиты содержали дополнительные яйцеклетки при отсутствии одной или обеих синергид. Можно предположить, что это яйцеклеткоподобные синергиды, имеющие полное сходство с яйцеклеткой по расположению и строению ядер. Отмечены мегагаметофиты с развитием одного, реже двух проэмбрио. (таблицы 1, 2).

Таблица 1 – Строение мегагаметофитов у генетически маркированных линий кукурузы АТТМ

Строение зародышевых мешков, %	Линии					
	АТТМ-1 <i>lg₁, bm₂, wx, y₁</i>	АТТМ-2 <i>lg₁, bm₂, y₁</i>	АТТМ-3 <i>bm₂, wx, y₁</i>	АТТМ-4 <i>y₁, bm₂</i>	АТТМ-5 <i>lg, j, y</i>	АТТМ-6 <i>y₁, bm₂, g₁</i>
Типичные	97,0	95,0	99,0	89,0	92,0	95,0
2 яйцеклетки	2,0	3,0	0	3,0	2,0	2,0
3 яйцеклетки	0	0	1,0	0	1,0	0
Прорэмбрио	1,0	2,0	0	6,0	3,0	3,0
2 проэмбрио	0	0	0	1,0	1,0	0
дополнительные ПЯ	0	0	0	1,0	1,0	0

Таблица 2 – Строение мегагаметофитов у линии кукурузы АТ-1

Морфологические особенности ЗМ	Количество, %
	%
Типичного строения	92,0
2 яйцеклетки	2,0
3 яйцеклетки	1,0
Проэмбрио	4,0
Недифференцированный зародышевый мешок	1,0

У линии АТТМ-1 (*lg₁, bm₂, wx, y₁*) отмечен один случай развития партеногенетического проэмбрио, в двух мегагаметофитах отмечено возникновение дополнительных яйцеклеток; у линии АТТМ-2 (*lg₁, bm₂, y₁*) наблюдали формирование партеногенетического проэмбрио в двух случаях, а дополнительных яйцеклеток в трех; у линии АТТМ-3 (*bm₂, wx, y₁*) партеногенетических проэмбрио отмечено не было, один мегагаметофит

содержал 3 яйцеклетки, две из которых по местоположению находились на месте синергид, а по морфологии были яйцеклетками. Шесть зародышевых мешков линии АТТМ-4 (y_1, bm_2) содержали партеногенетический проэмбрио, один мегагаметофит был с двумя партеногенетическими проэмбрио, один из них предположительно возник из яйцеклетки, а другой из дополнительной яйцеклетки; линия АТТМ-5 (lg, j, y_2) характеризовалась двумя мегагаметофитами с дополнительной яйцеклеткой и одним с двумя дополнительными яйцеклетками, партеногенетический проэмбрио развился в трех зародышевых мешках, один зародышевый мешок содержал два партеногенетических проэмбрио; анализ линии АТТМ-6 (y_1, bm_2, g_1) показал развитие трех мегагаметофитов с партеногенетическими проэмбрио и двух с дополнительной яйцеклеткой.

Для линии АТ-1 был характерен тот же спектр аномалий: партеногенетические проэмбрио 4,0%, одна дополнительная яйцеклетка 2,0%, две дополнительные яйцеклетки 1,0% (рисунок 1).

Так как возникновение дополнительных яйцеклеток свидетельствует о потенциальной возможности развития из них партеногенетических проэмбрио (которые впоследствии могут развиваться в близнецовые растения) способность к партеногенезу можно оценивать по сумме встречаемости проэмбрио и полигаметии. У серии линий АТТМ суммарная встречаемость данных явлений составила от 1 до 11%. У родительской партеногенетической линии АТ-1 эти явления составили 7%.

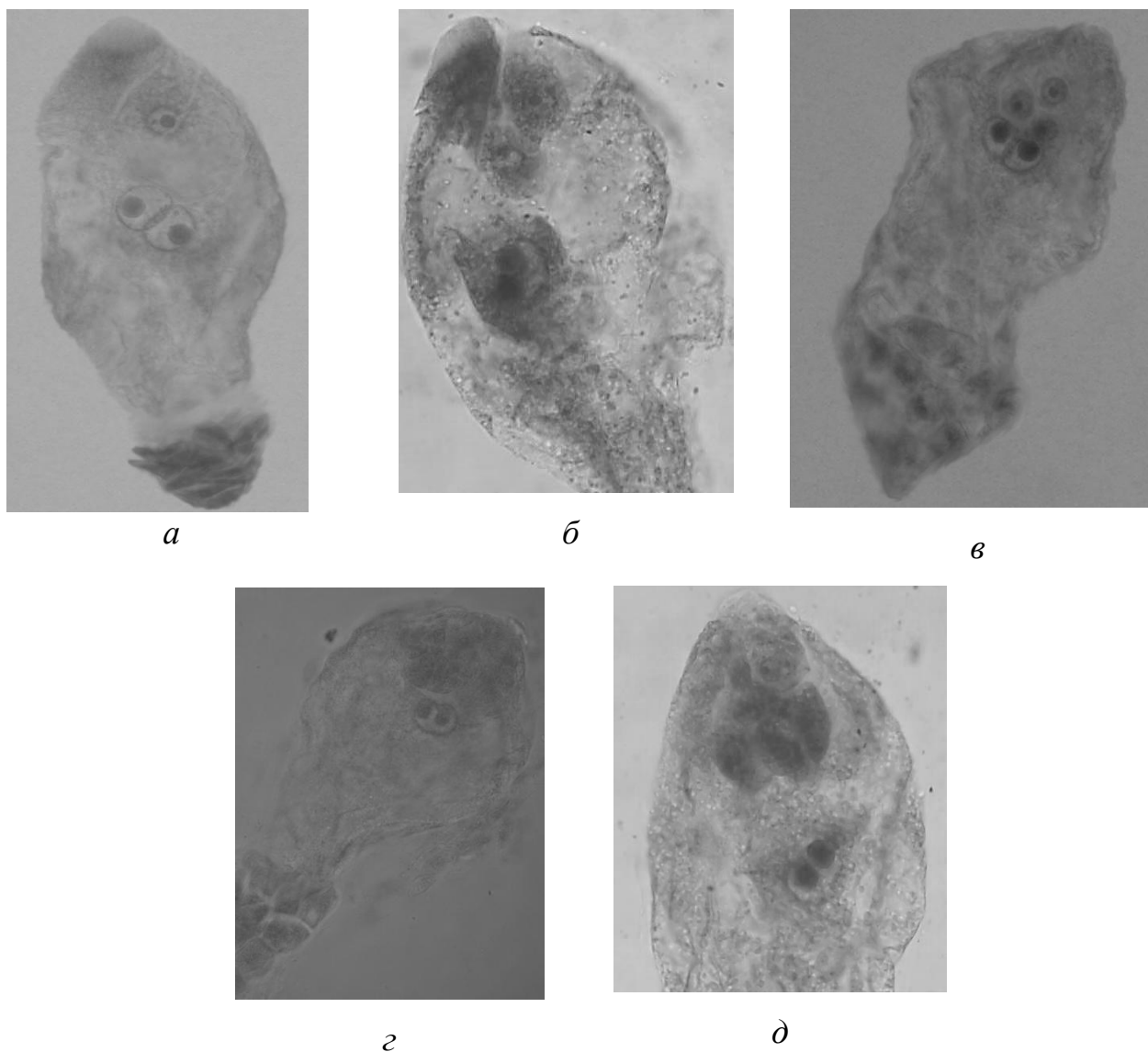


Рисунок 1 – Зародышевые мешки партеногенетических линий: *а*– зародышевый мешок типичного строения; *б* – зародышевый мешок с двумя яйцеклетками; *в* – зародышевый мешок с тремя яйцеклетками; *г*– зародышевый мешок с партеногенетическим проэмбрио; *д* – зародышевый мешок с двумя партеногенетическими проэмбрио.

У линии кукурузы ТМ все зародышевые мешки были типичного строения, отмечен только один случай нарушения дифференциации, когда зародышевый мешок содержал только одну клетку, которая занимала центральное положение (таблица 3).

Таблица 3 – Строение зародышевых мешков линии кукурузы Тестер Мангельсдорфа

Морфологические особенности ЗМ	Количество, %
Типичного строения	99,0
Нарушение дифференциации*	1,0

Линия ТМ не имеет склонности к партеногенезу. Развития автономного проэмбрио и образования дополнительных яйцеклеток отмечено не было.

Строение мужского гаметофита

Проведен анализ пыльцы шести линий кукурузы АТТМ и ее родительских форм АТ-1 и ТМ, для определения качества пыльцы исследуемых линий (таблицы 4,5) Для каждого растения изучали около 300 пыльцевых зерен.

Таблица 4 – Качество пыльцы изученных линий и гибридов кукурузы

Вариант	Количество пыльцевых зерен в %			Степень диффектности пыльцы в %	Количество исследуемых пыльцевых зерен в шт
	нормальные	С плазмолизом	пустые		
АТТМ-1 <i>lg₁, bm₂, wx, y₁</i> ,	94,5	3,5	2	5,5	309
АТТМ-2 <i>lg₁, bm₂, y₁</i>	89,7	4,7	5,6	10,3	320
АТТМ-3 <i>bm₂, wx, y₁</i>	88	8,7	3,2	11,9	310
АТТМ-4 <i>y₁, bm₂</i>	96,3	1,9	1,87	3,74	321
АТТМ-5 <i>lg, j, y</i>	97,9	1,5	0,6	2,1	330
АТТМ-6 <i>y₁, bm₂, g₁</i>	89,3	4,9	5,82	10,67	309
ТМ	91,4	3,5	5,1	8,61	313
АТ-1	74,5	2,86	22,6	25,46	314

Основная часть зрелых пыльцевых зерен контрольных растений имеет типичное для кукурузы строение, соответствующее описаниям других авторов [16, 24, 48].

Пыльцевые зерна нормального строения сфероидальные, реже эллипсоидальные, однопоровые, содержат одну вегетативную клетку и два спермия. Спермии достаточно крупные, удлинённой формы. Ядра спермиев лишены ядрышек. Поверхность ядра ровная, а на удлинённых концах волнистая, иногда образует небольшие выпячивания. В некоторых пыльцевых зернах были видны тяжи, отходящие от обоих концов спермиев. Считается, что посредством таких отростков спермии остаются связанными друг с другом на пути их продвижения к месту контакта с яйцеклеткой и центральной клеткой [28].

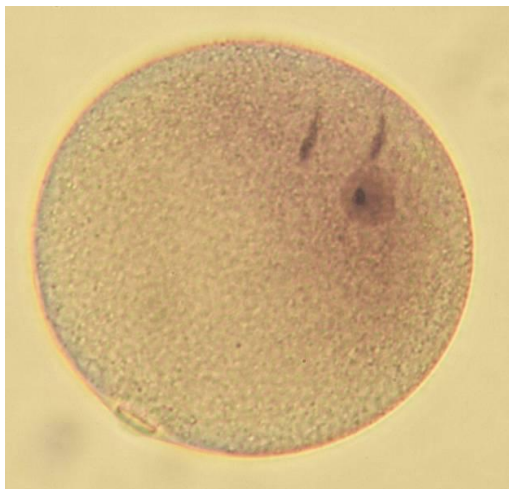
Вегетативная клетка обычно имеет одно крупное ядро шаровидной формы. Иногда вегетативное ядро меняет свою конфигурацию, принимает амёбообразную форму, сильно вытягивается или распадается на отдельные фрагменты. Вегетативные ядра всегда содержат одно ядрышко.

Выделены следующие типы дефектных пыльцевых зерен:

1. Плазмолизированные
2. Пустые (таблица 5, рисунок 2).

При анализе пыльцы партеногенетических линий АТТМ и АТ-1 были отмечены плазмолизированные и пустые ПЗ. Частота встречаемости ПЗ с плазмолизом составила от 1,5 до 8,9%. У контрольной линии ТМ отмечено 3,5% плазмолизированных ПЗ. Пустые ПЗ у партеногенетических линий составили от 0,6 до 22,6 (у линии АТ-1). В контрольной линии ТМ присутствовало 5,1% пустых ПЗ. Данные аномалии (плазмолизированные и пустые ПЗ) могли быть вызваны природными факторами (влажность,

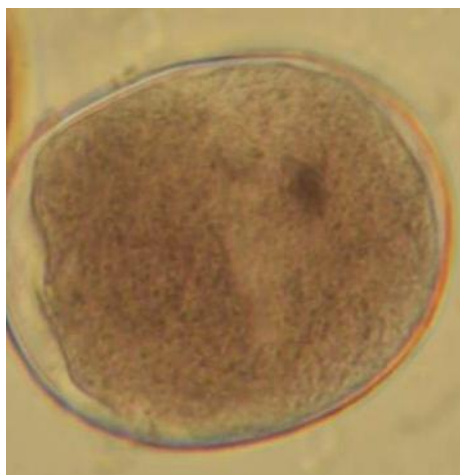
температура воздуха). И не могут быть использованы для диагностики партеногенеза у данных линий кукурузы.



a



б



в

Рисунок 2 – Строение пыльцевых зерен у линий кукурузы:
a – нормального строения; *б* – пустые; *в* – с плазмолизом.

В результате изучения количественных характеристик пыльцы линии были оценены по размерам пыльцевых зерен (таблица 5, рисунок 3).

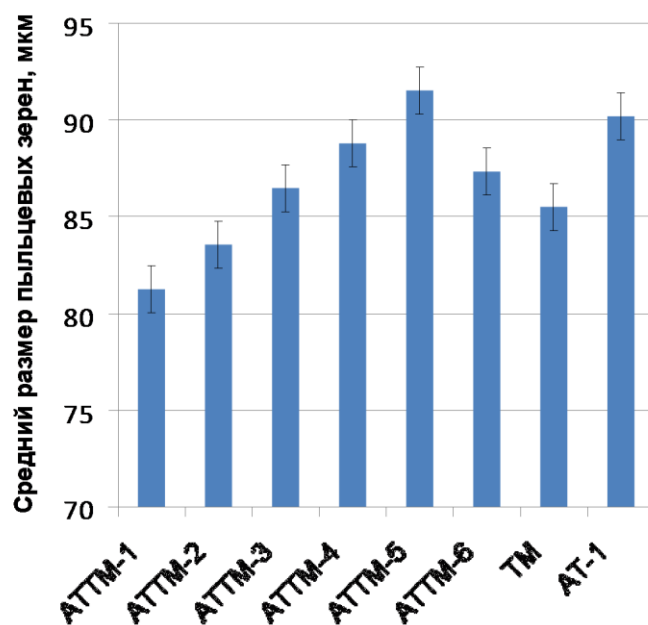


Рисунок 3 – Размеры пыльцевых зерен у линий кукурузы.

Средний размер ПЗ составил у линии АТТМ $81,26 \pm 0,45$ мкм (таблица 5), коэффициент вариации 3,20 %. У линии АТТМ-2 $83,57 \pm 0,53$, при коэффициенте вариации 3,78. Линия АТТМ-3 характеризовалась средним размером пыльцевых зерен $86,5 \pm 0,51$ (коэффициент вариации 3,60).

Таблица 5 – Размеры пыльцевых зерен у серии линий кукурузы АТТМ и их родительских форм.

Вариант	Средний размер ПЗ в мкм	Коэффициент вариации %
АТТМ-1 <i>lg₁,bm₂,wx,y₁</i>	$81,26 \pm 0,45$	3,20
АТТМ-2 <i>lg₁,bm₂,y₁</i>	$83,57 \pm 0,53$	3,78
АТТМ-3 <i>bm₂,wx,y₁</i>	$86,5 \pm 0,51$	3,60
АТТМ-4 <i>y₁,bm₂</i>	$88,8 \pm 0,56$	3,95
АТТМ-5 <i>lg,j,y</i>	$91,55 \pm 0,53$	3,80
АТТМ-6 <i>y₁,bm₂,g₁</i>	$87,34 \pm 0,67$	4,70
ТМ	$85,52 \pm 0,54$	3,80
АТ-1	$90,02 \pm 0,67$	4,74

Линия АТТМ-4 имела средний размер пыльцевых зерен $88,8 \pm 0,56$, при коэффициенте вариации 3,95. Средний размер ПЗ у линии АТТМ-5 составил 91,55, при коэффициенте 3,80. У линии АТТМ-6 $87,34 \pm 0,67$, коэффициент составил 4,7. Показано, что все линии имеют сходный размер пыльцевых зерен, а также соответствуют размерам ПЗ родительских форм: АТ-1 - $90,02 \pm 0,67$, ТМ - $85,52 \pm 0,54$. Значительных различий по размерам у исследованных линий не отмечено. Размер ПЗ у серии линий АТТМ соответствовал размеру ПЗ родительских форм.

ВЫВОДЫ

1. Проанализированы зародышевые мешки серии линий АТТМ и ее родительских форм (АТ-1 и Тестер Мангельсдорфа).

2. В зародышевых мешках серии линий АТТМ встречались отклонения от типичного развития: партеногенетические проэмбрио и дополнительные яйцеклетки.

3. Частота встречаемости партеногенетических проэмбрио достигала 7%. Отмечены мегagamетофиты как с одним, так и двумя проэмбрио. Частота встречаемости дополнительных яйцеклеток варьировала от 1 до 3%. Отмечены мегagamетофиты с одной и двумя дополнительными яйцеклетками.

4. Показано, что все линии имеют сходный размер пыльцевых зерен и соответствуют размерам ПЗ родительских форм. Значительных различий по размерам у исследованных линий не отмечено.

5. Выявленные аномалии (плазмолизированные и пустые ПЗ) могли быть вызваны природными факторами (влажность, температура воздуха) и не могут быть использованы для диагностики партеногенеза у данных линий кукурузы.

Харф