

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

Кафедра генетики

**ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА У  
ТЕТРАПЛОИДНОЙ КУКУРУЗЫ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 422 группы

направление 06.03.01 Биология

биологического факультета

Полубабкиной Анастасии Андреевны

Научный руководитель

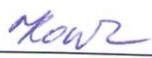
к.б.н., доцент кафедры генетики

 11.06.18 Л.П. Лобанова

Научный консультант

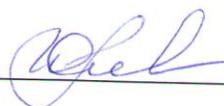
к.б.н., зав. отделом генетики

УНЦ «Ботанический сад»

 11.06.18 А.Ю. Колесова

Зав.кафедрой генетики,

д.б.н., профессор

 11.06.18 О.И. Юдакова

Саратов 2018

**Введение.** Изучение полиплоидных форм представляет особый интерес в связи с тем, что полиплоидия выступает одновременно и как генетический метод, используемый для получения нового селекционного материала, и как генетическое явление – своеобразный тип мутаций – мутаций генома.

В результате увеличения числа хромосом, меняется выраженность признаков, характер наследования признаков, пластичность формы, ее адаптационные возможности. Полиплоиды часто обладают большой вегетативной массой, крупными размерами семян, повышенной урожайностью. Полиплоидия позволяет преодолеть нескрещиваемость при отдаленной гибридизации, способствует повышению изменчивости генетического материала, делает возможным получение высокого эффекта гетерозиса и его закрепление на полиплоидном уровне.

Кукуруза является третьим по экономическому значению хлебным злаком в мировом производстве зерна, в чем важную роль сыграло ее постоянное селекционно-генетическое совершенствование.

Тетраплоиды кукурузы широко применяются в селекции. Это связано с возникновением у них ряда селекционно-ценных признаков, таких как увеличение вегетативной массы, рост урожайности, увеличение размеров метелки и початка, увеличение содержания жира, белка, каротиноидов и других веществ. В то же время у полиплоидов могут уменьшаться уровень фертильности, степень завязываемости и всхожести семян. Изучение развития и строения пыльца позволяет выявить цитогенетическую причину мужской стерильности у полиплоидов. Полученные данные служат основой для селекционного отбора по цитогенетическим признакам экспериментально созданных тетраплоидных культурных растений. Пыльцевой анализ позволяет определять репродуктивный потенциал растений по характерным морфологическим особенностям пыльцевых зёрен: клеточному строению, размеру, рисунку экзины, их фертильности и жизнеспособности. Все эти характеристики очень важны при проведении селекционных работ с целью получения продуктивного

потомства. Пыльцевой анализ является обязательным при оценке фертильности полиплоидных растений, в том числе кукурузы.

Целью данной работы являлось изучение особенности строения мужского гаметофита у 13 тетраплоидных форм кукурузы.

В задачи исследования входило:

1. Определить степень дегенерации зрелых пыльцевых зерен.
2. Оценить особенности клеточного строения пыльцы у разных форм тетраплоидной кукурузы.
3. Оценить возможность развития у исследуемых тетраплоидов пыльцевых зерен аномальной формы.

Объектом исследования послужили 13 тетраплоидных форм кукурузы (*Zea mays* L.). Материалом исследования послужила пыльца тетраплоидных форм кукурузы. Пыльцу фиксировали ацетоалкоголем (3:1) в разгар цветения утром через 0,5-1 часа после выбрасывания пыльников. Пыльца помещалась в пенициллиновый флакон или микропипетки с фиксатором, затем она перемешивалась путем встряхивания, вращения и перевертывания с целью получения равномерного ее перераспределения в объеме.

Для определения степени дефектности пыльцы (СДП) смесь пыльцы из фиксатора пипеткой переносилась на предметное стекло в каплю ацетокармина и препаровальной иглой перемешивалась. Каплю закрывали покровным стеклом и анализировали с помощью микроскопа “PrimoStar” при увеличении  $10 \times 40$ .

Анализ строения пыльцевых зерен проводился на временных препаратах, окрашенных ацетокармином.

Анализ препаратов и микрофотографирование проводили на микроскопе “ при увеличении  $10 \times 40$  на микроскопе “Axiostar-plus” с помощью программы визуализации “Zoombrowser”.

Бакалаврская работа состоит из следующих глав: введения, обзора литературы, материала и методов исследования, результатов исследования, заключения, выводов и списка использованных источников.

### Основное содержание работы.

При анализе пыльцы в первую очередь внимание было уделено степени дегенерации пыльцевых зерен. Дегенерирующая пыльца является стерильной и легко определяется визуально по степени разрушения содержимого ПЗ. В пыльце наблюдается разная степень денегерации вплоть до полного исчезновения цитоплазмы и ядер. В связи с этим, при первичном анализе были выделены два основных класса пыльцевых зерен: выполненные (нормальные) и дегенерирующие. Результаты анализа и соотношение количества выполненной пыльцы и пыльцы с признаками дегенерации содержимого представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты анализа пыльцы у тетраплоидных форм кукурузы

Вариант	Всего проанализировано	Выполненные ПЗ, %	Дегенерирующие ПЗ, %
5433 -1	1262	97,0	3,0
5433-2	1280	96,9	3,1
5433-3	1595	95,3	4,7
5434-1	1031	94,7	5,3
5434 -3	1776	80,0	20,0
5434-5	1722	89,3	10,7
5439-1	841	92,5	7,5
5446-3	1230	93,7	6,3
5449	878	73,0	27,0
5450	941	93,5	6,5
5451	1315	96,6	3,4
5464	922	73,9	26,1
5466	1544	94,30	5,7

Степень дегенерации пыльцы у изученных тетраплоидов варьировала от 3,1 до 27 %. Максимальная дефектность пыльцы зарегистрирована в трех вариантах: 5434-3, 5449 и 5464 и составила соответственно 20, 27 и 26 %. У всех трех вариантов тетраплоидов, относящихся к семейству 5433, обнаружено минимальное количество дегенерирующей пыльцы. Низкая

степень дегенерации наблюдалась также в варианте 5451. . Определение достоверности разницы между средними арифметическими отдельных растений проводилось с помощью критерия Стьюдента [41]. Доверительные интервалы были рассчитаны при уровне значимости 0,95 (5%). На представленных гистограммах видно, что доверительные интервалы большинства тетраплоидных форм не перекрываются (рисунок 2). Это указывает, что различия по степени дегенерации пыльцы между многими вариантами достоверны.



Рисунок 2 – Степень дегенерации пыльцы у тетраплоидных форм

Использование специальной методики окраски пыльцы позволило проанализировать клеточное строение пыльцевых зерен. Было показано, что выполненные пыльцевые зерна, без признаков дегенерации, могут иметь как нормальное, так и аномальное строение. Среди изучаемых тетраплоидов фрагментация вегетативных ядер с повышенной частотой наблюдалась у 4-х форм: 5433-2, 5446-3, 5450 и 5451. У остальных форм пыльцевые зерна с фрагментацией ядер были единичными.

При анализе пыльцы особое внимание уделялось отклонениям, возникшим в ходе микрогаметогенеза, которые могли быть вызваны либо изменением числа митозов, либо изменением дифференцировки клеточных

элементов. Все это приводило к формированию пыльцы аномального строения с измененным числом клеточных структур.

Количество пыльцы со структурными изменениями в выполненных пыльцевых зернах у изученных тетраплоидов варьировало от 3 до 17 %. (рисунок 4).

Аномальные ПЗ представлены тремя основными типами: остановкой развития на ранних стадиях (1-2-ядерной), увеличением числа ядер и 3-х клеточной пыльцой с аномальными спермиями (таблица 2).

Таблица 2 – Типы структурных изменений в выполненных пыльцевых зернах

Вариант	Всего	ПЗ нормального строения* %	Количество ПЗ аномального строения, %							
			1-ядерные	2-ядерные			1ВЯ+2СП**	2ВЯ и 2СП	1ВЯ + 3-4 СП	более 3-х ВЯ (или микро-ядер)
				2ВЯ	ВЯ+ГК	ВЯ+микр-ядро				
5433 -1	168	88,01	2,98	1,19	1,19	1,19	4,17	1,19	0,0	
5433-2	194	87,63	8,24	1,03	0,52	0,0	0,52	0,52	1,03	0,52
5433-3	264	93,56	2,27	0,75	0,0	0,0	0,0	0,75	1,14	1,5
5434-1	342	97,37	1,17	0,0	0,0	0,0	1,46	0,0	0,0	0,0
5434-3	393	93,38	2,80	0,76	0,25	0,25	1,78	0,76	0,25	0,83
5434-5	441	88,43	2,49	2,04	0,0	0,0	5,90	0,68	0,45	0,0
5439	370	88,92	0,81	0,81	0,0	0,0	8,65	0,27	0,54	0,0
5446-3	231	86,58	2,0	0,43	0,0	0,0	6,66	1,30	2,16	0,87
5449	329	87,23	0,30	0,61	0,61	0,0	9,73	0,30	1,82	0,0
5450	113	89,38	0,0	0,0	0,0	0,0	1,77	3,54	3,54	1,77
5451	130	93,07	0,77	2,31	0,0	0,0	1,54	0,0	1,54	0,77
5464	434	82,72	8,06	1,38	0,0	0,0	7,14	0,46	0,2	0,0
5466	172	94,77	0,0	1,16	0,0	0,0	3,49	0,0	0,58	0,0

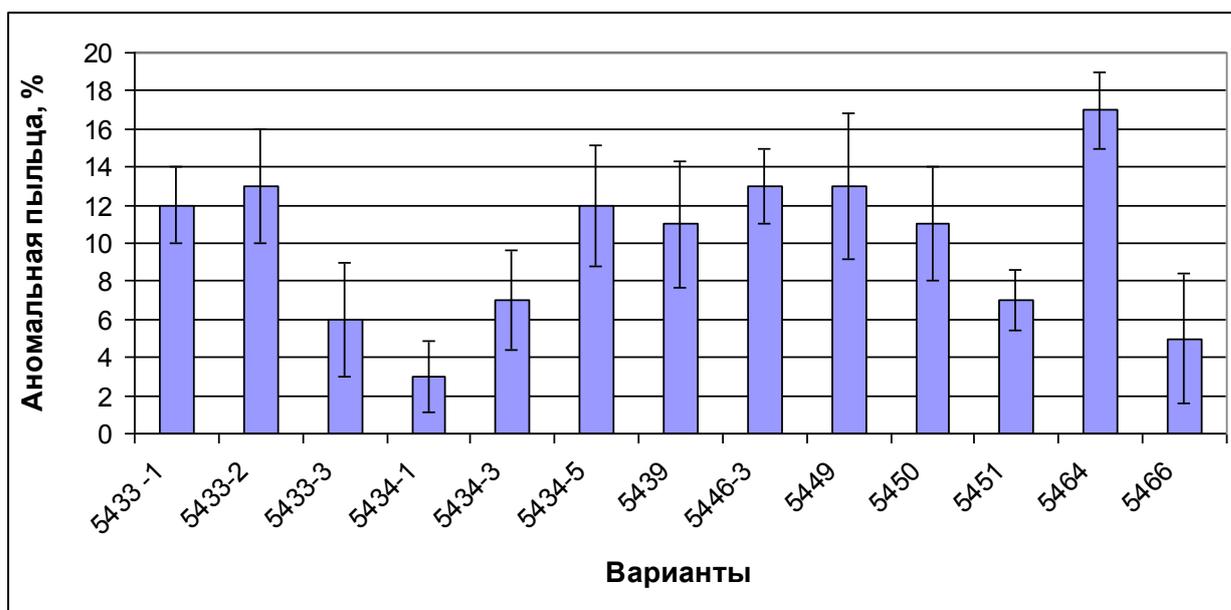


Рисунок 4 – Частота пыльцевых зерен аномального строения

*Малоядерные ПЗ* образуются в результате полного или частичного подавления митотических делений в микрогаметогенезе.

У большинства обнаруженных одноядерных пылинок наблюдалась разная степень плазмолиза, что свидетельствует именно об остановке развития пыльцы на этой стадии, а не задержке ее развития.

При формировании двухъядерной пыльцы остановка развития могла произойти на различных этапах дифференцировки образовавшихся после первого митоза ядер.

*Пыльца с дополнительными клеточными элементами* зарегистрирована во всех тетраплоидных вариантах (см. таблица 2). Такие пыльцевые зерна содержали либо 4-6 ядер вегетативного типа (рисунок 5 д-е), либо два ядра вегетативного типа и два спермия (рисунок 5 ж-з), либо одно вегетативное ядро и 3-4 спермия (рисунок 5 и-м). Это указывает на возможность дополнительных митотических делений ядер в ходе развития пыльцы. Частота встречаемости конкретного типа аномалий ПЗ варьирует у разных вариантов. Например, образование пыльцы с 3-4 спермиями в разных вариантах варьирует от 0 (5433-1 и 5433-3) до 3,5 % (5450).

**Трехклеточные ПЗ аномального строения** у тетраплоидов были представлены двумя типами: с тремя ядрами вегетативного типа и со спермиями нетипичной формы. Пыльцевые зерна с атипичными спермиями содержали вегетативное ядро и два спермия, которые четко отличались от нормальных. Один или оба спермия могли быть длинными, изогнутыми, фрагментированными, рыхлыми и с различной степенью окрашиваемости ядерными красителями. Это могли быть спермии (один или два) примерно в 2 раза длиннее, чем среднестатистические. Иногда длинные спермии были изогнутыми (под острым углом), или (реже) – извилистыми. Частота ПЗ с разными по морфологии спермиями варьировала от 0,5 до 9,7 %.

Полученные данные показывают, что в различных вариантах доминируют разные типы аномальных ПЗ. На рисунке 6 представлено соотношение основных трех классов ПЗ аномального строения у пяти тетраплоидных форм.

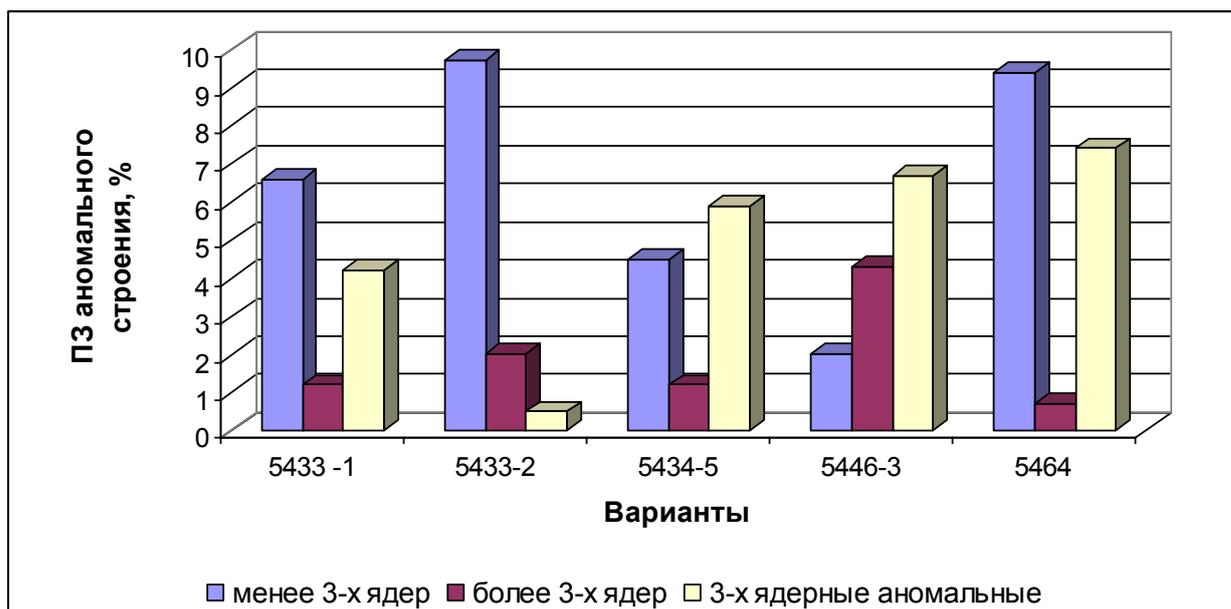


Рисунок 6– Соотношение основных классов пыльцевых зерен аномального строения у пяти тетраплоидных форм кукурузы

В 10 тетраплоидных вариантах были обнаружены крупные пыльцевые зерна неправильной формы (таблица 3). Среди них встречались пыльцевые зерна овальной, каплевидной и гантелевидной формы (рисунок 7). Частота такой пыльцы была невелика и варьировала в разных вариантах от 0,05 до 0,57.

Таблица 3 – Частота пыльцевых зерен атипичной формы в тетраплоидных вариантах

Вариант	Всего проанализировано, шт.	ПЗ атипичной формы, %
5433-3	1500	0,07
5434 (1)	1031	0,10
5434(5)	1722	0,17
5439-1	841	0,10
5446-3	1230	0,57
5449	1400	0,06
5450	2000	0,20
5451	1500	0,05
5464	922	0,11
5466	1544	0,13

В нашем исследовании анализировалась зрелая пыльца 13 тетраплоидных форм кукурузы Краснодарской селекции. Сравнение тетраплоидных форм по количеству дегенерирующей пыльцы показало, что все изученные формы характеризуются относительно невысокой степенью дегенерации (до 27 %), что свидетельствует о достаточно высокой степени пыльцевой фертильности. Однако выполненная пыльца может содержать аномальные пыльцевые зерна, которые могут быть стерильны. Различное соотношение пыльцевых зерен нормального и аномального строения в выполненной пыльце у 4-х тетраплоидов, которые характеризуются наибольшей степенью дегенерации, представлено на рисунке 8.

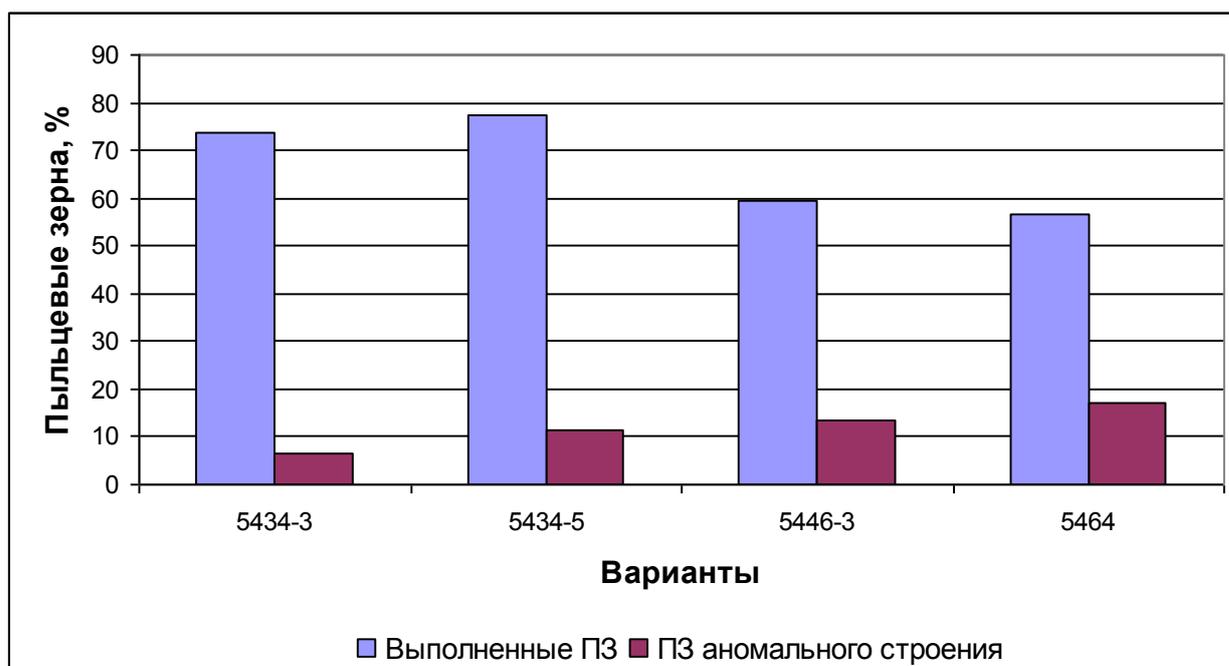


Рисунок 8 – Соотношение выполненных пыльцевых зерен нормального и аномального строения

Обнаруженные структурные изменения в выполненных пыльцевых зернах тетраплоидов в основном были представлены изменением числа клеточных элементов, изменением морфологии спермиев и атипичной формой пыльцевого зерна.

Образование одно- и двухъядерной пыльцы обусловлено угнетением митотических делений в гаметогене и остановкой развития на ранних стадиях развития. Этот тип пыльцевых зерен доминирует у 2-х тетраплоидов: 5433-2 и 5464.

Особый интерес представляет пыльца с дополнительными спермиями, появление которых свидетельствует о существенных нарушениях в спермиогенезе. Наличие в пыльце четного или нечетного числа спермиев указывает на возможность синхронных и асинхронных митозов генеративной клетки. Пыльца с 3-4 спермиями с повышенной частотой встречалась у тетраплоидов 5446-3 и 5450. У двух форм ПЗ с дополнительными спермиями не обнаружены.

При проведении пыльцевого анализа важнейшим показателем является степень стерильности изучаемой формы. Стерильность пыльцы складывается

из количества дегенерирующих и ПЗ аномального строения, не участвующих в оплодотворении. Среди тетраплоидных вариантов четко выделяются два (5449 и 5464), у которых стерильность пыльца превышает 40 %. У остальных 11 тетраплоидов стерильность пыльцы менее 30 %.

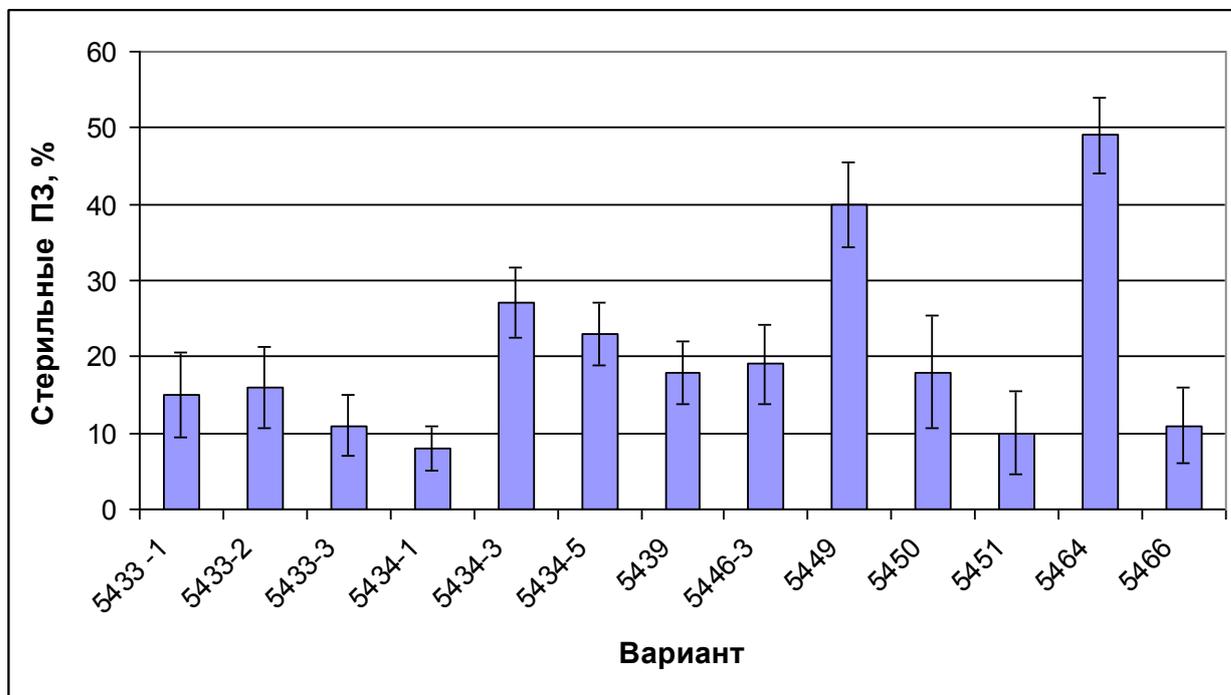


Рисунок 9 – Частота стерильных пыльцевых зерен у тетраплоидных форм кукурузы

### Заключение

Проведенное исследование тетраплоидных форм кукурузы выявило доминирование специфических аномалий в разных тетраплоидных вариантах. Это: дегенерирующие пыльцевые зерна, пыльца с остановкой развития или с добавочными спермиями и пыльца с атипичными по форме спермиями. Безусловно, подобные отклонения в значительной степени обусловлены влиянием дополнительного генетического материала и возможно, генным дисбалансом. Зарегистрированная полиспермия и фрагментация спермиев представляет несомненный интерес для получения генетически разнообразного исходного материала. Выявленные нарушения заслуживают внимания, и эти признаки следует учитывать в селекционной работе и при изучении онтогенеза пыльцы.

## Выводы

1. Максимальная дегенерация пыльцы характерна для трех тетраплоидных вариантов и составляет 20-27 %. Минимальная дегенерация пыльцы зарегистрирована у пяти тетраплоидов и не превышает 5 %.
2. Девять тетраплоидных форм содержат более 10 % пыльцевых зерен с различными отклонениями в строении. Аномальная пыльца была представлена тремя основными типами: остановкой развития на ранних стадиях, увеличением числа ядер и 3-х клеточной пыльцой с аномальными спермиями.
3. У десяти тетраплоидов зарегистрирована возможность развития пыльцевых зерен атипичной формы, частота которых не превышала 0,6 %. Вероятно, такие нарушения являлись спонтанным и были вызваны случайными ошибками развития ПЗ.
4. Специфичное влияние генотипа отдельных тетраплоидных форм на стадии зрелой пыльцы проявляется в разном содержании дегенерирующих и аномальных пыльцевых зерен. Максимальная суммарная дефектность пыльцы характерна для двух вариантов и составляет 40-49 %.

