

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 МУЖСКОЙ
ГЕНЕРАТИВНОЙ СФЕРЫ У ТЕТРАПЛОИДНОЙ ЛИНИИ
КУКУРУЗЫ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 241 группы
Направления 06.04.01 Биология
Биологического факультета
Магеррамова Шамиля Валеховича

Научный руководитель

к.б.н., доцент кафедры генетики

 15.06.18₂ Л.П. Лобанова

Научный консультант

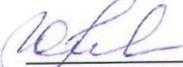
к.б.н., зав. отделом генетики

УНЦ «Ботанический сад »

 15.06.18₂ А.Ю. Колесова

Зав.кафедрой генетики

д.б.н., доцент

 15.06.18₂ О.И. Юдакова

Саратов 2018

ВВЕДЕНИЕ

Полиплоидизация культурных растений до настоящего времени сохраняет свою актуальность как явление, обеспечивающее наиболее быстрые наследственные изменения в геноме. Многие исследования свидетельствуют о возможности успешной полиплоидизации и практическом использовании полиплоидных культурных растений [1, 2].

Получение и использование полиплоидных форм в селекции кукурузы является важным направлением. Полиплоиды кукурузы часто обладают большой вегетативной массой, крупными размерами початка и семян. Полиплоидия способствует повышению изменчивости генетического материала, делает возможным получение высокого эффекта гетерозиса и его закрепление на полиплоидном уровне [1, 3, 4].

Основным препятствием к широкому применению полиплоидных форм была и остается их мейотическая нестабильность, снижение мужской и женской фертильности, степени завязываемости и всхожести семян. Исследования качества пыльцы у тетраплоидной формы кукурузы КрП-1 и полученных на ее основе триплоидных растений обнаружили достаточно широкий спектр отклонений в строении зрелых пыльцевых зерен по сравнению с диплоидными линиями [8, 9]. Были выявлены пыльцевые зерна с различными нарушениями клеточного строения и пыльцевые зерна аномальной формы, не описанные ранее у кукурузы. Однако данные о стабильности образования аномальных пыльцевых зерен в разные годы и возможных механизмах их формирования отсутствуют. В связи с этим становятся актуальными исследования степени фертильности пыльцы в разные годы и процессов микроспорогенеза у тетраплоидных растений с целью получения данных о возможных причинах образования пыльцы аномального строения.

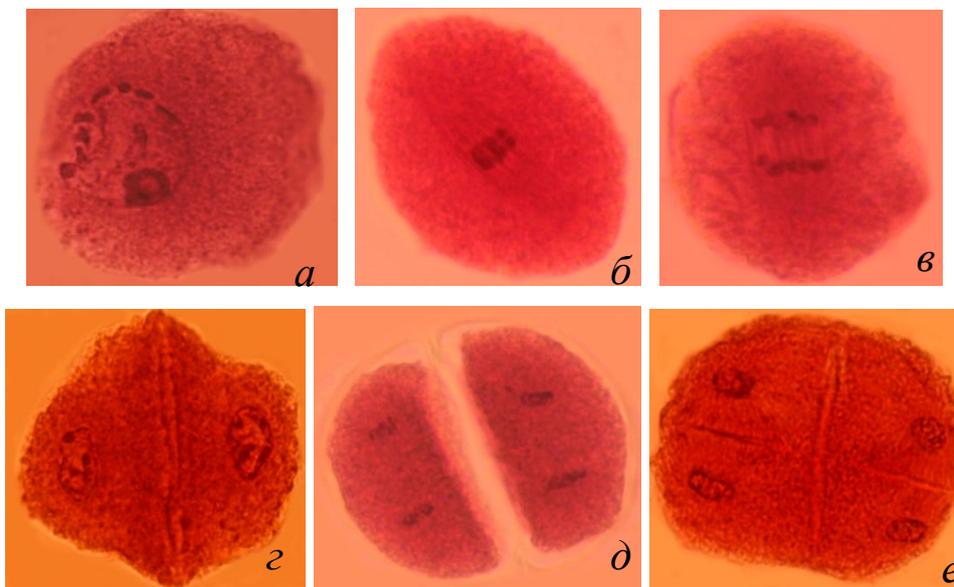
Цель настоящей работы заключалась в исследовании микроспорогенеза и зрелых пыльцевых зерен у растений тетраплоидной линии кукурузы КрП-1.

В задачи исследования входило:

- 1) изучение особенностей кариокинеза в ходе мейотических делений;
- 2) изучение особенностей цитокинеза в ходе мейотических делений;
- 3) характеристика образующихся спорад микроспор;
- 4) характеристика клеточной структуры зрелых пыльцевых зерен, сформировавшихся в разные годы.

Теоретической и методологической основой исследования выступают научные труды отечественных и зарубежных ученых-биологов, посвященные актуальным проблемам развития и построения. В процессе работы были использованы такие приемы научного исследования как системный подход, статистические методы обработки информации.

Основное содержание работы. Проведенный анализ позволил получить достаточно полное представление о нормальном ходе мейотических делений микроспороцитов кукурузы и качественном спектре отклонений от него (рисунок 1). Типы нарушений и их средняя частота в исследованной выборке из 9 растений представлена в таблице 1



а – профазы I; *б* – метафазы I; *в* – анафазы I; *г* – телофазы I; *д*– анафазы II; *е* – телофазы II

Рисунок 1 – Мейотические деления в микроспороцитах пыльцы.

Увеличение $\times 400$

Таблица 1. Типы и частота нарушений мужского мейоза у тетраплоидных растений КрП-1

Стадия мейоза	Число проанализированных, мейоцитов, шт.	Общее кол-во нарушений, %	Тип нарушений	Частота типов нарушений, %
1	2	3	4	5
Профаза-I	1747	1,1	Двухядерные клетки Атипичная форма клетки	0,6 0,5
Метафаза-I	404	2,1	Диффузное распределение хромосом	1,2
			Выбросы отдельных хромосом за пределы ахроматинового веретена	0,3
			Атипичная форма клетки	0,6
Анафаза-I	303	3,0	Разброс отдельных хромосом по веретену деления	1,9
			Выбросы отдельных хромосом за пределы ахроматинового веретена	0,5
			мост	0,5
			Атипичная форма клетки	0,1
Телофаза-I	361	12,1	Микроядра	1,2
			Изогнутая клеточная пластинка	1,0
			Неполный цитокинез*	8,6
			Отсутствие цитокинеза	0,7
			Атипичная форма клетки	0,6
Диада	301	10,1	Монада 2-х-ядерная	0,7
			Диада неравных клеток	0,7
			Диада с микроядрами	0,7
			Неполный цитокинез	7,5
			Атипичная форма клетки	0,5
Метафаза-II	227	6,3	Диффузное распределение хромосом	1,7
			Выбросы отдельных хромосом за пределы веретена деления	0,5
			Асинхронные деления	2,6
			Непараллельные веретена**	1,2
			Атипичная форма клетки	0,3
Анафаза-II	320	15,6	Разброс отдельных хромосом по веретену деления	1,6
			Выбросы отдельных хромосом за пределы веретена деления	0,5
			мост	0,9
			Трехполосные веретена	1,0
			Асинхронность деления	5,8
			Непараллельные веретена	5,5
			Атипичная форма клетки	0,3
Телофаза-II	246	4,2	Микроядра, сверхчисленные ядра	2,2
			Неполный цитокинез	0,9
			Отсутствие цитокинеза	1,0
			Атипичная форма клетки	0,1

Примечание: *- цитокинез в виде «тоннеля» или насечек;

** - веретена делений расположены в анафазе-II перпендикулярно или под углом друг к другу.

Анализ показал, что отклонения от нормы присутствуют на всех стадиях мейоза. Разные стадии мейоза различаются специфической морфологией нарушений и их количеством.

Аномалии расхождения хромосом в мейозе были зарегистрированы у всех изученных на мейоз тетраплоидных растений. Однако у разных растений частота микроспороцитов с нарушениями в кариокинезе варьировала от 4 % у растения 527 до 12,1% у растения 535-2 (рисунок 2)

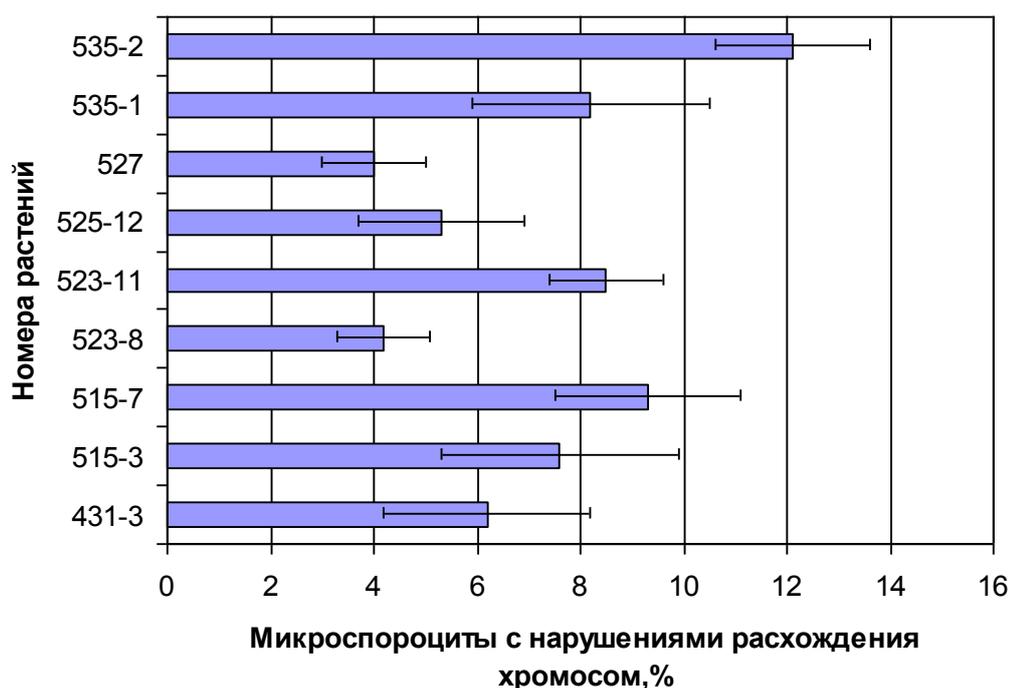
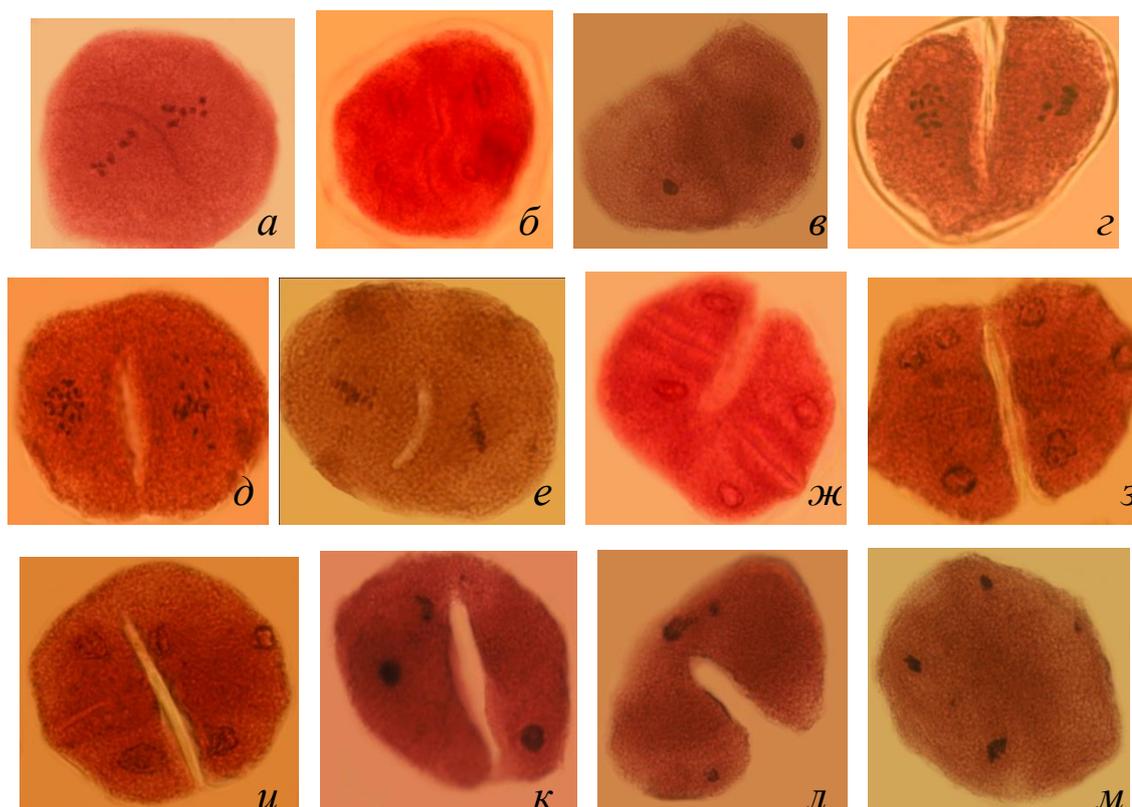


Рисунок 2 – Частота хромосомных аномалий в микроспорогенезе у тетраплоидных растений кукурузы

Среди различных вариантов нарушений цитокинеза у тетраплоидов можно выделить два основных, с наиболее значимыми последствиями для развития микроспор и пыльцы. Это: отсутствие цитокинеза после первого и/или второго деления мейоза и неполное заложение перегородок в виде «тоннеля» в центре клетки или «насечек» с внешней стороны. Такие аномалии чаще наблюдались у тетраплоидов во время первого деления мейоза, причем в основном встречались микроспороциты с неполным заложением перегородок (рисунок 3). Во втором мейотическом делении нарушения цитокинеза у тетраплоидов регистрировались реже. Общее

количество нарушений цитокинеза у 5 растений варьировало от 6 до 69 % (таблица 2).



а, б – заложение изогнутой и дугообразной пластинки фрагмопласта; *в* – отсутствие перегородки после мейоза I; *г - и* – разные варианты неполного заложения клеточных перегородок в виде «насечек» с одной или двух сторон, или в виде «тоннеля» в центре; *к, л* – микроспороциты с неполным цитокинезом после мейоза I и отсутствием цитокинеза после мейоза II; *м* – отсутствие цитокинеза после мейоза I и II

Рисунок 3 – Нарушения заложения клеточных перегородок в мейозе у тетраплоидной кукурузы. Увеличение $\times 400$

Анализ нарушений цитокинеза у разных тетраплоидных растений КрП-1 показал большую вариабельность данного признака и наличие как достоверных так и недостоверных различий между отдельными растениями (рисунок 4). Наличие достоверных различий может свидетельствовать о возможности отбора по данному признаку.

Таблица 2 – Варианты цитокинеза в мейозе тетраплоидной кукурузы

№ расте- ния	Цитокинез, %					
	I мейотическое деление			II мейотическое деление		
	нормаль- ный	неполный	отсутствует	нормаль- ный	неполный	отсутствует
515-7	31,0	27,8	41,2	0,0	0,0	0,0
527	91,3	8,7	0,0	0,0	0,0	0,0
535-1	47,6	52,4	0,0	100,0	0,0	0,0
535-2	58,2	40,2	1,6	98,4	1,6	0,0
431-3	61,2	38,8	0,0	79,6	16,6	3,8

Анализ нарушений цитокинеза у разных тетраплоидных растений КрП-1 показал большую вариабельность данного признака и наличие как достоверных так и недостоверных различий между отдельными растениями (рисунок 4). Наличие достоверных различий может свидетельствовать о возможности отбора по данному признаку.

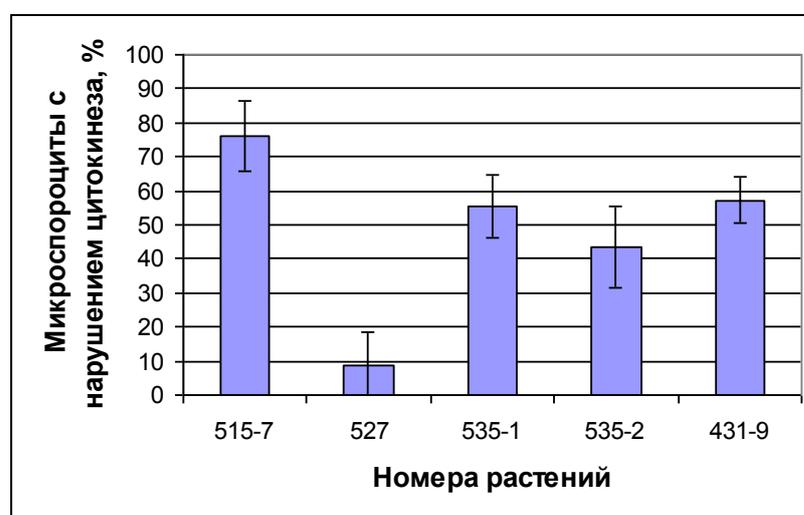
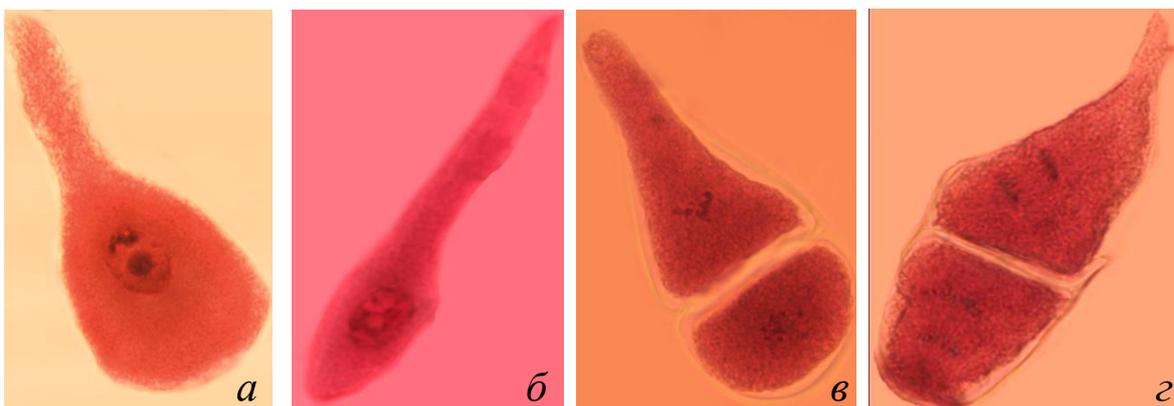


Рисунок 4 – Нарушения цитокинеза в мейозе растений тетраплоидной кукурузы

Важной особенностью микроспорогенеза у всех 9 растений было образование микроспороцитов атипичной формы. Они встречались на всех стадиях мейотического цикла, начиная с профазы-I (рисунок 5). Вместо округлых клеток формировались более крупные и удлиненные. Ядро всегда располагалось в расширенной части клетки.



а, б – профазы I; *в* – метафаза II; *г* – анафаза II

Рисунок 5 – Микроспороциты атипичной формы на разных стадиях мейоза

Общее количество микроспороцитов в мейозе разных растений варьирует от 0,8 до 9,8 % (рисунок 6). Появление таких аномалий в микроспорогенезе исследованных растений со средней частотой 3 % предполагает наличие достаточно стабильного механизма образования клеток атипичной формы у тетраплоидной линии КрП-1.

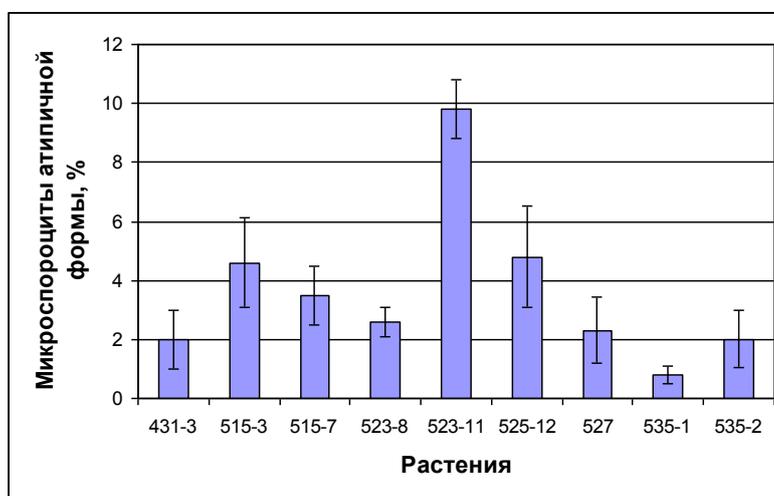


Рисунок 6 – Соотношение микроспороцитов аномальной формы у тетраплоидных растений кукурузы

Регистрация микроспороцитов атипичной формы со стадии профазы-I может свидетельствовать, что возможной причиной их появления является

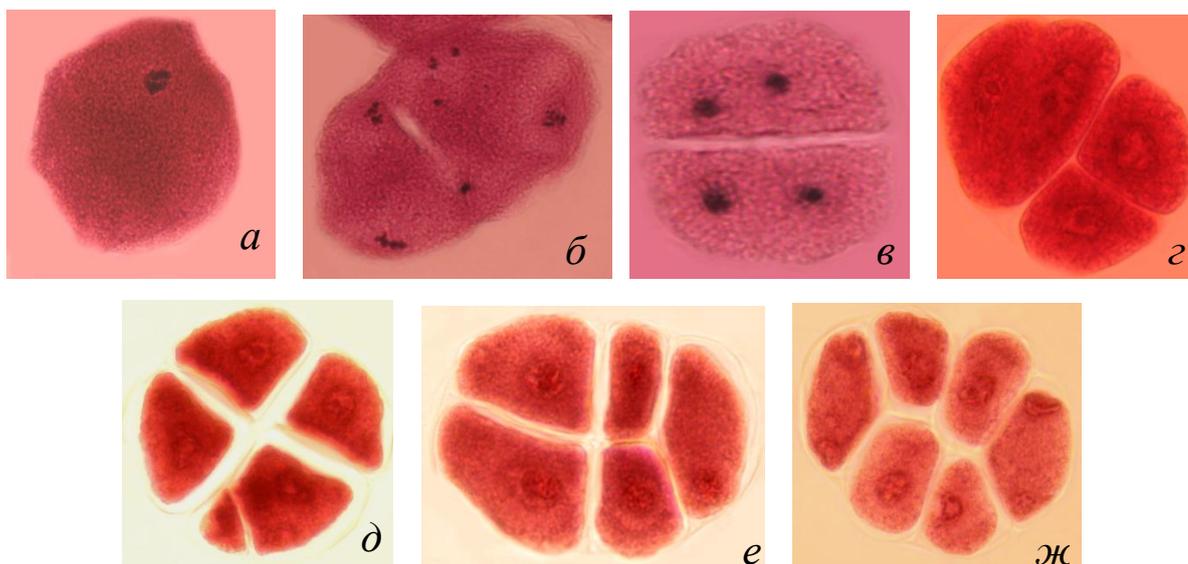
дефект внутриклеточного цитоскелета, необходимого для поддержания формы клетки.

Следствием различных нарушений карио- и цитокинеза в мейозе у тетраплоидной линии кукурузы КрП-1 явились разнообразные аномальные споры (таблица 4). В ходе проведенного анализа были обнаружены тетрады микроспор нетипичной формы и споры с числом клеток, отличным от четырех. В среднем количество спор атипичного строения в проанализированной выборке растений составило 23,8 %. С наибольшей частотой встречались тетрады различными морфологическими аномалиями: т-образные, линейные, с диагональными перегородками, микроядрами (11,4 %).

Таблица 4 – Результаты анализа спор микроспор у тетраплоидных растений

№ растения	Число проанализированных спор	Количество атипичных спор, %	Споры атипичного строения, %						
			Тетрады			монады	диады	триады	пентады, гексады
			т-образные	линейные	другие типы				
431-3	227	34,1	6,2	4,1	3,9	10,8	1,6	2,2	5,3
515-3	275	22,7	4,0	1,3	10,7	0,0	0,0	2,0	4,7
515-7	443	20,3	3,3	2,3	4,7	4,0	4,0	0,0	2,0
523-11	228	14,1	2,6	1,9	2,9	0,0	0,0	1,9	4,8
523-8	336	22,5	8,3	2,5	2,5	2,0	0,0	2,0	5,2
525-12	246	50,0	0,0	0,0	0,0	30,3	19,7	0,0	0,0
527	395	6,8	1,1	2,1	2,1	0,0	0,0	0,5	1,0
535-1	278	24,8	11,5	5,5	3,5	1,0	0,5	1,5	1,3
535-2	436	19,4	6,6	2,0	7,6	0,0	0,0	0,5	2,7
среднее		23,8	4,8	2,4	4,2	5,3	2,9	1,2	3,0

Появление спор с измененным числом клеток указывает на нарушения распределения хромосом в микроспороцитах. У тетраплоидных растений обнаружены монады, диады, триады, пентады, гексады и даже гептады микроспор (рисунок 7). В таких спорах могли образовываться реституционные ядра, и тогда все клетки были одноядерными, или в результате угнетения цитокинеза появлялись двухъядерные клетки. Такие микроспоры являются потенциальными источниками увеличения ploидности пыльцы.

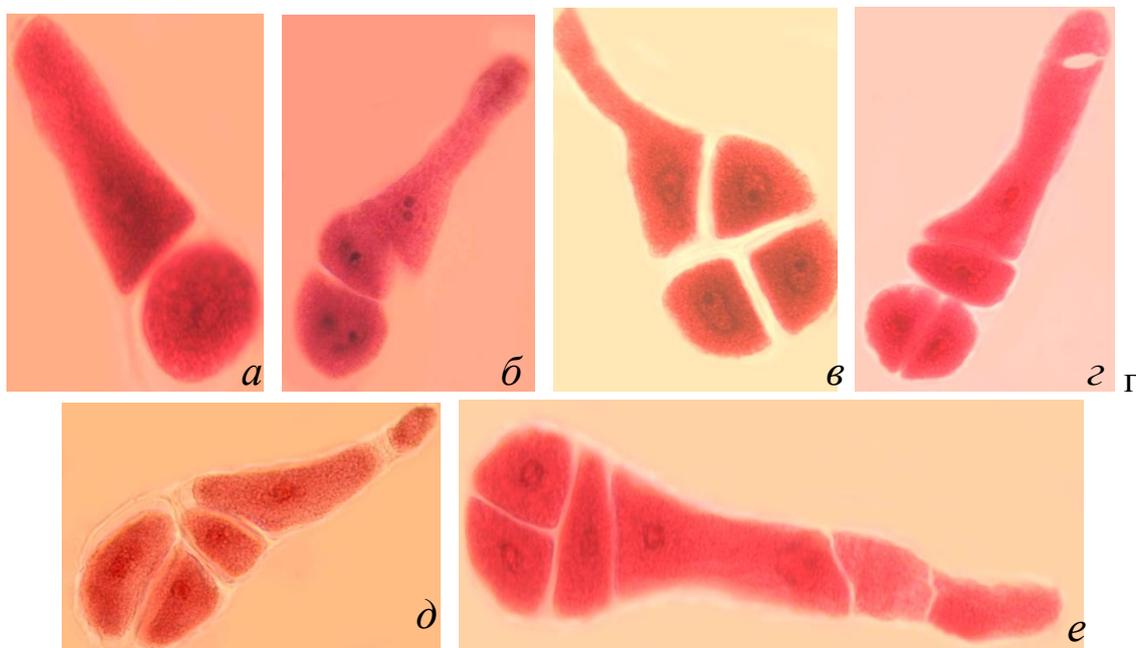


a – монада; *б*– рассеченная монада; *в* – диада с двумя ядрами в клетках; *г* – триада с одной и двумя ядрами в клетках; *д, е* – пентады; *ж* – гексада

Рисунок 7 – Типы спорад микроспор у тетраплоидной кукурузы.

Увеличение $\times 400$

На стадии сформировавшихся тетрад всех девяти проанализированных растений были обнаружены споряды, у которых одна из клеток имела атипично удлиненную форму. Аномально удлиненные микроспоры были обнаружены в диадах, триадах, тетрадах и даже в полиадах (рисунок 8).



a – диаде; *б* – триадах; *в, г* – тетрадах; *д* – пентаде; *е* – гексаде.

Рисунок 8 – Атипичная форма микроспор в спордах тетраплоидных растений. Увеличение $\times 400$

Частота спорад, содержащих микроспору атипичной формы, у тетраплоидных растений варьировала от 0,2 до 7,6 %. Во всех обнаруженных аномальных спорадах только одна микроспора имела атипично удлиненную форму. Наиболее часто микроспоры атипичной формы встречались в тетрадах микроспор.

Обнаружено, что частота пыльцы аномального строения у тетраплоидных растений в течение трех лет была различной (рисунок 9). Наименьшее количество аномальной пыльца образовалось в 2017 году (11,3 %) и ее содержание у отдельных растений было практически одинаковым. В 2015 году два растения достоверно отличались от двух других, что свидетельствует о возможности расщепления по признаку «качество пыльцы» в выборке растений этого года.

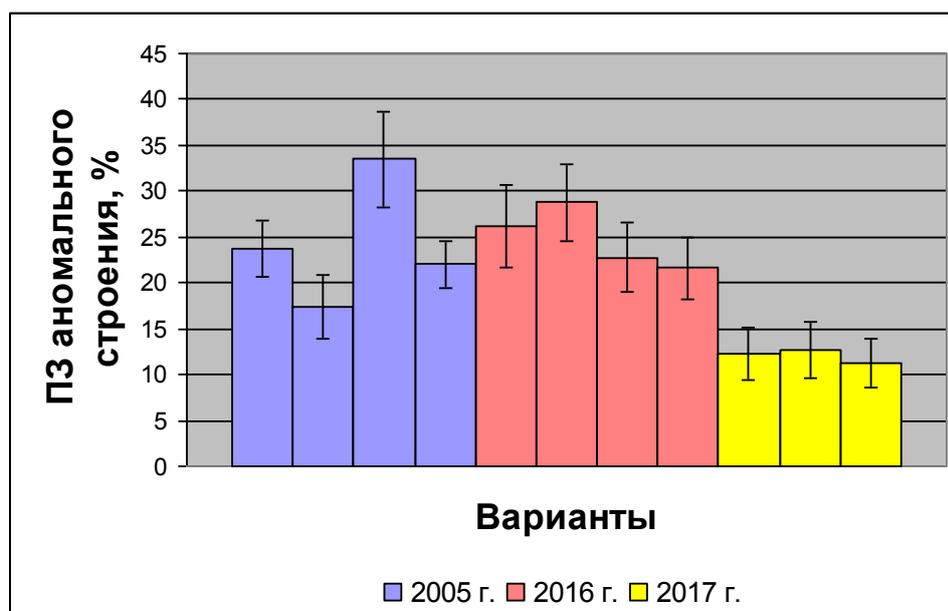


Рисунок 9 – Частота пыльцевых зерен аномального строения у тетраплоидных растений в разные годы

Заключение. Таким образом, структурно-морфологический анализ нормальной и измененной цитологической картины позволил выявить особенности микроспорогенеза у растений полиплоидных форм кукурузы. В частности, были описаны малоизвестные для кукурузы особенности цитокинеза, включающие его блокировку или неполный цитокинез в виде «насечек» или «тоннеля». Выявлены две группы специфических аномалий,

неизвестных или мало известных для кукурузы: это образование микроспороцитов атипичной формы и полиад, для выяснения механизмов появления которых необходимы дополнительные исследования.

Обнаруженные у тетраплоидных растений нарушения цито- и кариокинеза в ходе мейотических делений микроспороцитов являются причиной образования монад, триад, пентад и других атипичных вариантов спорад. Многие из этих вариантов могут быть связаны с образованием реституционных ядер и многоядерных микроспор. Эти аномалии имеют биологически значимые последствия и ведут, например, к формированию нередуцированных или анеуплоидных гамет. Многие из обнаруженных нарушений мейоза могут быть причиной частичной стерильности пыльцы у тетраплоидных и триплоидных растений. Однако высокий процент образования типичных микроспор свидетельствуют о возможности использования тетраплоида КрП-1 в селекции в качестве доноров диплоидных гамет. Не исключено также, что исследованная тетраплоидная форма является интересным материалом для исследования онтогенеза пыльцы и понимания разнообразных задач клеточной биологии.

ВЫВОДЫ

1. Частота микроспороцитов с нарушениями кариокинеза у различных тетраплоидных растений составила 4–12 %. Аномалии кариокинеза представлены отстаиванием хромосом в анафазе I и II, расположением отдельных хромосом вне основных хромосомных групп, образованием хромосомных мостов и трехполосных веретен деления.

2. Частота нарушений цитокинеза у разных тетраплоидных растений варьирует от 0 до 69 %, Нарушения цитокинеза представлены двумя основными типами: образованием неполной клеточной перегородки с внешней стороны или в центре клетки и отсутствием клеточной перегородки после мейоза I и/или мейоза II.

3. Различные вариации карио- и цитокинеза привели к образованию различных типов спорад: монад, диад, триад, атипичных тетрад и полиад. Их

появление свидетельствует о возможности образования у тетраплоидных растений нередуцированных и анеуплоидных пыльцевых зерен.

4. Выполненные пыльцевые зерна с различными отклонениями формируются у растений с частотой от 11,7 до 33,5 %. Аномальная пыльца представлена двумя основными типами: изменением числа клеточных элементов и атипичной формой пыльцевых зерен. Уменьшение или увеличение числа ядер в зрелой пыльце вызваны изменением числа митозов и дифференциации клеток в микрогаметогенезе.

5. Частота пыльцевых зерен атипичной формы у растений КрП-1 в среднем составила 2,5 %. Они различались по величине, внешнему виду, числу пор, клеточной структуре. Их образование может быть обусловлено нарушениями в микроспорогенезе и тетрадогенезе.

