

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 РАЗВИТИЯ МУЖСКОГО И
ЖЕНСКОГО ГАМЕТОФИТОВ У ГЕТЕРОПЛОИДНЫХ ФОРМ
КУКУРУЗЫ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 421 группы

Направления 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Пиманкиной Ольги Сергеевны

Научный руководитель,

к.б.н., доцент кафедры генетики

Лобанова 19.06.17г. Л.П. Лобанова

Научный консультант

к.б.н., зав. отделом генетики

УНЦ «Ботанический сад»

Колесова 19.06.17г. А.Ю. Колесова

Зав. кафедрой генетики,

д.б.н., профессор

Юдакова 19.06.17г. О.И. Юдакова

Саратов 2017

Введение. Кукуруза (*Zea mays* L.) – одна из наиболее древних и распространенных в мире зерновых культур. Именно на кукурузе были проведены широкие селекционно-генетические работы, позволившие открыть принципиально новые методы в практической селекции: создание инцухт-линий, построение сложных гибридологических схем и создание на этой основе высокоурожайных сортов. Благодаря теоретическим исследованиям кукурузы, выявлена прямая связь между цитогенетическими наблюдениями и генетическими проявлениями в потомстве. Значение кукурузы трудно переоценить, и есть основание полагать, что вид *Zea mays* L. обладает большими потенциальными возможностями, как в увеличении урожайности, так и в расширении сферы применения самой культуры – пищевого, кормового, технического и других типов потребления. Одним из важных направлений в селекции кукурузы является экспериментальное получение тетраплоидных форм.

В результате увеличения числа хромосом, меняется выраженность признаков, характер наследования признаков, пластичность формы, ее адаптационные возможности. Особенно перспективен перевод полиплоидных форм кукурузы на апомиктический способ размножения. Это может привести к увеличению урожайности, однородности сортов и снижению стоимости производства гибридных семян. Одним из подходов является передача апомиксиса путем гибридизации полиплоидной кукурузы с партеногенетическими линиями, которые могут служить донорами этого признака. В этом направлении работы по созданию апомиктической тетраплоидной кукурузы, проводимые на кафедре генетики СГУ, являются весьма перспективными.

Актуальность изучения развития и строения генеративных структур у полиплоидных растений обусловлена рядом причин. Во-первых, такие исследования позволяют выявить цитозэмбриологическую причину мужской и женской стерильности полиплоидов. Во-вторых, определить зависимость развития гаметофитов от числа наборов хромосом. В-третьих, служат основой

для определения возможности передачи гибридному полиплоидному потомству признаков апомиксиса от апомиктических линий.

Целью данной работы явилось изучение пыльцы и зародышевых мешков у диплоидной и тетраплоидной форм кукурузы с признаками апомиксиса.

В задачи исследования входило:

- 1) изучение строения пыльцы у разноплоидных форм кукурузы;
- 2) изучение строения зародышевых мешков у разноплоидных форм кукурузы;
- 3) проведение сравнительного анализа развития мужского и женского гаметофитов у диплоидных и тетраплоидных растений;
- 4) выявление возможности передачи признаков апомиксиса гибридному тетраплоидному потомству от диплоидной партеногенетической линии АТ-1.

Объектом исследования послужили три формы кукурузы:

- диплоидная партеногенетической линии АТ-1, созданная В.С. Тырновым на кафедре генетики СГУ;
- тетраплоидная форма КрП-1, полученная из Краснодара и
- гибридная тетраплоидная форма, полученная А.Ю. Колесовой при опылении растений КрП-1 пыльцой линии АТ-1.

Материалом для исследования послужили пыльца и зародышевые мешки. Анализ пыльцы проводили на временных препаратах, окрашенных ацетокармином. Пыльца всех вариантов анализировалась с семи растений. Всего было исследовано 9030 зрелых пыльцевых зерен

Для анализа зародышевых мешков использовали метод ферментативной мацерации, с последующей диссекцией семязачатков, и вычленением из них зародышевых мешков с помощью электролитически заточенных микроигл. Всего было проанализировано 1370 зародышевых мешков.

Основное содержание работы. При определении степени дефектности пыльцы к дефектной пыльце принято относить выполненные мелкие и крупные ПЗ и пыльцевые зерна с разной степенью плазмолиза вплоть до полной дегенерации содержимого. В качестве «нормальных» считали ПЗ среднего размера, выполненные и хорошо окрашенные.

Результаты анализа пыльцы и соотношение количества выполненной пыльцы и с признаками дегенерации содержимого представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Степень дефектности пыльцы у разноплоидных форм кукурузы

Вариант, плоидность	№ растения	Число проанализированных ПЗ, шт.	ПЗ, %				СДП, %
			выполненные			дегенерирующие+пустые	
			мелкие	средние	крупные		
АТ-1, 2n	1	564	1,0	92,5	2,5	4,0	7,5
	2	350	0,7	92,9	1,7	4,7	7,1
	3	356	0,0	90,6	1,1	8,3	9,4
	4	404	2,3	86,6	1,7	9,4	13,4
	5	363	1,5	94,9	2,0	1,6	5,1
	6	480	0,0	91,0	0,5	8,5	9,0
	7	520	0,0	94,6	1,4	4,0	5,4
	среднее		0,8	91,8	1,6	5,8	8,2
КрП-1, 4n	1	623	6,4	80,8	6,4	6,5	19,2
	2	514	11,6	61,1	6,1	21,2	38,9
	3	500	17,1	66,7	11,4	12,9	33,3
	4	423	12,2	55,7	10,7	21,4	44,3
	5	569	18,1	57,7	5,9	18,3	42,3
	6	425	16,9	58,5	13,7	10,9	41,5
	7	400	20,9	53,1	11,5	14,5	46,9
	среднее		14,4	63,1	10,6	14,9	37,2*
КрП-1×АТ-1, 4n	1	350	19,6	56,1	14,0	10,3	43,9
	2	489	15,5	62,9	12,8	8,8	37,1
	3	376	8,6	52,9	25,7	12,7	47,0
	4	431	17,9	77,5	1,1	3,5	22,5
	5	502	17,1	66,7	11,4	4,8	33,3
	6	360	23,1	58,5	6,2	12,4	41,6
	7	435	16,5	71,1	10,8	1,6	28,9
	среднее		16,9	63,7	11,7	7,7	36,3*

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

У всех исследованных тетраплоидных растений степень дефектности пыльцы оказалась высокой и в среднем у разных тетраплоидных форм составила 36 и 37%. Обнаружено, что основная доля дефектной пыльцы представлена выполненной пылью мелкого или крупного размера, которые могут иметь иной, чем в норме, уровень плоидности. При этом доля дегенерирующей пыльцы у КрП-1 была в 2,5 раза, а у тетраплоидной формы КрП-1×АТ-1 в 4,7 раза меньше, чем доля выполненной мелкой и средней пыльцы.

Выполненные пыльцевые зерна во всех исследованных вариантах имеют в основном типичное для пыльцы кукурузы клеточное строение. Большинство из них имеют шаровидную форму, одну пору, одно вегетативное ядро и два спермия. Анализ клеточной организации пыльцы разных вариантов показал, что аномальная пыльца представлена тремя основными типами: остановкой развития на ранних стадиях, увеличением числа ядер и клеток и атипичной формой. Тетраплоидные линии достаточно четко отличаются от диплоидной спектром зарегистрированных аномалий (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты анализа строения пыльцы у растений кукурузы разной плоидности

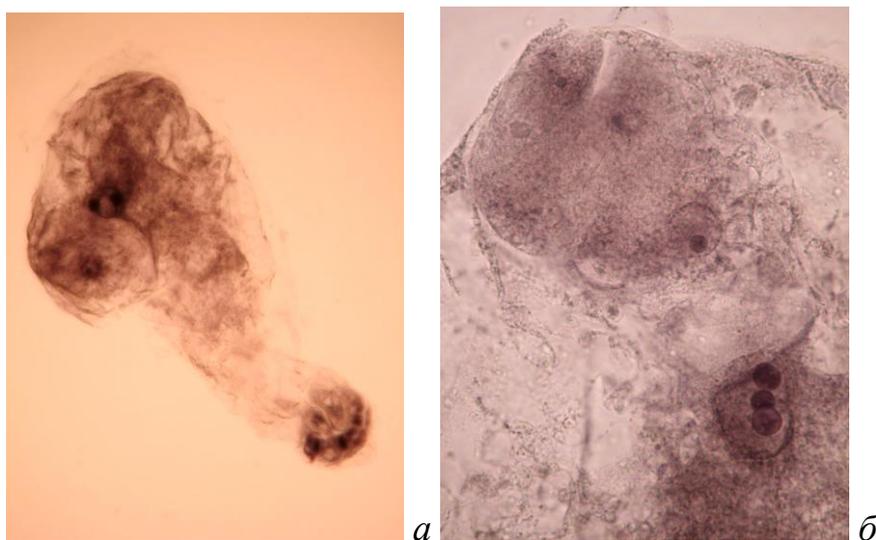
Вариант	№ растения	Число проанализированных ПЗ	ПЗ нормального строения, %	ПЗ аномального строения (%) с:					ПЗ атипичной формы
				1-ядерные	2-ядерные	ВЯ +ГЯ	2 ВЯ+ 2СП	1 ВЯ +3-6 СП	
АТ-1, 2n	1	480	95,1	0,0	4,9	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	207	90,8	5,7	1,8	1,3	0,4	0,0	0,0
	3	218	99,0	0,0	0,5	0,0	0,5	0,0	0,0
	4	204	97,1	0,0	0,5	0,0	1,9	0,5	0,0
	5	300	99,4	0,0	0,0	0,3	0,0	0,3	0,0
	6	208	98,1	0,0	0,5	0,5	0,9	0,0	0,0
	среднее			96,6	1,0	1,3	0,4	0,6	0,1
КрП-1, 4n	1	152	91,1	1,9	0,9	0,9	0,9	1,4	2,9
	2	164	95,6	0,0	1,5	0,0	1,5	0,0	1,4
	3	168	92,5	0,5	1,0	0,5	2,0	1,0	2,5
	4	163	96,0	0,0	0,7	0,0	0,7	0,8	1,8
	5	211	91,1	1,0	0,7	1,5	3,2	0,0	2,5
	6	439	89,3	1,1	1,9	1,0	2,3	0,9	4,5
	7	637	90,8	0,7	1,1	0,6	2,1	1,0	3,7
	среднее			92,3	0,8	1,1	0,6	1,8	0,6
КрП-1× АТ-1, 4n	1	200	97,1	0,0	0,0	0,5	1,0	0,5	0,9
	2	198	94,5	1,0	0,5	0,0	0,9	1,0	2,1
	3	200	93,6	1,0	0,0	1,5	0,0	0,5	3,4
	4	200	99,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8
	5	308	91,3	1,6	0,6	0,0	1,3	1,3	3,9
	6	280	96,6	0,6	0,4	0,0	0,9	0,4	1,1
	7	295	96,9	0,3	0,0	0,0	0,1	0,0	2,7
	среднее			95,6	0,6	0,2	0,3	0,6	0,5

У тетраплоидных растений КрП-1 увеличивается доля ПЗ с дополнительными клеточными элементами (с числом ядер более трех) и

появляются ПЗ аномальной формы. Появление пыльцы с дополнительными клетками и ядрами свидетельствует о дополнительных митозах в микрогаметогенезе, вероятно, не всегда правильных. Именно дополнительные митозы являются причиной образования ПЗ или с двумя вегетативными ядрами и двумя спермиями, или дополнительными спермиями, или микроядрами. Особый интерес представляют ПЗ с дополнительными спермиями, которые, вероятно, могут иметь как нормальный, так и измененный набор хромосом.

Заметное увеличение числа ПЗ аномального строения у тетраплоидных растений произошло за счет образования крупных пыльцевых зерен неправильной формы. Среди них встречались овальные, каплевидные, гантелевидные ПЗ, а также структуры более сложной формы.

Зародышевые мешки у тетраплоидной формы КрП-1 имеют в основном типичное для кукурузы строение (97,5%). Нормальные зародышевые мешки содержат трехклеточный яйцевой аппарат, центральную клетку с двумя полярными ядрами или одним полярным ядром и комплекс антиподальных клеток (рисунок 1а). Обнаружены 3 мешка с изменениями в типичной структуре (2,5 %). Из них один содержал три полярных ядра (рисунок 1б), в двух наблюдались синергидоподобные яйцеклетки.



а – нормального строения; *б* – три полярных ядра

Рисунок 1 – Зародышевые мешки у тетраплоидной линии КрП-1

У линии АТ-1 были выделены три основные группы зародышевых мешков: 1) с типичным строением (нормальные ЗМ);

2) с измененной структурой яйцевого аппарата;

3) с автономным эмбриогенезом и эндоспермогенезом.

Нормальное строение у линии АТ-1 имеют 92,6% ЗМ. К ЗМ нормального строения были также отнесены мешки с изменениями в антиподальном комплексе, но с типичным строением остальных элементов ЗМ.

ЗМ с нарушением структуры яйцевого аппарата и центральной клетки, а также с элементами апомиксиса были объединены в одну группу – «аномальные ЗМ». В среднем количество аномальных ЗМ у растений линии АТ-1 составило 7,4% (рисунок 2).

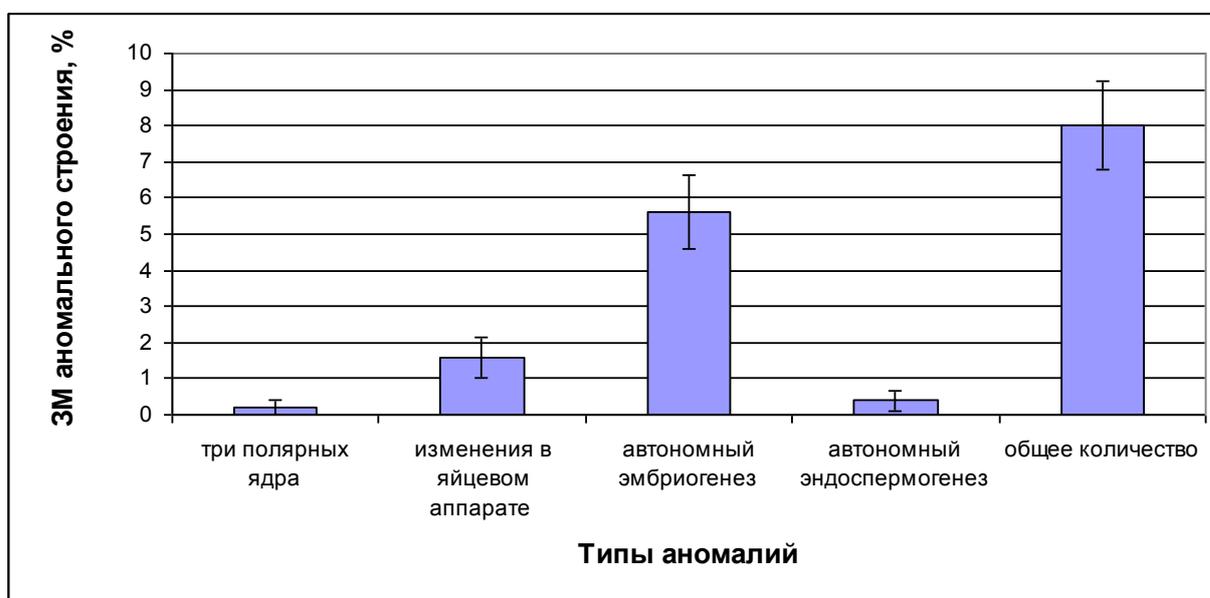


Рисунок 2 – Частота разных типов аномальных ЗМ у линии АТ-1

Среди ЗМ с изменениями типичной структуры преобладали ЗМ с автономным эмбриогенезом (рисунок 2). В 28 зародышевых мешках (5,6%) наблюдали развитие зародышей. Количество клеток в обнаруженных зародышах варьировало от 2 до 24. В некоторых зародышевых мешках в яйцевом аппарате присутствовали одна или две дополнительные клетки.

Изменения в комплексе антипод выражаются в тенденции к увеличению числа клеток и ядер в них. Крупные клетки, образовавшиеся в результате

разрастания антиподальных комплексов, встречались у 6% ЗМ. Учитывая типичное строение остальных элементов ЗМ, и характерную для многих видов вариабельность антипод, такие ЗМ не считались аномальными, но они свидетельствовали об увеличении вариабельности антиподального комплекса.

У тетраплоидного гибрида КрП-1×АТ-1 наряду с типичными зародышевыми мешками были обнаружены мешки аномального строения. Аномальные зародышевые мешки встречались у всех растений, их частота варьировала от 4,6 до 23,4%. Данные по частотам встречаемости разных типов отклонений представлены в таблице 3. К ним были отнесены зародышевые мешки с признаками апомиксиса и с нарушениями структуры яйцевого аппарата и центральной клетки.

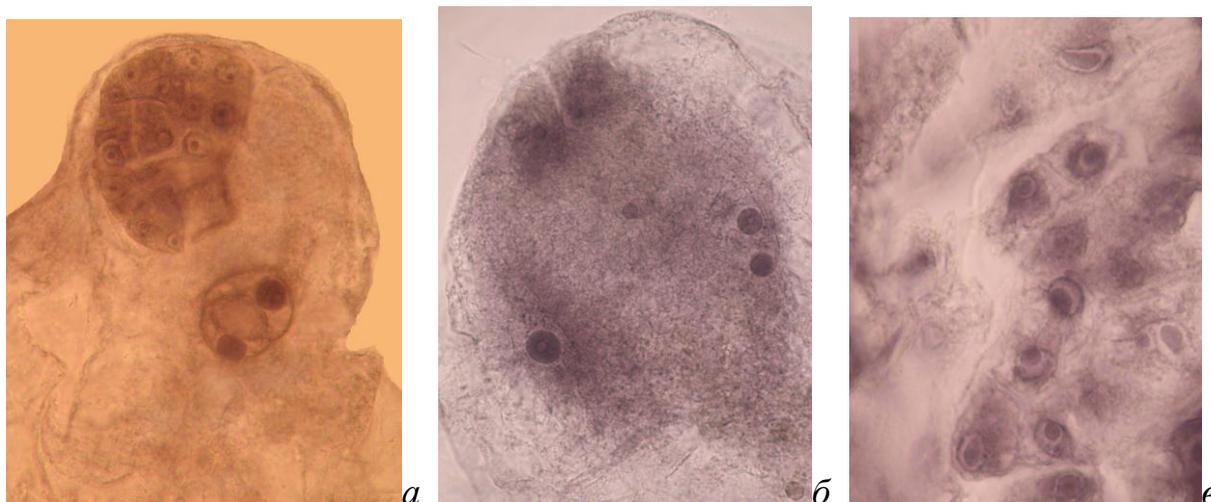
Таблица 3 – Результаты анализа зародышевых мешков тетраплоидной кукурузы КрП-1 × АТ-1

№ растения	Всего про-анализировано	ЗМ атипичного строения, %					
		всего	аномальной дифференциацией яйцевого аппарата	дополнительными клетками в яйцевом аппарате	дополнительными полярными ядрами	автономным развитием зародыша	автономным развитием эндосперма
1	41	7.3	2.9	2.4	-	2,0	-
2	126	4.6	1.0	0.8	-	3,0	-
3	127	13.4	0.8	-	1.9	3,6	7.1
4	115	23.4	8.7	2.6	0.9	4,4	7.0
5	103	10.1	5.2	1.0	1.9	1.0	1.0
6	149	19.5	5.4	4.0	1.3	8.1	0.7
7	87	14.9	6.9	-	4.6	3,5	-
среднее		13,4	4,4	1,5	1,5	3,7	2,3

У всех исследованных растений были обнаружены зародышевые мешки с автономным развитием зародышей (рисунок 3а), частота которых варьировала от 1,0 до 8,1%. Зародыши находились на разных стадиях – от двухклеточного проэмбрио до глобулярного, содержащего до 42 клеток. В двух зародышевых

мешках наряду с развивающимся зародышем присутствовала яйцеклетка, возникшая, по всей вероятности, вследствие нарушения дифференциации клеток яйцевого аппарата. В одном зародышевом мешке одновременно развивалось два зародыша (12- и 24-клеточный). Отмечено, что в одном зародыше клетки могли располагаться относительно друг по-разному: плотно или более рыхло, на некотором расстоянии друг от друга.

В среднем с частотой 2,3% у гибридных растений отмечено развитие автономного эндосперма. Число ядер эндосперма варьировало от 2 до 200 (рисунок 3б). В зародышевом мешке с 32-ядерным эндоспермом наблюдалось частичное заложение клеточных перегородок (начальная стадия клеткообразования) (рисунок 3в). Иногда отмечалась дегенерация части ядер эндосперма. Ядра автономного эндосперма часто содержали дополнительные ядрышки (от 1 до 3) и различались между собой по размеру



а – 24-клеточный зародыш; *б* – двухъядерный эндосперм; *в* – клеткообразование в эндосперме;

Рисунок 3 – Зародышевые мешки с автономным развитием зародыша и эндосперма

Среди аномальных ЗМ у формы КрП-1×АТ-1 преобладали ЗМ с изменениями в яйцевом аппарате. Сюда были отнесены зародышевые мешки с дополнительными клетками в яйцевом аппарате и измененной дифференцировкой синергид и яйцеклетки.

Сравнение нарушений в развитии пыльцы и зародышевых мешков выявило четкие различия в их распределении у исследованных форм кукурузы (рисунок 4). Если у партеногенетической линии АТ-1 среди гаметофитов аномального строения доминировали аномальные зародышевые мешки, то у тетраплоидной формы КрП-1 – аномальные пыльцевые зерна. У гибридного тетраплоида КрП-1×АТ-1 наблюдалось максимальное количество аномальных зародышевых мешков.

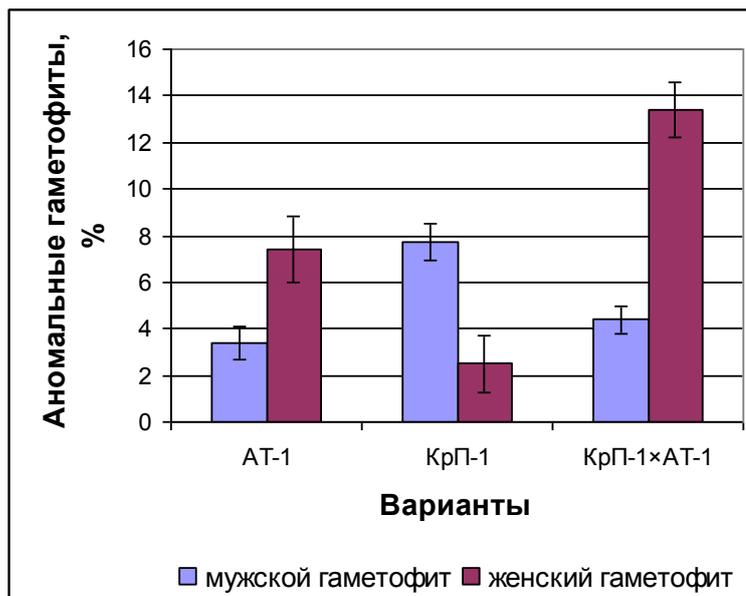


Рисунок 4 – Распределение пыльцы и зародышевых мешков аномального строения у партеногенетической линии АТ-1 и двух тетраплоидных форм кукурузы

Заключение. Полученные данные свидетельствуют, что генетические факторы, контролирующие автономное развитие зародыша, могут передаваться через мужские гаметы и экспрессироваться в разных генотипических средах. В работе представлены цитозэмбриологические доказательства проявления партеногенеза у кукурузы на полиплоидном уровне. Впервые проведено сравнение особенностей строения мужского и женского гаметофита у партеногенетических форм кукурузы разной пloidности, а также с тетраплоидной неапомиктической формой.

Установлено, что характер развития автономного зародыша и эндосперма, а также спектр аномалий зародышевых мешков у гибридной

тетраплоидной и диплоидной линии АТ-1 в значительной степени сходен. Вариабельность частоты зародышевых мешков с признаками апомиксиса у разных растений гибридного тетраплоида открывает возможность дальнейшего отбора растений с более высокой степенью партеногенеза у полиплоидной кукурузы. По результатам исследований были сделаны следующие выводы.

1. Пыльца тетраплоидных форм характеризуется высокой степенью дефектности, СДП которых составляет 36% и обусловлено в основном мелкой и крупной выполненной пылью.
2. Частота выполненных пыльцевых зерен аномального строения у тетраплоидной формы КрП-1 составила 7,7%. Аномальная пыльца представлена 2 основными типами: изменением числа клеточных элементов и атипичной формой пыльцевых зерен. У линии АТ-1 пыльца атипичной формы отсутствует. Обнаружена возможность передачи признака «атипичная форма пыльцы» гибридной тетраплоидной форме
3. У тетраплоидной формы КрП-1 формировалось незначительное количество аномальных зародышевых мешков (0,8%), и не выявлено ни одного случая автономного развития зародыша или эндосперма.
4. Диплоидная линия АТ-1 характеризуется устойчивым проявлением нередуцированного партеногенеза, его частота составляет 5,6%. Общая частота зародышевых мешков аномального строения у АТ-1 – 7,4%.
5. У гибридных тетраплоидных растений количество аномальных зародышевых мешков увеличивается до 13,4%. Зародышевые мешки с автономным развитием зародышей и эндосперма встречаются с частотой 6%. По этим признакам гибридные растения различаются между собой, что создает предпосылки для дальнейшего отбора на апомиксис.
6. Формирование у гибридной тетраплоидной формы зародышевых мешков с эмбриологическими предпосылками апомиксиса указывает на возможность их передачи от партеногенетической диплоидной линии АТ-1 на полиплоидный уровень.

