

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра генетики

**ЗАВИСИМОСТЬ РАЗВИТИЯ ЗАРОДЫШЕВЫХ МЕШКОВ У
РАЗНЫХ ГЕНОТИПОВ ТАБАКА ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ**
АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы
Направления 06.04.01 Биология
Биологического факультета
Князевой Алины Константиновны

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

 08.06.19 Л.П. Лобанова
подпись, дата

Консультант
ведущий биолог лаб. биотехнологии
и репродуктивной биологии, к.б.н.

 08.06.19 А.Ю. Колесова
подпись, дата

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

 08.06.19 О.И. Юдакова
подпись, дата

Саратов 2019

Введение. Знание особенностей размножения растений является одним из фундаментальных направлений современной биологии. Женский гаметофит, или зародышевый мешок, является ключевым элементом системы размножения растений, в котором происходят процессы оплодотворения, развития зародыша и эндосперма. Осуществление этих событий и судьба следующего поколения зависят от структурно-функциональной организации зародышевого мешка.

Изучение изменчивости генеративных структур при экспериментально моделированных стрессах позволит определить размах их варибельности в условиях внешней среды, норму реакции генотипа, возможность индукции таких явлений, как апомиксис, полиэмбриония, полиплоидия. Известно, что тип развития и признаки зрелого ЗМ учитываются при ботанической характеристике вида и имеют таксономическое значение. Знания особенностей строения и изменчивости женских генеративных структур, вызванных экологическими факторами, позволят точнее использовать информацию о фенотипических вариациях в систематике и филогении. Исследование связи генетических особенностей растения с модификациями в строении ЗМ является также одной из наиболее интересных проблем биологии развития растений.

Формирование женского гаметофита представляет собой сложный и насыщенный цитологическими событиями процесс, включающий в норме у большинства видов три митотических деления, поляризацию после первого митоза, цитокинез, дифференцированный рост клеток и их специализацию. Сочетание различных нарушений в гаметогенезе может привести к большому числу фенотипических вариантов женского гаметофита. Анализ морфологических вариаций женского гаметофита показывает, что они могут быть обусловлены нарушениями одного или нескольких цитологических процессов в гаметогенезе.

Цель настоящей работы заключалась в анализе структуры зародышевых мешков у разных генотипов табака и выявлении зависимости их строения от температуры.

В задачи работы входило:

1) определение спектра изменчивости зародышевых мешков у разных генотипов табака при оптимальных температурных условиях;

2) количественная и качественная оценка зародышевых мешков, развитие которых проходило при низкой температуре;

3) количественная и качественная оценка зародышевых мешков, развитие которых проходило при высокой температуре.

Структура и объем работы. Работа изложена на 50 страницах машинописного текста и включает 6 разделов: введение, обзор литературы, экспериментальную часть, заключение, выводы, список использованных источников, содержащий 46 наименований.

Научная новизна и значимость работы. Дана сравнительная характеристика структуры женского гаметофита 5 сортов и 2-х линий табака. Впервые проведено сравнение реакции женского гаметофита табака на экстремальные температурные условия в зависимости от генотипа. Показана универсальность качественных изменений в структуре ЗМ при низкой и высокой температуре. Получена информация о диапазоне изменчивости числа клеточных элементов и клеточной дифференциации у разных генотипов.

Основное содержание работы. Из литературных данных следует, что для растений *N. tabacum* L. оптимальными температурами для вегетативного роста, цветения и образования семян является диапазон температур 20-28°C. Поэтому ЗМ всех сортов и линий табака, сформировавшиеся с 1-ядерной стадии до зрелого гаметофита в условиях *in vitro* при температуре 25°C, послужили контролем для изучения влияния температуры на развитие и строение ЗМ.

В контроле у разных генотипов количество ЗМ нормального строения варьировало от 82 до 97 %. (рисунок 1). Наиболее высокое содержание типичных ЗМ обнаружено у линий БГ-4 и БГ-5 (97 и 96 %). Сорта табака оказались более вариабельными по содержанию ЗМ нормального строения.

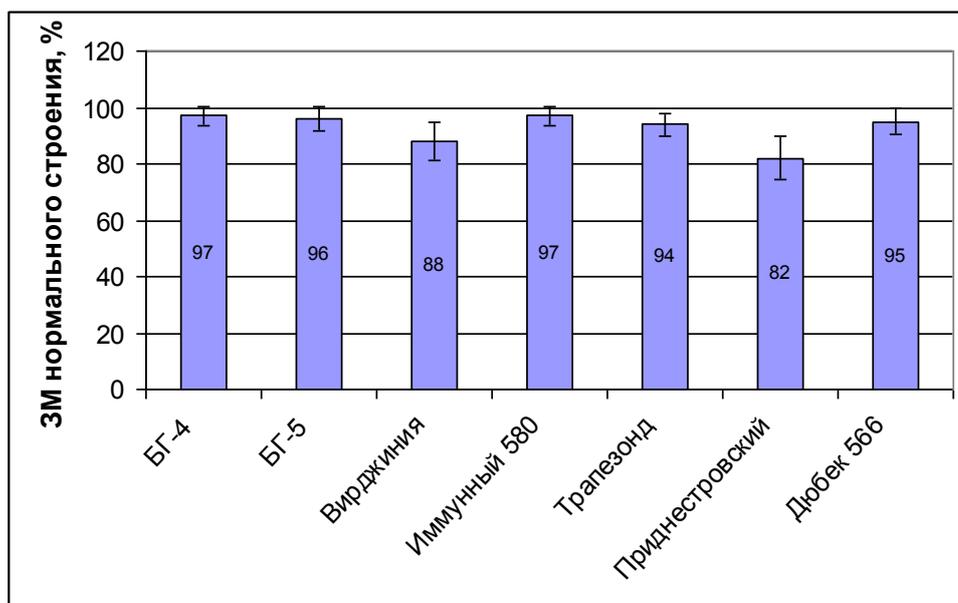
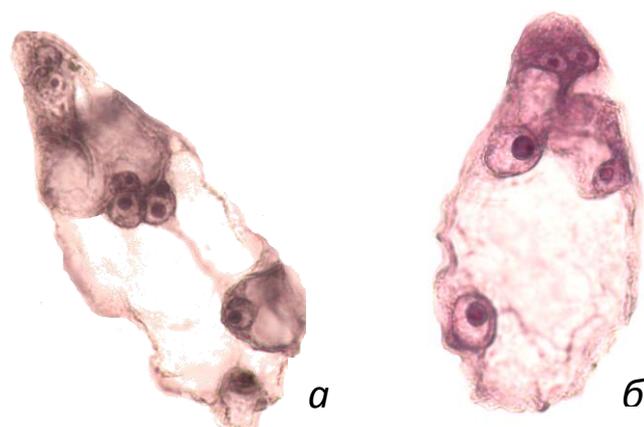


Рисунок 1 – Частоты зародышевых мешков нормального строения у разных генотипов табака при температуре 25°С

Нормальные ЗМ биполярны и содержат 7 клеток: 3-х клеточный яйцевой аппарат, центральную клетку и 3 антиподы. Яйцевой аппарат находится на микропиллярном полюсе ЗМ и состоит из яйцеклетки и 2-х синергид (рисунок 2). Яйцеклетка – женская гамета – четко отличается от синергид большим размером, довольно крупным ядром, сосредоточением цитоплазмы в апикальной части (там расположено ядро) и крупной вакуолью в базальной части. Синергиды обычно имеют небольшие ядра, расположенные в базальной части и небольшие вакуоли в апикальной. Три антиподы располагаются на халазальном конце ЗМ. Иногда антиподы отсутствуют из-за дегенерации клеток. Центральная клетка содержит два крупных гаплоидных полярных ядра или одно диплоидное вторичное или центральное. Ядра обычно располагаются рядом с яйцевым аппаратом и значительно реже на полюсах или в центре (таблица 1). Исключение составляет сорт Приднестровский, у которого в 36% ЗМ полярные ядра располагаются на полюсах, а у 21% - в центре. Число ЗМ со слившимися полярными ядрами доминирует у всех генотипов за исключением сорта Приднестровский. Только в трех вариантах у 5-6% ЗМ наблюдали расположение центрального ядра в центре, а у линии БГ-5 – у антипод (2%).



a – с полярными ядрами у яйцевого аппарата; *б* – с полярными ядрами на разных полюсах

Рисунок 2 – Зародышевые мешки табака нормального строения

Таблица 1– Характеристика ЗМ нормального строения при оптимальной температуре развития

Линии, сорта	ЗМ нормального строения, шт.	ЗМ со следующими признаками, %						я/ п син.
		ПЯ не слились			ПЯ слились			
		у яйце-клетки	в центре	на полюсах	у я/а	в центре	у анти-под	
БГ-4	100	37,0	6,0	12,0	38,0	6,0	0,0	1,0
БГ-5	95	12,6	2,1	6,3	69,5	6,3	2,1	1,1
Вирджиния	77	40,3	10,4	2,6	45,4	0,0	0,0	1,3
Иммунный 580	116	14,6	6,0	26,7	46,6	5,2	0,0	0,9
Трапезонд	66	33,3	9,1	15,1	42,4	0,0	0,0	1,5
Приднестровский	47	36,2	21,3	36,2	6,3	0,0	0,0	0,0
Дюбек 566	95	33,7	13,7	5,2	47,4	0,0	0,0	0,0

У двух линий и трех сортов были зарегистрированы зародышевые мешки с изменением локализации ядер и вакуолей в клетках яйцевого аппарата. Согласно ранее принятой классификации такие ЗМ были отнесены к субнормальным. При температуре развития 25°C наблюдалось образование только ЗМ с яйцеклеткоподобными синергидами, частота которых не превышала 1,5% (таблица 1).

Частота аномальных ЗМ при оптимальной температуре развития в разных вариантах составила 3-18%. Все возможные типы ЗМ аномального строения были объединены в 6 групп:

- 1) 1-6-ядерные или малоядерные, ценоцитные;
- 2) 1-6-ядерные, малоядерные, клеточные;
- 3) 7-8 ядерные или с нормальным числом ядер, ценоцитные;
- 4) 7-8-ядерные, клеточные;
- 5) 9 и более ядер или многоядерные, ценоцитные;
- 6) 9 и более ядер, многоядерные, клеточные.

При 25°C аномальные гаметофиты были представлены в основном ценоцитными ЗМ с числом ядер менее 7.



Рисунок 3 – Частоты типов ЗМ в завязях разных генотипов, развитие которых проходило при температуре 25°C

Таким образом, при оптимальной температуре (25°C) у изученных сортов и линий в большей части семязачатков формировались 8-ядерные ЗМ типичного строения, состоящие из двух синергид, яйцеклетки, центральной клетки с 2 полярными ядрами и трех антипод.

Анализ ЗМ, развитие которых проходило при температуре 10°C, показал, что частота образования ЗМ нормального строения значительно снизилась по сравнению с контролем. У четырех генотипов их количество составило 33-40%, а у трех 2-12% (рисунок 4).

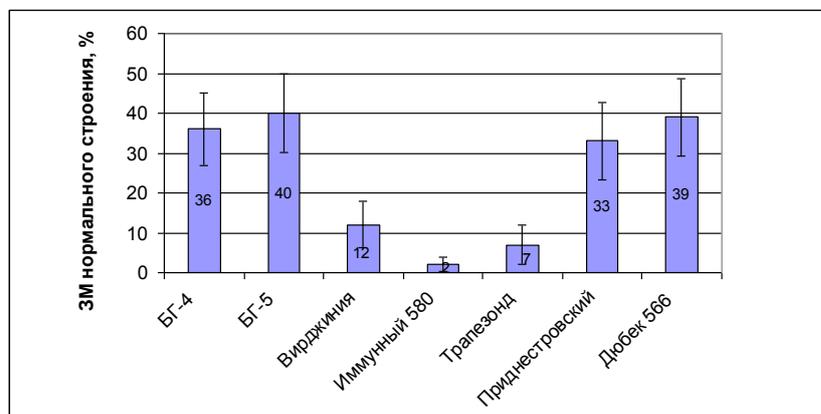


Рисунок 4 – Частоты ЗМ нормального строения у разных генотипов табака при температуре 10°C

Качественный анализ ЗМ нормального строения показал, что низкая температура значительно угнетает нормальную дифференцировку центральной клетки. У всех сортов и линий доминируют ЗМ с не слившимися полярными ядрами, расположенными на полюсах (таблица 2).

Изменение дифференциации клеток яйцевого аппарата в ЗМ типичного строения при низкой температуре проявилось в появлении у линии БГ-4 и сорта Приднестровский 2,3-3% ЗМ с яйцеклеткоподобными синергидами. Синергидоподобные яйцеклетки высокой частотой обнаружены только у сорта Дюбек 566 (7,6%).

При низкой температуре значительно увеличилось образование ЗМ аномального строения, вызванное в основном остановкой развития на ранних стадиях. Число малоядерных ЗМ с незавершенным развитием варьировало от 60 до 91%. Остановка развития, как правило, происходила на 2-4-ядерной стадиях. У всех сортов и линий при низкой температуре доминировали ценоцитные ЗМ с уменьшенным числом ядер (рисунок 5). Остальные типы

ЗМ аномального строения у разных генотипов встречаются с разной частотой и какой-либо закономерности не обнаружено.

Таблица 2 – Анализ зародышевых мешков нормального строения разных генотипов табака при 10°C

Линии, сорта	ЗМ нормального строения, шт.	ЗМ со следующими признаками, %						с/п я/кл	я/п син
		ПЯ не слились			ПЯ слились				
		у я/а	в центре	на полюсах	у я/а	в центре			
БГ-4	43	0,0	2,3	95,4	0,0	0,0	0,0	2,3	
БГ-5	43	37,2	7,0	44,2	11,6	0,0	0,0	0,0	
Вирджиния	16	25,0	0,0	75,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Иммунный 580	20	0,0	0,0	50,0	50,0	0,0	0,0	0,0	
Трапезонд	18	0,0	0,0	75,0	25,0	0,0	0,0	0,0	
Приднестровский	33	12,1	6,1	72,7	3,0	3,0	0,0	3,0	
Дюбек 566	13	0,0	0,0	46,2	46,2	0,0	7,6	0,0	

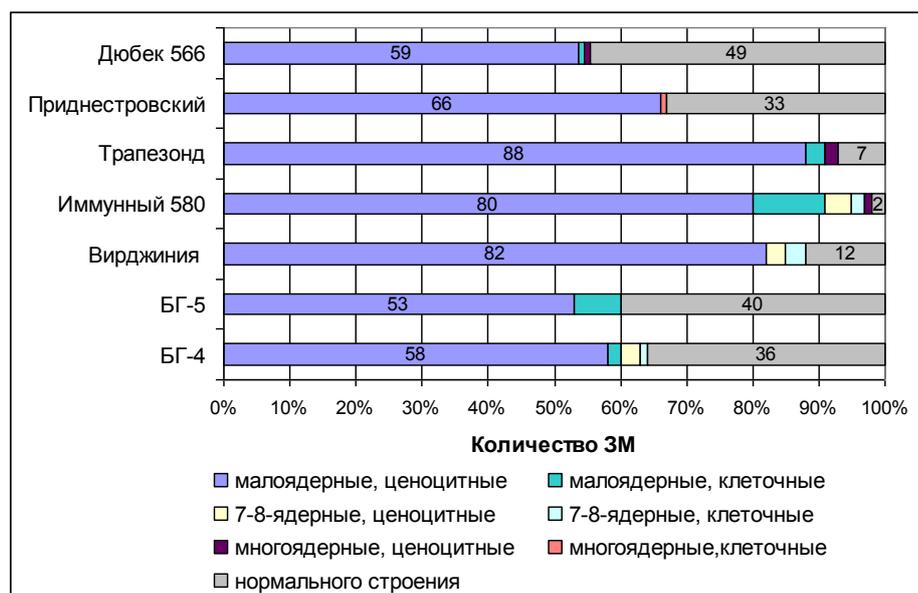


Рисунок 5 – Частоты типов ЗМ в завязях разных генотипов, развитие которых проходило при температуре 10°C

Таким образом, влияние низкой температуры на развитие ЗМ проявляется в угнетении митотических делений и цитокинеза в гаметогенезе, что приводит к образованию многочисленных ценоцитных малоядерных зародышевых

мешков. В ЗМ типичного строения низкая температура препятствует слиянию полярных ядер и миграции халазального полярного ядра к яйцевому аппарату.

Структура зародышевых мешков, гаметогенез которых проходил при температуре 37°C в значительной степени зависит от генотипа сорта или линии. Так, количество ЗМ нормального строения варьирует у разных генотипов от 3 до 70% (рисунок 6). Наименьшее число типичных ЗМ при высокой температуре образуется у сорта Иммунный 580, а наибольшее у линии БГ-6.

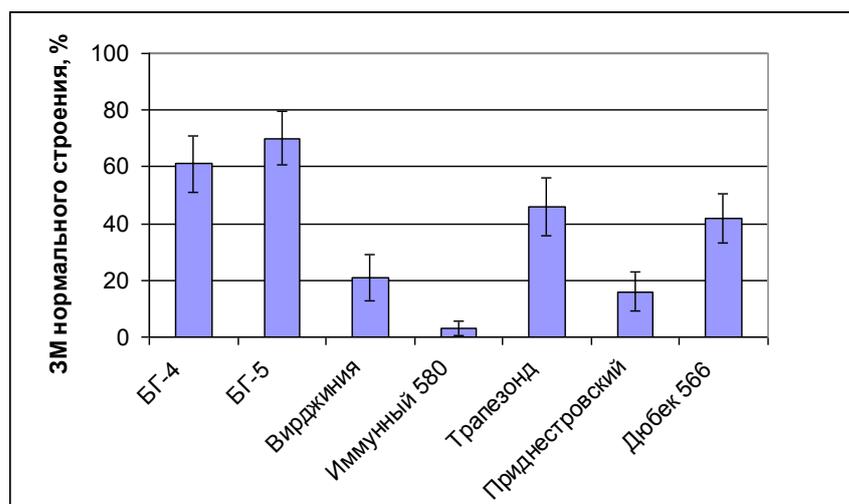


Рисунок 6 – Частоты ЗМ нормального строения у разных генотипов табака при температуре 37°C

Отмеченные вариации касаются в основном состояния полярных ядер (слились – не слились). Такая изменчивость рассматривается как изменчивость в границах нормы. Специфика действия высокой температуры на ЗМ нормального строения проявляется в подавлении слияния полярных ядер, но в отличие от низкотемпературного воздействия не слившиеся полярные ядра располагаются в основном не на полюсах, а у яйцевого аппарата (таблица 3).

У сорта Приднестровский были зарегистрированы зародышевые мешки с изменением локализации ядер и вакуолей в клетках яйцевого аппарата и образованием яйцеклеткоподобных синергид (5%). Как отмечалось ранее, такие ЗМ относятся к субнормальным.

Таблица 3 – Анализ зародышевых мешков нормального строения разных генотипов табака при температуре 37°C

Линии, сорта	ЗМ нормального строения, шт.	ЗМ со следующими признаками, %						я/п син
		ПЯ не слились			ПЯ слились			
		у я/а	в центре	на полюсах	у я/а	в центре	у антипод	
Вирджиния	23	65,2	17,4	4,3	13,0	0,0	0,0	0,0
Иммунный 580	30	100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Приднестровский	20	60,0	30,0	0,0	5,0	0,0	0,0	5,0

Аномальные зародышевые мешки значительно различались по количеству ядер, их расположению относительно друг друга и по наличию или отсутствию клеточных перегородок. Это были малоядерные ЗМ (с числом ядер менее 7), нормальным числом ядер (с 7-8 ядрами) и многоядерные (число ядер более 8). В каждой группе встречались ЗМ с клеточной дифференцировкой и с отсутствием клеточной дифференцировки (ценоцитные).

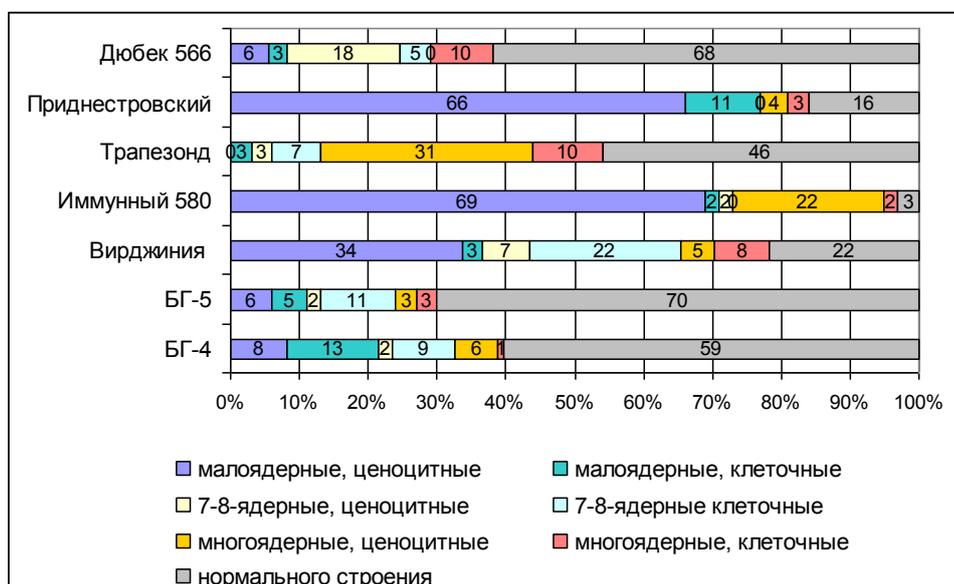


Рисунок 8 – Частоты типов ЗМ в завязях разных генотипов, развитие которых проходило при температуре 37°C

Главное отличие высокотемпературного воздействия на развитие ЗМ от других температурных вариантов заключалось в образовании значительного количества многоядерных ЗМ. Частота таких ЗМ у изученных форм

значительно варьировала: от 6 до 41%. Среди многоядерных доминировали ЗМ с дополнительными клетками и/или ядрами. У сортов Дюбек 566 и Вирджиния среди многоядерных ЗМ преобладали клеточные, а у сортов Иммунный 580 и Трапезонд – ценоцитные. Максимальное число ядер в клеточных ЗМ составило 24, в ценоцитных – 50. Наиболее часто формировались мегагаметофиты с числом ядер от 9 до 16. В многоядерных клеточных ЗМ наблюдались дополнительные полярные ядра или клетки, расположенные латерально или в яйцевом и/или антиподальном аппаратах. В многоядерных ценоцитных ЗМ ядра чаще всего были равномерно распределены по всей крупной клетке. Среди аномально дифференцированных 7-8-ядерных ЗМ преобладали мегагаметофиты с тремя полярными ядрами (до 10%). Реже встречались клеточные ЗМ с числом ядер меньше 7.

Заключение. Проведенное исследование выявило высокую изменчивость процессов гаметогенеза под влиянием низкой и высокой температуры. У всех изученных сортов и линий табака экстремально низкая температура (10°C) вызывала остановку развития ЗМ на ранних стадиях в значительной части семязачатков, а высокая температура (37°C) индуцировала дополнительные митотические деления и подавляла процесс заложения клеточных стенок. Высокая и низкая температуры нарушали также процесс дифференциации ЗМ. Спектр нарушений в развитии женского гаметофита сходен у разных сортов и линий табака, а частота возникновения разных типов аномалий в значительной степени определяется генотипом растений.

Полученные данные показывают возможность целенаправленной модификации женского гаметофита растений экстремальными температурами. Выявленные изменения, индуцированные температурными условиями, представляют интерес для понимания механизмов развития ЗМ и могут быть полезны при решении ряда проблем цитозембриологии и, в частности, экологической эмбриологии.

ВЫВОДЫ

1. Развитие зародышевых мешков табака возможно при всех исследованных температурных режимах. При оптимальной температуре (25°C) у изученных сортов и линий в большей части семязачатков формируются 8-ядерные ЗМ типичного строения.
2. При нормальной температуре у разных генотипов формируется от 3 до 18% ЗМ аномального строения. При 10°C доля ЗМ аномального строения возрастает до 30-97%, а при 37°C – до 60-91%.
3. Действие низкой и высокой температур на развитие ЗМ различается по морфологическому эффекту. Низкая температура вызывала остановку развития ЗМ на ранних стадиях, что приводило к образованию ценоцитных ЗМ с числом ядер менее восьми. Высокая температура индуцировала дополнительные ядерные деления в гаметогенезе и вызывала образование ценоцитных и клеточных ЗМ с числом ядер более 8.
4. Высокая и низкая температуры вызывали специфические изменения в дифференцировке клеток ЗМ с типичной структурой, влияя на расположение полярных ядер, их состояние и дифференциацию клеток яйцевого аппарата.
5. Спектр нарушений в развитии женского гаметофита сходен у разных сортов и линий табака, а частота возникновения разных типов аномалий в значительной степени определяется генотипом растений.
6. Таким образом, структурная организация зародышевых мешков может быть существенно изменена внешними факторами, влияние которых следует учитывать при диагностике систем размножения, в систематике и эмбриологии.

