

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

Кафедра генетики

**ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ПРОЯВЛЕНИЕ
ГАМЕТОФИТНЫХ МУТАЦИЙ ТАБАКА**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 422 группы
направления 06.03.01 Биология
биологического факультета
Нурушевой Ирины Асэльбековны

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

Развитие зародышевого мешка (ЗМ) и его морфологические особенности детерминированы генетически. Этим объясняется их, как правило, константное проявление у растений конкретных видов. Структурная организация ЗМ во многом определяет процессы оплодотворения, формирования зародыша и эндосперма. Изменения строения ЗМ нередко является причиной изменения функционального состояния составляющих его клеток. Известно, что изменения в структурной организации ЗМ могут быть обусловлены мутациями, затрагивающими осуществление отдельных этапов мегаспорогенеза. Мутации женского гаметофита в настоящее время описаны у многих видов и могут проявляться в остановке развития ЗМ на ранних стадиях, в сокращении числа митозов или добавочных делениях в ценоцитной фазе, автономном развитии яйцеклетки и ядер центральной клетки.

Изменчивость признаков ЗМ может быть обусловлена также и влиянием внешней среды. Экологическим фактором, существенно влияющим на физиологические и морфологические процессы растений, является температура, которая может изменять структурно-функциональное состояние половых элементов, а в некоторых случаях вызывает эффекты, которые могут быть использованы в практике.

Особый интерес представляет индукция внешними факторами таких изменений женского гаметофита, которые являются предпосылками гаплоидии, полиплоидии, полиэмбрионии, диплоидного апомиксиса. Исследования ЗМ, связанные с масштабным скринингом изменчивости, весьма перспективны и способствуют получению принципиально новой информации. Исследования взаимодействия генетических и паратипических факторов позволяют конкретизировать такие понятия, как «генотип-средовое взаимодействие», «норма реакции генотипа», «модификационная изменчивость» применительно

к эмбриологическим признакам, и тем самым, способствовать развитию генетического направления в эмбриологии растений.

Цель дипломной работы заключалась в исследовании модификационной изменчивости индуцированной температурой у женского гаметофита гомозиготной линии БГ-6 и трех мутантных линий табака.

В задачи экспериментальной работы входило:

1) определить спектр изменчивости зародышевых мешков у линии табака БГ-6, гаметогенез которых проходил в условиях *in vitro* при разных температурных условиях;

2) изучить влияние экстремальных температур на развитие зародышевых мешков у мутантной линии табака БГ-141.4;

3) изучить влияние экстремальных температур на развитие зародышевых мешков у мутантной линии табака М-3;

4) изучить влияние экстремальных температур на развитие зародышевых мешков у мутантной линии табака СГ-27/4.

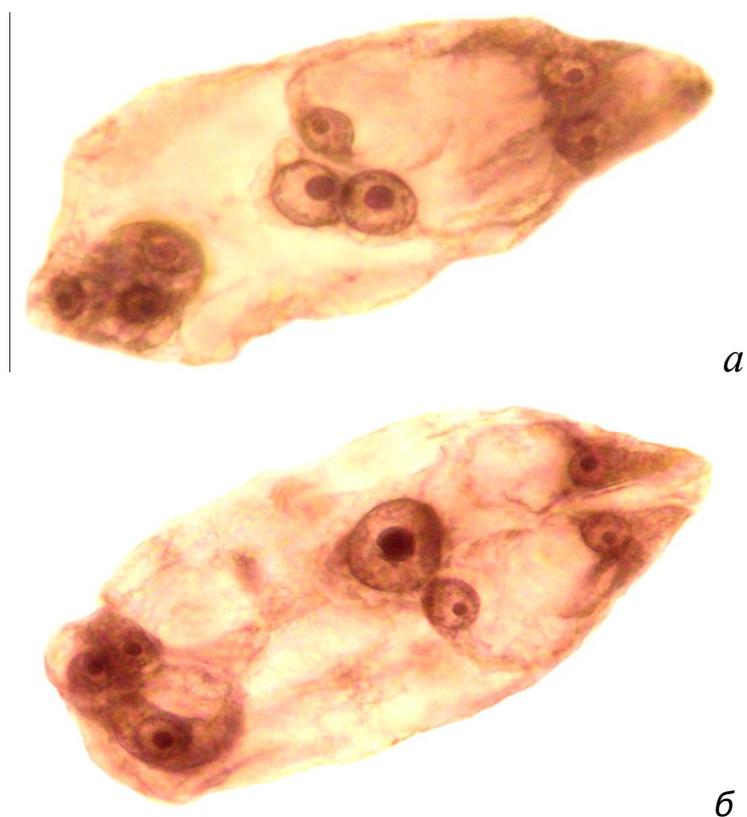
Материал и методы исследования

В качестве исходного материала использовались изолированные завязи растений *Nicotiana tabacum* L. трех мутантных линий с измененным числом элементов в ЗМ: БГ-141.4, М-3, СГ-27.4. Линия БГ-141.4 характеризовалась образованием моно- или биполярных ЗМ с уменьшенным числом клеток и ядер. У линии СГ-27.4 проявляется признак увеличенного числа ядер и клеток в ЗМ за счет дополнительных митозов. Третья линия М-3 отличалась высокой частотой (до 90%) ценоцитных малоядерных ЗМ. Данные мутантные линии были получены из гомозиготной линии БГ-6 методом радиационного мутагенеза в отделе генетики и цитологии Ботанического сада СГУ. В качестве контроля использовалась гомозиготная линия табака БГ-6, характеризующаяся высокой константностью в проявлении цитологических признаков ЗМ.

В работе исследовались особенности развития ЗМ мутантных линий с одноядерной стадии до зрелой стадии при трех температурных режимах: 10, 25 и 37°C.

Основное содержание работы

Исследованию, определяющему влияние экстремальных температур на развитие зародышевых мешков у мутантных линий, предшествовало изучение развития ЗМ у немутантной линии БГ-6 в условиях *in vitro* при разных температурных условиях. При оптимальной температуре (25°C) у линии БГ-6 в основной части семязачатков осуществлялся нормальный гаметофитогенез, что приводило к образованию 96% биполярных 8-ядерных 7-клеточных ЗМ типичного строения (рисунок 1).



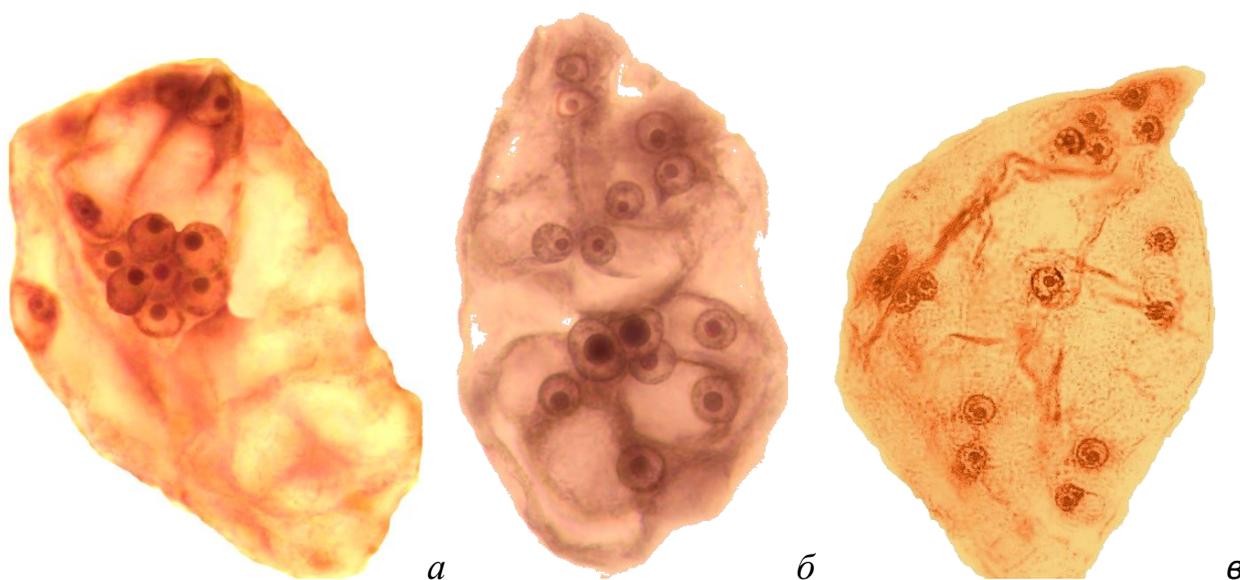
a – 8-ядерный с двумя полярными ядрами; *б* – слияние полярных ядер; *в* – 7 ядерный с центральным ядром

Рисунок 1 – Зародышевые мешки табака нормального строения. Увеличение $\times 400$

Единичные аномальные ЗМ, обнаруженные у линии БГ-6, имели разное строение, обусловленное, вероятно, случайными нарушениями развития. Эти данные полностью согласуются с полученными ранее для ЗМ данной линии, развитие которых проходило в полевых условиях.

Зародышевые мешки, у которых не изменялся «план строения», но менялась морфология клеток яйцевого аппарата, рассматривались как субнормальные. Такие мешки содержали либо яйцеклеткоподобные синергиды, либо синергидоподобные яйцеклетки и к классу аномальных отнесены не были.

Наибольший интерес представляли ЗМ с дополнительными клетками в яйцевом аппарате и с дополнительными полярными ядрами (рисунок 2 а, б). 19 % многоядерных ЗМ были ценоцитными с различным числом ядер и их расположением (рисунок 2 в).



а – с дополнительными полярными ядрами; *б* – с дополнительными клетками в яйцевом и антиподальном аппаратах; *в* – 16-ядерный ценоцитный

Рисунок 2 – Зародышевые мешки аномального строения с числом ядер более 8.

Увеличение $\times 400$

В проведенном исследовании были проанализированы ЗМ мутантных линий, гаметогенез которых проходил в изолированных завязях в условиях *in*

in vitro. Частота ЗМ нормального строения в мутантных вариантах значительно снижена и если у линии БГ-6 составляет 97 %, то у линии БГ-141.4 – 32 %, у линии М-3 – 23 %, у линии СГ-27.4 – 49% (рисунок 3).

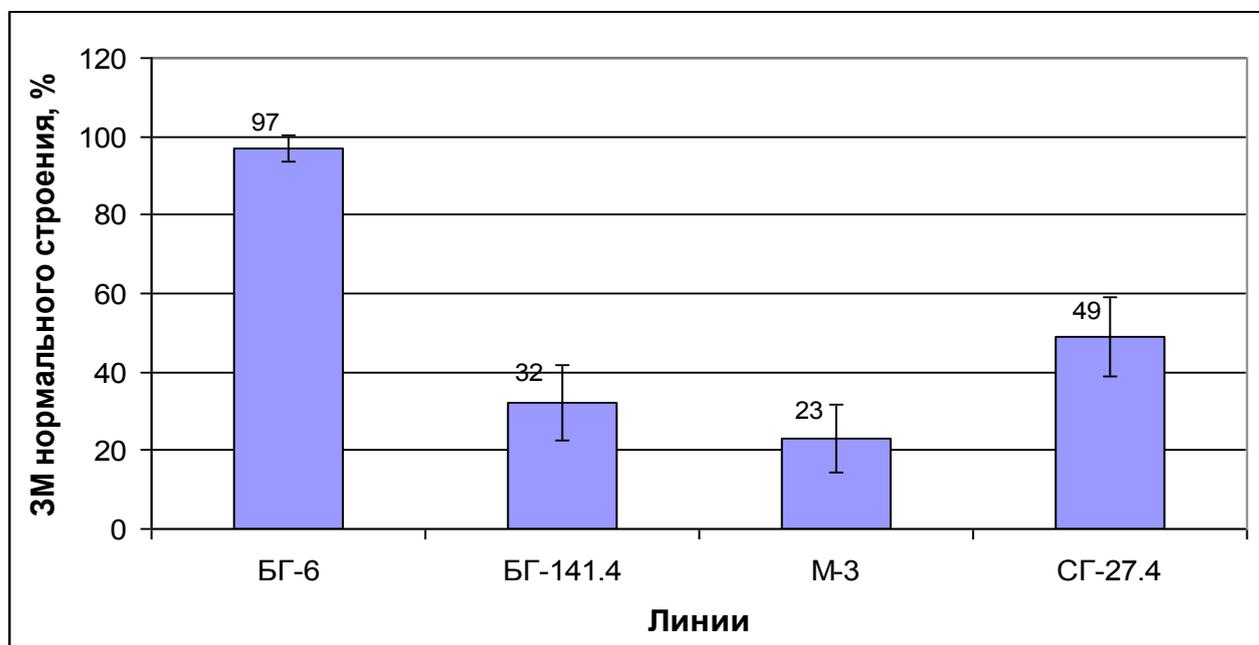


Рисунок 3 - Соотношение ЗМ нормального строения у разных линий табака

Было установлено, что в условиях *in vitro* у всех трех мутантных линий сохраняется доминирование ЗМ конкретного морфологического типа (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты анализа зародышевых мешков у трех мутантных линий табака, развитие которых проходило в условиях *in vitro* при 25° С

Линия	время культивирования, сутки	ЗМ аномального строения с числом ядер, %					
		менее 7		7-8		более 8	
		ценоцитные	клеточные	ценоцитные	клеточные	ценоцитные	клеточные
БГ-6	3	1	0	0	1	1	1
БГ-141.4	3	5**	59***	0	4	0	0
	5	6**	69***	0	6	0	0
М-3	3	59***	13	0	5	0	0

СГ-27.4	3	6**	4	3	28***	1	9**
	5	1	7	0	11***	0	25***

Примечание: * различия с контролем (линией БГ-6) достоверны на уровне значимости 0,05
 ** различия с контролем (линией БГ-6) достоверны на уровне значимости 0,01
 *** различия с контролем (линией БГ-6) достоверны на уровне значимости 0,001

У линии БГ-141.4 доля малоядерных клеточного строения ЗМ достигает 59-69 %. У линии СГ-27.4 признак увеличенного числа ядер и клеток в зародышевых мешках проявляется с частотой 34-36 %. Линия М-3 содержит до 59 % ценоцитных малоядерных зародышевых мешков.

Показано, что экстремальные для развития ЗМ температурные условия в значительной степени модифицируют проявление гаметофитных мутаций.

Линия БГ-141.4. У данной мутантной линии высокая и низкая температуры, прежде всего, подавляли цитокинез. В результате образовывались многочисленные ценоцитные ЗМ. Однако низкая температура оказывала более выраженное влияние на цитокинез и приводила практически к полной замене малоядерных клеточных ЗМ при 25°C на малоядерные ценоцитные (рисунок 4). Следует также отметить значительное снижение митотической активности при низкой температуре, что подтверждается увеличением количества ЗМ с числом ядер менее семи с 75% при 25°C до 93% при 10°C.

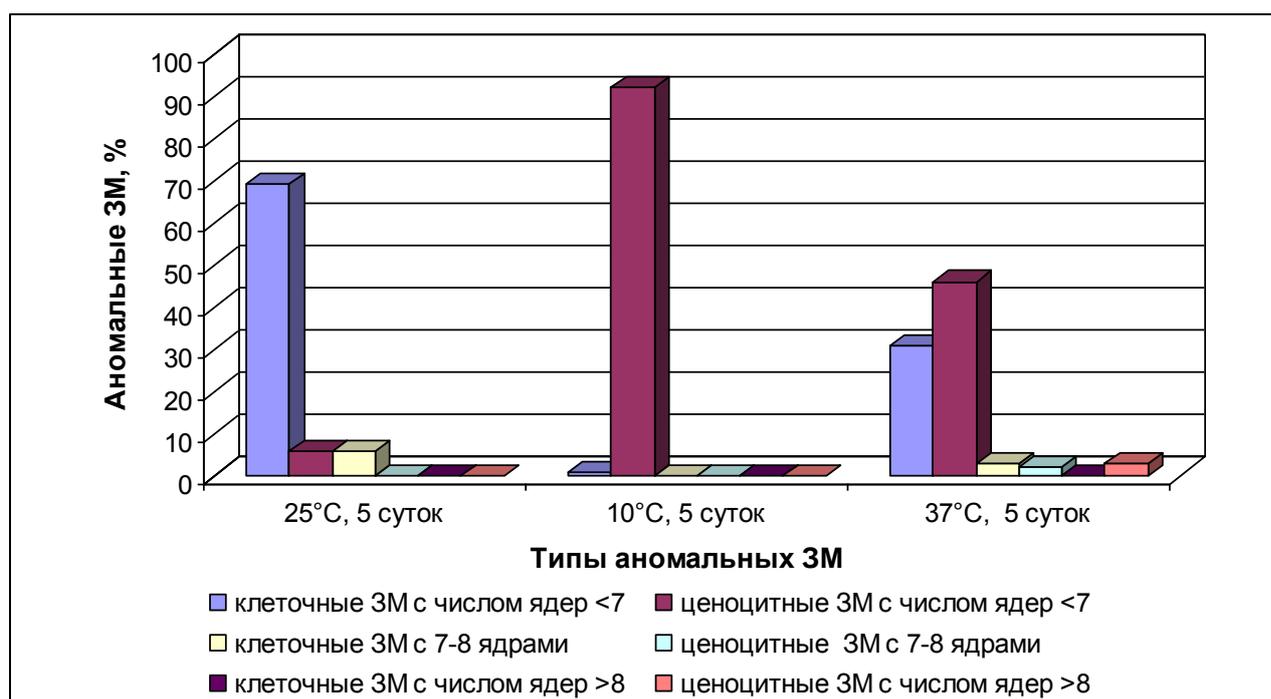


Рисунок 4 –Результаты анализа аномальных ЗМ мутантной линии БГ-141.4, гаметонез которых проходил при разных температурах

Высокая температура на стадии гаметогенеза у данного мутанта может индуцировать дополнительные митозы, что подтверждается образованием единичных ценоцитных ЗМ с числом ядер более восьми (рисунок 2 в), а также малоядерных ЗМ с крупными ядрами неправильной формы, содержащими дополнительные ядрышки. Вероятно, в этом случае деления ядер осуществлялись аномально по типу эндомитозов.

Линия М-3. Сходный морфогенетический эффект действия экстремальных температур на развитие ЗМ зарегистрирован и у мутантной линии М-3, а именно: температура 10°C угнетала митотические деления и цитокинез, а температура 37°C индуцировала в 6% ЗМ дополнительные деления и практически не влияла на цитокинез (рисунок 5). В обоих температурных вариантах увеличивается общее количество аномальных ЗМ, но при низкой температуре все они представлены малоядерными ценоцитными, а при высокой – различными типами.

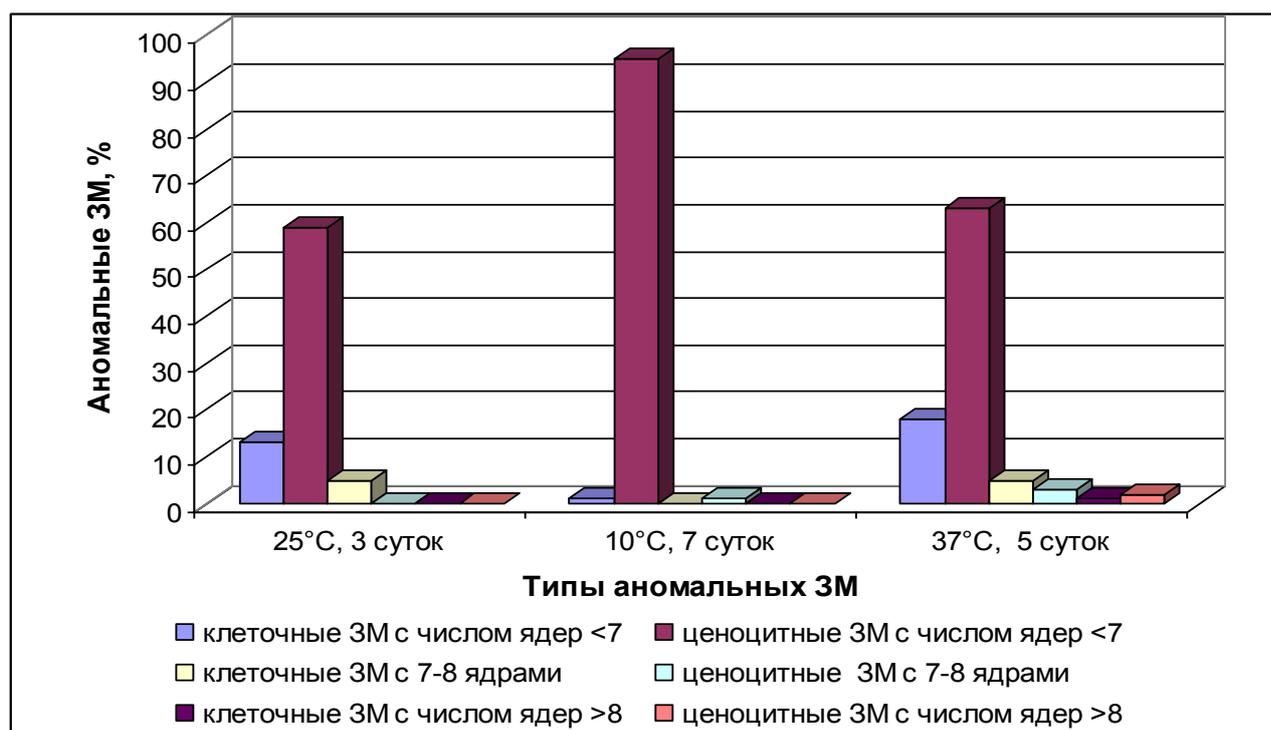


Рисунок 5 – Результаты анализа аномальных ЗМ мутантной линии М-3, гаметонез которых проходил при разных температурах

Линия СГ-27.4. У данной линии сохраняется специфика действия низкой температуры, обнаруженная для других генотипов. Низкая температура подавляет митозы и цитокинез. Это приводит к снижению количества многоядерных клеточных ЗМ с 25% до 5% (рисунок 6). Уменьшается также количество и других типов клеточных ЗМ аномального строения. При этом резко возрастает процент ценоцитных с числом ядер менее семи. Особенность действия высокой температуры на эту линию проявилась, прежде всего, в угнетении цитокинеза и появлении ценоцитных ЗМ с различным числом ядер. Следует также отметить некоторый эффект стимуляции митотических делений, поскольку процент многоядерных ЗМ увеличился при этой температуре с 25 до 33%.

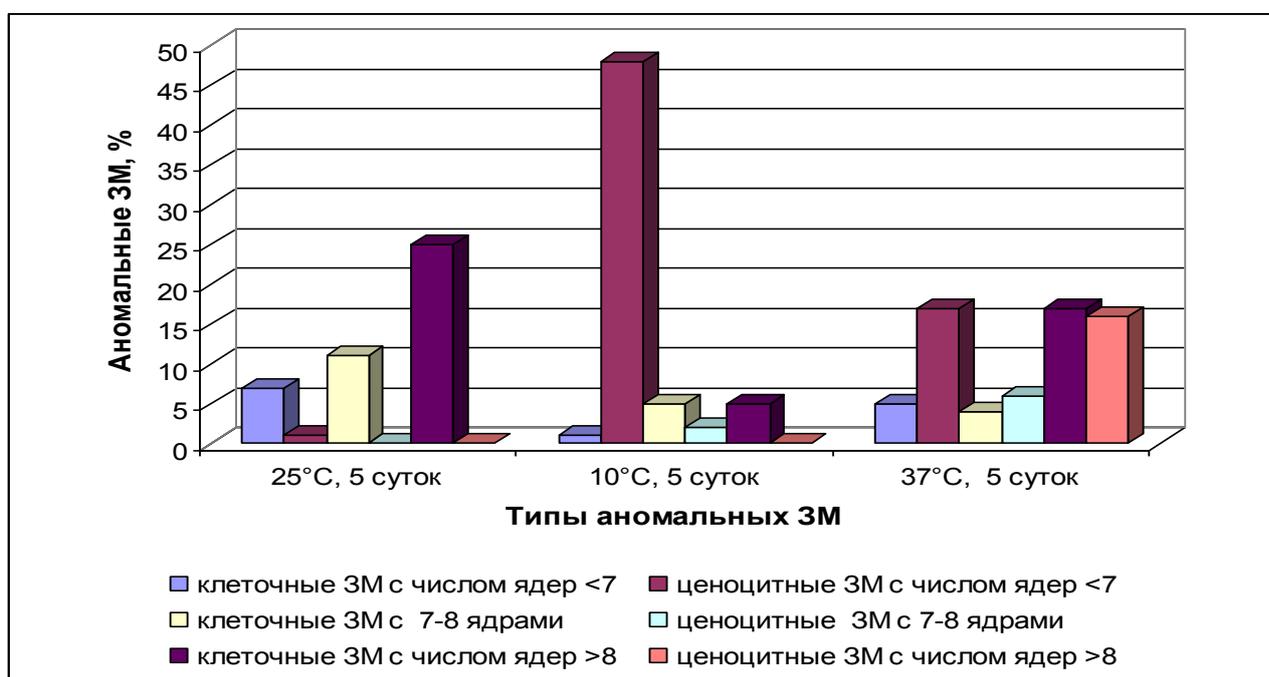


Рисунок 6 –Результаты анализа аномальных ЗМ мутантной линии СГ-27/4, гаметонез которых проходил при разных температурах

Исследования ЗМ табака разных генотипов (гомозиготной линии БГ-6 и трех мутантных линий) показали степень структурной пластичности ЗМ вида *Nicotiana tabacum*.

Полученные результаты свидетельствуют, что температурные условия в значительной степени моделируют проявление гаметофитных мутаций и являются мощным модифицирующим фактором. Однако действие экстремально низкой или экстремально высокой температуры на развитие ЗМ имели отчетливо выраженную специфику. У всех четырех проанализированных генотипов низкая температура в гаметогенезе угнетала митотические деления и цитокинез. В результате у всех мутантных генотипов при этом температурном режиме доминировали малоядерные ценоцитные ЗМ, а у линии БГ-6 этот тип ЗМ преобладал среди аномалий. Действие высокой температуры в гаметогенезе преимущественно индуцировало дополнительные митозы. Такой эффект наиболее отчетливо наблюдается у немутантной линии БГ-6, а также у мутанта СГ-27.4. Однако и у малоядерных мутантов (БГ-141.4 и М-3) прослеживается тенденция к образованию многоядерных ЗМ. При этом совершенно очевидно, что количественная выраженность модификаций ЗМ температурными условиями зависит от генотипа.

Не исключено, что, экспериментально изменяя температурные условия развития зародышевых мешков, можно активно вмешиваться в эмбриональные процессы и изменять их ход.

Проведенное исследование демонстрирует большие потенциальные возможности экспериментального подхода, основанного на комплексном изучении изменчивости ЗМ. Дальнейшая разработка этого направления может способствовать решению ряда проблем общей и частной эмбриологии растений и генетики систем размножения.

Таким образом, в ходе проведенного исследования получена информация о диапазоне и цитологических закономерностях изменчивости ЗМ у трех мутантных линий табака. Показана зависимость строения ЗМ, развитие которых проходило в условиях *in vitro*, как от генотипа, так и влияния

температурных условий. Установлено, что морфологические вариации структурной организации ЗМ обусловлены изменениями в проявлении его основных признаков – числа ядер и образования клеточных перегородок. Полученные данные позволили сделать следующие выводы.

1. В условиях *in vitro* при нормальной температуре у линии табака БГ-6 формируется не более 4 % ЗМ аномального строения. При высокой и низкой температурах доля ЗМ аномального строения возрастает соответственно до 57 и 22 %.
2. Действие низкой и высокой температур на развитие ЗМ линии БГ-6 четко различается по морфологическому эффекту. Высокая температура вызывает образование многоядерных ЗМ с числом ядер более 8, низкая – малоядерных с числом ядер менее восьми.
3. У мутантных линий в условия *in vitro* при нормальной температуре (25°C) сохраняется фенотип зародышевых мешков характерный при их развитии в условиях *in vivo*.
4. Низкая и высокая температуры модифицировали проявление гаметофитных мутаций. Низкая температура на стадии гаметогенеза у всех мутантных линий угнетала митотические деления и цитокинез. В результате доминировали малоядерные ценоцитные зародышевые мешки. При высокой температуре у всех мутантных линий прослеживается тенденция к дополнительным митозам. Такой эффект наиболее отчетливо наблюдает у мутанта СГ-27.4.
5. Таким образом, структурная организация зародышевых мешков может быть изменена не только генетическими, но и внешними факторами. Влияние экологических факторов на процессы формирования женского гаметофита и его фенотипическую изменчивость следует учитывать при диагностике систем размножения, в систематике и эмбриологии.